

## НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

диссертационного исследования на тему:

### **«Модельное введение вирулентных бактериофагов при индивидуальном и групповом содержании обезьян»**

(специальность 01.05.11 - «Микробиология»)

В настоящее время во всем мире проводятся исследования, направленные на изучение свойств литических бактериофагов, механизмов фагорезистентности бактерий и на разработку новых фагосодержащих композиций и препаратов. В отношении некоторых европейских фармацевтических препаратов бактериофагов завершены или завершаются рандомизированные, двойные слепые, плацебо контролируемые клинические испытания. Поэтому в ближайшие годы следует ожидать появления и активного применения, новых фагосодержащих композиций. В то же время остается неизученным влияние массового использования литических бактериофагов на состояние микроэкологии биотопов живых организмов, а также на биологическое разнообразие и адаптационные возможности условно-патогенных и патогенных бактерий в окружающей среде.

При анализе известных моделей взаимодействия организма человека и микробиоты установлено, что одной из наиболее информативных моделей этого взаимодействия могут быть обезьяны. Согласно данным многолетних исследований, обезьяны близки к человеку по показателям физиологии пищеварительного тракта, по восприимчивости к большинству свойственных человеку инфекций. При этом модель макак резусов является релевантной по отношению к человеку для изучения особенностей взаимодействия макроорганизма, в том числе функционирования пищеварительного тракта, и микробиоты кишечника, а также физиологических изменений, обусловленных таким взаимодействием. Условно-патогенные и патогенные бактерии видов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* часто выделяются от обезьян и могут быть причиной дисбиотических нарушений, повышенной заболеваемости, осложняющих течение хронических заболеваний желудочно-кишечного и респираторного трактов.

**Цель настоящего исследования** – изучить влияние введения вирулентных бактериофагов на модели макак резусов при индивидуальном и групповом содержании животных.

#### **Задачи исследования:**

1. Исследовать структуру патогенных и условно патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, являющихся причиной дисбиотических нарушений, осложняющих течение хронических заболеваний желудочно-кишечного и респираторного тракта *Macaca mulatta*.
2. Исследовать спектр литической активности бактериофагов в отношении циркулирующих у *Macaca mulatta* патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

3. Разработать и апробировать антибактериальную композицию на основе вирулентных бактериофагов для санации *Macaca mulatta* от циркулирующих ветеринарно и доклинически значимых патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий.
4. Провести на индивидуальном и групповом уровне сравнительный анализ изменения количества ДНК подобранных бактериофагов у обезьян, биотопы которых содержат или не содержат фагочувствительные бактерии, а также динамику фагоспецифической ДНК в окружающей среде.
5. Изучить особенности динамики фагочувствительности изолятов патогенных и условно-патогенных бактерий *Macaca mulatta*, вызванных экзогенным введением подобранных вирулентных бактериофагов, на индивидуальном и групповом уровне.

### **Научная новизна**

Показана ветеринарная и субклиническая значимость бактерий видов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* у обезьян *Macaca mulatta* (макак резусов), используемых в качестве лабораторных животных.

Впервые предложена антибактериальная композиция на основе вирулентных бактериофагов, которая может быть использована для обеспечения санации лабораторных приматов от специфических патогенных и условно-патогенных бактерий, а также для получения и содержания животных, свободных от бактерий, видов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* (заявка на выдачу патента на изобретение РФ № 2021138736 от 24.12.2021).

Впервые проведено исследование вирулентных бактериофагов *in vivo* с использованием обезьян в качестве лабораторных животных. Установлены минимальные сроки выделения бактериофагов и фагоспецифической ДНК из биотопов организма обезьян при введении бактериофагов на индивидуальном и групповом уровне.

Впервые проведен модельный эксперимент по изучению изменения фагочувствительности патогенных и условно-патогенных бактерий на индивидуальном и групповом уровне. Показано сохранение спектра фагочувствительности грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* при персистировании стафилококкового бактериофага в окружающей среде на протяжении периода не менее одного года с начала проведения эксперимента.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявлены наиболее часто циркулирующие у обезьян *Macaca mulatta* (макак резусов), используемых в качестве лабораторных животных, патогенные и условно-патогенные бактерии: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* Таргетный микробиологический мониторинг этих микроорганизмов обеспечит своевременную санацию *Macaca mulatta*, снижая общую заболеваемость и смертность среди обезьян.

Установленные минимальные сроки выделения бактериофагов и фагоспецифической ДНК из биотопов организма обезьян позволят проводить модельные эксперименты и доклинические исследования новых препаратов и средств на основе бактериофагов.

Установленное изменение спектра фагочувствительности грамотрицательных бактерий *Proteus spp.*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* и сохранение спектра фагочувствительности грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* позволит оптимизировать подходы к рациональной фаготерапии и фагопрофилактике.

Разработанная антибактериальная композиция на основе бактериофагов обеспечит эффективную и безопасную санацию лабораторных приматов от специфических патогенных и условно-патогенных бактерий, а также позволит получать и содержать животных, свободных от специфических патогенов.

Композиция внедрена в работу лаборатории инфекционной патологии и клинико-ветеринарного отделения ФГБНУ «Научно-исследовательского института медицинской приматологии» (акт внедрения № 205 от 23.06.2022г.)

В ходе работы аннотированы и подготовлены к депонированию в NCBI GenBank полногеномные последовательности бактериофагов *Escherichia phage Ec7A-M1*, *Proteus phage Pr22* и *Klebsiella phage KPV16A-M1*.

## **Методология и методы исследования**

В основу научной работы положен принцип изучения и анализа фактического материала. Для достижения поставленной цели диссертации и решения задач исследования в работе использован комплекс методов: клинические, лабораторные, бактериологические (микроскопические, морфологические, культуральные исследования), молекулярно-генетические, биоинформатические методы исследования бактериофагов, а также аналитический и статистический методы (для обработки результатов исследований применялась компьютерная программа GraphPad PRISM).

## **Объекты исследования**

В исследовании были использованы обезьяны вида *Macaca mulatta* (макаки резусы) в возрасте от 6 мес. до 18 лет, содержащихся на территории ФГБНУ «Научно-исследовательского института медицинской приматологии» г. Сочи. Всего в эксперименте использовано 26 животных.

Животные, используемые в эксперименте, являлись акклиматизированными и содержались в групповых клетках по 4 – 7 особей. Клетки имели зимние домики с центральным отоплением и водоснабжением. При эксперименте на индивидуальном уровне (пероральное, назальное введение бактериофагов) животные содержались в специальном помещении для содержания обезьян (температура окружающего воздуха  $24 \pm 2$  °C); относительная влажность ( $65 \pm 5$ ); 8-часовая продолжительность светового дня). Животные содержались в индивидуальных клетках (оборудованных автоматическими поилками), на которых были указаны номер животного, группа. Пищевой рацион у всех обезьян состоял из полнорационного гранулированного корма, хлеба, яиц, фруктов, овощей. Животные без ограничения получали воду из центрального водопровода.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требования Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS №123 и Директивы №2010 /63/ EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010г. Разрешение на проведение работ было получено от Комитета по Биоэтике ФГБНУ «НИИ Медицинской Приматологии», который работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (ФГБНУ «НИИ МП») – №36/1, №53.

