

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Бочкарева Светлана Сергеевна

**Конструирование препаратов бактериофагов и клиничко-
иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций,
связанных с оказанием медицинской помощи**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:

академик РАН, профессор, д.м.н. Караулов А.В.

д.м.н. Ершова О.Н.

Москва - 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП)	19
1.1.1. Клинико-эпидемиологические аспекты ИСМП	21
1.1.2. Концепция профилактики и лечения ИСМП	31
1.2. Бактериофаги как лекарственные средства	33
1.2.1. Применение бактериофагов для терапии инфекционных заболеваний История и современность	33
1.2.2. Обзор современных разработок в области создания лекарственных форм бактериофагов	42
1.2.3. Нормирование, методы получения и оценки качества препаратов бактериофагов	48
1.2.4. Клинико-иммунологические аспекты применения бактериофагов	55
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.1 Материалы исследования	63
2.1.1. Бактериальные культуры	63
2.1.2. Питательные среды и растворы	63
2.1.3. Бактериофаги	63
2.2. Методы исследования	65
2.2.1. Методы получения и изучения бактериофагов	65
2.2.1.1. Методы выделения бактериофагов из клинического материала	65
2.2.1.2. Оценка спектра литической активности бактериофагов	65
2.2.1.3. Выявление лизогенных штаммов бактерий	66
2.2.1.4. Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов	67
2.2.1.5. Подготовка штаммов бактериофагов и бактериальных культур к лиофильному высушиванию	67
2.2.1.6. Получение бактериофагов для производства экспериментальных серий лекарственных форм	68

2.2.1.7. Выделение и рестрикционный анализ ДНК бактериофагов	68
2.2.1.8. Секвенирование ДНК бактериофагов. Подготовка геномных библиотек	69
2.2.1.9. Определение устойчивости фагов к повреждающим факторам внешней среды	70
2.2.1.10. Определение параметров инфекционного процесса в системе фаг-клетка	70
2.2.1.11. Метод двойной вложенной полимеразной цепной реакции	71
2.2.2. Методы контроля качества лекарственных препаратов бактериофагов	72
2.2.2.1. Прозрачность	72
2.2.2.2. Цветность	72
2.2.2.3. рН	73
2.2.2.4 Видимые механические включения	73
2.2.2.5. Извлекаемый объем	73
2.2.2.6. Стабильность ЛФ бактериофагов	73
2.2.2.7. Стерильность	73
2.2.2.8. Бактериальные эндотоксины	73
2.2.2.9. Аномальная токсичность	74
2.2.2.10. Определение экзотоксинов	74
2.2.3. Методы доклинических испытаний ЛФ бактериофагов	74
2.2.3.1. Острая токсичность	75
2.2.3.2. Хроническая токсичность	75
2.2.3.3. Общий клинический анализ крови подопытных животных	76
2.2.3.4. Гистологические исследования	76
2.2.3.5. Определение местного действия ЛФ бактериофагов	77
2.2.3.6. Фармакокинетика ЛФ бактериофагов	77
2.2.3.7. Моделирование острой клебсиеллезной инфекции	77
2.2.3.8. Изучение профилактической эффективности ЛФ бактериофагов	77
2.2.3.9. Изучение лечебной эффективности ЛФ бактериофагов	79

2.2.4. Методы клинических исследований	80
2.2.5. Иммунологические методы	86
2.2.5.1. Получение кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток к использованным бактериофагам	86
2.2.5.2. Метод преципитации в геле по Оухтерлони	
2.2.5.3. Метод иммуноэлектрофореза	87
2.2.5.4. Оценка клеточного и гуморального антифагового иммунного ответа	87
2.2.5.4.1. Определение антифагового гуморального иммунного ответа методом ИФА	87
2.2.5.4.2. Определение антифагового гуморального иммунного ответа в реакции нейтрализации	89
2.2.5.4.3. Изучение антифагового клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии	90
2.2.5.5. Оценка параметров иммунного статуса больных	92
2.2.5.5.1. Оценка клеточного иммунного статуса больных	
2.2.5.5.2. Оценка гуморального иммунитета больных	93
2.2.5.5.3. Оценка интерферонового статуса больных	93
2.2.5.5.4. Определение способности клеток крови продуцировать цитокины (цитокиновый статус)	94
2.2.6. Статистические методы	95
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	96
ГЛАВА III. РАЗРАБОТКА ЛФ БАКТЕРИОФАГОВ	99
3.1. Создание коллекции производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i>	99
3.1.1. Выделение бактериофагов, активных в отношении отобранных бактерий-мишеней, из объектов окружающей среды	99
3.1.2. Фенотипическая характеристика изолированных штаммов бактериофагов. Отбор производственно-перспективных штаммов	100

бактериофагов на основании их биологических свойств	
3.1.3 Отбор и наработка производственно-перспективных штаммов бактериофагов, лизирующих <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i> , и бактериальных штаммов для размножения бактериофагов	110
3.1.4 Устойчивость бактериофагов КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 к воздействию повреждающих факторов внешней среды	112
3.1.5. Определение частоты возникновения фагорезистентных мутантов бактерий	115
3.2 Молекулярно-генетический анализ бактериофагов КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111	118
3.2.1 Молекулярно-генетическое исследование бактериофагов методом рестрикционного анализа	118
3.2.2 Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов, биоинформатический анализ	124
3.2.3. Определение степени гомологии секвенированных фаговых геномов с геномами известных бактериофагов, представленных в международных базах данных	127
3.2.4. Выявление бактериальных генов вирулентности в геномах бактериофагов	136
3.2.5 Оценка характера взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой	137
3.3. Разработка состава и технологии получения раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагови инъекционного раствора	138
3.4. Разработка методов анализа раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов и инъекционного раствора	147
3.5. Изучение стабильности ЛФ бактериофагов	156
ГЛАВА IV. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛФ	178

БАКТЕРИОФАГОВ	
4.1. Острая токсичность ЛФ бактериофагов	178
4.2. Хроническая токсичность ЛФ бактериофагов	179
4.3. Изучение местного действия ЛФ бактериофагов	186
4.4. Фармакокинетика клебсиеллёзного бактериофага KPV15	186
4.5. Профилактическая эффективность ЛФ бактериофага	189
4.6. Изучение лечебной эффективности ЛФ бактериофагов	191
ГЛАВА V. РАЗРАБОТКА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ИСМП	196
5.1. Разработка алгоритма проведения индивидуальной (персонализированной) фаготерапии	196
5.2. Определение критериев эффективности персонализированной фаготерапии	203
5.3. Результаты проведения персонализированной фаготерапии на клинических базах	204
5.3.1. Оценка эффективности применения бактериофагов для пациентов ОРИТ	204
5.3.2. Оценка безопасности применения бактериофагов для пациентов ОРИТ	215
5.3.3. Примеры клинических случаев	216
ГЛАВА VI. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ИСМП	226
6.1. Конструирование иммуноферментных тест-систем для определения IgG-антител, специфичных в отношении штаммов изучаемых бактериофагов	226
6.2. Определение антифагового иммунного ответа <i>in vitro</i> у больных на фоне фаготерапии	232
6.3. Изучение параметров клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии	236

6.3.1. Влияние бактериофага на функциональную активность мононуклеаров, выделенных из крови человека	236
6.3.2 Изменение количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови больных после проведения фаготерапии	246
6.3.3. Изменение функциональной активности лейкоцитов и лимфоцитов в крови больных после проведения фаготерапии	248
6.3.4. Изменение иммунного статуса пациентов в динамике фаготерапии	251
6.3.5. Изменение интерферонового статуса пациентов в динамике фаготерапии	253
Заключение	257
ВЫВОДЫ	266
Перспективы дальнейшей разработки темы	269
Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования	280
Список сокращений	281
Список литературы	283
Благодарности	313
Приложения	314
Приложение 1. Лабораторные регламенты	
Приложение 2. Акты о внедрении результатов работы	
Приложение 3. Договоры о сотрудничестве с клиническими базами	
Приложение 4. Разрешение этического комитета	
Приложение 5. Индивидуальная регистрационная карта	
Приложение 6. Методические рекомендации № 105	
Приложение 7. Патент	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Широкое распространение антибиотикорезистентности у бактерий, угрожает современному здравоохранению [77, 102, 150, 161]. ВОЗ назвала проблему устойчивости к противомикробным препаратам одной из основных стоящих перед человечеством глобальных угроз здоровью населения [15]. Устойчивость бактерий к антибиотикам приводит к снижению эффективности методов лечения бактериальных заболеваний, увеличению заболеваемости и смертности [34, 150, 177]. Эту проблему пытаются решить путем поиска и синтеза новых антимикробных препаратов, однако микроорганизмы адаптируются к ним быстрее, чем происходит разработка и внедрение новых антимикробных средств. В настоящее время известно около 6000 антибиотиков. Путь от открытия и испытания до внедрения нового антибиотика занимает от 5 до 10 лет и обходится в сумму от десятков до сотен миллионов долларов, в то время как микроорганизмам в лабораторных условиях достаточно несколько недель для адаптации к новому антимикробному препарату [233].

Одним из вариантов решения этой проблемы может стать фаготерапия. Решением Ученого Совета Роспотребнадзора от 21 июня 2011 года рекомендовано научно-исследовательским организациям совместно с производителями фармацевтических средств направить усилия на разработку новых препаратов на основе бактериофагов, эффективных при осуществлении мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Наиболее остро проблема антибиотикорезистентности стоит для лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) в медицинских организациях различного профиля. Такие инфекции наносят значительный ущерб здоровью населения, экономике и демографической ситуации, что определяет актуальность их профилактики на современном этапе. По расчетным данным ИСМП ежегодно развиваются у 2-2,5 млн. человек [26, 35]. К высокому риску инфицирования относятся отделения реанимации и интенсивной терапии,

ожоговые, онкологические, травматологические, урологические отделения, а также учреждения материнства и детства [214]. Риск возникновения периодических вспышек ИСМП у больных в критическом состоянии, находящихся на продленной искусственной вентиляции легких в отделениях реанимации и интенсивной терапии, особенно высок [31]. Ситуация усугубляется формированием «госпитальных штаммов» – штаммов микроорганизмов с измененными биологическими свойствами, они приобретают устойчивость к антимикробным препаратам, к физическим воздействиям, а также повышенную вирулентность [1, 34, 96]. Антибиотикотерапия против штаммов ИСМП, отличающихся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), зачастую является неэффективной, что значительно ухудшает течение основного заболевания. Больных, находящихся на длительном лечении в отделении реанимации, можно также отнести к категории «иммунокомпрометированных больных», поскольку длительная борьба с инфекцией у них приводит к истощению ресурсов иммунной системы.

В широком смысле термин «иммунокомпрометированный пациент» может быть применим к различным контингентам населения: больным, перенесшим тяжелые инфекции, травмы или операции; лицам, проживающим или работающим в экологически неблагоприятных условиях и подвергающимся постоянному воздействию радиационного, химического и других факторов; лицам определенных возрастных групп (в частности, пожилого и старческого возраста); лицам определенных профессий (например, подвергающихся постоянному стрессу (летчики, подводники и др.), сверхвысоким физическим нагрузкам, высоким и низким температурам и др.) [29, 91]. Наиболее тяжело поддаются лечению именно иммунокомпрометированные больные, страдающие ИСМП. При проведении фаготерапии у таких больных для достижения максимального эффекта необходим индивидуализированный подбор бактериофагов с учетом, с одной стороны, быстрого изменения штаммов-возбудителей, вызывающих непрерывно рецидивирующую инфекцию у данной категории пациентов и зачастую обладающих МЛУ, а с другой стороны, возможного формирования антифагового

иммунитета при повторных курсах фаготерапии с использованием бактериофагов, характеризующихся сходными антигенными детерминантами.

Степень разработанности темы исследования

Проблеме контроля и профилактики ИСМП уделяется большое внимание как в отечественных, так и в мировых публикациях [37, 55, 131, 136]. Одним из методов профилактики и лечения ИСМП являются бактериофаги, интерес к которым значительно вырос в последнее время [2, 18, 20, 72, 98, 185]. К настоящему времени в медицинской и научной практике накоплен обширный опыт применения бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов для лечения инфекционных заболеваний [1–21, 24, 28, 33, 39, 169, 181], в том числе и как противоэпидемических средств [6, 11].

Коммерческие препараты бактериофагов выпускаются в России с сороковых годов прошлого века, а также производство сохранилось с советских времен в Грузии. Открыты центры фаготерапии в Грузии «Международный центр фаготерапии имени Г. Элиавы», Польше «Институт иммунологии и экспериментальной терапии им. Хиршфельда Польской академии наук», Бельгии «Центр инфекционных заболеваний при военном госпитале королевы Астрид» и США «Центр инновационного применения фагов и терапии», основанный Медицинской школой Калифорнийского университета в Сан-Диего. Все эти центры осуществляют лечение больных в соответствии со стратегией «сострадательного» лечения, то есть в тех случаях, когда доказана неэффективность другой антибактериальной терапии. В ряде публикаций показана необходимость индивидуального подбора штаммового состава препаратов бактериофагов [51, 145, 201], однако системного анализа лечения препаратами бактериофагов не было до сих пор опубликовано. Ряд авторов указывал на проблему возникновения иммунного ответа на введение пациентам бактериофагов [135, 154, 155, 222, 223, 238], но отсутствуют данные об оценке влияния иммунного ответа на эффективность фаготерапии, также нет данных о всестороннем изучении как гуморального, так и клеточного иммунитета в ответ на лечение бактериофагами.

Цель исследования: разработка технологии производства и рационального алгоритма подбора бактериофагов в составе фагового коктейля для эффективной фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с обязательной оценкой иммунного ответа на бактериофаги у данной категории больных. Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи.

