

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Тюрина Анна Владимировна

**ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ
БАКТЕРИОФАГОВ**

1.5.6 Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат медицинских наук
Гаевская Наталья Евгеньевна

Ростов-на-Дону – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	9
Задачи исследования.....	9
Научная новизна исследования.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	11
Методология и методы исследования.....	13
Объекты исследования.....	13
Штаммы холерных вибрионов.....	13
Штаммы холерных бактериофагов.....	15
Материалы исследования.....	16
Питательные среды.....	16
Лабораторные животные.....	16
Методы исследования.....	17
Микробиологические исследования.....	17
Метод выделения фагов из проб воды водоемов и сточных вод.....	17
Метод определения литической активности холерных бактериофагов.....	18
Метод размножения холерных бактериофагов.....	18
Контроль титра по методу Грациа.....	18
Метод получения антифаговых сывороток.....	18
Изучение морфологии негативных колоний.....	19
Метод электронной микроскопии фаговых корпускул.....	19
Определение устойчивости холерных фагов к температуре и хлороформу.....	20
Изучение стабильности фаголизатов холерных бактериофагов.....	20
Молекулярно-генетические исследования.....	20
Выделение ДНК бактериофагов с последующим анализом геномов.....	20
Статистические методы.....	20
Личное участие автора в получении результатов.....	21
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	22
Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	22

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	24
1.1. Характеристика возбудителя <i>V. cholerae</i> на современном этапе развития VII пандемии холеры.....	24
1.2. Проблема антибиотикорезистентности холерных вибрионов	28
1.3. Бактериофаги холерных вибрионов и основные направления их использования	31
1.4. Принципы конструирования препаратов на основе холерных бактериофагов.	40
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ И ОТБОР НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИЗ НИХ.....	48
2.1. Отбор штаммов холерных бактериофагов из коллекции-депозитария и характеристика их биологических свойств	48
2.2. Отбор перспективных штаммов холерных бактериофагов с учетом их генетических свойств.....	56
2.3. Оценка фармакокинетики смеси холерных бактериофагов (Rostov-M3 + Rostov-13 + ФБ1) на модели <i>in vivo</i>	61
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ	64
3.1. Метод получения биомассы холерных вибрионов с наибольшим выходом вирусных частиц.....	64
3.2. Определение наличия ЛПС в препаратах холерных бактериофагов.....	67
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФАГОВОГО КОКТЕЙЛЯ НА МОДЕЛИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ И ВЗРОСЛЫХ КРОЛИКОВ.....	70
4.1. Оценка острой и хронической (подострой) токсичности	70
4.2. Оценка апоптогенного и цитотоксического влияния холерных бактериофагов на иммунокомпетентные клетки крови	77
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ФОРМИРОВАНИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ХОЛЕРНЫМ ФАГАМ И ИХ СМЕСИ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ	80
5.1. Определение специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных	81
5.2. Оценка продукции секреторного иммуноглобулина А в ответ на введение холерных фагов и их смеси.....	83

ГЛАВА 6. ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ROSTOV-M3, ROSTOV-13, ФБ1 И ИХ СМЕСИ	87
6.1. Исследование профилактической эффективности смеси холерных бактериофагов (Rostov-M3+Rostov-13+ФБ1) в отношении вирулентных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей.....	88
6.2. Исследование профилактической эффективности бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 в отношении токсигенных штаммов <i>V. cholerae</i> O1 и O139 серогрупп на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика	90
ГЛАВА 7. ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ROSTOV-M3, ROSTOV-13 В ОТНОШЕНИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ	94
7.1. Оценка фармакокинетики смеси холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov- 13 на модели белых мышей.....	94
7.2. Оценка профилактической эффективности экспериментального профилактического препарата в отношении вирулентных штаммов <i>V. cholerae</i> O1 серогруппы при первичных и повторных курсах введения	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	112
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Современные системы здравоохранения сталкиваются с серьезными вызовами, связанными с постоянными сезонными вспышками холеры в эндемичных регионах и стремительным распространением антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae* [118; 136; 137; 142; 148; 209]. Неблагоприятная обстановка по холере ежегодно обостряется происходящими в мире чрезвычайными ситуациями биолого-социального характера [50; 79; 85].

В настоящее время основным методом профилактики холеры остается проведение вакцинации (СанПиН 3.3686-21). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует профилактические меры, включающие массовую вакцинацию против холеры в эндемичных странах. Для чрезвычайных ситуаций в 2013 г. при поддержке Глобального альянса по иммунизации был создан запас трех оральных вакцин против холеры, получивших предварительное одобрение ВОЗ: Dukoral (SBL, Швеция), Shanchol (Shantha Biotechnics, Индия) и Euvichol (EuBiologics, Южная Корея). Вакцинация проходит в несколько этапов, является безопасной и обеспечивает высокую защиту у детей и взрослых [28; 232]. В нашей стране также была зарегистрирована вакцина против холеры, которая представляет собой таблетированную форму, ревакцинация проводится через 6-7 месяцев. В Бангладеш проведены исследования в отношении эффективности однократной инактивированной пероральной вакцины, которые показали, что данное средство обеспечивает хорошую защиту у взрослых и детей старше пяти лет, в то время как у детей младшего возраста наблюдается ограниченная защита [214]. Современные вакцины против холеры, несмотря на их доказанную эффективность, имеют ряд существенных ограничений в применении. К основным противопоказаниям относятся: возраст младше 2 лет, период грудного вскармливания, наличие хронических заболеваний в стадии декомпенсации, а также индивидуальная непереносимость компонентов вакцины. Как и другие биологические препараты,

противохолерные вакцины могут вызывать ряд побочных реакций, что подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями [165; 208; 233]. Наиболее типичными нежелательными явлениями являются аллергические реакции (от легкой крапивницы до тяжелых системных проявлений), местные воспалительные процессы в месте инъекции (характеризующиеся покраснением, отечностью и болезненностью), а также общие симптомы, включая повышение температуры тела и общее недомогание. Эти реакции, хотя и носят преимущественно временный характер, требуют тщательного медицинского контроля, особенно у пациентов с отягощенным аллергологическим анамнезом, и подчеркивают необходимость строгого соблюдения протоколов вакцинации и постпрививочного наблюдения. Данные ограничения существенно сужают круг лиц, которым может быть проведена вакцинопрофилактика, особенно в эндемичных регионах с высоким уровнем заболеваемости, то есть имеющиеся холерные вакцины не могут в полной мере обеспечить полноценную защиту населения.

Современные протоколы лечения холеры включают два основных направления [181; 231]: патогенетическую (коррекция водно-электролитного баланса) и этиотропную терапию (элиминация возбудителя и сокращение вибриононосительства). Однако антибактериальная терапия сопряжена с рядом проблем: это побочные реакции на препараты [111; 164], ускоренное развитие антибиотикорезистентности [101-103; 142] и снижение эффективности лечения и рост смертности [76; 184; 200]. Особенно актуальны эти проблемы при холере, где резистентность существенно осложняет терапию [142; 175; 228].

В связи с этим особую актуальность приобретает разработка новых действенных препаратов антимикробного действия, что отражено в декларациях, решениях и других документах ВОЗ. Поиск новых альтернативных методов лечения бактериальных инфекций активно обсуждался в 2017 г. на саммите G20 в Гамбурге. [158]. В России вопросы противодействия биологическим угрозам, включая распространение опасных инфекционных заболеваний, находят свое отражение в

системе стратегического планирования. Ключевыми нормативно-правовыми актами в этой сфере являются Федеральный закон "О биологической безопасности" и "Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 г." [33; 34]. Эти документы формируют правовую основу для комплексного подхода к обеспечению биологической безопасности страны.

Особое значение в контексте борьбы с инфекционными заболеваниями приобретает проблема антимикробной резистентности. Для ее решения в России реализуется ряд важных инициатив. Это программа "СКАТ для стационаров" [95], направленная на оптимизацию использования антимикробных препаратов в медицинских учреждениях, а также Государственная стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ №2045-р от 25.09.2017 г.), которая включает мониторинг резистентности микроорганизмов, контроль за применением антибиотиков и развитие научных исследований в этой области.

Важным аспектом стратегических документов является акцент на разработку инновационных иммунобиологических и биотехнологических препаратов. Это направление рассматривается как перспективная альтернатива традиционной антимикробной терапии, особенно в условиях роста резистентности возбудителей. В частности, особые надежды возлагаются на развитие фаговой терапии и профилактики, что может существенно повысить эффективность борьбы с опасными инфекциями.

Бактериофаги – это вирусы, которые относятся к биосредствам и избирательно поражают нужные бактериальные клетки, что говорит об их специфичности, тем самым ограничивают их размножение естественным образом [7; 91; 160]. Эти природные агенты способны уничтожать антибиотикоустойчивые штаммы микроорганизмов [134; 143; 189; 219; 237], что относится к их главным качествам. Данные биопрепараты не имеют противопоказаний, могут использоваться при

беременности, после родов, безопасны для детей любого возраста, также их можно сочетать с другими лекарственными препаратами (ЛП) [45; 195; 211; 220].

Степень разработанности темы исследования

Современные исследования подтверждают эффективность бактериофагов для лечения и профилактики многих инфекций, особенно вызванных антибиотикорезистентными штаммами [9; 19; 191]. В России, согласно данным Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС), по состоянию на конец 2024 г. производилось 13 торговых наименований лечебно-профилактических препаратов бактериофагов, производителем которых является АО «НПО «Микроген». НПЦ «Микромир» производит бактериофаг-содержащие гели, которые не являются лекарственными средствами [18; 34].

Однако применение коммерческих фаговых композиций не всегда является эффективным, что свидетельствует о необходимости индивидуального подбора состава препаратов бактериофагов к конкретному штамму возбудителя [18; 182; 210] и комплексного рассмотрения терапии данными биосредствами [34; 157]. В современных исследованиях [5; 46; 174; 187; 227] активно изучается иммунный ответ при фаготерапии, однако остаются нерешенными ключевые вопросы о влиянии иммунных реакций на эффективность лечения. В частности, отсутствует комплексная оценка: степени нейтрализации фагов антителами, формирования клеточного иммунитета, долгосрочной динамики гуморального ответа, корреляции между иммуногенностью фагов и их терапевтической активностью.

В последнее десятилетие идет успешное использование коммерческих бактериофагов для профилактики и лечения различных кишечных инфекций [70; 117], однако в арсенале профилактических средств отсутствуют холерные препараты. Анализ состояния проблемы расширения числа устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов *V. cholerae*, увеличение спектра антибиотикорезистентности на современном этапе течения седьмой пандемии дают основание говорить не только о необходимости использования фагов для профилактики и лечения холеры, но и

актуальности разработки новых методических подходов для ее решения [22].

Цель исследования:

экспериментальное обоснование возможности создания препарата на основе холерных бактериофагов, его характеристика, оценка безопасности и профилактической активности в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы.

Задачи исследования:

1. Отобрать наиболее перспективные холерные бактериофаги из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов и изучить их биологические свойства.
2. Осуществить молекулярно-генетический анализ набора холерных бактериофагов.
3. Разработать способ получения очищенной биомассы маточных холерных бактериофагов с наибольшим титром вирусных частиц.
4. Определить безопасность холерных бактериофагов и их смеси по следующим критериям: аномальной и хронической токсичности, апоптогенному и цитотоксическому влиянию на экспериментальных животных.
5. Оценить формирование системного и местного гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных после введения холерных фагов и их смеси.
6. Оценить фармакокинетику и профилактическую эффективность экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов на биологических моделях.

Научная новизна исследования

Впервые проведена биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов из коллекции-депозитария. Были отобраны вирулентные фаги с высокой литической активностью, полученные из объектов окружающей среды и лизогенных штаммов микроорганизмов (свидетельство о регистрации базы данных «Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III-IV групп

патогенности» № 2022620881 от 19.04.2022 г.).

Разработан метод получения очищенной биомассы холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13, обеспечивающий наибольший выход вирусных частиц при соблюдении норм биологической безопасности. Очищенные фаголизаты включены в состав экспериментального профилактического препарата и соответствуют всем требованиям для проведения исследований *in vivo*.

Экспериментальные исследования фармакокинетики продемонстрировали, что профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 обладает способностью к длительной персистенции в организме. Научные данные свидетельствуют, что после курсового введения (5 и 7 дней) фаговая композиция продолжает выделяться с фекалиями лабораторных мышей на протяжении 21 суток после последнего введения, даже при отсутствии гомологичных штаммов *V. cholerae*, данный срок может быть достаточным для реализации ее профилактического потенциала.

Впервые результаты экспериментальных исследований продемонстрировали, что бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 – как при индивидуальном применении, так и в составе комбинированного препарата – не оказывают токсического воздействия на ключевые физиологические параметры лабораторных животных (отсутствие негативного влияния на: паренхиматозные органы (печень, почки, селезенку), гистологическую структуру тканей (сохранение нормальной морфологии), функциональную активность иммунокомпетентных клеток (отсутствие иммуносупрессии)).

Получены данные в отношении системного и местного гуморального иммунного ответа на введение как отдельных холерных бактериофагов, так и их смеси. Впервые показано, что после первичного курсового приема смеси Rostov-M3 и Rostov-13 в сыворотке крови и кишечнике экспериментальных животных регистрируется наличие специфических антител в невысоких титрах, не влияющих на ее эффективность, при повторном введении коктейля бактериофагов количество антифаговых антител

увеличивается, но не препятствует реализации профилактической способности экспериментального препарата.

Впервые экспериментально доказано, что пятидневный профилактический курс бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 (как в виде монопрепаратов, так и в составе комбинированного средства) обеспечивает высокоэффективную защиту взрослых кроликов от заражения холерным вибрионом (Патент на изобретение РФ № RU2783000C1).

Впервые разработан экспериментальный профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 с учетом его эффективности и безопасного действия в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лечебно-профилактическим препаратам.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о взаимодействии бактериофагов с макроорганизмом. Установлены закономерности персистенции холерных фагов Rostov-13 и Rostov-M3, включая длительное сохранение в отсутствие специфического хозяина, особенности распределения в организме, устойчивость к факторам иммунной защиты. Полученные данные вносят вклад в развитие фаговой экологии, раскрывая новые аспекты фаговых взаимодействий, и формируют базу для разработки новых подходов к созданию биопрепаратов на основе бактериофагов.

Диссертационная работа предлагает новое решение в области противоэпидемических мероприятий, демонстрируя возможность создания биологических профилактических средств на основе строго специфичных бактериофагов. Результаты исследования формируют теоретический фундамент для развития перспективного направления - фагопрофилактики особо опасных инфекций, что особенно актуально в условиях нарастающей антибиотикорезистентности.

Полученные результаты позволяют рассматривать Rostov-M3 и Rostov-13 в качестве перспективной основы для создания эффективных и безопасных

профилактических препаратов против холерной инфекции.

Разработаны нормативные документы - Регламент получения и Инструкция по изготовлению и контролю препарата, утвержденные Ученым Советом Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол №11 от 31.10.2022).

Научные данные, полученные в ходе работы, включены в монографию "Холера. Эпидемиология, диагностика, клиника, лечение, профилактика" (2024 г., 718 с., ISBN 978-5-98615-649-1); в Федеральные методические рекомендации МР 4.2.0263-21, регламентирующие работу с бактериофагами микроорганизмов I-IV групп патогенности. Депонирован в Государственную коллекцию патогенных бактерий Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор 20554, который может использоваться для размножения холерного бактериофага Rostov-M3 (KM 2157, 11.10.2023 г.).

Определены полногеномные нуклеотидные последовательности трех штаммов *Vibrio phage* (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-13), депонированные в Международной базе данных GenBank, номера доступа (MG957431, MH105773, OK169294-OK169295).

Научные результаты диссертации используются сотрудниками Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора при выполнении научной темы № 228-4-24 (акт внедрения от 25.03.2024 г.), а также сотрудниками Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский институт» Роспотребнадзора при изучении влияния экзометаболитов микробиома кишечника на рост холерного вибриона с целью разработки новых препаратов на основе бактериофагов (акт внедрения от 12.02.2025 г.).

Результаты диссертационного исследования включены в программы повышения квалификации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.02.2025 г.).

Методология и методы исследования

Методологическая основа диссертационного исследования была разработана в строгом соответствии с поставленными научными целями и задачами. В работе применялся комплекс современных исследовательских подходов, включающий: биологические (изучение взаимодействия фагов с бактериальными клетками, оценка профилактической эффективности *in vivo*), бактериологические (культивирование, выделение чистых культур), серологические (анализ иммунного ответа), молекулярно-генетические (характеристика геномов фагов), биотехнологические (оптимизация производства фаговых препаратов, стандартизация методов контроля качества) методы.

Все этапы экспериментальных исследований проводились в строгом соответствии с законодательством РФ, с соблюдением международных биоэтических норм (Хельсинкская декларация, Директива 2010/63/EU). Также в соответствии с внутренними регламентами исследования одобрены Комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Для обеспечения достоверности результатов каждый эксперимент повторялся не менее 3 раз, использовались статистические методы анализа данных, также применялись современные методы верификации результатов.

Объекты исследования

Штаммы холерных вибрионов

Использовали культуры патогенных микроорганизмов, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Размножение холерных фагов осуществляли на нетоксигенных индикаторных культурах *V. cholerae* El Tor: 75М, КМ 199 (Р-13169), 18546, 19706, 19645, 20554; *V. cholerae* O139 18772 (Таблица 1).

Для моделирования холерной инфекции в исследованиях использовали коллекционные токсигенные штаммы *V. cholerae* различного происхождения и серогрупп: штаммы серогруппы O1 биовара El Tor (19243, 18899, Р5879); штаммы

серогруппы O1 биовара classical (145, 569B); штамм серогруппы O139 (16066). У данных штаммов была подтверждена токсигенность (наличие *ctxA/B* генов), стандартизированные вирулентные свойства, которые документально подтверждены паспортом (Таблица 1).

Для хранения культур вибрионов использовали два основных метода: краткосрочное хранение (в столбике полужидкого агара Мартена с концентрацией $0,3 \pm 0,1\%$, при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$) и долгосрочное хранение в лиофилизированном состоянии. Данные методы хранения позволяют сохранять исходные свойства штаммов, обеспечивать стабильность культур при длительном хранении и поддерживать стандартизированные условия для исследовательской работы.

Таблица 1 – Характеристика штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, использованных в работе

№ п/п	Вид микроба	№ штамма	Объект, место и год выделения	Наличие холерного токсина
1.	<i>V. cholerae</i> classical	145	Получен из Индии, 1958 г.	<i>ctx</i> ⁺
2.	<i>V. cholerae</i> classical	569B	Получен из Индии, 1968 г.	<i>ctx</i> ⁺
3.	<i>V. cholerae</i> El Tor	75 M	Получен из Индии, 1958 г.	<i>ctx</i> ⁻
4.	<i>V. cholerae</i> El Tor	КМ-199 (P-13169)	Выделен из воды реки Дон, 1987 год	<i>ctx</i> ⁻
5.	<i>V. cholerae</i> O139 серогруппы	16066	Получен из Индии, 1993 г.	<i>ctx</i> ⁺
6.	<i>V. cholerae</i> O139 серогруппы	18772	Река Москва, 2005 г.	<i>ctx</i> ⁻
7.	<i>V. cholerae</i> El Tor	КМ-2044 (P-19706)	Выделен из внешней среды (из воды р. Салгир), с. Укромное, Симферопольский район, Республика Крым, 2014 год	<i>ctx</i> ⁻
8.	<i>V. cholerae</i> El Tor	КМ-2157 (20554)	г. Ростов-на-Дону, река Дон, 2019 год	<i>ctx</i> ⁻
9.	<i>V. cholerae</i> El Tor	18546	г. Элиста, Республика Калмыкия, пр. Заячий	<i>ctx</i> ⁻
10.	<i>V. cholerae</i> El Tor	19645	г. Ростов-на-Дону, река Дон, 2014 год	<i>ctx</i> ⁻
11.	<i>V. cholerae</i> El Tor	19243	Московская обл., выделен от больного, 2012 год	<i>ctx</i> ⁺

Продолжение таблицы 1

12.	<i>V. cholerae</i> El Tor	14863	Выделен от больного, Одесская обл., 1991 год	ctx ⁻
13.	<i>V. cholerae</i> El Tor	19188	Выделен от больного, Москва, 2010 год	ctx ⁺
14.	<i>V. cholerae</i> El Tor	18963	Очистные сооружения, г. Ростов-на-Дону, 2007 год	ctx ⁺
15.	<i>V. cholerae</i> El Tor	18512	Река Дон, 2002 год	ctx ⁺
16.	<i>V. cholerae</i> El Tor	P5879	г. Таганрог, человек 1972 год	ctx ⁺
17.	<i>V. cholerae</i> El Tor	18899	Выделен от больного, 2006 год	ctx ⁺

Штаммы холерных бактериофагов

В работе применяли коллекционные штаммы холерных бактериофагов из депозитария специализированной лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. На основании комплексного анализа биологических и генетических характеристик для дальнейших исследований были отобраны шесть перспективных фаговых штаммов: Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, ФБ1, Rostov-M3 и Rostov-13 (Таблица 2), демонстрирующих наибольший потенциал для создания экспериментального профилактического препарата.

Таблица 2 – Характеристика холерных бактериофагов

№ N/p	Наименование холерных бактериофагов	Объект, место выделения	Индикаторный штамм	Серологическая группа
1.	Rostov-1	Выделен из воды реки Дон	<i>V. cholerae</i> El Tor 19706	VII
2.	Rostov-6	Выделен из сточных вод	<i>V. cholerae</i> El Tor 19645	II
3.	Rostov-7	Выделен из воды реки Дон	<i>V. cholerae</i> El Tor 18546	VII
4.	ФБ1	Выделен из штамма <i>V. cholerae</i> P-16488 O139 серогруппы	<i>V. cholerae</i> O139 18772	XII
5.	Rostov-M3	Получен из Индии (Калькутта), из коллекции Мукерджи	<i>V. cholerae</i> El Tor: KM 2157 (20554)	III
6.	Rostov-13	Выделен из воды реки Дон	<i>V. cholerae</i> El Tor KM 199 (P-13169)	VII

Материалы исследования

Питательные среды

При работе с культурами холерных вибрионов O1, O139 серогруппы и холерными бактериофагами использовали следующие лабораторно приготовленные питательные среды: 1% пептонная вода (ПВ, рН 8,4), щелочной агар (ЩА, рН 8,0), 0,3% ЩА (рН 8,0), 0,3%, 0,7% и 1,5% агар Мартена (рН 7,7), а также бульон Мартена (рН 7,7). Питательные среды готовили согласно инструкции производителя и методическим указаниям [80]:

- «Набор реагентов Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая (Щелочной агар) производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (по ТУ 9385-131-14237183-2009, РУ № ФСР 2009/06185 от 07.05.2013 г.);

- «Питательная среда для накопления холерного вибриона сухая «Пептон основной сухой» производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области (по ТУ 9385-038-78095326-2008, РУ № ФСР 2009/05472 от 17.10.2011 г.). 1% пептонную воду готовили путём разведения основного раствора пептона дистиллированной водой в 10 раз.

- Агар и бульон Мартена (рН 7,7) готовили по стандартной прописи [67].

Лабораторные животные

Эксперименты с лабораторными животными выполнялись в сотрудничестве со специалистами лаборатории экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Инфицирование животных токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп проводили согласно СанПиН [100].

Содержание животных осуществлялось в полном соответствии с национальным стандартом [29]. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария в соответствии с нормами лабораторной практики. Помещения были оборудованы системой приточно-вытяжной вентиляции и комбинированным

освещением (естественным и искусственным), при поддержании температурного режима 19-23°C и относительной влажности 50-70%. Взрослые кролики размещались индивидуально в клетках, мыши - группами по 10 особей. Перед началом исследований все животные прошли 7-дневный карантинный период. Обеспечение включало свободный доступ к очищенной воде и стандартизированным сертифицированным кормам в необходимом количестве.

Для проведения исследований *in vivo* были использованы лабораторные животные: аутбредные мыши (6-10 недель, масса 17-20 г) и взрослые кролики (1,5-4 месяца, масса 1,5-3,5 кг), полученные из сертифицированного питомника ФКУЗ "Ростовский-на-Дону противочумный институт" Роспотребнадзора. Все экспериментальные процедуры, включая забор биоматериала в утренние часы (8:00-12:00), проводились в строгом соответствии с положениями "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных научных целей" [40], нормами биоэтики РФ, внутренними регламентами института (Протоколы № 2 от 12.02.2021; № 3 от 25.03.2021; № 5 от 08.06.2021; № 8 от 28.09.2021; № 4 от 20.04.2022; № 6 от 13.05.2022; №3 от 14.02.2024). Соблюдение принципов 3R (Replacement, Reduction, Refinement), минимизация стресса и дискомфорта животных. Перед взятием материала и инъекциями, белых мышей и кроликов обезболивали миорелаксантом ксила и новокаином (из расчета 0,1 мг на 1 кг веса), взрослым кроликам при моделировании экспериментальной холеры делали внутримышечно инъекцию везотила (из расчета 15 мг на 1 кг веса). После окончания экспериментов животных эвтаназировали хлороформом.

Методы исследования

Микробиологические исследования

Метод выделения фагов из проб воды водоемов и сточных вод

На наличие фагов исследовали пробы воды, доставленные в лабораторию бактериофагов. В воду добавляли хлороформ (1:10), либо прогревали при 56°C 40–60 мин. Затем центрифугировали взвеси в течение 30 мин при 3000 об/мин и исследовали

надосадочную жидкость на наличие фага. Холерные бактериофаги Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7 и Rostov-13, взятые в диссертационную работу, были выделены из водных объектов внешней среды.

Метод определения литической активности холерных бактериофагов

Для оценки литической активности бактериофагов использовали стандартизированный метод Грациа (метод двойного агарового слоя) с внесенными модификациями. Исследование проводили в соответствии с Фармокапеей РФ [30] и внутренними методическими рекомендациями.

Исследуемый бактериофаг наносили дорожками на двухслойный агар Мартена (1,5-1,6% питательного агара Мартена, разлитого в чашки Петри). Перед использованием чашки тщательно подсушивали в термостате при 37°C, так как капли конденсата искажают результаты. В верхний слой входит 4,5 мл 0,7 %-го агара Мартена, предварительно растопленного и охлажденного до 45°C. В охлажденный агар вносят 0,5 мл 4-х часовой бульонной культуры штамма *V. cholerae* O1 или O139 серогруппы. Круговыми движениями содержимое пробирки перемешивают, быстро выливают на поверхность чашки с 1,5% агаром. После застывания агара наносили капли бактериофага, при стекании капель образуются дорожки, затем чашки переворачивают вниз и инкубируют 16-18 часов при 37°C. Оценку литической активности выделенного бактериофага учитывали по пятибалльной шкале [96].

Метод размножения холерных бактериофагов

Для размножения холерных бактериофагов использовали стандартные методики [1; 20].

Контроль титра по методу Грациа

Для определения титра бактериофагов использовали метод агаровых слоев, предложенный А. Грациа в 1936 г. [96].

Метод получения антифаговых сывороток

Для получения специфических сывороток проводили внутривенную иммунизацию кроликов, для этого использовали очищенные препараты холерных

бактериофагов: Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-13, ФБ1 и Rostov-M3 [74]. Каждую антифаговую сыворотку получали путем иммунизации (в краевую вену уха, по 3-4 животных на каждый монофаг). Иммунизацию осуществляли в два цикла с интервалом 13-15 дней. Каждый цикл включал 4 инъекции возрастающей дозой фага. Последовательно вводили 2, 4, 6 и 8 мл с интервалом в 3-4 дня. Через 13-15 дней от последней инъекции 2-го цикла кроликов обескровливали. Кровь, собранную стерильно в 100-мл флаконы, выдерживали в термостате один час при 37°C до получения сгустка, затем на 18ч оставляли в холодильнике при 4-8°C, отбирали сыворотку и переносили в стеклянные ампулы.

Изучение морфологии негативных колоний

Для изучения морфологии негативных колоний холерных бактериофагов использовали стандартные методики [1; 20].

Метод электронной микроскопии фаговых корпускул

Морфологическое исследование бактериофагов проводили с использованием электронного микроскопа Jeol JEM 1011 (JEOL Ltd, Япония). Для этого фаговые частицы предварительно концентрировали из культуральных фильтратов, полученных методом агаровых слоев. Очистку осуществляли путем добавления полиэтиленгликоля 6000 (в соотношении 1:10) с последующей выдержкой при 4°C в течение 24 часов и центрифугированием при 20000 g (35 мин). Осадок ресуспендировали в деионизированной воде. Образцы для микроскопии готовили нанесением полученной суспензии на формваровые сетки (0,5% покрытие) с экспозицией 1 мин. После удаления избытка жидкости фильтровальной бумагой проводили негативное контрастирование 2% раствором уранилацетата (1-2 мин). Микроскопию выполняли при увеличениях 100000-200000×. Электронные микрофотографии регистрировали с помощью цифровой камеры Olimpus-SIS-Veleta Platform (EMSIS, Германия), используя программное обеспечение iTEM-TEMimaging Platform (EMSIS, Германия).

Определение устойчивости холерных фагов к температуре и хлороформу

Для оценки температурной устойчивости бактериофагов проводили суточную инкубацию фаголизатов (концентрация $n \times 10^7$ БОЕ/мл) при различных температурах: +25°C (контроль), -20°C и +65°C. После 24-часовой экспозиции определяли содержание фаговых частиц методом агаровых слоев, сравнивая с контрольным образцом.

При исследовании устойчивости к хлороформу к 4,5 мл фаголизата добавляли 0,5 мл хлороформа (соотношение 1:10), интенсивно встряхивали до образования однородной эмульсии и выдерживали при комнатной температуре в течение суток. После центрифугирования (3000 об/мин, 20 мин) титр фагов определяли в надосадочной жидкости, используя в качестве контроля необработанный хлороформом фаголизат, хранившийся в аналогичных условиях.

Изучение стабильности фаголизатов холерных бактериофагов

Исследование проводили при хранении в холодильнике при температуре 5°C и относительной влажности $60 \pm 5\%$ в течение 12 месяцев. Контроль качества осуществляли через каждые 6 месяцев.

Молекулярно-генетические исследования

Выделение ДНК бактериофагов с последующим анализом геномов

Выделение проводили в соответствии со стандартными методиками [71; 234]. Выделение, контроль качества и количество ДНК фагов проводили согласно МР 4.2.02.63-21. Секвенирование осуществляли системой Miseq (Illumina, США). Программы, использованные для сборки геномов и последующего анализа: BLASTN, BLASTX 2.12.0+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); PhageAnalyzer 2.0 [94] (<https://rnipi.ru/scientific-activity/publication/phageanalyzer-2-0-programma-dlya-analiza-rezultatov-polnogenomnogo-sekvenirovaniya-bakteriofagov/>).

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с общепринятыми методами биостатистики. Для анализа использовали

специализированные программные пакеты: Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007), Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. Доверительные интервалы для среднеарифметических значений (M) рассчитывали с уровнем достоверности 95% ($P = 0,05$).

Для оценки достоверности различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни, что обусловлено его устойчивостью к отклонениям от нормального распределения данных. Сравнение групп по качественным признакам выполняли с использованием точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Автор осуществил комплексный вклад в исследование, включающий системный анализ научной литературы и разработку концепции исследования, планирование и проведение экспериментов (отбор фаговых штаммов, оценка их свойств *in vitro* и *in vivo*), статистическую обработку данных современными методами, подготовку публикаций и презентацию результатов. Личное участие автора составило 92% работы, включая наиболее ответственные этапы: разработку экспериментальных протоколов, проведение ключевых опытов, интерпретацию данных и формулирование выводов.

Исследования по безопасности и эффективности экспериментального препарата проведены на базе лаборатории экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности (и.о. зав. лабораторией, к.м.н. Д.А. Левченко). Геномный анализ холерных бактериофагов (секвенирование и биоинформатика) выполнен на базе лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. Р.В. Писанов). Изучение иммунного ответа у экспериментальных животных проведено на базе лаборатории иммунологии (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. И.А. Иванова). Гистологические исследования проведены на базе патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ростовской области

"Областная клиническая больница №2" (зав. отделением Е.А. Синельник).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Холерные бактериофаги Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1, охарактеризованные по биологическим и генетическим свойствам, обладают строгой литической активностью в отношении *V. cholerae* серогрупп О1 и О139, не содержат генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, что подтверждает их безопасность и перспективность использования в качестве основы для разработки профилактических препаратов против холеры.

2. Разработанный технологический способ получения очищенных жидких форм маточных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 обеспечивает увеличение концентрации активных фаговых частиц до 10^8 – 10^9 БОЕ/мл, что на порядок превышает стандартные показатели и создает основу для дальнейших исследований *in vivo*.

3. Бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 демонстрируют высокую безопасность *in vivo*, не проявляя токсического, апоптогенного и цитотоксического действия на иммунокомпетентные клетки, а также эффективно предотвращают развитие экспериментальной холеры, вызванной *V. cholerae* серогруппы О1, при этом вызывают незначительное формирование специфического местного и системного гуморального иммунного ответа, не препятствующего проявлению их профилактических свойств, что подтверждает их перспективность для включения в состав экспериментального профилактического противохолерного препарата.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Экспериментальная часть исследования выполнена с использованием сертифицированного современного оборудования и коммерческих диагностических препаратов, включая тест-системы, срок годности которых соответствовал требованиям на момент проведения работ.