**Материалами для исследования** являлись цельная кровь, сыворотка крови, назальные соскобы, фекальные образцы обезьян, а также образцы сточных вод.

В ходе выполнения работы были выделены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы у животных, содержащихся на территории ФГБНУ НИИ «Медицинской Приматологии» (таблица 1).

Таблица 1 – Количество культур, изолированных у обезьян и изученных на литическую активность бактериофагов во время диссертационного исследования

	Наименование	Количество
1	<i>Escherichia coli</i>	161
2	<i>Proteus spp.</i>	131
3	<i>Klebsiella spp.</i>	90
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	112
Всего		494

В работе были использованы штаммы бактериофагов из коллекции лаборатории «Клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов» ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и препараты бактериофагов производства АО «НПО «Микроген» различных серий (таблица 2).

Таблица 2 – Бактериофаги, используемые для оценки фагочувствительности у выделенных микроорганизмов

№ п/п	Микроорганизм-мишень	кол-во фагов	Наименование фагов	Источник
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3	СН1, SCH1, Sa30-2	Коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
2	<i>Escherichia coli</i>	4	ЕСD7, V18, Ес7А-М1, ЕС1-7	Коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
3	<i>Proteus spp.</i>	6	Н49, П16, У52, Н125,	Коммерческий препарат «НПО «Микроген»
			Pro-1, Pr22	Коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
4	<i>Klebsiella spp.</i>	11	П16, Н100, У37, У41, П246, У38, У34, У40, Н54,	Коммерческий препарат «НПО «Микроген»
			КРV15, КРV16А-М1	Коллекция ФБУН МНИИЭМ

**Методы исследования****Клинические и инструментальные методы исследования:**

осмотр и термометрия животных.

**Лабораторные методы исследования:** риноцитограмма, общий анализ крови, биохимический анализ крови.

**Бактериологические методы исследования:** выделение и идентификация микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и *Staphylococcus spp.*, спот-тест - метод качественного определения лизиса бактериальной культуры бактериофагом, нарастание титра фага методом агаровых слоев по Грациа, метод агаровых слоев по Грациа, метод выявления бактериофага в биологических образцах с обогащением, определение нейтрализующей активности сыворотки крови.

**Молекулярно-генетические методы исследования:** ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом горизонтального гель-электрофореза, ПЦР в реальном времени, секвенирование.

**Статистические методы исследования**

Данные обрабатывали методами описательной статистики, вычисляли среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD) или 95% доверительный интервал (ДИ). Обработку проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (США) и с помощью калькулятора на веб-странице для расчета доверительного интервала частотных данных по модифицированному методу Вальда (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/confInterval1/>). Для сравнения частотных показателей был использован критерий  $\chi^2$ . Для определения изменений частотных показателей в зависимости от года исследования применяли тренд-тест на основе критерия  $\chi^2$ .

Статистическую обработку данных использовали при межгрупповых и внутригрупповых сравнениях, где сопоставлялись показатели, полученные для животных в различные сроки проведения эксперимента (исходные значения - фон, через 24 часа после введения бактериофага). Для всех регистрируемых показателей были представлены следующие значения описательной статистики: среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD). Для сравнения изучаемых показателей был использован непараметрический метод Манн-Уитни. Результаты сравнения будут считаться статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **Личное участие автора в получении результатов**

Автор самостоятельно проводила анализ литературы по теме, участвовала в обсуждении постановки цели и задач диссертации, разработала дизайн исследования. Проводила сбор исследуемого материала (кровь, назальный соскоб, фекальные образцы, сточные воды), назальное и пероральное введение бактериофагов, гематологические исследования цельной крови. Описывала внешний вид животных во время эксперимента, проводила термометрию. Проводила микробиологические исследования с выделением штаммов, оценивала литическую активность бактериофагов. Совместно со старшим научным сотрудником лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского к.б.н. Киселевой И.А. осуществляла исследование литических свойств бактериофагов и определяла их титры. Молекулярно-генетические исследования проводила совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «НИИ МП» к.б.н. Агумава А.А. Проводила статистические методы исследования, обработку и анализ результатов исследований, готовила к публикации материалы по диссертационному исследованию в журналах, рекомендованных ВАК.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Определена структура циркулирующих патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, выделенных от *Macaca mulatta*, являющихся причиной дисбиотических нарушений, осложняющих течение хронических заболеваний желудочно-кишечного и респираторного тракта животных. Установлена релевантность изучения особенностей циркуляции патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий при групповом содержании макак резусов для моделирования данных особенностей микробиоты в человеческих популяциях.

2. Определен спектр литической активности бактериофагов, активных в отношении циркулирующих у *Macaca mulatta* патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий; подобраны и вновь выделены вирулентные штаммы бактериофагов, обладающие широким спектром литической активности в отношении бактерий, колонизирующих биотопы организма макак резусов. Разработана антибактериальная композиция на основе вирулентных бактериофагов для санации лабораторных приматов.

3. Выявлено изменение спектра фагочувствительности грамотрицательных бактерий *Proteus spp.*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* и сохранение спектра фагочувствительности грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* при экзогенном введении обезьянам вирулентных бактериофагов в формах для профилактики и лечения бактериальных кишечных инфекций, для профилактики бактериальных инфекций респираторного тракта на индивидуальном и групповом уровне. Выявлено персистирование стафилококкового бактериофага на протяжении периода не менее одного года с начала проведения эксперимента на обезьянах на территории их содержания.

## Степень достоверности и апробации результатов исследования

Достоверность результатов диссертации основана на достаточном объеме выборки изученных материалов, использовании в работе современных методов исследования (ПЦР, секвенирование) и программного обеспечения для статистической обработки данных (программа GraphPad PRISM).

Диссертация выполнена в соответствии с отраслевой программой по фундаментальным исследованиям НИОКТР № 122012600267-3.

Основные положения диссертационной работы доложены на: четвертой научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (сентябрь 2018г., Нижний Новгород); международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии» (апрель 2019 г., Сочи); международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» (ноябрь 2020 г., Сочи); четвертой международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (ноябрь 2021г., Сочи).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе микробиологического мониторинга обезьян было показано, что наиболее часто у здоровых (таблица 3) и больных особей (таблица 4) выделяются патогенные и условно-патогенные бактерии вида *E. coli* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*

Таблица 3 – Условно-патогенные энтеробактерии, выделенные у здоровых обезьян с 2016 по 2020г.