Задачи исследования:

1. Выделение штаммов ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, из клинического материала, взятого от больных, и получение коктейлей бактериофагов, активных в отношении выявленных патогенов.
2. Анализ фенотипических и молекулярно-генетических характеристик бактериофагов, входящих в состав коктейлей.
3. Разработка технологии получения универсального состава лекарственной формы, включающего необходимый набор вспомогательных компонентов, для конструирования препаратов на основе коктейлей бактериофагов различного штаммового состава, предназначенных для инъекционного и местного применения.
4. Проведение доклинических испытаний безопасности и эффективности коктейлей бактериофагов (острая и хроническая токсичность, фармакокинетические исследования, оценка эффективности на инфекционной модели).
5. Конструирование и клиническая апробация иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения IgG-антител к использованным в работе бактериофагам.
6. Изучение гуморального иммунного ответа больных на фоне фаготерапии.
7. Изучение клеточного иммунного ответа больных на фоне фаготерапии.
8. Определение критериев эффективности использования бактериофагов у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые получены индивидуальные фармакокинетические и иммунологические характеристики бактериофагов: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Были разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейля бактериофагов для различных путей введения, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов, и технология их пилотного производства.

Проведены доклинические исследования по оценке острой и хронической токсичности раствора с коктейлем бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Изучена фармакокинетика бактериофагов, а также терапевтическая эффективность разработанных препаратов на примере клебсиеллёзного бактериофага KpV15.

Впервые сконструированы и клинически апробированы иммуноферментные тест-системы для определения IgG-антител к изучаемым бактериофагам. Изучены параметры гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии; исследованы уровни IgG-антител к изучаемым бактериофагам и оценено их влияние на эффективность фаготерапии.

Показана высокая микробиологическая эффективность использования разработанного алгоритма персонализированного подбора бактериофагов для лечения пациентов, страдающих ИСМП, на четырех клинических базах, которая составила 89 %.

Теоретическая и практическая значимость исследования состоит в создании обоснованной концепции индивидуализированного подбора бактериофагов для эффективной терапии постоянно рецидивирующих, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, особенно вызванных возбудителями, обладающими МЛУ. Концепция учитывает многофакторные аспекты взаимодействия фага как с бактерией-мишенью, так и с макроорганизмом.

Получен ряд лекарственных препаратов на основе оригинальных вирулентных бактериофагов, эффективных в отношении ведущих возбудителей инфекций (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и

Acinetobacter baumannii), связанных с оказанием медицинской помощи (в том числе, возбудителей, обладающих МЛУ). В результате проведенных исследований разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейлей бактериофагов, а именно, раствор для приема внутрь и местного применения и инъекционный раствор, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов для конструирования фаговых препаратов различного штаммового состава. Разработаны спецификации на лекарственные формы и лабораторные регламенты.

Сконструирована линейка иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения в образцах сыворотки крови пациентов IgG-антител к полученным и использованным в ходе работы бактериофагам. Данная линейка тест-систем может быть внедрена в широкую медицинскую практику. Сформулированы основные принципы оценки эффективности фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП, с учетом гуморального иммунного ответа на бактериофаг.

Методология и методы исследования

Методологической основой настоящего исследования являются труды отечественных и зарубежных авторов в области фундаментальных исследований бактериофагов. Методология исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Объектами исследования являлись штаммы бактерий, вызывающих ИСМП, и обладающих МЛУ, а также штаммы бактериофагов, пациенты с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями, связанными с оказанием медицинской помощи, проходившие лечение на четырех клинических базах. Предметом исследования является разработка концепции персонализированной фаготерапии. В исследовании использованы системный подход и специальные методы, включающие ретроспективный анализ, микробиологические, молекулярно-генетические, иммунологические, биоинформационные, химико-фармацевтические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан алгоритм конструирования и технология получения фагосодержащих лекарственных форм для инъекционного и местного применения, в том числе, на основе бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, лизирующих бактериальные патогены, этиологически значимые для инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

2. Концепция персонализированного подхода к фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, основными элементами которой являются: определение чувствительности выделенных от больного бактерий-мишеней к фагам с подбором рабочего титра препарата, оценка уровня нейтрализующих IgG-антител в крови пациента к входящим в состав коктейля бактериофагам, выбор (с учетом локализации инфекционного процесса и фармакокинетических свойств отобранных для терапии фагов) пути введения и соответствующей ему лекарственной формы, обеспечивает высокую микробиологическую эффективность терапии (89%) со снижением в 1,5 раза риска летальных исходов.

3. Применение препаратов, содержащих бактериофаги, у пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, вызывает штаммоспецифический антифаговый иммунный ответ, который необходимо учитывать при подборе коктейля бактериофагов, что исключительно важно при повторной фаготерапии.

Достоверность результатов научных положений и выводов

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объем выборки анализируемых образцов, использование сертифицированных бактериологических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов, которые характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное бактериологическое, иммунохимическое и молекулярно-генетическое исследование бактериальных штаммов и штаммов бактериофагов позволило получить данные, сопоставимые с данными литературы, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. При

проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование: методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что также позволяет считать их достоверными. Основные положения, изложенные в настоящей работе, опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и прошли экспертную оценку.

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования. Непосредственно автором разработана концепция исследования, определены алгоритмы и методология выполнения работы, обобщены литературные данные по проблеме, проведены экспериментальные и аналитические исследования. Автор принимал непосредственное участие в разработке лекарственных форм бактериофагов и их изучении, в подборе фагового коктейля для лечения 160 больных, разработке иммуноферментных тест-систем, изучении гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Автором непосредственно разработана документация для проведения инициативного научного исследования (протокол инициативного научного исследования, индивидуальная регистрационная карта, информация для пациента и форма информированного согласия), утвержденная Этическим комитетом. Автором лично проведены анализ полученных результатов с применением статистических методов исследования, подготовка основных публикаций и докладов по выполненной работе на научно-практических мероприятиях, разработка концепции персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Доклинические исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории биологических испытаний ФБУН ГНЦ ПМБ (зав. лабораторией А.И. Борзилов). Бактериофаги выделены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ (зав. лабораторией Воложанцев Н.В.)

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на ряде научных конференций, форумов и конгрессов: Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», 26-27 сентября 2016г., Новосибирск; Национальном конгрессе бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях», 20-22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург; Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., Москва; Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье медицинского персонала и обеспечение эпидемиологической безопасности медицинской деятельности», 21-23 апреля 2016 г., Омск/МедиАль; 4th World Congress on Targeting Infectious Diseases “Phage Therapy 2016”. Paris, France, June 2-3, 2016; Federation of Infection Societies (FIS) Annual Conference and the 10th Healthcare Infection Society (HIS) International Conference 2016. 6-8 November 2016, EICC, Edinburg, UK; 1st German Phage Symposium October 09-11, 2017, Steinbeis-Haus für Management und Technologie (SHMT) Filderhauptstraße 142, 70599 Stuttgart, Germany; The 15th Finnish Microbial Pathogenesis Day, August 21-23, 2017, University of Helsinki, Haartman Institute, Helsinki, Finland; Conference on Centennial Celebration of Bacteriophage Research, April 24-26, 2017, Institut Pasteur, Paris, France; X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 26-28 февраля 2018 г., Москва; Научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24-26 сентября, 2018, Нижний Новгород; XIII Международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия», 2018, Санкт-Петербург; XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном

мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 1-3 апреля 2019 г., Москва; VI Национальном конгрессе бактериологов, 14-16 сентября 2021 г., Казань; Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2020 г., Москва.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора 30 июня 2022 г. (протокол № 5).

Внедрение результатов исследования

Работа проводилась в рамках НИР 2017-2020 гг. ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».

По теме диссертации получен патент РФ №2664681 «Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с МЛУ» (авторы: Алёшкин В.А., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Бочкарева С.С., Шкода А.С., Вайншток И.И., Ведяшкина С.Г., Митрохин С.Д., Калачева О.С., Орлова О.Е., Киселева И.А., Рубальский Е.О., Зулькарнеев Э.Р.)

Научно-практические результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре клинической микробиологии и фаготерапии факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, а также в клиническую работу ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России а также в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора. Лабораторные регламенты на производство РПВМП и ИР с коктейлями бактериофагов апробированы в АО «Биннофарм».

На основании проведенных исследований разработаны и рекомендованы Департаментом здравоохранения города Москвы Методические рекомендации (№105) «Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП)».

Публикации: основное содержание работы отражено в 45 публикациях, 12 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 10 – в журналах, индексируемых международными базами данных, 10 статей в других изданиях, 1 – глава в монографии, 20 – в материалах конференций и конгрессов, 1 – методические указания, 1 – патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 351 страницах, содержит 69 таблиц и 71 рисунок. Библиография содержит 240 источников (51 отечественных и 189 иностранных).

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП)

На фоне пандемии COVID-19 угроза инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, приобретает глобальное значение. В 2015 г. ВОЗ объявила ИСМП одной из основных угроз здоровью людей, в связи с чем был разработан Глобальный план действий ВОЗ по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам [96, 108]. Наслаиваясь на основное заболевание, ИСМП увеличивают длительность пребывания пациентов в стационаре, что ведет к увеличению сроков лечения, хронизации процесса, а в наиболее тяжелых случаях – к летальному исходу [32, 48, 56, 97, 210].

Общим признаком для отнесения случаев инфекций к ИСМП является непосредственная связь их возникновения с оказанием медицинской помощи (лечением, диагностическими исследованиями и т.д.), поэтому к ИСМП относят случаи инфекции, как присоединяющиеся к основному заболеванию у госпитализированных пациентов, так и связанные с оказанием любых видов медицинской помощи (в амбулаторно-поликлинических, образовательных, санаторно-оздоровительных учреждениях, учреждениях социальной защиты населения, при оказании скорой медицинской помощи, помощи на дому и др.), а также случаи инфицирования медицинских работников в результате их профессиональной деятельности [35].

Переход в нормативной и научной литературе от терминов «внутрибольничный», «госпитальный» или «нозокомиальный» к терминам «связанный со здравоохранением» или «с оказанием медицинской помощи» отражает увеличение числа случаев выявления инфекций в медицинских учреждениях и за пределами больниц, в амбулаторных хирургических центрах, центрах диализа и домах престарелых и др. В иностранной литературе ИСМП обозначается термином Healthcare-associated infections (HAI). В Европейском Союзе контроль за ИСМП и устойчивостью к противомикробным препаратам

осуществляет Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC). В США аналогичную функцию выполняет Центр по контролю и профилактике заболеваний (Center for Disease Control and Prevention – CDC). В России контроль за ИСМП осуществляет Роспотребнадзор.

Ежегодно более 1,4 миллиона человек во всем мире заболевают ИСМП. В развитых странах от 5% до 10% пациентов, поступающих в больницы, заражаются этими инфекциями. В некоторых развивающихся странах доля пострадавших пациентов может превышать 25%. В результате этих инфекций только в Евросоюзе порядка тридцати пяти тысяч пациентов умирают ежегодно [26, 216]. В США, по некоторым данным, этот тип инфекций уносит от 40 000 до 80 000 жизней. По количеству случаев ИСМП уступают лишь сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям. Исследования ВОЗ показывают, что страны со средним уровнем дохода ежегодно теряют 7,0-8,2 миллиарда долларов из-за данного типа инфекций. В России ИСМП ежегодно регистрируются в среднем у около тридцати тысяч пациентов, однако достоверные и полные статистические данные отсутствуют. Реальная заболеваемость ИСМП достигает 2,5 миллионов случаев в год, что составляет 5-40% от всех пациентов, находящихся в стационарах страны, а экономический ущерб от случаев ИСМП по примерным подсчётам составляет около 300 миллиардов рублей в год [2, 26, 37, 151, 165].

Риск внутрибольничных инфекций зависит от методов инфекционного контроля в медицинском учреждении, иммунного статуса пациента и распространенности патогенов. Факторы риска ИСМП включают иммуносупрессию, пожилой возраст, продолжительность пребывания в больнице, сопутствующие заболевания, частоту посещения медицинских учреждений, искусственную вентиляцию легких, недавние инвазивные процедуры, внутренние устройства и пребывание в отделении интенсивной терапии (ОИТ) [214]. Прием внутривенных антибиотиков в течение последних 90 дней — это один из самых значимых факторов риска развития устойчивости к противомикробным препаратам [169]. Несмотря на то, что антибиотики играют важную роль в лечении, они

повышают риск восприимчивости пациентов к множеству внутрибольничных и часто устойчивых к противомикробным препаратам патогенам. Эти патогены могут быть приобретены у других пациентов или персонала больницы. Риск выше среди пациентов в ОИТ. В исследовании распространенности ИСМП в Германии, в котором приняли участие 231459 пациентов в 947 больницах, был сделан вывод, что около 19,5% пациентов в ОИТ имели по крайней мере один случай ИСМП [211].

ИСМП можно классифицировать по ряду признаков: по этиологии (экзогенные и эндогенные), по характеру патологического процесса (вызванные патогенными или оппортунистическими микроорганизмами), по локализации патологического процесса (инфекции дыхательных путей, мочевыделительных путей, области хирургического вмешательства, суставов и костей и др.) [32, 208].

ECDC включил в перечень ИСМП следующие заболевания: пневмонию, (Hospital-acquired pneumonia (HAP)), инфекцию мочевыводящих путей (Healthcare-associated urinary tract infection (HA UTI)), инфекцию в области хирургического вмешательства (Surgical site infection (SSI)), инфекцию, вызванную *Clostridium difficile* (Healthcare-associated *Clostridium difficile* infection (HA CDI)), неонатальный сепсис и инфекции кровотока (Bloodstream infections (BSI)).

В мировой структуре заболеваемости ИСМП на первом месте находятся пневмонии (20-30%), на втором – инфекции в области хирургического вмешательства (около 20%), на третьем – желудочно-кишечные инфекции (15-17%), затем инфекции мочевыводящих путей (около 13%), инфекции кровотока, связанные с катетеризацией (около 10 %), и инфекции новорожденных (около 10%). Структура заболеваемости, несколько отличается в России, США и Европе [2, 137, 157, 208].

1.1.1. Клинико-эпидемиологические аспекты ИСМП

К патогенам, ответственным за ИСМП, относят бактерии, вирусы и грибы. Распространенность инфекций, вызываемых определенными микроорганизмами, варьируется в зависимости от местоположения медицинского учреждения и

популяции пациентов. Бактерии являются наиболее распространенными патогенами, следующие по распространенности грибы и затем вирусы [1, 32].

