

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувачка кафедри професор Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ, СПЕЦИФІЧНИХ ДО  
КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю 091 Біологія

Морміль Олександри Юріївни

Науковий керівник від кафедри

Кандидат біологічних наук, доцент

Харіна А.В.

Робота виконана на базі ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна»

під керівництвом доктора філософії Корнієнко Н.О.

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2024 р.**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БСА	–	Бортницька станція аерації
БУО	–	бляшкоутворююча одиниця
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
НК	–	негативна колонія
НПБК	–	ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна»
ORF	–	open reading frame, відкрита рамка зчитування

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Загальна характеристика <i>Klebsiella pneumoniae</i> , механізмів її резистентності та застосування бактеріофагів.....	7
1.1. Характеристика <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	7
1.2. Огляд механізмів резистентності <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	11
1.2.1. Резистентність до аміноглікозидів .....	12
1.2.2. Резистентність до $\beta$ -лактамів .....	13
1.2.3. Резистентність до хінолонів.....	14
1.2.4. Резистентність до поліміксину .....	16
1.2.5. Резистентність до тигецикліну .....	17
1.3. Терапевтичне застосування бактеріофагів .....	18
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень.....	22
2.1. Матеріали .....	22
2.1.1. Бактеріофаги .....	22
2.1.2. Культури бактерій.....	22
2.1.3. Синтетична сеча .....	22
2.2. Методи досліджень .....	23
2.2.1. Культивування бактерій .....	23
2.2.2. Виділення бактеріофагів .....	24
2.2.3. Визначення спектру літичної активності бактеріофагів.....	25
2.2.4. Титрування бактеріофагів .....	25
2.2.5. Накопичення бактеріофагів.....	26
2.2.6. Електронна мікроскопія .....	27
2.2.7. Перевірка стабільності досліджуваних бактеріофагів .....	27
2.2.8. Виділення ДНК та сиквенування геному .....	29
2.2.9. Статистична та біоінформатична обробка даних .....	29
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та обговорення .....	30
3.1. Первинна характеристика бактеріофагів.....	30

3.2. Спектр літичної активності досліджуваних бактеріофагів.....	33
3.3. Морфологія негативних колоній досліджуваних зразків .....	34
3.4. Морфологія досліджуваних бактеріофагів.....	37
3.5. Стабільність досліджуваних бактеріофагів.....	40
3.6. Характеристика геному бактеріофага Кр 29 .....	41
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>44</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>45</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>64</b>

## ВСТУП

Рівень стійкості бактерій до антибіотиків зростає у всьому світі, створюючи серйозні виклики для системи охорони здоров'я. Раніше антибіотикорезистентні штами виявляли лише у лікарнях, але тепер вони розповсюджені по всьому світу. За прогнозами, до 2050 року не залишиться ефективних антибіотиків, якщо не буде розроблено нових препаратів [1]. Багато інфекцій супроводжуються високими рівнями захворюваності, смертності і витрат на лікування. Антимікробна резистентність стала однією з найважливіших проблем охорони здоров'я у XXI столітті, вона ставить під загрозу ефективне лікування та профілактику все більшої кількості бактеріальних інфекцій [2]. Механізми антимікробної резистентності включають здатність бактерій руйнувати антибіотики, модифікувати свої білки та змінювати проникність мембрани для ліків [3]. За кілька десятиліть бактерії, що викликають інфекції, стали стійкими у різних ступенях до більшості доступних на ринку антибіотиків. Можливості лікування захворювань зменшуються через поширення бактерій, що стали стійкими до ліків та мають нові механізми резистентності [4].

Найпоширеніші та найсерйозніші грамнегативні інфекції у медичних установах спричиняються ентеробактеріями, переважно *Klebsiella pneumoniae*, сальмонелами та *Escherichia coli* [5, 6]. *K. pneumoniae* є одним з найбільш поширених грамнегативних патогенів, що викликає широкий спектр інфекцій позалікарняного та лікарняного походження, таких як інфекції сечовивідних шляхів, пневмонія, внутрішньочеревна інфекція, бактеріємія, менінгіт і піогенні абсцеси печінки [7]. За останні десятиліття гостро зросла поширеність стійких до цефалоспоринів штамів *K. pneumoniae*, які продукують  $\beta$ -лактамази розширеного спектру дії [8]. Ці ферменти гідролізують  $\beta$ -лактамне кільце, забезпечуючи інактивацію антибіотиків, таких як пеніцилін та цефалоспорин. Третє покоління цефалоспоринів може бути неефективним у лікуванні через здатність  $\beta$ -лактамази пригнічувати оксिमіноцефалоспорини [9]. Згідно зі звітом Центру контролю та профілактики захворювань (CDC) за 2019 рік, 80%

з 9000 інфекцій, спричинених карбапенем-резистентними ентеробактеріями у 2013 році, були викликані резистентною *K. pneumoniae* [10]. ВООЗ класифікувала карбапенем-резистентні ентеробактерії як найвищий пріоритет у списку патогенів, що становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини [11].

Необхідно розглянути нові методи для контролю поширення антибіотикорезистентних бактерій. Фаготерапія використовується для боротьби з патогенними бактеріями, особливо з множинними антибіотикорезистентними інфекціями, а також як потенційний протизапальний та імуномодулюючий засіб [12]. Терапевтичний потенціал бактеріофагів полягає в їхній специфічності та здатності індукувати летальні ефекти у бактерій-хазяїнів шляхом лізису клітин [13]. Для лікування можна використовувати лише вірулентні фаги, які атакують певні штами бактерій та сприяють літичній інфекції, що зменшує кількість бактеріальних клітин у організмі до рівня, який не становить небезпеки або шкоди для організму [14].

Фаги *K. pneumoniae* були виділені з різних джерел – стічні води [15], ставки [16], річки [17], моря [18], сільськогосподарські стічні води [19], водопοї [20] та фекалії тварин [21]. Серед них найбільш розповсюдженими джерелами є стічні води лікарень [22, 23, 24, 25, 26]. Більшість виділених бактеріофагів *K. pneumoniae* належать до класу Caudoviricetes і характеризуються ДНК геномом, хвостом і відсутністю оболонки [27]. Однак також було виявлено безхвостий фаг *K. pneumoniae* з морфотипом тектівірусу [16]. Крім того, багато з виділених фагів *K. pneumoniae* проявляли активність проти капсули та біоплівки, експресуючи різні типи полісахаридних деполімераз [28, 29].

З огляду на зростаюче занепокоєння стійкістю бактерій до антибіотиків, інтерес до фаготерапії як потенційного рішення цієї проблеми стрімко зростає. Саме тому мета роботи полягала у виділенні та характеристиці ізолятів бактеріофагів *Klebsiella pneumoniae*.

## РОЗДІЛ 1

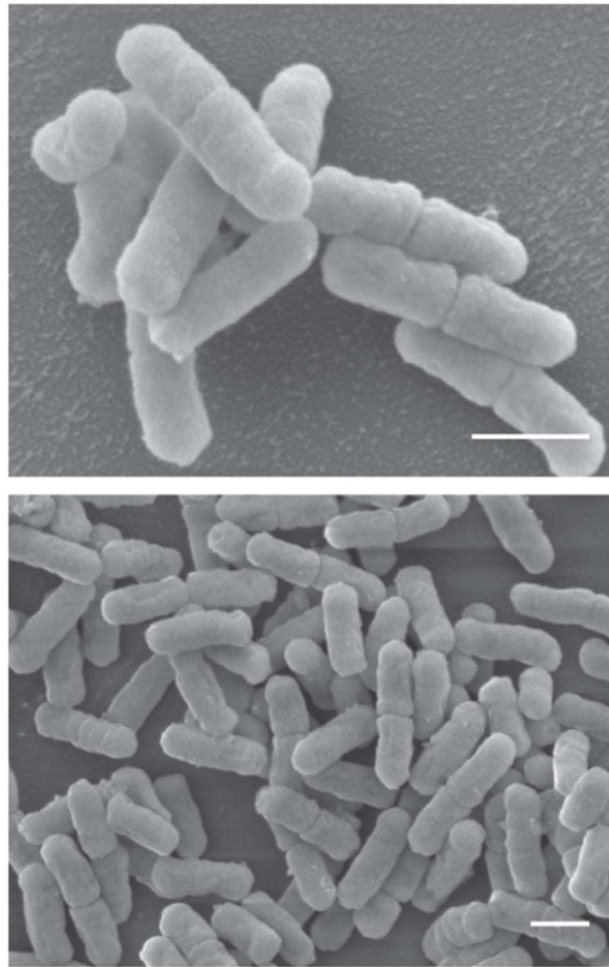
### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, МЕХАНІЗМІВ ЇЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), умовно-патогенна бактерія, здатна колонізувати поверхні слизових оболонок і мігрувати в інші тканини, що призводить до летальних інфекцій. Медичне обладнання та приміщення також можуть бути колонізовані штамми цієї бактерії, які широко розповсюджені в природі. Крім того, значна кількість позалікарняних захворювань у всьому світі пов'язана з цим мікроорганізмом. Такі інфекції характеризуються високим рівнем захворюваності та смертності, а також здатністю до метастатичного поширення. Вважається, що з цими інфекціями пов'язані гіпервірулентні штами *K. pneumoniae*. Патогенність цієї бактерії залежить від чотирьох ключових елементів: капсули, ліпополісахариду, фімбрії та сидерофорів. Сидерофори, вторинні метаболіти, відіграють важливу роль у поглинанні заліза з навколишнього середовища і транспортуванні його всередину бактерії [30]. На колонізацію *K. pneumoniae* певних територій можуть впливати різні фактори, включаючи місцеву систему охорони здоров'я, використання та зловживання антибіотиками, методи боротьби з інфекціями, харчові звички, стать і вік.

#### 1.1. Характеристика *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* належить до родини Enterobacteriaceae, яка включає також такі поширені патогени, як *Escherichia coli*, *Salmonella* та *Shigella* [31]. Це нерухома, паличкоподібна бактерія, розміром 0,3-2,0 мкм в ширину і 0,6-6,0 мкм в довжину, з характерним мукоїдним покриттям на агарі (рис 1.1, 1.2). *K. pneumoniae* може рости як в аеробних (з киснем), так і в анаеробних (без

кисню) середовищах, оскільки є факультативним анаеробом. З біохімічного погляду, вона ферментує лактозу, має позитивну реакцію на каталазу та негативну на цитохромоксидазу.



**Рис 1.1.** Мікрофотографія. Скануюча електронна мікроскопія планктонних бактерій *K. pneumoniae* [32]. Збільшення:  $\times 200\ 000$  верхнє зображення,  $\times 10\ 000$  нижнє зображення. Розмір лінійки становить 1 мкм

Характерною рисою *K. pneumoniae* є її капсула. Бактерія утворює виражений позаклітинний полісахаридний шар, що оточує клітину (рис 1.3). Ця капсула виступає як бар'єр, захищаючи бактерії від імунної відповіді хазяїна [33]. Вона допомагає уникнути фагоцитозу, збільшує стійкість до внутрішньоклітинної ліквідації та імітує глікани хазяїна, що сприяє виживанню бактерій. Втрата капсули може знизити вірулентність *K. pneumoniae* [34]. Синтез капсули контролюється локусом капсульного

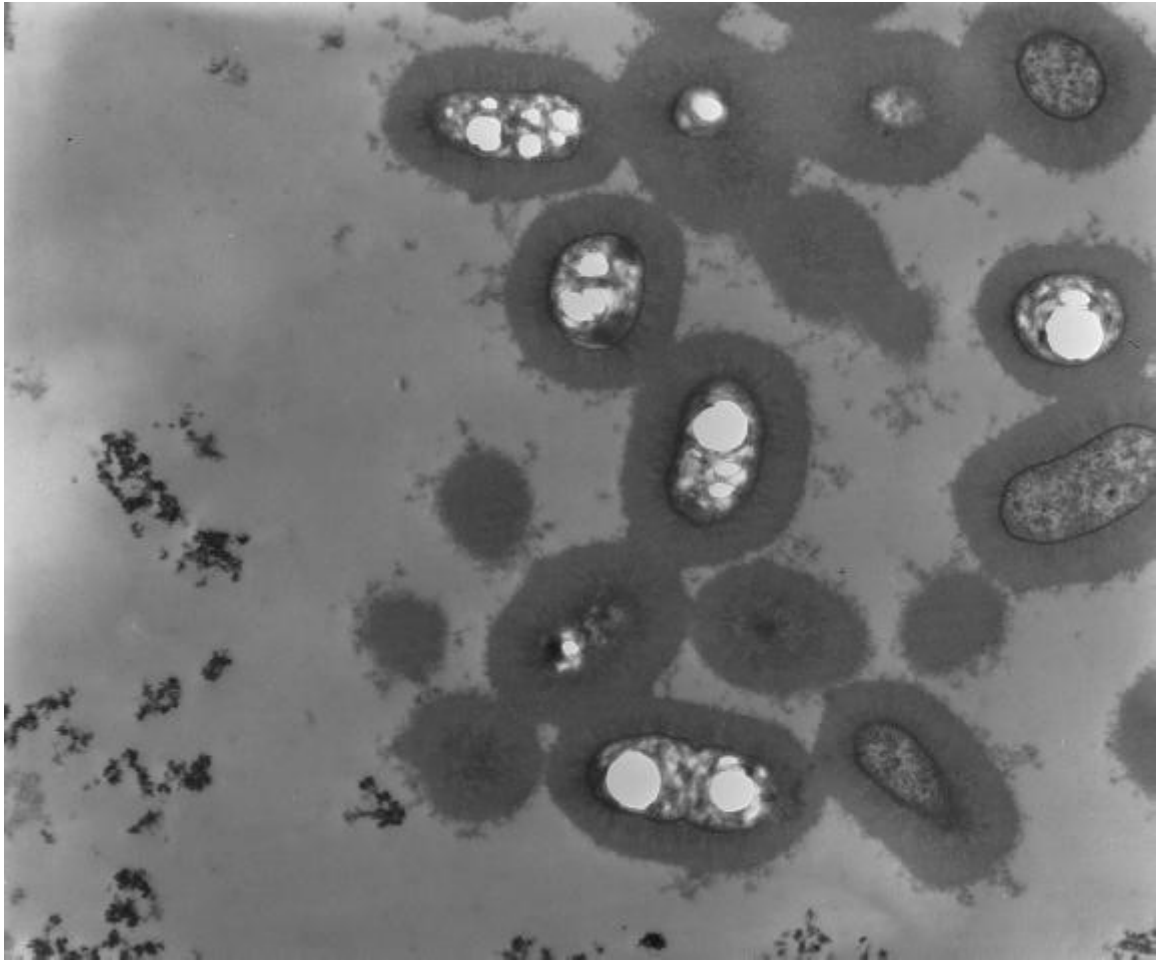
полісахариду (cps), який містить декілька генів. Відомо, що *K. pneumoniae* продукує щонайменше 79 типів капсул [35], які відрізняються структурою та компонентами полісахаридної одиниці [33]. У штамів високовірулентної *K. pneumoniae*, особливо серотипів K1 і K2, спостерігається гіперкапсуляція [36], і її регулюють специфічні гени вірулентності, такі як *s-rmpA*, *s-rmpA2*, *p-rmpA*, *p-rmpA2* і *wzy-K1* [37].