Надежность результатов исследования обоснована достаточным объемом выборки, использованием сертифицированных методов бактериологического,

иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью.

Результаты диссертационной работы получены при выполнении двух государственных научно-исследовательских тем, в которых автор являлся исполнителем и ответственным исполнителем: «Экспериментальное обоснование возможных путей преодоления антибиотикоустойчивости у холерных вибрионов» № АААА-А16-116070610104-9 от 06.06.2016 г. и «Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов и изучение иммунного ответа организма на введение холерных фагов» № АААА-А19-119032090077-3 от 20.03.2019 г.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 16 от 27.11.2024г.)

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях различного уровня, включая конференции молодых ученых: IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 5 - 7 декабря 2017 г.); XIV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская обл., ОК «Лужки» 22 - 24 сентября, 2022 г.); Международный молодежный форум «Неделя науки-2022» 28 ноября (Ставрополь, - 2 декабря, 2022 г.); Международная конференция «Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению» (Новосибирск, 21 – 23 сентября, 2024 г.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика возбудителя *V. cholerae* на современном этапе развития VII пандемии холеры

Холера (от греческих корней "chole" - желчь и "rheo" - течь) - это особо опасная кишечная инфекция с фекально-оральным механизмом передачи, распространяющаяся преимущественно через воду, а также пищевым и контактным путями. Заболевание характеризуется тяжелой диареей, приводящей к массивной потере жидкости и электролитов (до 20-30 литров в сутки), которые переходят из тканей в просвет кишечника. Это вызывает прогрессирующее обезвоживание, сопровождающееся гемодинамическими нарушениями (коллапс), острой почечной недостаточностью (анурия) и метаболическим ацидозом. Без своевременного восполнения жидкости и электролитов заболевание заканчивается летальным исходом. Название болезни исторически связано с характерным симптомом - "истечением желчи", наблюдаемым при тяжелых формах заболевания [11; 66; 178; 218].

Возбудителем холеры является холерный вибрион, который, заселяя тонкий кишечник хозяина, продуцирует экзо- и эндотоксины, способные вызывать диарею. Холерные вибрионы включены в семейство *Vibrionaceae*, под *Vibrio* и вид *V. cholerae*, который делится на биовары, серогруппы и серовары. Биовары: *V. cholerae asiatica* (classical), *V. cholerae* El Tor. По O - антигену – на серогруппы: O1 и O139 (Бенгал), серовары: Огава (AB), Инаба (AC), Гикошима (ABC) [178; 215]. Истинными возбудителями холеры являются штаммы *V. cholerae*, содержащие гены холерного токсина (*ctxAB+*) и токсинорегулируемых пилей (*cpA+ tcpA+*). К ним относятся *V. cholerae* серогруппы O1, биоваров *V. cholerae* classical и *V. cholerae* El Tor, а также *V. cholerae* серогруппы O139 [11; 73; 179; 222].

V. cholerae продуцирует два ключевых токсина: термостабильный эндотоксин и термолабильный экзотоксин, известный как холероген [73; 176]. Основным фактором, вызывающим клинические проявления холеры, такие как профузная диарея, является

холероген. Молекула холерогена состоит из двух субъединиц – А и В, которые кодируются генами *ctxAB*, входящими в состав оперона. Этот оперон расположен в мобильном генетическом элементе (МГЭ) филаментозного бактериофага СТХ. Структура МГЭ включает две основные области: «коровую» (core region) и RS2 [203]. Область RS2 содержит несколько рамок считывания: *rstA2*, *rstB2* и *rstR*. Эти гены выполняют важные функции: *rstA2* отвечает за сайт-специфическую интеграцию фага в геном хозяина, *rstR* регулирует репрессию транскрипции гена *rstA*, а *rstB2* обеспечивает репликацию фаговой ДНК [229].

"Коровая" область генома фага СТХ содержит несколько ключевых структурных генов, включая: *zot* (кодирует зонула окклюденс токсин, разрушающий межклеточные контакты); *ace* (дополнительный холерный энтеротоксин); *cep* (гены, ответственные за образование пилей); *orfU* (ген с пока не установленной функцией) [151-152; 223]. Однако для успешного развития инфекционного процесса одного лишь синтеза холерного токсина недостаточно. Ключевым этапом является прикрепление холерных вибрионов к эпителию тонкого кишечника, которое опосредовано токсин-корегулируемыми пиллями (ТСП). Эти структуры выполняют две важные функции: способствуют адгезии бактерий к клеткам хозяина и выступают в качестве рецепторов для фага СТХ [173]. ТСП образуются в результате полимеризации основной субъединицы ТсрА, кодируемой геном *tcpA*. Данный ген входит в состав кластера *tcpA-F*, расположенного на острове патогенности VPI-1 (*Vibrio Pathogenicity Island*) [116]. Таким образом, патогенность *V. cholerae* определяется сложным взаимодействием между генетическими элементами фага СТХ и бактериального генома.

Современные эпидемиологические данные свидетельствуют, что наиболее тяжелые формы холеры вызывают гибридные штаммы *V. cholerae* биовара El Tor с измененной генетической структурой. Эти модифицированные штаммы характеризуются особым вариантом профага СТХф, содержащего гены *ctxAB*, ответственные за продукцию холерного токсина (ХТ) [75; 146].

В истории распространения и изучения холеры выделяют семь пандемий [99]. Возникновение седьмой пандемии холеры связано с появлением измененных на генетическом уровне штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, не идентичных классическим вариантам. Эти штаммы демонстрируют повышенную вирулентность, способность эффективно адаптироваться к различным условиям окружающей среды, а также устойчивость к множеству антимикробных препаратов [58; 146; 171]. Изменения в эпидемическом процессе холеры, включая рост общего числа заболевших, увеличение доли тяжелых случаев и расширение географического распространения инфекции, способствовали интенсивному распространению заболевания в эндемичных регионах. Эти факторы также привели к завозу холеры в страны Европы, что создает потенциальный риск проникновения инфекции на территорию РФ [85].

В начале VII пандемии холера была неоднократно занесена на территорию нашей страны [87; 107; 108; 110]. Возникновению холерных очагов, обусловленных скрытым заносом возбудителя, способствовали благоприятные природные условия, способствующие накоплению и размножению токсигенных штаммов *V. cholerae*. Изучение эпидемиологических особенностей вспышек, в том числе специфики водопользования, а также обнаружение токсигенных изолятов в поверхностных водоемах, свидетельствовало о водном механизме передачи инфекции [88].

По оценкам исследователей, во всем мире в период 2012–2023 гг. зарегистрировано 4 308 845 случая холеры с распространением инфекции в 71 стране всех континентов, наибольший удельный вес занимали страны Азии и Африки [93]. Значительное влияние на структуру заболеваемости холерой оказали крупные эпидемии, такие как вспышка на острове Гаити в 2010 г., которая началась после разрушительного землетрясения. Кроме того, в этот же период произошла масштабная эпидемия холеры в Йемене (2017 г.), где в условиях военного конфликта было зарегистрировано более 1 032 481 случая заболевания [137].

В 2023 году были зарегистрированы два случая завоза холеры из Индии. Первый токсигенный штамм Эль Тор Ogawa (ctxA⁺tcpA^{ET+}) был выделен из проб клинического материала двадцатилетнего гражданина Индии, приехавшего в Тамбовскую область [93]. Специалисты лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора установили принадлежность данного штамма к 16 фаготипу, что свидетельствует о его эндемичности для Индии и является убедительным аргументом в пользу завозного характера возбудителя. Второй токсигенный штамм Эль Тор Ogawa (ctxA⁺tcpA^{ET+}) был выделен из проб клинического материала гражданина РФ, прибывшего в г. Москва из Индии. Такие события следует считать, как возникновение серьезной угрозы, которые требуют проведения противоэпидемических (профилактических) мероприятий [93].

Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации характеризуется преимущественным выделением нетоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1, O139 и других серологических групп из открытых водных источников. С 2009 по 2018 г. в 29 субъектах Российской Федерации выявлено 744 изолята *V. cholerae* O1 (биовар Эль Тор) и *V. cholerae* O139, демонстрирующих различия в спектре основных вирулентных свойств [78]. Были зарегистрированы единичные изоляты токсигенных штаммов *V. cholerae* Эль Тор в поверхностных водоемах Республики Крым (2010 г.) и Ростовской области (2011, 2014 гг.) [78]. В 2023 и 2024 гг. были выделены токсигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor (ctxA⁺tcpA^{ET+}) из пробы воды р. Темерник (Ростов-на-Дону) на фоне эпидемического благополучия в Ростовской области, выявление данного штамма связано с неустановленным завозом из-за рубежа и свидетельствует о том, что данные изоляты все еще сохраняются на отдельных эндемичных территориях [93].

Особого внимания заслуживает классический биовар холерного вибриона (*V. cholerae* биовара classical). Эпидемиологические наблюдения показали, что в разгар седьмой пандемии (1980–1990 гг.) произошло возвращение классических штаммов в

Бангладеш, где они заняли доминирующее положение в структуре холерной инфекции в ряде южных областей [209].

Несмотря на стабильную эпидемиологическую обстановку по холере в РФ, на сегодняшний момент сохраняется риск завоза инфекции [84-86; 93]. Основным фактором риска является миграция населения из стран с неблагополучной ситуацией по холере, что создает угрозу проникновения возбудителя через государственную границу [84-86]. Все зарегистрированные случаи холеры имели завозное происхождение [79; 93]. Ежегодно наблюдаются сезонные подъемы заболеваемости холерой, сопровождающиеся распространением инфекции на новые территории. Это создает условия для формирования временных вторичных очагов, что подчеркивает необходимость постоянного мониторинга и контроля эпидемиологической ситуации [77; 78; 83; 93], что свидетельствует о необходимости использования новых подходов к профилактике холеры. Профилактика и контроль холеры в России осуществляются в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2007 г.) и федеральной целевой программой «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации». Всемирная ассамблея здравоохранения (2011 г.) оценила ситуацию с холерой в рамках седьмой пандемии как значительную угрозу для мирового сообщества, что послужило основанием для принятия резолюции WHA64.15. Данный документ предусматривает внедрение единой стратегии борьбы с заболеванием, акцентируя внимание на превентивных мерах, а не только на ликвидации вспышек [79; 87].

1.2. Проблема антибиотикорезистентности холерных вибрионов

Седьмая пандемия холеры характеризуется широкой циркуляцией полирезистентных штаммов *V. cholerae*, проявляющих устойчивость как к антибиотикам, так и к биоцидам. Это явление создает значительные препятствия для эффективного контроля над инфекцией и ведет к обострению эпидемической ситуации во всем мире [79; 87; 142; 213]. В настоящее время существует реальная угроза возникновения биолого-социальных чрезвычайных ситуаций международного

масштаба, которые могут проявляться в виде крупных эпидемий и вспышек холеры [79; 85].

Основным методом лечения холеры является регидратационная терапия, тогда как антибиотики применяются для снижения интенсивности и продолжительности клинических симптомов, а также уменьшения выделения возбудителя с каловыми массами [43; 112; 145]. Распространение устойчивых к антибиотикам штаммов холерного вибриона напрямую связано с нарушением схем антибактериальной терапии, чрезмерным использованием противомикробных препаратов в медицине и их массовым применением в агропромышленном комплексе, что подтверждается данными современных исследований [35; 58; 72; 142].

Также увеличение антибиотикоустойчивых штаммов возбудителя холеры, обусловленное мутациями, а также генетическими перестройками, предполагает регулярное модернизирование антимикробных препаратов [102; 185; 207]. Холерный вибрион способен приобретать гены антибиотикорезистентности посредством внедрения мобильных генетических элементов: плазмид, инсерционных последовательностей (IS-элементов), транспозонов и интегронов с генными кассетами [105-106].

Первые сообщения о выделении от больных штаммов холерного вибриона Эль Тор, устойчивых к стрептомицину, тетрациклину, хлорамфениколу, канамицину, ампициллину и эритромицину относятся еще к 1965 г. [153]. С начала 1980-х годов XX столетия происходит резкое увеличение количества антибиотикорезистентных изолятов *V. cholerae* [6], которое продолжается и в настоящее время во всем мире [185; 236].

Распространенность устойчивости к антибиотикам у штаммов *V. cholerae* оценивалась зарубежными авторами путем проведения систематического обзора и поиска в международных базах данных, включая PubMed и Google Scholar, статей, опубликованных с 1 января 1990 г. по 30 сентября 2016 г. [118]. Данное исследование демонстрирует высокие показатели устойчивости холерных вибрионов к различным

антибиотикам. По результатам метаанализа была установлена устойчивость клинических изолятов *V. cholerae* к тетрациклинам [115].

Рост антибиотикоустойчивости клинических изолятов *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы показан в работе Chaoying Liu [185]. Авторы проанализировали 24 062 штамма холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы и установили, что высокую эффективность и низкий уровень резистентности имеют такие антибиотики, как ципрофлоксацин, азитромицин, гентамицин, цефалексин, имипенем, офлоксацин и норфлоксацин [185]. Аналогичные результаты были получены в опытах по изучению устойчивости изолятов *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы из окружающей среды [236]. Особую актуальность приобретает увеличение антимикробной резистентности *V. cholerae* в экономически неблагополучных регионах и эндемичных зонах, что подчеркивает критическую важность систематического мониторинга и строгого регулирования использования антибактериальных средств.

Проведенный в 2019 г. мониторинг антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации, выявил, что 37,5% исследованных изолятов обладали устойчивостью к фуразолидону. Более 80% штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 были нечувствительны одновременно к 1–7 антибактериальным препаратам и имели 20 различных фенотипов [101].

Таким образом, в современный период седьмой пандемии отмечается разнообразие и вариабельность фенотипов антибиотикорезистентности возбудителя холеры на фоне нарастания числа антибиотикорезистентных штаммов, что резко ограничивает число эффективных антибактериальных препаратов и определяет необходимость проведения бактериологического контроля выделения культуры на фоне лечения с обязательным исследованием антибиотикочувствительности. Поэтому, ВОЗ рекомендует ограничить применение антибактериальных препаратов исключительно тяжелыми случаями холеры, а в качестве профилактических мер предлагает использовать массовую вакцинацию [32; 118].

Современный анализ эпидемиологической ситуации свидетельствует о тревожной тенденции - доминировании антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* различных сероваров над чувствительными формами [87; 101; 118; 185]. Данный факт обуславливает необходимость разработки инновационных подходов к контролю заболевания [57], среди которых особого внимания заслуживает фаготерапия.

Перспективность применения бактериофагов обусловлена их уникальной способностью инфицировать как антибиотикочувствительные, так и полирезистентные штаммы холерного вибриона [7; 54; 76; 160]. Эта характеристика делает бактериофаги перспективной альтернативой в условиях нарастающей антибиотикорезистентности, особенно в эндемичных регионах с ограниченными ресурсами здравоохранения.

1.3. Бактериофаги холерных вибрионов и основные направления их использования

История изучения холерного бактериофага начинается в 1896 году, когда английский бактериолог Эрнест Хэнкин (E.N. Hankin) обнаружил, что вода из реки Ганг обладает способностью значительно снижать количество *V. cholerae*. Это явление, позже названное «феноменом Хэнкина», стало одним из первых свидетельств существования бактериофагов – вирусов, избирательно поражающих бактерии [3]. Хэнкин предположил, что в воде присутствует некий агент, способный уничтожать холерные вибрионы, однако в то время его природа оставалась неизученной. В 1917 году, грузинский ученый Георгий Габриэлевич Элиава описал аналогичное явление в воде из реки Мтквари (Кура). Он отметил, что в определенных условиях количество холерных вибрионов в воде резко уменьшалось, что указывало на присутствие других организмов [24].

Честь открытия холерного бактериофага принадлежит Феликсу Д'Эррелю (Félix d'Hérelle), одному из основоположников учения о бактериофагах. В 1921 г. Д'Эррель

впервые выделил специфический бактериофаг, активный против *V. cholerae*, из испражнений пациента, выздоравливающего после холеры. Это открытие стало важным шагом в развитии фаговой терапии и подтвердило существование вирусов, способных избирательно уничтожать бактерии [31].

В 1922 году немецкий ученый Йоттен (Jötten) также выделил холерный фаг, но уже из культуры холерных вибрионов. Это открытие подтвердило универсальность явления и открыло новые возможности для изучения взаимодействия бактериофагов с патогенными микроорганизмами. Работы Д'Эрреля и Йоттена заложили основу для дальнейших исследований бактериофагов, которые стали важным инструментом в борьбе с инфекционными заболеваниями.

В настоящее время научные исследования подтвердили, что активность холерных фагов играет значительную роль в формировании сезонных вспышек холеры в Бангладеш [150; 169]. Согласно опубликованным данным, эти вирусы, избирательно поражающие бактерии *V. cholerae*, способны влиять на динамику распространения заболевания [172]. В частности, их активность может снижать численность патогенных бактерий в окружающей среде, что, в свою очередь, сдерживает интенсивность эпидемий. Аналогичные выводы сделаны авторами работы по оптимальным факторам выживаемости нового литического бактериофага JSF4φ [169]. Полученные данные показали, что литическое действие данного фага распространяется на клинические и экологические штаммы *V. cholerae*, что способствует постепенной ликвидации вспышек холеры.

Бактериофаги, в том числе специфичные к холерному вибриону, могут взаимодействовать с бактериальной клеткой четырьмя основными способами: литическим, лизогенным, псевдолизогенным и хроническим. В случае литического цикла фаг, проникнув в клетку, быстро запускает её разрушение с высвобождением новых вирионов. В свою очередь, при лизогении вирусный геном либо интегрируется в хромосому бактерии, образуя профаг, либо сохраняется в цитоплазме в виде плазмиды [149]. У вибрионов некоторые профаги кодируют факторы вирулентности,

такие как токсины. Они могут придавать вирулентность бактериям при заражении, используя процесс, известный как лизогенная конверсия [21; 51], который способствует изменению физиологии клеток путем введения новых функций [196]. Хроническая инфекция характеризуется постоянным выделением фагового потомства через процессы почкования или экструзии без разрушения клетки-хозяина, которая сохраняет жизнеспособность в течение длительного периода. В случае псевдолизогении наблюдается непрерывная репликация фагов при наличии достаточного количества бактериальных клеток, при этом часть популяции, обладающая физической или физиологической устойчивостью, продолжает делиться, тогда как остальные клетки подвергаются инфицированию. В результате фаговая инфекция не вызывает полного лизиса всей бактериальной культуры [196; 230].

Фаги, способные к размножению только в литическом цикле, называют вирулентными. Если вирус способен развиваться по упомянутым циклам, даже с чередованием литического, то он считается умеренным [196; 230].

Вирулентные фаги холерных вибрионов могут сокращать популяции бактерий и способствовать их эволюции. Silva-Valenzuela С.А. с соавторами, используя три вирулентных фага, исследовали их равновесие с *V. cholerae* в водных микросомах, ограничивающих питательные вещества [217]. В результате было высказано предположение, что фаги подавляют вспышки холеры, но прямых доказательств хищничества фагов в водной среде установлено не было. Авторы показали, что разные фаги обладают различной способностью инфицировать определенные ниши или стадии жизненного цикла бактерий-хозяев. Особенности фагово-бактериальных взаимодействий в их естественной среде могут использоваться для разработки метода прогнозирования вспышек или борьбы с ними.

Умеренные фаги играют ключевую роль в регуляции биологических свойств холерных вибрионов, выполняя как защитные, так и эволюционные функции. Согласно исследованиям [196], эти фаги не только обеспечивают бактериям иммунную защиту от гомоиммунных умеренных и некоторых вирулентных фагов, но

и способствуют формированию гетерогенных популяций с повышенной адаптационной способностью. Как отмечают авторы [23; 90], спонтанная индукция умеренных фагов приводит к появлению атипичных бактериальных популяций, демонстрирующих: (1) повышенную устойчивость к неблагоприятным условиям среды, (2) улучшенные колонизационные свойства, и (3) усиленную конкурентную способность. Эти данные подчеркивают значимость фаговых взаимодействий в эволюции и экологии холерных вибрионов, а также необходимость их учета при разработке профилактических мер против холеры.

Разработка эффективных диагностических и профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов требует четкого разграничения их вирулентной и умеренной форм, что обусловлено принципиальными различиями в их биологических свойствах и механизмах взаимодействия с бактериальной клеткой [60; 196; 230]. Это требование логически вытекает из описанных ранее особенностей взаимодействия фагов с бактериальными клетками и непосредственно связано с их практическим применением.

Изучение биологических особенностей бактериофагов *V. cholerae* берет свое начало в 1920-1940-х гг. Первые исследования выявили существенную гетерогенность фаговых изолятов, полученных из различных биологических материалов: фекалий инфицированных пациентов, лизогенных культур холерного вибриона и природных водоемов [39; 198]. Анализ выделенных штаммов продемонстрировал выраженные различия по нескольким ключевым параметрам: морфологии бляшек (негативных колоний); спектру литической активности; кинетике репродукции; устойчивости к физико-химическим факторам.

Таким образом, научное осмысление значительного разнообразия холерных бактериофагов привело к необходимости создания их систематической классификации, что стало важнейшим условием для дальнейших исследований и практического применения. Первую такую классификационную систему разработали в 1933 г. I. Asheshov, S. Khan и M. Lahiri, взяв за основу три ключевых критерия:

серологические свойства фагов (антигенная специфичность и иммунологические характеристики), морфологию негативных колоний (форма и размер зон лизиса), а также спектр чувствительности различных штаммов холерных вибрионов (избирательность и интенсивность бактериолитического действия) [69]. Данная разработка заложила фундамент для дальнейшего изучения холерных фагов.

Интенсивное развитие исследований в этой области наблюдалось в 1970-е гг., и они продолжают с успехом до настоящего времени. Современные работы [21; 23], вносят значительный вклад в понимание роли и разнообразия холерных фагов, расширяя знания об их взаимодействии с холерными вибрионами и их влиянии на эпидемиологию холеры.

Холерные фаги, как и многие другие бактериофаги, существуют в двух основных формах: умеренной и вирулентной, что соответствует общей закономерности их жизненного цикла. Вирулентные фаги, поражающие возбудителя холеры, были всесторонне изучены и описаны в ряде научных работ [16; 23; 38; 132; 196]. Свойства умеренных холерных фагов, включая их способность к лизогении, влияние на генетическую изменчивость бактерий и роль в адаптации хозяев к неблагоприятным условиям, также были изучены в многочисленных исследованиях [55; 63; 69; 159; 196]. Эти работы подчеркивают важность умеренных фагов не только как факторов, влияющих на эволюцию и экологию холерных вибрионов, но и как потенциальных инструментов для контроля за распространением холеры. Современные исследования продолжают углублять понимание сложных взаимодействий между фагами и их хозяевами, что открывает новые перспективы для применения фагов в медицине и биотехнологии.

Холерные бактериофаги представляют собой морфологически и генетически разнородную группу вирусов, что потребовало разработки специальных систем классификации. Первая классификация была предложена Дэвидом Бредли в 1967 году (Рисунок 1А), разделившим фаги на шесть морфологических групп (А-F) на основе электронно-микроскопических исследований. Год спустя А.С. Тихоненко

модифицировал эту систему, объединив группы D и E и предложив альтернативную классификацию из пяти категорий (Рисунок 1Б) [109]. Согласно этой системе, фаги разделяются на: (1) нитевидные (группа I), (2) с аналогами отростка (II), (3) с коротким отростком (III), (4) с длинным не сокращающимся отростком (IV) и (5) со сложным сокращающимся отростком (V). Эти классификации, основанные на ультраструктурных особенностях вирусных частиц, подчеркивают значительное морфологическое разнообразие холерных бактериофагов и заложили основу для их дальнейшего изучения и систематизации, сохранив свою актуальность, несмотря на появление новых молекулярно-генетических методов исследования.

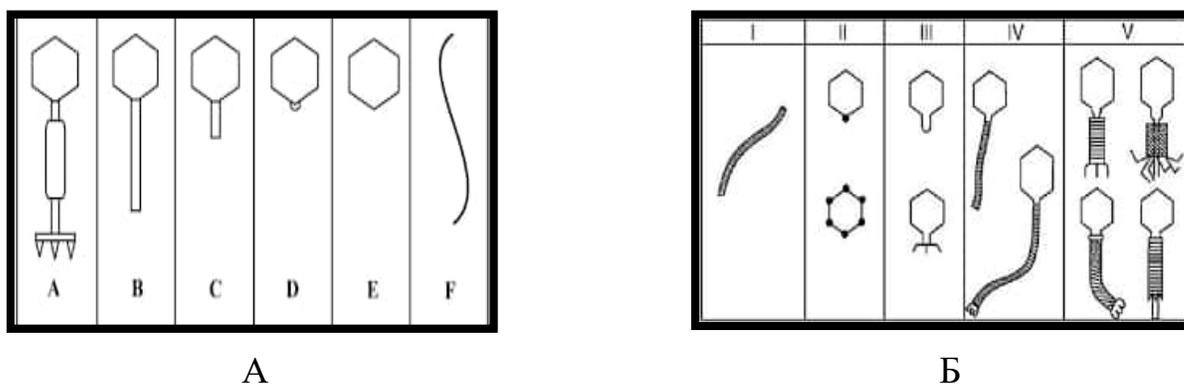


Рисунок 1 – Фаговые морфогруппы: А – по Бредли (1967) [25]; Б – по Тихоненко (1968) [25; 109]

Бактериофаги разделяют на ДНК- и РНК-содержащие фаги. Последние образуют только два семейства: *Cystoviridae*, *Leviviridae*. Остальная многочисленная группа относится к ДНК-содержащим фагам – *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Plasmaviridae*, *Corticoviridae*, *Fuselloviridae*, *Tectiviridae*, *Microviridae*, *Inoviridae*, *Plectovirus* и *Inoviridae Inovirus*.

Официальная классификация Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), основанная на морфологии фага и организации генома, оспаривалась многими авторами [180; 204; 206]. В связи с быстрой изменчивостью фагов, ученые не успевают их анализировать, сравнивая с уже изученными. В 2021 г. произошли существенные изменения в таксономии бактериальных вирусов: классификация вирусов на основе взаимоотношений теперь рассматривается на уровне генома. Для

бактериальных вирусов дорожная карта и руководство по геномной классификации были опубликованы в рекомендациях по анализу геномов бактериофагов [216; 224], утверждены исполнительным комитетом и ратифицированы голосованием в 2022 г. Значительные изменения были внесены в таксономию бактериальных вирусов: парафилетические морфологические семейства *Podoviridae*, *Siphoviridae* и *Myoviridae*, а также отряд *Caudovirales* (Рисунок 2). Была установлена биномиальная система номенклатуры видов. Самым радикальным изменением в классификации фагов является отмена основанных на морфологии семейств *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*, а также удаление порядка *Caudovirales*, который заменен классом *Caudoviricetes*, чтобы сгруппировать все хвостатые бактериальные и архейные вирусы с икосаэдрическим капсидом и двухцепочечным геном ДНК. Это изменение было необходимо, учитывая многочисленные независимые оценки исследователей, что объединенные по морфологии семейства полифилетичны и не точно отражают общую эволюционную историю [225].

В соответствии с новой классификацией (Рисунок 2) холерные фаги относятся к миовирусам (сем. *Peduviridae* и др.), подовирусам (род *Enhodamvirus*, сем. *Autographiviridae*, *Zobellviridae* и др.), сифовирусам класса *Caudoviricetes*, а также фибровирусам порядка *Tubulavirales* сем. *Inoviridae*.

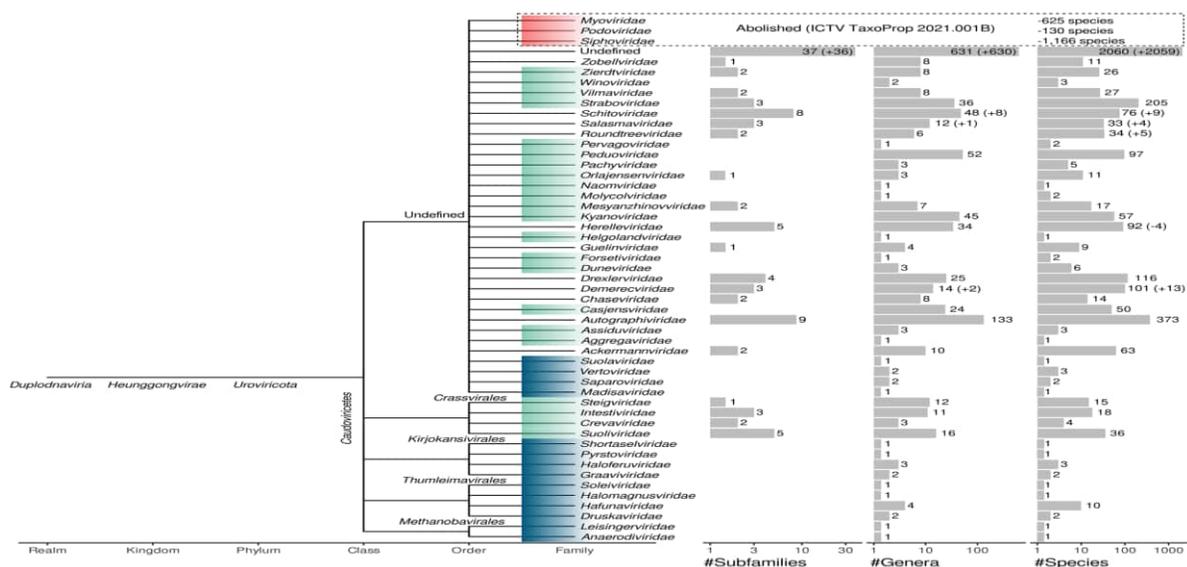


Рисунок 2 – Кладограмма, отражающая таксономическую структуру класса *Caudoviricetes*

[225]

Как правило, к представителям класса *Caudoviricetes* относятся вирулентные бактериофаги (подо-, мио-, сифовирус), имеющие исключительно литический путь жизненного цикла. [177; 230]. Подтверждением вирулентности бактериофага является выявление таких детерминант, как lysozyme, porphyrin biosynthesis, endolysin, различные типы гидролаз и т.д. [125; 230], но обязательно должны отсутствовать гены, характерные для умеренных фагов: integrase, mobile element protein, транспозазы, фаговые антирепрессоры, токсины, гены антибиотикорезистентности, siderophore-interacting protein [230]. В свою очередь, умеренные бактериофаги могут содержать в своем геноме детерминанты, характерные для вирулентных фагов, которые были представлены выше.

Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз является полногеномное секвенирование [121; 139]. Современные методы молекулярной биологии и генной инженерии позволяют не только детально характеризовать бактериофаги, внести изменения в их геномы, но и сконструировать синтетические бактериофаги. Отбор бактериофагов для терапевтических и профилактических целей требует строгого учета их вирулентных свойств. В отличие от умеренных фагов, способных интегрироваться в бактериальный геном и формировать устойчивые популяции, вирулентные фаги обеспечивают полный лизис чувствительных клеток, отсутствие лизогенной конверсии и минимизацию риска развития резистентности [17; 44; 68; 162]. Фаговая терапия и профилактика должна быть основана только на безопасных (вирулентных), хорошо охарактеризованных на геномном и протеомном уровнях бактериофагах [68; 141; 235].

Фаги демонстрируют высокую эффективность в качестве бактерицидных агентов, обладая рядом уникальных преимуществ. Они не вызывают побочных эффектов, нетоксичны для организма человека и отличаются высокой специфичностью действия. Благодаря своей избирательности, фаги уничтожают

только целевые патогенные бактерии, не затрагивая при этом полезные микроорганизмы, что позволяет сохранить нормальный микробиом человека. Эти свойства делают фаги перспективным инструментом для борьбы с бактериальными инфекциями.

В кишечнике здорового человека присутствует огромное количество различных видов фагов. Среди них наиболее распространенными являются представители класса *Caudoviricetes*, включающего подовирусы, миовирусы и сифовирусы. Интересно, что именно к этому классу относятся фаги, которые активно применяются в фаготерапии и фагопрофилактике для борьбы с бактериальными инфекциями [147; 199; 211].

Одной из ключевых особенностей фагов является их способность преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в костные ткани, пораженные остеомиелитом [156; 199]. В присутствии целевых бактерий фаги активно размножаются в инфицированных участках организма. После уничтожения патогена фаги разрушаются тканевыми макрофагами, а их выведение из организма осуществляется с участием печени и почек [168]. Подобные свойства позволяют использовать бактериофаги в качестве высокоэффективного и безопасного средства для терапии бактериальных поражений, включая труднодоступные анатомические области.