Микроорганизмы, являющиеся возбудителями ИСМП, имеют ряд общих признаков, а именно: высокую вирулентность, устойчивость к антибиотикам, дезинфектантам, ультрафиолетовому облучению, МЛУ.

В иностранной литературе широко используются термины «множественная лекарственная устойчивость» (МЛУ), «широкая лекарственная устойчивость» (ШЛУ) и «пандемическая лекарственная устойчивость» (ПЛУ). Термин МЛУ используется в России в отношении патогенов, обладающих устойчивостью к нескольким противомикробным препаратам. Термин ШЛУ применяется только к возбудителю туберкулеза. Принципиальная разница между этими терминами заключается в критериях распространённости невосприимчивости к антимикробным препаратам. Как правило, считается, что бактерии, устойчивые к 1-3 классам антибиотиков, обладают МЛУ, если же устойчивость выше, то патогены считают обладающими ШЛУ. Если микроорганизмы невосприимчивы ко всем, разрешенным противомикробным препаратам их считают обладающими ПЛУ [159].

В соответствии с программой «Стратегии контроля антимикробной терапии» (СКАТ), утвержденной в 2018 г., к наиболее распространённым возбудителям ИСМП в России относятся грамотрицательные и грамположительные бактерии, указанные в таблице 1.1.

Таблица 1.1 - Возбудители ИСМП в соответствии с программой «Стратегии контроля антимикробной терапии»

<i>Грамотрицательные</i>	<i>Грамположительные</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Staphylococci CN</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала список приоритетных патогенов, включающий 12 видов бактерий, классифицированных на критические, высокоприоритетные и средние в зависимости от их уровня устойчивости к доступным терапевтическим средствам (таблица 1.2 [103]).

Таблица 1.2 - Список приоритетных патогенов в соответствии с данными ВОЗ

Критические	Средние
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Enterobacterales</i>	<i>Shigella spp.</i>
Высокоприоритетные	
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Campylobacter spp.</i>	
<i>Salmonella spp.</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	

Список патогенов, устойчивых к антибиотикам, возглавляют грамотрицательные бактерии — возбудители большинства нозокомиальных инфекций в отделениях реанимации и ОИТ, гнойной хирургии и онкологии. Наиболее распространенными и опасными считаются микроорганизмы ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacteriaceae*) [69].

Бактерии из рода *Enterococcus* являются комменсалами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. Обзор инфекционных агентов, вызывающих ИСПМ, показал, что энтерококки – одна из основных причин внутрибольничных инфекций в Соединенных Штатах (составляют около 20-30% в общей структуре данных заболеваний) и третья основная причина таких инфекций во всем мире [124, 132, 192]. В пределах рода *Enterococcus* наиболее клинически значимыми являются *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, при этом *E. faecalis* вызывает примерно 60% инфекций, а *E. faecium* – остальную часть ИСПМ, вызываемых

Enterococcus. E. faecium имеет более высокие показатели устойчивости к антибиотикам и смертности, чем *E. faecalis* [112, 124].

Наиболее распространенными инфекциями, вызываемыми ими, являются бактериемия, эндокардит, инфекции мочевыводящих путей, инфекции ожоговых и хирургических ран, внутрибрюшные и внутритазовые инфекции, а также инфекции катетеров и других имплантированных медицинских устройств. За последние два десятилетия появление устойчивых к ванкомицину энтерококков (*vancomycin resistant Enterococcus – VRE*) вызывает тревогу из-за высокого уровня смертности. Инфекции, вызываемые этими патогенами, являются тяжелыми, стойкими и с высоким уровнем летальности. Общий уровень смертности от энтерококковой бактериемии составляет от 26% до 46% [105, 112].

В предыдущие годы источником энтерококковой инфекции для большинства пациентов считалась их собственная эндогенная флора. Однако заметный рост энтерококковых инфекций, протекающих как ИСМП, продемонстрировал, что основной способ распространения от пациента к пациенту происходит через руки медицинских работников, медицинские инструменты и медицинские халаты [116]. Энтерококки могут сохраняться на коже рук до одного ч и до 4 месяцев на поверхностях, где они могут служить резервуаром для постоянной передачи в отсутствие регулярной дезактивации [138].

Основными факторами риска инфекционных заболеваний, вызванных *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*, обладающих МЛУ, являются: недавно принесённые трансплантации, сопутствующие заболевания, такие как диабет или почечная недостаточность, длительное использование катетеров [58, 112].

E. faecalis и *E. faecium* проявляют внутреннюю устойчивость к широкому спектру антибиотиков, они генетически устойчивы к цефалоспорином и обладают естественной пониженной восприимчивостью к пенициллинам из-за экспрессии пенициллинсвязывающих белков (PBPs), которые слабо связываются с бета-лактамами антибиотиками. Еще одна группа антибиотиков, к которым *E. faecium* и *E. faecalis* проявляют умеренную внутреннюю и высокую приобретенную резистентность, это аминогликозиды. Резистентность вызвана неспособностью

антибиотика проникать в цитоплазму и ингибировать синтез рибосомального белка и за счет изменения генов, кодирующих фосфотрансферазы, ацетилтрансферазы и нуклеотидилтрансферазы [120]. Кластеры генов, кодирующих устойчивость к ванкомицину, распространены в природе, и источником генов *van*, идентифицированных в современных изолятах энтерококков, являются почвенные бактерии рода *Paenibacillus*. Энтерококки функционируют как резервуар детерминант лекарственной устойчивости и могут служить трамплином для распространения этих генов на другие грамположительные патогены. Описаны случаи, когда VRE являются источником генов устойчивости к ванкомицину, которые были идентифицированы в MRSA [81, 191].

Staphylococcus aureus является самым распространенным бактериальным патогеном человека, вызывающим широкий спектр клинических проявлений. Эти инфекции широко распространены как во внебольничной, так и внутрибольничной среде. *S. aureus* является одновременно комменсальной бактерией и патогеном человека. Примерно 30% населения земли колонизировано *S. aureus*. Он обнаруживается в нормальной флоре человека на коже и слизистых оболочках (чаще всего в носовой области) [221]. *S. aureus* вызывает бактериемию, инфекционный эндокардит, инфекции кожи и мягких тканей (например, импетиго, фолликулиты, фурункулы, карбункулы, флегмоны и др.), остеомиелит, септический артрит, легочные инфекции (например, пневмонию, эмпиему плевры), гастроэнтерит, отит, менингит, синдром токсического шока и инфекции мочевыводящих путей [218]. Более половины ИСМП во всем мире вызваны *S. aureus*, а именно, его метициллин устойчивым штаммом (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA). При этом за последние 10 лет наблюдается некоторое снижение распространенности MRSA в Соединенных Штатах и Европе, хотя показатели смертности по-прежнему остаются высокими [114].

Устойчивость *S. aureus* к пенициллину определяется *blaZ* геном, который кодирует β -лактамазу. Метициллин, полусинтетический бета-лактамный антибиотик, введенный в терапию инфекций, не чувствительных к пенициллину, в конце 1950-х годов. Устойчивость к нему у *S. aureus* обусловлена наличием *meSA*

(или *tecC*) гена, кодирующего пенициллинсвязывающий белок PBP2a. Эти детерминанты устойчивости являются частью мобильного генетического элемента, называемого стафилококковой кассетной хромосомой *tec* (*SCCtec*), которая вставляется в хромосому *S. aureus* [57]. Плазмиды и кассетные хромосомы стафилококков играют центральную роль в придании устойчивости к β -лактамам антибиотикам и ванкомицину. В последние 20 лет участились случаи возникновения штаммов *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину и, реже, с полной устойчивостью к ванкомицину. Полная устойчивость к ванкомицину у *S. aureus* обеспечивается опероном *vanA*, первоначально входящим в состав конъюгативной плазмиды устойчивых к ванкомицину энтерококков [168].

Факторами, определяющими заболеваемость, являются: возраст (высокие показатели заболеваемости в первый год жизни, низкая заболеваемость в молодом возрасте и постепенный рост заболеваемости с возрастом), иммуносупрессия, наличие трансплантатов, имплантированных протезов, катетеров, инъекционная наркомания [141, 179].

Klebsiella pneumoniae является условно-патогенным микроорганизмом, вызывающим широкий спектр заболеваний особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом и все чаще демонстрирующим резистентность к антибиотикам. Факторы, влияющие на вероятность инфицирования это: поступление в ОИТ, длительное использование инвазивных устройств, неэффективные стратегии борьбы с инфекцией в медицинском учреждении, иммуносупрессия, особенно у больных сахарным диабетом и алкоголизмом, длительное применение антибиотиков широкого спектра действия. Согласно некоторым исследованиям [173], на *Klebsiella pneumoniae* приходится около трети всех грамотрицательных инфекций, таких как инфекции мочевыводящих путей, цистит, пневмония, инфекции хирургических ран, эндокардит и септицемия. Эта бактерия также вызывает некротизирующую пневмонию, гнойные абсцессы печени и эндогенный эндофтальмит [93]. В общем сообществе от 5% до 38% людей переносят *K.*

pneumoniae в кале и от 1% до 6% – в носоглотке. Основными резервуарами инфекции являются ЖКТ пациента и руки персонала больницы [59, 72].

K. pneumoniae имеет полисахаридную капсулу, которая определяет её вирулентность и способность избегать фагоцитоза [83]. За последние два десятилетия, наряду с “классическим” штаммом *K. pneumoniae* (сКР), появился новый “гипервирулентный” штамм *K. pneumoniae* (hvКР), вызывающий высокоинвазивные инфекции, такие как абсцессы печени, остеомиелит, как у здоровых, так и у лиц с ослабленным иммунитетом [190]. Кроме того, этот штамм способен вызывать эндофтальмит и менингит и, в отличие от инфекций сКР, в основном поражает молодых, здоровых людей [206]. В отличие от типичных внутрибольничных инфекций, вызываемых сКР, hvКР может вызывать серьезные внебольничные инфекции у людей с нормальным иммунитетом [142].

Уровень распространенности лекарственной устойчивости в *K. pneumoniae* следующий: амикацин (40,8%), азтреонам (73,3%), цефтазидим (75,7%), ципрофлоксацин (59,8%), колистин (2,9%), цефотаксим (79,2%), цефепим (72,6) и имипенем (65,6%) [93].

Acinetobacter baumannii – условно-патогенный микроорганизм человека. *A. baumannii* в настоящее время считается глобальной угрозой мировому здравоохранению из-за его склонности приобретать фенотипы с МЛУ, ШЛУ и даже ПЛУ с непрогнозируемыми темпами [62, 82, 113]. *A. baumannii* обладает множеством механизмов выживания в широком диапазоне сред, что повышает ее способность к распространению в больницах [181]. Инфекции, вызванные *A. baumannii*, составляют около 2% всех ИСПМ, в США и Европе; однако эти показатели в два раза выше в Азии и на Ближнем Востоке [152, 158]. Хотя показатели инфицирования *A. baumannii* ниже по сравнению с другими грамотрицательными патогенами, около 45% всех изолятов данного патогена, полученных от больных по всему миру, считаются имеющими МЛУ, а в Латинской Америке и на Ближнем Востоке [114] этот показатель достигает 70%, что почти в четыре раза выше, чем у других грамотрицательных патогенов, таких как *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* [106].

Чаще всего, микроорганизмы *A. baumannii* вызывают нозокомиальную пневмонию, связанную с ИВЛ, инфекции кровотока, связанные с катетеризацией, реже инфекции кожи и мягких тканей в области хирургического вмешательства, а также инфекции мочевыводящих путей, связанные с катетером [164, 207, 231].

Общим для этих инфекций является нарушение анатомического барьера, которое позволяет проникнуть *A. baumannii* непосредственно к месту заражения. Внебольничные инфекции, вызванные *A. baumannii*, встречаются достаточно редко – в основном, у пациентов с сопутствующими заболеваниями, такими как алкоголизм, сахарный диабет, онкология или обструктивные заболевания легких [89]. Большинство инфицированных *A. baumannii* возникают у тяжелобольных пациентов в ОИТ, составляя до 20% [143].

Наиболее распространенные факторы риска для приобретения МЛУ *A. baumannii* это предшествующее применение антибиотиков, кортикостероидов, искусственная вентиляция легких, продолжительность пребывания в ОИТ/больнице более 7 суток, тяжесть заболевания и использование медицинских устройств [140].

A. baumannii обладает почти всеми механизмами бактериальной резистентности. Липополисахариды, везикулы и белки, полисахаридные капсулы, фосфолипазы, протеазы, порины внешней мембраны и системы поглощения железа являются наиболее важными факторами устойчивости *A. baumannii*. Также ключевыми механизмами устойчивости *A. baumannii* являются низкая проницаемость внешней мембраны, изменение сайтов связывания антибиотиков и мутации, которые могут вызывать повышение или понижение активности системы оттока [140, 143, 198]. *A. baumannii* имеет генетически пониженную восприимчивость к нескольким классам антибиотиков, включая бета-лактамы, макролиды, триметоприм и фосфомицин, из-за естественной непроницаемости мембран, активности базального оттока и наличия двух хромосомно кодируемых бета-лактамаз, цефалоспорины ADC и ОКСА-51 оксациллиназы. Развитие приобретенной резистентности происходит за счет мутаций в хромосомных структурах и приобретения экзогенных генов путем горизонтального переноса

генов. Например, мутации в двухкомпонентной регуляторной системе AdeRS и в регуляторах AdeL и AdeN приводят к изменению выпускных насосов AdeABC, AdeFGH и AdeIJK и к повышению резистентности к бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, тигециклину, макролидам, линкозамидам, хинолонам, антифолатам и хлорамфениколу [140, 143, 198].