**Рис 1.2.** Фотографія чашки Петрі. *Klebsiella pneumoniae* утворює негемолітичні сіро-білі, мукоїдні колонії на агарі з овечою кров'ю [38]

Як грамнегативні бактерії, класичні і гіпервірулентні штами *K. pneumoniae* мають у своїй зовнішній мембрані ліпополісахариди (ЛПС), які також відомі як ендотоксини. ЛПС складається з ліпиду А, основного олігосахариду та О-антигенів, що допомагають захищати бактерії від комплемент-опосередкованого знищення [39]. У *K. pneumoniae* існує

принаймні 8 різних серотипів O-антигенів, причому антиген O1 є найпоширенішим серед клінічних штамів.



**Рис 1.3.** Мікрофотографія. Трансмисійна електронна мікроскопія клітин *K. pneumoniae*, оточених товстими шарами фібрилярного капсульного матеріалу [40]

Крім того, у штамів *K. pneumoniae* поширені два типи фімбрій: типу 1 і 3, які кодуються оперонами *fim* і *mrkABCD*, відповідно [41]. Вони сприяють адгезії бактерій, їхній інвазії в клітини хазяїна та формуванню біоплівки.

Стандартні штами *K. pneumoniae*, які вважаються умовно-патогенними, часто викликають захворювання у людей зі слабким імунітетом або тих, у кого імунітет ослаблений іншими інфекціями. Однак гіпервірулентний варіант *K. pneumoniae* може також інфікувати здорових осіб, що призводить до розвитку серйозних інфекцій, таких як піогенний абсцес печінки, менінгіт,

некротичний фасцит, ендoftальміт і важка пневмонія. Зазвичай розвитку внутрішньолікарняних інфекцій передуює колонізація шлунково-кишкового тракту *K. pneumoniae*, яка може також розповсюджуватися до сечовивідних та дихальних шляхів, а також крові [42]. Ще одним аспектом інфекцій *K. pneumoniae* є її здатність утворювати біоплівку на медичному обладнанні, такому як катетери та ендотрахеальні трубки, що створює значне джерело інфекції для хворих, які піддаються катетеризації [43]. Нозокоміальні інфекції, спричинені *K. pneumoniae*, часто мають хронічний перебіг через розвиток біоплівок, що не вразливі до впливу імунітету в організмі та виробництво ферментів, що можуть інактивувати антибіотики, наприклад,  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії або карбапенемази, затруднюючи для лікарів пошук ефективного антибіотика для лікування [44]. Розробка нових антимікробних препаратів і схем лікування має важливе значення для боротьби з інфекціями, спричиненими *K. pneumoniae*, щоб оптимізувати використання ресурсів та підвищити ефективність медичної допомоги.

## 1.2. Огляд механізмів резистентності *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* має додаткові генетичні структури, наприклад плазміди. Цей вид бактерій можна класифікувати на три типи: опортуністичні, гіпервірулентні (hvKp) та мультирезистентні [45]. Дотепер більшість інфекцій *K. pneumoniae* були спричинені класичними штамми (сKp), що активно розповсюджувалися в лікарнях та інфікували вразливих пацієнтів. Хоча штамми сKp і hvKp подібні, hvKp відрізняються виразністю вірулентних властивостей. Інфекції hvKp часто виникають у різних ділянках організму і згодом розповсюджуються, що ускладнює їх лікування та контроль. Зростання стійкості до антибіотиків є актуальною проблемою. Мультирезистентна *K. pneumoniae* володіє генами стійкості, що локалізуються на плазмідах. При неконтрольованому застосуванні антибіотиків бактерія активно накопичує

такі гени, що може призвести до виникнення штамів з екстремальною резистентністю [46]. Тому дослідження механізмів вірулентності та резистентності *K. pneumoniae* є нагальною потребою.

### 1.2.1. Резистентність до аміноглікозидів

Аміноглікозиди, які можуть пригнічувати синтез білка бактерій, широко застосовувалися в антибактеріальній терапії з 1940 до 1980 років, але потім їх замінили карбапенеми, цефалоспорини та фторхінолони [47]. За цей період *K. pneumoniae* набула механізмів антибіотикорезистентності, ними стали ферменти, що модифікують препарати (аденилювання, ацетилювання та фосфорилування). Протягом десятиліть у *K. pneumoniae* були виявлені плазмідно-опосередковані гени резистентності родин *aac*, *aph* та *ant*. Зменшення застосування аміноглікозидів сповільнило процес виникнення нових генів резистентності, поки не з'явилася 16S рРНК-метилаза, яка кодується генами з групи *armA* і блокує зв'язування аміноглікозидів з 16S рРНК [48]. Хоча ферменти, що модифікують ліки, є специфічними, 16S рРНК-метилаза надає стійкості майже до всіх аміноглікозидів, включаючи плазоміцин та нові аміноглікозиди [49]. Однак дослідження, проведене Cirit та ін. у 2019 році, вказує на те, що резистентність до аміноглікозидів у *K. pneumoniae* переважно обумовлена геном *aac(3)-II*, а не 16S рРНК-метилазою [50]. Про хромосомне розташування генів *armA* у *K. pneumoniae* повідомлялося лише раз [51]. Інші відомі плазміди, які впливають на активність 16S рРНК-метилаз, такі як *NpmA* та *Rmt*, також були виявлені у *K. pneumoniae* [47], але поки немає доказів їх хромосомної локалізації.

Механізм хромосомної толерантності *K. pneumoniae* до аміноглікозидів зумовлений змінами в клітинній проникності (через модифікації ефлюкських насосів *KpnEF* і *AcrAB-TolC*, що передбачає втрату поринів *KpnO*) і генами аміноглікозид-модифікуючих ферментів. Відсутність *AcrAB-TolC*

підвищувала чутливість до тобраміцину і гентаміцину [52], у той час як мутант *kpnEF* проявляв значну стійкість до тобраміцину і спектиноміцину [53], але не до гентаміцину та стрептоміцину. Це вказує на те, що осмотичний апарат бактерії має різну спорідненість до різних аміноглікозидів. Дослідження показали, що білки пор *KpnO* *in vitro* прямо впливають на резистентність до аміноглікозидів, зокрема тобраміцину, стрептоміцину і спектиноміцину [54]. У клінічних штамів *K. pneumoniae* не виявлено мутацій, які зумовлюють резистентність шляхом модифікації мішені, таких як *gpsL* або *rrs*. Вони можуть бути рідкісними через високі витрати на пристосування та знижену вірулентність, пов'язану з мутаціями *gpsL* [55]. Серед штамів *K. pneumoniae*, що резистентні до гентаміцину або амікацину, найбільш поширеними є асс (6')-Ib, асс (3')-II, арh (3')-IV та ант (3')-I [56]. Окрім того, резистентність до аміноглікозидів спостерігалася у штамів з  $\beta$ -лактамазною активністю, ізольованих у Туреччині, які містять гени *gmtC* та *blaNDM-1* у плазмідах [57]. Тому важливо звертати увагу не лише на появу генів резистентності до аміноглікозидів, але й на мультирезистентність *K. pneumoniae*.

### 1.2.2. Резистентність до $\beta$ -лактамів

$\beta$ -лактамі антибіотики застосовуються в клінічній практиці з 1940-х років і є основним класом протимікробних препаратів. Відтоді у мікроорганізмів, які спричиняють кишкові захворювання, з'явилися тисячі різних  $\beta$ -лактамаз [58].

Резистентність *K. pneumoniae* до пеніциліну була виявлена вперше в 1960-х роках, що спричинило відкриття перших генів  $\beta$ -лактамаз, таких як *blaSHV-1* і *blaTEM-1*. Через двадцять років був виявлений перший ген  $\beta$ -лактамази широкого спектру дії *blaSHV-2* у штамі з німецької інтенсивної терапії. Цей ген демонструє високу стійкість до  $\beta$ -лактамів, включаючи цефалоспорини та монозоаміни. У Франції було також виявлено плазмідний варіант цього гена

blaTEM-3 [59]. У 1990-2000-х роках *K. pneumoniae* стала основним збудником внутрішньолікарняних інфекцій з  $\beta$ -лактамазами розширеного спектру. У лікарнях Іраку та Іспанії 40% клінічних штамів *K. pneumoniae* мають гени  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру [60]. Штам з основними генами  $\beta$ -лактамази blaTEM і blaSHV став домінуючим у багатьох країнах [61]. У 2000 році завдяки плазмідам і транспозонам, що кодують гени типу blaCTX-M, гени  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру в *K. pneumoniae* були змінені внаслідок ятрогенних спалахів [62]. Дослідження показали, що резистентність до  $\beta$ -лактамінів може активуватися через ген gamA. Протеомні аналізи висвітлюють роль ефлюкських насосів у цьому процесі [63].

Інший тип генів  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру дії передається *K. pneumoniae* шляхом горизонтального перенесення, наприклад гени типу blaOXA [64] і рідкісні гени blaGES і blaSFO [65] або blaPER, blaTLA і blaVEB [66] і blaKLUC-5 [67]. Крім того, з'явилися гени  $\beta$ -лактамаз, які частково чутливі до тазобактаму і клавуланової кислоти [58]. Протягом останніх років кількість штамів *K. pneumoniae*, які мають гени  $\beta$ -лактамаз розширеного спектру, зросла у всьому світі.

### 1.2.3. Резистентність до хінолонів

Хінолонові антибіотики взаємодіють з топоізомеразами бактерій, пригнічуючи реплікацію ДНК. Вони застосовуються в медицині з 1960-х років, але стали більш популярними у 1980-х роках після використання фторхінолонів першого класу, яке призвело до збільшення резистентності бактерій до цієї групи антибіотиків [68]. Механізми, які призводять до резистентності *K. pneumoniae* до фторхінолонів, включають мутації у генах-мішенях, продукування резистентного ефлюкського насоса і модифікацію ферментів та білків захисту мішені [69].

Лікування інфекцій *K. pneumoniae* хінолоновим препаратом першого покоління налідиксовою кислотою та фторхінолоновим препаратом першого покоління офлоксацином також супроводжувалося виникненням хромосомної резистентності. Її основним механізмом є мутація ДНК-гірази (субодиниці *gyrA-gyrB*) та топоізомерази IV (субодиниці *parC-parE*). Мутації в генах *parC* і *gyrA* у *K. pneumoniae* були виявлені раніше і зустрічаються частіше, ніж у генах *gyrB* і *parE* [70].

Дослідження вказують на взаємозв'язок між змінами у клітинній проникності та резистентністю до хінолонів, особливо через дефіцит *OmpK36*, надмірну експресію гена мультимедикаментозного ефлюксного насоса *acrAB* та стабільність *kdeA* [59]. Індукція генів цієї помпи у чутливих *E. coli in vitro* підвищує їхню стійкість до лікарських засобів. *OqxAB*, який спочатку розглядався як хромосомний ефлюксий насос у *K. pneumoniae*, тепер відомий як частина плазмідно-опосередкованої резистентності до хінолонів і поширений у різних бактеріях [71]. Також було виявлено, що регулятор цієї ефлюксної помпи впливає на формування резистентності до хінолонів у *K. pneumoniae* [72].

Іншим класом генів, які впливають на резистентність до хінолонів, є плазмідно-опосередкована детермінанта, присутня не лише у *K. pneumoniae*, але й у інших бактеріях родини *Enterobacteriaceae*. Ця детермінанта стійкості до хінолонів вважається одним з ключових факторів резистентності до фторхінолонів у *K. pneumoniae* [73]. Одним з генів комплексу є *qnr*, який кодує родину білків, що захищають ДНК-гіразу та топоізомеразу IV від інгібування хінолоном. Перший ген *qnr* було виявлено в плазміді *K. pneumoniae* у США у 1994 році. Гени насосів *qnrS1*, *qnrD*, *qnrB* та *oqxAB* були виявлені у мультирезистентних штамів *K. pneumoniae* [74]. Хоча ці гени природно присутні у хромосомах інших грамнегативних бактерій (*Shewanella*, *Citrobacter spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* та *Serratia marcescens*) [75], дослідження не підтвердили їхньої присутності на хромосомі *K. pneumoniae*.

Це дозволяє припустити, що ген *qnr* може бути одним з генів, відповідальних за резистентність до хінолону у плазмідах *K. pneumoniae*.

Інший плазмідний ген хінолонової резистентності, відомий як *aa(6')-Ib-cr*, вважається єдиним геном у *K. pneumoniae*, який відповідає за модифікацію хінолонів [75]. Він може інактивувати хінолони з вузьким спектром дії, такі як ципрофлоксацин і норфлоксацин, які містять субстрат цього ферменту – незаміщену піперазинову групу. Хоча спочатку вважалося, що цей ген локалізується на плазміді *K. pneumoniae*, недавні дослідження також показали його присутність на хромосомах. Ген *aa(6')-Ib-cr* забезпечує резистентність до аміноглікозидів, таких як канаміцин, тобраміцин та амікацин, а також до хінолонів, наприклад, норфлоксацину та ципрофлоксацину [76].

#### 1.2.4. Резистентність до поліміксину

Поліміксин порушує цілісність мембрани бактерій, витісняючи позаклітинні іони ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ), шляхом взаємодії з негативно зарядженим ліпополісахаридом, це призводить до лізису клітин. Історія стійкості *K. pneumoniae* до поліміксину коротша порівняно з іншими антибіотиками, через обмеження їх використання у 1980-х та 2000-х роках. Перша колістинорезистентна *Klebsiella aerogenes* (нині класифікується як *Streptococcus pneumoniae*) була виявлена під час першого застосування колістину [77]. З появою штамів *K. pneumoniae* з карбапенемазою на початку 2000-х, поліміксин став одним з останніх варіантів лікування. Перший випадок нозокоміального зараження мультирезистентною *K. pneumoniae*, нечутливою до поліміксину, було зафіксовано в Греції у 2004 році [78]. З того часу з'являється все більше клінічних звітів про появу штамів, резистентних до поліміксину.

Стійкість *K. pneumoniae* до поліміксину визначається за рахунок модифікації його мішені через хромосомний механізм, відомий як «система

модифікації ЛПС». Штами з цією системою можуть змінювати структуру і знижувати кількість аніонів у ЛПС, впливаючи на зв'язування поліміксину [46]. Мутації в ключових генах, що регулюють дозрівання ліпиду А (lpxM та його регулятор ramA) [79], його нейтралізацію (pbpP, pmrE), додаткову комбінацію з фосфоетаноламіном (pmrC) або пальмітатом (pagP) [80] призводять до змін у структурі ЛПС. Регуляторні гени, такі як rhoPQ, pmrA та pmrD, а також мутації в інших генах, які впливають на гіперекспресію pmrB або інактивацію mgrB, теж можуть ініціювати резистентність до поліміксину [81, 82]. Wright та ін. у 2015 році вказали на роль систем TirA-подібної глікозилтрансферази та CrrAB у модифікації ЛПС [83]. Іншими механізмами колістинової резистентності *K. pneumoniae* є капсульний полісахарид (який може маскувати заряджені молекули на зовнішній мембрані) [53], а також висока експресія ефлюкських насосів AcrAB-TolC і KpnEF (завдяки позитивній регуляції RagA) [79]. Pal зі співавторами виявили, що видалення глікозилтрансферази WcaJ у *K. pneumoniae* змінило її фенотип, роблячи її більш стійкою до поліміксину [84]. Повідомлення про плазмідно-опосередковану стійкість до поліміксинів надійшло з Китаю, де було ідентифіковано ген mcr-1, який кодує фосфоетаноламінові трансферази аналогічні PmrC [85]. Дослідження показали, що резистентність до поліміксину часто набувається у пацієнтів, тому обмеження застосування цих препаратів може зменшити mcr-1-опосередковану резистентність [86]. Фенотиповий скринінг набутої резистентності до поліміксинів, опосередкованої геном mcr-1, включає тест з етилендіамінтетраоцтовою кислотою та дипіколіновою кислотою [87] і тест MALDIxin [88].