Клинические успехи фаготерапии в лечении критических пациентов с инфекциями, вызванными полирезистентными микроорганизмами [131; 144; 201; 212], стимулируют активное развитие этого направления в современной медицине. В последние годы чаще проводятся конференции и крупные конгрессы, посвященные бактериофагам, они сосредоточены на их практическом использовании и применении в различных областях. Появилось несколько компаний, занимающихся разработкой препаратов на основе бактериофагов. Однако анализ результатов исследований бактериофагов в экспериментальных моделях инфекций и данных клинических испытаний выявляет серьезные проблемы [18], которые необходимо решить для разработки по-настоящему эффективных методов фаготерапии и фагопрофилактики.

На фармацевтическом рынке РФ находятся в обращении 16 наименований зарегистрированных лекарственных препаратов на основе бактериофагов–монофагов, поливалентных фагов (фаговые коктейли) широкого спектра действия, выпускаемых в виде растворов и таблеток. Российское НПО «Микроген» корпорации «Ростех» – крупнейшее иммунобиологическое предприятие, выпускающее лечебно-профилактические фаговые препараты на трех производственных площадках: «Иммунопрепарат» г. Уфа, «ИмБио» г. Нижний Новгород, «Биомед» г. Пермь. В основе препаратов лежат стерильные фаголизаты целевых бактерий, подвергнутые глубокой очистке, включающей удаление бактериальных токсинов, компонентов лизированных клеток, антигенных комплексов и примесей культуральных сред [34; 49; 104].

В настоящее время фаготерапия и фагопрофилактика признается перспективным направлением в лечении инфекций, вызываемых антибиотикоустойчивыми штаммами бактерий, проводится активный научный поиск новых композиций на основе бактериофагов, в том числе и холерных [120; 170; 192; 235].

1.4. Принципы конструирования препаратов на основе холерных бактериофагов

В 1927 году ученые Феликс Д'Эрелль и Георгий Габриэлевич Элиава впервые начали использовать бактериофаги для профилактики и лечения холеры, что стало важным шагом в развитии фаготерапии. Во время эпидемий холеры в Индии они разработали и успешно применили инновационный метод — искусственное заражение колодцев холерными бактериофагами, что позволило снизить распространение инфекции [31; 48]. Позже, в 1932 г. исследователь J. Morison также подтвердил высокую эффективность бактериофагов в борьбе с холерой. В своих работах он привел статистические данные, демонстрирующие значительное снижение смертности среди пациентов, применявших фаговые препараты: в этой группе показатель составил всего 10%, тогда как среди тех, кто отказался от лечения,

смертность достигала 92,3% [193]. Эти исследования стали важным этапом в изучении бактериофагов и заложили основу для дальнейшего развития фаготерапии как альтернативного метода борьбы с инфекционными заболеваниями.

Параллельно с исследованиями в Индии фаготерапия и фагопрофилактика активно развивались в СССР. Как отмечается в работах [194], советские ученые внесли значительный вклад в эту область. С 1938 г. микробиологи З.В. Ермольева и Л.М. Якобсон начали применять холерные бактериофаги для санации колодцев и профилактики [3; 27]. Широкое применение поливалентных холерных бактериофагов позволило избежать эпидемии холеры в блокированном Сталинграде в годы Великой Отечественной войны. В Ташкентском институте вакцин и сывороток коллективом ученых под руководством Ермольевой разработан поливалентный препарат, содержащий 19 разновидностей бактериофагов, эффективных против холерного вибриона, брюшнотифозной палочки и дифтерийной коринебактерии. Результаты этих исследований были обобщены в фундаментальном труде Ермольевой, включающем специальный раздел по применению бактериофагов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний [41].

После окончания Великой Отечественной войны в специализированных противочумных учреждениях началось небольшое производство бактериофагового противохолерного препарата [27; 37], фармакологическая активность которого подтверждалась в ходе доклинических исследований на животных. В 1960-х гг. группа исследователей под руководством А.Г. Никонова создала высокоактивный холерный бактериофаг с усиленными литическими свойствами. Данный препарат продемонстрировал высокую эффективность при ликвидации эпидемических вспышек в Восточном Пакистане (ныне Бангладеш) и Афганистане. Разработанная методика предполагала комплексный подход, сочетающий применение фагопрепаратов с регидратационной терапией (солевыми растворами) и антибактериальными средствами [27; 69]. В 1964 г. российские ученые обнаружили, что пассажи фага на холерных вибрионах в среде с добавлением человеческой крови

повышают его активность. Сотрудники института «Микроб» разработали два препарата с поливалентными холерными фагами, но их испытания в Бангладеш не показали терапевтического эффекта на фоне регидратации [27; 69]. Это привело к сомнениям в эффективности фагов и прекращению исследований в данной области.

Активное изучение бактериофагов для профилактики и лечения холеры возобновилось только в начале XXI века благодаря работам Т.А. Кудряковой из Ростовского-на-Дону противочумного института. В результате проведенных исследований под её руководством был создан инновационный препарат, содержащий поливалентные холерные бактериофаги [59; 61; 62; 64; 65]. Первая версия препарата включала четыре фага, относящихся к трём серотипам (III, IV и VI), и демонстрировала выраженную литическую активность в отношении классических штаммов холерного вибриона. Однако в связи с изменением биовара возбудителя холеры во время VII пандемии потребовалась модификация состава препарата. В обновленной версии использовались фаги пяти серотипов (III, V, VI, VII, IX), при этом доля фагов, активных против вибрионов Эльтор, была минимальной. Эти исследования стали важным шагом в адаптации фаготерапии к современным штаммам возбудителя холеры, что подчеркивает необходимость постоянного обновления и совершенствования подобных препаратов в условиях изменяющейся эпидемиологической обстановки.

В последние годы на базе Ростовского-на-Дону противочумного института были проведены исследования бивалентной смеси холерных бактериофагов, направленные на их подбор и изучение эффективности *in vitro* и *in vivo* [22]. Результаты этих исследований продемонстрировали перспективность дальнейшего поиска фагов, которые могли бы стать наиболее эффективными средствами для лечения и профилактики экспериментальной холеры.

Схожие результаты, подтверждающие эффективность фагопрофилактики и фаготерапии холеры, были зафиксированы и в исследованиях зарубежных ученых [122; 170; 235]. В экспериментах на взрослых кроликах и белых мышах было

продемонстрировано, что использование нескольких бактериофагов как до, так и после инфицирования значительно снижало тяжесть симптомов заболевания и уменьшало признаки воспаления у зараженных животных. В 2019 году исследовательская группа под руководством Bhandare S. экспериментально доказала, что однократное пероральное применение бактериофага из семейства *Podoviridae* эффективно защищает новорожденных кроликов от развития клинических проявлений холеры. Важным аспектом данного исследования стало отсутствие формирования фагорезистентности у возбудителя при использовании монофаговой терапии [120]. Эти данные свидетельствуют о том, что фаги способны не только предотвращать развитие инфекции, но и смягчать ее течение, что подтверждает их потенциал в качестве эффективного средства для борьбы с холерой. Такие результаты подчеркивают важность дальнейших исследований в этой области для разработки новых стратегий профилактики и лечения инфекционных заболеваний

Исследователи не только применяют фаговые препараты на практике, но и изучают теоретические аспекты бактериофагии. В работе [167] зарубежные ученые успешно использовали пробиотики и холерные бактериофаги для терапии в лабораторных условиях. Они подчеркивают необходимость гибкой, многосторонней стратегии борьбы с холерой, адаптированной к конкретным условиям вспышки. Комбинация методов, включая регидратацию, антибиотики, вакцинацию, пробиотики и фаговую терапию, обладает значительным потенциалом для эффективного противодействия инфекции.

Для идентификации потенциальных терапевтических холерных фагов ученые из Индии [119] проводили комплексный сравнительный анализ полногеномных последовательностей 86 холерных бактериофагов. Авторы идентифицировали девять кластеров и три одиночных элемента с помощью BLASTn. Внутри кластеров наблюдалась высокая степень совпадения последовательностей и функционального сходства как на геномном, так и на протеомном уровнях. Данные анализа свидетельствуют, что фаги консервативны внутри кластеров. В отношении каждого

терапевтического фага были идентифицированы два наиболее близких фага, которые могут быть предложены, в качестве потенциальных терапевтических фагов, для лечения и профилактики холеры.

Также, в настоящее время актуальны исследования систем защиты холерного вибриона от фаговой инфекции, включая модификацию рестрикции, abortивную инфекцию, фазовые изменения рецепторов клеточной поверхности, индуцируемые фагом хромосомные островки и кластерные системы коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas с регулярными промежутками [42; 124], а также секретируемые везикулы наружной мембраны *V. cholerae*, действующие как защитный механизм и зависящие от фагового рецептора [205]. Известно более 100 систем защиты прокариот от бактериальных вирусов [36], эти бактериальные системы-ловушки способны повлиять на профилактику и лечение бактериофагом, что необходимо учитывать при разработке биопрепаратов против холеры.

Важным фактором, повлиявшим на снижение интереса к бактериофагам, было отсутствие стандартизованных методов тестирования, способов производства, промышленных стандартов для фаготерапии и фагопрофилактики, а также документирования результатов исследований по оценке их эффективности. Кроме того, первоначальное изучение и поиски осложнялись проблемами, связанными с получением образцов/препаратов бактериофагов [3; 54; 129].

В современном мире при разработке фаговых препаратов важно учитывать риск инфицирования холерными фагами бактерий нормальной микрофлоры ЖКТ при пероральном приеме [126; 129]. Решением может стать селекция атоксигенных штаммов фагов, обеспечивающих строгую специфичность к бактериям-хозяевам [81]. Многолетний опыт применения моно- и поливалентных фаговых препаратов для терапии и профилактики кишечных инфекций и дисбактериоза подтверждает отсутствие неспецифической литической активности в отношении человеческой микробиоты [4; 45; 70; 129].

Следующая проблема, связанная с получением бактериофагов, заключалась в

степени чистоты полученных препаратов, которые могли содержать нежелательные бактериальные компоненты. В современном мире эту проблему поможет решить качественная фильтрация фаголизата [26; 52; 129].

Одним из ключевых ограничений фаготерапии холеры является потенциальная модификация фенотипа бактерий вследствие интеграции профаговой ДНК в геном хозяина, что может приводить к изменению вирулентных свойств возбудителя [53; 183]. Для преодоления этого ограничения разработан комплексный подход, включающий строгий отбор производственных штаммов и использование исключительно литических фагов в составе терапевтических коктейлей [4; 56; 162]. Современные методы полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа играют ключевую роль в данном процессе, позволяя идентифицировать гены лизогении, детектировать маркеры вирулентности и достоверно подтверждать безопасность фаговых препаратов. Эти технологии обеспечивают контроль генетической стабильности производственных штаммов, стандартизацию качества препаратов и соответствие международным требованиям биобезопасности, создавая надежную основу для клинического применения фаготерапии.

Вместе с тем, разработка эффективных фаговых биопрепаратов требует комплексного подхода, включающего тщательное изучение их взаимодействия с макроорганизмом. Ключевыми аспектами таких исследований являются: (1) оценка безопасности и терапевтической эффективности [53; 70; 129], (2) анализ фармакокинетики (длительность персистенции и биораспределение в тканях и клетках) [8; 197], а также (3) изучение иммунологических реакций, включая развитие специфического иммунного ответа, способного нейтрализовать вирусные частицы [5; 12; 13; 163]. Исследования польских ученых показали, что бактериофаги способны оказывать положительное влияние на иммунные процессы, такие как фагоцитоз, респираторные взрывы фагоцитов, пролиферация Т-клеток, синтез антител и выработка цитокинов [123]. Однако в ряде случаев их эффект ограничивается кратковременным повышением активности Т- и В-лимфоцитов, а также НК-клеток,

что сопровождается увеличением их количества в крови [162; 163]. При этом иммунная система может нейтрализовать фаги, вырабатывая специфические антитела, что делает важным отбор менее иммуногенных фагов. Для оценки воздействия бактериофагов на организм необходимо учитывать особенности иммунного ответа, который определяется физико-химическими свойствами фагов, способом и дозой их введения, частотой применения [46; 166], а также иммунным статусом пациента [13; 130; 166; 199].

Важным моментом является и недостаточность нормативного правового регулирования, которая не позволяет в полной мере осуществлять государственный контроль и надзор за качеством изготовленных биопрепаратов на основе бактериофагов [34; 157] в случае их применения в рамках персонализированного подхода. Кроме того, Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» не оговариваются правила контроля обеспечения качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, предназначенных для изготовления в аптечной организации.

В последние годы во всем мире активно исследуются возможности клинического применения бактериофагов, а также разрабатываются стабильные и эффективные лекарственные формы на их основе [10; 82; 133; 190]. Особое внимание уделяется персонализированному подходу к лечению инфекционных заболеваний с использованием бактериофагов, который считается одним из наиболее перспективных направлений [138; 154; 155; 202]. Разработка методологии персонализированной фаготерапии и фагопрофилактики соответствует ключевым положениям Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации до 2030 года. Для успешной реализации данного направления необходимо разработать унифицированные научно обоснованные принципы создания новых фаговых профилактических препаратов, которые должны: 1) соответствовать действующей нормативно-правовой базе РФ, 2) отвечать международным стандартам качества, и 3) учитывать современные

требования к доказательной медицине. Решение этой задачи требует комплексного подхода, включающего стандартизацию методов отбора фагов, унификацию производственных процессов, разработку четких критериев эффективности и создание системы мониторинга результатов, что позволит обеспечить научно обоснованный переход к персонализированным подходам в борьбе с антимикробной резистентностью.

Таким образом, современные исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают перспективность применения бактериофагов для профилактики холеры [120; 122; 170; 235], выделяя ключевые требования к разработке эффективных препаратов. Во-первых, фаги должны обладать строгой вирулентностью и широким литическим спектром в отношении *V. cholerae*, не воздействуя при этом на нормальную микрофлору человека. Во-вторых, важны их высокая репродуктивная способность в клетках-хозяевах и стабильность при хранении. Особое значение имеет использование поливалентных "фаговых коктейлей" из штаммов с различными механизмами действия, что снижает риск развития резистентности [44; 92]. Однако разработка таких препаратов сталкивается с технологическими сложностями, включая необходимость получения высокоочищенных фаговых препаратов, их тщательной оценки на безопасность и эффективность в соответствии с нормативными требованиями [97], а также преодоления потенциальной иммуногенности фагов. Комплексное решение этих задач позволит реализовать потенциал бактериофагов как эффективного средства профилактики холеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ И ОТБОР НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ИЗ НИХ

Анализ состояния проблемы, касающейся возможности завоза инфекции на территорию нашей страны и увеличения числа штаммов холерных вибрионов, обладающих устойчивостью к антибактериальным препаратам, свидетельствует о необходимости поиска новых возможностей для фагопрофилактики холеры [89]. Для достижения поставленной цели на первом этапе исследования требовалось выбрать холерные бактериофаги, обладающие активностью в отношении *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы, провести их всестороннюю морфологическую и генетическую характеристику с целью оценки возможности их использования в качестве кандидатов, в большей степени отвечающих требованиям, предъявляемым к профилактическим препаратам и их компонентам.

2.1. Отбор штаммов холерных бактериофагов из коллекции-депозитария и характеристика их биологических свойств

Первой задачей, поставленной в рамках данного исследования, стало выделение, изучение и отбор штаммов бактериофагов, проявляющих активность в отношении *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, с последующей характеристикой их фенотипических и генотипических свойств.

Взятые в эксперимент бактериофаги были выделены из водной среды (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-13, Rostov-M3) и культуры *V. cholerae* O139 (ФБ1). При отборе бактериофагов учитывался ряд ключевых показателей, обеспечивающих их эффективность и пригодность для дальнейшего использования. Во-первых, оценивалась специфичность литического действия в отношении целевых штаммов вибрионов, что является основным критерием для определения их профилактического потенциала. Во-вторых, внимание уделялось репродуктивной активности фагов, предпочтение отдавалось штаммам с максимально высокой способностью к

размножению в клетках-хозяевах. Также важным параметром была степень лизиса гомологичных бактерий, которая определяла эффективность уничтожения патогенов.

Кроме того, учитывались продолжительность культивирования фагов и скорость их размножения, что напрямую влияет на возможность масштабирования производства фаговых препаратов. Немаловажным фактором являлись оптимальные посевные дозы как бактерий, так и фагов, поскольку их соотношение играет ключевую роль в достижении максимальной литической активности. Эти критерии позволили провести комплексный отбор наиболее перспективных штаммов бактериофагов для дальнейших исследований.

Оценка литической активности испытуемых холерных фагов была проведена на 60-ти штаммах *V. cholerae* O1 El Tor, 30-ти штаммах биовара classical, 40 штаммах *V. cholerae* O139 и результаты представлены в таблице 3, а также на рисунке 3. Бактериофаг Rostov-6 продемонстрировал широкую литическую активность, эффективно воздействуя на 63,3% штаммов классического биовара и 55% штаммов биовара El Tor *V. cholerae*. В сравнении с этим, фаги Rostov-1 и Rostov-7 проявляли более узкую специфичность, показывая высокую эффективность против биовара El Tor - 70% и 63,5% соответственно. Наиболее высокая литическая активность в отношении биовара El Tor равная 97% отмечена у фага Rostov-13. Бактериофаг Rostov-M3 проявил выраженную избирательную активность, демонстрируя высокий уровень лизиса (83,3%) штаммов классического биовара *V. cholerae*, тогда как для биовара El Tor эффективность составила 43,3% (26 из 60 тестируемых штаммов). В свою очередь, фаг ФБ1 показал умеренную литическую способность, воздействуя на 50% исследованных штаммов *V. cholerae* серогруппы O139.

Специфичность исследуемых бактериофагов подтверждена на 100 штаммах близкородственных бактерий (*Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*) (Таблица 3). Данный эксперимент показал отсутствие лизиса в любых его проявлениях, что говорит о специфичности вышеперечисленных холерных фагов.

Таблица 3 – Оценка литической активности и специфичности холерных бактериофагов

Вид микроорганизма	Кол-во взятых штаммов	Кол-во штаммов лизируемых фагом					
		Rostov-1	Rostov-6	Rostov-7	Rostov-13	Rostov-M3	ФБ1
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	60	42	33	38	58	26	0
<i>V. cholerae</i> O1 classical	30	0	19	0	0	25	0
<i>V. cholerae</i> O139	40	0	0	0	0	0	20
<i>V. cholerae</i> nonO1/ nonO139	10	0	0	0	0	0	0
<i>V. methchnikovii</i>	5	0	0	0	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	16	0	0	0	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	10	0	0	0	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	2	0	0	0	0	0	0
<i>S. typhi</i>	3	0	0	0	0	0	0
<i>S. paratyphi</i>	5	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>S. enteritidis</i>	10	0	0	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	16	0	0	0	0	0	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	15	0	0	0	0	0	0

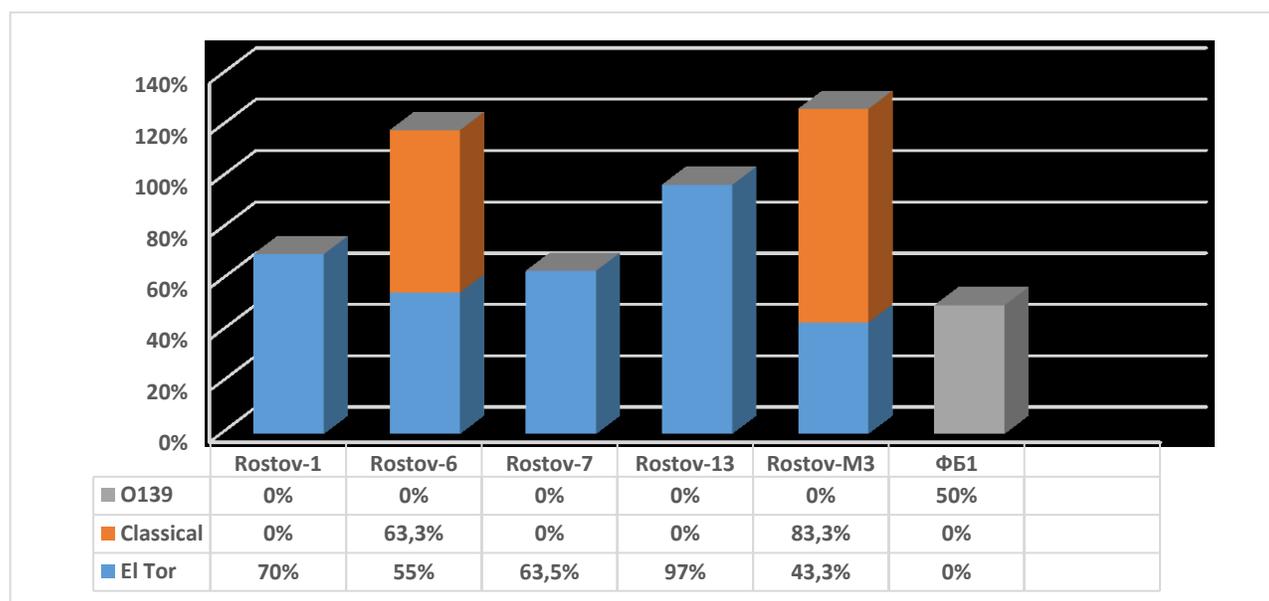


Рисунок 3 – Оценка литической активности холерных бактериофагов в процентном соотношении

При исследовании жизнеспособности выделенных холерных бактериофагов было установлено, что они обладают высокой чувствительностью к повышенным температурам. Так, нагревание фаголизатов до 65°C полностью инактивирует фаги в течение 30 минут, что указывает на их термолабильность и необходимость соблюдения температурного режима при хранении и транспортировке. В то же время, эксперименты показали, что кратковременное хранение фаголизатов при низких температурах (например, при -20°C в течение 24 часов) не приводит к снижению их литической активности. Это свидетельствует о стабильности фагов в условиях холодого воздействия, что важно для их практического применения (Таблица 4).

Таблица 4 – Воздействие температуры на холерные бактериофаги (по Грациа)

Название бактериофага	Индикаторный штамм	Температурный режим/Титр фага (БОЕ/мл)		
		+ 25 °С	-20 °С	+ 65 °С
Rostov-1	<i>V. cholerae</i> El Tor 19706	3,2×10 ⁷	3,4×10 ⁷	0
Rostov-6	<i>V. cholerae</i> El Tor 19546	7,1×10 ⁸	6,9×10 ⁸	0
Rostov-7	<i>V. cholerae</i> El Tor 18546	4,9×10 ⁷	3×10 ⁷	0
Rostov-13	<i>V. cholerae</i> El Tor 13169	6,1×10 ⁷	6,3×10 ⁷	0
Rostov-M3	<i>V. cholerae</i> El Tor 20554	7,2×10 ⁸	6,8×10 ⁸	0
ФБ1	<i>V. cholerae</i> O139 18772	5,1×10 ⁸	4,9×10 ⁸	0

Результаты экспериментов, направленных на изучение влияния хлороформа на холерные бактериофаги, показали, что обработка фаголизатов хлороформом в течение 24 часов не вызывала снижения титра ни у одного из исследуемых фагов. Это свидетельствует о высокой устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформа и подтверждает возможность его использования для очистки фаголизатов от бактериальных клеток. Такая обработка позволяет эффективно отделить фаги от остаточных компонентов бактериальной культуры, что является важным этапом в процессе производства фаговых препаратов (Таблица 5).

Таблица 5 - Воздействие хлороформа на холерные бактериофаги (по Грациа)

Наименование бактериофага	Индикаторный штамм	Титр фага (БОЕ/мл)	
		Хлороформ	Бульон (Контроль)
Rostov-1	<i>V. cholerae</i> El Tor 19706	3×10^7	$3,2 \times 10^7$
Rostov-6	<i>V. cholerae</i> El Tor 19546	$6,9 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$
Rostov-7	<i>V. cholerae</i> El Tor 18546	5×10^7	$4,9 \times 10^7$
Rostov-13	<i>V. cholerae</i> El Tor: 13169	6×10^7	$6,1 \times 10^7$
Rostov-M3	<i>V. cholerae</i> El Tor 20554	$7,4 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$
ФБ1	<i>V. cholerae</i> O139 18772	$3,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$

Данные холерные бактериофаги хранились в форме фаголизатов, предварительно обработанных хлороформом, на протяжении 12 месяцев при температуре 4 – 8°C (в условиях холодильника). Для оценки их активности и стабильности титр фагов регулярно определяли с использованием метода Грациа. Результаты показали, что длительное хранение маточных фагов в таких условиях не приводит к значительному снижению их литической активности (Таблица 6).

Таблица 6 – Устойчивость холерных бактериофагов при хранении (по Грациа)

Название бактериофага	Титр (БОЕ/мл) исходный	Титр (БОЕ/мл) через 6 мес.	Титр (БОЕ/мл) через 12 мес.
Rostov-1	$3,2 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
Rostov-6	$7,1 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$
Rostov-7	$4,9 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
Rostov-13	$6,1 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
Rostov-M3	$7,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
ФБ1	$5,1 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$

Это свидетельствует о высокой стабильности бактериофагов при хранении в охлажденном состоянии, что является важным фактором для их практического применения. Также полученные данные подтверждают возможность использования хлороформа для обработки фаголизатов с целью их очистки и последующего длительного хранения без потери активности.

На следующем этапе исследования для определения морфологических характеристик холерных бактериофагов была применена трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Результаты показали, что все отобранные фаги имеют головчатую структуру, однако относятся к разным морфологическим группам и семействам, что подробно отражено в таблице 7. Эти данные подтверждаются анализом нуклеотидных последовательностей, который позволил классифицировать исследуемые холерные бактериофаги как ДНК-содержащие хвостатые фаги. Полученные данные свидетельствуют о значительном разнообразии морфологических и генетических характеристик бактериофагов, поражающих *V. cholerae*. Эти результаты важны для изучения их биологических свойств и особенностей взаимодействия с бактериями-хозяевами.

Таблица 7 – Морфология холерных бактериофагов

Название бактериофага	Размер и строение головки	Размер и строение хвоста	Морфотип [14]	Классификация [224-226]
Rostov-1	44×51,5 нм (многогранная головка)	12,5 нм (короткий несократимый хвост)	С подовирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. <i>Autographiviridae</i>
Rostov-6	45,3×51 нм (многогранная головка)	11 нм (короткий несократимый хвост)	С подовирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Род <i>Enhodamvirus</i>
Rostov-7	45,3×51 нм (многогранная головка)	102,3 нм (длинный сократимый хвост)	А мноввирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. неустановлено
Rostov-13	48,26×47,15 нм (многогранная головка)	13, 78 нм (короткий несократимый хвост)	С подовирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. <i>Autographiviridae</i>
Rostov M3	45,1×53,3 нм (многогранная головка)	11,3 нм (короткий сократимый хвост)	А мноввирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. неустановлено
ФБ1	45×51,5 нм (многогранная головка)	11,7 нм (длинный сократимый хвост)	V мноввирусы	Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. неустановлено

Бактериофаги Rostov-1, Rostov-6 и Rostov-13, активные против холерного вибриона, классифицируются как представители III морфогруппы (по классификации

Тихоненко А.С., 1968) [109] и принадлежат к семейству *Podoviridae* (Ackerman Н.В., 1987) [14], что подтверждается их морфологическими характеристиками (Рисунок 4). Фаги Rostov-7, Rostov-M3 и ФБ1 входят в V морфогруппу согласно классификации [109] и принадлежат к семейству *Myoviridae* [14], что также подтверждается их морфологическими особенностями (Рисунок 4).

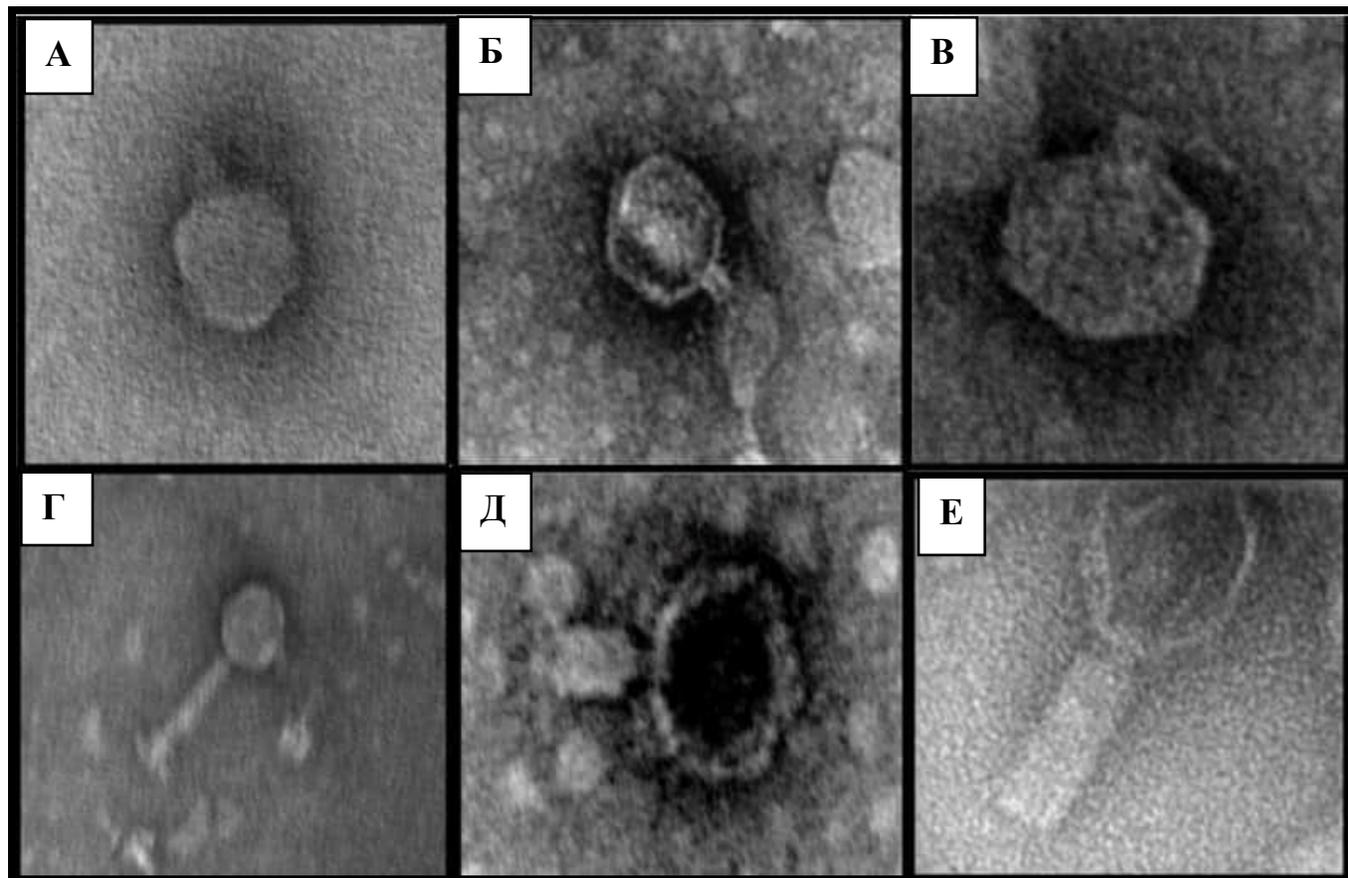


Рисунок 4 – Холерные бактериофаги (просвечивающий электронный микроскоп Jeol JEM 1011 «JEOL Ltd», Япония) (Увеличение: А – 150 000, Б – 150 000, В – 200 000, Г – 150 000, Д – 150 000, Е – 200 000)

Примечание: А – Rostov-1, Б – Rostov-6, В – Rostov-13, Г – Rostov-7, Д – Rostov-M3, Е – ФБ1

Была проведена также визуальная оценка морфологии колоний бактериофагов на газоне индикаторных культур. Так, бактериофаг Rostov-1 образует колонии двух типов: мелкие, диаметром 1,0-1,5 мм и крупные 0,3-0,6 мм на газоне индикаторной культуры *V. cholerae* O1 19706 (Рисунок 5 А). При этом Rostov-7 на индикаторной культуре *V. cholerae* O1 El Tor 18546 образует прозрачные нк диаметром 0,2-0,5 мм

(Рисунок 5 В). В свою очередь, Rostov-6 активен в отношении *V. cholerae* биоваров classical и El Tor, образуя прозрачные нк диаметром 0,3-0,4 мм на газоне индикаторной культуры *V. cholerae* O1 19546 (Рисунок 5 Б). У фага Rostov-M3 на индикаторной культуре *V. cholerae* O1 20554 зарегистрированы прозрачные нк круглой формы диаметром 0,1-0,2 мм (Рисунок 5 Д). На чашке Петри индикаторной культуры *V. cholerae* O139 18772 бактериофаг ФБ1 формировал точечные прозрачные нк круглой формы диаметром 0,3-0,7 мм (Рисунок 5 Е). Для Rostov-13 характерно образование на индикаторной культуре *V. cholerae* O1 13169 прозрачных нк двух типов (крупные и мелкие) размером 0,2-0,6 мм (Рисунок 5 Г).