Pseudomonas aeruginosa или синегнойная палочка – условно-патогенный микроорганизм, являющийся компонентом нормальной микрофлоры кожи. *P. aeruginosa* может вызывать множественные инфекции, которые варьируются от местных до системных и от доброкачественных до опасных для жизни. *P. aeruginosa* четвертый по распространённости патоген, вызывающий ИСМП, является причиной около 10% от всех внутрибольничных инфекций. Это вторая наиболее частая причина пневмонии, связанная с ИВЛ, и третья причина инфекций кровотока. *P. aeruginosa* вызывает эндокардит, септицемию, инфекции мочевыводящих путей, цистит, хирургические раневые инфекции. Хронические инфекции дыхательных путей, вызванные *P. aeruginosa*, являются основным сопутствующим заболеванием у пациентов с муковисцидозом, бронхоэктазией, или хронической обструктивной болезнью легких. *P. aeruginosa* остается жизнеспособной в легких пациентов с диагнозом «муковисцидоз» более десяти лет, именно эта группа пациентов особо подвержена поражению патогенами с МЛУ и ШЛУ [87]. Кроме того, к категориям пациентов с высоким риском приобретения данного типа инфекции относятся лица, имеющие иммунодепрессию (нейтропению, синдром приобретенного иммунодефицита), обширные ожоги, госпитализированные в ОИТ [65]. Благодаря своей адаптивной природе и высокой выживаемости *P. aeruginosa* колонизирует как влажную среду, так и может выживать на сухих поверхностях больничной среды от 6 ч до 6 месяцев [220].

P. aeruginosa проявляет устойчивость к различным антибиотикам, включая аминогликозиды, хинолоны и β -лактамы. Механизмы *P. aeruginosa*, используемые для противодействия антибиотикам, можно разделить на внутренние, приобретенные и адаптивные. Внутренняя резистентность *P. aeruginosa* включает низкую проницаемость внешней мембраны, экспрессию насосов для оттока,

которые выводят антибиотики из клетки, и выработку ферментов, инактивирующих антибиотики. Приобретенная устойчивость *P. aeruginosa* может быть достигнута либо горизонтальным переносом генов устойчивости, либо мутационными изменениями. Адаптивная резистентность *P. aeruginosa* включает образование биопленки в легких инфицированных пациентов, где биопленка служит диффузионным барьером для ограничения доступа антибиотиков к бактериальным клеткам [180, 220].

Enterobacterales представляют собой семейство условно-патогенных микроорганизмов, являющихся компонентами нормофлоры ЖКТ человека, которые включают распространенные (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) и редкие (*Proteus mirabilis*, *Raoultella planticola*, *Citrobacter freundii*) патогены [188].

Энтеробактерии являются одними из наиболее распространенных патогенов человека, вызывающих такие инфекции, как цистит, пиелонефрит, септицемию, пневмонию, перитонит, менингит, и в том числе ИСМП: инфекции мочевыводящих путей катетер- или инструментально-ассоциированные, пневмонии, в том числе связанные с ИВЛ, инфекции кожи и мягких тканей, такие как раневые инфекции, инфицирование пролежней, ожоговые инфекции, инфекции кровотока. *Enterobacterales* легко распространяются между людьми через руки, пищу и воду [87]. Факторами риска для приобретения МЛУ является предшествующее применение антибиотиков, в первую очередь β -лактамов, инвазивные процедуры, пребывание в ОИТ, иммунный статус пациента.

Enterobacterales с МЛУ и ШЛУ активно распространяются как патогены, ответственные за внутрибольничную инфекцию. Они обладают способностью накапливать гены устойчивости, главным образом за счет горизонтального переноса генов. Наиболее проблемные механизмы — это приобретение генов, кодирующих расширенный спектр β -лактамаз, карбапенемаз, 16S рРНК метилаз, обеспечивающих устойчивость к аминогликозидам, плазмид-опосредованная устойчивость хинолонов и *mcr* генов, обеспечивающих устойчивость к полимиксинам. Особую обеспокоенность вызывает резистентность к

карбапенемам (имипенема, эртапенема, меропенема, дорипенема), которые являются антимикробными препаратами последней очереди [142, 175].

1.1.2. Концепция профилактики и лечения ИСМП

Открытие антибиотиков в 1928 г. и их внедрение в клиническую практику произвели революцию в области медицины. С тех пор и в течение десятилетий антибиотики использовались для лечения широкого спектра инфекций, спасая миллионы жизней. Однако, современные темпы развития антибиотикорезистентности значительно превышают уровень открытия и разработки новых антибиотиков и представляют собой глобальную проблему общественного здравоохранения. По некоторым оценкам, к 2050 году более 10 миллионов человек могут ежегодно умирать из-за устойчивости патогенов к противомикробным препаратам. Хотя это спорная цифра [86], она подчеркивает серьезность проблемы лечения бактериальных инфекций, обладающих МЛУ и ШЛУ [67], на что особенно обращено внимание на заседании ВОЗ в 2014 г. [162, 186, 232].

В июле 2017 г. на саммите G20 в Гамбурге было подчеркнуто, что мировому сообществу необходимо объединить усилия по поиску новых альтернативных методов лечения бактериальных инфекций [104]. В России для решения этой проблемы была разработана и внедрена программа «Стратегия контроля антимикробной терапии» (СКАТ) для стационаров [42]. Кроме того, была принята «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», утвержденная Распоряжением Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р.

В соответствии с этими документами концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, эпидемиологический надзор за ИСМП — это система непрерывного слежения за эпидемическим процессом и его детерминантами для осуществления эпидемиологической диагностики с целью принятия управленческих решений по предупреждению возникновения и распространения ИСМП. Эпидемиологический надзор - это активное выявление,

учет и регистрация ИСМП; выявление факторов риска возникновения ИСМП; эпидемиологический анализ заболеваемости пациентов и медицинского персонала ИСМП; микробиологический мониторинг за возбудителями ИСМП; определение спектра устойчивости микроорганизмов к антимикробным средствам (антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и др.); эпидемиологическую оценку лечебно-диагностического процесса; эпидемиологическую и гигиеническую оценку больничной среды, условий пребывания в учреждении здравоохранения пациентов и медицинских работников; оценку эффективности проведенных профилактических и противоэпидемических мероприятий; прогнозирование эпидемической ситуации.

Целью Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ является повышение эффективности профилактики и лечения инфекций, вызванных микроорганизмами с МЛУ. Одна из задач Стратегии направлена на создание новых альтернативных антибиотикотерапии методов лечения и профилактики инфекционных болезней. Таким направлением может быть фаготерапия. Использование бактериофагов для лечения ИСПМ имеет ряд преимуществ:

- бактериофаги специфичны, то есть их литическая активность проявляется в отношении определенного вида или рода микроорганизмов;
- бактериофаги вирулентны в отношении бактерий, обладающих устойчивостью к антибиотикам;
- бактериофаги способны проникать в ткани организма человека и животного;
- результаты исследований бактериофагов *in vivo*, длительная практика их клинического применения указывают на незначительное количество возможных нежелательных реакций;
- бактериофаги не вызывают побочных эффектов, не подавляют рост нормофлоры, не ослабляют иммунитет;
- бактериофаги могут применяться у пациентов любого возраста;

- противопоказанием к медицинскому применению бактериофагов служит только индивидуальная непереносимость компонентов лекарственного препарата.

1.2. Бактериофаги как лекарственные средства

1.2.1 Применение бактериофагов для терапии инфекционных заболеваний.

История и современность

Согласно проведенному научному поиску по базам PubMed, Scopus, Web of Science (ключевые слова: *bacteriophages; phage therapy, bacteriophage therapy, clinical studies of bacteriophages, dosages form; drug design*) очевидно, что интерес исследователей к изучению бактериофагов, как средств терапии бактериальных инфекций, растет (рис.1.1, 1.2). Кроме того, ряд журналов в последние годы выпустили специальные выпуски, посвященные фаготерапии (Frontiers in Microbiology, Frontiers in Pharmacology, Viruses, Antibiotics, Pathogens, Microorganisms и др.).

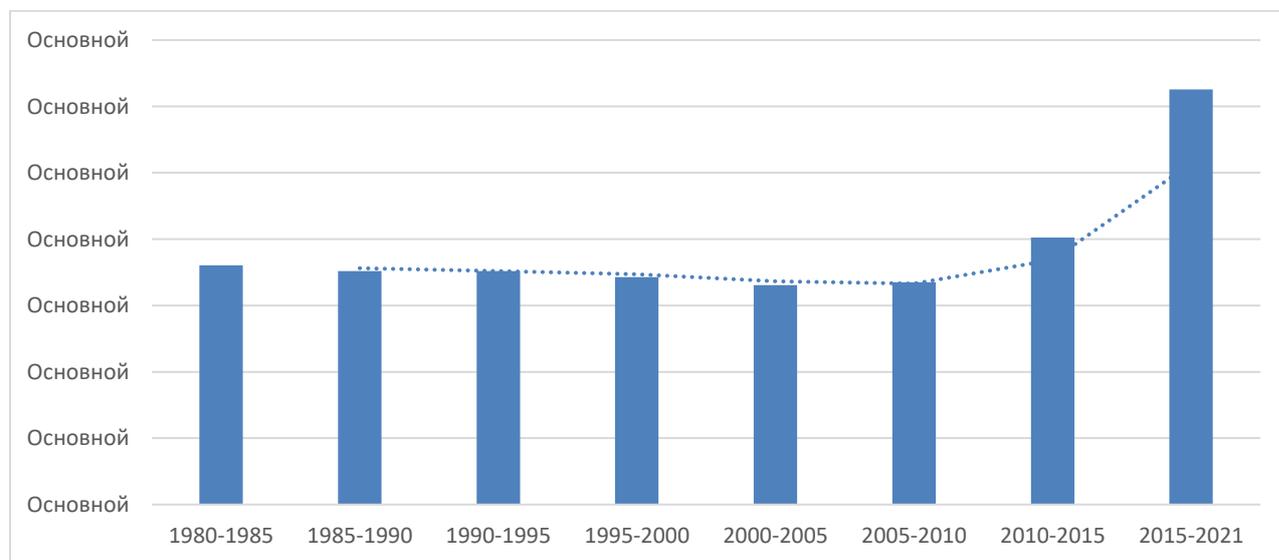


Рисунок - 1.1 - Публикации по базам PubMed, Scopus, Web of Science в целом по исследованиям бактериофагов в медицине

Общее количество публикаций по исследованию бактериофагов выросло за последние пять-шесть лет в среднем на 20%, однако интерес к изучению эффективности и безопасности терапии бактериофагами вырос больше чем в два раза, так же, как и значительно выросло количество публикаций по разработке лекарственных форм (ЛФ) бактериофагов.

Вирусы бактерий, активные в отношении возбудителей кишечных, респираторных, урогенитальных и ряда других инфекций, известны с начала XX в. Впервые характерную зону лизиса, связанную с фаговой инфекцией, описал Ф. Туорт в 1915 г., а Ф. д'Эрелль определил источник этого явления, отнес его к бактериальным вирусам и ввел термин «бактериофаг». Д'Эрелль впервые провел лечение бактериофагами трех детей в возрасте 3, 7 и 12 лет, больных дизентерией, в детской больнице в Париже в 1919 г. У пациентов купировались симптомы инфекционного заболевания через одни сутки после однократного применения противодизентерийного бактериофага [3, 17, 39, 115, 212, 213].

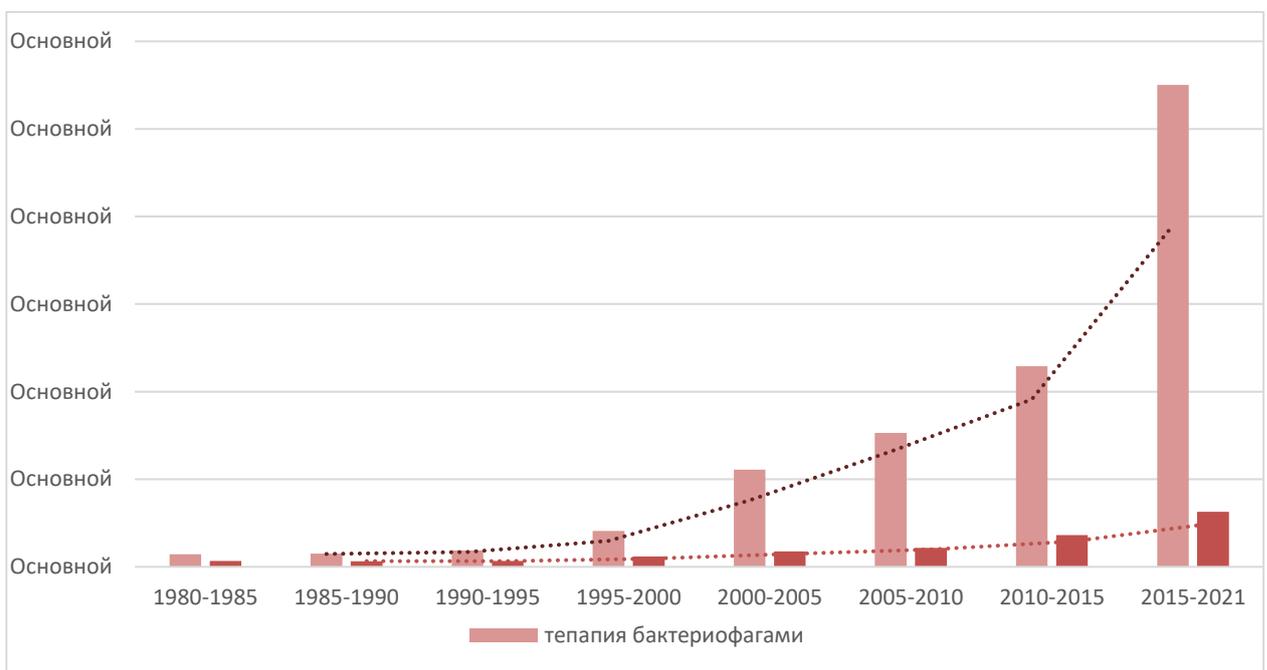


Рисунок - 1.2 - Публикации по базам PubMed, Scopus, Web of Science по исследованиям в области лечения бактериофагами и создания ЛФ на их основе

В Советском Союзе впервые бактериофаги применили в 1931 году для профилактики и лечения холеры. [3]. После этого было открыто производство коммерческого фагового препарата против холеры в Тбилисском НИИ вакцин и сывороток. Затем открылись центры по производству фаговых препаратов в Индии и Бразилии. Французская частная лаборатория вплоть до 1940 года производила 5 наименований фаговых препаратов против различных бактериальных инфекций: Bacte'-coli-phage, Bacte'-rhino-phage, Bacte'-intesti-phage, Bacte'-pyo-phage, Bacte'-staphy-phage, которые на рынок поставляла коммерческая компания «L'Oréal». В

1940-е гг. в США производство фагов осуществляла фирма «Eli Lilly & Co», которая поставляла на рынок 7 видов лекарственных препаратов (ЛП): стафилококковый, стрептококковый, эшерихиозный и против других патогенных бактерий [3, 21, 50].