### 1.2.5. Резистентність до тигецикліну

Тигециклін, який введено в лікувальну практику з 2005 року, є першим поколінням гліцилциклінів та застосовується у боротьбі з інфекціями,

спричиненими *K. pneumoniae*. Він володіє широким діапазоном антибактеріальної активності і є дієвим навіть проти штамів, що виробляють β-лактамази широкого спектру [89]. Однак незабаром після першого застосування було виділено штам *K. pneumoniae* зі зниженою чутливістю до тигецикліну [90]. Відомі механізми толерантності до тигецикліну кодуються в хромосомі, зокрема модифікація мішеней – рибосомних одиниць 30S і 16S та зміни проникності клітин. Додатково, дослідження вказують, що надмірна експресія генів ефлюкських насосів AcrAB-TolC і OqxAB, а також зміни в рівнях експресії їх регуляторів (RamA, RamR, RarA і AcrR) можуть призводити до резистентності. Мутація в гені RamR може підвищувати експресію RamA. Також виявлено, що гени Lon і gpsJ мають зв'язок зі стійкістю до тигецикліну в *K. pneumoniae* [91]. Зниження рівня транскрипту порину ompK35K також впливає на стійкість штамів [92]. Дослідження показали, що мутація гену gpsJ, який кодує рибосомний білок S10, також спричиняє зниження чутливості [93]. Резистентні до тетрацикліну ефлюкські насоси, що кодуються геном tetA, були виявлені у нечутливих ізолятів *K. pneumoniae*, але механізм їх стійкості до тигецикліну залишається нез'ясованим [94].

### 1.3. Терапевтичне застосування бактеріофагів

Бактеріофаги – це віруси, які інфікують бактеріальні клітини. Фаги зустрічаються в усіх середовищах, де живуть бактерії. Вперше ці віруси були описані Вільямом Твортом у 1915 році через їх здатність створювати прозорі зони на бактеріальному газоні. У 1917 році Фелікс д'Ерель підтвердив це відкриття та запропонував термін «бактеріофаг». До появи перших антимікробних препаратів фаги використовувалися як ліки проти бактеріальних інфекцій; д'Ерель провів першу експериментальну фаготерапію з використанням перорального розчину фагів для лікування дизентерії [27]. Однак з відкриттям антимікробних препаратів, таких як пеніцилін,

застосування фагів у медицині стало менш популярним. Тим не менш, бактеріофаги залишалися корисними для наукових досліджень як інструменти для розвитку молекулярної біології, вивчення горизонтального перенесення генів та бактеріальної еволюції, а також як засоби діагностики [95]. Однак останнім часом, з огляду на збільшення кількості інфекцій, викликаних бактеріями, які мають множинну лікарську стійкість, такими як *K. pneumoniae*, фаги знову набули актуальності як потенційна альтернатива сучасним антимікробним хіміотерапевтичним препаратам.

У разі застосування фагів як альтернативи антимікробним препаратам найбільш придатними вважаються ті, що мають лише літичний шлях реплікації, оскільки вони призводять до знищення бактеріальних клітин-хазяїв. На відміну від них, лізогенні фаги, які можуть перемикатися між життєвими циклами, можуть бути менш надійними для лікування через можливість переходу в стан спокою і ризик відновлення бактеріальної інфекції. Це лише один з аспектів характеристики бактеріофагів, який є важливим фактором при виборі оптимального методу лікування.

Для інфікування хазяїна, літичний фаг спочатку прикріплюється до бактеріальної клітини, впізнаючи та з'єднуючись зі специфічним рецептором на її поверхні. Ця взаємодія між хвостовим відростком фага та рецептором хазяїна дозволяє вірусу ідентифікувати сприйнятливі бактерії та розташуватися для введення свого генетичного матеріалу в клітину. Процес адсорбції може відбуватися через будь-яку зовнішню структуру, залежно від фага та бактерії. Наприклад, у грамнегативних бактерій, як *K. pneumoniae*, рецепторами можуть бути капсула, пілі, білки зовнішньої мембрани, цукристі фрагменти або ЛПС [96]. Цей механізм визначає, які бактерії можуть бути хазяїнами для конкретного бактеріофага.

D'Andrea та колеги [97] виявили, що відкритий ними літичний фаг φVO1E здатний до специфічного таргетування карбапенемазопродукуючих *K. pneumoniae* з пандемічної групи 258 (CG258) кладу II, але не тих, що належать до близькоспорідненого ладу I, через взаємодію зі специфічними

капсульними полісахаридами, присутніми на штаммах класу II. На противагу цьому, Verma та співавтори [98] показали, що літичний фаг KPO1K2, специфічний до *K. pneumoniae* B5055 може інфікувати декілька штамів *K. pneumoniae* і деякі штами *E. coli*, а, отже, має більший спектр хазяїв порівняно з кладоспецифічним фагом φBO1E.

Вважається, що літичні фаги з широким спектром хазяїв (наприклад, на рівні роду або виду) є ефективнішими у лікуванні бактеріальних інфекцій, ніж ті, що мають вузький спектр, який обмежується окремими штамми. Фаги з вузьким спектром хазяїв не підходять, наприклад, для профілактичного лікування і вимагають точної ідентифікації патогена перед початком терапії. Крім того, навіть у фагів з широким колом хазяїв, як правило, спектр дії вузький, ніж у антибіотиків [99]. Це спонукало до створення фагових коктейлів, що поєднують кілька фагів у одному препараті, для збільшення кола хазяїв [100]. Також були проведені експерименти з гібридизацією хвостових структур фагів для штучного розширення їхнього спектру активності [101].

При виборі фагів для застосування в якості терапевтичних антимікробних засобів слід звертати увагу на декілька ключових аспектів. По-перше, важливо, щоб фаги були ефективними проти *K. pneumoniae*. Для цього *in vitro* оцінюють їхню здатність до лізису бактерій. Фаги, які швидко і ефективно лізують бактерії, утворюють видимі та чіткі зони лізису. Додатково, віруси з широким спектром хазяїв зазвичай вважаються більш доцільними, оскільки можуть взаємодіяти з декількома штамми одночасно [102]. По-друге, літичні фаги завдяки характеру свого життєвого циклу швидше та ефективніше знищують бактерії, ніж лізогенні, які інтегруються в геном хазяїна та можуть залишатися неактивними протягом невизначеного часу. Крім того, лізогенні фаги можуть переносити бактеріям гени, які збільшують їхню токсичність та стійкість до антибіотиків, роблячи інфекцію більш агресивною та менш чутливою до лікування [102].

Фагова терапія вважається перспективним рішенням для боротьби з розвитком та поширенням мультирезистентних штамів *K. pneumoniae*.

Дослідження *in vitro* та *in vivo* підтвердили ефективність фагів як окремих агентів, у складі фагових коктейлів та в комбінації з сучасними антимікробними хіміотерапевтичними препаратами. Зокрема, рутинне використання фаготерапії у Східній Європі та результати обмежених клінічних випробувань на Заході підтверджують безпечність фагів для застосування на людях [27]. Проте, відсутність прогресу у внесенні змін до нормативних актів, які б враховували терапію бактеріофагами, уповільнює її розвиток. Подолання цієї перешкоди має стати основним напрямком майбутніх досліджень у галузі фаготерапії.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

##### 2.1.1. Бактеріофаги

У ході роботи досліджували дев'ятнадцять ізолятів бактеріофагів. Зі стічних вод з Бортницької станції аерації виділили зразки: Кр 5, Кр 11, Кр 12, Кр 13, Кр 14, Кр 15, Кр 16, Кр 23/1, Кр 24, Кр 25, Кр 25/1, Кр 26, Кр 28, Кр 29, Кр 30, Кр 31. Зі стічних вод ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України виділили зразки: Кр 19, Кр 20, Кр 22.

##### 2.1.2. Культури бактерій

Для дослідження були взяті 55 ізолятів бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* з колекції НПБК. Використовували нічні культури бактерій, культивовані у рідкому поживному середовищі та на скошеному агарі.

##### 2.1.3. Синтетична сеча

Для перевірки стабільності бактеріофагів використовували штучну сечу Flinn Scientific Artificial Urine, Normal (США), яка є безпечним аналогом справжньої сечі. Її склад наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

## Склад синтетичної сечі

Компонент	Концентрація, %
Креатин	0,1
Альбумін	0,1
Жовтий харчовий барвник	0,1
NaOH	1
NaCl	1-2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	1
Бензоат натрію (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> Na)	1
Сечовина (NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )	3-5
Вода (H <sub>2</sub> O)	89,7-92,7

## 2.2. Методи досліджень

## 2.2.1. Культивування бактерій

Бактерій культивували у рідкому поживному середовищі та на скошеному агарі. Перелік використаних живильних середовищ і їх склад наведено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2.

## Склад живильних середовищ

Середовище	Склад, г/л
Merck Tryptic Soy Broth (Німеччина) Казеїн-пептонний соєво-пептонний бульйон	Панкреатичний лізат казеїну – 17,0 Папаїновий лізат соєвих продуктів – 3,0 D(+) моногідрат глюкози – 2,5 NaCl – 5,0 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2,5
Merck Tryptic Soy Agar (Німеччина) Трипсиново- соєвий агар	Панкреатичний лізат казеїну – 15,0 Папаїновий лізат соєвих бобів – 5,0 NaCl – 5,0 Агар-агар – 15,0

В якості основного середовища для культивування бактерій і постановки вірусологічних експериментів використовувався трипсиново-соєвий агар. Бактерії культивувалися в аеробних умовах за температури 37° С.

## 2.2.2. Виділення бактеріофагів

Виділяли бактеріофагів зі стічних вод з Бортницької станції аерації та ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України методом подвійних агарових шарів. Для цього зразок стічної води пропускали через шприцевий фільтр з розміром пор 0,45 мкм. Після чого 500 мкл зразка вносили в 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом із 100 мкл суспензії нічної культури бактерії і наносили на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Результати враховували після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С за наявності негативних колоній на газоні бактерії. Окремі негативні колонії вилучали для отримання чистих ліній фагів і

подальших досліджень. Вилучені негативні колонії були перенесені в 1 мл 0,9%-го розчину NaCl. У разі отримання великої кількості однорідних за морфологією негативних колоній використовували для виділення метод зливного лізису. Верхній шар заливали 0,9%-вим розчином NaCl. Після дифузії фагових часток з агарового шару в розчин протягом доби за температури 4° С, зразок центрифугували при 4900 об/хв за температури 15° С протягом 20 хвилин на центрифугі Thermo Scientific™ Megafuge ST Plus Series (США) і фільтрували через бактеріальний фільтр 0,22 мкм.

### **2.2.3. Визначення спектру літичної активності бактеріофагів**

Для характеристики бактеріофагів визначали спектри їх літичної активності методом краплинного тесту. На нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару) наносили 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом з 100 мкл суспензії нічної культури бактерії. Після застигання верхнього шару крапали по 5 мкл зразків фагів на відповідні сектори. Результати враховувалися після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С за наявності лізису бактеріального газону на секторах.

### **2.2.4. Титрування бактеріофагів**

Для визначення концентрації бактеріофагів у вихідних бактеріальних лізатах і у лізатах після перенакопичення використовувався метод агарових шарів за Грація. Для цього вихідну суспензію було розведено серією десятикратних розведень. Після чого 500 мкл кожного розведення було внесено в 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом з 100 мкл суспензії нічної культури бактерії і нанесено на нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару). Після інкубації протягом 24 годин за

температури 37° С були враховані результати за наявністю окремих негативних колоній на газоні бактерії. Було визначено розмір та структуру окремих негативних колоній і деякі були вилучені для отримання чистих ліній фагів і подальших досліджень. Вилучені негативні колонії переносили в 1 мл 0,9%-го розчину NaCl.

Також для приблизного визначення концентрації бактеріофагів у бактеріальних лізатах використовували краплинний тест. Вихідну суспензію розводили серією десятикратних розведень. На нижній шар застиглому агаризованого середовища (1,4% агару) наносили 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) разом з 100 мкл суспензії нічної культури бактерії. Після застигання верхнього шару крапали по 5 мкл кожного розведення на відповідні сектори. Результати враховувалися після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С за наявністю лізису бактеріального газону на секторах.

### **2.2.5. Накопичення бактеріофагів**

Накопичення бактеріофагів, вилучених у вигляді окремих негативних колоній, після титрування проводилось методом зливного лізису. Для цього до агаризованого середовища (0,7% агару) додавали 100 мкл розведення суспензії бактеріофагів, яке дає майже суцільний лізис, і 100 мкл суспензії нічної культури бактерії, на якій цей фаг утворює чіткі та прозорі негативні колонії. Після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С верхній шар заливали 0,9%-вим розчином NaCl. Після дифузії фагових часток з агарового шару в розчин протягом доби за температури 4° С, зразок центрифугували при 4900 об/хв за температури 15° С протягом 20 хвилин на центрифугу Thermo Scientific™ Megafuge ST Plus Series (США) і фільтрували через бактеріальний фільтр 0,22 мкм.

## **2.2.6. Електронна мікроскопія**

Для визначення морфології віріонів було застосовано електронну мікроскопію. Були досліджені зразки Кр 11, Кр 15, Кр 19 і Кр 29. Для цього суспензію бактеріофагів, накопичених після вилучення окремої негативної колонії, характерної для всіх зразків морфології, і пасажування, піддавали диференційному центрифугуванню. Зразки центрифугували при 4900 об/хв за температури 15° С протягом 20 хвилин на центрифугузі Thermo Scientific™ Megafuge ST Plus Series (США) і фільтрували через бактеріальний фільтр 0,45 мкм, потім центрифугували при 38000 об/хв за температури 4° С протягом 150 хвилин на центрифугузі Beckman Coulter Optima™ L-90K Ultracentrifuge (США) і фільтрували через бактеріальний фільтр 0,22 мкм. Зразки наносили на формварову плівку-підкладку шляхом поміщення мідної сіточки з плівкою-підкладкою у краплину відповідної суспензії і експозиції протягом 1 хвилини. Після чого препарати контрастували 2%-вим водним розчином фосфорновольфрамової кислоти шляхом експозиції плівки-підкладки у краплі розчину протягом 1 хвилини. Рештки рідини були видалені фільтрувальним папером. Висушені препарати переглядали за допомогою електронного мікроскопа Jeol JEM-1230 (Японія) при прискорюючій напрузі 80кВ.

## **2.2.7. Перевірка стабільності досліджуваних бактеріофагів**

### **2.2.7.1. Перевірка стабільності досліджуваних бактеріофагів у синтетичній сечі**

У мікропробірці з 1000 мкл сечі додавали по 100 мкл досліджуваних зразків бактеріофагів. У якості контролів вносили 100 мкл досліджуваних зразків до 1000 мкл 0,9%-го розчину NaCl. Після інкубації протягом 1 години

за температури 37° С проводили титрування методом агарових шарів за Грація. До 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) додавали 50 мкл суспензії нічної культури бактерії і 500 мкл розведеного зразка, наносили на нижній шар застиглого агаризованого середовища (1,4% агару). Після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С враховували результати за наявністю окремих негативних колоній на газоні бактерії. Відсоток інактивації фагів вираховували за формулою:

$$\% \text{ інактивації} = 100\% - \frac{100 \times \text{титр(д)}}{\text{титр(к)}}, \quad (2.1)$$

де НК(к) – титр бактеріофага у контролі, БУО/мл;

НК(д) – титр бактеріофага у досліді, БУО/мл.