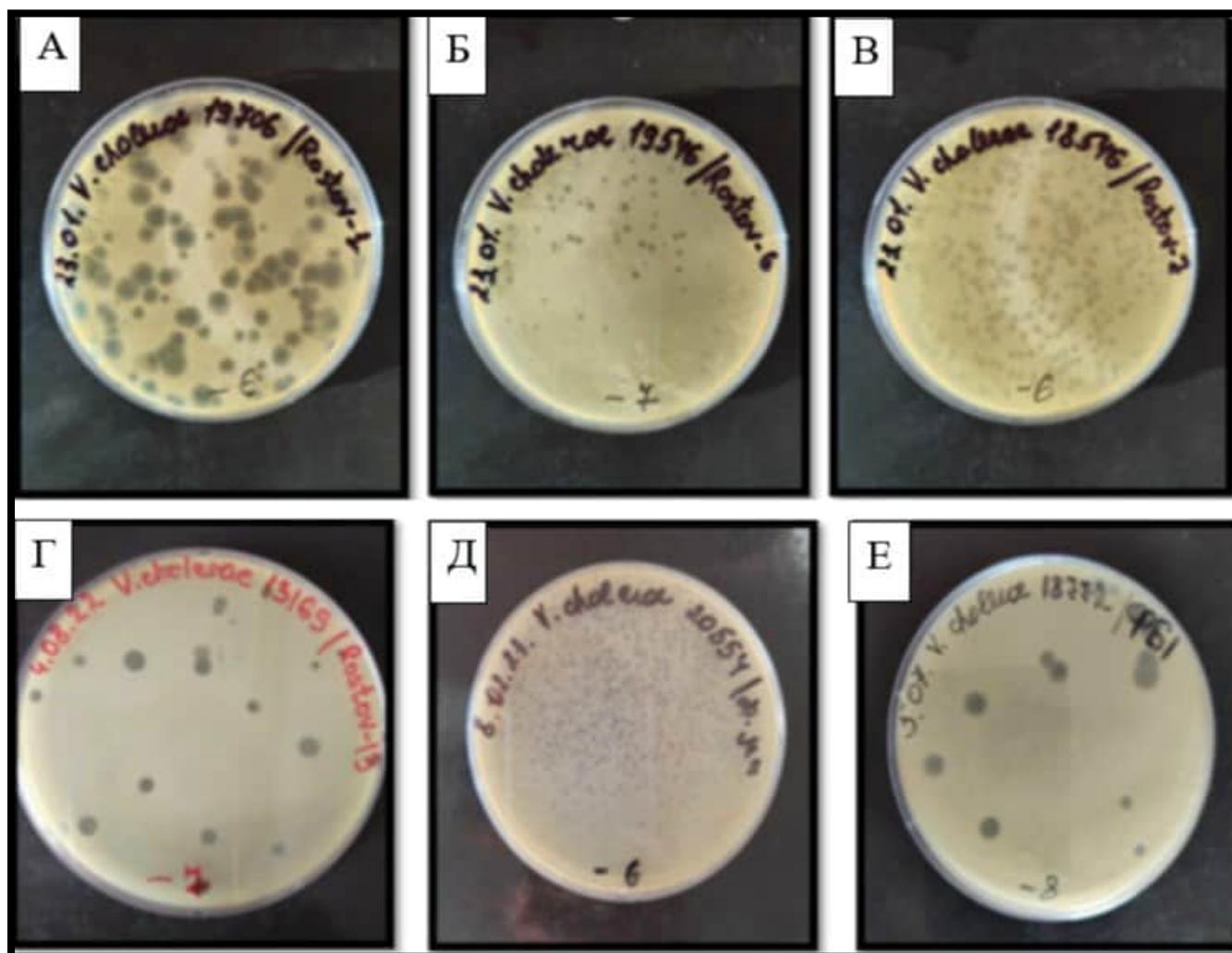


Рисунок 5 – Холерные бактериофаги (Негативные колонии на индикаторных штаммах)
Примечание: А – Rostov-1, Б – Rostov-6, В – Rostov-7, Г – Rostov-13, Д – Rostov-M3, Е – ФБ1

На основании проведенных исследований литической активности холерных бактериофагов, анализа их морфологических характеристик, прозрачности формируемых негативных колоний и продуктивности на штаммах-хозяевах *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, все изученные фаги (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) были признаны перспективными кандидатами для разработки профилактического препарата.

Следующий этап работы включал секвенирование и биоинформационный анализ вышеперечисленных фагов с целью определения их вирулентности, так как для фагопрофилактики могут быть использованы исключительно вирулентные (литические) бактериофаги.

2.2. Отбор перспективных штаммов холерных бактериофагов с учетом их генетических свойств

Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей фагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1 после их биологической характеристики выявил наличие интеграз в геномах *V. phage* Rostov-6 и Rostov-7, что исключает возможность их применения в лечебно-профилактических целях. Остальные исследованные фаги были идентифицированы как головчатые ДНК-содержащие хвостатые бактериофаги вирулентного типа, что делает их перспективными кандидатами для включения в состав противохолерных профилактических средств.

Геном бактериофага Rostov M3 состоит из 46669 пар нуклеотидов (п.н.) с содержанием G+C 45,6%. Выявлено 50 открытых рамок считывания (ORF). В геноме обнаружены ORF, кодирующие генетические детерминанты метаболизма нуклеотидов, репликации и репарации ДНК: белки хвостовых структур и сборки капсида, а также литические ферменты, такие как предполагаемый белок хвостового отростка/лизоцима (Genbank: MN379461.1:6474-7838). После анализа данных, предоставленных системой BLASTN, обнаружены три бактериофага (*Vibrio phage* vB_VchM-138, *Vibrio phage* 24 и *Vibrio phage* CP-T1), гомологичные Rostov M3,

которые тоже являются миовирусами (Рисунок 6).

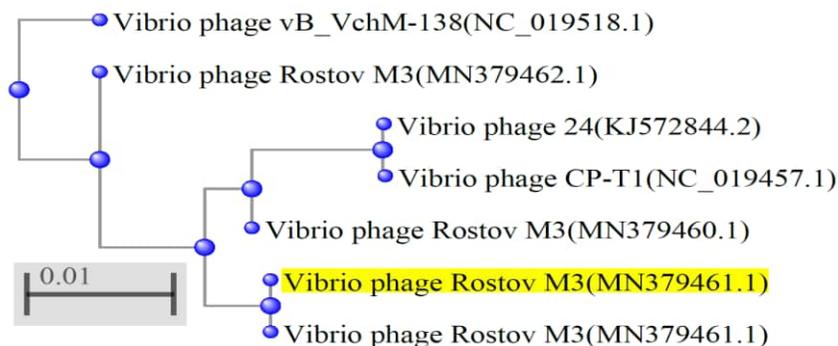


Рисунок 6 – Дендрограмма, построенная при помощи BLAST для Rostov-M3

Два бактериофага, *Vibrio phage vB_VchM-138* и *Vibrio phage 24*, демонстрируют высокую степень покрытия генома — 91% и 93% соответственно, а также идентичность с фагом Rostov-M3 на уровне 99,08% и 98,31%. Согласно данным научных публикаций, указанные бактериофаги обладают вирулентными свойствами и специфичны в отношении *V. cholerae* серогруппы O1 биовара classical. Эти фаги нашли применение в качестве диагностических маркеров, а также представляют значительный интерес для разработки новых подходов к лечению и профилактике холерной инфекции.

Третий фаг, *Vibrio phage CP-T1*, имеет степень покрытия генома 93% и идентичность с фагом Rostov-M3 на уровне 98,31%. В отличие от первых двух, этот фаг является умеренным и способен размножаться на двух биоварах *V. cholerae* O1 — classical и El Tor [139]. Это расширяет его потенциальное применение, хотя умеренные фаги требуют более осторожного подхода из-за их способности интегрироваться в геном бактерии-хозяина. Важно отметить, что в геноме бактериофага Rostov-M3 не обнаружены генетические детерминанты, связанные с факторами резистентности, токсинами или интегразами. Это делает его безопасным кандидатом для использования в медицинских целях, так как отсутствие таких генов снижает риск нежелательных побочных эффектов, таких как горизонтальный перенос генов устойчивости или токсигенности.

Бактериофаг Rostov-13 обладает линейной двуцепочечной ДНК размером 36

326 пар нуклеотидов с GC-составом 42%. Геномный анализ выявил 44 потенциальных гена (ORF), половина из которых была успешно аннотирована. Среди идентифицированных последовательностей обнаружены гены, кодирующие: ключевые литические ферменты (эндолизины и трансгликозилазу, разрушающую пептидогликан); ферменты метаболизма нуклеотидов и репарации ДНК; структурные компоненты вирусной частицы (белки капсида и хвостовых структур); ферменты репликации (ДНК-полимеразу, хеликазу/праймазу, ДНК-лигазу, нуклеазы); терминальный комплекс (большая gp19 и малая gp18 субъединицы).

Примечательно, что геном фага содержит ген РНК-полимеразы Т7-типа, что соответствует характеристикам семейства *Autographiviridae*. Следует отметить, что до 2019 года данная группа классифицировалась ICTV как подсемейство в составе *Podoviridae* (официальная таксономическая история доступна на портале ICTV). (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202008192).

Анализ BLASTN показал, что ближайшими гомологами нуклеотидной последовательности для фага Rostov-13 являются *Vibrio* phage N4 и *Vibrio* phage Rostov-1 со степенью покрытия 99% и 95% и идентичностью 99,53% и 99,93% соответственно (Рисунок 7).

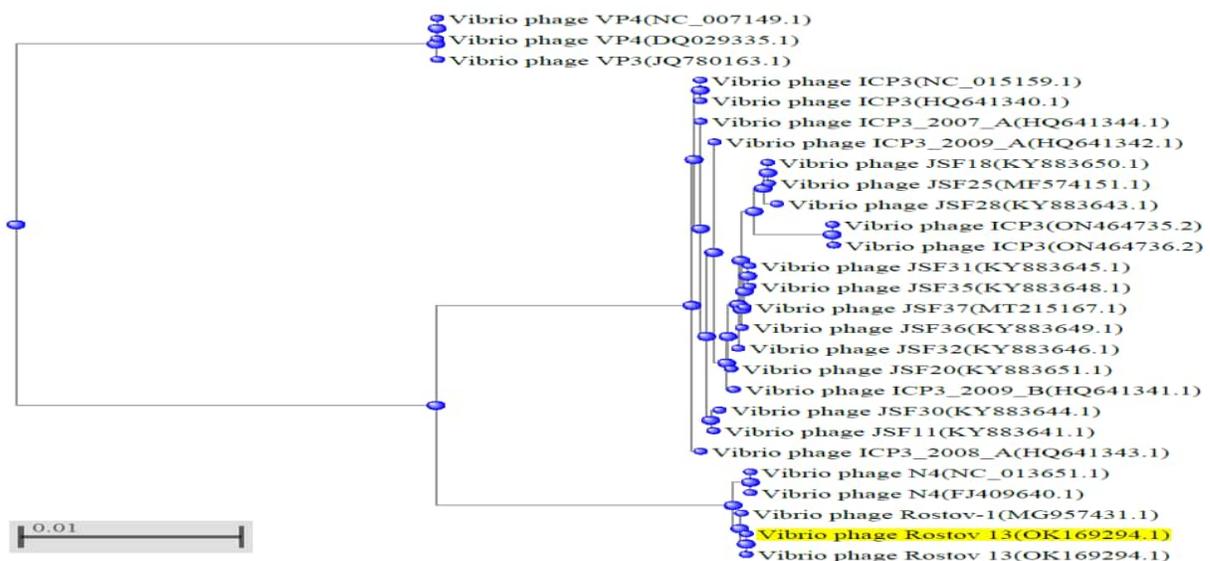


Рисунок 7 – Дендрограмма, построенная при помощи попарного выравнивания BLAST для Rostov-13

Результаты биоинформационного анализа с применением программ PhageAnalyzer и BLASTX свидетельствуют о генетической безопасности исследуемых бактериофагов. В их геномах не обнаружено: детерминант антибиотикорезистентности; интегразных генов, способных обеспечить интеграцию в бактериальный геном и токсикогенных последовательностей. Полученные данные позволяют сделать следующие выводы, что данные фаги не представляют риска горизонтального переноса генов устойчивости, исключена возможность лизогенной конверсии, а также отсутствует потенциальная токсичность для эукариотических клеток. Такие характеристики делают данные бактериофаги перспективными кандидатами для разработки терапевтических препаратов, соответствующих требованиям биобезопасности.

Анализ данных нуклеотидных последовательностей бактериофага ФБ1 говорит о его принадлежности к ДНК-содержащим бактериофагам класса *Caudoviricetes* семейства *Autographiviridae*. Фаг ФБ1 представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 37315 п.н. Обнаружено 49 ORF, кодирующие белки хвостовых структур и сборки капсида, эндолизин, пептидогликан-трансгликозилаза, а также множество гипотетических белков. В геноме фага не выявлены гены интеграз, резистентности к антибиотикам и детерминанты вирулентности.

Исследованные бактериофаги демонстрируют высокий уровень генетического сходства (83–99%) с геномами фагов, представленными в международной базе данных GenBank (NCBI). Это свидетельствует о их близком родстве с уже известными и изученными представителями фагового сообщества. Часть аннотированных последовательностей этих фагов была зарегистрирована в GenBank (NCBI), что отражено в таблице 8. Это позволяет не только подтвердить их идентификацию, но и установить возможные эволюционные связи с другими фагами, а также определить их таксономическую принадлежность.

Таблица 8 – Зарегистрированные геномы исследованных бактериофагов

Название бактериофага	Таксономическая принадлежность [225]	Номер доступа в Genbank (NCBI)
Rostov-1	Класс <i>Caudoviricetes</i> , Сем. <i>Autographiviridae</i>	MG957431
Rostov-6	Класс <i>Caudoviricetes</i> , Под <i>Enhodamvirus</i>	MH105773
Rostov-7	Класс <i>Caudoviricetes</i>	MK575466.1
Rostov-M3	Класс <i>Caudoviricetes</i>	MN379460-MN379463
Rostov-13	Класс <i>Caudoviricetes</i> , Сем. <i>Autographiviridae</i>	OK169294-OK169295

Из вышеизложенного следует, что Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 являются вирулентными (головчатыми, хвостатыми, ДНК-содержащими) фагами. В структуре геномов бактериофагов Rostov-6 и Rostov-7 были обнаружены гены интегразы, что указывает на их принадлежность к умеренным фагам, способным интегрироваться в геном бактерии-хозяина. Это делает их использование в профилактических или лечебных препаратах нецелесообразным, так как умеренные фаги могут передавать генетический материал между бактериями, что потенциально способствует распространению генов устойчивости или вирулентности. Однако, несмотря на ограничения в медицинском применении, Rostov-6 и Rostov-7 могут быть полезны для мониторинга холерных вибрионов в окружающей среде, например, в водоемах или почве, где они могут служить индикаторами наличия патогенных штаммов. Кроме того, они могут быть использованы в экспериментальных исследованиях для изучения механизмов взаимодействия фагов с бактериями, их роли в горизонтальном переносе генов и эволюции патогенов.

Учитывая, что бактериофаг Rostov-1 демонстрирует более низкую литическую активность в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor по сравнению с фагом Rostov-13, в дальнейших исследованиях акцент был сделан на изучение других перспективных фагов: Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1. Эти фаги были отобраны благодаря их высокой литической активности, широкому спектру действия и

стабильности, что делает их потенциально пригодными для использования в профилактике холеры.

2.3. Оценка фармакокинетики смеси холерных бактериофагов (Rostov-M3 + Rostov-13 + ФБ1) на модели *in vivo*

Для эксперимента отобрали 8 кроликов массой 2,5 кг из питомника, которых разделили на 4 группы по 2 особи в каждой. Животным опытных групп перорально вводили смесь холерных бактериофагов (Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1 в равных пропорциях) в дозе 1 мл/сутки с концентрацией $n \times 10^7 - n \times 10^8$ БОЕ/мл согласно схеме, представленной в таблице 9. Контрольным группам вместо фаговой смеси давали 0,9% раствор натрия хлорида (физиологический раствор) в тех же объемах и по аналогичной схеме введения.

Таблица 9 – Схема введения смеси холерных бактериофагов

Группы кроликов	Фаговая композиция (в объеме 1 мл/1 раз сут) и длительность введения препаратов			
	однократно	3 дня	5 дней	7 дней
1	+	-	-	-
2	-	+	-	-
3	-	-	+	-
4	-	-	-	+

Примечания: «+» – введение *per os* фаговой композиции; «-» – отсутствие введения *per os*

По завершении курса введения фаговой смеси проводили анализ биологических образцов кроликов (кровь, фекалии, моча) для выявления фаговых частиц. Кал и моча – однократно в сутки, кровь – двукратно в первые сутки, затем ежедневно по одному разу до окончания эксперимента. Все образцы исследовали методом агаровых слоев для определения титра фаговых частиц.

Пероральное введение бактериофагов представляет наиболее физиологически обоснованный метод их доставки при холере, поскольку соответствует естественному пути проникновения возбудителя через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). Этот

способ обеспечивает целенаправленное действие фагов в первичном очаге инфекции, одновременно позволяя оценивать их активность по выделению с фекалиями. Эффективность такого применения характеризуется выраженной дозозависимостью: способность фагов преодолевать кишечный барьер и адсорбироваться на слизистой ЖКТ прямо коррелирует с введенной дозой. Критическое значение при этом имеют кинетические параметры транзита через различные отделы пищеварительной системы, определяющие продолжительность профилактического воздействия.

Учитывая это, на начальных этапах испытаний *in vivo* крайне важно тщательно подобрать оптимальные дозы и кратность приема фаговых препаратов. Это включает определение времени персистенции фагов в организме при однократном и ежедневном введении, а также оценку их способности сохранять активность в условиях ЖКТ. Такие исследования помогут установить, насколько эффективно фаги могут колонизировать кишечник, взаимодействовать с патогенами и предотвращать развитие инфекции.

Первые исследования фармакокинетики смеси холерных бактериофагов, проведенные на модели взрослых кроликов, показали, что смесь, состоящая из фагов Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1 (в соотношении 1:1:1), при поступлении в ЖКТ не выводится сразу с экскрементами, а сохраняется в организме в течение определенного времени, зависящего от кратности применения. При однократном пероральном введении 1 мл фагового коктейля (1 группа) фаговые частицы обнаруживались в крови и испражнениях кроликов на протяжении 3 суток. Это указывает на потенциальную эффективность фаговой смеси для краткосрочной профилактики холеры, что особенно важно в условиях возможного контакта с возбудителем.

У второй группы животных, которым вводили раз в день фаговый коктейль (1 мл) в течение 3 суток регистрировали выделение фаговых частиц из крови и испражнений кролика до 6 суток. У кроликов, получавших препарат раз в день в количестве 1 мл в течение 5 суток (3 группа) и 7 суток (4 группа), фаговые частицы регистрировались в моче до 8 суток. Следует отметить, что наиболее интенсивно

фаговые частицы выделялись именно из испражнений кроликов, особенно из мочи.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что начальный объем коктейля (1 мл) относительно быстро выводится из организма животного, что является недопустимым фактором при профилактике заболевания. Учитывая тот факт, что время персистирования бактериофагов в макроорганизме напрямую зависело от введенного количества препарата, было принято решение об увеличении объема его однократного введения экспериментальным животным (взрослые кролики) до 3 мл ($n \times 10^7$ – $n \times 10^8$ БОЕ/мл).

Для эффективного использования бактериофагов в терапии или профилактике необходимо получать высокоочищенные фаголизаты с высоким титром вирусных частиц. В данном исследовании была поставлена следующая задача оптимизировать метод получения очищенных препаратов фагов Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1, а также увеличить их концентрацию.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Несмотря на успешное применение бактериофагов для терапии и профилактики различных кишечных инфекций [4; 53], следует констатировать отсутствие коммерчески доступных фаговых препаратов против холеры. Это особенно тревожно в контексте современной эпидемиологической ситуации. Данные обстоятельства делают особенно актуальным разработку специализированных фаговых препаратов против холеры и создание инновационных методических подходов к их производству.

Разработка эффективных бактериофаговых препаратов против холеры представляет собой сложную технологическую задачу, обусловленную особой патогенностью *V. cholerae*. Ключевыми производственными требованиями являются: (1) соблюдение строгих норм биобезопасности; (2) определение биологических и генетических характеристик маточных бактериофагов; (3) достижение высоких титров фаговых частиц за счет тщательного подбора штаммов-продуцентов и оптимизации условий культивирования; (4) обеспечение исключительной степени очистки от бактериальных токсинов и компонентов питательной среды; (5) многоступенчатый контроль качества и стерильности.

Производственный цикл требует одновременного обеспечения: максимального накопления биомассы бактерий-хозяев на этапе предкультивирования, высокой продуктивности фагового лизиса и максимального удаления токсичных метаболитов. Каждый этап - от подбора штаммов до финальной очистки - требует тщательной оптимизации. Только комплексный подход позволяет создавать эффективные и безопасные препараты, соответствующие фармакопейным требованиям [30].

3.1. Метод получения биомассы холерных вибрионов с наибольшим выходом вирусных частиц

Принимая во внимание работы коллег Московского научно-исследовательского

института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского по разработке специализированного продукта «Фудфаг» [53], активного в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий родов *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, и проводя исследования по получению холерных фаголизатов, мы подобрали и оптимизировали условия для культивирования холерных бактериофагов с высоким титром вирусных частиц в физиологическом растворе.

С целью получения фаговой биомассы с наибольшим титром холерных вирусных частиц и низким содержанием токсинов был разработан методический подход, состоящий из нескольких этапов:

1. **Подготовка и розлив питательной среды.** На начальном этапе проводилась подготовка питательных сред, необходимых для культивирования индикаторных штаммов бактерий и бактериофагов. Среда разливалась в стерильные емкости с соблюдением асептических условий.
2. **Культивирование индикаторных штаммов.** Индикаторные штаммы *V. cholerae* высевались в бульон Мартена и инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 20 часов для достижения оптимальной плотности бактериальной культуры.
3. **Пересев на плотную питательную среду.** После инкубации в жидкой среде индикаторные штаммы пересевались на агаровые чашки Петри с 1,5% агаром Мартена (рН 7,6±0,2) и инкубировались при 37°C для получения изолированных колоний.
4. **Отбор колоний и подготовка бактериальной суспензии.** Колонии бактерий 2-го пассажа отбирались микробиологической петлей и засеивались в бульон Мартена (4,5 мл на пробирку). Культуры инкубировались в термостате при 37°C в течение 18 часов до достижения концентрации 10^8 – 10^9 колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЕ/мл).
5. **Формирование бактериального газона.** Для формирования бактериального

газона использовали чашки Петри с 1,5% агаром Мартена (толщина слоя 10 мм). Растопленный 0,7% агар Мартена, охлажденный до 45°C, смешивали с 0,5 мл 18-часовой культуры индикаторного штамма и равномерно распределяли по поверхности основного агара, формируя верхний посевной слой. После 20-минутного застывания при комнатной температуре чашки инкубировали для получения плотного сплошного бактериального газона.

6. **Нанесение бактериофага.** На сформированный бактериальный газон наносили маточный штамм бактериофага с титром 10^7 – 10^8 БОЕ/мл. Фаг равномерно распределяли по поверхности газона покачивающими движениями и инкубировали в термостате при 37°C в течение 18 часов для достижения лизиса бактерий.
7. **Сбор и очистка фаголизата.** Для выделения бактериофагов зоны лизиса вместе с верхним слоем агара аккуратно срезали скальпелем и переносили в колбу с 500 мл стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl, pH 7,0-7,2). Далее к полученной суспензии добавляли хлороформ в объеме 1/10 от общего количества и инкубировали при постоянном встряхивании в течение 30 минут для полного лизиса оставшихся бактериальных клеток. После этого проводили центрифугирование при 5000-6000 об/мин в течение 30 минут, по окончании которого надосадочную жидкость, содержащую очищенные фаговые частицы, аккуратно собирали для последующих исследований.
8. **Очистка и контроль качества.** Фаголизаты подвергали поэтапной очистке, включающей: последовательную фильтрацию через мембранные фильтры с порами 0,45 мкм (удаление клеточного дебриса) и 0,22 мкм (стерилизация); обязательный контроль специфической стерильности по утвержденной методике [47].

Данный метод позволил увеличить количество фаговых частиц в очищенных фаголизатах бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 (Таблица 10), которые являются перспективными кандидатами для создания профилактического препарата.

Таблица 10 – Урожайность холерных бактериофагов на основе 0,9% раствора NaCl

Выход бактериофага БОЕ/мл (бульон Мартена)	Штамм для размножения бактериофага (индикаторный штамм)	Выход бактериофага, БОЕ/мл (0,9% раствора NaCl)
Rostov-13 ($6,1 \times 10^7$)	<i>V. cholerae</i> El Tor KM 199 (P-13169)	$7,4 \times 10^8$
Rostov-M3 ($7,2 \times 10^8$)	<i>V. cholerae</i> El Tor: KM 2157 (20554)	$8,2 \times 10^9$
ФБ1 ($5,1 \times 10^8$)	<i>V. cholerae</i> O139 18772	$5,1 \times 10^9$

Традиционные этапы размножения маточных холерных бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) в питательной среде, а затем в физиологическом растворе с последующей фильтрацией не обеспечивает полного удаления продуктов жизнедеятельности бактерий. В частности, в препарате могут оставаться липополисахариды (ЛПС) – эндотоксины, входящие в состав мембран холерных вибрионов [73]. Их присутствие способно провоцировать кишечные расстройства и аллергические реакции, что ограничивает профилактическое применение фаговых препаратов. Поэтому следующим этапом разработки послужило определение наличия ЛПС в очищенных формах, полученных фаголизатов.

3.2. Определение наличия ЛПС в препаратах холерных бактериофагов

Для количественного определения ЛПС в фаговых препаратах (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1) применяли ИФА-метод с прямым пероксидазным конъюгатом, разработанным специалистами лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора [2].

Препараты бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 были исследованы на наличие ЛПС методом ИФА до и после очистки на хроматографической колонке EndoTrap® HD (Hyglos GmbH, Германия) (Rostov-M3к, Rostov-13к, ФБ1к). В опыт их брали в двух разведениях – 1:2 и 1:4. Моноклональный антилипополисахаридный пероксидазный конъюгат разводили до 1:200. В качестве положительного контроля использовали инаktivированные микробные клетки двух штаммов *V. cholerae* O1 – 18963 и 18512, а в качестве отрицательного контроля – буфер, в котором разводили пробы. Установлено наличие ЛПС в препарате Rostov-M3 в разведении 1:2. После

очистки препарата на колонке ЛПС в его составе отсутствовал (Таблица 11).

Таблица 11 – Наличие ЛПС в препаратах холерных бактериофагов

Препарат	Разведение	Реакция в ИФА	Оптическая плотность
Rostov-M3	1:2	+	0.450±0.02
	1:4	-	0.212±0.01
ФБ1	1:2	-	0.069±0.01
	1:4	-	0.073±0.03
Rostov-13	1:2	-	0.109±0.01
	1:4	-	0.069±0.03
Rostov-M3K	1:2	-	0.225±0.02
	1:4	-	0.110±0.01
ФБ1К	1:2	-	0.037±0.02
	1:4	-	0.043±0.02
Rostov-13K	1:2	-	0.035±0.03
	1:4	-	0.056±0.04
K ⁺ – бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18963 (ctx ⁺)	1:10	+	1.081±0.01
K ⁺ – бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18512 (ctx ⁺)	1:10	+	1.140±0.01
K ⁻ – буфер ФСБ	–		0.199±0.02

Примечание: в табл. 11 представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение $P < 0,05$; K⁺ (положительный контроль); K⁻ (отрицательный контроль); ОП – оптическая плотность

В других двух препаратах Rostov-13K и ФБ1К наличие ЛПС также не регистрировалось, что свидетельствует о чистоте всех полученных препаратов бактериофагов.

Проведенные исследования показали, что очищенные фаголизаты Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 обладают комплексом ценных свойств для профилактического применения: широким спектром литической активности (43-97%) в отношении *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, высокой урожайностью (до 10⁹ БОЕ/мл), устойчивостью к температурным воздействиям и хлороформу, отсутствием токсинов и нежелательных генов в фаговой ДНК, а также сохранением вирулентных характеристик.

На следующей стадии исследования мы провели комплексную оценку безопасности

и профилактической активности разработанного фагового коктейля (Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1 в равных пропорциях 1:1:1) на экспериментальных моделях *in vivo*. Данный этап имеет принципиальное значение для всей работы, так как только доказанная безопасность и высокая профилактическая эффективность могут служить основанием для создания практического средства профилактики холеры, что является целью нашего исследования.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФАГОВОГО КОКТЕЙЛЯ НА МОДЕЛИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ И ВЗРОСЛЫХ КРОЛИКОВ

Тесты на острую и хроническую (подострую) токсичность используются как одни из важных показателей для контроля качества безопасности препаратов, получаемых из субстанций биологического происхождения [98]. Основной целью выявления острой и хронической токсичности является определение уровня токсичности экспериментального препарата, которая превышает установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по неожиданным явлениям интоксикации животных. Острая токсичность экспериментального профилактического препарата может возникнуть за счет появления продуктов разложения или нежелательных примесей в исследуемом коктейле.

Оценку безопасности разработанного экспериментального профилактического коктейля проводили с использованием лабораторных животных (кролики и белые мыши) в опытах изучения острой и подострой (хронической) токсичности в соответствии с нормативными документами [30; 97] и применением стандартных методов [98].

В процессе работы животные содержались в специализированных помещениях, оснащенных всем необходимым современным оборудованием. Все этапы проведенных исследований соответствовали международным этическим нормам обращения с лабораторными животными, требованиями законодательства РФ и внутренними регламентами учреждения.

4.1. Оценка острой и хронической (подострой) токсичности

В работе по изучению острой токсичности использовали 60 аутбредных белых мышей (18-20 г), разделенных на 6 групп по 10 особей. Три опытные группы получали фаговый коктейль (Rostov-M3 +Rostov-13+ФБ1 в соотношении 1:1:1, концентрация

$n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл) различными способами: внутривбрюшинно (1,0 мл), внутримышечно (0,5 мл) и перорально (0,5 мл). Три контрольные группы получали 0,9% физиологический раствор в аналогичных объемах и теми же способами введения.

Параллельно провели исследование острой токсичности на 4 кроликах массой 2-2,5 кг. Животные опытной группы получали перорально максимальную разовую дозу фагового коктейля (10 мл), контрольная группа - 0,9% физиологический раствор в том же объеме. Наблюдение за всеми животными (мышами и кроликами) продолжали в течение 14 суток, ежедневно оценивая их состояние и поведенческие реакции. Все экспериментальные процедуры, включая схемы введения и дозировки, подробно представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Схема экспериментов по изучению острой токсичности коктейля холерных бактериофагов на лабораторных животных (кроликах и мышах)

Вид лабораторных животных	Количество в опыте/ в контроле, шт	Способ введения препарата	Доза препарата, мл/животное
Мыши белые	10/10	в/бр	1,0
	10/10	в/м	0,5
	10/10	per os	1,0
Кролики	4/2	per os	10,0

Примечания: в/бр – внутривбрюшинное введение, в/м – внутримышечное введение, per os – пероральное введение

Результаты исследования острой токсичности на двух моделях лабораторных животных (белые мыши и взрослые кролики) продемонстрировали полное отсутствие токсического действия бактериофагов при всех испытанных способах введения максимальной разовой дозы. В ходе 14-дневного наблюдения у животных не было зарегистрировано каких-либо отклонений в клиническом состоянии, поведении или физиологических показателях, что объективно подтверждает безопасность исследуемых фаговых препаратов.

В исследовании хронической токсичности использовали 40 белых мышей массой 20-24 г, разделенных на 4 группы по 10 животных. Две опытные группы

получали внутривенно по 0,5 мл фаговой смеси (Rostov-13+Rostov-M3+ФБ1 в концентрации $n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл) в течение 14 и 20 дней соответственно. Две контрольные группы получали аналогичные объемы 0,9% физиологического раствора по тем же схемам. В ходе эксперимента ежедневно проводили клинический осмотр животных с оценкой: общего состояния, наличия симптомов интоксикации, поведенческих реакций, контроль массы тела, мониторинг потребления корма и воды, оценку состояния шерстного покрова и двигательной активности.

На 15 и 21 сутки после введения препарата проводили макроскопическое и микроскопическое исследование органов мышей после эвтаназии хлороформом (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Органы мышей: А - головной мозг; Б - фрагменты кишечника; В - почка

Для проведения гистологического анализа отбирали образцы паренхиматозных органов (легкие, сердце, печень, селезенка, почки), фрагменты головного мозга и кишечника с брыжейкой. После извлечения образцы фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Далее проводили стандартную гистологическую обработку, включающую обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, заливку в парафин и приготовление полутонких срезов толщиной 0,5 мкм на ротационном микротоме по стандартной методике [113]. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопический анализ выполняли с использованием моторизованного микроскопа Leica DM 6000 (Leica Microsystems,

Германия) с применением лицензионного программного обеспечения Qwin (Leica, Кембридж, Великобритания) и Application Suite (Leica, Швейцария).

Длительное внутрижелудочное введение белым беспородным мышам 0,5 мл экспериментального профилактического коктейля (с титром $n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл) в течение 20 дней не вызвало общетоксического действия. На протяжении всего периода наблюдения все животные оставались живыми, их поведение было адекватным, а состояние шерстистого покрова соответствовало норме и не отличалось от контрольной группы, получавшей физиологический раствор (ФР) в течение того же срока.