Несмотря на полученные положительные результаты научных исследований препаратов бактериофагов, в целом клинические данные об их эффективности были противоречивыми. Было допущено много ошибок из-за плохого понимания биологической природы фагов. Лечебные средства готовились на основе умеренных фагов, фаготерапия инфекций, вызванных несколькими возбудителями, проводилась монопрепаратами. Недостаточная очистка и неправильное хранение приводили к низким титрам активного фага, загрязнению бактериальными антигенами. При выборе бактериофага также не учитывали чувствительность к бактерии-мишени. Кроме того, была неизвестна роль врожденного иммунного ответа в удалении активного фага и снижении эффективности фаговой терапии [39]. Несмотря на предварительные многообещающие результаты в большинстве стран Западной Европы и Америки промышленное производство коммерческих препаратов бактериофагов остановилось [3, 213].

На территории СССР производство лечебных бактериофагов напротив никогда не останавливалось. Массовое производство осуществлялось при Тбилисском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток, затем в Научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней им. И.И. Мечникова в Ленинграде, потом были построены заводы по производству бактериофагов в Уфе, Нижнем Новгороде, Хабаровске и Перми [3]. Бактериофаги использовались для диагностики, обнаружения патогенных бактерий без выделения их в чистом виде, терапии острых кишечных инфекций (ОКИ) и декомпенсированных форм дисбактериоза. Кроме того, бактериофаговые препараты применялись при широком спектре гнойно-воспалительных заболеваний бактериального генеза и с профилактической целью в регионах, эндемичных по инфекционным заболеваниям, а также в организованных коллективах (ясли, детские сады, школы и армейские казармы),

где могли происходить быстрые вспышки инфекций. В 1960-1990 гг. активно проводились клинические исследования производимых в Советском Союзе фаговых препаратов для профилактики и лечения ОКИ [54]. В публикации 1968 г. описан положительный опыт массового профилактического применения в педиатрической практике таблетированной формы дизентерийного бактериофага [7]. Крупное клиническое исследование было проведено в Тбилиси, в нем изучалось профилактическое применение дизентерийного бактериофага на 30 тысячах детей в возрасте от 6 месяцев до 7 лет. Применение этого ЛП позволило более чем в три раза уменьшить заболеваемость дизентерией [3]. Эффективность регулярной фагопрофилактики, объемом 16-20 курсов в год, была продемонстрирована в работе С.А. Погорельской в 1968 г. в сравнительном исследовании, проведенном на базе 58 коллективов младших дошкольных учреждений Горьковской области [3]. Ю.П. Солодовников в 1970 г. провел похожие клинические исследования на базе детских садов и яслей [49]. В исследовании приняли участие более 6,5 тысяч детей и было показано, что регулярный прием поливалентного дизентерийного бактериофага больше чем в два раза уменьшил число случаев дизентерии в фагированной группе по сравнению с контрольной. В то же время ряд сомнений об эффективности применения бактериофагов при ОКИ у детей отражен в отчете ВОЗ, подготовленном группой российских и пакистанских ученых в 1971 г. [163]. У 16 детей в возрасте 7-12 лет с острой холерой на фоне стандартной регидратационной терапии был применен бактериофаговый препарат, произведенный в СССР. В качестве групп сравнения выступали пациенты, у которых применялась стандартная антибиотикотерапия (тетрациклин) или препарат плацебо. Незирая на крайне незначительное число пациентов в опытной группе и в группах сравнения, исследователи сделали вывод, что в используемых дозах терапевтический эффект бактериофага заметно уступает тетрациклину. Опубликованы результаты исследования перорального применения бактериофагов у пятисот недоношенных детей с неонатальным сепсисом для купирования у них ятрогенного дисбактериоза кишечника, появившегося на фоне антибиотикотерапии [28]. При приеме колипротейного бактериофага у всех

недоношенных детей заметно улучшалась клиническая картина, что выражалось в нормализации перистальтики кишечника, элиминации *E. coli* и *Proteus*, а также увеличении веса, что позволило значительно снизить количество летальных исходов у данной категории пациентов. В 1990 г. Л.Н. Милютин опубликовала данные, подтверждающие эффективность лечения сальмонеллеза и дизентерии с использованием, комбинированной фаго- и антибиотикотерапии у ста двенадцати детей [33]. За счет использования комбинированного лечения исследователю удалось добиться лечебной эффективности при сальмонеллезе в более чем в 80 % случаев и при дизентерии – более чем в 90% случаев. Несколько позднее Л.Ю. Нилова изучала чувствительность патогенных микроорганизмов, выделенных у 127 детей в возрасте до 3 лет, страдающих дисбактериозом, к фаговым препаратам различных производителей (филиалов компании «Микроген» в Нижнем Новгороде, Перми и Уфе) [36] и сделала вывод, что фаготерапия является перспективным методом эрадикации патогенной микрофлоры при дисбактериозе кишечника у детей. В 1982-1983 гг. 3 тыс. военнослужащих из разных регионов СССР приняли участие в программе оценки профилактического фагирования таблетированным поливалентным препаратом против дизентерии. Уровни заболеваемости в опытных и контрольной группах в период эпидемического подъема статистически достоверно различались, достигая на Дальнем Востоке в ряде воинских коллективов отличий более чем в девять раз (заболеваемость в опытной группе на фоне возникшей в подразделении вспышки острой дизентерии, вызванной потреблением инфицированной *S. flexneri* воды, при фагировании 1 раз в 3 дня была ниже, чем в контрольной, в 9,5 раз, при фагировании по схеме 1 раз в 5 дней – в 5,7 раза) [4]. Клинические испытания фагового коктейля против *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* были осуществлены сотрудниками ФГУП НПО «Микроген» Н.Н. Ворошиловой с соавт. [14]. Испытания проводили с участием двухсот двадцати детей с ОКИ, разделенных на одинаковые по размеру группы: опытную, в которой проводилось лечение бактериофагами, и контрольную, пациенты которой принимали пробиотики, эубиотики или антибиотики. Данный фаговый коктейль продемонстрировал более

высокую эффективность (на 28%), чем пробиотики и эубиотики и близкую эффективность к антибиотикам (около 90%).

Сотрудниками ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора и ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора опубликованы в 2015 г. результаты разработки специализированного продукта диетического профилактического питания, разрешенного Роспотребнадзором в качестве средства фагопрофилактики декретированных контингентов работников предприятий различных отраслей с целью снижения риска развития спорадических случаев и вспышек Food-borne infections (FBI), вызванных *E. coli*, *Salmonella enterica* (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*), *Listeria monocytogenes* и *S. aureus*. Была подтверждена безопасность и эффективность этого продукта на животных и в рамках ограниченных клинических испытаний [53].

Фаготерапия в настоящее время переживает возрождение, вызванное главным образом кризисом устойчивости к антибиотикам. Этому возобновлению интереса к фаготерапии способствовало улучшение понимания биологии, генетики, иммунологии и фармакологии фагов. Современные молекулярно-биологические методы (next generation sequencing, электронная микроскопия, геновая инженерия и др.) являются инструментом для детальной характеристики бактериофагов, кроме того, возможно изменение генетических свойств фагов, например расширение их спектра действия или использование фагов как носителей других ЛП. В США и в Европе были проведены крупные конгрессы по вопросам фаготерапии, в которых была затронута тематика практического применения бактериофагов, их производства и нормирования [219].

За последние 10 лет в иностранной литературе было опубликовано достаточно большое количество исследований по изучению клинической эффективности бактериофагов.

Эффективность местного применения фаготерапии оценивалась в 2009 г. Wright A. et al. [236] в рандомизированном двойном слепом плацебо-

контролируемом исследовании, в котором изучали действие фагового коктейля при лечении хронического отита, вызванного устойчивым к антибиотикам штаммом *P. aeruginosa*, у 24 пациентов. Препарат на основе фага улучшил все измеренные результаты по сравнению с плацебо после 42-дневного периода наблюдения. Также в период с 2015 по 2017 г. было проведено рандомизированное, многоцентровое, одиночное слепое и открытое исследование, в котором оценивали лечение инфекций ожоговых ран, вызванных *P. aeruginosa*, у 25 пациентов с использованием коктейля из 12 фагов, предназначенного для местного применения. Не было зарегистрировано нежелательных побочных эффектов, связанных с применением фагового коктейля. Авторы также показали, что лечение значительно снизило нагрузку патогена в ранах [126]. Продолжаются исследования II фазы (регистрационный номер клинических испытаний NCT02664740) местного лечения язв диабетической стопы, инфицированных *S. aureus*, с помощью фагового коктейля [109]. Также подтверждена эффективность применения фагов в офтальмологии – глазные капли с фагами при абсцессе роговицы глаза и интерстициальном кератите [98]. Успешное лечение синегнойной септицемии, чувствительной только к колистину, препаратом бактериофага описано в 2017 г. [127]. В 2019 г. проводилась I фаза клинических исследований по оценке безопасности, переносимости и предварительной эффективности фагового коктейля, состоящего из трех литических фагов, применяемого интраназально у пациентов с хроническим риносинуситом, вызванным *S. aureus* [178]. Двухразовое интраназальное орошение фагами было безопасным и хорошо переносимым девятью пациентами в течение 14 дней лечения, без каких-либо серьезных нежелательных явлений. Хотя предварительные наблюдения за эффективностью кажутся многообещающими (у двух из девяти пациентов была эрадикация инфекции), авторы подчеркнули необходимость рандомизированного клинического исследования для определения оптимального режима дозирования.

Были проведены исследования, посвященные пероральному введению фагов. Бактериофаги против кишечной палочки для лечения желудочно-кишечных заболеваний оценивались в I фазе плацебо-контролируемых исследований у

здоровых взрослых из Швейцарии [72] и Бангладеш [201], в 2005 и 2012 гг., соответственно, а у здоровых и больных детей из Бангладеш в 2017 г. [199]. Не было обнаружено побочных эффектов от перорального введения фагов. Эти исследования также позволили получить представление о биодоступности и активности пероральных фаговых препаратов. Не было признаков наличия фагов или фагоспецифических антител в кровотоке и фаговый препарат не нарушал состав микробиоты кишечника. Однако такое же отсутствие репликации вируса наблюдалось у детей с диарейным заболеванием и лечение не оказало значительного благоприятного эффекта по сравнению со стандартной регидратационной терапией. Авторы объясняли это низкой дозой фагов в препарате из-за нейтрализации желудочным соком. Действительно, бактериофаги неустойчивы в кислой среде, что было показано в исследовании Sarker S.A. et al. [200]. Кроме того, также было установлено, что *E. coli* не была основной причиной острой бактериальной диареи, и поэтому даже эффективное лечение фагами, лизирующими *E. coli*, не привело к улучшению исхода заболевания [174].

В 2017-2018 гг. проводилось рандомизированное плацебо- контролируемое двойное слепое клиническое исследование поливалентного фагового препарата «Пиофаг» для лечения инфекций мочевыводящих путей у пациентов, перенесших трансуретральную резекцию предстательной железы. Исследование проводилось на базе Национального центра урологии в Тбилиси (Грузия) и финансировалось «Balgrist University Hospital» (Швейцария) (клиническое исследование № NCT03140085) [144]. В результате была показана безопасность применения препарата и выявлено снижение титров инфекционных бактерий у шести из девяти пациентов [222]. В 2020 г. были опубликованы дальнейшие результаты этого исследования, где на 113 пациентах показана эффективность лечения препаратом «Пиофаг» в двойном слепом плацебо-контролируемом испытании [145]. В 2020 г. проведено исследование в «Westmead Hospital», Австралия. Четырнадцати пациентам с инфекционным эндокардитом и сепсисом, вызванным *Staphylococcus*, внутривенно вводили фаговый коктейль ABSA01, включающий три разных бактериофага производства «AmpliPhi Biosciences», США. Коктейль вводили два

раза в день на протяжении двух недель. В результате исследователи наблюдали снижение воспалительных реакций и уменьшение бактериальной нагрузки [185]. Однако контрольной группы в исследовании не было. Компания «AmpliPhi Biosciences» получила разрешение FDA на проведение испытаний внутривенного фагового препарата для лечения гнойных ран и кожных инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами *S. aureus*.

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных терапии бактериофагами, описывающих как единичные случаи, так и клинические исследования, до сих пор ни одно двойное слепое рандомизированное клиническое исследование не дало данных, подтверждающих многообещающие результаты, полученные при экспериментальной терапии на животных и людях. Все публикации по клиническим исследованиям описывают исследования I или II фазы. Очевидно, что необходимо выявить вероятные причины невозможности подтвердить терапевтическую ценность клинической фаготерапии [111].

Одним из значимых аспектов, определяющих антибактериальную активность фагов, является их титр в фаговых препаратах. Worley-Morse T.O. et al. продемонстрировали линейную зависимость между ингибированием бактерий и концентрациями фагов [235]. В исследованиях, опубликованных Центром фаготерапии в Калифорнии, показано, что фаги в титре 10^{10} БОЕ/мл, вводимые внутривенно, оказывают фармакологическое действие без существенных побочных эффектов, но побочные эффекты проявлялись при увеличении титра до 10^{11} БОЕ/мл [60]. Кроме того, та же концентрация фага была успешно использована *in vivo* при лечении инфекции протезного коленного сустава [76], а хорошие клинические результаты были достигнуты при использовании концентрации фага 10^9 БОЕ/мл при лечении пневмонии и эмпиемы, связанных с вентиляцией легких [156].

Поскольку фармакокинетика фагов находится на ранней стадии определения, недостаточно известно об оптимальной дозировке и терапевтических концентрациях фагов в крови пациентов. По литературным данным,

терапевтический эффект достигался при концентрации фага от 10^4 БОЕ/мл до 10^9 БОЕ/мл [88, 185, 202].