Энтеробактерии	Год исследования					Тренд-тест	За 5 лет
	2016	2017	2018	2019	2020		
<i>Citrobacter spp.</i>	1,6 %	1,0 %	2,2 %	0,8 %	1,2 %	p = 0,2629	1,3%
<i>E.coli</i>	78,8 %	88,3 %	89,3 %	82,2 %	84,9 %	p = 0,1131	<b>84,6 %*</b>
<i>E.coli</i> –гемолит.	1,3 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %	<b>p &lt; 0,0001</b> (-)	0,3 %
<i>E.coli</i> л/отр	2,2 %	5,4 %	9,6 %	4,3 %	4,8 %	<b>p = 0,0372</b> (-)	<b>5,2 %*</b>
<i>Edwardsiella spp.</i>	0,2 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	<b>p = 0,0344</b> (-)	0,1 %
<i>Enterobacter spp.</i>	2,5 %	2,2 %	5,3 %	5,2 %	5,7 %	<b>p &lt; 0,0001</b> (-)	<b>4,1 %*</b>
<i>Hafnia spp.</i>	0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	p = 0,6482	0,0 %
<i>Klebsiella spp.</i>	4,4 %	1,8 %	4,1 %	5,3 %	4,2 %	<b>p = 0,0406</b> (-)	<b>4,0 %*</b>
<i>Morganella spp.</i>	1,0 %	1,6 %	0,7%	1,6 %	1,1 %	p = 0,8927	1,2 %
<i>Proteus spp.</i>	11,8 %	11,3 %	9,3 %	8,7 %	7,3 %	<b>p &lt; 0,0001</b> (-)	<b>9,8 %*</b>
<i>Providencia spp.</i>	0,4 %	2,0 %	2,7 %	2,4 %	3,9 %	<b>p &lt; 0,0001</b> (-)	2,2 %
Кол-во животных	<b>1262</b>	<b>1358</b>	<b>1186</b>	<b>1602</b>	<b>946</b>	—	6354

\* –  $p < 0,001$  (критерий  $\chi^2$  статистические различия выявляемости по отношению к прочим микроорганизмам. В скобках приведен 95% доверительный интервал. Стрелками указано направление тренда изменений частоты выявляемости с годами при статистической значимости теста.

По сравнению с остальными энтеробактериями выделение лактозоположительных *E.coli* наблюдалось с частотой 84,6 % , *Proteus spp.* 9,8 % , *E.coli* лактозоотрицательных 5,2 % , *Enterobacter spp.* 4,1% , *Klebsiella spp.* 4,0 % . В единичных случаях от 0,0 % до 2,2 % были выделены *Citrobacter spp.*, *E.coli* – гемолитическая, *Edwardsiella spp.*, *Hafnia spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*

При анализе динамики выделения по годам показано, что выявляемость лактозоположительных *E.coli* (тренд–тест,  $p = 0,1131$ ) не зависит от года исследования. Среди остальных видов кишечной палочки частота выделения гемолитической *E.coli* уменьшилось за текущий период, а выделение лактозоотрицательной *E.coli* значимо изменялась с годами.

Микробиологический анализ фекалий, полученных от больных животных, также показал, что указанные выше микроорганизмы остаются преобладающими из семейства *Enterobacteriaceae*, за исключением *Enterobacter spp.*

Таблица 4 - Условно-патогенные энтеробактерии, выделенные у больных обезьян за 5 лет при патологии кишечника

Энтеробактерии	Год исследования					Тренд–тест	За 5 лет
	2016	2017	2018	2019	2020		
<i>Citrobacter spp.</i>	1,6 %	0,9 %	1,2 %	3,7 %	2,9 %	$p = 0,3651$	1,4 %
<b><i>E.coli</i></b>	97,7 %	100 %	91,4 %	89,6 %	91,0 %	$p < 0,0005$ ( $\downarrow$ )	<b>92,7 %*</b>
<i>E.coli</i> –гемолит.	0,0 %	0,9 %	2,5 %	3,0 %	4,5 %	$p = 0,0046$ ( $\downarrow$ )	2,6 %
<i>E.coli</i> л/отр	3,1 %	4,6 %	6,1 %	5,2 %	6,1 %	$p = 0,2578$	5,3 %
<i>Edwardsiella spp.</i>	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %		0,0 %
<i>Enterobacter spp.</i>	5,5 %	4,6 %	5,5 %	3,4 %	0,4 %	$p = 0,0043$ ( $\downarrow$ )	3,4 %
<i>Hafnia spp.</i>	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %		0,0 %
<b><i>Klebsiella spp.</i></b>	7,0 %	2,7 %	6,1 %	6,3 %	8,6 %	$p = 0,2299$	<b>6,6 %*</b>
<i>Morganella spp.</i>	0,0 %	0,0 %	3,1 %	1,9 %	1,6 %	$p = 0,1673$	1,5 %
<b><i>Proteus spp.</i></b>	28,9 %	21,8 %	14,7 %	16,4 %	15,9 %	$p = 0,0026$ ( $\downarrow$ )	<b>18,4 %*</b>
<i>Providencia spp.</i>	0,0 %	2,7 %	2,5 %	2,6 %	0,4 %	$p = 0,9341$	1,6 %
Кол-во животных	<b>128</b>	<b>110</b>	<b>163</b>	<b>268</b>	<b>245</b>	—	914

\* –  $p < 0,001$  (критерий  $\chi^2$ ), статистические различия выявляемости по отношению к прочим микроорганизмам. В скобках приведен 95% доверительный интервал. Стрелками указано направление тренда изменений частоты выявляемости с годами при статистической значимости теста.

Выделение лактозоположительной *E.coli* происходило с частотой 92,7 % , *Proteus spp.* 18,4 % , *Klebsiella spp.* 6,6 % за 5 лет.

Увеличилось выделение лактозоотрицательной *E.coli* с 2,6 % у здоровых животных до 5,3 % у обезьян с диарейным синдромом (таблица 4).



При анализе динамики выделения по годам показано, что выявляемость лактозоположительных *E. coli* и *Proteus spp.* с годами достоверно уменьшается. Статистически значимая тенденция к снижению или увеличению выделения *Klebsiella spp.* за текущий период не выявлена.

При исследовании 191 образца кишечного содержимого у обезьян разных видов, патогенные эшерихии выявлены в 183 пробах (95,8%), в 8 пробах (4,2%) патогенные *E. coli* не обнаружены. При этом ДНК энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) обнаружена в 92,9% (170 проб), ДНК энтеропатогенных *E. coli* (EPEC) – в 63,4% (116 проб), ДНК энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) – в 1,1% (2 пробы) и ДНК энтероагрегативных *E. coli* (EAгEC) – в 0,6% (1 проба). Токсигенные *E. coli* (ETEC) не были обнаружены. Как показали наши исследования, EIEC детектированы во всех образцах материала, полученных от клинически здоровых и больных обезьян при патологии кишечника.

Для изучения носительства *Staphylococcus aureus* у обезьян проведены микробиологические исследования носовой полости клинически здоровых особей.