Кроме того, продолжительное введение фагового коктейля не оказало негативного влияния на физическое состояние мышей. Животные в опытной группе набирали вес с той же скоростью, что и особи из контрольной группы, что свидетельствует об отсутствии отрицательного воздействия на их общее развитие и метаболизм.

Гистологическое исследование тканей внутренних органов (лёгких, сердца, печени, селезёнки, почек), образцов головного мозга и кишечника с брыжейкой, проведённое на 15-й и 21-й день эксперимента, показало отсутствие морфологических изменений патологического характера. Структура тканей всех исследуемых органов соответствовала норме, что свидетельствует об отсутствии токсического или повреждающего воздействия экспериментального фагового коктейля на организм животных (Рисунок 9-10) В частности, в печени не наблюдалось признаков жировой дистрофии или некроза, в почках отсутствовали изменения клубочков и канальцев, а в селезенке сохранялась нормальная архитектура лимфоидной ткани. В легких не было обнаружено воспалительных инфильтратов или фиброзных изменений, а в сердце — признаков дистрофии миокарда. В поджелудочной железе островки немногочисленные крупные, патологических изменений нет. Структура ткани селезенки соответствует норме, наблюдались мелкие кровоизлияния. В вилочковой железе структура ткани соответствует норме, полнокровие. Кишечник и брыжейка

демонстрировали сохранность слизистой оболочки, отсутствие воспалительных процессов и нарушений микроциркуляции. Гистологическая картина головного мозга также соответствовала норме, без признаков отека или дегенеративных изменений.

Необходимо отметить, что у единичных особей в тканях головного мозга и мозжечка присутствовал перипеллюлярный, периваскулярный отек, также подоболочечный энцефалолизис, периваскулярная пролиферация глии. В тонкой и толстой кишке диффузная слабо выраженная лимфоплазмочитарная инфильтрация, одиночные лимфоидные фолликулы в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки с гиперплазией, оттесняющие мышечную оболочку снаружи. В печени – в портальных трактах слабая лимфо-макрофагальная инфильтрация, не переходящая на пограничную пластинку, также некроз, лобулярное воспаление и лейкостаз в синусоидах печени. В легких наблюдалось резкое полнокровие и мелкие кровоизлияния в межальвеолярных перегородках, крайне скудная, преимущественно, перибронхиальная лимфоцитарная инфильтрация. В почках наблюдалась гиперемия, интерстициональное воспаление (Таблица 13).

Статистическая обработка результатов исследования не выявила значимых различий в частоте патологических изменений органов между животными опытных и контрольных групп. Кроме того, у животных опытных и контрольных групп выявлены аналогичные патологические изменения, свидетельствующие о том, что данные нарушения не являются следствием введения экспериментального профилактического коктейля. Нельзя исключить, что выявляемые изменения в организме лабораторных животных обусловлены большим объемом вводимой жидкости.

Таблица 13 –Патологические изменения органов мышей, взятых на 15 и 21 сутки эксперимента

Орган	Патологические процессы	Контрольные группы		Опытные группы	
		(15сутки) аб. (%) n=10	(21сутки) аб. (%) n=10	(15сутки) аб. (%) n=10	(21сутки) аб. (%) n=10
Головной мозг	подоболочечный энцефалолизис	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (20 %)
	продуктивное очаговое воспаление	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	-
	периваскулярная пролиферация глии	1 (10 %)	2 (20 %)	2 (20 %)	2 (20 %)
Тонкий и толстый кишечник	гиперсекреция слизи	2 (20 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (10 %)
	гиперплазия лимфатических фолликулов	1 (10 %)	-	1 (10 %)	-
Печень	некроз	1 (10 %)	-	1 (10 %)	-
	лобулярное воспаление	2 (20 %)	-	1 (10 %)	-
	портальное воспаление	1 (10 %)	2 (20 %)	2 (20 %)	2 (20 %)
	признаки регенерации	1 (10 %)	1 (10 %)	2 (20 %)	2 (20 %)
	лейкостазы синусоидов	1 (10 %)	1 (10 %)	-	2 (20 %)
Легкие	кровоизлияние	1 (10 %)	-	-	-
	перибронхиальное воспаление	1 (10 %)	1 (10 %)	-	2 (20 %)
	воспаление интерстициальное	2 (20 %)	3 (30 %)	2 (20 %)	2 (20 %)
Почки	интерстициальное воспаление	-	1 (10 %)	-	-

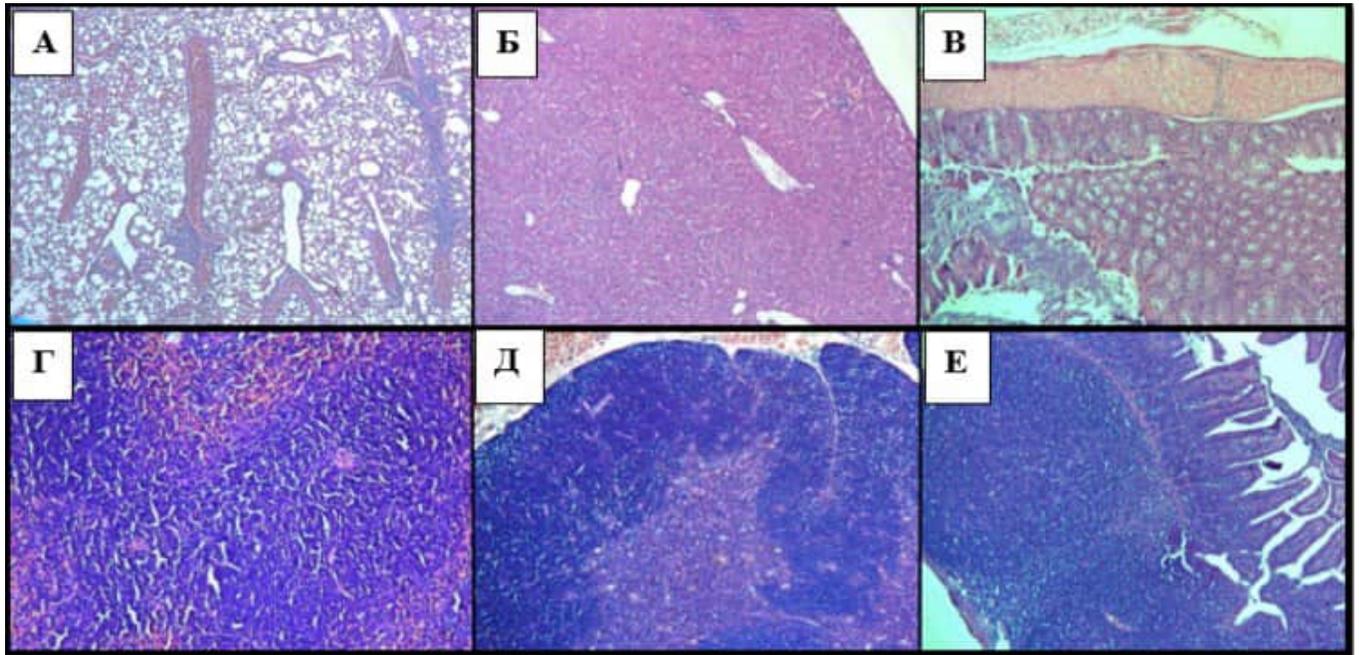


Рисунок 9 – Гистологические снимки органов опытных мышей (Моторизованный исследовательский микроскоп Leica DM 6000 «Leica Microsystems», Германия)
 (Увеличение: А - x10; Б - x10; В - x10; Г - x20; Д - x10; Е - x10)
 Примечание: А – Легкое; Б - Печень; В -Толстая кишка; Г - Селезенка; Д - Тимус; Е -Тонкая кишка

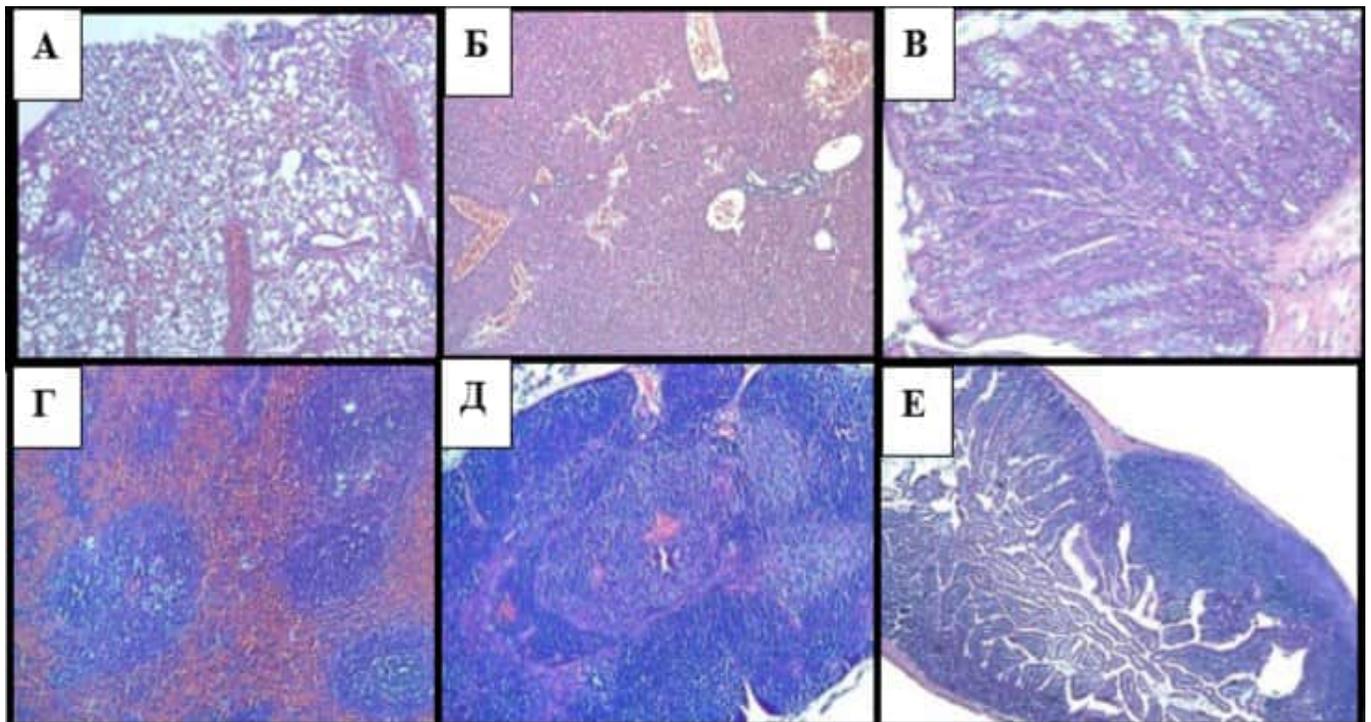


Рисунок 10 – Гистологические снимки органов контрольных мышей (Моторизованный исследовательский микроскоп Leica DM 6000 «Leica Microsystems», Германия)
 (Увеличение: А - x10; Б - x10; В - x10; Г - x20; Д - x10; Е - x10)
 Примечание: А – Легкое; Б - Печень; В -Толстая кишка; Г - Селезенка; Д - Тимус; Е -Тонкая кишка

Таким образом, результаты комплексного морфологического исследования (макро- и микроскопического) внутренних органов мышей после 20-дневного курса внутрижелудочного введения комбинации холерных бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) показали отсутствие патологических изменений в тканях головного мозга, дыхательной, пищеварительной, выделительной и лимфоидной систем. Полученные данные подтверждают, что компоненты, входящие в состав экспериментального профилактического коктейля, являются безопасными и не оказывают негативного влияния на организм животных. Это открывает перспективы для дальнейшего изучения их применения.

4.2. Оценка апоптогенного и цитотоксического влияния холерных бактериофагов на иммунокомпетентные клетки крови

Известно, что многие микроорганизмы способны вызывать гибель иммунокомпетентных клеток макроорганизма, являясь триггерами апоптоза или некроза в эукариотических клетках хозяина.

Апоптоз является одной из форм клеточной смерти, которая происходит под действием разнообразных внутренних и внешних факторов. Этот процесс играет важную роль в обеспечении нормального клеточного гомеостаза, подавлении роста опухолей и в развитии заболеваний, в том числе и инфекционных. Другой формой клеточной гибели является некроз. Различия между апоптозом и некрозом определяются разными механизмами реализации, что находит отражение в морфологии погибающих клеток. Клетки в состоянии апоптоза выглядят уплотненными, характеризуются «пузырением» мембраны, конденсацией хроматина и образованием окруженных мембранами фрагментов. Часто при апоптозе наблюдается фрагментация ДНК с образованием характерной «лесенки». В отличие от апоптотических, в некротических клетках отсутствуют признаки конденсации хроматина. При некрозе клетка сильно повреждается, что приводит к ее гибели. Еще одно важное отличие некроза от апоптоза заключается в том, что при некрозе

развивается воспалительная реакция.

Учитывая, что апоптоз и некроз клеток макроорганизма может быть вызван различными внутренними и внешними стимулами, изучение влияния холерных бактериофагов на эти процессы является важной задачей, решению которой посвящен данный раздел работы.

В эксперименте участвовали 6 взрослых кроликов массой 1,5 кг, разделенных на 3 группы по 2 особи. Опытным группам в течение 7 дней ежедневно вводили через желудочный зонд по 3 мл фаговой композиции (Rostov-M3+Rostov-13+ФБ1 в равном соотношении, концентрация $n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл). Контрольная группа получала 0,9% физиологический раствор в аналогичном объеме и по той же схеме. Для оценки клеточного статуса проводили забор крови из ушной вены в вакуумные пробирки с гепарином. Полученные образцы цельной крови окрашивали реагентами набора "Annexin V" (eBioscience, США) и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). В ходе исследования оценивали не менее 10 000 клеточных событий, определяя относительное количество жизнеспособных клеток, а также клеток в состоянии апоптоза и некроза.

Результаты исследования цитотоксического и апоптогенного действия профилактического фагового коктейля (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1) на клетки крови взрослых кроликов продемонстрировали отсутствие негативного влияния на форменные элементы при семидневном применении. Анализ показал сохранение нормального уровня жизнеспособности иммунокомпетентных клеток (93-97% для моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов), что статистически не отличалось от контрольных значений ($p > 0,05$, Таблица 14). Важно отметить, что препарат не вызывал увеличения количества апоптотических клеток по сравнению с контрольной группой и не проявлял цитотоксических свойств.

Таблица 14 – Изучение цитотоксичности и апоптогенной активности смеси на основе холерных бактериофагов в отношении иммунокомпетентных клеток крови взрослых кроликов

Показатели (%)	Коктейль бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1)			Контрольные значения		
	моноциты	лимфоциты	нейтрофилы	моноциты	лимфоциты	нейтрофилы
Жизнеспособные клетки	95±1,3	96±0,9	94±1,0	94±2,3	97±0,8	95±1,5
Некроз	2,3±0,9	1,9±0,8	2,0±0,79	2,7±0,8	1,1±0,7	2,3±0,7
Апоптоз	2,2±0,7	2,2±0,9	3,8±0,8	2,6±0,9	2,3±0,8	3,4±0,9

Аналогичная тенденция наблюдалась и после повторного семидневного курса введения смеси бактериофагов этой же группе кроликов. Эти данные свидетельствуют о том, что длительное применение фагового коктейля не вызывает повреждения клеток крови и не нарушает их функциональную активность. Это подтверждает безопасность препарата для иммунной системы и отсутствие негативного влияния на процессы клеточного обновления и апоптоза.

Таким образом, полученные результаты показали отсутствие негативного влияния холерных бактериофагов и их смеси на организм экспериментальных животных, что является необходимым условием применения их в качестве профилактических препаратов.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ФОРМИРОВАНИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К ХОЛЕРНЫМ ФАГАМ И ИХ СМЕСИ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для оценки эффективности энтеральной лекарственной формы бактериофагов необходимо учитывать не только фармакокинетику, биодоступность, но и возможный ответ иммунной системы человека на фаги, что определяет безопасность и результативность фаготерапии. Показано, что снижение клинической эффективности используемых фагов может быть связано с образованием специфических антифаговых антител, формирующихся при повторном приеме данных фагов у одного и того же пациента. В то же время наличие выраженного гуморального антифагового иммунного ответа не исключает терапевтического эффекта [13-14]. Известно, что выработка антител зависит не только от индивидуальных иммуногенных особенностей бактериофагов, но и от способа их введения, дозы и схемы применения [91].

Учитывая вышесказанное, при разработке экспериментальных биопрепаратов на основе холерных бактериофагов для создания условий их длительного персистирования в организме необходимо учитывать активацию вирусными частицами иммунных реакций. Оценка антифагового гуморального иммунитета позволит получить информацию о том, развивается или нет иммунный ответ на конкретный холерный бактериофаг при проведении фагопрофилактики, в какие сроки после введения и в каком количестве появляются специфические антитела и насколько длительно они циркулируют в крови. Поэтому, в случае снижения эффективности применения фагов знание подобных вопросов позволит скорректировать штаммовый состав препаратов.

5.1. Определение специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных

Уровень титра оценивали по истечении месяца после проведения курса фагопрофилактики продолжительностью три, пять и семь дней. Титр специфических иммуноглобулинов G (IgG) в сыворотке крови кроликов определяли методом ИФА. Используемая экспериментальная иммуноферментная тест-система предназначена для обнаружения антифаговых IgG сконструирована по следующему принципу: в лунки полистиролового планшета вносили 100 мкл бактериофага в рабочем титре 10^7 БОЕ/мл, выступающий в роли антигена, после чего выдерживали для сорбции в холодильнике 24 ч. Иммуноферментный анализ выполняли по следующей схеме: исследуемые сыворотки инкубировали в лунках планшета с последующим добавлением меченных пероксидазой хрена антител (козьих анти-IgG/IgM и кроличьих анти-IgA). Реакцию выявляли при помощи субстрата терметилбензидина. Контрольные образцы включали нормальную кроличью сыворотку (отрицательный контроль) и иммунную сыворотку с известным титром антител (положительный контроль). Методика обеспечила достоверное определение антифаговых антител в исследуемых образцах.

Результаты серологического исследования кроличьих сывороток после 3-, 5- и 7-дневного курса введения бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 продемонстрировали минимальную иммуногенность данных препаратов. При этом, фаги Rostov-M3 и Rostov-13 не вызывали активацию гуморального иммунного ответа. Бактериофаг ФБ1 индуцировал слабую продукцию специфических антител (1:100), что было в 12,8 раз ниже показателей положительного контроля. Экспериментальная фаговая смесь (основа профилактического коктейля) также показала низкие титры специфических антител и значительно меньшую иммуногенность по сравнению с контрольными сыворотками (Таблица 15).

Таблица 15 – Определение фаговых антител после первичного курса фагопрофилактики

Препараты бактериофагов	Титры сывороток в различные сроки			Титр контрольных положительных сывороток	Титр сыворотки крови интактного кролика
	3 дня	5 дней	7 дней		
Rostov-M3	отриц	отриц	отриц	более 1:1280	1:40
Rostov-13	отриц	отриц	отриц	более 1:1280	1:40
ФБ1	отриц	отриц	1:100	более 1:1280	1:40
Смесь фагов	1:100	1:100	1:200	-	1:40

Результаты изучения гуморального иммунного ответа показали, что повторное введение исследуемых холерных бактериофагов индуцирует продукцию специфических антител, однако с существенными различиями в иммуногенности отдельных фагов. В частности, фаг Rostov-M3 уже после трехкратного введения вызывал образование высоких титров специфических иммуноглобулинов, тогда как фаги ФБ1 и Rostov-13 демонстрировали значительно более слабый иммунный ответ (Таблица 16). Примечательно, что при повторном введении поливалентной смеси бактериофагов у взрослых кроликов не наблюдалось существенной активации гуморального иммунитета - титры антител оставались на низком уровне независимо от продолжительности курса (3, 5 или 7 дней), что свидетельствует о перспективности использования именно комбинированных фаговых препаратов для профилактических целей.

Таблица 16 – Определение фаговых антител после повторного курса фаготерапии

Препараты бактериофагов	Титры сывороток в различные сроки			Титр контрольных положительных сывороток	Титр сыворотки крови интактного кролика
	3 дня	5 дней	7 дней		
Rostov-M3	1:800	1:800	1:1600	более 1:1280	1:40
Rostov-13	отриц.	отриц.	1:1600	более 1:1280	1:40
ФБ1	отриц.	отриц.	1:1600	более 1:1280	1:40
Смесь фагов	1:200	1:200	1:400	-	1:40

Таким образом, проведенные исследования выявили, что повторное применение холерных бактериофагов стимулирует гуморальный иммунный ответ у лабораторных животных. Однако важно отметить, что при использовании поливалентной фаговой смеси наблюдались существенно более низкие титры специфических антител по сравнению с контрольными иммунными сыворотками. Это указывает на умеренную иммуногенность фагового коктейля, что может способствовать его успешному применению для профилактики холеры. Тем не менее, для полной оценки потенциала данных бактериофагов необходимо провести дополнительные исследования, направленные на изучение влияния сформировавшегося гуморального иммунного ответа на их профилактическую эффективность при повторных курсах приема. Это позволит определить, насколько устойчивость фагов к нейтрализации антителами сохраняется в условиях длительного применения, а также разработать оптимальные схемы использования фаговых препаратов для предотвращения инфекций.

5.2. Оценка продукции секреторного иммуноглобулина А в ответ на введение холерных фагов и их смеси

Исследования проводили через неделю после окончания трех, пяти и семидневного курса фагопрофилактики. Для этого накладывали две лигатуры на тонкий кишечник и вводили по 3 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), затем осуществляли забор промывных вод взрослого кролика, в которых наблюдали продукцию sIgA методом ИФА «Enzyme-linked immunosorbent assay kit for sIgA» (Bio-Techne, США). В микропланшетном формате при длине волны 450 нанометров (нм) была определена численность sIgA, которую оценивали на многофункциональном ридере «Synergy™ 2» (BioTek Instruments, США).

Кишечные бактериофаги способны стимулировать продукцию специфических антител, причем этот процесс зависит от двух ключевых факторов: дозы препарата и длительности экспозиции. Особенно важно отметить, что для слабоиммуногенных фагов существенное повышение уровня специфических иммуноглобулинов в системном кровотоке достигается лишь при соблюдении двух условий: применение

крайне высоких доз препарата и продолжительный период воздействия. Особую роль в этом процессе играет секреторный иммуноглобулин А (sIgA), который является основным эффекторным компонентом слизистых оболочек. sIgA оказывает ингибирующее действие на фаги в кишечнике, и считается, что его влияние на эффективность фаготерапии может быть даже более значимым, чем появление фагорезистентных штаммов бактерий. Поэтому важным этапом исследования стало определение уровня антифаговых антител.

Исследование динамики секреторного иммунного ответа в тонком кишечнике кроликов выявило важные особенности взаимодействия бактериофагов с местной иммунной системой. При первичном курсе введения фаги Rostov-M3 и Rostov-13 не вызывали значимого изменения уровня секреторного IgA (sIgA), тогда как семидневное применение фага ФБ1 приводило к достоверному повышению его концентрации. Поливалентная смесь всех трех фагов при первичном введении также не оказывала существенного влияния на продукцию sIgA. Однако повторные курсы применения демонстрировали выраженный иммуностимулирующий эффект: трехкратное введение ФБ1 вызывало 2,5-кратное увеличение sIgA по сравнению с контролем (Рисунок 11 А), а 5-7-дневные курсы комбинированного препарата - двукратный рост показателя (Рисунок 11 Б, В).

Таким образом, повторные курсы применения противохолерных бактериофагов, в частности ФБ1 и их смесей, стимулируют повышенную выработку секреторного иммуноглобулина А (sIgA) в тонком кишечнике у экспериментальных животных. Это явление может снижать эффективность профилактического действия фаговых препаратов, поскольку sIgA способен нейтрализовать фаговые частицы, препятствуя их взаимодействию с патогенными бактериями. Данный аспект требует дальнейшего углубленного изучения, так как он может стать ограничивающим фактором при длительном использовании фаговых средств.

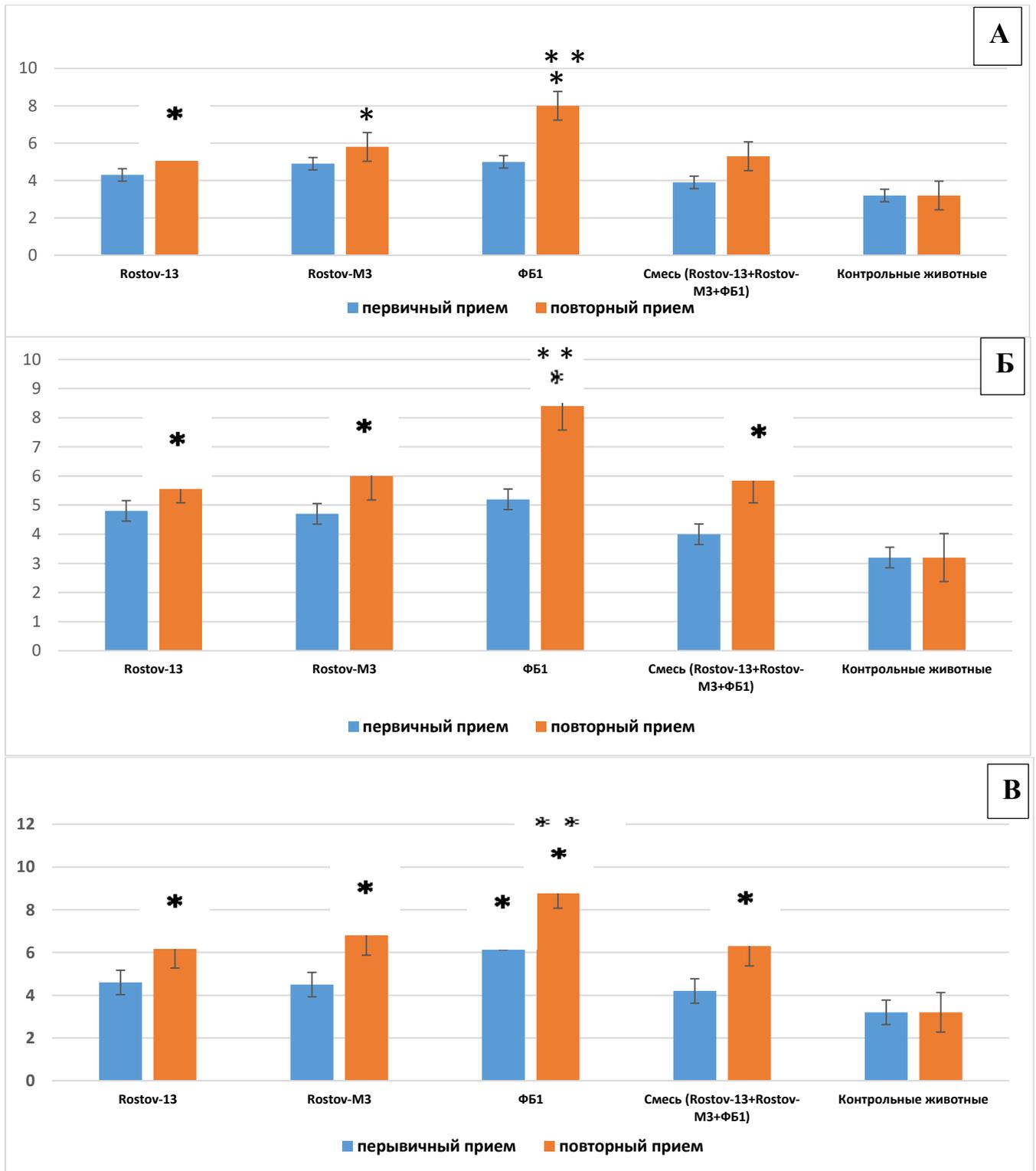


Рисунок 11 – Количество (нг/мл) секреторного иммуноглобулина А: А – после трех; Б – после пяти; В – после семидневного введения холерных бактериофагов.

Примечание:

* - достоверное отличие от показателя контрольных животных ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие от показателя в эти сроки в других группах ($p < 0,05$)

Разработка новых фаговых препаратов против холеры требует обязательного учета их потенциальной иммуногенности, особенно при планировании повторных курсов терапии. Как показывают исследования [13], многократное введение бактериофагов может индуцировать выработку специфических антител, способных нейтрализовать терапевтический и профилактический эффект препаратов. Этот феномен объясняет необходимость тщательного отбора слабоиммуногенных фаговых штаммов, оптимизации схем применения (длительность курсов, интервалы между ними) и разработки поливалентных композиций, минимизирующих риск выработки нейтрализующих антител.

ГЛАВА 6. ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ROSTOV-M3, ROSTOV-13, ФБ1 И ИХ СМЕСИ

Профилактическая эффективность биопрепаратов определяется комплексом взаимосвязанных факторов, включая их фармакологическую природу, качественный состав и способ введения, которые должны быть тщательно сбалансированы для достижения оптимального защитного действия при минимальном риске нежелательных реакций. Критическое значение имеет правильный подбор активных компонентов и их дозировок, а также выбор рационального пути введения, обеспечивающего необходимую биодоступность и продолжительность действия препарата. Для оценки эффективности исследуемых холерных бактериофагов и их комбинаций были использованы две модели лабораторных животных.

Первая модель представляла собой генерализованную инфекцию белых мышей, вызванную вирулентными штаммами *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы. Эта модель позволяет оценить способность фагов предотвращать системное распространение инфекции и защищать организм от тяжелых последствий заражения.

Экспериментальная модель изолированной тонкой кишечной петли взрослых кроликов достоверно воспроизводит ключевые патогенетические механизмы холеры человека. Данная система демонстрирует характерный холерогенный эффект, проявляющийся интенсивной секрецией жидкости и электролитов в просвет кишечника, а также выраженный энтеропатогенный эффект с типичными гистологическими изменениями: отеком тканей, геморрагиями и некрозом эпителия кишечных ворсин, полностью соответствующими патологической картине заболевания у человека.

Использование этих двух моделей позволило всесторонне оценить профилактическую эффективность фаговых препаратов, учитывая, как системное воздействие инфекции, так и локальные изменения в кишечнике. Это особенно важно для разработки препаратов, способных не только предотвращать развитие заболевания, но и минимизировать повреждения тканей, вызванные действием

токсинов холерных вибрионов.

6.1. Исследование профилактической эффективности смеси холерных бактериофагов (Rostov-M3+Rostov-13+ФБ1) в отношении вирулентных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей

Для моделирования холерной инфекции токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы культивировали 18 ч при 37°C. Бактериальную суспензию (1×10^9 КОЕ/мл в 0,9% NaCl) готовили по стандарту мутности. Агар Нобля стерилизовали кипячением (30 мин), охлаждали до 45°C и смешивали с бактериальной суспензией (1:1) до конечной концентрации агара 0,2%. Полученную смесь (0,2 мл, содержащую 2×10^8 клеток) вводили внутрибрюшинно мышам. Гибель всех животных в течение 24 ч подтверждала развитие генерализованной холерной инфекции, что соответствует стандартным критериям оценки вирулентности.

В исследовании участвовали 70 взрослых мышей массой 18-20 г, равномерно распределенных на 7 групп по 10 животных. Экспериментальные группы получали однократное ежедневное внутрижелудочное введение фагового коктейля (0.5 мл, концентрация $n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл) по следующим схемам: группы 1 и 2 - 5-дневный курс, группы 3 и 4 - 7-дневный курс перед инфицированием. Контрольные группы получали эквивалентный объем физиологического раствора по аналогичным протоколам введения. Для контроля эффективности и безопасности фаговой смеси была выделена дополнительная группа (7 группа), которой препарат вводили в течение 7 дней, но без последующего заражения. Это позволило оценить влияние фагов на организм животных в отсутствие инфекции.

Заражение контрольных и опытных групп проводилось на 6 и 8 сутки опыта токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 (classical 145 + El Tor 18899) и O139 (16066) серогрупп (Таблица 17).

Таблица 17 – Эффективность фаговой смеси при генерализованной форме инфекции у белых мышей, вызванной токсигенными штаммами *V. cholerae* O1, O139 серогрупп

Подопытные животные	Профилактика смесью бактериофагов в дозе 0,5 мл ($n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл)				Контроль культур <i>V. cholerae</i>		Контроль смеси бактериофагов
	5 дней		7 дней		O1	O139	
	O1	O139	O1	O139			
Выжившие (%)	83,3±5,7	6,7±5,7	93,3±5,7	13,3±5,7	0	0	100
Павшие (%)	13,3±5,7	93,3±5,7	6,7±5,7	86,7±5,7	100	100	0

Исследование профилактической эффективности комбинации бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 при генерализованной форме холеры у мышей выявило выраженную серогрупп-специфическую активность. Пятидневный профилактический курс фагового коктейля перед заражением показал высокую (90%) защиту против штаммов O1 серогруппы, но оказался малоэффективным (10% выживаемость) в отношении серогруппы O139 (Таблица 17).