#### **2.2.7.2. Перевірка стабільності досліджуваних бактеріофагів без холодового ланцюга**

У мікропробірки відібрали по 300 мкл досліджуваних зразків бактеріофагів. Після шести діб інкубації за температури 25° С проводили титрування методом агарових шарів за Грація. До 5 мл агаризованого середовища (0,7% агару) додавали 100 мкл суспензії нічної культури бактерії і 100 мкл розведеного зразка, наносили на нижній шар застиглого агаризованого середовища (1,4% агару). Після інкубації протягом 24 годин за температури 37° С враховували результати за наявністю окремих негативних колоній на газоні бактерії. У якості контролів використовували зразки досліджуваних бактеріофагів, які зберігалися при температурі 4° С у холодильнику. Відсоток інактивації фагів вираховували за формулою 2.1.

### **2.2.8. Виділення ДНК та сиквенування геному**

За допомогою Phage DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Канада) відповідно до інструкції виробника виділили ДНК бактеріофагу Кр 29. Геном сиквенували за сприяння Файдюк Юлії Василівни у Latvian Biomedical Research and Study Centre (Рига, Латвія). Використовували технологію Illumina на сиквенаторі Illumina Miseq (США).

### **2.2.9. Статистична та біоінформатична обробка даних**

Експерименти з перевірки стабільності виконувалися в трьох повтореннях, а при визначенні розмірів бактеріофагів вимірювали по 5 часток. Результати подані у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартне відхилення. Діаграми і таблиці, а також статистичний аналіз було виконано за допомогою програми Microsoft Excel.

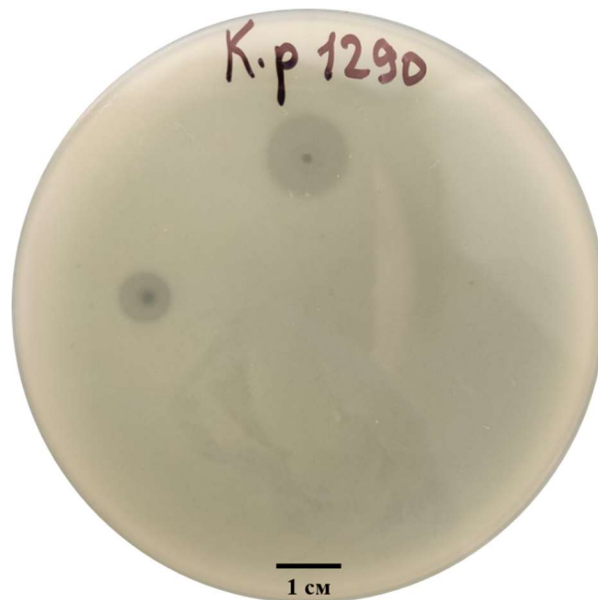
Отримані при сиквенуванні короткі прочитування розміром приблизно 350 пар основ піддавали збірці з використанням інструменту SPADES на онлайн-платформі GALAXY (версія 3.15.4+galaxy1). Отримали контиг розміром 40679 пар основ з перекриттям 214х. Аотували геном за допомогою інструменту GeneMarks, а визначення функцій для білок-кодуєчих послідовностей здійснювали за допомогою пошуку гомологів (blastp). В онлайн-калькуляторі GC Content Calculator (Biologics International Corp) виконували визначення GC складу. Спорідненість з іншими бактеріофагами визначали за допомогою інструменту Viridic, а генетичну мапу створили з використанням Proksee.

## РОЗДІЛ 3

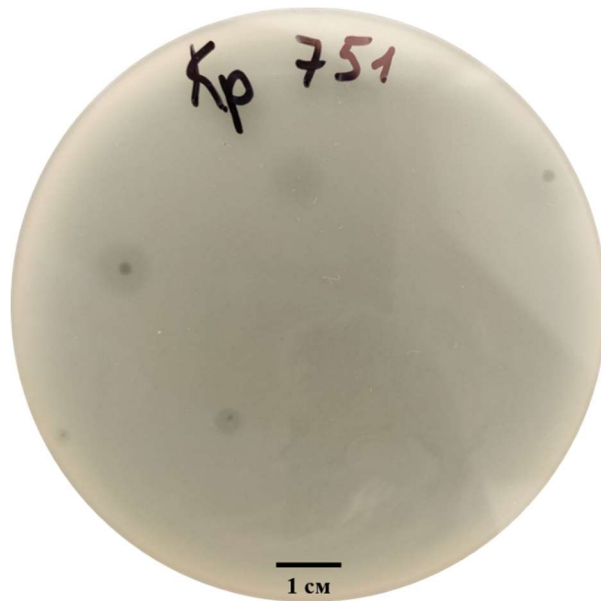
### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Первинна характеристика бактеріофагів

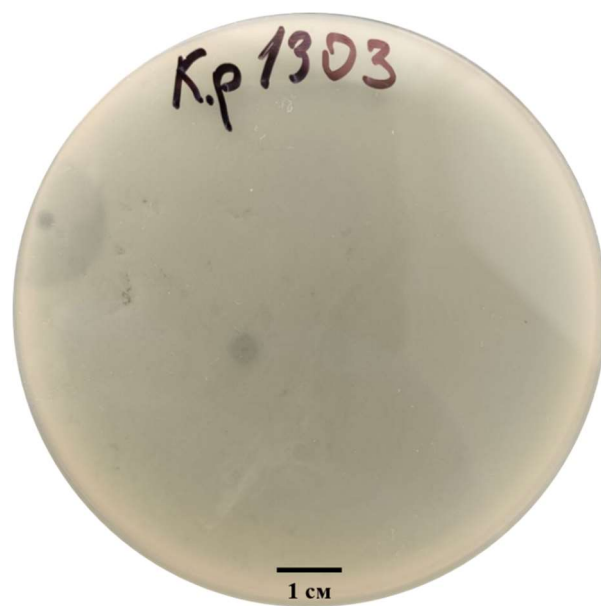
Бактеріофаги виділяли зі стічних вод Бортницької станції аерації і ДУ Інституту травматології та ортопедії НАМН України. Усього було виділено 19 зразків. Вони відрізнялися за морфологією і розмірами негативних колоній, а також за наявністю чи відсутністю ореолів (рис. 3.1-3.5).



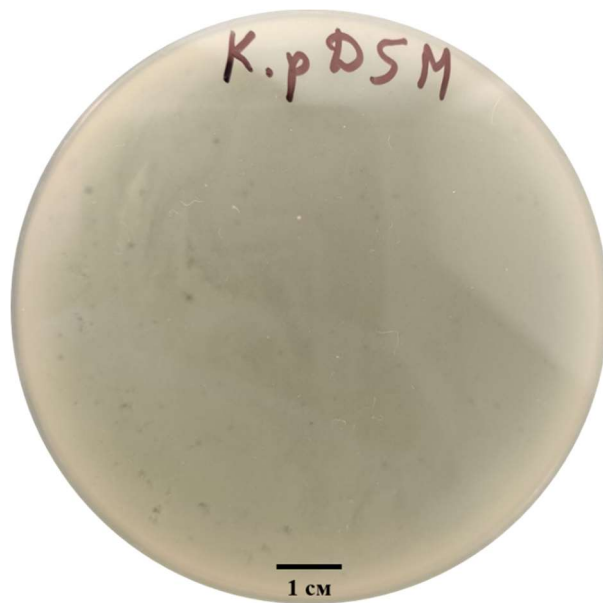
**Рис. 3.1.** Первинне виділення бактеріофагів зразка Кр 11, бактерія *Klebsiella pneumoniae* 1290



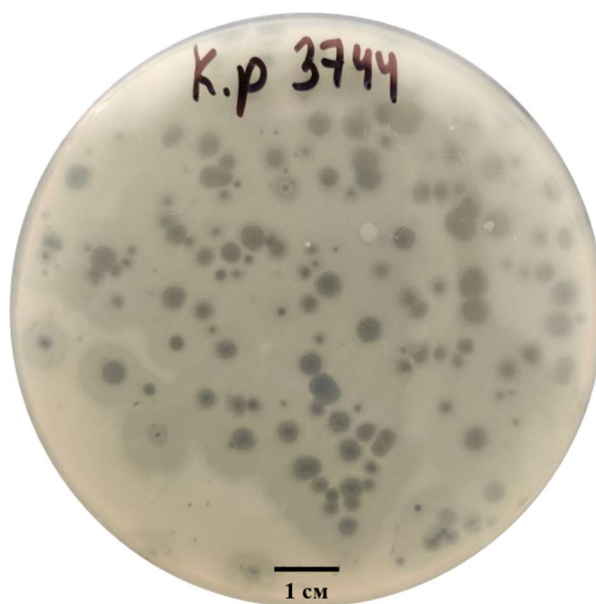
**Рис. 3.2.** Первинне виділення бактеріофагів зразка Кр 12, бактерія *Klebsiella pneumoniae* 751



**Рис. 3.3.** Первинне виділення бактеріофагів зразка Кр 13, бактерія *Klebsiella pneumoniae* 1303



**Рис. 3.4.** Первинне виділення бактеріофагів зразка Кр 14, бактерія *Klebsiella pneumoniae* DSM

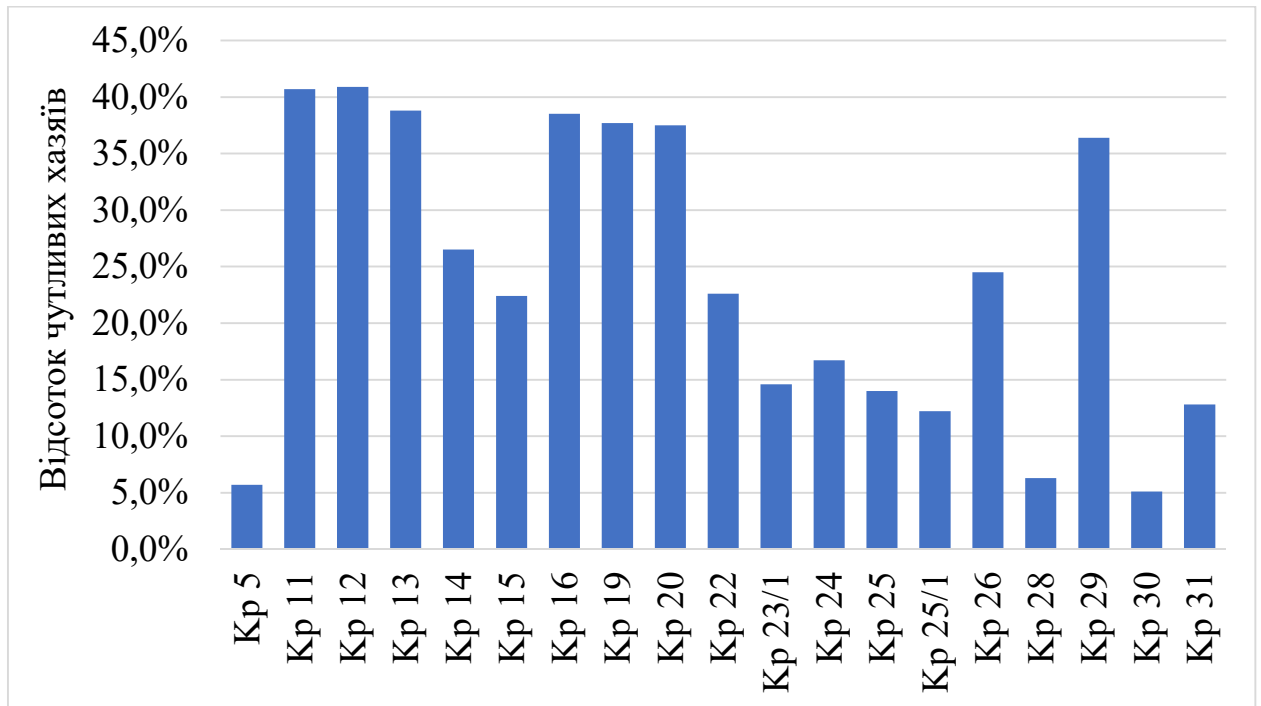


**Рис. 3.5.** Первинне виділення бактеріофагів зразка Кр 16, бактерія *Klebsiella pneumoniae* 3744

Для деяких ізолятів *K. pneumoniae* було отримано негативні колонії різних морфологій (див. рис. 3.5). Це свідчить про наявність у стічній воді декількох різних бактеріофагів, сприйнятливих до цього ізоляту бактерії.

### 3.2. Спектр літичної активності досліджуваних бактеріофагів

Літичну активність виділених бактеріофагів досліджували на 55 ізолятах бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* з колекції НПБК. Результати представлені на діаграмі (рис. 3.6), а також у таблицях (Додаток А, Б).



**Рис. 3.6.** Активність виділених бактеріофагів на різних ізолятах *Klebsiella pneumoniae*

Таким чином, виділені бактеріофаги значно відрізняються за спектром літичної активності. Із 19 досліджених зразків 3 є вузькоспеціалізованими і здатні лізувати лише 2-3 ізоляти *K. pneumoniae*. Найвищу активність на рівні 36-41% показали 7 бактеріофагів, а 9 зразків лізували від 12 до 27% ізолятів.

Виділені у цьому дослідженні бактеріофаги не демонструють максимально можливі показники літичної активності. Відтак, група вчених із Китаю виділила зі стічних вод лікарні і характеризувала бактеріофаг vB\_КрP\_HS106, який має 63,4% активності [103], а бразильські науковці дослідили фаг vB\_КрnS\_Uniso31, який показує лізис клінічних ізолятів *K. pneumoniae* на рівні 42,3% [104]. Але, фаги з відносно вузькими спектрами

активності також зустрічаються у дослідженнях, наприклад, зі стічних вод у Гізі було виділено фаг vB\_Kpn\_ZC2 з активністю 23,3% [105]. А от група вчених з Китаю та США виділила 54 бактеріофаги, які значно варіювали за своїми спектрами активності. У середньому кожен фаг лізував 25 штамів *K. pneumoniae*. Аналіз частоти фагів за діапазоном хазяїв показав, що 2, 11, 25, 14 і 2 фаги лізують >41, 31-40, 21-30, 11-20 і <10 штамів *K. pneumoniae*, відповідно [106].

Для подальших досліджень обрали 4 ізоляти бактеріофагів – Кр 11, Кр 15, Кр 19, Кр 29. При виборі орієнтувалися на відсоток активності фагів, зручність накопичення, а також на різноманітність інфікованих ізолятів бактерії-хазяя.