Для повышения эффективности фаготерапии возможно применять персонализированный подход, когда фаги подбираются по активности в отношении бактерий, выделенных непосредственно от инфицированных пациентов [52, 145].

1.2.2 Обзор современных разработок в области создания лекарственных форм бактериофагов

Не менее важным вопросом наряду с изучением эффективности и безопасности лечения бактериофагами является создание стабильных и эффективных ЛП на их основе.

На российском фармацевтическом рынке зарегистрированы ЛП бактериофагов промышленного производства. Эти препараты представляют собой монокомпонентные фаголизаты или их коктейли в виде растворов для перорального, местного или наружного применения 12 наименований. В состав ряда препаратов входят консерванты (8-гидроксихинолина сульфат, хинозол и др.). 2 препарата представляют собой раствор для приема внутрь и ректального введения и четыре препарата в виде таблетированных ЛФ (таблица 1.3).

Кроме того, на территории РФ зарегистрированы парфюмерно-косметические средства с бактериофагами, которые содержат различные их коктейли и выпускаются в форме гелей с одинаковым составом вспомогательных веществ: гелеобразователь — редкосшитый акриловый полимер карбопол, экстракт календулы, консервант нипазол, вода (таблица 1.4).

Эффективность лекарственных препаратов во многом зависит от вида, состава ЛФ и от способа её введения, которые должны обеспечивать оптимальное терапевтическое действие препарата и комплаентность пациентов лечению, не вызывая негативных реакций.

Несмотря на многолетний опыт терапии, сопровождающейся пероральным приемом бактериофагов, и большое количество зарегистрированных в РФ

препаратов для перорального применения, фармакокинетика бактериофагов при приеме внутрь остается до конца не изученной.

Таблица 1.3 - Лекарственные препараты бактериофагов, зарегистрированные на территории РФ, производства АО «НПО Микроген» [9].

Препарат	Регистрационный номер	Лекарственная форма
Бактериофаг колипротейный	ЛС-001998	раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг стафилококковый	Р N001973/01	
Бактериофаг псевдомонасаэругиноза (синегнойный)	Р N001976/01	
Секстафаг®(Пиобактериофаг)	ЛС-001049	
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	ЛС-002031	
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный	ЛС-001361	
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный	ЛС-001297	
Пиобактериофаг комплексный	ЛС-000700	
Бактериофаг протейный	Р N001975/01	
Бактериофаг стрептококковый	Р N001974/01	
Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, E	ЛС-000624	
Бактериофаг коли	Р N001977/01	таблетки
Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE	ЛС-002206	
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	Р N002560/01	таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой
Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE	ЛС-002206	
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	Р N002560/01	
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	ЛС-002033	
Интести®-бактериофаг	ЛС-001999	раствор для приема внутрь и ректального введения

И, как уже указывалось выше, субстанцию бактериофагов при приеме внутрь необходимо защищать от агрессивной кислой среды желудка, что также подтверждается и отечественными исследователями [24]. В диссертационной работе Ковязиной Н.А. приводится сравнительная фармакокинетика коктейля бактериофагов, лизирующих *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *K. pneumoniae*, после перорального приема в виде раствора и кишечнорастворимых таблеток, полученных методом сухого гранулирования с последующим таблетированием. Было показано, что при пероральном введении лабораторным животным происходит всасывание бактериофагов в кровь, циркуляция в организме и выведение с мочой и каловыми массами. Независимо от типа ЛФ все компоненты коктейля бактериофагов обнаруживались в сыворотке крови, моче уже через 2 ч после приёма препаратов. Однако, при введении таблетированной формы наблюдали более высокую литическую активность коктейля бактериофагов.

Таблица 1.4. - Парфюмерно-косметические средства с бактериофагами, зарегистрированные на территории РФ

Наименование	Рег.номер декларации о соответствии/ номер гос.регистрации	Назначение	Состав коктейля бактериофагов
Фагодент®	RU Д-RU.A.Ж23.В.Ф0830	Гигиенические процедуры для полости рта	56 видов бактериофагов против 19 инфекций
Фагодерм®	RU Д-RU.AE96.В.01343/20	Гигиена и нормализация микрофлоры кожи и мягких тканей	47 видов бактериофагов против 16 инфекций
Фагогин®	KZ.18.01.79.001.E.003056.10.13	Средство для интимной гигиены	40 видов бактериофагов против 13 инфекций
Отофаг®	RU Д-RU.AЮ.18.В.02380/20	Гигиена и нормализация микрофлоры ЛОР-органов	32 вида бактериофагов против 12 инфекций

Разработка твердых ЛФ, устойчивых к желудочному соку, активно ведется во всём мире: России, Великобритании, Италии, США и Австралии [24, 133, 227].

В исследованиях, проводимых в университете Лафборо (Loughborough University, Leicestershire, England), получен положительный опыт использования технологии микрокапсулирования и мембранного эмульгирования для создания кишечнорастворимой твердой ЛФ для перорального приема, содержащей бактериофаг Felix O1, специфичный для *Salmonella* [205] или бактериофаг, специфичный для *E.coli* [227]. Исследователи из Австралии разработали универсальную технологию получения кишечнорастворимых таблеток с включением в состав различных фагов, в качестве модельного фага использовали PEV20 против псевдомонады. В общем виде технология заключалась в получении порошка фага методом распылительной сушки, затем прямом прессовании ядра и нанесении оболочки на таблетку [133].

В 2018 г. было проведено исследование по разработке таблеток бактериофагов из гранулята, полученного на основе Eudragit® S100 и трегалозы [226]. Авторы считают, что трегалоза в составе гранулята защищает бактериофаги от повышенных температур и предотвращает падение титра фагов в процессе получения ЛФ. Авторами, показано, что таблетки на основе данного гранулята, полученного распылительной сушкой, более стабильны в кислой среде желудка, чем микрокапсулы [226]. В работе, опубликованной в 2021 г., исследовательская команда университета Лафборо продемонстрировала успешное применение технологий мембранного эмульгирования и тройного инкапсулирования для контролируемого высвобождения в определенном отделе ЖКТ (при pH 5,5, pH 6 и pH 7) на примере бактериофага, лизирующего *E. coli* [194]. Группа ученых из Политехнического Университета Вирджинии (Virginia Tech, Blacksburg, USA) и медицинской школы Гарварда (Harvard Medical School, Boston, USA) [121] разработала оригинальную твердую ЛФ, в которую фаг вводили в виде суспензии. Продемонстрировали эффективность данной системы доставки *in vivo* на модели самок белых мышей BALB после однократного введения.

Для лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *P.aeruginosa*, *S.aureus* и поражающих органы дыхания с высокой летальностью (бактериальные пневмонии, муковисцидоз), ряд ученых предлагает разрабатывать аэродисперсные ЛФ бактериофагов в формах интраназальных спреев, аэрозолей, растворов для использования в небулайзерах, а также порошков для ингаляций [78, 80, 172].

В исследовании, проведенном в 2020 г. в Швейцарии [189], продемонстрировали в экспериментах на животных перспективность ингаляционной формы бактериофагов для лечения метициллин-резистентной пневмонии. В другой работе [203] изучаются методы доставки фагов для лечения инфекций, встречающихся у больных муковисцидозом. Исследователи сравнивают ингаляционное назальное и внутривентральное введение бактериофагов мышам, зараженным *B. cephalacia*. При этом, в работе использовали ингаляционное введение как жидкости, так и порошка бактериофага. Результаты исследования говорят о перспективности аэрозольной фаговой терапии. Агрегатное состояние бактериофагов активно влияет на стабильность их титра в процессе хранения и применения. Получение порошка бактериофага методом струйного распыления может приводить к механическим повреждениям бактериофагов [61, 149].

На решение этой проблемы направлены исследования по подбору вспомогательных веществ, методов и режимов получения лиофилизатов со стабильным титром фагов [150, 78, 80].

Для получения составов со стабильным титром фагов предлагают использовать новый метод тонкопленочной сублимационной сушки (Thin film freeze-drying – TFFD), в качестве криопротекторов были выбраны сахароза и лецитин. Ученые из США получили стабильные порошки фагов, которые можно использовать для различных способов ингаляционного введения [240].

Если применение бактериофагов для системного действия вызывает ряд опасений, связанных с иммунным ответом, то для разработки ЛФ наружного применения для лечения ожогов и ран таких ограничений нет. В работах [95] и [100] бактериофаги включают в состав коммерческих мягких ЛФ для

подтверждения эффективности предложенного вида ЛФ. В 2021 г. опубликована работа, посвященная разработке гидрофильного геля с коктейлем бактериофагов PEV1 и PEV31 для нанесения на раны. Показана стабильность составов на основе неионногенных полимеров: поливинилового спирта и поливинилпирролидона [79]. Китайские и гонконгские ученые разработали гель для лечения ран на основе терморевверсивного полимера Poloxamer 407 и бактериофагов ME-AB2 and MDR-AB2. Разработанная ЛФ была стабильна в течение 24 месяцев, показала способность к удалению биопленки *A. baumannii*. Гидрогелевая композиция значительно подавляла выживаемость микроорганизмов в модели раневой инфекции *ex vivo* с использованием кожи свиньи (снижение количества бактерий на 90% было достигнуто после 4-часовой обработки) [237]. Учеными Грузии, Индии и России разрабатываются пленки для нанесения на раны [25, 75, 128, 130]. Еще один вариант наружного использования бактериофагов – разработка повязок на рану. Институт химической инженерии и Национальный технологический университет Тайбэя представили результаты создания пористого перевязочного материала с использованием трехмерной (3D) печати на основе альгинатного геля с включенным в состав бактериофагом HZJ против H5a *E. coli*. ЛФ продемонстрировала способность медленно высвобождать литические фаги и эффективно подавлять рост бактерий в течение 24 ч на культуре клеток [204].

Еще одним направлением использования лекарственных форм бактериофагов является обработка протезов, имплантатов, операционного поля, а также катетеров, растворами и гелями бактериофагов, которая может эффективно предотвратить образование биопленок [71, 100].

В результате совместной работы, проведенной ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского и Сеченовским Университетом, были разработаны суппозитории, содержащие бактериофаги [10, 63]. Суппозитории были стабильны в течение 2 лет. Изучение фармакокинетики бактериофагов, специфичных в отношении *P. aeruginosa*, *S. enteritidis* и *E. coli*, после ректального введения лабораторным животным в составе суппозиториев, продемонстрировало системный эффект.

В работе, проведенной теми же авторами [2] описана разработка термореверсивного вагинального геля на основе комбинации полоксамера и производных целлюлозы с коктейлем бактериофагов, лизирующих патологическую микрофлору влагалища.

В 2011 г. была опубликована работа, посвященная разработке назальной формы бактериофагов для терапии заболеваний, вызванных MRSA [55]. Описаны результаты получения назальных пленок на основе сочетания гидроксипропилметилцеллюлозы, желатина и маннитола.

Кроме того, предлагается получать офтальмологические ЛФ с бактериофагами для лечения кератита и эндофтальмита, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями *Enterococcus spp.* и *S. aureus* [98, 136].

Известны технологии включения бактериофагов в современные системы доставки – липосомы, наноэмульсии и наносферы [66, 94, 148]. Их использование, по мнению авторов, позволит увеличить биодоступность и улучшить фармакокинетику бактериофагов [148], а также обеспечит более высокую стабильность титра фага в ЛФ [66].

Еще одним вектором развития фаготерапии является создание ЛФ на основе ферментов (эндолизинов) бактериофагов [12, 13, 70, 225], а также комбинированных препаратов фагов и ферментов, выделенных из них. Предполагается, что совместное применение бактериофагов и эндолизинов создаст синергический эффект и увеличит широту терапевтического действия бактериофагов [171].

1.2.3. Нормирование, методы получения и оценки качества препаратов бактериофагов

Можно выделить два принципиальных подхода к получению препаратов бактериофагов. Традиционный подход, использующийся в нашей стране для производства коммерческих препаратов бактериофагов, подразумевает разработку ЛП фагов с максимально широким спектром действия и фиксированным составом. Технологии производства таких ЛП внедрены в практику компанией «Микроген».

Однако терапевтическое применение фиксированных комбинаций бактериофагов сопряжено с рядом существенных недостатков. Бактерии способны к изменчивости и приобретению резистентности к конкретному фагу в процессе терапии, что приводит к снижению патогенности микроорганизма и повышает вероятность эрадикации возбудителя средствами иммунной системы пациента [166, 176]. То есть, при необходимости повторной терапии лекарственный фаговый препарат широкого спектра может не обладать требуемым терапевтическим эффектом. Следующим недостатком является сложность взаимодействия бактериофага с иммунной системой пациента [119, 223]. Производство и регистрация препаратов широкого спектра действия с фиксированным составом, должна быть адаптирована к циркулирующим в определенной географической области или медицинском учреждении штаммам бактерий, что влечёт за собой значительный рост затрат на получение таких препаратов [11, 19].

Второй подход (персонализированная фаготерапия) подразумевает применение препарата из одного или нескольких фагов против штамма патогена, выделенного от конкретного пациента и чувствительного к этому препарату. Персонализированная фаготерапия лишена недостатков препаратов фиксированного состава [27].

В то же время существующий в настоящее время регламент регистрации фармацевтических субстанций и ЛПЗ значительно ограничивает возможность разработки и выхода на рынок новых препаратов бактериофагов как для традиционного терапевтического подхода, так и для персонализированного [99]. Регистрация лекарственного препарата требует продолжительных клинических испытаний и значительных инвестиций, но если в случае синтезированных низкомолекулярных соединений или биомолекул окупаемость вложений обеспечивается патентной защитой, то для препаратов бактериофагов такая практика невозможна [217].