Семидневный профилактический курс фагов способствовал увеличению числа выживших животных при инфицировании *V. cholerae* O139, однако их количество оставалось очень низким. Следует отметить, что процентное содержание выживших животных при заражении *V. cholerae* O1 не изменилось и статистически достоверно не отличалось от такового в группе животных, получавших фагопрофилактику в течение пяти дней.

Эксперименты по оценке профилактической эффективности экспериментального коктейля бактериофагов против холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей показали высокую эффективность в отношении вибрионов O1, но недостаточную активность против вибрионов O139. Эти результаты подчеркивают необходимость продолжения исследований и поиска новых литических бактериофагов, способных эффективно уничтожать вибрионы O139 серогруппы.

6.2. Исследование профилактической эффективности бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 в отношении токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика

Всего в эксперименте использовали 24 взрослых кролика (1,5 кг). В каждом исследовании 8 взрослых кроликов разделяли на 4 группы по 2 особи. Опытным группам в течение 3, 5 или 7 дней вводили внутривентрикулярно по 3 мл фаговых препаратов (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 отдельно или в смеси 1:1:1, концентрация $n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл), контрольной группе - 0,9% физиологический раствор в тех же объемах. Через 24 часа голодания животным под наркозом (везотил 15 мг/кг) проводили лапаротомию, выделяли петли тонкого кишечника и накладывали лигатуры на участки длиной 10-12 см с интервалом 4-5 см. В контрольную петлю вводили 1 мл забуференного физраствора (ЗФР), в опытную - 1 мл ЗФР с культурой *V. cholerae* O1/O139 (1×10^9 КОЕ/мл). Через 16-18 часов животных подвергали эвтаназии и оценивали холерогенный и энтеропатогенный эффекты визуально, а также выраженность данных эффектов рассчитывали по формуле, предложенной W. Burrows [128].

Проведенное исследование профилактической эффективности бактериофагов против холерной инфекции на модели тонкого кишечника кроликов позволило получить важные экспериментальные данные. Результаты показали, что предложенный режим применения - трехдневный курс перорального введения препарата в дозе 3 мл с концентрацией фаговых частиц в диапазоне от $n \times 10^8$ до $n \times 10^9$ бляшкообразующих единиц на миллилитр (БОЕ/мл) - не демонстрирует статистически значимого защитного эффекта против заражения *V. cholerae*. Полученные результаты, представленные в таблице 18, указывают на необходимость дальнейшей оптимизации параметров фагопрофилактики.

Таблица 18 – Оценка профилактического действия препаратов бактериофагов по выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в изолированной петле тонкого кишечника кролика

Препарат бактериофагов + инфекционный агент	Влияние фага на инфекционный процесс после приема:					
	3 дней		5 дней		7 дней	
	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)
Rostov-M3 <i>V. cholerae</i> O1 classical 145	средняя	1,10±0,09	слабая	0,35±0,09	отсутствует	0,17±0,10
Rostov-13 <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18899	средняя	1,15±0,07	слабая	0,38±0,10	отсутствует	0,19±0,12
ФБ1 <i>V. cholerae</i> O139 16066	сильная	1,22±0,04	сильная	1,15±0,10	сильная	1,18±0,06
Смесь бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1) <i>V. cholerae</i> O1 classical 145, El Tor 18899, <i>V. cholerae</i> O139 16066	сильная	1,20±0,08	сильная	1,18±0,04	сильная	1,13±0,06
Контроль (интактные)	сильная	1,33±0,04	сильная	1,27±0,07	сильная	1,25±0,08

Пятидневный курс фагопрофилактики (3 мл, $n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл) показал различное защитное действие изучаемых бактериофагов при экспериментальной холере. Наиболее выраженные патологические изменения в перевязанных петлях тонкого кишечника кроликов наблюдались при использовании фага ФБ1 против штамма *V. cholerae* O139 16066. В этих группах регистрировались характерные признаки тяжелого инфекционного процесса: выраженный отек слизистых оболочек, геморрагии, некроз ворсинчатого эпителия, а также растяжение петель с накоплением полупрозрачного экссудата (K>1). Аналогичная картина сохранялась и после

семидневного курса применения фага ФБ1, что свидетельствует о его недостаточной эффективности против серогруппы O139. Полученные данные (Таблица 18) подтверждают необходимость строгого учета серогрупповой специфичности при разработке фаговых профилактических препаратов.

Исследование профилактического действия фагов Rostov-M3 и Rostov-13 выявило выраженную зависимость эффективности от длительности курса. При пятидневном введении у кроликов, зараженных штаммами *V. cholerae* classical 145 и El Tor 18899, отмечались лишь незначительные проявления холеры ($K < 1$) - слабый отек слизистой без кровоизлияний и структурных изменений эпителия. Семидневный курс полностью предотвращал развитие инфекции: у всех животных отсутствовали как холерогенный ($K = 0$, отсутствие жидкости в просвете), так и энтеропатогенный эффекты (нормальное состояние слизистой).

Трехкомпонентный препарат (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) не показал защитного действия при заражении поливалентной культурой *V. cholerae*, что проявлялось выраженными патологическими изменениями в кишечнике ($K > 1$) и выделением вибрионов O139 серогруппы. Это свидетельствует о неспособности фага ФБ1 подавлять рост данных штаммов, что говорит о целесообразности его исключения из экспериментального профилактического препарата.

В отличие от этого, комбинация Rostov-M3 и Rostov-13 продемонстрировала высокую эффективность против штаммов O1 серогруппы (как classical, так и El Tor биоваров) при курсовом применении в течение 5-7 дней. Полное отсутствие патологических изменений подтверждает целесообразность использования именно этого дуэта для профилактики холеры, вызванной эльторовскими и классическими штаммами.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных был разработан профилактический фаговый препарат, содержащий бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 в равном соотношении (1:1) с титром $n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл. Препарат продемонстрировал высокую эффективность в предотвращении холерной инфекции,

вызванной штаммами O1 серогруппы (как классического биовара, так и биовара E1 Tor), что подтверждено в серии контролируемых экспериментов.

Следующей главой исследования стало изучение фармакокинетики данного препарата, включая его распределение и выведение из организма, а также оценка его способности оказывать профилактический эффект. Эти данные необходимы для оптимизации дозировок и режимов применения, а также для подтверждения безопасности и эффективности препарата в условиях, приближенных к реальным.

ГЛАВА 7. ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ROSTOV-M3, ROSTOV-13 В ОТНОШЕНИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ

7.1. Оценка фармакокинетики смеси холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 на модели белых мышей

В исследовании участвовало 50 аутбредных мышей, разделенных на 5 равных групп. Схема эксперимента включала однократное внутрижелудочное введение (группа 1) фаговой смеси (Rostov-M3 + Rostov-13, 1:1) в дозе 0.5 мл ($n \times 10^8 - n \times 10^9$ БОЕ/мл). Анализ фекальных проб в динамике (3, 6, 9, 12, 24, 48 ч).

А также многократное внутрижелудочное введение (ежедневный прием) по 0.5 мл (группы 2-4) той же фаговой композиции. Курсы составляли 3, 5 и 7 дней соответственно. Контрольным группам животных таким же образом вводился 0,9% ФР в объемах и сроках, соответствующих экспериментальным группам. Отбор проб проводился после завершения курса. По окончании введения смеси фагов 1 раз в сутки отбирали испражнения мышей для проведения исследований на наличие активных фаговых частиц.

Для анализа образцов использовали следующую методику: подготовка проб (3 г фекалий помещали в стерильные пробирки, затем гомогенизировали в 4,5-5 мл 0,9% бульона Мартена и добавляли хлороформ в соотношении 1:10); определение фагового титра (использовали метод Грациа (двойной агар), для этого применяли специфические индикаторные культуры, учитывали количество негативных колоний (н.к.) и выражали результат в БОЕ/мл образца. Исследования проводили до полного исчезновения фаговых частиц. Контрольные анализы выполняли ежедневно.

Исследование фармакокинетики показало, что после однократного перорального введения комбинации бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 выявили характерную динамику их выделения с фекалиями у белых мышей. Максимальные

концентрации фагов были зарегистрированы через 6 и 9 часов после введения, причем наивысшие показатели наблюдались именно на 9-часовом сроке (Таблица 19). В эти временные точки регистрировалось максимальное количество негативных колоний (н.к.).

Таблица 19 — Количество н.к. (фаговых частиц) в кишечнике белых мышей после однократного введения коктейля (по Грациа)

Вид животного	Способ/доза введения	Бактериофаги	Время после введения, час					
			3	6	9	12	24	48
Белые мыши	Per os/0,5 мл ($n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл)	Смесь (Rostov-13 +Rostov-M3)	$4,1 \times 10^2$	2×10^3	1×10^4	$2,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^1$	-

Также, результаты фармакокинетических исследований свидетельствуют о пролонгированном действии профилактического фагового препарата (Rostov-13 + Rostov-M3). Установлено, что после однократного перорального введения активные бактериофаги сохраняются в желудочно-кишечном тракте более 24 часов, что согласуется с предыдущими данными о 72-часовой персистенции у кроликов. Такая продолжительная активность позволяет предположить, что однократное применение препарата обеспечивает как минимум суточную защиту от *V. cholerae* серогруппы O1, что особенно ценно для экстренной профилактики в эндемичных регионах.

Дополнительные исследования с ежедневным введением в течение 3-7 дней позволили оценить динамику выведения фаговых частиц, их возможную кумуляцию при повторных введениях и способность поддерживать концентрацию (Таблица 20).

Результаты показали, что при трехдневном курсе фаги полностью выводились из кишечника в течение определенного времени, которое варьировалось в зависимости от индивидуальных особенностей животных. При пяти- и семидневном курсе наблюдалось увеличение времени персистенции фагов, что свидетельствует об их способности накапливаться в кишечнике при длительном применении.

Таблица 20 — Количество н.к. (фаговых частиц) в кишечнике белых мышей после разных курсов введения (per os по 0,5 мл) экспериментального препарата

Способ/доза введения	Время после введения препарата, сутки	Смесь бактериофагов Rostov-13+Rostov-M3 ($n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл)		
		3 дня	5 дней	7 дней
Per os/0,5 мл	1	$4,2 \times 10^6$	5×10^6	$7,4 \times 10^5$
	2	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$8,1 \times 10^6$
	3	8×10^4	$3,2 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$
	4	2×10^3	$4,1 \times 10^2$	$5,1 \times 10^4$
	5	2×10^3	1×10^2	$1,7 \times 10^2$
	6	1×10^2	$2,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
	9	4 н.к.	$1,2 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
	12	0	8 н.к.	10 н.к.
	15	0	5 н.к.	7 н.к.
	18	0	2 н.к.	3 н.к.
	21	0	1 н.к.	2 н.к.
	24	0	0	0

Проведенные исследования выявили выраженную способность фагового препарата к длительной персистенции в организме животных. При трехдневном курсе введения наблюдалось постепенное снижение концентрации фаговых частиц с полным выведением к 9-му дню. Более продолжительные курсы (5-7 дней) приводили к существенному увеличению периода персистенции - фаговые частицы продолжали выделяться с фекалиями даже на 21-й день после последнего приема, что подтверждалось обнаружением негативных колоний. Особенно важно отметить, что такая длительная персистенция наблюдалась даже в отсутствие специфического хозяина (*V. cholerae*), что свидетельствует о способности данных бактериофагов сохранять активность в ЖКТ независимо от наличия целевого патогена. Такое длительное сохранение фагов в кишечнике может быть связано с их способностью адаптироваться к условиям ЖКТ и взаимодействовать с другими компонентами микрофлоры. Это также позволяет предположить, что фаговый препарат может обеспечивать защиту от холерных вибрионов в течение нескольких недель после окончания курса приема.

7.2. Оценка профилактической эффективности экспериментального профилактического препарата в отношении вирулентных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы при первичных и повторных курсах введения

Исследование профилактического эффекта разработанного препарата в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика показало, что трехдневный курс приема снижает выраженность патоморфологических изменений в опытных петлях по сравнению с контрольной группой. Однако полностью предотвратить развитие экспериментальной холеры в этом случае не удалось (Таблица 21). Эти данные указывают на частичную эффективность препарата при краткосрочном применении и подчеркивают необходимость более длительных курсов или оптимизации дозировок для достижения полного профилактического эффекта.

Таблица 21 – Оценка профилактического эффекта препарата после первичных курсов приема на основе анализа выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в изолированной петле тонкого кишечника инфицированного взрослого кролика

Препарат бактериофагов + инфекционный агент	Наличие эффектов после приема бактериофагов в течение:					
	3 дней		5 дней		7 дней	
	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)
Rostov-13 и Rostov-M3 (смесь 1:1) <i>V. cholerae</i> O1 classical 569B, El Tor 18899	средняя	1,19±0,12	отсутствует	0,37±0,08	отсутствует	0,27±0,13
Контроль (интактные)	сильная	1,33±0,04	сильная	1,27±0,07	сильная	1,25±0,08

Наиболее выраженный профилактический эффект экспериментального препарата в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы наблюдался после пяти- и семидневного курса приема. Эти данные легли в основу разработки способа профилактики холеры, вызванной возбудителями O1 серогруппы, включая биовары classical и El Tor (патент № RU2783000C1). Данный способ предполагает использование фагового препарата в течение 5–7 дней для предотвращения развития инфекции, что делает его перспективным для применения в эндемичных регионах и при вспышках заболевания.

Исследование формирования гуморального иммунного ответа на бактериофаги Rostov-13 и Rostov-M3 показало, что повторные курсы приема препарата приводят к увеличению продукции специфических иммуноглобулинов как в сыворотке крови, так и в кишечнике экспериментальных животных. Это свидетельствует о развитии системного и местного иммунного ответа на фаговые частицы.

Учитывая эти данные, была проведена оценка влияния, сформировавшегося гуморального иммунного ответа на профилактическую эффективность экспериментального препарата при его повторном применении. Это важно, так как выработка специфических антител может потенциально снижать активность фагов за счет их нейтрализации.

Результаты показали, что, несмотря на увеличение уровня иммуноглобулинов, профилактическая эффективность препарата сохранялась, хотя и с некоторым снижением по сравнению с первичным курсом. Это указывает на необходимость оптимизации схем применения, например, путем увеличения дозировок или использования фагов с низкой иммуногенностью.

Таблица 22 – Оценка профилактического эффекта препарата после повторных курсов приема на основе анализа выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в изолированной петле тонкого кишечника инфицированного взрослого кролика

Препарат бактериофагов + инфекционный агент	Наличие эффектов после приема бактериофагов в течение:					
	3 дней		5 дней		7 дней	
	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)
Rostov-13 и Rostov-M3 (смесь 1:1) <i>V. cholerae</i> O1 classical 569B, El Tor 18899	средняя	1,09±0,02	отсутствует	0,27±0,17	отсутствует	0,17±0,03
Контроль(интактные)	сильная	1,24±0,09	сильная	1,17±0,07	сильная	1,35±0,13

Экспериментальные данные показали, что трехкратное введение фаговой смеси способствует уменьшению патологических изменений в перевязанных кишечных петлях, но не обеспечивает полной защиты от холерной инфекции (Таблица 22). В сравнении с контрольной группой у животных, получавших фаговый препарат, наблюдалось снижение выраженности отека, уменьшение площади кровоизлияний, частичное сохранение структуры ворсинчатого эпителия, сохранение воспалительной инфильтрации и наличие отдельных участков некроза.

При пятидневном курсе профилактического приема препарата признаки холеры у животных отсутствовали: опытная петля была сдута, не наблюдалось отека, кровоизлияний или скопления жидкости, что исключало наличие холерогенного эффекта. Семидневный курс применения фагового препарата обеспечил полную профилактическую защиту - патоморфологическое состояние кишечных петель у животных опытной группы свидетельствовало об отсутствии отека и воспалительной

инфильтрации, а также сохранении целостности эпителиального покрова.

В то же время у животных контрольной группы, не получавших фаговый препарат, опытные петли тонкого кишечника были значительно раздуты, заполнены мутной жидкостью, а на их стенках наблюдались ярко выраженные кровоизлияния. Эти данные подтверждают высокую профилактическую эффективность фагового препарата при пяти- и семидневном курсе приема, что делает его перспективным для предотвращения развития холеры, вызванной *V. cholerae* O1 серогруппы.

Результаты оценки профилактической эффективности препарата на другой экспериментальной модели холеры показали, что первичные и повторные курсы в течение пяти и семи дней предотвращают развитие генерализованной формы холеры примерно у 90% белых мышей (Таблица 23).

Таблица 23 – Оценка профилактической эффективности экспериментального препарата при первичных и повторных курсах приема на модели генерализованной формы холеры у белых мышей

Количество животных (%)	Профилактика смесью бактериофагов в дозе 0,5 мл ($n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл) в течение						Контроль культур <i>V. cholerae</i> O1	
	первичные курсы			повторные курсы			classical 569B	El Tor 18899
	3 дней	5 дней	7 дней	3 дней	5 дней	7 дней		
выжившие	60,3±5,7	92±2,65	94,3±2,08	66,4±4,7	93,3±5,13	95,3±4,5	0	0
павшие	38,5±5,8	7,5±2,8	5,2±2,1	34,5±4,8	6,9±5,1	4,5±3,5	100	100

Таким образом, проведенные исследования убедительно доказали эффективность разработанного фагового препарата (Rostov-13 + Rostov-M3) для профилактики холеры, вызываемой *V. cholerae* серогруппы O1. Препарат демонстрирует высокую эффективность против обоих биоваров (classical и El Tor), стабильные результаты как при первичном, так и при повторном применении, а также хорошие показатели безопасности.

Разработанный препарат на основе бактериофагов обладает значительным потенциалом для профилактики холеры, особенно в условиях ограниченных ресурсов.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на подтверждение его эффективности и безопасности в реальных условиях, что откроет путь к внедрению в глобальные системы здравоохранения. Для успешной реализации проекта критически важны междисциплинарное сотрудничество (микробиологи, эпидемиологи, клиницисты) и поддержка на международном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холера — это опасное инфекционное заболевание, характеризующееся тяжелой диареей, которая при отсутствии своевременного лечения может быстро привести к обезвоживанию организма и летальному исходу [11; 178; 218]. Несмотря на значительные усилия по борьбе с этой инфекцией, холера продолжает оставаться социально значимым заболеванием, представляющим серьезную угрозу для общественного здравоохранения как в эндемичных регионах, так и в случае локальных вспышек [93]. В последние десятилетия в связи с широким распространением антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов [101-102; 207], профилактика бактериальными вирусами является актуальным направлением и требует детального исследования совместимости организма и профилактических биопрепаратов на основе бактериофагов. Анализ состояния проблемы свидетельствует о необходимости поиска новых активных рас холерных бактериофагов и разработки новых методов профилактики данного заболевания.

В соответствии с поставленными задачами была осуществлена биологическая характеристика коллекционных штаммов холерных бактериофагов (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1), которая показала их выраженную серогрупповую и биоварную специфичность в отношении *V. cholerae*. Наибольший спектр литической активности продемонстрировал фаг Rostov-6, эффективный против 63,3% штаммов classical и 55% штаммов El Tor биоваров. Фаги Rostov-1 и Rostov-7 показали избирательную активность против El Tor (70% и 63,5% соответственно), тогда как Rostov-13 проявил избирательную активность, лизируя 97% вибрионов биовара El Tor. Фаг Rostov-M3 отличался высокой лизабельностью в отношении биовара classical (83,3%), тогда как только 43,3% El Tor вибрионов оказались чувствительными к нему. Особый интерес представляет фаг ФБ1, показавший 50% активность против серогруппы O139. Все исследуемые холерные фаги обладают высокой стабильностью, сохраняя литическую активность в течение года, устойчивы к температурным воздействиям и действию хлороформа, что

согласуется с соответствующей публикацией по холерным фагам [23].

Следующий этап диссертационной работы касался молекулярно-генетических исследований холерных бактериофагов, включающих полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ. Такого рода эксперименты имеют ключевое значение, так как позволяют не только изучить геномную организацию фагов, но и оценить их профилактический потенциал и биобезопасность [121; 139]. Полученные результаты позволили выявить принципиальные различия в геномной организации фагов: в геномах Rostov-6 и Rostov-7 обнаружены интегразные гены, что исключает их использование в профилактических целях из-за потенциального риска лизогенной конверсии. В отличие от них, фаги Rostov-1, Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 обладают характеристиками, представляющими их перспективными для профилактического применения. Эти показатели имеют ключевое значение для разработки эффективных и безопасных фаговых препаратов, их стандартизации и последующего доклинического применения, что соответствует требованиям нормативно-правовой базе Евразийского экономического союза и отраслевого фармакопейного стандарта [30; 97].

Учитывая, что бактериофаг Rostov-1 демонстрирует более низкую литическую активность в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы E1 Tor по сравнению с фагом Rostov-13, последующие эксперименты были сосредоточены на изучении бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1. Эти фаги обладали широким спектром литической активности (от 43 до 97%) в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы, высокой урожайностью (до 10^9 БОЕ/мл), а также устойчивостью к температурным воздействиям и хлороформу. Кроме того, они являлись вирулентными, оригинальными и генетически безопасными, так как их ДНК не содержала нежелательных генов, таких как гены устойчивости к антибиотикам, токсинов или интеграз.

Благодаря этим характеристикам, фаги Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 были признаны перспективными кандидатами для включения в состав экспериментального

профилактического коктейля. Их способность лизировать различные штаммы холерных вибрионов, сохраняя при этом стабильность и безопасность, можно рассматривать, как эффективный инструмент для разработки новых методов профилактики холеры, особенно в условиях растущей устойчивости бактерий к антибиотикам [101; 207].

Традиционный метод получения холерных бактериофагов путем культивирования в питательной среде с последующей фильтрацией не обеспечивает полного удаления продуктов метаболизма микроорганизмов [53], в частности липополисахарида - ключевого компонента клеточной стенки холерного вибриона, обладающего эндотоксическими свойствами. Наличие эндотоксинов в препарате может провоцировать развитие побочных эффектов, включая желудочно-кишечные нарушения и аллергические реакции [15; 26]. Для решения этой проблемы нами были разработаны и внедрены оптимизированные условия культивирования холерных бактериофагов. В результате урожайность холерных фагов при использовании 0,9% раствора NaCl составила: Rostov-13 ($7,4 \times 10^8$ БОЕ/мл), Rostov-M3 ($8,2 \times 10^9$ БОЕ/мл), ФБ1 ($5,1 \times 10^9$ БОЕ/мл), что выше на один порядок, чем в бульоне Мартена, который использовался при размножении маточных фагов. Кроме того, применение усовершенствованной методики позволило получить очищенные препараты, лишенные примесей бактериального эндотоксина, что существенно повышает их профилактическую безопасность.

Применение комбинированных препаратов на основе вирулентных бактериофагов с различным литическим профилем способствует значительному повышению эффективности как терапевтических, так и профилактических средств против холеры. Поэтому, в соответствии с современными требованиями к биологическим препаратам [30; 97], нами была составлена композиция из трех холерных бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) в соотношении 1:1:1 для продолжения исследований *in vivo*.

Фармакокинетические исследования смеси холерных бактериофагов (Rostov-

МЗ+Rostov-13+ФБ1) на модели взрослого кролика показали, что фаговые частицы при однократном пероральном введении выделяются из испражнений животных в течение нескольких суток в зависимости от дозы и кратности применения, что согласуется с литературными данными [127; 135]. Сделан вывод о том, что начальный объем коктейля (1 мл) быстро выводится из организма животного, что является недопустимым фактором при профилактике заболевания, то есть при данном сроке необходимо было увеличить объем фагового коктейля, обеспечивая тем самым более длительное прибывание фагов в макроорганизме.

Для подтверждения безопасности разработанного фагового коктейля (Rostov-МЗ, Rostov-13 и ФБ1) был проведен комплекс токсикологических исследований на лабораторных животных. Такие эксперименты имеют особое значение, поскольку обеспечение безопасности является ключевым требованием к профилактическим препаратам. Результаты исследований продемонстрировали отсутствие острой токсичности (однократное введение максимальной дозы не вызывало патологических реакций, а именно сохранение нормальных физиологических показателей и отсутствие изменений в поведении животных), что соответствовало литературным данным, касающихся фагов других кишечных инфекций [53].

После ежедневного введения смеси фагов в течение 15 и 20 дней статистически достоверных отличий в сравнении с контролем в гистологических срезах органов опытных животных не обнаружено, что является доказательством отсутствия хронической (подострой инфекции) и безопасности применения данных холерных бактериофагов, что также согласуется с литературными данными [53].

Дополнительным подтверждением безопасности фагов Rostov-МЗ, Rostov-13, ФБ1 и их смеси являются результаты по оценке цитотоксического и апоптогенного влияния, которые показали, что после семидневного приема данные фаги не вызывают апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных. Аналогичная тенденция сохранялась в случае повторного введения животным данной смеси, что также свидетельствует о ее безопасности для

макроорганизма. Эти данные, безусловно, важны при разработке профилактического препарата, так как свидетельствуют, что фаговая смесь может быть использована без риска для здоровья.

При исследовании гуморального иммунного ответа на введение фагов выявлено, что профилактический прием в течение трех, пяти и семи дней холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 и их смеси не приводит к значительному образованию специфических антител, что является залогом успешного применения этих препаратов для профилактики холеры. Проведена повторная фагопрофилактика взрослых кроликов по аналогичной схеме с целью оценки возможности многократного использования фагов без риска формирования сильного гуморального иммунного ответа к ним. Результаты показали, что при повторных курсах введения каждого из фагов у экспериментальных животных формируются антифаговые IgG, причем у животных, получавших повторно смесь бактериофагов титры специфических антител в сыворотке крови регистрируются на низком уровне. Согласно клиническим наблюдениям [186], имеет место выраженная зависимость антительного ответа от пути введения бактериофагов. В частности, исследование выявило существенные различия в иммуногенности препаратов бактериофагов (пероральное введение вызывало минимальный антительный ответ, а местное применение приводило к существенному повышению уровня антител).

Известно, что специфический секреторный иммуноглобулин А (sIgA) способен ингибировать активность бактериофагов в кишечнике, что может снижать эффективность фаготерапии даже в большей степени, чем появление фагорезистентных штаммов бактерий [188]. Учитывая, что при повторных курсах фагопрофилактики показатели sIgA повышаются быстрее, чем при первичном приеме, была проведена оценка его продукции при указанных сроках введения бактериофагов. Исследования секреторного иммунного ответа в тонком кишечнике кроликов позволили выявить существенные различия в способности исследуемых бактериофагов индуцировать продукцию sIgA. При первичном применении фаги

Rostov-M3 и Rostov-13 не вызывали значимого повышения уровня sIgA независимо от продолжительности курса (3-7 дней). В отличие от них, семидневный курс фага ФБ1 приводил к достоверному увеличению секреции sIgA. Повторный курс сопровождался выраженным иммуностимулирующим эффектом - трехкратное введение ФБ1, присутствующего в смеси, приводило к 2,5-кратному увеличению sIgA по сравнению с контролем, что свидетельствует о его высокой иммуногенности. Эти данные подчеркивают важность учета иммуногенных свойств фагов при разработке фаговых препаратов, так как повышение уровня sIgA может снижать их эффективность при длительном применении.

Учитывая вышеизложенное, а также профилактическое применение бактериофага ФБ1, как в виде отдельного препарата, так и в составе смеси, которое оказалось неэффективным против холерных вибрионов O139 серогруппы на двух моделях лабораторных животных. Эти факты делают его включение в экспериментальный фаговый коктейль нецелесообразным. Полученные результаты подчеркивают необходимость продолжения исследований, направленных на поиск новых вирулентных бактериофагов, способных эффективно лизировать вибрионы O139 серогруппы. Такие фаги должны обладать высокой литической активностью в отношении O139 серогруппы, стабильностью и низкой иммуногенностью, чтобы минимизировать риск нейтрализации антителами. Это особенно важно в условиях распространения антибиотикорезистентных штаммов бактерий и необходимости разработки альтернативных методов профилактики и лечения холеры.

Следующим этапом исследований стала оценка фармакокинетики и профилактической активности фаговой композиции, состоящей из бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13. Результаты показали, что после пяти- и семидневного курса приема фаговые частицы обнаруживались в испражнениях мышей даже спустя 21 день. Это свидетельствует о способности фагов длительно персистировать в организме животных, даже при отсутствии гомологичных штаммов *V. cholerae*. Такое длительное сохранение фагов в кишечнике может быть связано с их способностью

адаптироваться к условиям желудочно-кишечного тракта и взаимодействовать с другими компонентами микрофлоры, несмотря на то что происходит дезактивация неопределенного количества фагов кислой средой желудка [8; 140]. Эти данные позволяют предположить, что фаговая композиция может обеспечивать защиту от холерных вибрионов серогруппы O1 в течение нескольких недель после окончания курса приема. В литературе существуют данные, согласно которым, патогены могут существенно влиять на фармакокинетику специфических бактериофагов [8]. В таких условиях вероятно увеличение продолжительности персистенции и возможность нарастания концентрации фагов. Доказано, что фаговая композиция, поступающая в ЖКТ животных, не выводится сразу с экскрементами, а остается в организме некоторое время в зависимости от дозы и кратности применения, что необходимо учитывать при создании профилактических биопрепаратов [14].

Установлено, что смесь отобранных и охарактеризованных бактериофагов демонстрирует эффективное профилактическое действие против холерных вибрионов O1 серогруппы уже после пятидневного курса приема. Аналогичные результаты были получены и при семидневном применении фаговой смеси. Эксперименты свидетельствуют, что использование смеси бактериофагов для профилактики холеры, вызванной вибрионами разных биоваров (classical и El Tor), является действенным и эффективным подходом.

Учитывая, что после повторных курсов приема коктейля из фагов Rostov-M3 и Rostov-13 наблюдался антифаговый иммунный ответ в тонком кишечнике экспериментальных животных, было оценено влияние специфических антител на профилактическую способность препарата. Показано, что как при первичных, так и при повторных курсовых приемах в течение пяти и семи дней признаков развития экспериментальной холеры не было зарегистрировано у всех взятых в эксперимент взрослых кроликов и примерно 90% белых мышей. Полученные результаты подтверждают тот факт, что синтез антифаговых антител не всегда означает снижение жизнеспособности фага [14; 161], а формирование выраженного антифагового

гуморального иммунитета не снижает проявление профилактической способности бактериофагов [12-13]. Согласно мнению ряда исследователей, появление антифаговых иммуноглобулинов в крови может рассматриваться как положительный прогностический признак и свидетельствовать о нормализации иммунного ответа в процессе фагопрофилактики [14; 187].

Проведенные исследования в рамках диссертационной работы позволили установить два наиболее эффективных бактериофага против холеры - Rostov-M3 и Rostov-13 для создания профилактического препарата. Была разработана технология культивирования маточных штаммов данных бактериофагов в физиологическом растворе, способствующая увеличению количества фаговых частиц в очищенных фаголизатах, что позволяет повысить их титр. Холерные бактериофаги (Rostov-M3, Rostov-13) были объединены в оптимальной пропорции (1:1), что обеспечивает широкий спектр действия, минимальную иммуногенность, длительную персистенцию.

Доказано, что вышеуказанные фаги безопасны для применения и обладают выраженным профилактическим эффектом в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы. На их основе был разработан экспериментальный профилактический препарат, соответствующий всем требованиям, предъявляемым к новым иммунобиологическим средствам.

Данные, полученные в процессе разработки экспериментального препарата, могут быть полезны и в научном, и практическом плане при создании новых иммунобиологических препаратов для профилактики холеры у людей, применение которых позволит расширить возможности в тактике профилактических мероприятий против этого заболевания.

ВЫВОДЫ:

1. На основе изучения биологических и молекулярно-генетических характеристик были выбраны холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13, которые не содержат генов интеграз, антибиотикоустойчивости и токсинов. При этом они демонстрируют высокую литическую активность (43–97%) в отношении *V. cholerae* серогруппы O1. Эти свойства делают их перспективными кандидатами для включения в состав экспериментального профилактического средства против холеры.
2. Отработана технология культивирования маточных штаммов холерных бактериофагов в физиологическом растворе, способствующая увеличению количества фаговых частиц в очищенных фаголизатах, что позволяет повысить титр холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13.
3. Холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 в максимальных дозах не оказывают токсического действия на макроорганизм и не вызывают апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток у лабораторных животных, что свидетельствует о безопасности их использования на экспериментальных моделях.
4. Проведенные иммунобиологические исследования позволили установить, что применение фаговой композиции Rostov-M3/Rostov-13 (как однократное, так и повторное в течение 7 дней) сопровождается незначительной выработкой антител в сыворотке крови и тонком кишечнике, что не оказывает влияния на профилактическую эффективность препарата.
5. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о высокой профилактической эффективности разработанного фагового препарата на основе штаммов Rostov-M3 и Rostov-13. Установлено, что пятисуточный курс перорального применения данного средства обеспечивает полную защиту лабораторных животных от инфицирования холерным вибрионом серогруппы O1.
6. Разработанный экспериментальный профилактический препарат, безопасный и активный в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы, расширит возможности в тактике профилактических мероприятий против холеры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Представленные в диссертационном исследовании основные этапы получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов могут быть полезны при разработке новых иммунобиологических средств для профилактики холеры у людей.