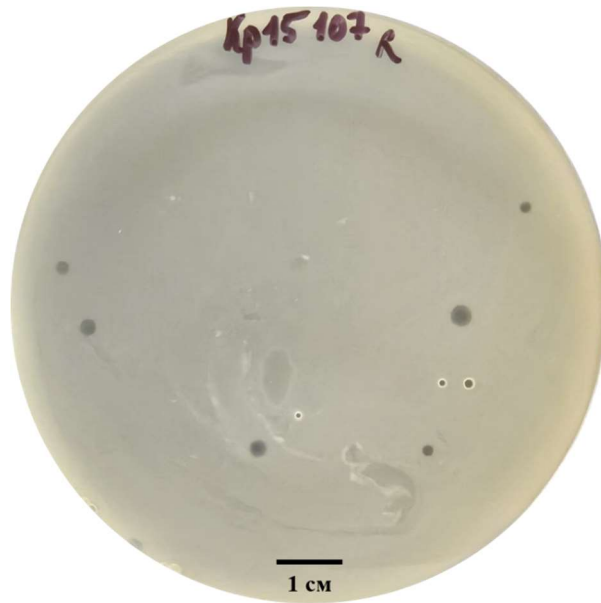
### 3.3. Морфологія негативних колоній досліджуваних зразків

Зразок Кр 11 був виділений зі стічних вод БСА, із двох негативних колоній, які мали однакову морфологію на газоні бактерії *Klebsiella pneumoniae* 1290. Бактеріофаги цього зразка утворюють бляшки 1-2 мм в діаметрі з мутним ореолом (рис. 3.7).



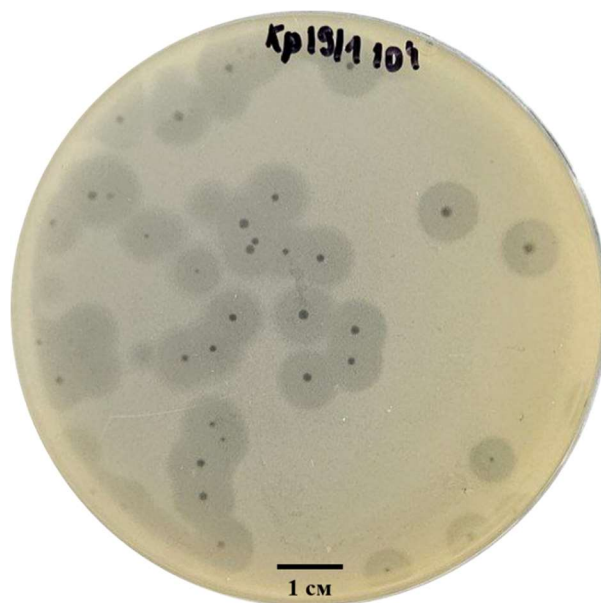
**Рис. 3.7.** Морфологія колоній ізоляту зі зразка Кр 11, розведення  $10^{-6}$

Кр 15 також був отриманий зі стічних вод Бортницької станції аерації, але методом зливного лізису на газоні бактерії *Klebsiella pneumoniae* 3744. Для цього зразка характерні бляшки 2-3 мм в діаметрі без ореолу (рис. 3.8).



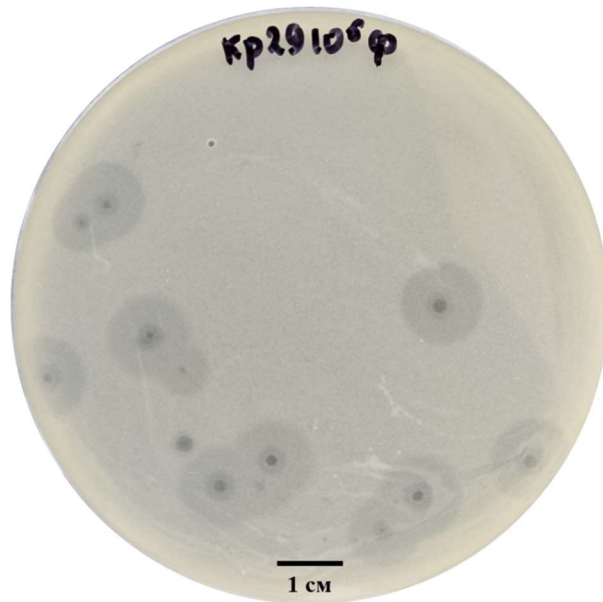
**Рис. 3.8.** Морфологія колоній ізоляту зі зразка Кр 15, розведення  $10^{-7}$

Натомість зразок Кр 19 був виділений зі стічних вод хірургічного відділення, із негативної колонії на газоні бактерії *Klebsiella pneumoniae* 1646. Бактеріофаги цього зразка утворюють бляшки, які морфологічно схожі з бляшками Кр 11, 1-2 мм в діаметрі і з мутним ореолом (рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** Морфологія колоній ізоляту зі зразка Кр 19, розведення  $10^{-4}$

Методом зливного лізису на газоні бактерії *Klebsiella pneumoniae* 1298 зі стічних вод Бортницької станції аерації був отриманий і зразок Кр 29. У бактеріофагів цього зразка спостерігали утворення бляшок 1-3 мм в діаметрі з мутним ореолом (рис. 3.10).

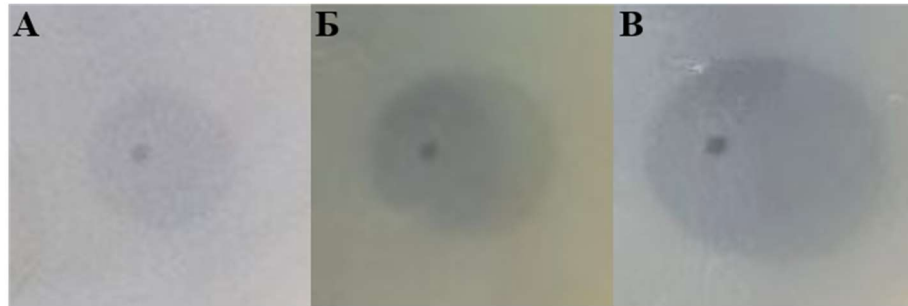


**Рис. 3.10.** Морфологія колоній ізоляту зі зразка Кр 29, розведення  $10^{-6}$

З обраних для подальших досліджень ізолятів, лише Кр 15 утворює негативні колонії без ореолів (див. рис. 3.8), що може свідчити про низьку активність або відсутність деполімераз у бактеріофагів цього зразка [107].

Фаги зі зразків Кр 11, Кр 19 і Кр 29 утворюють колонії з ореолами (див. рис. 3.7, 3.9, 3.10). Таким чином, вони можуть представляти собою ймовірне джерело для біотехнологічного накопичення фагових деполімераз. На сьогодні багато зусиль направлені на пошук і розробку систем експресії цих ферментів, адже деполімерази фагів мають багато застосувань, наприклад, використання для терапії проти бактеріальних патогенів, для запобігання утворення та ерадикації біоплівки і для виробництва олігосахаридів з полісахаридів [108]. Дослідники неодноразово виділяли бактеріофаги з деполімеразами і перевіряли ефективність цих ферментів для лікування бактеріальних інфекцій [108, 109, 110, 111, 112, 113, 114].

На користь того, що у бактеріофагів зі зразків Кр 11, Кр 19 і Кр 29 присутні деполімерази свідчить той факт, що ореол навколо колонії продовжує збільшуватися з часом (рис. 3.11).



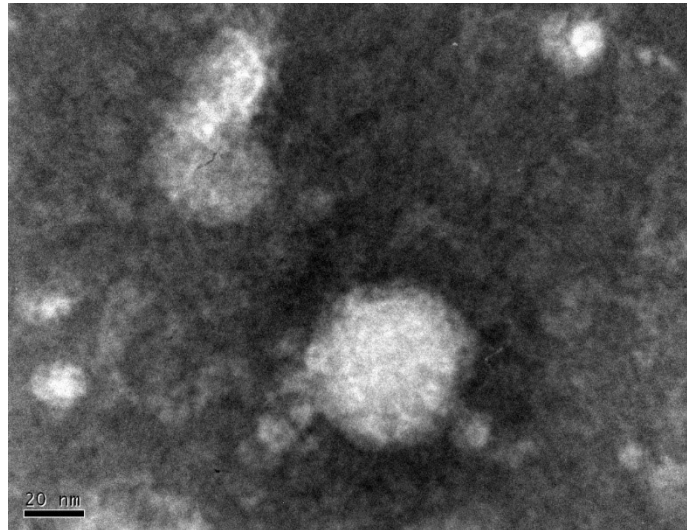
**Рис. 3.11.** Збільшення ореолу негативної колонії, зразок Кр 11. А – 24 години інкубації, Б – 48 годин інкубації, В – 72 години інкубації

Як було припущено раніше, гало, що збільшуються з часом, можуть містити неінфіковані клітини бактерій у стаціонарній фазі, оптична щільність яких була знижена під дією дифузних деполімераз на капсули [107]. Такий ефект для бактеріофагів *K. pneumoniae* уже спостерігався раніше [115, 116].

### 3.4. Морфологія досліджуваних бактеріофагів

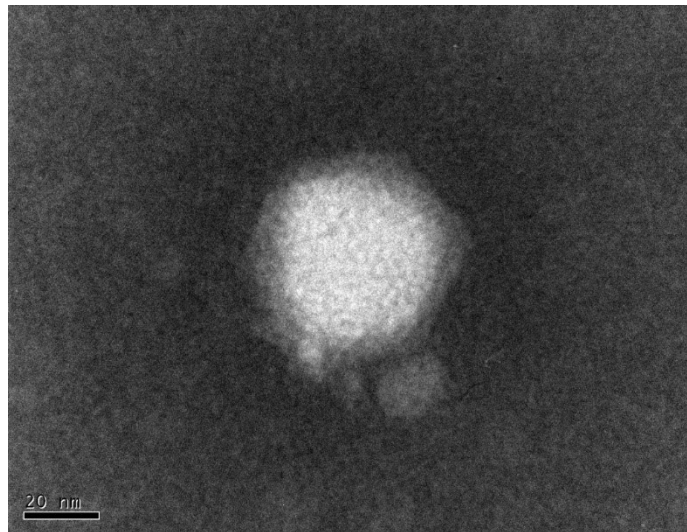
Бактеріофаги зі зразків Кр 11, Кр 15, Кр 19 і Кр 29 були досліджені за допомогою електронного мікроскопа. Віріони всіх ізолятів мають морфотип С1. Фаги з таким морфотипом були виділені до *K. pneumoniae* і іншими дослідниками [110, 115, 116].

Віріони зі зразка Кр 11 мають сферичну головку діаметром  $55 \pm 5$  нм і короткий хвостовий відросток довжиною  $12 \pm 3$  нм (рис. 3.12).



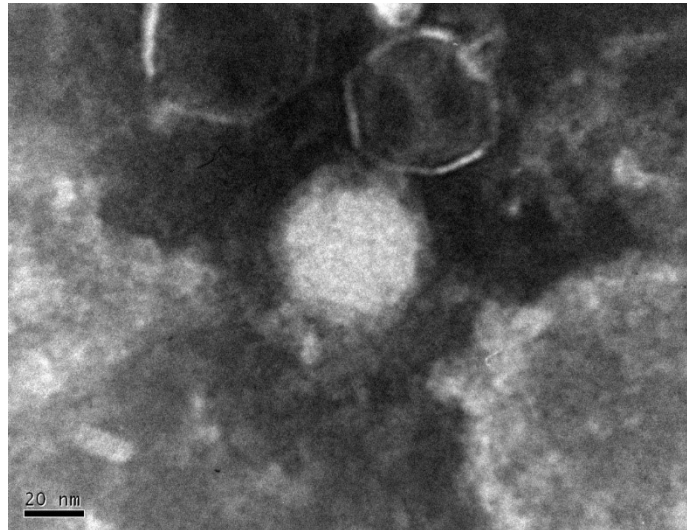
**Рис. 3.12.** Мікрофотографія бактеріофага зі зразка Кр 11. Розмір лінійки становить 20 нм

У зразку Кр 15 віріони мають сферичну головку діаметром  $57 \pm 6$  нм і короткий хвостовий відросток довжиною  $10 \pm 2$  нм (рис. 3.13).



**Рис. 3.13.** Мікрофотографія бактеріофага зі зразка Кр 15. Розмір лінійки становить 20 нм

Віріони у зразку Кр 19 мають сферичну головку діаметром  $54 \pm 4$  нм і короткий хвостовий відросток довжиною  $16 \pm 6$  нм (рис. 3.14).



**Рис. 3.14.** Мікрофотографія бактеріофага зі зразка Кр 19 та пустих капсидів. Розмір лінійки становить 20 нм

Віріони зі зразка Кр 29 мають сферичну головку діаметром  $55 \pm 4$  нм і короткий хвостовий відросток довжиною  $12 \pm 2$  нм (рис. 3.15).

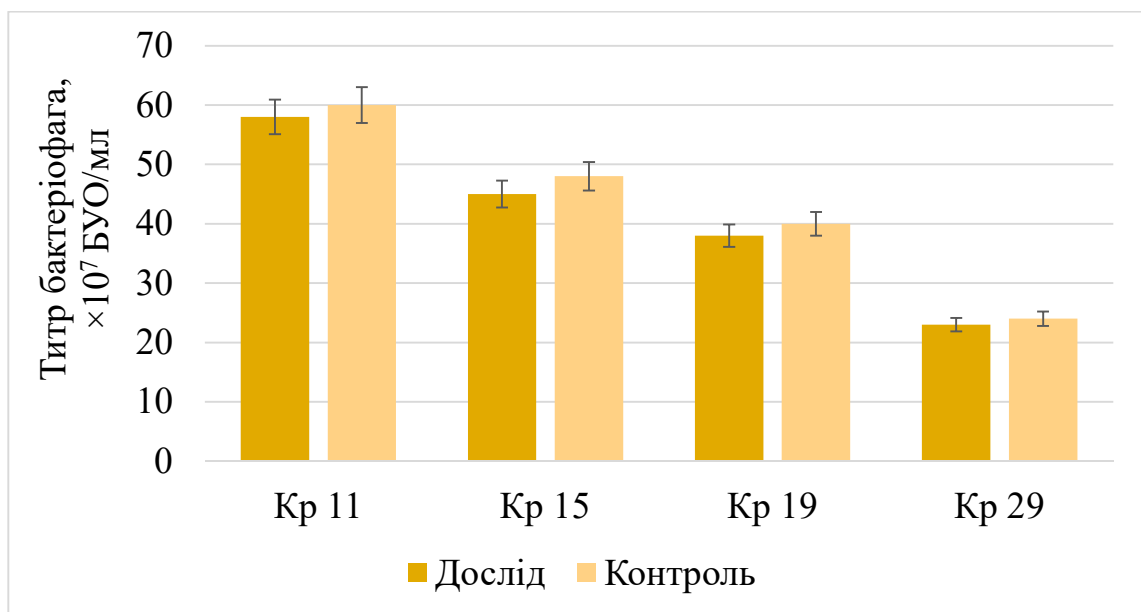


**Рис. 3.15.** Мікрофотографія бактеріофага зі зразка Кр 29. Розмір лінійки становить 20 нм

За літературними даними до *Klebsiella pneumoniae* виділені фаги різної морфології, зокрема міовіруси [103, 117], сіфовіруси [104, 117], іновіруси [117], а також подовіруси [110, 115-117]. У нашій роботі досліджувалися подоподібні віруси, представники з коротким хвостовим відростком.