Таблица 5 – Выделение золотистого стафилококка из носовой полости обезьян

№	Виды обезьян	Кол-во особей	<i>S.aureus</i> – позитивные
1	Макаки резусы	69	25
2	Макаки яванские	10	6
3	Макаки лапундеры	3	3
	Всего	84	34 (41,6%)

Как видно из таблицы 5, золотистый стафилококк в носовой полости у обезьян обнаружен в 41,6 %.

Полученные результаты подтверждают циркуляцию грамотрицательных и грамположительных бактерий у обезьян и их роль в воспалительных процессах желудочно-кишечного и респираторного трактов.

В результате проведенных собственных микробиологических исследований были выявлены следующие наиболее часто циркулирующие патогенные и условно-патогенные бактерии у макак резусов: *Escherichia coli* (в особенности EIEC и EPEC), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* Персистирование патогенных *E.coli*, *Klebsiella spp.* и *Proteus spp.* могут влиять на ряд исследований при использовании обезьян в качестве лабораторных животных.

В ходе работы проведен анализ спектра литической активности коммерческих бактериофагов в отношении выделенных циркулирующих у обезьян грамотрицательных и грамположительных бактерий. Кумулятивные результаты количества лизированных на «+++» и «++++» культур представлены в таблицах 6-8.

Таблица 6 – Спектр литической активности коммерческих бактериофагов

Микроорганизмы-мишени	Общее кол-во культур	Кол-во лизированных культур	Всего
<b>Интести</b>			

<i>E.coli</i>	22	-	
<i>E.coli</i> гем.	38	10	26,3 %
<i>E.coli</i> л/omp	76	32	42,1%
<i>P.mirabilis</i>	57	4	7,7 %
<i>P.vulgaris</i>	73	6	
<i>S.aureus</i>	86	36	41,9 %
Всего	352	88	25%
<b>Клебсиеллезный</b>			
<i>K.pneumoniae</i>	56	1	3,4%
<i>K.oxytoca</i>	31	2	
<b>Всего</b>	<b>87</b>	<b>3</b>	

Таблица 7 – Спектр литической активности коммерческих бактериофагов

Микроорганизмы-мишени (количество)	Номер серии бактериофага			
	H100/ H54	У41	У27	У40
<i>K.pneumoniae</i> (8)	1/0	1	1	1
<i>K.oxytoca</i> (9)	0/1	0	0	0
<b>Всего (17)</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Результаты исследования по коммерческим бактериофагам показали, что Интести-бактериофаг проявил литическую активность в 25 % случаев, клебсиеллезный бактериофаг всего 3,4 %.

Таблица 8 – Спектр литической активности коммерческих бактериофагов

Микроорганизмы-мишени (количество)	Номер серии бактериофага			
	H49	H125	У52	П16
<i>Proteus vulgaris</i> (10)	2	2	0	6
<i>Proteus mirabilis</i> (8)	2	1	2	4
<b>Всего (18)</b>	<b>4 (22,2)</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>10 (55,5%)</b>

В качестве стафилококкового бактериофага был выбран фаг СН1, лизировавший все выделенные культуры золотистого стафилококка. Нами не были выявлены в доступных коллекциях отдельные штаммы бактериофагов, обладающие достаточно широким спектром литической активности в отношении выделенных от обезьян Е1ЕС, ЕРЕС, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* Поэтому была проведена работа, направленная на выделение и характеристику новых вирулентных бактериофагов. В качестве основных критериев к кандидатным штаммам были продукция прозрачных бляшек, высокий титр фага при его амплификации и строго литический тип жизненного цикла.

Таким образом в состав композиции для санации обезьян были выбраны четыре штамма бактериофага, обладающие наибольшим спектром литической активности в отношении выделенных от обезьян изолятов бактерий. Характеристика штаммов бактериофагов представлена в Таблице 9.

Таблица 9 - Штаммы бактериофагов для лечебно-профилактического применения у обезьян

Наименование бактериофага	<i>Escherichia phage</i> Ec7A-M1	<i>Klebsiella phage</i> KPV16A-M1	<i>Proteus phage</i> Pr22	<i>Staphylococcus phage</i> CH1
Источник	Сточные воды	Сточные воды	Сточные воды	Коллекция МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Количество лизированных культур	10/10 (100%): 5 – EPEC, 5 – EIEC	10/10 (100%): 5 – <i>K. pneumoniae</i> , 5 – <i>K. oxytoca</i>	10/10 (100%): 5 – <i>P. mirabilis</i> 5 – <i>P. mirabilis</i>	10/10 (100%): 10 – <i>S. aureus</i>
Размер генома, т.п.н.	157	185	42	138
Ссылка на нуклеотидную последовательность	Заявка на выдачу патента на изобретение №2021138736			GenBank: MK331930.1
Таксономическая принадлежность	Порядок <i>Caudovirales</i> ; семейство <i>Myoviridae</i> ; род <i>Phaepocotavirus</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> ; семейство <i>Myoviridae</i> ; подсемейство <i>Tevenvirinae</i> ; род <i>Slopekvirus</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> ; семейство <i>Autographiviridae</i> ; подсемейство <i>Molineuxvirinae</i> ; род <i>Acadevirus</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> ; семейство <i>Herelleviridae</i> ; подсемейство <i>Twortvirinae</i> ; род <i>Kayvirus</i>
Прямой праймер, 5'-3'	gtctaccatctctgtccc	tcaacagcccatacaaaccc	gattgggttgctattcagg g	gctatggaaggacagaacc c
Обратный праймер, 5'-3'	ctaggagatcttactgacc g	acgaacaggctatgaaacg c	tacatctactcggctctgcc	atagcgtactccttaccgcc
Продукт ПЦР, п.н.	408	595	696	1157
Титр бактериофага, БОЕ/мл	10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>12</sup>

Таким образом вновь выделенные штаммы бактериофагов *Escherichia phage* Ec7A-M1, *Proteus phage* Pr22 и *Klebsiella phage* KPV16A-M1 принадлежали к таксонам, включающим только вирулентные бактериофаги. Ранее выделенный бактериофаг *Staphylococcus phage* CH1 также являлся вирулентным и лизировал все культуры золотистого стафилококка, выделенные у обезьян.

По результатам исследования известных препаратов коммерческих бактериофагов было принято решение о необходимости разработки оригинальной композиции бактериофагов для санации лабораторных приматов.

### **Пероральное введение фагов на индивидуальном уровне.**

Композиция на основе подобранных штаммов бактериофагов была использована при проведении эксперимента на индивидуальном уровне.