Данный экспериментальный биопрепарат может быть рекомендован для декретированных категорий работников в период повышения риска заболеваемости холерой, а также для населения, находящегося на эндемичных территориях.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для расширения спектра литической активности профилактического препарата в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп требуется дальнейшее проведение поиска вирулентных рас холерных бактериофагов.

Целесообразна разработка таблетированной формы экспериментального профилактического средства в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп для придания препарату лучшего товарного вида, уменьшения его объемов при транспортировании и хранении.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ/мл – бляшкообразующие единицы в 1 мл

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГРЛС - Государственный реестр лекарственных средств

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ИКК – иммунокомпетентные клетки

ИФА – иммуноферментный анализа

КОЕ/мл – колониеобразующие единицы в 1 мл

ЛПС – липополисахарид

м.к. – микробных клеток

МГЭ – мобильный генетический элемент

МК – микробные клетки

нг/мл – нанограмм в 1 миллилитре.

нк – негативные колонии

нм – нанометр

п.н. – пар нуклеотидов

ПВ – пептонная вода

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФ – Российская Федерация

СКАТ – «Стратегия контроля антимикробной терапии»

УА – уранилацетат

ФР – физиологический раствор

ХТ – холерный токсин

ЩА – щелочной агар

ICTV – официальная классификация Международного комитета по таксономии вирусов

Ig – иммуноглобулины

IS-элементы – генетические элементы

sIgA – иммуноглобулин А

TCP – токсин-корегулируемые пили адгезии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс, М. Бактериофаги. – М., 1961. – 527 с.
2. Алексеева, Л.П. Твердофазный иммуноферментный анализ (прямой вариант) для выявления токсигенных холерных вибрионов O1, O139 серогрупп / Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, В.В. Евдокимова [и др.]. – Текст: электронный // Вестник ПГУ. Биология. – 2022. – № 4. – С. 280-287. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tverdofaznyy-immunofermentnyy-analiz-priamo-variant-dlya-vyyavleniya-toksigennyh-holernyh-vibrionov-o1-o139-serogrupp> (дата обращения: 11.01.2023).
3. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть 1: История исследований до широкого применения антибиотиков / А.В. Алешкин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов [и др.]. – Текст: электронный // Научные обзоры. – 2016. – С. 10–13. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bakteriofagi-v-infektsionnoy-patologii-chast-i-istoriya-issledovaniy-do-shirokogo-primeneniya-antibiotikov> (дата обращения: 1.03. 2021).
4. Алешкин, А.В. Бактериофаги как пробиотические микроорганизмы: специализированный продукт диетического профилактического питания на основе бактериофагов в профилактике инфекций, передающихся пищевым путем / А.В. Алешкин, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч // Инфекционные болезни. – 2016. – Т. 14. – № 2. – С. 31–40.
5. Алешкин, В.А. Проблема антифагового иммунного ответа при энтеральной фотерапии / В.А. Алешкин, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева [и др.]. // В кн.: Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе». – Новосибирск, 2016. – С. 177-178.
6. Андрусенко, И.Т. Холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп: чувствительность к антибиотикам в период седьмой пандемии / И.Т. Андрусенко, Ю.М. Ломов, Э.А. Москвитина, Л.С. Подосинникова, С.М. Иванова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – №. 3. – С. 107–114.

7. Асланов, Б.И. Бактериофаги – эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б.И. Асланов. – Текст: электронный // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 106–109. – URL: https://www.med-sovet.pro/jour/article/view/345?locale=ru_RU (дата обращения: 4.02.2021).
8. Барсук, А.Л. Фармакокинетика энтеральных форм бактериофагов / А.Л. Барсук, Л.В. Ловцова, Ю. А. Сорокина [и др.]. – Текст: электронный // International Journal of Medicine and Psychology. – 2021. – Т. 4. – №. 1. – С. 119-127. – URL: <https://ijmp.ru/wp-content/uploads/2021/03/international-journal-of-med-and-psychol-tom-4.-1-2021.pdf> (дата обращения: 12.04.2024).
9. Бахрушина, Е.О. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa* / Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова, С.С. Бочкарева, [и др.]. – Текст: электронный // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11. – № 2. – С. 74–78. – URL: https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/1219?locale=ru_RU (дата обращения: 24.05.2023).
10. Бахрушина, Е.О. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов / Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин [и др.]. – Текст: электронный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – № 4. – С. 351–360. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=47109073> (дата обращения: 19.05.2022).
11. Божко, В.Г. Холера. Этиология, эпидемиология, патогенез, клиническая картина, лечение // Монотематический сборник лекций ученых ВолгГМУ. Органы и структуры пищеварительной системы. – 2018. – С. 216–223.
12. Бочкарева, С.С. Изучение фармакокинетики суппозиторных форм препаратов бактериофагов / С.С. Бочкарева, А.В. Караулов, А.В. Алешкин [и др.]. // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. – 2019. – Т. 168. – № 12. – С. 707–711.
13. Бочкарева, С.С. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации / С.С. Бочкарева,

А.В. Алешкин, О.Н. Ершова [и др.]. – Текст: электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 4. – С. 42–48. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunologicheskie-aspekty-fagoterapii-infektsiy-svyazannyh-s-okazaniem-meditsinskoj-pomoschi-v-otdelenii-neyroreanimatsii> (дата обращения: 19.05.2022).

14. Бочкарева, С.С. Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: Автореферат дисс. ... докт. биол. наук по специальности 1.5.6 – биотехнология / Бочкарева Светлана Сергеевна. – Москва, 2022. – 48 с. – URL: <https://www.dissercat.com/content/konstruirovanie-preparatov-bakteriofagov-i-kliniko-immunologicheskie-aspekty-fagoterapii-i> (дата обращения: 7.02.2023). – Текст: электронный.

15. Булатова, М.В. Методы контроля пирогенности для оценки качества лекарственных средств / М.В. Булатова, А.Б. Рыжиков, С.В. Усова, М.П. Богрянцева. – Текст: электронный // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени ЮА Овчинникова. – 2024. – Т. 20. – №. 1. – С. 73-81. – URL: [https://biorosinfo.ru/upload/file/journal_75_20_\(3\).pdf](https://biorosinfo.ru/upload/file/journal_75_20_(3).pdf) (дата обращения: 15.06.2024).

16. Быстрый, Н.Ф. Основные критерии и схемы классификации бактериофагов, активных к холерным вибрионам классического и Эльтор биотипов / Н.Ф. Быстрый, М.С. Дрожевкина // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. Прага. – 1979; – Т. 23. – № 1. – С. 77-85.

17. Викторов, Д.А. Разработка методики дифференцирования умеренных и вирулентных бактериофагов / Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.]. // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. – 2013. – С. 32-37.

18. Власов, В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине / В.В. Власов, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова. – Текст: электронный // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – № 11. – С. 1587–1600. – URL:

<https://www.elibrary.ru/item.asp?doi=10.31857/S0320972520110068> (дата обращения: 7.02.2023).

19. Воробьев, А.М. Определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов бактериофагов ECD7, AM24, AP22, SI3 и ST11 / А.М. Воробьев, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин [и др.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170. – № 11. – С. 597–601.
20. Габриелович, И.М. Практическое пособие по бактериофагам. – Минск: Вышэйш. школа, 1968. – 180 с.
21. Гаевская, Н.Е. Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных для человека вибрионов / Н.Е. Гаевская, Т.А.Кудрякова, Л.Д. Македонова [и др.]. – Текст: электронный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 4. – С. 62–64. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/identifikatsiya-i-differentsiatsiya-bakteriofagov-patogennyh-dlya-cheloveka-vibrionov> (дата обращения: 14.03.2021).
22. Гаевская, Н.Е. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами / Н.Е. Гаевская, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина [и др.]. // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – №3. – С. 11–15.
23. Гаевская, Н.Е. Характеристика биологических свойств холерных и параземолитических бактериофагов: Автореферат дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Гаевская Наталья Евгеньевна. – Волгоград, 2013. – 25 с. – Текст: непосредственный.
24. Георгадзе, И.А. / И.А. Георгадзе, Е. Г. Макашвили // Грузинская советская энциклопедия: в 12 т. – Тбилиси: Комбинат печати Государственного Комитета Совета Министров Грузинской ССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 1979. – Т. 4. – С. 125.
25. Головин, С.Н. Пожиратели бактерий: убийцы в роли спасителей / С.Н. Головин. – Текст: электронный // Биомолекула. – 2016. – URL: <https://www.biomolecula.ru/articles/pozhirateli-bakterii-ubiitsy-v-rol-i-spasitelei> (дата обращения: 06.06.2024).

26. Городничев, Р.Б. Сравнение методов очистки фаговых лизатов грамотрицательных бактерий для персонализированной терапии / Р.Б. Городничев, М.А. Корниенко, Н.С. Купцов [и др.]. – Текст: электронный // Медицина экстремальных ситуаций. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С. 30-37. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnenie-metodov-ochistki-fagovyh-lizatov-gramotritsatelnyh-bakteriy-dlya-personalizirovannoy-terapii> (дата обращения: 06.06.2024).
27. Горшенин, А.В. Участие микробиологов З.В. Ермольевой и Л.М. Якобсон в научной дискуссии о судьбе производства советских холерных бактериофагов в 1967 году / А.В. Горшенин. – Текст: электронный // Самарский научный вестник. – 2021. – Т. 10. – № 4. – С. 201–207. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/uchastie-mikrobiologov-z-v-ermolievoy-i-l-m-yakobson-v-nauchnoy-diskussii-o-sudbe-proizvodstva-sovetskih-holernyh-bakteriofagov-v> (дата обращения: 13.03.2022).
28. Горяев, А.А. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры / А.А. Горяев, Саяпина Л.В., Обухов Ю.И [и др.]. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18. – № 1. – С. 42-49. – URL: https://www.biopreparations.ru/jour/article/view/120?locale=ru_RU (дата обращения: 28.11.2020).
29. ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. – М.: Стандартинформ, 2016. – 12 с. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200127789> (дата обращения: 17.01.2021). – Текст: электронный.
30. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. ОФС.1.7.1.0002.15 Т. II. Бактериофаги.– URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/707/> (дата обращения: 13.02.2025). — Текст: электронный.
31. Д’Эрелль, Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления / Ф. Д’Эрелль. // Тифлис: Тифлисский государственный университет. – 1935. – С. 262.
32. Давидович, Н.В. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у

- бактерий / Н.В. Давидович, Н.Н. Кукалевская, Е.Н. Башилова [и др.]. – Текст: электронный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65. – № 6. – С. 387-393. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osnovnye-printsipy-evolyutsii-antibiotikorezistentnosti-u-bakteriy-obzor-literatury/viewer> (дата обращения: 8.06.2021).
33. Давыдов, Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века / Д.С. Давыдов. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18. – №1. – С. 50-56. – URL: <https://www.biopreparations.ru/jour/article/view/121/42> (дата обращения: 21.11.2022).
34. Давыдов, Д.С. Особенности государственной регистрации и обеспечения качества лекарственных препаратов бактериофагов в Российской Федерации / Д.С. Давыдов, Р.Л. Парфенюк, З.В. Дурманова [и др.]. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2023. – Т. 23. – № 2. – С. 181-193. – URL: <https://www.biopreparations.ru/jour/article/view/412/698> (дата обращения: 14.11.2023).
35. Даудова, А.Д. Антибиотикорезистентность. Вызов современности / А.Д. Даудова, Ю.З. Демина, Г.Н. Генатулина [и др.]. – Текст: электронный // Антибиотики и химиотерапия. – 2023. – Т. 68. – № 3-4. – С. 66-75. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/1021/907> (дата обращения: 27.02.2024).
36. Даудова, А.Д. Механизмы антифаговой защиты прокариотов / А.Д. Даудова, Ю.З. Демина, Р.О. Абдрахманова [и др.]. – Текст: электронный // Антибиотики и химиотерапия. – 2024. – Т. 69. – № 5-6. – С. 63-71. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/1021/907> (дата обращения: 13.01.2025).
37. Доскин, В.А. Необыкновенные факты из биографии З.В. Ермольевой / В.А. Доскин, И.А. Власов // Врач. – 2012. – № 6. – С. 86-88.
38. Дрожевкина, М.С. Классификация холерных фагов / М.С. Дрожевкина, А.Г. Сомова, Н.Ф. Быстрый [и др.]. // Проблемы особо опасных инфекций. – 1973. – № 3. – С. 44-51.

39. Дрожевкина, М.С. Некоторые данные по характеристике фагов, выделенных в очагах холеры / М.С. Дрожевкина, Т.И. Харитонов, Ю.И. Арутюнов // Проблемы особо опасных инфекций. – 1973. – № 3. – С. 51-54.
40. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей. ETS N 123. – Страсбург, 1986. – 13 с. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/901909691> (дата обращения 12.08.2021). – Текст: электронный.
41. Ермольева, З.В. Холера / З.В. Ермольева // – М.: Медгиз. – 1942. – 123 с.
42. Заднова, С.П. Выявление фагоиндуцируемых мобильных генетических элементов в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор / С.П. Заднова, Н.А. Плеханов, А.Ю. Спирина [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 2. – С. 112-119. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1828/1387> (дата обращения 04.12.2023).
43. Захарова, И.Н. Дифференциальный диагноз инфекционных водянистых диарей (взгляд из глубины веков до настоящего времени). Современные подходы к регидратации / И.Н. Захарова, И.В. Бережная, А.Т. Камилова, Д.К. Дмитриева [и др.]. – Текст: электронный // Медицинский совет. – 2021. – № 11. – С. 188-200. – URL: <https://www.med-sovet.pro/jour/article/view/6307/5718> (дата обращения 17.03.2022).
44. Зубаров, А.Ю. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов / А.Ю. Зубаров, Н.Н. Каркищенко, Д.В. Попов [и др.]. – Текст: электронный // Биомедицина. – 2012. – № 1. – С. 134-138. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sozдание-otechestvennoy-kollektsii-bakteriofagov-i-printsipy-razrabotki-lechebno-profilakticheskikh-fagovyh-preparatov/viewer> (дата обращения 21.06.2021).
45. Зуева, Л.П. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, В.Г. Акимкин. – Текст: электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии – 2014. – № 3. – С. 100-107. – URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyy-vzglyad-na-rol-bakteriofagov-v-evolyutsii-gospitalnyh-shtammov-i-profilaktike-infektsiy-svyazannyh-s-okazaniem-meditinskoy/viewer> (дата обращения 01.11.2019).

46. Иванова, И.А. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И.А. Иванова, А.А Труфанова, А.В. Филиппенко [и др.]. – Текст: электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 79–84. – URL: <https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/499/371> (дата обращения 27.01.2020).

47. Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерных микробов. – Саратов, 1982. – 8 с.

48. Кажал, Н. Из истории борьбы против микробов и вирусов / Н. Кажал, Р. Ифтимович // Бухарест: Научное издательство. – 1968. – 404 с.

49. Каргина, Т.М. Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты-бактериофаги / Т.М. Каргина, Е.И. Саканян, Д.С. Давыдов [и др.]. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 233-241. – URL: <https://www.biopreparations.ru/jour/article/view/237/247> (дата обращения 04.02.2020).

50. Карнаухов, И.Г. Осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки и риск возникновения чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия при стихийных бедствиях и антропогенных катастрофах / И.Г. Карнаухов, В.А. Старшинов, В.П. Топорков [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 2 – С. 9-15. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/786/737> (дата обращения 12.05.2020).

51. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / под общ. ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе (пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Латаров). – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.

52. Киселева, И.А. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием

медицинской помощи: пути повышения эффективности / И.А. Киселева. – Текст: электронный // Материалы II Национального конгресса бактериологов. Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 43–44. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bakteriofagi-v-profilaktike-infektsiy-svyazannyh-s-okazaniem-meditsinskoj-pomoschi-puti-povysheniya-effektivnosti/viewer> (дата обращения: 09.07.2020).

53. Киселева, И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Киселева Ирина Александровна. – Москва, 2015. – 26 с. – Текст: непосредственный.

54. Конькова, Л.С. Бактериофаги: прошлое, настоящее, будущее / Л.С. Конькова, Л.А. Краева, О.А. Бургасова [и др.]. – Текст: электронный // Vrach (Doctor). – 2022. – Т. 33. – № 2. – С. 21-26. – URL: <https://vrachjournal.ru/sites/default/files/fulltext-pdf/25877305-2022-02-03.pdf> (дата обращения: 10.04.2023).

55. Коровкина, Г.И. Холерные фаги XII серотипа / Г.И. Коровкина, Т.Б. Караваева, В.П. Мороз [и др.]. // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики ООИ. – 1991. – С. 126-131.

56. Красильников, И.В. Некоторые аспекты современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебнопрофилактических препаратов бактериофагов / И.В. Красильников, А.К. Лобастова, К.А. Лыско. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2010. – Т. 2. – № 38. – С. 28-33. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nekotorye-aspekty-sovremennogo-sostoyaniya-i-perspektivnyh-napravleniy-razvitiya-proizvodstva-i-primeneniya-lechebno/viewer> (дата обращения: 20.09.2019).

57. Кретенчук, О.Ф. Эффективные средства в борьбе с холерой в эпоху антибиотикорезистентности / О.Ф. Кретенчук, М.В. Полеева, В.А. Коршенко [и др.]. – Текст:

электронный // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – Вып. 18. – № 4. – С. 72-82. – URL: https://biorosinfo.ru/upload/file/journal_v18_no4_22.pdf (дата обращения: 28.03.2023).

58. Крицкий, А.А. Способ одновременного выявления штаммов *Vibrio cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в режиме реального времени / А.А. Крицкий, Н.Б. Челдышова, С.П. Заднова [и др.]. // Биотехнология. – 2018. – Т. 34. – №. 2. – С. 70-79.

59. Кудрякова, Т.А. Бактериофаги патогенных вибрионов и их применение / Т.А. Кудрякова, Ю.М. Ломов, Б.Н. Мишанькин // «Холера»: Материалы VIII Российской научно-практической конференции по проблеме. – Ростов-на-Дону, 2003. – С. 208-210.

60. Кудрякова, Т.А. Изучение биологических свойств холерных фагов и штаммов вибрионов Эль-Тор, выделенных из внешней среды Донецка / Т.А. Кудрякова, Е.И. Евтеева, Л.Д. Македонова [и др.]. // Гигиена и санитария. –1993. – № 12. – С. 14-17.

61. Кудрякова, Т.А. Использование бактериофага в сочетании с глюкосоланом и молочнокислой культурой штамма лактобацилл при лечении экспериментальной холеры. / Т.А. Кудрякова, В.П. Авроров, В.Д. Кругликов [и др.]. // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Сборник материалов проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2002. – Вып.15. – С. 111–113.

62. Кудрякова, Т.А. Испытание антибактериальной активности музейных рас холерных бактериофагов и ее изменение при пассажах *in vivo* / Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина [и др.]. // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Сборник материалов проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2003. – Вып. 18. – С. 147–150.

63. Кудрякова, Т.А. Лизогенные системы и свойства умеренных холерных фагов / Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина // «Современный эпидемиологический потенциал природных очагов чумы»: Сборник материалов международной научно-практической конференции. – Казахстан, 2001. – Вып. 3. – С. 165–167.

64. Кудрякова, Т.А. Поиск вирулентных фагов для лечения экспериментальной холеры / Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина [и др.]. // «Проблемы биологической и экологической безопасности»: Сборник материалов международной научной конференции. – Оболенск, 2000. – С. 57–58.
65. Кудрякова, Т.А. Применение бактериофага при лечении экспериментальной холеры / Т.А. Кудрякова, Ю.М. Ломов, Б.Н. Мишанькин [и др.]. // «Холера»: Сборник материалов VII Российской научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2003. – С. 216–219.
66. Кулагина, М.Г. Холера / М.Г. Кулагина. – Текст: электронный // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2013. – № 4 (5). – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/holera-1/viewer> (дата обращения: 13.06.2019)
67. Лабинская, А.С. Практикум по микробиологическим методам исследования / А.С. Лабинская. – М.: Медгиз, 1963. – 443 с.
68. Летаров, А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. – М.: ТД ДеЛи, 2019. – 384 с.
69. Ломов, Ю.М. Холерные фаги / Ю.М. Ломов, А.Г. Сомова, Т.А. Кудрякова // Ростовский государственный научно-исследовательский противочумный институт МЗ СССР. – Ростов н/Д: Б. и., 1990. – 159 с.
70. Лыско, К.А. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: краткий обзор производства и применения / К.А. Лыско, Е.В. Отрашевская, Г.М. Игнатъев. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2013. – № 4. – С. 4–9. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/lechebno-profilakticheskie-preparaty-bakteriofagov-kratkiy-obzor-proizvodstva-i-primeneniya/viewer> (дата обращения: 23.04.2019).
71. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрыбина. – М.: Мир, 1984. – 458 с.

72. Маркин, Ю. Путь к здоровью без антибиотиков / Ю. Маркин, С. Редько, Е. Клёнкина. – Текст: электронный // Животноводство России. – 2020. – С. 52–54. – URL: <https://static.zzr.ru/public/article/pdf/zzr-2020-09-012.pdf> (дата обращения: 21.05.2021).
73. Маркина, О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Маркина Ольга Владимировна. – Ставрополь, 2008. – 22 с.– Текст: непосредственный.
74. Марьина, Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага / Ю.Н. Марьина // Труды Ростовского противочумного института. – 1941. – Т. 2. – С. 3–7.
75. Миронова, Л.В. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов *ctxAB-tcpA+ Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на эндемичной по холере территории / Л.В. Миронова, Н.О. Бочалгин, А.С. Гладких [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 1. – С. 115–123. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1288/1094> (дата обращения: 11.09.2020).
76. Михалёва, Т.В. Антибиотикорезистентность: современные подходы и пути преодоления / Т.В. Михалёва, О.И. Захарова, П.В. Ильясов. – Текст: электронный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 124–132. – URL: <https://sciencejournals.ru/view-article/?j=prikbio&y=2019&v=55&n=2&a=PrikBio1902011Mikhaleva> (дата обращения: 21.04.2021).
77. Монахова, Е.В. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? / Е.В. Монахова, А. Ghosh, А. Mutreja [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 3. – С. 17–26. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1359/1138> (дата обращения: 11.12.2020).
78. Москвитина, Э.А. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. / Э.А. Москвитина, Е.Г.

Янович, В.Д. Кругликов [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 64-73. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1126/1014> (дата обращения: 09.12.2020).

79. Москвитина, Э.А. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Янович, М.Л. Куриленко [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 38-47. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1317/1110> (дата обращения: 09.12.2020).

80. МУК 4.2.3745-22 Методы лабораторной диагностики холеры: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. – 19 с. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/350413501> (дата обращения: 06.12.2023). – Текст: электронный

81. Мустафин, А.Х. Биотехнологические параметры разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* в пищевом 189 сырье и продуктах питания: Автореферат дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Мустафин Али Хамзеевич. – Саратов, 2012. – 17 с. – Текст: непосредственный.

82. Начаров, П.В. Общая характеристика, результаты и перспективы клинического применения бактериофаговой терапии / П.В. Начаров, А.А. Кривопапов, Т.И. Шустова. – Текст: электронный // Медицинский совет. – 2023. – Т. 17. – № 7. – С. 170-175. – URL: <https://www.med-sovet.pro/jour/article/view/7519/6702> (дата обращения: 02.02.2024).

83. Носков, А.К. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, А.А. Лопатин [и др.]. – Текст: электронный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98. – № 2. – С. 163-175. – URL: <https://microbiol.crie.ru/jour/article/view/1003/584> (дата обращения: 27.03.2022).

84. Носков, А.К. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г / А.К. Носков, В.Д. Кругликов,

Э.А Москвитина [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 43-51. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1437/1188> (дата обращения: 12.01.2022).

85. Носков, А.К. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 56-66. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1790/1360> (дата обращения: 09.06.2023).

86. Носков, А.К. Холера: тенденции развития эпидемического процесса в 2021 г., прогноз на 2022 г / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 1. – С. 24-34. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1654/1272> (дата обращения: 09.06.2023).

87. Онищенко, Г.Г. Совершенствование эпидемиологического надзора за холерой в России в период седьмой пандемии (сообщение II) / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов [и др.]. – Текст: электронный // Здоровье населения и среда обитания. – 2015г. – № 10. – С. 47-51. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskiiy-nadzor-za-holeroj-v-rossii-v-period-sedmoj-pandemii/viewer> (дата обращения: 30.08.2020).

88. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль-Тор в г. Владивосток / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 5. – С. 26-31.

89. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов [и др.]. – Текст: электронный // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70. – № 2. – С. 249-256. – URL: <https://vestnikramn.spr-journal.ru/jour/article/viewFile/63/454> (дата обращения: 30.08.2020).

90. Остроумова, Н.М. Роль умеренных фагов в популяционной изменчивости холерного вибриона / Н.М. Остроумова // Проблемы особо опасных инфекций. – 1993. – № 3 (73). – С. 114-126.
91. Перепанова, Т.С. Терапевтическое применение бактериофагов: назад в будущее / Т.С. Перепанова, А.В. Казаченко, П.Л. Хазан [и др.]. – Текст: электронный // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23. – № 1. – С. 55-64. – URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_46170158_70714242.pdf (дата обращения: 27.08.2022).
92. Попов, Д.В. Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита: Автореферат дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Попов Денис Викторович. – Москва, 2003. – 29 с. – Текст: непосредственный.
93. Попова, А.Ю. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. / А.Ю. Попова, А.К. Носков, Е.Б. Ежлова [и др.]. – Текст: электронный // Проблемы особо опасных инфекций. —2024. — №1. — С. 76-88. – URL: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1947/1468> (дата обращения: 13.06.2024).
94. Программа «PhageAnalyzer» / М.П. Погожова, А.С. Водопьянов, Н.Е. Гаевская [и др.]. // Свидетельство о государственной регистрации № 2019616060 от 17.05.2019. – URL: <https://antiplague.ru/upload/medialibrary/e66/iacrpr0exyz042015qe9bas1z3rquerywm.pdf> (дата обращения: 27.08.2022). – Текст: электронный.
95. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / С.В. Яковлева, Н.И. Брико, С.В. Сидоренко, [и др.]. – М.: Перо, 2018. – 156 с. – URL: <https://antimicrob.net/wp-content/uploads/skat.pdf> (дата обращения: 15.04.2020). – Текст: электронный.
96. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. - Москва, 2014. – 39 с. – URL:

https://microbius.ru/uploads/document/file/67/racionalnoe_-primenenie_-bakteriofagov_-v_-lechebnoj-i.pdf (дата обращения: 18.07.2020). – Текст: электронный.

97. Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза". – URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0089/> (дата обращения: 24.11.2020). – Текст: электронный

98. Руководство по экспериментальным (доклиническим) исследованиям новых фармакологических веществ/ Р.У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=19116235> (дата обращения: 16.02.2019). – Текст: электронный.

99. Савельева, И.В. Холера эль тор на современном этапе седьмой пандемии: эволюция возбудителя, клинико-эпидемиологические особенности, лабораторная диагностика / И.В. Савельева, А.Н. Куличенко, В.Н. Савельев [и др.]. – Текст: электронный // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11. – № 5. – С. 917-926. – URL: https://iimmun.ru/iimm/article/view/1476/1335/ru_RU#! (дата обращения: 18.07.2020).

100. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (в ред. N 4 от 25.05.2022, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021). – Роспотребнадзор РФ, 2021. – URL: (дата обращения: 06.09.2022). – Текст: электронный.

101. Селянская, Н.А. Анализ устойчивости к антибактериальным препаратам холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в России в 2019 г / Н.А. Селянская, Л.А. Егиазарян, М.И. Ежова [и др.]. – Текст: электронный // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т. 66. – № 3-4. – С. 4-11. – URL: <https://www.antibiotics-chemotherapy.ru/jour/article/view/799/772> (дата обращения: 26.01.2022).

102. Селянская, Н.А. Антибиотикорезистентность *Vibrio cholerae* El Tor, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / Н.А. Селянская, Л.А. Егиазарян, А.В. Тришина [и др.]. – Текст: электронный // Здоровье населения и среда обитания. – 2019. – № 3 (312). – С. 61-64. – URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnost-vibrio-cholerae-el-tor-izolirovannyh-iz-obektov-okruzhayuschey-sredy-na-territorii-rossiyskoy-federatsii/viewer> (дата обращения: 11.01.2021).

103. Селянская, Н.А. Динамика антибиотикорезистентности холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории РФ в 2012-2016 гг. / Н.А. Селянская, Л.А. Егiazарян, Л.М. Веркина // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области: Сборник материалов региональной научно практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2017. – С. 151-154.

104. Синягина, Ю.В. Современный обзор производства диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов / Ю.В. Синягина, М.В. Овчинникова, О.С. Зинина [и др.]. – Текст: электронный // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени ЮА Овчинникова. – 2022. – Т. 18. – № 4. – С. 62–71. – URL: https://biorosinfo.ru/upload/file/journal_v18_no4_22.pdf (дата обращения: 08.03.2023).

105. Смирнова, Н.И. Генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7 пандемии холеры / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, С.П. Заднова [и др.]. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 3–10.

106. Смирнова, Н.И. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран / Н.И. Смирнова, Е.Ю. Агафонова, Е.Ю. Щелканова [и др.]. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – № 36 (2). – С. 76-84.

107. Титова, С.В. Ситуация по холере в мире в 2018 году, прогноз на 2019 год научное обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов [и др.]. // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Сборник материалов проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2019. – Вып. 32. – С. 12-21.

108. Титова, С.В. Современные подходы к мониторингу / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, Р.В. Писанов [и др.]. // «Холера и патогенные для человека вибрионы»: Сборник материалов проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. – С. 10-17.
109. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Наука, 1968. – 89 с.
110. Урбанович, Л.Я. Современные представления об эпидемиологии, клинико-лабораторной диагностике и дифференцированном объеме противохолерных мероприятий / Л.Я. Урбанович // Материалы семинара по санитарной охране территории РФ от завоза и распространения железнодорожным транспортом особо опасных инфекционных болезней. – Иркутск, 2006. – С. 57-77.
111. Чащина, И.Л. Типичные ошибки антибиотикотерапии у детей / И.Л. Чащина. – Текст: электронный // Практика педиатра. – 2014. – №. 2. – С. 19-23. – URL: <https://medi.ru/docplus/j01140319.pdf> (дата обращения: 21.04.2020).
112. Ющук, Н.Д. Острые диарейные инфекции: принципы рациональной терапии / Н.Д. Ющук, М.Г. Кулагина, С.А. Шутько, Л.Ц. Митрикова. – Текст: электронный // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2019. – Т. 8. – № 4 (31). – С. 103-108. – URL: https://infect-disease-journal.ru/ru/jarticles_infection/655.html?SSr=500134628f09ffffff27c__07e50313093238-4f1e (дата обращения: 21.04.2020).
113. Ярцев, В.В. Основы гистологической техники для зоологов: учебно-методическое пособие / В.В. Ярцев // Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. – 84 с.
114. Ackermann, H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987 / H.W. Ackermann // Microbiological Sciences. – 1987. – Vol. 4 (7). – P. 214-218.
115. Ahmadi, M.H. Global status of tetracycline resistance among clinical isolates of *Vibrio cholerae*: a systematic review and meta-analysis / M.H. Ahmadi. – Text: electronic // Antimicrobial Resistance & Infection Control. – 2021. – Vol. 10 (1). – P. 1-12. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8343947/> (date accessed: 14.02.2025).

116. Almagro-Moreno, S. Cholera: environmental reservoirs and impact on disease transmission / S. Almagro-Moreno, R.K. Taylor. – Text: electronic // *Microbiology Spectrum*. – 2013. – Vol. 1(2). – P. OH-0003-2012. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4321695> (date accessed: 01.04.2025).
117. Alomari, M.M.M. Therapeutic and prophylactic effect of the experimental bacteriophage treatment to control diarrhea caused by *E. coli* in newborn calves / M.M.M. Alomari, M. Dec, A. Nowaczek [et al.]. – Text: electronic // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 7 (8). – P. 2093-2101. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8369487/> (date accessed: 14.02.2025).
118. Bagheri-Josheghani, S. Prevalence of antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: a meta-analysis / S. Bagheri-Josheghani, B. Bakhshi, M. Mousavi. – Text: electronic. – 2021. – URL: <https://www.researchsquare.com/article/rs-208720/v1> (date accessed: 14.02.2025).
119. Barman, R.K. Screening of potential *Vibrio cholerae* bacteriophages for cholera therapy: A comparative genomic approach / R.K. Barman, A.K. Chakrabarti, S. Dutta. – Text: electronic // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9002330/> (date accessed: 12.02.2024).
120. Bhandare, S. Reviving phage therapy for the treatment of cholera / S. Bhandare, J. Colom, A. Baig [et al.]. – Text: electronic // *The Journal of infectious diseases*. – 2019. – Vol. 219 (5). – P. 786-794. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7610978/> (date accessed: 14.02.2024).
121. Bhandare, S.G. Complete genome sequences of *Vibrio cholerae*-specific bacteriophages 24 and X29 / S.G. Bhandare, A. Warry, R.D. Emes. – Text: electronic // *Genome Announc.* – 2017. – Vol. 5, № 46. – e01013-17. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5690320/> (date accessed: 14.02.2024).
122. Bhowmick, T.S. Pathogenic potential of vibriophages against an experimental infection with *Vibrio cholerae* O1 in the RITARD model / T.S. Bhowmick, H. Koley, M. Das [et al.]. – Text: electronic // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – Vol. 33 (6).