Регулирующие органы США и Европы классифицируют фаги как биологические вещества, вследствие чего фаги подпадают под действие фармацевтического законодательства [183, 193]. Функции по регистрации

биологических препаратов в США выполняет департамент FDA (Food and Drug Administration), имеющий название CBER (Center for Biologics Evaluation and Research). Нормативная база для регулирования регистрации биологических продуктов изложена в законе Public Health Service Act, а также в параграфе 355 закона Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA), согласно которому регистрационное досье на новый ЛП должно содержать полную информацию о его составе и нет возможности указать вариативный состав. Требования ЕМА (European Medicines Agency) к препаратам бактериофагов в целом соответствуют требованиям FDA [117, 122]. Кроме того, маркетинг фагового продукта требует подтверждения безопасности, эффективности, а также качества при производстве в соответствии с требованиями GMP [182]. Соблюдение GMP требует значительных финансовых ресурсов [126, 183] и, следовательно, является критическим препятствием для центров фаготерапии. Контроль качества фагов рекомендуется проводить по следующим критериям [186]: отсутствие профагов и устойчивости к антибиотикам у бактерий, используемых для производства фагов, литическая и специфическая активность отдельных фагов в отношении целевых бактерий, контроль примесей (эндотоксинов, остаточных реагентов). В иностранных фармакопеях отсутствуют статьи, регламентирующие показатели качества ЛП бактериофагов, поэтому исследователи при разработке фаговых препаратов опираются только на научные источники.

В мировой лечебной практике описаны примеры применения бактериофагов в рамках программы «сострадательного использования». Сострадательное лечение означает использование не одобренных лекарственных средств вне клинических испытаний для лечения пациентов, для которых были исчерпаны одобренные терапевтические возможности. Принцип сострадательного использования описан в «Хельсинкской декларации этических принципов медицинских исследований с участием людей», которая представляет собой международное соглашение по аспектам клинических исследований, таким как «согласие пациента» и «контроль плацебо» [234]. Процесс и условия для сострадательного использования определяются регулирующими органами, такими как FDA, Управление по

лекарственным средствам (TGA) в Австралии или ЕМА, хотя государства-члены Европейского союза применяют директивы ЕМА независимо и могут руководствоваться дополнительными национальными правилами [64, 90, 125].

Сострадательное лечение отличается от клинических исследований тем, что его основной целью является предоставление терапевтической пользы пациенту, а не оценка эффективности экспериментального лечения (хотя безопасность может быть оценена). Однако терапия бактериофагами в рамках сострадательного лечения не является доказательной базой для широкого внедрения бактериофагов в лечебную практику [167].

С 2000 г. было опубликовано более 30 отчетов о терапии фагами в рамках сострадательного подхода, половина из которых была опубликована за последние несколько лет и представляет различные инфекции, фаги, патогены и пути введения, которые в совокупности свидетельствуют о применении фагов более чем у 2000 пациентов [167].

Некоторые страны проводят терапию фагами без регистрации и разрешения на продажу. Институт иммунологии и экспериментальной терапии им. Людвика Хирсфельда в Польше с 1970-х годов проводит экспериментальное лечение пациентов фагами в амбулаторных условиях. В 2005 г. в Польше было открыто Отделение фаготерапии, которое осуществляет лечение в соответствии с национальной схемой регулирования, а с 2000 г. было описано в публикациях о лечении фагами почти 1500 больных [146-147, 170, 228-230].

Центр инновационных применений и терапии фагами (IPATH) при Медицинской школе Калифорнийского университета в Сан-Диего открылся в середине 2018 г. как единственный фаговый центр в Северной Америке с целью использования фагов в рамках сострадательной терапии и для последующего проведения клинических испытаний [165]. Опыт применения нескольких методов фаговой терапии в Бельгии привел к недавно полученному разрешению на использование фагов в качестве активных ингредиентов препаратов магистрального действия (рецептурного назначения) [187]. Фаги назначают

отдельным пациентам при условии, если эти препараты производятся в соответствии с внутренней монографией.

В России и в ряде стран Восточной Европы производство и применение препаратов бактериофагов нормируется методическими указаниями и клиническими рекомендациями. Так, в 2014 г. были выпущены Федеральные клинические (методические) рекомендации «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике», описывающие принципы рационального применения бактериофагов для терапии и профилактики бактериальных инфекций, а также рекомендуемые методы контроля качества ЛП этой группы.

В Государственную Фармакопею XIV издания впервые введена общая фармакопейная статья ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические» и опубликовано двенадцать фармакопейных статей на лечебно-профилактические бактериофаги, зарегистрированные в РФ [22].

ОФС описывает целевую направленность применения бактериофагов в терапии, классификацию, методы получения, выделения, очистки и анализа фагов. Описывает питательные среды, рекомендуемые для производства бактериофагов, требования к ним. В статье приводятся требования к производственным штаммам бактерий и маточных фагов. Показатели качества ЛП бактериофагов включают: содержание фаговых частиц по методу Грациа, специфическую активность и стабильность лизиса по методу Аппельмана, рН, стерильность, аномальную токсичность. Также ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические» содержит общие указания к стандартизации некоторых ЛФ бактериофагов, таблеток, растворов, суппозиторий и мазей.

Промышленное производство бактериофагов включает в себя следующие основные этапы:

- работа с возбудителями гнойно-септических и кишечных бактериальных инфекций, подбор к ним активных фаговых рас, работа с коллекцией производственных бактериальных штаммов, регулярно пополняемых свежевыделенными бактериями;

- культивирование бактериофагов, которое проводят в ферментерах путем посева производственных штаммов бактерий и маточных фагов, содержащих несколько высокоактивных фаговых рас;
- очистка фаголизатов от фрагментов бактериальных клеток, их метаболитов, в том числе энтеротоксинов и белковых компонентов питательной среды, методом микрофильтрации и ультрафильтрации;
- концентрирование;
- стерилизующая фильтрация;
- получение субстанции бактериофага в виде раствора или лиофилизата;
- получение ЛФ [44].

В процессе производства ЛП бактериофагов в соответствии с Государственной Фармакопеей необходимо оценивать качество исходных, промежуточных и конечных продуктов на следующих основных этапах:

1. при подготовке производственных штаммов бактерий проводят контроль посевных культур бактериальных штаммов-продуцентов на чистоту, типичность биологических свойств и на отсутствие лизогении;
2. при подготовке маточных бактериофагов проводят контроль маточных бактериофагов на содержание фаговых частиц в 1 мл, определяемое методом Грациа; специфическую активность по методу Аппельмана; стабильность лизиса (сохранность полученных результатов лизиса по методу Аппельмана) в течение 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$; стерильность.
3. на стадии культивирования в реакторах наступление полного фаголизиса определяют визуально по отсутствию видимого бактериального роста.

В лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского разработана методология создания фаговых ЛП и технология культивирования фагов на плотных питательных средах, отличающаяся по ряду пунктов от выше приведенной.

В общем виде разработка и производство бактериофагов заключается в следующем:

- определение видов эпидемически значимых микроорганизмов;
- создание репрезентативного банка этих микроорганизмов;
- выделение и селекция вирулентных штаммов бактериофагов по спектру их специфической литической активности против патогенных бактерий-мишеней;
- подтверждение отсутствия умеренных фагов, интегрированных в геном бактериальных клеток-хозяев, на которых культивируются отобранные штаммы бактериофагов, с помощью тестов с митомицином С, УФО и т.д.;
- получение бактериофагов на плотной питательной среде, стерилизующая фильтрация, удаление эндотоксина из полученных фаголизатов методом аффинной хроматографии;
- определение морфологической структуры фаговой частицы с помощью электронного микроскопирования;
- подтверждение отсутствия генов, кодирующих токсины, и других нежелательных генов в геноме отобранных фагов с помощью ПЦР, полногеномное секвенирование фаговой ДНК и биоинформационный анализ;
- подтверждение отсутствия бактериальных эндотоксинов;
- проверка стабильности бактериофагов;
- создание готовых форм коктейлей бактериофагов [23, 38].

Благодаря этой технологии возможно получать стерильные фаголизаты с высоким титром вирусных частиц 10^{12} БОЕ/мл и низким содержанием эндотоксинов менее 50 ЕЭ/мл.

Наиболее проблемным этапом производства бактериофагов является их очистка от экзо- и эндотоксинов. Наиболее распространенным методом очистки фагов является осаждение полиэтиленгликолем с последующей экстракцией хлороформом, ультрацентрифугирование градиентом хлорида цезия и диализ для удаления соли цезия. У этой методики помимо трудоемкости существует ряд недостатков: количество хлороформа строго регламентируется в фармацевтических продуктах, поэтому использование хлороформа потребует анализа концентрации остаточного растворителя, кроме того, цезий (в составе

CsCl) не считается безопасным [101], хотя остаточная концентрация хлорида цезия крайне мала [129]. Альтернативным методом очистки является экстракция 1-октанолом, его эффективность продемонстрирована в ряде работ [68, 215]. Более перспективными методами очистки фагов являются хроматографические методы, а именно, анионообменная хроматография с монолитными колонками, содержащими слабые (DEAE) или сильные (QA) анионообменные смолы. Существуют работы, описывающие использование коммерческих колонок различного состава, при этом при выборе колонки необходимо учитывать выход фагов и количество эндотоксинов в готовом фаголизате [118].

1.2.4. Клинико-иммунологические аспекты применения бактериофагов

Бактериофаг, введенный в организм человека, как чужеродный антиген возбуждает его иммунную систему. Одним из главных следствий этого является гуморальный ответ на фаг, который, однако, не следует простой схеме индукции. По-видимому, он зависит от способа введения фага, от индивидуальных особенностей конкретного фага, в частности, его иммуногенности, от дозы и схемы применения, а также от неизученных к настоящему времени факторов. Поскольку антитела могут снижать жизнеспособность фагов, даже приводя к исчезновению антибактериального эффекта, иммуногенность фагов является одной из важных составляющих, которые могут вносить вклад в успех или неудачу фаготерапии. Тем не менее, непросто прийти к общему заключению о влиянии, которое гуморальный ответ на бактериофаг оказывает на эффективность фаготерапии. Трудности окончательного заключения упираются в многофакторную природу иммунной системы человека и ее взаимоотношений с потенциальными антигенами. Второй аспект взаимодействия бактериофага с иммунной системой человека (помимо выработки антифаговых антител) связан с возможной неспецифической иммуномодулирующей активностью фага в отношении различных функций как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

В последние десятилетия научное сообщество стало проявлять интерес к проблеме взаимодействия между ЛП препаратами бактериофагов и иммунитетом

человека. Исходя из публикаций, касающихся успешного применения фагов в терапии бактериальных инфекций различной этиологии, рассмотренных в предыдущих разделах, очевидно, что успешный контроль бактериальной инфекции фагами зависит не только от взаимоотношения пары «фаг/бактерия». В то же время лишь немногие научные публикации описывают наличие антител к бактериофагам у здоровых лиц и у пациентов во время фаготерапии. Трудно определить взаимоотношения между сывороточной антифаговой активностью и эффективностью фаготерапии в связи с пока недостаточным объемом фактического материала [73, 223].

Опубликован ряд результатов по исследованию антифагового иммунитета в популяции здоровых людей. Во время введения фагов здоровым добровольцам [239] индукция антифаговых антител была обнаружена у 54,4% пациентов во время терапии (на 10-й день лечения фагами, пероральный прием). Только у 3 из 57 пациентов (5,3%) сыворотки показали высокую антифаговую активность. Аналогично, в эксперименте, проведенном в 2005 г. [72], ни у одного из обследованных добровольцев не было обнаружено повышенного уровня антифаговых антител (IgG, IgA и IgM) после перорального приема. Среди 122 пациентов из Отделения фаготерапии во Вроцлаве только 15 человек (12,3%) продемонстрировали высокую антифаговую активность сывороток (AAS), в основном при местном применении [155]. В том же отчете не было выявлено четкой корреляции между введением фага и повышенным уровнем антифаговых антител в сыворотках пациентов. Дальнейшие исследования [153] показали, что AAS зависит от способа введения фага. У всех пациентов, получавших перорально препараты стафилококковых фагов, наблюдался низкий уровень AAS, а у пациентов с местным введением фагового коктейля почти в половине случаев он был высоким. Как правило, использование фагового коктейля приводило к более сильному иммунному ответу, чем монотерапия. Что касается относительно небольшого числа пациентов со столь высокой активностью сывороток, то трудно определить взаимосвязь между антифаговой активностью сыворотки, уровнем антифаговых антител и эффективностью фаготерапии. Следует сказать, что

индукция антифаговых антител и их связывание с антигенами фагов не обязательно означает потерю жизнеспособности фага [110].

Ученые из Института иммунологии и экспериментальной терапии имени Людвика Хиршфельда (Вроцлав, Польша) опубликовали результаты сравнения выработки антифаговых антител с их нейтрализующими свойствами и клиническим исходом у пациентов, получавших фаготерапию. Пациенты, у которых был выявлен самый высокий уровень антифаговых антител и самая высокая антифаговая активность их сывороток, закончили лечение фагами с хорошими клиническими результатами или даже с полным выздоровлением [155, 239]. Эти результаты подтверждаются исследованием, опубликованным в 2021 г. другой группой польских ученых. В работе проведен анализ индукции антител двумя фагами, A3R и 676Z, которые являются терапевтическими агентами против золотистого стафилококка и которые представляют близкородственные штаммы. Сравнение геномов A3R и 676Z показало их высокое сходство (более чем 99%), за исключением дополнительного фрагмента длиной 7,5 т.п.н. в последовательности 676Z. Биологическая роль этого дополнительного фрагмента еще не определена, однако эти фаги не демонстрируют идентичной специфичности в отношении бактериальных хозяев. Был изучен специфический иммунный ответ, индуцируемый этими фагами и их структурными белками, у здоровой популяции людей и у пациентов, подвергнутых фаготерапии. Фаги могут индуцировать специфические для фагов антитела, в том числе нейтрализующие. Однако их влияние на терапевтическую эффективность оказалось незначительным и не исключало благоприятного исхода фаготерапии. Разница между специфическим иммунным ответом, который может быть вызван высокими дозами парентерально применяемых фагов (как в модели на животных), и реакцией, наблюдаемой у пациентов, получающих лечение бактериофагами, позволяет создать "терапевтическое окно" [131].