Очищенные фаголизаты бактериофагов *Escherichia phage* Ec7A-M1, *Klebsiella phage* KPV16A-M1, *Proteus phage* Pr22, *Staphylococcus phage* CN1 вводили в виде смеси обезьянам, при наличии (группа I, n=4) и отсутствии (группа II, n=4) в составе микробиоты кишечника микроорганизмов, чувствительных к подобранным бактериофагам. Каждый бактериофаг в смеси был в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл. Введение смеси очищенных фаголизатов проводили каждому животному однократно перорально при помощи шприца в объеме 10 мл. У всех животных проводили оценку наличия фагоспецифической ДНК методом ПЦР в следующих контрольных точках: до введения, через 24, 48, 72, 96 и 120 часов (до момента прекращения детекции ДНК) после введения очищенных фаголизатов. Также проводили оценку наличия фагоспецифической ДНК в сыворотке крови до и через 24 часа после введения.

До начала эксперимента при помощи разработанного метода ПЦР выявлено отсутствие специфических участков ДНК подобранных бактериофагов в организме интактных макак резусов и в объектах окружающей среды на территории их содержания.

Результаты по выявлению специфических участков ДНК бактериофагов, входящих в состав перорально введенной смеси очищенных фаголизатов, в организме макак резусов на индивидуальном уровне при наличии в составе микробиоты кишечника чувствительных патогенных и условно-патогенных бактерий представлены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 - Результаты ПЦР по выявлению ДНК бактериофага *Staphylococcus phage* CN1

№	Номера обезьян	Фекалии					Сыворотка крови		
		До введения	День после введения фага CN1					До введения	24 ч после начала введения
			24ч	5-й	10-й	14-й	17-й		
1	36663	-	+	+	+	+	-	-	-
2	34344	-	+	+	+	-	-	-	-
3	33180	-	+	+	+	+	-	-	-
4	36668	-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль -		-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль +		+	+	+	+	+	+	+	+

Как видно из таблицы 10, результаты детекции ДНК бактериофага в представленной группе отличались у отдельных обезьян. Во время введения бактериофага у всех опытных обезьян ПЦР дала положительные результаты. Наиболее длительное определение ДНК бактериофага *Staphylococcus phage* CN1

отмечено у обезьяны под номером 36663 и 33180, что совпадало с бактериологическими исследованиями выделения изолятов стафилококка, несмотря на низкий титр бактерий. Детекция ДНК в последующие дни показала отсутствие бактериофага *Staphylococcus phage* CH1.

Таблица 11 – Результаты ПЦР по выявлению ДНК бактериофага *Proteus phage* Pr22

№	Номера обезьян	Фекалии					Сыворотка крови		
		До введения	День после введения фага Pr22					До введения	24 ч после начала введения
			24ч	5-й	10-й	14-й	17-й		
1	36663	-	-	-	-	-	-	-	-
2	34344	-	+	+	+	+	-	-	-
3	33180	-	+	+	+	-	-	-	-
4	36668	-	+	+	+	-	-	-	-
Контроль -		-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль +		+	+	+	+	+	+	+	+

В данной таблице из представленных опытных обезьян детекция ДНК бактериофага *Proteus phage* Pr22 не была обнаружена у одной обезьяны под номером 36663.

В таблицах 12 и 13 представлена динамика выявления штаммов бактериофагов, входящих в состав перорально введенной смеси очищенных фаголизатов, в организме макаков резусов при отсутствии в составе микробиоты кишечника целевых чувствительных патогенных и условно-патогенных бактерий.

Таблица 12 – Результаты ПЦР по выявлению ДНК бактериофага *Escherichia phage* Ec7A-M1

№	Номера обезьян	Фекалии					Сыворотка крови		
		До введения	День после введения фага Ec7A-M1					До введения	24 ч после начала введения
			24ч	5-й	10-й	14-й	17-й		
1	36663	-	+	+	-	-	-	-	-
2	34344	-	+	+	+	-	-	-	-
3	33180	-	-	+	+	-	-	-	-
4	36668	-	-	-	+	+	-	-	-
Контроль -		-	-	-	-	-	-	-	-
Контроль +		+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 13 – Результаты ПЦР по выявлению ДНК бактериофага *Klebsiella phage* KPV16A-M1

№	Номера обезьян	Фекалии					Сыворотка крови		
		До введения	День после введения фага KPV16A-M1					До введения	24 ч после начала введения
			24 ч	5-й	10-й	14-й	17-й		
1	36663	-	+	+	+	-	-	-	-
2	34344	-	+	+	+	-	-	-	-



Таблица 17 – Результаты ПЦР по выявлению ДНК бактериофага *Klebsiella phage* KPV16A-M1

№	Номера обезьян	Фекалии					Сыворотка крови	
		До введения	День после введения фага KPV16A-M1					До введения
24ч	5-й		10-й	14-й	17-й			
1	36729	-	+	-	-	-	-	-
2	37363	-	+	-	-	-	-	-
3	35982	-	+	-	-	-	-	-
4	36116	-	+	-	-	-	-	-
Контроль -		-	-	-	-	-	-	-
Контроль +		+	+	+	+	+	+	+

У животных, содержащих (группа I) и не содержащих (группа II) в составе микробиоты кишечника фагочувствительных бактерий, время персистенции бактериофагов различается. Выделение литических фагов в отношении фагочувствительных бактерий в опытной группе можно проследить до 10 дня (для *Klebsiella spp.*) и до 14 дня (для *Escherichia coli* и *Proteus spp.*). Несмотря на то, что в предварительном исследовании *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* не выделялись культуральными методами, такое длительное присутствие бактериофагов в организме животных указывает на наличие чувствительных микроорганизмов. Персистирование бактериофага в контрольной группе животных происходило до пятого дня для *Escherichia coli* у двух обезьян, остальные штаммы бактериофагов выделяли только через 24 часа после введения, и то не у всех животных. Бактериофаги активные в отношении *Staphylococcus aureus* в опытной группе можно проследить до 14 дня включительно. Выделение бактериофага СН1 в контрольной группе на 5 или 10 день после введения препарата говорит о том, что животные могли быть инфицированы во время проведения эксперимента. Бактериофаг начал размножаться на чувствительных бактериях и стал доступен для выделения методом ПЦР.

Исследование нейтрализующей активности сыворотки крови обезьян до и после начала применения смеси очищенных фаголизатов показало отсутствие нейтрализующих антител у всех экспериментальных животных.

Показатели общего клинического и биохимического анализа крови у обезьян в опытной и контрольной группе до и через 24 часа после введения бактериофагов не выявил выраженных отличий в показателях крови. Все показатели находились в пределах нормы.

### Назальное введение бактериофагов на индивидуальном уровне

Очищенные фаголизаты бактериофагов *Staphylococcus aureus* СН1 вводили обезьянам в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл. Введение очищенного фаголизата проводили каждой особи в течение 5 дней назально при помощи пастеровской пипетки в объеме 1 мл (по 500 мкл в каждую ноздрю). У всех животных

проводили сбор материала для бактериологических, гематологических и молекулярно-генетических исследований в следующих контрольных точках: до введения, через 24 часа и через 5 дней во время введения, через 3, 6 и 10 дней после введения очищенного фаголизата СН1.