- P. 569-573. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857908005918?via%3Dihub> (date accessed: 14.02.2022).
123. Borysowski, J. The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy / J. Borysowski, K. Dabrowska, M. Ohams // «Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics»: Conference dedicated to the 120th birth anniversary of Professor George Eliava. Abstract book. Tbilisi, Georgia. – 2012. – 33 p.
124. Box, A.M. Functional analysis of bacteriophage immunity through a type I CRISPR-Cas system in *Vibrio cholerae* and its application in bacteriophage genome engineering / A.M. Box, M.J. McGuffie, B.J. O'Hara [et al.]. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 2016. – Vol. 198 (3). – P. 578-590. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4719448/> (date accessed: 24.06.2024).
125. Boyd, C.M. Bacteriophage ICP1: a persistent predator of *Vibrio cholera* / C.M. Boyd, A. Angermeyer, S.G. Hays [et al.]. – Text: electronic // Annual review of virology. – 2021. – Vol. 8. – P. 285-304. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9040626/> (date accessed: 14.02.2025).
126. Brussow, H. Phages of dairy bacteria / H. Brussow. – Text: electronic // Annual Review of Microbiology. – 2001. – Vol. 55. – P. 283-284. – URL: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.55.1.283/> (date accessed: 14.02.2025).
127. Bruttin, A. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy / A. Bruttin, H. Brüssow // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – T. 49. – №. 7. – C. 2874-2878.
128. Burrows, W. Animal models of cholera / W. Burrows, R.B. Sack // Cholera / Ed. D. Barua, W. Burrows // Philadelphia. – 1974. – Ch.9. – P. 189-205.
129. Caflisch, K.M. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review / K.M. Caflisch, G.A. Suh, R. Patel. – Text: electronic // Expert review of anti-infective therapy. – 2019. – Vol. 17 (12). – P. 1011-1041. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6919273/> (date accessed: 14.02.2023).

130. Cervený, K.E. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* iron-dextran-treated mice / K.E. Cervený, A. Depaola, D.H. Duckworth [et al.]. – Text: electronic // *Infection and Immunity*. – 2002. – Vol. 70. – P. 6251-6262. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC130292/> (date accessed: 14.02.2023).
131. Chan, B.K. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa* / B.K. Chan, P.E. Turner, S. Kim [et al.]. – Text: electronic // *Evolution, medicine, and public health*. – 2018. – Vol. 2018 (1). – P. 60-66. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5842392> (date accessed: 24.04.2022).
132. Chanda, P.K. Characteristics of a cholera phage / P.K. Chanda, N.C. Ghosh. – Text: electronic // *Archives of microbiology*. – 1978. – Vol. 119 (3). – P. 303-304. – URL: <https://sci-hub.ru/10.1007/BF00405410> (date accessed: 14.02.2025).
133. Chanishvili, N. Early therapeutic and prophylactic uses of bacteriophages / N. Chanishvili, Z. Alavidze. – Text: electronic // *Bacteriophages: biology, technology, therapy*. – 2021. – P. 401-429. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27090515> (date accessed: 06.05.2022).
134. Chegini, Z. Bacteriophage therapy for inhibition of multi drugresistant uropathogenic bacteria: a narrative review / Z. Chegini, A. Khoshbayan, S. Vesal [et al.]. – Text: electronic // *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. – 2021. – Vol. 20 (1). – P. 1-13. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8077874> (date accessed: 16.12.2023).
135. Chibani-Chennoufi, S. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy / S. Chibani-Chennoufi, J. Sidoti, A. Bruttin [et al.]. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2004. – T. 48. – №. 7. – C. 2558-2569.
136. Cholera prevention and control // Seventy-first world health assembly, Agenda item 11.2. 26 May 2018. (WHA71.4). – URL: http://apps.who.int/gb/eb-wha/pdf_files/WHA71/A71_R4-en.pdf. (date accessed: 16.05.2023). – Text: electronic.
137. Cholera, 2017 // *WklyEpidem. Rec.* – WHO, 2018. – No 93 (38). – P. 489-497. – Text: electronic. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf?ua=1> (date accessed: 08.06.2022).
138. Clarke, A.L. The safety and efficacy of phage therapy for bone and joint infections: a

systematic review / A.L. Clarke, S. De Soir, J.D. Jones. – Text: electronic // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9 (11). – P. 795. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7697170> (date accessed: 11.02.2023).

139. Comeau, A.M. Phage morphology recapitulates phylogeny: the comparative genomics of a new group of dwarf myoviruses / A.M. Comeau, D. Tremblay, S. Moineau. – Text: electronic // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7 (7). – e40102. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3391216> (date accessed: 26.01.2023).

140. Dąbrowska, K. Pharmacologically aware phage therapy: pharmacodynamic and pharmacokinetic obstacles to phage antibacterial action in animal and human bodies / K. Dąbrowska, S.T. Abedon. – Text: electronic // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2019. – Vol. 83. – №. 4. – P. 10.1128/mmbr. 00012-19. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31666296> (date accessed: 13.06.2023).

141. D'Andrea, M.M. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage / M.M. D'Andrea, P. Marmo, L.H. Angelis. – Text: electronic // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5453958> (date accessed: 16.05.2022).

142. Das, B. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms / B. Das, J. Verma, P. Kumar [et al.]. – Text: electronic // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 1. – P. 83-92. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19307935?via%3Dihub> (date accessed: 16.07.2023).

143. De Miguel, T. Bacteriophages and lysins as possible alternatives to treat antibiotic-resistant urinary tract infections / T. De Miguel, J.L.R. Rama, C. Sieiro [et al.]. – Text: electronic // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9 (8). – P. 466. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7460213> (date accessed: 10.02.2025).

144. Dedrick, R.M. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* / R.M. Dedrick, C.A. Guerrero-Bustamante, R.A. Garlena [et al.]. – Text: electronic // *Nature medicine*. – 2019. – Vol. 25 (5). – P. 730-

733. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6557439/> (date accessed: 10.02.2025).
145. Deen, J. Epidemiology of cholera / J. Deen, M.A. Mengel, J.D. Clemens. – Text: electronic // Vaccine. – 2020. – Vol. 38. – P. 31-40. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19309995?via%3Dihub> (date accessed: 18.02.2025).
146. Domman, D. Integrated view of *Vibrio cholera* in the Americas / D. Domman, M.L. Quilici, M.J. Dorman [et al.]. – Text: electronic // Science. – 2017. – Vol. 358(6364). – P. 789-793. – URL: https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao2136?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed (date accessed: 11.03.2024).
147. Dutilh, B.E. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes / B.E. Dutilh, N. Cassman, K. McNair [et al.]. – Text: electronic // Nature communications. – 2014. – Vol. 5 (1). – P. 4498. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4111155> (date accessed: 10.12.2022).
148. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholera* / S.M. Faruque, M.J. Albert [et al.]. – Text: electronic // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1998. – Vol. 62 (4). – P. 1301-1314. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC98947> (date accessed: 14.02.2022).
149. Faruque, S.M. Role of phages in the epidemiology of cholera / S.M. Faruque. – Text: electronic // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2014. – Vol. 379. – P. 165-180. – URL: <https://link.springer.com/chapter/10.1007> (date accessed: 10.08.2023).
150. Faruque, S.M. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics. Role of host-mediated amplification of phage / S.M. Faruque, M.J. Islam, Q.S. Ahmad [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2005. – Vol. 102 (17). – P. 6119-6124. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1087956> (date accessed: 23.08.2022).
151. Fasano, A. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions / A. Fasano, B. Baudry, D.W. Pumphlin [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1991. – Vol. 88 (12). – P. 5242-5246. –

URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC51848> (date accessed: 13.10.2022).

152. Fasano, A. Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro / A. Fasano, C. Fiorentini, G. Donelli [et al.]. – Text: electronic // Journal of Clinical Investigation. – 1995. – Vol. 96(2). – P.710-720. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC185254> (date accessed: 01.04.2024).

153. Felsenfeld, O. Notes on food, beverages and fomites contaminated with *Vibrio cholerae* / O. Felsenfeld. – Text: electronic // Bulletin of the World Health Organization. – 1965. – Vol. 33 (5). – P. 725. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2475869> (date accessed: 23.01.2025).

154. Ferry, T. Case report: Arthroscopic “Debridement antibiotics and implant retention” with local injection of personalized phage therapy to salvage a relapsing *Pseudomonas aeruginosa* prosthetic knee infection / T. Ferry, C. Kolenda, C. Batailler [et al.]. – Text: electronic // Frontiers in Medicine. – 2021. – Vol. 8. – P. 569159. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8132876> (date accessed: 12.02.2024).

155. Ferry, T. Personalized bacteriophage therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection / T. Ferry, C. Kolenda, F. Laurent [et al.]. – Text: electronic // Nature communications. – 2022. – Vol. 13 (1). – P. 4239. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9306240> (date accessed: 23.01.2025).

156. Fish, R. Resolving digital staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage — A case report / R. Fish, E. Kutter, D. Bryan [et al.]. – Text: electronic // Antibiotics. – 2018. – Vol. 7 (4). – P. 87. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6316425> (date accessed: 22.01.2025).

157. Furfaro, L.L. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles / L.L. Furfaro, M.S. Payne, B.J. Chang. – Text: electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2018. – Vol. 23 (8). – P. 376. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6205996> (date accessed: 11.07.2022).

158. G20 Leaders’ Declaration: Shaping an interconnected world. – Hamburg, 2017. –

URL: <https://www.g20.org/en/g20/timeline> (дата обращения: 07.09.2023). – Text: electronic.

159. Gaevskaya, N.E. Bacteriophages of pathogenic vibrios, identification, differentiation / N.E. Gaevskaya, T.A. Kudryakova, L.D. Makedonskaya. – Text: electronic // Bacteriophages: an overview and synthesis of a re-emerging field. New York: Nova Science Publishers, 2016. – P. 1-30. — URL: <https://www.researchgate.net/publication/318837662> (date accessed: 21.11.2022).

160. Gordillo Altamirano, F.L. Phage therapy in the postantibiotic era / Altamirano F.L. Gordillo, J.J. Barr. – Text: electronic // Clinical Microbiology Reviews. – 2019. – Vol. 32 (2). – P. 66-91. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6431132> (date accessed: 21.01.2023).

161. Górski, A. Phage as a modulator of immune responses: Practical implications for phage therapy / A. Górski, R. Międzybrodzki, J. Borysowski [et al.]. – Text: electronic // Advances in Virus Research. – 2012. – Vol. 83. – P. 41-47. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123944382000025?via%3Dihub> (date accessed: 21.01.2021).

162. Górski, A. Phage Therapy: Towards a successful clinical trial / A. Górski, J. Boryoski, R. Międzybrodzki. – Text: electronic // Antibiotics (Basel). – 2020. – Vol. 9 (11). – P. 827-834. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7699228> (date accessed: 18.08.2024).

163. Górski, A. Phages and immunomodulation / A. Górski. – Text: electronic // Future Microbiology. – 2017. – Vol. 12 (10). – P. 905-914. – URL: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb-2017-0049?rfr_dat=cr_pub++0pub-med&url_ver=Z39.88003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org (date accessed: 28.12.2023).

164. Granowitz, E.V. Antibiotic adverse reactions and drug interactions / E.V Granowitz, R.B. Brown. – Text: electronic // Critical Care Clinics. – 2008. – Vol. 24. – P. 421-422. – URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1016/j.ccc.2007.12.011> (date accessed: 12.05.2023).

165. Hill, D.R. Oral cholera vaccines: use in clinical practice / D.R. Hill, L. Ford, D.G. Lalloo. – Text: electronic // The Lancet infectious diseases. – 2006. – Vol. 6 (6). – P. 361-

373. – URL: [https://www.sci-hub.ru/10.1016/S1473-3099\(06\)70494-7](https://www.sci-hub.ru/10.1016/S1473-3099(06)70494-7) (date accessed: 13.07.2024).
166. Hodyra-Stefaniak, K. Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo / K. Hodyra-Stefaniak, P. Miernikiewicz, J. Drapała [et al.]. – Text: electronic // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 14802. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4594097> (date accessed: 13.02.2024).
167. Hsueh, B.Y. Combating cholera / B.Y. Hsueh, C.M. Waters. – Text: electronic // F1000Research. – 2019. – Vol. 8. – P. 1-8. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6492228> (date accessed: 13.02.2025).
168. Huh, H. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications / H. Huh, S. Wong, J.S. Jean [et al.]. – Text: electronic // Advanced drug delivery reviews. – 2019. – Vol. 145. – P. 4-17. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X19300031?via%3Dihub> (date accessed: 07.07.2022).
169. Islam, M.J. Determination of optimum survivability factors of highly pathogenic *Vibrio cholerae* 01 serogroup specific bacteriophage JSF4 ϕ / M.J. Islam, T.C. Sarker, R.A. Jebin [et al.]. – Text: electronic // Universepg American journal of pure and applied biosciences. – 2020. – Vol. 2 (2). – P. 8-14. — URL: <https://www.researchgate.net/publication/340447437> (date accessed: 17.02.2025).
170. Jaiswal, A. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice / A. Jaiswal, H. Koley, S. Mitra [et al.]. – Text: electronic // International Journal of Medical Microbiology. – 2014. – Vol. 304 (3-4). – P. 422-430. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422114000174?via%3Dihub> (date accessed: 11.02.2025).
171. Jaskólska, M. Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae* / M. Jaskólska, D.W. Adams, M. Blokesch. – Text: electronic // Nature. – 2022. – Vol. 604 (7905). – P. 323-329. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7613841> (date accessed: 09.01.2023).
172. Jensen, M.A. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks /

- M.A. Jensen, S.M. Faruque, J.J. Mekalanos [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2006. – Vol. 103 (12). – P. 4652-4657. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1450226> (date accessed: 09.01.2023).
173. Karaolis, D.K.R. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria / D.K.R. Karaolis, S. Somara, D.R. Maneval [et al.]. – Text: electronic // Nature. – 1999. – Vol. 399 (6734). – P. 375-379. – URL: <https://www.nature.com/articles/20715> (date accessed: 12.02.2022).
174. Kim, K.P. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response / K.P. Kim, J.D. Cha, E.H. Jang [et al.]. – Text: electronic // Microbial Biotechnology. – 2008. – Vol. 1 (3). – P. 247-257. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3815886> (date accessed: 12.02.2022).
175. Kitaoka, M. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae* / M. Kitaoka, S.T. Miyata, D. Unterweger [et al.]. – Text: electronic // Journal of medical microbiology. – 2011. – Vol. 60 (4). – P. 397-407. – URL: [//www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.023051-0#tab2](http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.023051-0#tab2) (date accessed: 23.12.2023).
176. Klose, K.E. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae* / K.E. Klose. – Text: electronic // Int J Med Microbiol. – 2001. – Vol. 291 (2). – P. 81-88. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422104700120?via%3Dihub> (date accessed: 13.02.2022).
177. Knowles, B. Lytic to temperate switching of viral communities / B. Knowles, C.B. Silveira, B.A. Bailey [et al.]. – Text: electronic // Nature. – 2016. – Vol. 531 (7595). – P. 466-470. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature17193> (date accessed: 13.02.2024).
178. Kumar, A. *Vibrio* pathogenicity island-1: the master determinant of cholera pathogenesis / A. Kumar, B. Das, N. Kumar. – Text: electronic // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 466-470. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7574455> (date accessed: 13.02.2024).
179. LaRocque, R. Cholera: Microbiology and pathogenesis / R. LaRocque, J.B. Harris. – Text: electronic // Uptodate Retrieved November. – 2018. – Vol. 24. – P. 2020. – URL:

<https://www.uptodate.com/contents/cholera-microbiology-and-pathogenesis/print?topicRef=2704&source> (date accessed: 13.08.2023).

180. Lawrence, J.G. Imbroglios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches / J.G. Lawrence, G.F. Hatfull, R.W. Hendrix. – Text: electronic // *Bacteriology*. – 2002. – Vol. 184. – P. 4891-4905. – Режим доступа: – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC135278> (date accessed: 18.11.2024).

181. Leibovici-Weissman, Y. Antimicrobial drugs for treating cholera / Y. Leibovici-Weissman, A. Neuberger, R. Bitterman [et al.]. – Text: electronic // *Cochrane database of systematic reviews*. – 2014. – Vol. (6). – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4468928> (date accessed: 18.11.2024).

182. Leitner, L. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebocontrolled, double-blind clinical trial / L. Leitner, A. Ujmajuridze, N. Chanishvili [et al.]. – Text: electronic // *Lancet Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21 (3). – P. 427-436. – URL: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30330-3](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30330-3) (date accessed: 23.10.2023).

183. Letarov, A.V. Ecological basis for rational phage therapy / A.V. Letarov, A.K. Golomidova, K.K. Tarasyan. – Text: electronic // *Acta Naturae*. – 2010. – Vol. 2, №. 1(4). – P. 60-71. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3347537> (date accessed: 18.01.2024).

184. Li, M. Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections / M. Li, R.Y.K. Chang, Y. Lin [et al.]. – Text: electronic // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 596. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7904610> (date accessed: 13.01.2025).

185. Liu, C. Antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* O1/O139 clinical isolates: a systematic review and meta-analysis / C. Liu, Y. Wang, K. Azizian [et al.]. – Text: electronic // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2022. – Vol. 20 (9). – P. 1217-1231. – URL: https://www.tandfonline.com/doi/10.1080/14787210.2022.2098114?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed (date accessed:

14.02.2025).

186. Łusiak-Szelachowska, M. Antiphage activity of sera from patients receiving staphylococcal phage preparations / Łusiak-Szelachowska M., Żaczek, M. B. WeberDąbrowska. – Text: electronic // *Microbes in the spotlight - recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms* – 2016. – P. 245–249. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/308344708> (date accessed: 16.06.2022).

187. Łusiak-Szelachowska, M. Anti-phage serum antibody responses and the outcome of phage therapy / M. Łusiak-Szelachowska, R. Międzybrodzki, W. Fortuna. – Text: electronic // *Folia Microbiol. (Praha)*. – 2021. – Vol. 66 (1). – P. 127-131. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7854414> (date accessed: 04.09.2023).

188. Majewska, J. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood / J. Majewska, W. Beta, D. Lecion [et al.]. – Text: electronic // *Viruses*. – 2015. - Vol. 7 (8). – P. 4784-4799. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4576206> (date accessed: 07.12.2023).

189. Malik, S. Bacteriophage cocktail and phage antibiotic synergism as promising alternatives to conventional antibiotics for the control of multi-drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* / S. Malik, K. Nehra, J.S. Rana. – Text: electronic // *Virus research*. – 2021. – Vol. 302. – P. 198496. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170221002033?via%3Dihub> (date accessed: 07.12.2024).

190. McCallin, S. Clinical trials of bacteriophage therapeutics / S. McCallin, H. Brüssow. – Text: electronic // *Bacteriophages: biology, technology, therapy*. – 2021. – P. 1099-1127. – URL: https://www.researchgate.net/publication/348913857_Clinical_Trials_of_Bacteriophage_Therapeutics (date accessed: 17.02.2024).

191. Metersky, M.L. New guidelines for nosocomial pneumonia / M.L. Metersky, A.C. Kalil. – Text: electronic // *Current opinion in pulmonary medicine*– 2017. – Vol. 23 (3). – P. 211-217. – URL: https://journals.lww.com/co-pulmonarymedicine/abstract/2017/05000/new_guidelines_for_nosocomial_pneumonia.5.aspx (date accessed: 14.02.2023).

192. Molina-Quiroz, R.C. Role of bacteriophages in the evolution of pathogenic vibrios and lessons for phage therapy / R.C. Molina-Quiroz, A. Camilli, C.A. Silva-Valenzuela. – Text: electronic // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2023. – Vol. 1404. – P. 149-173. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10587905> (date accessed: 14.02.2025).
193. Morison, J. Bacteriophage in the treatment and prevention of cholera / J. Morison. – London: H.K. Lewis and Co., Ltd., 1932. – 32 p.
194. Myelnikov, D. An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922–1955 / D. Myelnikov. – Text: electronic // *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. – 2018. – Vol. 73(4). – P. 385-411. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6203130> (date accessed: 04.02.2024).
195. Nale, J.Y. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans / J.Y. Nale, M.R.J. Clokie. – Text: electronic // *Current opinion in biotechnology*. – 2021. – Vol. 68. – P. 310-317. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8150739> (date accessed: 14.02.2025).
196. Nawel, Z. An overview on Vibrio temperate phages: Integration mechanisms, pathogenicity, and lysogeny regulation / Z. Nawel, O. Rima, B. Amira. – Text: electronic // *Microbial Pathogenesis*. – 2022. – Vol. 165. – P. 105490. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401022001036?via%3Dihub> (date accessed: 25.01.2025).
197. Nguyen, S. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers / S. Nguyen, K. Baker, B.S. Padman [et al.]. – Text: electronic // *MBio*. – 2017. – Vol. 8 (6). – P. e01874-17. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5698557> (date accessed: 25.01.2025).
198. Nicastro, J. Bacteriophage applications-historical perspective and future potential / J. Nicastro, S. Wong, Z. Khazaei [et al.]. – Text: electronic // Springer international publishing – 2016. – 82 p. – URL: http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/73775/1/2016_Book_BacteriophageApplications-Hist.pdf (date accessed: 12.02.2024).

199. Nilsson, A.S. Phage therapy—constraints and possibilities / A.S. Nilsson. – Text: electronic // Upsala journal of medical sciences. – 2014. – Vol. 119 (2). – P. 192-198. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4034558> (date accessed: 25.01.2025).
200. Olesen, S.W. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance / S.W. Olesen, M.L. Barnett, D.R. MacFadden, J.S. Brownstein, S. Hernández-Díaz, M. Lipsitch, Y.H. Grad. – Text: electronic // Elife. – 2018. – Vol. 7. – P. 39435-39450. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6307856> (date accessed: 15.09.2023).
201. Onsea, J. Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: development of a standardized multidisciplinary treatment protocol / J. Onsea, P. Soentjens, S. Djebara [et al.]. – Text: electronic // Viruses. – 2019. – Vol. 11 (10). – P. 891. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6832313> (date accessed: 28.01.2024).
202. Patey, O. Clinical indications and compassionate use of phage therapy: personal experience and literature review with a focus on osteoarticular infections / O. Patey, S. McCallin, H. Mazure [et al.]. – Text: electronic // Viruses. – 2018. – Vol. 11 (1). – P. 18. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6356659> (date accessed: 08.09.2024).
203. Pearson, G.D. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor / G.D. Pearson, A. Woods, S.L. Chiang [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1993. – Vol. 90 (8). – P. 3750-3754. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC46379> (date accessed: 08.09.2024).
204. Proux, C. The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like *Siphoviridae* in lactic acid bacteria / C. Proux, D. van Sinderen, J. Suarez [et al.]. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 2002. – Vol. 184. – P. 6026-6036. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC135392> (date accessed: 13.05.2022).
205. Reyes-Robles, T. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection / T. Reyes-Robles, R.S. Dillard, L.S. Cairns [et al.]. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 2018. – Vol. 200 (15). – P. e00792-17. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6040182> (date accessed: 08.09.2024).

206. Rohwer, F. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage / F. Rohwer, R. Edwards. – Text: electronic // Journal of bacteriology. – 2002. – Vol. 184. – P. 4529-4535. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC135240> (date accessed: 15.10.2023).
207. Rostami, A. Globally *Vibrio cholera* antibiotics resistance to RNA and DNA effective antibiotics: a systematic review and meta-analysis / A. Rostami, F.A. Zadeh, F. Ebrahimzadeh [et al.]. – Text: electronic // Microbial Pathogenesis. – 2022. – Vol. 172. – P. 105514. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401022001279?via%3Dihub> (date accessed: 05.12.2023).
208. Ryan, E.T. Cholera vaccines / E.T. Ryan, S.B. Calderwood. – Text: electronic // Clinical infectious diseases. – 2000. – Vol. 31 (2). – P. 561-565. — URL: <https://academic.oup.com/jtm/article-abstract/8/2/82/1830780?redirectedFrom=fulltext&login=false> (date accessed: 05.02.2025).
209. Safa, A. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 / A. Safa, G.B. Nair, R.Y.C. Kong. – Text: electronic // Trends Microbiol. – 2010. – Vol. 18 (1). – P. 46-54. — URL: [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(09\)00238-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X09002388%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(09)00238-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X09002388%3Fshowall%3Dtrue) (date accessed: 07.08.2024).
210. Sarker, S.A. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh / S.A. Sarker, S. McCallin, C. Barretto [et al.]. – Text: electronic // Virology. – 2012. – Vol. 434. – P. 222-232. — URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682212004436?via%3Dihub> (date accessed: 07.08.2024).
211. Sausset, R. New insights into intestinal phages / R. Sausset, M.A. Petit, V. Gaboriau-Routhiau [et al.]. – Text: electronic // Mucosal immunology. – 2020. – Vol. 13 (2). – P. 205-215. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7039812> (date accessed: 05.02.2025).
212. Schooley, R.T. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection / R.T. Schooley, B. Biswas, J.J. Gill [et al.]. – Text: electronic // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2017. – Vol. 61 (10). – P. e00954. — URL:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5610518> (date accessed: 05.12.2024).

213. Shah, M.M. Antibiotic-resistant *Vibrio cholerae* O1 and Its SXT elements associated with two cholera epidemics in Kenya in 2007 to 2010 and 2015 to 2016 / M.M. Shah, M. Bundi, C. Kathiiko [et al.]. – Text: electronic // Microbiology Spectrum. – 2023. – P. e04140-22. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10269778> (date accessed: 05.02.2025).

214. Shaikh, H. Current and future cholera vaccines / H. Shaikh, J. Lynch, J. Kim [et al.]. – Text: electronic // Vaccine. – 2020. – Vol. 38 (1). – P. A118-A126. — URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19316536?via%3Dihub> (date accessed: 25.04.2023).

215. Sharmila, T. Pathogenesis of cholera: recent prospectives in rapid detection and prevention of cholera / T. Sharmila, T.A. Thomas. – Text: electronic // Bacterial pathogenesis and antibacterial control. – 2018. – 154 p. — URL: <https://www.researchgate.net/publication/325456201> (date accessed: 15.04.2024).

216. Shen, A. Phage genome annotation: where to begin and end / A. Shen, A. Millard. – Text: electronic // Phage. – 2021. – Vol. 2 (4). – P. 183-193. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9041514> (date accessed: 07.02.2024).

217. Silva-Valenzuela, C.A. Niche adaptation limits bacteriophage predation of *Vibrio cholerae* in a nutrient-poor aquatic environment / C.A. Silva-Valenzuela, A. Camilli. – Text: electronic // Proceedings of the national academy of sciences. – 2019. – Vol. 116 (5). – P. 1627-1632. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6358685> (date accessed: 18.07.2023).

218. Sit, B. Animal models for dissecting *Vibrio cholerae* intestinal pathogenesis and immunity / B. Sit, B. Fakoya, M.K. Waldor. – Text: electronic // Current opinion in microbiology. – 2022. – Vol. 65. – P. 1-7. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8792189> (date accessed: 07.02.2025).

219. Śliwka, P. Characterization and comparative genomic analysis of three virulent *E. coli* bacteriophages with the potential to reduce antibiotic-resistant bacteria in the environment /

- P. Śliwka, B. Weber-Dąbrowska, M. Żaczek [et al.]. – Text: electronic // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24 (6). – P. 5696. — URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5696> (date accessed: 30.11.2024).
220. Stacey, H.J. The safety and efficacy of phage therapy: a systematic review of clinical and safety trials / H.J. Stacey, S. De Soir, J.D. Jones. – Text: electronic // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11 (10). – P. 1340. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9598614> (date accessed: 07.02.2025).
221. Sulakvelidze, A. Challenges of bacteriophage therapy / A. Sulakvelidze. – Text: electronic // Industrial pharmaceutical microbiology. – 2011. – Vol. 45 (31). – P. 14-18. — URL: <https://www.researchgate.net/publication/288789391> (date accessed: 09.06.2024).
222. Teschler, J.K. Mechanisms underlying *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersion / J.K. Teschler, C.D. Nadell, K. Drescher [et al.]. – Text: electronic // Annual Review of Microbiology. – 2022. – Vol. 76. – P. 503-532. — URL: [https://www.annualreviews.org/docserver/fulltext/micro/76/1/annurev-micro-111021-053553.pdf?expires=1739534067&id=id&accname=guest&checksum=](https://www.annualreviews.org/docserver/fulltext/micro/76/1/annurev-micro-111021-053553.pdf?expires=1739534067&id=id&accname=guest&checksum=7BC6D885F4E9D8DD9A68CF49E) A51E4857BC6D885F4E9D8DD9A68CF49E (date accessed: 09.06.2024).
223. Trucksis, M. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette / M. Trucksis, J. E. Galen, J. Michalski [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1993. – Vol. 90 (11). – P. 5267-71. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC46697> (date accessed: 12.06.2023).
224. Turner, D. A Roadmap for genome-based phage taxonomy / D. Turner, A.M. Kropinski, E.M. Adriaenssens. – Text: electronic // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – P. 506. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8003253> (date accessed: 12.06.2024).
225. Turner, D. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee / D. Turner, A.N. Shkoporov, C. Lood [et al.]. – Text: electronic // Archives of Virology. – 2023. – Vol. 168. – P. 74. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9868039> (date accessed: 12.06.2024).

226. Turner, D. Phage annotation guide: guidelines for assembly and high-quality annotation / D. Turner, E.M. Adriaenssens, I. Tolstoy [et al.]. – Text: electronic // Phage. – 2021. – Vol. 2. – P. 170-182. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8785237> (date accessed: 12.06.2024).
227. Ujmajuridze, A. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections / A. Ujmajuridze, N. Chanishvili, M. Goderdzishvili [et al.]. – Text: electronic // Frontiers In Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1832-1839. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6090023> (date accessed: 21.01.2024).
228. Verma, J. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* / J. Verma, S. Bag, B. Saha [et al.]. – Text: electronic // Proceedings of the national academy of sciences USA. – 2019. – Vol. 116 (13). – P. 6226-6231. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6442563> (date accessed: 12.01.2023).
229. Waldor, M.K. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2 / M.K. Waldor, E.J. Rubin, G.D. Pearson [et al.]. – Text: electronic // Molecular Microbiology. – 1997. – Vol. 24 (5). – P. 917-926. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2958.1997.3911758.x?sid=nlm%3Apubmed> (date accessed: 12.01.2025).
230. Weinbauer, M.G. Ecology of prokaryotic viruses / M.G. Weinbauer. – Text: electronic // FEMS microbiology reviews. – 2004. – Vol. 28 (2). – P. 127-181. — URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.femsre.2003.08.001?sid=nlm%3Apubmed> (date accessed: 12.01.2022).
231. WHO/CDC/CSR/EDC/1999. Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera // Centers for disease control and prevention Atlanta, Georgia. – 1999. – P. 61-74. — URL: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/6669> (date accessed: 16.12.2023). – Text: electronic.
232. Wierzba, Th. F. Oral cholera vaccines and their impact on the global burden of disease / Th. F. Wierzba. – Text: electronic // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2019. – Vol. 15 (6). – P. 1294-1301. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6663124> (date

accessed: 12.01.2024).

233. Wong, K.K. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of cholera vaccine / K.K. Wong, E. Burdette, B.E. Mahon [et al.]. – Text: electronic // The morbidity and mortality weekly report (MMWR). – 2017. – Vol. 66 (18). – P. 482-485. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5657988> (date accessed: 27.11.2024).

234. Yamamoto, K.R. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification / K.R. Yamamoto, B.M. Alberts, R. Berzinger. – Text: electronic // Virology. – 1970. – Vol. 40 (3). – P. 734-744. — URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0042682270902187?via%3Dihub> (date accessed: 13.12.2024).

235. Yen, M. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models / M. Yen, L.S. Cairns, A. Camilli. – Text: electronic // Nature communications. – 2017. – Vol. 8 (1). – P. 1-7. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5296635> (date accessed: 11.01.2025).

236. Yuan, X.H. Global status of antimicrobial resistance among environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1/O139: a systematic review and meta-analysis / X.H. Yuan, Y.M. Li, A.Z. Vaziri [et al.]. – Text: electronic // Antimicrobial Resistance & Infection Control. – 2022. – Vol. 11 (1). – P. 62. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9036709> (date accessed: 01.06.2024).

237. Zurabov, F. Bacteriophages with depolymerase activity in the control of antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms / F. Zurabov, E. Glazunov, T. Kochetova [et al.]. – Text: electronic // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13 (1). – P. 15188. — URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10499987> (date accessed: 11.01.2025).