### 3.5. Стабільність досліджуваних бактеріофагів

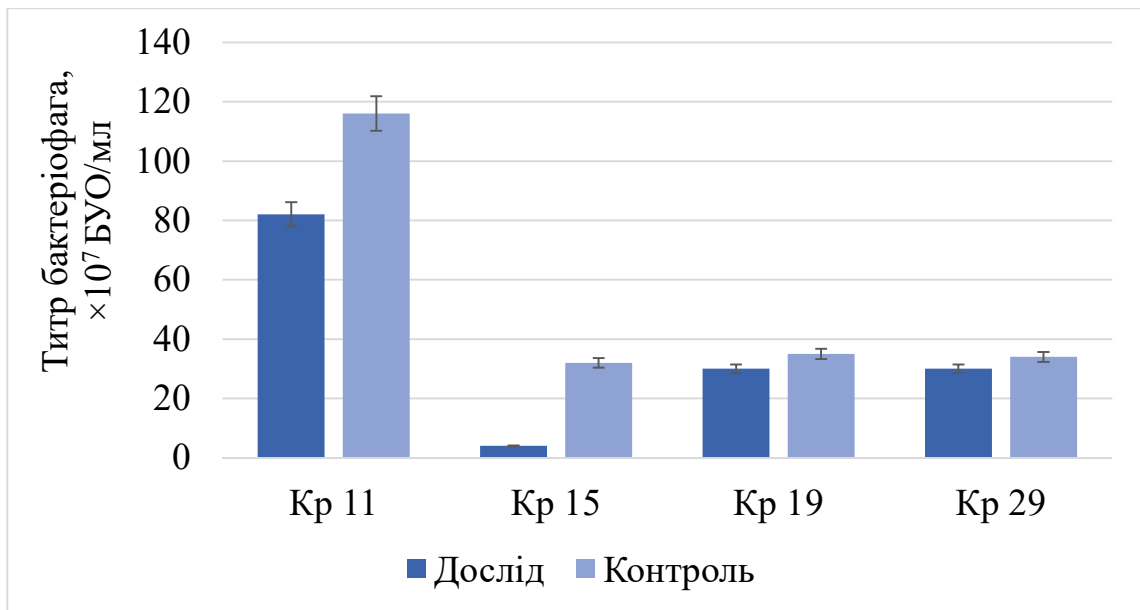
Оскільки, більшість ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, використаних у цьому дослідженні, походять із урологічних відділень, а введення бактеріофагів у сечовий міхур є одним зі способів терапії інфекцій сечовивідних шляхів, то важливо розуміти, що під дією сечі віруси не інактивуються і зберезуть літичну активність. Результати дослідження стабільності фагів у штучній сечі представлено на рисунку 3.16.



**Рис. 3.16.** Стабільність бактеріофагів у штучній сечі

Таким чином, літична активність досліджуваних ізолятів бактеріофагів під впливом штучної сечі майже не змінилася. Отже, введення фагів у сечовий міхур може бути ефективним способом терапії інфекцій сечовивідних шляхів.

Враховуючи те, що пацієнти можуть возити препарати із собою, і не завжди є можливість підтримки холодового ланцюга, вирішили перевірити як бактеріофаги будуть витримувати такі умови. Результати експерименту представлено на рисунку 3.17.

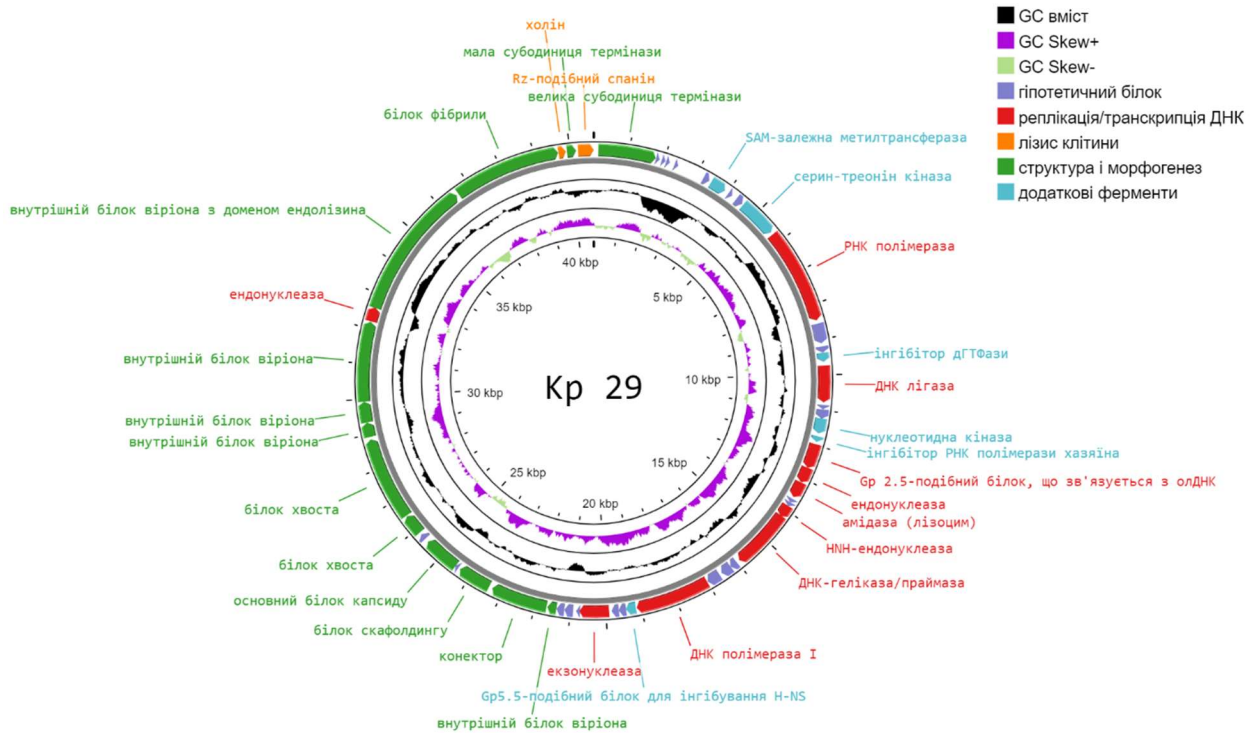


**Рис. 3.17.** Стабільність бактеріофагів в умовах відсутності холодового ланцюга

Отже, за результатами експерименту, без підтримання холодового ланцюга бактеріофаги втрачають свою інфекційність. Відсоток інактивації зразка Кр 15 був набагато вищим за інші, що вказує на доцільність використання фагових коктейлів, замість терапії монофагами, оскільки, в коктейлі інші фаги можуть бути більш стабільними і ефект від їх застосування збережеться на очікуваному рівні.

### 3.6. Характеристика геному бактеріофага Кр 29

Сиквенований геном бактеріофага Кр 29 містить 40679 пар основ і кодує 58 відкритих рамок зчитування (рис. 3.18). Вміст ГЦ пар складає 53,3%. Гени поділяються на 3 групи. Продукти генів I групи слугують для створення сприятливих умов у клітині для розвитку фага, білки, кодовані генами II групи залучені до метаболізму ДНК, а продукти генів III групи виконують функції упаковки ДНК, збірки віріонів та лізису.



**Рис. 3.18.** Геномна карта бактеріофага ізоляту Кр 29, виконана у Proksee

У геномі відсутній окремий ген, який кодує деполімеразу. Фагові деполімерази часто входять до складу хвостового шипа або фібрили. Передбачається, що білок фібрили (ORF 55) може мати домен з деполімеразною активністю, що узгоджується з літературними даними. Hsieh та ін. [108], Wu та ін. [109], а також Pan та ін. [110] ідентифікували та експресували деполімерази бактеріофагів роду *Przondovirus*. Результати їх дослідження показали, що білки хвостових волокон/шипів утворювали напівпрозорі плями на газонах відповідних штамів бактерії, що і є наслідком дії деполімераз.

Геном цього бактеріофага не містить генів токсинів і стійкості до антибіотиків, що дозволяє рекомендувати цей ізолят для подальших клінічних досліджень.

За великою субодиницею термінази бактеріофаг ізоляту Кр 29 є подібним до ізолятів з Китаю, Тайваню та Польщі (рис. 3.19).

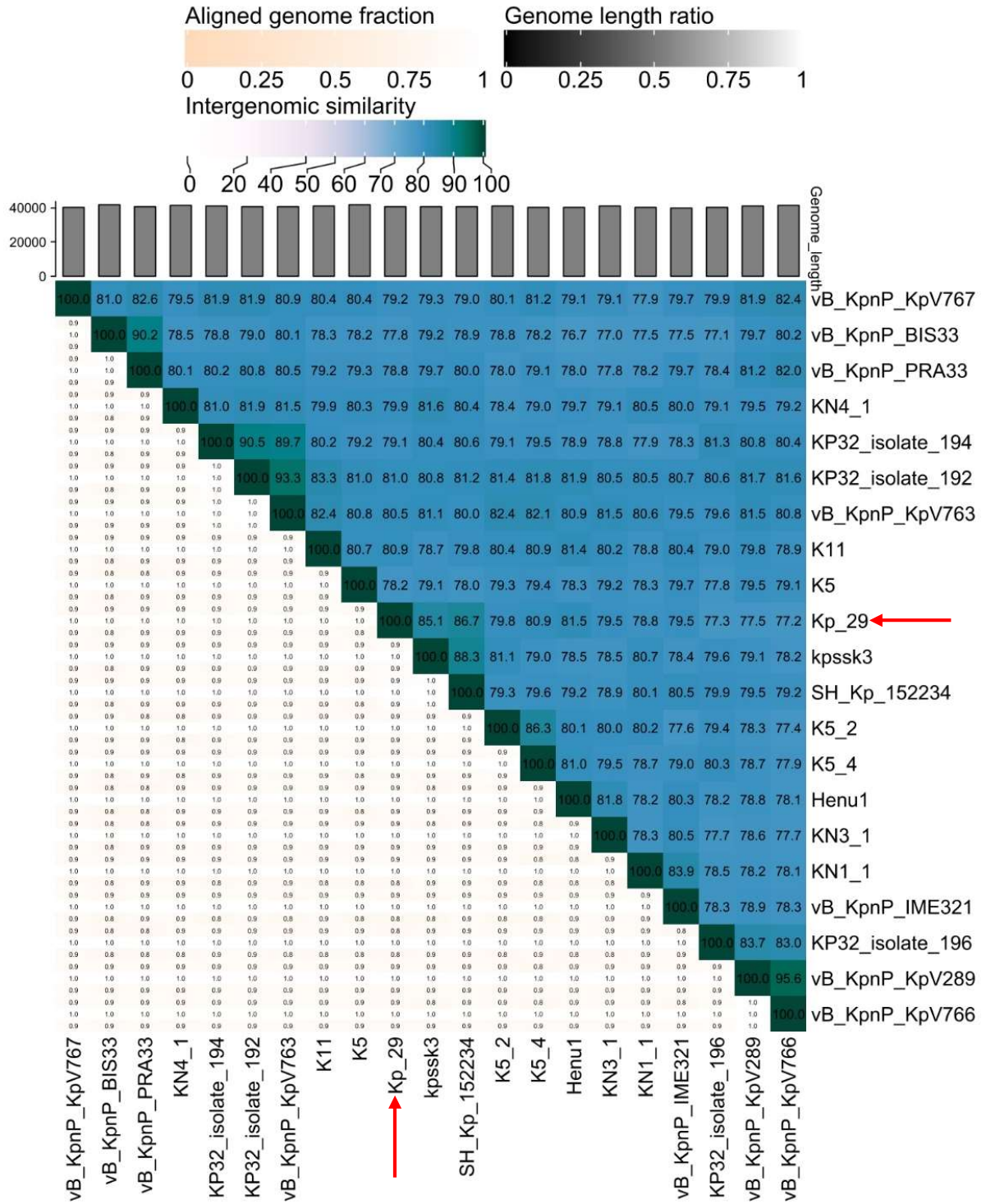


Рис. 3.19. Теплова карта значень міжгеномної подібності бактеріофага ізоляту Kp 29, створена за допомогою інструменту Viridic

Найбільшу спорідненість бактеріофаг Kp 29 має до видів SH\_Kp\_152234 (86,7%) та kpssk3 (85,1%), виділених у Китаї, а отже Kp 29 належить до нового виду роду *Przondovirus*, підродини *Studiervirinae*, родини *Autographiviridae*, порядку *Caudoviricetes*.

## ВИСНОВКИ

1. Зі стічних вод виділили 19 ізолятів бактеріофагів, здатних лізувати клінічні штами *Klebsiella pneumoniae*. Вони відрізняються за морфологією негативних колоній і за спектром чутливих хазяїв *K. pneumoniae*.
2. Найвищі спектри активності, у межах 35-41%, мають 7 зразків, що свідчить про вибірковість дії досліджуваних ізолятів.
3. Фагові ізоляти Кр 11, Кр 15, Кр 19 і Кр 29 відносяться до морфотипу С1 і мають сферичні головки діаметром від  $54 \pm 4$  нм до  $57 \pm 6$  нм та короткі хвостові відростки довжиною від  $10 \pm 2$  нм до  $16 \pm 6$  нм.
4. З чотирьох досліджених ізолятів лише Кр 15 утворює негативні колонії без ореолів, що може свідчити про низьку активність або відсутність деполімераз у бактеріофагів цього ізоляту.
5. Без підтримання холодого ланцюга бактеріофаги Кр 11, Кр 15, Кр 19 і Кр 29 втрачають свою інфекційність. Синтетична сеча не впливає на стабільність бактеріофагів, що дозволяє розглядати їх як перспективний складник препаратів для лікування інфекцій сечовивідних шляхів.
6. Бактеріофаг Кр 29 належить до нового виду роду *Przondovirus*, підродини *Studiervirinae*, родини *Autographiviridae*, порядку *Caudoviricetes*. У геномі цього бактеріофага відсутні гени токсинів і стійкості до антибіотиків, а отже цей ізолят можна рекомендувати для подальших клінічних досліджень.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vivas, R., Barbosa, A.A.T., Dolabela, S.S., and Jain, S. (2019). Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), pp. 890–908.
2. Prestinaci, F., Pezzotti, P., and Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), p. 309.
3. Ventola, C.L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), pp. 277-283.
4. Zaman, S., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., and Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, [online] Volume 9(6). Available at: <https://doi.org/10.7759/CUREUS.1403> [Accessed 28 Jun. 2017].
5. Rossolini, G.M., Arena, F., Pecile, P., and Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, pp. 56–60.
6. Department of Health and Human Services, CDC (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, [online] Available at: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/index.html> [Accessed 11 Mar. 2024].
7. Vading, M., Nauc ler, P., Kalin, M., and Giske, C.G. (2018). Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *PLoS ONE*, [online] Volume 13(4). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195258> [Accessed 6 Apr. 2018].
8. Iredell, J., Brown, J., and Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352.
9. Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), p. 657.
10. Solomon, S.L., and Oliver, K.B. (2014). Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink. *American Family Physician*,