До начала эксперимента из назальных соскобов были выделены изоляты *Staphylococcus aureus* и определена к ним литическая активность бактериофага СН1 (Таблица 18).

Таблица 18 – Результаты выделения *Staphylococcus aureus* и оценки активности очищенного фаголизата СН1.

Номера образцов и обезьян (возраст, пол)	Выделенные микроорганизмы	Активность бактериофага СН1
№ 45975 (1,5г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	++++
№ 45923 (1,5г., ♀)	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++
№ 46198 (1г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	++++
№ 44944 (2,5г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++
№ 45676 (1,5г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++
№ 45934 (1,5г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++
№ 45876 (1,5г., ♂)	<i>Staphylococcus aureus</i>	++++

В таблице 19 представлена динамика выявления ДНК бактериофага СН1 в назальном соскобе.

Таблица 19 – Выделение ДНК бактериофага СН1 в назальном соскобе

Номера обезьян	фоновые значения	День введения фага СН1		День после окончания введения фага СН1		
		2-й	5-й	3-й	6-й	10-й
45975	-	+	+	+	+	-
45923	-	+	+	+	+	-
46198	-	+	+	+	+	-
44944	-	+	+	-	+	-
45676	-	+	+	-	+	-
45934	-	+	+	-	+	-
45876	-	+	+	-	+	-

До начала эксперимента все обезьяны были интактны на предмет наличия ДНК фага СН1. Во время и после окончания применения бактериофага специфическая ДНК детектировалась у всех животных.

В таблице 20 представлена динамика выявления *S. aureus* методом ПЦР в назальном соскобе.

Таблица 20 – Выделение ДНК *S. aureus* в назальном соскобе



Номера обезьян	фоновые значения	День введения фага СН1		День после окончания введения фага СН1		
		2-й	5-й	3-й	6-й	10-й
45975	+	+	+	+	+	-
45923	+	+	+	+	+	-
46198	+	+	+	+	+	-
44944	+	+	+	+	-	-
45676	+	+	+	-	-	-
45934	+	+	+	-	-	-
45876	+	+	-	-	-	-

Таблица 21 – Результаты бактериологического исследования назальных соскобов во время эксперимента

№	Номера обезьян	Результаты бактериологического исследования (желточно-солевой агар), колонии с лецитовителлазой (КОЕ/мл)					
		фоновые значения	День введения фага СН1		День после окончания введения фага СН1		
			2-й	5-й	3-й	6-й	10-й
1	45975	150	160	120	40	10	не обнаружены
2	45923	220	195	130	55	15	не обнаружены
3	46198	120	130	110	30	3	не обнаружены
4	44944	180	170	95	27	2	не обнаружены
5	45676	111	97	65	12	не обнаружены	не обнаружены
6	45934	80	82	53	5	не обнаружены	не обнаружены
7	45876	40	10	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены

Через две недели после начала санации золотистый стафилококк перестал высеваться из назального соскоба у всех животных в группе.

В течение всего эксперимента общие клинические и биохимические показатели были в пределах нормы.

#### Назальное введение бактериофага СН1 на групповом уровне

Очищенные фаголизаты бактериофагов *Staphylococcus phage* СН1 вводили обезьянам в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл. Введение очищенного фаголизата проводили каждой особи в течение 5 дней назально при помощи пастеровской пипетки в объеме 1 мл (по 500 мкл в каждую ноздрю). У всех животных проводили сбор материала для бактериологических, гематологических и молекулярно-генетических исследований в следующих контрольных точках: до введения, через 24 часа и через 5 дней во время введения, через 3, 6 и 10 дней после введения очищенного фаголизата СН1.

За месяц до начала эксперимента у троих из четырех обезьян, находящихся в групповом содержании, из назальных соскобов был выделен *Staphylococcus aureus*. В отношении выделенных изолятов определили спектр литического

действия штаммов бактериофагов серии SCH1, Sa30-2, CH1 (таблица 22). Для дальнейшей работы был выбран бактериофаг *Staphylococcus phage* CH1.

Таблица 22 – Результаты оценки активности различных штаммов бактериофагов в отношении *Staphylococcus aureus*, выделенного из назального соскоба

№	Номер обезьяны	SCH1	Sa30-2	CH1
1	38065 (12л, ♂)	++++	++++	++++
2	35100 (17,5л., ♀)	(+)	++++	++++
3	44866 (2,5г., ♂)	-	-	-
4	45903 (1,5г., ♂)	-	++++	++++

На момент начала опыта у всех животных проводили оценку наличия *Staphylococcus aureus* микробиологическими методами. Далее оценку выполняли на 2 и 5 дни введения бактериофага, через 3, 6 и 10 дней после окончания введения очищенных фаголизатов.

Таблица 23 - Результаты бактериологического исследования назальных соскобов во время эксперимента

№	Номера обезьян	Результаты бактериологического исследования (желточно-солевой агар), колонии с лецитовителлазой (КОЕ/мл)					
		фоновые значения	День введения фага CH1		День после окончания введения фага CH1		
			2-й	5-й	3-й	6-й	10-й
1	38065	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
2	35100	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	15 колоний	не обнаружены
3	44866	не обнаружены	не обнаружены	1	не обнаружены	2	не обнаружены
4	45903	200 колоний	200 колоний	100	25	4	не обнаружены

До введения бактериофага *S. aureus* высевался только у детеныша под номером 45903 (исходно *S. aureus* был выявлен у трех из четырех животных в назальном соскобе). С начала интраназального введения бактериофага CH1 количество роста колоний с лецитовителлазой у обезьяны 45903 постепенно уменьшалось, что продолжалось и после окончания введения препарата, пока на десятый день от последнего введения на желточно-солевом агаре отмечено полное отсутствие роста колоний золотистого стафилококка. В данном случае можно судить о хорошей литической активности бактериофага CH1, который работал и после окончания введения бактериофага CH1.

На 6-й день после введения бактериофага CH1 у двух других животных из этой группы (35100 и 44866) на желточно-солевом агаре наблюдался незначительный рост колоний золотистого стафилококка, но на 10 день отмечено полное отсутствие роста колоний *S. aureus*. Нельзя исключить вероятность носительства данного возбудителя вследствие его передачи во время близкого контакта между особями в группе. За время проведения эксперимента у самца под номером 38065 *Staphylococcus aureus* не был выделен ни из одной взятой пробы назального соскоба.

Наличие бактериофага СН1 определяли в назальных соскобах методом ПЦР (Таблица 24). До начала эксперимента у всех обезьян ДНК фага СН1 не определялось.

Таблица 24– Результаты ПЦР по выявлению бактериофага СН1 в назальном соскобе

№	Номера обезьян	фоновые значения	День введения фага СН1		День после окончания введения фага СН1		
			2-й	5-й	3-й	6-й	10-й
1	38065	-	+	+	-	-	+
2	35100	-	+	+	+	+	+
3	44866	-	+	+	+	+	+
4	45903	-	+	+	-	+	+

С начала интраназального введения бактериофага и после окончания введения препарата, специфическая ДНК бактериофага СН1 детектировалась у всех животных. С учетом отсутствия выделения фага методом Грациа в подавляющем большинстве контрольных точек, а также культур стафилококка можно сделать заключение о наличии и сохранении свободной ДНК фага СН1 на слизистой оболочке носа в количестве выше порога чувствительности ПЦР.

У самца 38065 и самки 35100 уровень лейкоцитов на всех сроках опыта не превышал фоновые показатели, что свидетельствует об отсутствии реакции на введение бактериофага. В целом, общий анализ крови у всех животных с результатами клинического осмотра в течение всего эксперимента не выявлял серьезных патологических изменений.

Исследования бактериофагов на групповом уровне проводили с интервалом в два года по сравнению с исследованиями на индивидуальном уровне. По прошествию этого периода нами не было выявлено изменения чувствительности высеваемых изолятов золотистого стафилококка к бактериофагу СН1. Однако, при исследовании *in vitro* чувствительности колифага Ес7А-М1 к вновь высеваемым изолятам *E. coli* было обнаружено значительное снижение спектра литической активности бактериофага (менее 10% высеваемых культур). В связи с этим была проведена работа, направленная на поиск колифага, активного в отношении циркулирующих *E. coli*. В качестве такого бактериофага был выбран хорошо охарактеризованный штамм колифага ЕС1-7 из коллекции МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, лизировавший более 50% высеваемых культур ЕРЕС и ЕИЕС.

### **Пероральное введение бактериофага ЕС1-7 на групповом уровне**

Очищенные фаголизаты бактериофагов *Escherichia coli* ЕС1-7 вводили обезьянам в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл. Введение очищенного фаголизата проводили каждому животному в течение 5 дней перорально при помощи шприца в объеме 10 мл. У всех животных проводили сбор материала для бактериологических, гематологических и молекулярно-генетических исследований в следующих контрольных точках: до введения, через 24 часа, через

3 и 5 дней во время введения, через 3, 6 и 10 дней после введения очищенного фаголизата ЕС1-7.

До начала эксперимента из фекальных образцов были выделены изоляты *E. coli* и определена литическая активность бактериофага ЕС1-7 (Таблица 25).

Таблица 25 - Результаты выделения *E. coli* и оценка активности очищенного фаголизатов ЕС1-7

№	Номера обезьян (возраст, пол)	Выделенные микроорганизмы	ЕС1-7	Ес7А-М1	ЕСD 7	V18
1	40326 (8 л., ♀)	<i>E. coli</i>	++++	-	-	-
2	45486 (1 г.11 мес., ♂)	<i>E. coli</i>	+++	-	-	-
		<i>E. coli</i> (л/о)	+	++	-	+
3	45652 (1 г.8 мес., ♀)	<i>E. coli</i>	++++	-	-	-
4	46515 (8 мес., ♂)	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
5	46815 (6 мес., ♂)	<i>E. coli</i>	++	-	++++	++
6	35679 (16,5 л., ♀)	<i>E. coli</i>	-	-	-	-
7	39432 (9,5 л., ♂)	<i>E. coli</i>	-	-	-	-

На момент начала опыта у всех животных проводили оценку наличия *E. coli* микробиологическими методами. Далее оценку выполняли на 2 и 5 дни введения бактериофага, через 3, 6 и 10 дней после окончания введения очищенных фаголизатов (Таблица 26).

Таблица 26 – Результаты бактериологического исследования фекальных образцов во время эксперимента

№	Номера обезьян	Результаты бактериологического исследования (среда Эндо), колонии <i>E. coli</i> (КОЕ/мл)						
		фооновые значения	День введения фага ЕС1-7			День после введения фага ЕС1-7		
			2-й	3-й	5-й	3-й	6-й	10-й
1	40326	80	20	10	26	200	25	8
2	45486	160	50	25	200	600	14	160
3	45652	3	50	20	150	400	120	7
4	46515	90	150	200	40	40	270	235
5	46815	20	30	13	300	1000	2000	2000
6	35679	500	700	300	600	1000	1500	1200
7	39432	12	10	200	11	40	5	130

В результате микробиологического исследования у 2 обезьян отмечено постепенное снижение роста кишечной палочки на вторые и третьи сутки во время введения очищенного фаголизата ЕС1-7 и у обезьян под номером 45652 и 40326 отмечено уменьшение роста кишечной палочки на 3 день во время введения, но со значительным ростом протей.

До начала, во время и после окончания применения бактериофага эксперимента все обезьяны были интактны на предмет наличия специфической ДНК фага ЕС1-7. Исключением составляла обезьяна 45486 после окончания применения фага. С учетом микробиологического выявления (методом Грация) бактериофага в низком титре у всех особей только после начала эксперимента

можно сделать заключение содержания ДНК фага ЕС1-7 ниже порога чувствительности ПЦР.

### Выявление бактериофагов в образцах объекта окружающей среды

Во время проведения планового исследования в рамках НИОКТР при помощи разработанного метода ПЦР выявлено отсутствие специфических участков ДНК подобранных бактериофагов в организме интактных макаков резусов и в объектах окружающей среды на территории их содержания (таблица 27).

Таблица 27 – Результаты ПЦР по выявлению бактериофагов

№	Образцы и номера обезьян	Штаммы бактериофагов			
		<i>Escherichia phage</i> Ec7A-M1	<i>Klebsiella phage</i> KPV16A-M1	<i>Proteus phage</i> Pr22	<i>Staphylococcus phage</i> CH1
1	Сточные воды №1	-	-	-	-
2	Сточные воды №2	-	-	-	-
3	Сточные воды №3	-	-	-	-
4	36119 (фекалии)	-	-	-	-
5	36116 (фекалии)	-	-	-	-
6	35982 (фекалии)	-	-	-	-
7	37747 (фекалии)	-	-	-	-
8	36657 (фекалии)	-	-	-	-
9	37363 (фекалии)	-	-	-	-
10	36599 (фекалии)	-	-	-	-

Методом ПЦР исследованы образцы сточных вод для определения распространения и элиминации ДНК бактериофага CH1 и бактериофага ЕС1-7 на групповом уровне. В качестве объекта окружающей среды были исследованы образцы сточных вод их очистных сооружений, находящихся на территории содержания экспериментальных *Macaca mulatta* (таблица 28 и 29).

Таблица 28 - Результаты ПЦР по выявлению бактериофага CH1 в сточной воде

№	Материал	Дата получения	Вариабельный белок, фаг CH1
1	Сточная вода	19.10.20г.	+
2	Сточная вода	22.10.20г.	+
3	Сточная вода	26.10.20г.	+
4	Сточная вода	29.10.20г.	+
5	Сточная вода	02.11.20г.	+

При исследовании динамики распространения и элиминации ДНК бактериофага CH1 было обнаружено наличие видоспецифической ПЦР-мишени, что свидетельствует о персистировании этого фага на протяжении периода не менее одного года (со времени проведения аналогичного эксперимента у обезьян

на индивидуальном уровне). Специфичность продукта подтвердилась секвенированием полученных ампликонов (рисунок 1).