- [online] Volume 89(12), pp. 938–941. Available at: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2014/0615/p938.html> [Accessed 15 Jun. 2014].
11. Willyard, C. (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*, [online] Volume 543(7643), p. 15. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE.2017.21550> [Accessed 2 Mar. 2017].
  12. Górski, A., Międzybrodzki, R., Jończyk-Matysiak, E., Zaczek, M., and Borysowski, J. (2019). Phage-specific diverse effects of bacterial viruses on the immune system. *Future Microbiology*, [online] Volume 14(14), pp. 1171-1174. Available at: <https://doi.org/10.2217/FMB-2019-0222> [Accessed 19 Sep. 2019].
  13. Dufour, N., and Debarbieux, L. (2017). Phage therapy: a realistic weapon against multidrug resistant bacteria. *Medecine Sciences*, 33(4), pp. 410–416.
  14. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., and Abedon, S. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp. 69–86.
  15. Sofy, A.R., El-DougDoug, N.K., Refaey, E.E., Dawoud, R.A., and Hmed, A.A. (2021). Characterization and Full Genome Sequence of Novel KPP-5 Lytic Phage against *Klebsiella pneumoniae* Responsible for Recalcitrant Infection. *Biomedicines*, [online] Volume 9(4), p. 342. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040342> [Accessed 28 Mar. 2021].
  16. Singh, A., Singh, A.N., Rathor, N., Chaudhry, R., Singh, S.K., and Nath, G. (2022). Evaluation of Bacteriophage Cocktail on Septicemia Caused by Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Mice Model. *Frontiers in Pharmacology*, [online] Volume 13, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.778676> [Accessed 7 Feb. 2022].
  17. Anand, T., Virmani, N., Kumar, S., Mohanty, A.K., Pavulraj, S., Bera, B.C., Vaid, R.K., Ahlawat, U., and Tripathi, B.N. (2020). Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, [online] Volume 21, pp. 34–41. Available at:

- <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.09.018> [Accessed 8 Oct. 2019].
18. Cui, Z., Shen, W., Wang, Z., Zhang, H., Me, R., Wang, Y., Zeng, L., Zhu, Y., Qin, J., He, P., and Guo, X. (2012). Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Phage JD001. *Journal of Virology*, 86(24).
  19. Pertics, B.Z., Cox, A., Nyúl, A., Szamek, N., Kovács, T., and Schneider, G. (2021). Isolation and Characterization of a Novel Lytic Bacteriophage against the K2 Capsule-Expressing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain 52145, and Identification of Its Functional Depolymerase. *Microorganisms*, [online] Volume 9(3), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030650> [Accessed 21 Mar. 2021].
  20. Luo, Z., Geng, S., Lu, B., Han, G., Wang, Y., Luo, Y., Yang, Z., Cao, S., and Yao, X. (2021). Isolation, Genomic Analysis, and Preliminary Application of a Bovine *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage vB\_Kpn\_B01. *Frontiers in Veterinary Science*, [online] Volume 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.622049> [Accessed 3 Sep. 2021].
  21. Harb, L., Boeckman, J., Newkirk, H., Liu, M., Gill, J. J., and Ramsey, J. (2019). Complete Genome Sequence of the Novel *Klebsiella pneumoniae* Phage Marfa. *Microbiology Resource Announcements*, [online] Volume 8(29). Available at: <https://doi.org/10.1128/MRA.00748-19> [Accessed 18 Jul. 2019].
  22. Li, F., Tian, F., Nazir, A., Sui, S., Li, M., Cheng, D., Nong, S., Ali, A., KaKar, M.U., Li, L., Feng, Q., and Tong, Y. (2022). Isolation and genomic characterization of a novel *Autographiviridae* bacteriophage IME184 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Research*, 319.
  23. Pu, M., Han, P., Zhang, G., Liu, Y., Li, Y., Li, F., Li, M., An, X., Song, L., Chen, Y., Fan, H., and Tong, Y. (2022). Characterization and Comparative Genomics Analysis of a New Bacteriophage BUCT610 against *Klebsiella pneumoniae* and Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 23(14). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23148040> [Accessed 21 Jul. 2022].
  24. Bai, J., Zhang, F., Liang, S., Chen, Q., Wang, W., Wang, Y., Martín-Rodríguez,

- A.J., Sjöling, Å., Hu, R., & Zhou, Y. (2022). Isolation and Characterization of vB\_kpnM\_17-11, a Novel Phage Efficient Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [online] Volume 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.897531> [Accessed 5 Jul. 2022].
25. Chen, X., Tang, Q., Li, X., Zheng, X., Li, P., Li, M., Wu, F., Xu, Z., Lu, R., and Zhang, W. (2022). Isolation, characterization, and genome analysis of bacteriophage P929 that could specifically lyse the KL19 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Research*, 314.
26. Fang, Q., Feng, Y., McNally, A., and Zong, Z. (2022). Characterization of phage resistance and phages capable of intestinal decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Communications Biology*, [online] Volume 5(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S42003-022-03001-Y> [Accessed 13 Jan. 2022].
27. Herridge, W.P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T.C., and Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of Medical Microbiology*, [online] Volume 69(2), p. 176–194. Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001141> [Accessed 24 Jan. 2020].
28. Zaki, B.M., Fahmy, N.A., Aziz, R.K., Samir, R., and El-Shibiny, A. (2023). Characterization and comprehensive genome analysis of novel bacteriophage, vB\_Kpn\_ZCKp20p, with lytic and anti-biofilm potential against clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [online] Volume 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1077995> [Accessed 23 Jan. 2023].
29. Jamal, M., Hussain, T., Rajanna Das, C., and Andleeb, S. (2015). Characterization of *Siphoviridae* phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, [online] Volume 64(4), pp. 454–462. Available at: <https://doi.org/10.1099/JMM.0.000040> [Accessed 1 Apr. 2015].
30. Abbas, R., Chakkour, M., Zein El Dine, H., Obaseki, E.F., Obeid, S.T.,

- Jezzini, A., Ghssein, G., and Ezzeddine, Z. (2024). General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology*, [online] Volume 13(2), p. 78. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY13020078> [Accessed 27 Jan. 2024].
31. Bandyopadhyay, S., and Samanta, I. (2020). Antimicrobial Resistance in Agri-Food Chain and Companion Animals as a Re-emerging Menace in Post-COVID Epoch: Low-and Middle-Income Countries Perspective and Mitigation Strategies. *Frontiers in Veterinary Science*, [online] Volume 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00620> [Accessed 9 Oct. 2020].
  32. Guilhen, C., Miquel, S., Charbonnel, N., Joseph, L., Carrier, G., Forestier, C., and Balestrino, D. (2019). Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *Npj Biofilms and Microbiomes*, [online] Volume 5(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0098-1> [Accessed 24 Sep. 2019].
  33. Tang, Y.W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I.R., and Schwartzman, J.D. (2014). *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. Academic Press is an imprint of Elsevier.
  34. Lawlor, M.S., Handley, S.A., and Miller, V.L. (2006). Comparison of the Host Responses to Wild-Type and *cpsB* Mutant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Infection and Immunity*, [online] Volume 74(9). Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00244-06> [Accessed 1 Sep. 2006].
  35. Pan, Y.J., Lin, T.L., Chen, C.T., Chen, Y.Y., Hsieh, P.F., Hsu, C.R., Wu, M.C., and Wang, J.T. (2015). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific Reports*, [online] Volume 5. Available at: <https://doi.org/10.1038/SREP15573> [Accessed 23 Oct. 2015].
  36. Wang, L., Shen, D., Wu, H., and Ma, Y. (2017). Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. *PLoS ONE*, [online] Volume 12(3). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0173638> [Accessed 10 Mar. 2017].

37. Russo, T.A., Olson, R., Fang, C.T., Stoesser, N., Miller, M., MacDonald, U., Hutson, A., Barker, J.H., La Hoz, R.M., Johnson, J.R., Backer, M., Bajwa, R., Catanzaro, A.T., Crook, D., De Almeida, K., Fierer, J., Greenberg, D.E., Klevay, M., Patel, P., and Zola, J. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, [online] Volume 56(9), pp. 776–794. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18> [Accessed 27 Aug. 2018].
38. Sharma, S.K. (2015). Comparison of Phenotypic Characteristics and Virulence Traits of *Klebsiella pneumoniae* Obtained from Pneumonic and Healthy Camels (*Camelus dromedarius*). *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, [online] Volume 3(2), pp. 116–122. Available at: <https://doi.org/10.14737/JOURNAL.AAVS/2015/3.2.116.122> [Accessed 21 Jan. 2015].
39. Shankar-Sinha, S., Valencia, G.A., Janes, B.K., Rosenberg, J.K., Whitfield, C., Bender, R.A., Standiford, T.J., and Younger, J.G. (2004). The *Klebsiella pneumoniae* O Antigen Contributes to Bacteremia and Lethality during Murine Pneumonia. *Infection and Immunity*, [online] Volume 72(3). Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1423-1430.2004> [Accessed 1 Mar. 2004].
40. Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] Volume 11(4), p. 589. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589> [Accessed 1 Oct. 1998].
41. Abushaheen, M.A., Muzahed, Fatani, A.J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D.D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A.A., Shaik, J., and Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6).
42. Shon, A.S., Bajwa, R.P.S., and Russo, T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed.

- Virulence*, [online] Volume 4(2), pp. 107–118. Available at: <https://doi.org/10.4161/VIRU.22718> [Accessed 9 Jan. 2013].
43. Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., and Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology*, [online] Volume 10(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179> [Accessed 23 Jun. 2010].
  44. Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., and Quinn, J.P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(9), pp. 785–796.
  45. Martin, R.M., and Bachman, M.A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [online] Volume 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00004> [Accessed 22 Jan. 2018].
  46. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., and Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, [online] Volume 41(3), pp. 252–275. Available at: <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX013> [Accessed 18 May 2017].
  47. Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., and Connolly, L.E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, [online] Volume 6(6). Available at: <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A027029> [Accessed 1 Jun. 2016].
  48. Doi, Y., Wachino, J. ichi, and Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), p. 523.
  49. Poulidakos, P., and Falagas, M.E. (2013). Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(12), pp. 1585–1597.

50. Cirit, O.S., Fernández-Martínez, M., Yayla, B., and Martínez-Martínez, L. (2019). Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(3), pp. 327–335.
51. Yu, F., Wang, L., Pan, J., Yao, D., Chen, C., Zhu, T., Lou, Q., Hu, J., Wu, Y., Zhang, X., Chen, Z., and Qu, D. (2009). Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of rmtB and armA genes in the same isolate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 64(1), pp. 57–63.
52. Peirano, G., Ahmed-Bentley, J., Fuller, J., Rubin, J.E., and Pitout, J.D.D. (2014). Travel-Related Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Alberta, Canada: the First 3 Years. *Journal of Clinical Microbiology*, [online] Volume 52(5). Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00162-14> [Accessed 1 May 2014].
53. Srinivasan, V.B., and Rajamohan, G. (2013). KpnEF, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, Is an SMR-Type Efflux Pump Involved in Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 57(9), p. 4449. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.02284-12> [Accessed 16 Aug. 2013].
54. Srinivasan, V.B., Venkataramaiah, M., Mondal, A., Vaidyanathan, V., Govil, T., and Rajamohan, G. (2012). Functional Characterization of a Novel Outer Membrane Porin KpnO, Regulated by PhoBR Two-Component System in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS ONE*, [online] Volume 7(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041505> [Accessed 25 Jul. 2012].
55. Tsai, Y.K., Liou, C.H., Lin, J.C., Ma, L., Fung, C.P., Chang, F.Y., and Siu, L.K. (2014). A Suitable Streptomycin-Resistant Mutant for Constructing Unmarked In-Frame Gene Deletions Using rpsL as a Counter-Selection Marker. *PLoS ONE*, [online] Volume 9(9). Available at:

- <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0109258> [Accessed 30 Sep. 2014].
56. El-Badawy, M.F., Tawakol, W.M., El-Far, S.W., Maghrabi, I.A., Al-Ghamdi, S.A., Mansy, M.S., Ashour, M.S., and Shohayeb, M.M. (2017). Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *International Journal of Microbiology*, [online] Volume 2017(1). Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/8050432> [Accessed 30 May 2017].
  57. Gokmen, T.G., Nagiyev, T., Meral, M., Onlen, C., Heydari, F., and Koksall, F. (2016). NDM-1 and rmtC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Turkey. *Jundishapur Journal of Microbiology*, [online] Volume 9(10). Available at: <https://doi.org/10.5812/JJM.33990> [Accessed 23 Aug. 2016].
  58. Bush, K. (2010). Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*, [online] Volume 14. Available at: <https://doi.org/10.1186/CC8892> [Accessed 29 Jun. 2010].
  59. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., and Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, [online] Volume 17(17), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJERPH17176278> [Accessed 28 Aug. 2020].
  60. Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C.G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D.M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G.M., Samuelsen, Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P., Poirel, L., Bogaerts, P., Navon-Venezia, S., and Cornaglia, G. (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, [online] Volume 18(5), pp. 413–431. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03821.X> [Accessed 1 May 2012].
  61. Livermore, D.M. (2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*, [online] Volume 27(2), p. 128–142. Available at:

- <https://doi.org/10.3904/KJIM.2012.27.2.128> [Accessed 31 May 2012].
62. Calbo, E., and Garau, J. (2015). The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiology*, 10(6), pp. 1063–1075.
  63. Jiménez-Castellanos, J.C., Ismah, W.A.K.W.N., Takebayashi, Y., Findlay, J., Schneiders, T., Heesom, K.J., and Avison, M.B. (2018). Envelope proteome changes driven by RamA overproduction in *Klebsiella pneumoniae* that enhance acquired  $\beta$ -lactam resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 73(1), pp. 88–94. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX345> [Accessed 6 Oct. 2017].
  64. Evans, B.A., and Amyes, S.G.B. (2014). OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] Volume 27(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13> [Accessed 1 Apr. 2014].
  65. Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] Volume 14(4). Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001> [Accessed 1 Oct. 2001].
  66. Philippon, A., Slama, P., Dény, P., and Labia, R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A  $\beta$ -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] Volume 29(1). Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-15> [Accessed 28 Oct. 2015].
  67. Li, P., Shen, K., Zhang, Y., Ying, J., Zhu, T., Liu, Y., Xu, L., Lin, C., Zhang, K., Li, P., Lu, J., Li, K., Yi, H., Bao, Q., and Xu, T. (2018). Characterization of a Novel bla<sub>KLUC</sub> Variant With Reduced  $\beta$ -Lactam Resistance From an IncA/C Group Plasmid in a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01908> [Accessed 15 Aug. 2018].
  68. Naeem, A., Badshah, S.L., Muska, M., Ahmad, N., and Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*, [online] Volume 21(4). Available at:

- <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21040268> [Accessed 28 Mar. 2016].
69. Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., and Piddock, L.J.V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, [online] Volume 22(8), pp. 438–445. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007> [Accessed 16 May 2014].
  70. Guillard, T., de Jong, A., Limelette, A., Lebreil, A.L., Madoux, J., and de Champs, C. (2016). Characterization of quinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* recovered from diseased companion animals in Europe. *Veterinary Microbiology*, 194, pp. 23–29.
  71. Wong, M.H.Y., Chan, E.W.C., and Chen, S. (2015). Evolution and Dissemination of OqxAB-Like Efflux Pumps, an Emerging Quinolone Resistance Determinant among Members of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 59(6), pp. 3290–3297. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00310-15> [Accessed 14 May 2015].
  72. Zheng, J. xin, Lin, Z. wei, Sun, X., Lin, W. hong, Chen, Z., Wu, Y., Qi, G. bin, Deng, Q. wen, Qu, D., and Yu, Z. jian. (2018). Overexpression of OqxAB and MacAB efflux pumps contributes to eravacycline resistance and heteroresistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes & Infections*, [online] Volume 7(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41426-018-0141-Y> [Accessed 1 Aug. 2018].
  73. Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., and Hooper, D.C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, [online] Volume 2(5). Available at: <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.PLAS-0006-2013> [Accessed 24 Oct. 2014].
  74. Surleac, M., Barbu, I.C., Paraschiv, S., Popa, L.I., Gheorghe, I., Marutescu, L., Popa, M., Sarbu, I., Talapan, D., Nita, M., Iancu, A.V., Arbune, M., Manole, A., Nicolescu, S., Sandulescu, O., Streinu-Cercel, A., Otelea, D., and Chifiriuc, M.C. (2020). Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant

- Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS ONE*, [online] Volume 15(1). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228079> [Accessed 30 Jan. 2020].
75. Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., and Torres, C. (2012). *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 67(4), pp. 886–897. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR548> [Accessed 4 Jan. 2012].
76. Schultsz, C., and Geerlings, S. (2012). Plasmid-Mediated Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Drugs*, 72(1), pp. 1–16.
77. Davis, B., Lilly, H.A., and Lowbury, E.J. (1969). Gram-negative bacilli in burns. *Journal of Clinical Pathology*, 22(6), pp. 634–641.
78. Antoniadou, A., Kontopidou, F., Poulakou, G., Koratzanis, E., Galani, I., Papadomichelakis, E., Kopterides, P., Souli, M., Armaganidis, A., and Giamarellou, H. (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 59(4), pp. 786–790. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL562> [Accessed 16 Feb. 2007].
79. De Majumdar, S., Veleba, M., Finn, S., Fanning, S., and Schneiders, T. (2013). Elucidating the Regulon of Multidrug Resistance Regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 57(4). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01998-12> [Accessed 14 Mar. 2013].
80. Llobet, E., Campos, M.A., Giménez, P., Moranta, D., and Bengoechea, J.A. (2011). Analysis of the Networks Controlling the Antimicrobial-Peptide-Dependent Induction of *Klebsiella pneumoniae* Virulence Factors. *Infection and Immunity*, [online] Volume 79(9). Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.05226-11> [Accessed 16 Aug. 2011].