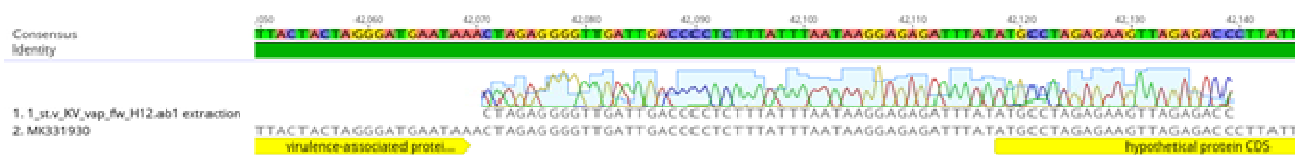


Рисунок 1 – Выравнивание сиквенса продукта ПЦР на геном фага CN1

Таблица 29 – Результаты ПЦР по выявлению бактериофага EC1-7 в сточной воде

№	Материал	Дата получения	Капсид, видовой EC1-7
1	Сточная вода	16.11.20г.	-
2	Сточная вода	19.11.20г.	-
3	Сточная вода	23.11.20г.	-
4	Сточная вода	26.11.20г.	-
5	Сточная вода	30.11.20г.	-

При исследовании динамики распространения и элиминации ДНК бактериофага EC1-7 наличие видоспецифической ПЦР-мишени не было обнаружено.

## ВЫВОДЫ

1. Показано преобладание следующих таксонов микроорганизмов: видов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* при определении структуры патогенных и условно патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, являющихся причиной дисбиотических нарушений, осложняющих течение хронических заболеваний желудочно-кишечного и респираторного тракта *Macaca mulatta*.
2. Исследован спектр литической активности бактериофагов в отношении циркулирующих у *Macaca mulatta* патогенных и условно-патогенных грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* Показан широкий спектр литической активности известных стафилококковых бактериофагов и узкий спектр литической активности известных эшерихиозных, клебсиеллезных и протейных бактериофагов в отношении изолятов бактерий макак резусов.
3. Разработана и апробирована антибактериальная композиция на основе вирулентных стафилококковых, эшерихиозных, клебсиеллезных и протейных бактериофагов для санации *Macaca mulatta* от циркулирующих ветеринарно и доклинически значимых патогенных и условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

4. Проведен на индивидуальном и групповом уровне сравнительный анализ содержания фагоспецифической ДНК в биотопах организма приматов и ее элиминации из организма обезьян, а также сравнительный анализ динамики фагоспецифической ДНК в окружающей среде, при пероральном использовании очищенных фаголизатов для лечения и профилактики бактериальных инфекций.
5. Проведено изучение на индивидуальном и групповом уровне выявления фагочувствительных изолятов бактерий, соответствующих специфичности подобранных литических бактериофагов, при пероральном использовании очищенных фаголизатов вирулентных бактериофагов для лечения и профилактики бактериальных инфекций.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение таргетного микробиологического мониторинга циркулирующих патогенных и условно-патогенных бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и родов *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*) у обезьян, используемых в качестве лабораторных животных, позволит обеспечить своевременную санацию животных.
2. Результаты по спектру фагочувствительности грамотрицательных бактерий *Proteus spp.*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* и сохранению спектра фагочувствительности грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* даст возможность оптимизировать подходы к рациональной фаготерапии и фагопрофилактике.
3. Выделение бактериофагов и фагоспецифической ДНК из биотопов организма обезьян позволит проводить модельные эксперименты и доклинические исследования новых препаратов и средств на основе бактериофагов.
4. Разработанная антибактериальная композиция на основе бактериофагов обеспечит эффективную и безопасную санацию лабораторных приматов от специфических патогенных и условно-патогенных бактерий, а также позволит получать и содержать животных, свободных от специфических патогенов.
5. В ходе работы аннотированы и подготовлены к депонированию в NCBI GenBank полногеномные последовательности бактериофагов *Escherichia phage Ec7A-M1*, *Proteus phage Pr22* и *Klebsiella phage KPV16A-M1*, что необходимо для патентной защиты разработанных и планируемых к разработке промышленно-перспективных фагосодержащих антибактериальных композиций.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Аршба И.М., Орлов С.В., Рубальский Е.О., Алешкин А.В., Рубальский О.В., Агумава А.А., Полякова В.И., **Черкашина Е.В.** Влияние применения литических бактериофагов на динамику фагочувствительности патогенных и условно-патогенных бактерий на индивидуальном и групповом уровне на модели обезьян. // Материалы четвертой научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». 24-26 сентября 2018, г. Нижний Новгород, с.-10.
2. **Черкашина Е.В.**, Аршба И.М., Рубальский О.В., Рубальский Е.О., Полякова В.И. Молекулярно-генетическая детекция стафилококкового бактериофага у интактных обезьян при его пероральном введении. // Сб. Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии» 18-19 апреля 2019 год, г. Сочи, с. 204-210.
3. Аршба И.М., **Черкашина Е.В.**, Рубальский Е.О., Рубальский О.В., Полякова В.И., Демерчян А.В. Фундаментальные особенности кинетики вирулентных бактериофагов при введении приматам-носителям фагочувствительных бактерий. // Сб. Международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине» 25-27 ноября 2020 г., г.Сочи, с.18-19.
4. **Черкашина Е. В.**, Аршба И.М., Киселева И.А., Полякова В.И., Рубальский Е.О., Алёшкин А.В., Ruetke S., Демерчян А.В., Рубальский О.В. Динамика распространения ДНК вирулентного стафилококкового бактериофага CN1 при интраназальном введении у обезьян. Материалы IV международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» 1-3 ноября 2021г., г.Сочи. с.142-146.
5. Заявка на выдачу патента на изобретение №2021138736, приоритет от 24.12.2021 «Композиция антибактериальная для санации лабораторных приматов». Орлов С.В., Аршба И.М., Рубальский Е.О., Рубальский О.В., **Черкашина Е.В.**, Демерчян А.В., Полякова В.И.
6. **Черкашина Е.В.**, Аршба И.М., Демерчян А.В., Полякова В.И., Рубальский О.В., Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ruetke S., Kuehn C., Haverich A., Рубальский Е.О., Орлов С.В., «Композиция бактериофагов для лечебно-профилактического применения у обезьян». Журнал «БЭБиМ». Принята в печать.
7. **Черкашина Е.В.**, Демерчян А.В., Полякова В.И., Киселева И.А., Рубальский О.В., Аршба И.М., Рубальский Е.О., Орлов С.В. «Интраназальное введение бактериофага *Staphylococcus phage* CN1 при индивидуальном и групповом содержании обезьян». Астраханский медицинский журнал. Принята в печать.