81. Jayol, A., Poirel, L., Brink, A., Villegas, M.V., Yilmaz, M., and Nordmann, P. (2014). Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 58(8). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00084-14> [Accessed 15 Jul. 2014].
82. Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M.V., Ozdamar, M., Türkoglu, S., and Nordmann, P. (2015). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 70(1), pp. 75–80. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKU323> [Accessed 3 Sep. 2014].
83. Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., Van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., and Adamsa, M.D. (2015). Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 59(1), pp. 536–543. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.04037-14> [Accessed 23 Dec. 2014].
84. Pal, S., Verma, J., Mallick, S., Rastogi, S.K., Kumar, A., and Ghosh, A.S. (2019). Absence of the glycosyltransferase Wcaj in *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 affects biofilm formation, increases polymyxin resistance and reduces murine macrophage activation. *Microbiology*, [online] Volume 165(8), pp. 891–904. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000827> [Accessed 1 Aug. 2019].
85. Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., and Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), pp. 161–168.
86. Macesic, N., Nelson, B., McConville, T.H., Giddins, M.J., Green, D.A., Stump, S., Gomez-Simmonds, A., Annavajhala, M.K., and Uhlemann, A.C.

- (2020). Emergence of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Through Diverse Genetic Adaptations: A Genomic, Retrospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, [online] Volume 70(10), pp. 2084–2091. Available at: <https://doi.org/10.1093/CID/CIZ623> [Accessed 12 Sep. 2019].
87. Wink, P.L., Caierão, J., Nunes, A.G.A., Collar, G.D.S., Martins, J.B., Dalmolin, T.V., Pilonetto, M., and Barth, A.L. (2020). Evaluation of EDTA and Dipicolinic Acid in Broth Microdilution with Polymyxin B as a Phenotypic Test to Detect the *mcr-1* Gene. *Microbial Drug Resistance*, 26(4), pp. 329–333.
88. Dortet, L., Broda, A., Bernabeu, S., Glupczynski, Y., Bogaerts, P., Bonnin, R., Naas, T., Filloux, A., and Larrouy-Maumus, G. (2020). Optimization of the MALDIxin test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 75(1), pp. 110–116. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ405> [Accessed 3 Oct. 2019].
89. Golan, Y. (2015). Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: a systematic literature review of current and emerging treatment options. *BMC Infectious Diseases*, [online] Volume 15(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S12879-015-1054-1> [Accessed 5 Aug. 2015].
90. Ruzin, A., Visalli, M.A., Keeney, D., and Bradford, P.A. (2005). Influence of Transcriptional Activator RamA on Expression of Multidrug Efflux Pump AcrAB and Tigecycline Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 49(3). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1017-1022.2005> [Accessed 1 Mar. 2005].
91. Fang, L., Chen, Q., Shi, K., Li, X., Shi, Q., He, F., Zhou, J., Yu, Y., and Hua, X. (2016). Step-Wise Increase in Tigecycline Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Mutations in *ramR*, *lon* and *rpsJ*. *PLoS ONE*, [online] Volume 11(10). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0165019> [Accessed 20 Oct. 2016].
92. Källman, O., Motakefi, A., Wretling, B., Kalin, M., Olsson-Liljequist, B., and

- Giske, C.G. (2008). Cefuroxime non-susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing ramA and acrA and expressing ompK35 at reduced levels. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, [online] Volume 62(5), pp. 986–990. Available at: <https://doi.org/10.1093/JAC/DKN296> [Accessed 21 Jul. 2008].
93. Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., García-Fernández, A., and Carattoli, A. (2014). Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [online] Volume 58(3). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01803-13> [Accessed 19 Feb. 2014].
94. Ahn, C., Yoon, S.S., Yong, T.S., Jeong, S.H., and Lee, K. (2016). The Resistance Mechanism and Clonal Distribution of Tigecycline-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea. *Yonsei Medical Journal*, [online] Volume 57(3), pp. 641–646. Available at: <https://doi.org/10.3349/YMJ.2016.57.3.641> [Accessed 15 Mar. 2016].
95. Clokie, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., and Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, [online] Volume 1(1), pp. 31–45. Available at: <https://doi.org/10.4161/BACT.1.1.14942> [Accessed 1 Jan. 2011].
96. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., and Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, [online] Volume 363(4). Available at: <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNW002> [Accessed 10 Jan. 2016].
97. D’Andrea, M.M., Marmo, P., Henrici De Angelis, L., Palmieri, M., Ciacci, N., Di Lallo, G., Demattè, E., Vannuccini, E., Lupetti, P., Rossolini, G.M., and Thaller, M.C. (2017).  $\phi$ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. *Scientific Reports*, [online] Volume 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-017-02788-9> [Accessed 1 Jun. 2017].
98. Verma, V., Harjai, K., and Chhibber, S. (2009). Characterization of a T7-Like

- Lytic Bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: A Potential Therapeutic Agent. *Current Microbiology*, 59(3), pp. 274–281.
99. Loc-Carrillo, C., and Abedon, S.T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, [online] Volume 1(2), pp. 111–114. Available at: <https://doi.org/10.4161/BACT.1.2.14590> [Accessed 1 Mar. 2011].
  100. Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., Sun, C., and Feng, X. (2012). A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. *PLoS ONE*, [online] Volume 7(3). Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0031698> [Accessed 1 Mar. 2012].
  101. Yosef, I., Goren, M.G., Globus, R., Molshanski-Mor, S., and Qimron, U. (2017). Extending the Host Range of Bacteriophage Particles for DNA Transduction. *Molecular Cell*, [online] Volume 66(5), pp. 721–728. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.025> [Accessed 25 May 2017].
  102. Harper, D.R. (2018). Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses*, [online] Volume 10(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/V10040177> [Accessed 5 Apr. 2018].
  103. Chen, C., Tao, Z., Li, T., Chen, H., Zhao, Y., and Sun, X. (2023). Isolation and characterization of novel bacteriophage vB\_KpP\_HS106 for *Klebsiella pneumoniae* K2 and applications in foods. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1227147> [Accessed 16 Aug. 2023].
  104. Balcão, V.M., Moreli, F.C., Silva, E.C., Belline, B.G., Martins, L.F., Rossi, F.P.N., Pereira, C., Vila, M.M.D.C., and da Silva, A.M. (2022). Isolation and Molecular Characterization of a Novel Lytic Bacteriophage that Inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Pharmaceutics*, [online] Volume 14(7). Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071421> [Accessed 6 Jul. 2022].
  105. Fayez, M.S., Hakim, T.A., Zaki, B.M., Makky, S., Abdelmoteleb, M., Essam, K., Safwat, A., Abdelsattar, A.S., and El-Shibiny, A. (2023).

- Morphological, biological, and genomic characterization of *Klebsiella pneumoniae* phage vB\_Kpn\_ZC2. *Virology Journal*, [online] Volume 20(1), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02034-x> [Accessed 3 May 2023].
106. Li, M., Guo, M., Chen, L., Zhu, C., Xiao, Y., Li, P., Guo, H., Chen, L., Zhang, W., and Du, H. (2020). Isolation and Characterization of Novel Lytic Bacteriophages Infecting Epidemic Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01554> [Accessed 21 Jul. 2020].
107. Zeineldin, M., Esmael, A., Al-Hindi, R.R., Alharbi, M.G., Ashenafi Bekele, D., and Teklemariam, A.D. (2023). Beyond the Risk of Biofilms: An Up-and-Coming Battleground of Bacterial Life and Potential Antibiofilm Agents. *Life*, [online] Volume 13(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/LIFE13020503> [Accessed 11 Feb. 2023].
108. Hsieh, P.F., Lin, H.H., Lin, T.L., Chen, Y.Y., and Wang, J.T. (2017). Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization. *Scientific Reports*, [online] Volume 7(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/S41598-017-04644-2> [Accessed 4 Jul. 2017].
109. Wu, J.W., Wang, J.T., Lin, T.L., Liu, Y.Z., Wu, L.T., and Pan, Y.J. (2023). Identification of three capsule depolymerases in a bacteriophage infecting *Klebsiella pneumoniae* capsular types K7, K20, and K27 and therapeutic application. *Journal of Biomedical Science*, [online] Volume 30(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12929-023-00928-0> [Accessed 20 May 2023].
110. Pan, Y.J., Lin, T.L., Chen, Y.Y., Lai, P.H., Tsai, Y.T., Hsu, C.R., Hsieh, P.F., Lin, Y.T., and Wang, J.T. (2019). Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microbial Biotechnology*, [online] Volume 12(3), pp. 472–486. Available at:

- <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13370> [Accessed 31 Jan. 2019].
111. Lin, T.L., Hsieh, P.F., Huang, Y.T., Lee, W.C., Tsai, Y.T., Su, P.A., Pan, Y.J., Hsu, C.R., Wu, M.C., and Wang, J.T. (2014). Isolation of a Bacteriophage and Its Depolymerase Specific for K1 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in Typing and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, [online] Volume 210(11), pp. 1734–1744. Available at: <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIU332> [Accessed 7 Jul. 2014].
  112. Pan, Y.-J., Lin, T.-L., Chen, C.-C., Tsai, Y.-T., Cheng, Y.-H., Chen, Y.-Y., Hsieh, P.-F., Lin, Y.-T., and Wang, J.-T. (2017). *Klebsiella* Phage  $\Phi$ K64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types. *Journal of Virology*, [online] Volume 91(6), pp. 2457–2473. Available at: <https://doi.org/10.1128/JVI.02457-16> [Accessed 28 Feb. 2017].
  113. Liu, Y., Leung, S.S.Y., Huang, Y., Guo, Y., Jiang, N., Li, P., Chen, J., Wang, R., Bai, C., Mi, Z., and Gao, Z. (2020). Identification of Two Depolymerases From Phage IME205 and Their Antivirulent Functions on K47 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00218> [Accessed 14 Feb. 2020].
  114. Wu, Y., Wang, R., Xu, M., Liu, Y., Zhu, X., Qiu, J., Liu, Q., He, P., and Li, Q. (2019). A Novel Polysaccharide Depolymerase Encoded by the Phage SH-KP152226 Confers Specific Activity Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* via Biofilm Degradation. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02768> [Accessed 3 Dec. 2019].
  115. Domingo-Calap, P., Beamud, B., Vienne, J., González-Candelas, F., and Sanjuán, R. (2020). Isolation of Four Lytic Phages Infecting *Klebsiella pneumoniae* K22 Clinical Isolates from Spain. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 21(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS21020425> [Accessed 9 Jan. 2020].
  116. Domingo-Calap, P., Beamud, B., Mora-Quilis, L., González-Candelas, F., and

- Sanjuán, R. (2020). Isolation and Characterization of Two *Klebsiella pneumoniae* Phages Encoding Divergent Depolymerases. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 21(9). Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS21093160> [Accessed 9 Jan. 2020].
117. Townsend, E.M., Kelly, L., Gannon, L., Muscatt, G., Dunstan, R., Michniewski, S., Sapkota, H., Kiljunen, S.J., Kolsi, A., Skurnik, M., Lithgow, T., and Jameson, E. (2021). Isolation and Characterization of *Klebsiella* Phages for Phage Therapy. *PHAGE*, [online] Volume 2(1), pp. 26–42. Available at: <https://doi.org/10.1089/PHAGE.2020.0046> [Accessed 17 Mar. 2021].

## Додаток А 1

**СПЕКТРИ ЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ДОСЛІДЖУВАНИХ  
БАКТЕРІОФАГІВ**

Бактерія Фаг	1298	DSM	751	3744	1303	1372	793	249	674
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	+	-	+	-	-	-	+
28	-	+	-	-	-	-	-	-	-
26	-	+	-	-	-	-	-	-	-
25/1	+	-	-	-	-	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	+	-	+
23/1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
22	-	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	+	-	+	+	+	-	+
19	+	-	+	-	+	+	+	-	+
16	+	-	+	-	+	-	+	-	+
15	-	+	-	-	-	+	-	-	+
14	-	+	+	-	-	-	-	-	+
13	+	+	+	+	+	+	+	-	+
12	+	-	+	-	+	-	+	-	+
11	+	-	+	+	+	+	+	-	+
5	-	+	-	-	-	-	-	-	-



## Додаток А 3

Бактерія Фат	996	668	109	361	439	128	461	255	1567	1646
31	-	-		-	-	-	-	+	-	-
30	-	-		-	-	-	-	+	-	-
29	-	-		+	-	-	-	-	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
25/1	-	-		-	-	+	-	-	-	-
25	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
24	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
23/1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
20	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
19	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
16	-	+		-	-	+	-	-	+	+
15	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
13	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
12	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
11	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-





## Додаток А 6

Бактерія Фат	61	69	196	8	5
31					
30					
29	+	-	-	-	-
28					
26	-	-	-	-	+
25/1	-	-	-	-	-
25					
24					
23/1					
22	-	-	-	+	+
20					
19	+	-	-	-	-
16					
15	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-
13					
12					
11	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-

## Додаток Б

**ПІДСУМКИ ДОСЛІДЖЕНЬ ЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ  
БАКТЕРІОФАГІВ**

Зразки фагів	Всього +	Всього -	Всього проб	% Активності
Кр 5	3	50	53	5,7
Кр 11	22	32	54	40,7
Кр 12	18	26	44	40,9
Кр 13	19	30	49	38,8
Кр 14	13	36	49	26,5
Кр 15	11	38	49	22,4
Кр 16	15	24	39	38,5
Кр 19	20	33	53	37,7
Кр 20	18	30	48	37,5
Кр 22	12	41	53	22,6
Кр 23/1	7	41	48	14,6
Кр 24	8	40	48	16,7
Кр 25	6	37	43	14,0
Кр 25/1	6	43	49	12,2
Кр 26	13	40	53	24,5
Кр 28	3	45	48	6,3
Кр 29	16	28	44	36,4
Кр 30	2	37	39	5,1
Кр 31	5	34	39	12,8