Так же в 2021 г. опубликованы результаты проведения фаговой терапии 25 пациентам с хроническим риносинуситом. Пациенты получали фаговые препараты местно ($n = 4$) или местно и перорально ($n = 21$). Местное применение фагов

осуществлялось путем орошения пазух носа или назального распыления. Перед пероральным введением фага перорально применяли 10 мл дигидроксиалюминия натрия карбоната. Пациенты применяли препараты фагов, лизирующих *S. aureus*, в виде коктейля из трех фагов с титром 10^{6-10} БОЕ/мл (22 пациента) и препараты фагов, лизирующих *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* или *E. coli*, с титром 10^{8-9} БОЕ/мл (3 пациента). Примерно 30% пациентов со слабыми ответами антифаговых антител положительно ответили на фаготерапию, что было аналогично результатам лечения, достигнутым в группе пациентов с высокой продукцией антител. Таким образом, авторы считают, что появление антифаговых антител в крови может быть маркером восстановления иммунитета во время фаготерапии и являться хорошим прогностическим признаком [154].

В первом исследовании безопасности фаготерапии, проведенном в Исследовательском центре корпорации «Нестле» (Швейцария) на 15 здоровых добровольцах, получивших *per os* фаг T4, лизирующий *E. coli*, показано, что вплоть до месяца после приема не обнаружено ни IgG-, ни IgM- ни IgA-антител к бактериофагу. Авторы использовали две дозы фагов (10^3 и 10^5 фаговых частиц в мл) и показали, что у людей, получавших более высокую дозу фага, фаг выделялся с фекалиями через один день после приема, а при более низкой дозе фаги выделялись с фекалиями только у 50% испытуемых. Через неделю после 2-дневного приема фагов они с фекалиями уже не выделялись. Кроме того, оральный прием фагов не вызывал снижения общего количества *E. coli* в фекалиях. В конце исследования наряду с отсутствием антител трех исследуемых классов в сыворотке крови испытуемых не обнаруживались фаговые частицы. Авторы отмечали, что прием фагов не сопровождался никакими побочными эффектами [72].

Несколько другая картина наблюдается при парентеральном введении фага. Американские исследователи изучили выработку антител к бактериофагу, лизирующему *E. coli*, у 52 добровольцев, получивших бактериофаг внутривенно. Фаг находился в крови в течение 3-4 дней. По окончании этого периода были обнаружены IgM-антитела, которые способствовали удалению бактериофага, вплоть до 7-го дня. Вторичный ответ заключался в выработке IgG-антител.

Сыворотка крови лиц, получавших бактериофаг внутривенно, на 7-ой день обладала способностью нейтрализовать активность фага [184].

Австралийские ученые опубликовали результаты фаготерапии обширной хронической остеоартикулярной инфекции у ребенка 7 лет, вызванной синегнойной палочкой. Предыдущая хирургическая обработка и удаление оборудования, а также трехмесячный курс внутривенного введения антибиотиков, не смогли остановить развитие инфекции. При фаготерапии вводили по 0,9 мл 10^{11} БОЕ/мл Pa14NPFPASA16 (PASA16) внутривенно один раз (дни 1, 2 и 4-7) или два раза в день (с интервалом 12 ч; дни 3 и 8-14) в течение двух недель, начиная с трех месяцев двенадцатимесячного курса внутривенного колистина и азтреонама. Уровень С-реактивного белка достиг максимума на 4-й день (20,1 мг/л), на 30-й день было отмечено незначительное повышение уровней IgG в сыворотке крови по сравнению с начальным уровнем (от 14,7 г/л до 16,1 г/л; нормальный диапазон 6,24-14,4 г/л) без изменения уровней комплемента в сыворотке крови (C3/C4). Безболезненная нагрузка на пораженную ногу была достигнута впервые с момента первоначальной травмы через семь недель после завершения дополнительной фаготерапии, а долгосрочное наблюдение продемонстрировало рентгенологическое улучшение. Через пять месяцев после завершения всего противомикробного лечения у пациента отсутствовали симптомы инфекционного заболевания [134].

Фаги, как и другие вирусы, потенциально способны к взаимодействию с иммунной системой человека. Например, в экспериментах *in vitro* показано, что фаги могут ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток, но механизм этого эффекта до сих пор не установлен [92]. Можно предположить несколько способов, с помощью которых фаг мог бы экспонироваться в тканях и взаимодействовать с иммунной системой организма хозяина. Например, в экспериментах на животных показано, что оральный прием фагов сопровождается транслокацией фаговых частиц в лимфоидные ткани. Один из возможных механизмов вовлекает дендритные клетки, которые способны «захватывать» элементы содержимого кишечника и, как показано, могут активно фагоцитировать фаговые частицы в

культуре. Поглощение фага делает дендритные клетки неспособными к дальнейшему фагоцитозу, что вероятно, приводит к тому, что их провоспалительная функция ослабляется. Как альтернатива, дендритные клетки могут презентировать фаговые антигены Т-клеткам, приводя к развитию клеточно-опосредованных реакций и высвобождению цитокинов [139, 184].

Многих авторов интересует вопрос, могут ли фаги активировать врожденный противирусный иммунитет. Эта возможность имеется благодаря Toll-подобным рецепторам, способным распознавать нуклеиновые кислоты вирусов, к которым относятся и бактериофаги. Возбуждение этих рецепторов при связи с вирусами инициирует каскад сигналов, которые активируют экспрессию интерферона I типа, воспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 6 (IL-6) и IL-1 β , и хемокинов (в частности, IL-8). В результате происходит стимуляция антивирусного иммунитета, которая может помочь пациенту в защите против патогенных вирусов [92].

Таким образом, можно предположить, что имеются механизмы, позволяющие фагам, естественно находящимся в кишечнике или введенным с препаратами, активировать врожденный и адаптивный иммунный ответ, но эти механизмы недостаточно изучены.

Фаги, присутствующие в кишечнике, могут индуцировать выработку соответствующих антител по дозозависимому типу при достаточно длительной экспозиции. Если фаг слабо иммуногенен, то только очень высокие дозы фага при длительном времени экспозиции могут привести к значимому увеличению специфических иммуноглобулинов в крови. Специфический иммуноглобулин А, как главный иммуноглобулин слизистых, обладает ингибирующим эффектом на жизнеспособность фага в кишечнике. Полагают, что действие секреторного IgA (sIgA) на фаг оказывает даже большее влияние на эффективность фаготерапии, чем появление устойчивых к фагу штаммов бактерий в кишечнике. При повторных курсах фаготерапии концентрация секреторного IgA увеличивается быстрее, чем при первичном приеме фага [161].

По данным исследователей из Института иммунологии и экспериментальной терапии для взаимодействия с иммунной системой больного имеет значение способ

введения фага при фаготерапии. В отделении фаготерапии этого института находились больные с разнообразными инфекциями (инфекции мочеполового тракта, простатиты, инфекции мягких тканей, инфекции костной системы и инфекции верхних и нижних дыхательных путей). Высокая антифаговая активность в сыворотке крови в течение 15-60 дней фаготерапии наблюдалась у некоторых больных, получавших фаг местно или местно/орально, в то время как оральное введение фага слабо индуцировало гуморальный ответ. Обнаружив высокую антифаговую активность сывороток лишь у 15 больных из 122 обследованных, авторы тем не менее полагают, что наличие выраженного гуморального ответа на фаготерапию не исключает её эффективность [155].

Таким образом, можно сделать вывод, что фаготерапия является актуальным методом лечения инфекционных заболеваний, в первую очередь инфекций, вызванных штаммами бактерий, обладающими МЛУ и ШЛУ. Именно такие бактерии являются основной причиной ИСМП. Во всем мире в последние годы активно изучают аспекты клинического применения бактериофагов и разрабатывают стабильные и эффективные лекарственные формы. Персонализированный подход к лечению инфекционных заболеваний бактериофагами представляется наиболее перспективным. Разработка методологии персонализированной фаготерапии соответствует принятой в РФ «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года». Необходимо также сформулировать общие принципы разработки новых ЛП бактериофагов в соответствии с действующей в РФ нормативной базой. Кроме того, остается не изученным ряд иммунологических аспектов применения бактериофагов в клинической практике, что ограничивает доказательную базу эффективности фаготерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ I

Фаготерапия является актуальным методом лечения инфекционных заболеваний, в первую очередь вызванных штаммами бактерий, обладающих МЛУ и ШЛУ, которые являются основной причиной ИСМП. Во всем мире в последние

годы активно изучают аспекты клинического применения бактериофагов и разрабатывают стабильные и эффективные лекарственные формы. Персонализированный подход к лечению инфекционных заболеваний бактериофагами представляется наиболее перспективным. Разработка методологии персонализированной фаготерапии соответствует Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Так же, необходимо сформулировать общие принципы разработки новых лекарственных препаратов бактериофагов в соответствии с действующей в Российской Федерации нормативной базой. Кроме того, остается не изученным ряд иммунологических аспектов применения бактериофагов в клинической практике, что ограничивает доказательную базу эффективности фаготерапии.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

2.1.1. Бактериальные культуры.

В научном исследовании использовали бактериальные штаммы: *Pseudomonas aeruginosa* (46 штаммов), *Staphylococcus aureus* (39 штаммов), *Klebsiella pneumoniae* (40 штаммов) и *Acinetobacter baumannii* (80 штаммов).

2.1.2. Питательные среды и растворы

Для культивирования бактериальных культур использовали питательный бульон Луриа-Бертани и Nutrient Agar (HIMEDIA, Индия), а также питательный агар на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар, Оболенск).

Для бактериологических исследований были использованы жидкие и плотные следующие питательные среды: мясо-пептонный бульон; 1,5%- и 2%-ный мясопептонный агар; 2%-ный мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон с глюкозой; среда Эндо (НПО «Микроген»); трехсахарный агар с мочевиной по Олькеницкому; 2%-ный МПА с кровью (кровяной агар); желточно-солевой агар Чистовича. Также в работе использовали 0,9% изотонический раствор натрия хлорида, SM-буфер (Tris-HCl буфер, pH 7,5, содержащий NaCl и MgCl₂).

2.1.3. Бактериофаги.

В работе использованы бактериофаги, как полученные в рамках данного исследования, так и полученные и депонированные сотрудниками лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Характеристика бактериофагов приведена в таблице 2.1. При изучении иммунного ответа на фаготерапию дополнительно использовали *Klebsiella phage KPV9024*, депонированный в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГНЦ ПМБ» «ГКПМ – Оболенск» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии ФБУН ГНЦ ПМБ НР-146.

Таблица 2.1 - Характеристика штаммов бактериофагов.

<i>Наименование бактериофага</i>	<i>Таксономическая принадлежность</i>	<i>Номер депонирования в GenBank</i>
Enterococcus phage Enf1	Порядок Caudovirales; семейство Siphoviridae; род Sapbvirus	MK800154.1
Escherichia phage ECD7	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Tevenvirinae; род Rb49virus	KY683735.1
Escherichia phage V18	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Vequintavirinae; род V5virus	KY683736.1
Pseudomonas phage PA5	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; род Pbunavirus	KY000082.1
Pseudomonas phage PA10	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; род Pbunavirus	KY000083.1
Pseudomonas phage PA1C	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; род Phikzvirus	MK599315
Staphylococcus phage SCH1	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Spounavirinae; род Kayvirus	KY000084.1
Staphylococcus phage Sa30	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Spounavirinae; род Kayvirus	MK331931.1
Staphylococcus phage CH1	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Spounavirinae; род Kayvirus	MK331930.1
Staphylococcus phage SCH111	Порядок Caudovirales; семейство Podoviridae; подсемейство Picovirinae; род P68virus	KY000085.1
Klebsiella phage KPV811	Порядок Caudovirales; семейство Podoviridae; подсемейство Autographivirinae; род Kp34virus	KY000081.1
Klebsiella phage KPV15	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; подсемейство Tevenvirinae; род Jd18virus	KY000080.1
Acinetobacter bacteriophage AP22	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae; род Ap22virus	NC_017984.1
Acinetobacter phage AM24	Порядок Caudovirales; семейство Myoviridae	KY000079.1

* Выделенные цветом бактериофаги получены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФГУН ГНЦ ПМБ.

Охарактеризованный бактериофаг AP22 предоставлен Поповой А.В. [40]

** Остальные бактериофаги получены и депонированы сотрудниками лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы получения и изучения бактериофагов

2.2.1.1. Методы выделения бактериофагов из клинического материала.

Прямой метод выделения бактериофагов [23]. Получаемый от пациентов материал (кровь, мочу) фильтровали через стерилизующий фильтр (0,22 мкм, «Millipore», США). Твердый исследуемый материал (оформленные испражнения – кал) предварительно измельчали, тщательно перемешивали в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, затем полученную смесь фильтровали через бумажный фильтр, а потом через фильтр с диаметром отверстий 0,22 мкм. Присутствие бактериофага в полученных фильтрах определяли последовательно двумя методами: спот-тестом и методом Грация.

Выделение бактериофагов методом обогащения с «подсевом».

Бактериальные штаммы рассеивали петлей на отдельную чашку Петри с 1,5 % питательным агаром (МПА, агар Мюллер-Хинтона и т.п.) и инкубировали (18 ± 2) ч при температуре 37 °С. По 4-6 выросших колоний в S-, SO-форме (*K. pneumoniae* в КО-форме) каждого штамма пересевали петлей в пробирки с 4,5 мл бульона и вновь инкубировали (18 ± 2) ч при температуре 37 °С без аэрации. Бактериальную ночную культуру, выращенную в жидкой питательной среде (см. п. 1.5) до концентрации 10^9 КОЕ/мл, разводили в 5 раз средой, содержащей 10 mM MgSO₄, и заражали бактериофагом с множественностью инфицирования 0,01 – 0,1 БОЕ/КОЕ. Полученную смесь инкубировали при температуре 37 °С при аэрации (качалка, 170 об/мин) до просветления культуры (обычно от 2 до 3,5 час.). Фаголизат стерилизовали добавлением 1% хлороформа с последующим интенсивным перемешиванием в течение 20 мин. Клеточный дебрис удаляли низкоскоростным центрифугированием (10 000 об/мин., 10 мин.), надосадочную жидкость отбирали в стерильную емкость. Количество фаговых частиц в фаголизате определяли методом Грация.

2.2.1.2. *Оценку спектра литической активности бактериофагов проводили с помощью метода Аппельмана или метода Грация (метод агаровых*

слоев) в соответствии с ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические» [16].

Кроме того, спектр литической активности при подборе бактериофагов в рамках персонализированной фаготерапии на первом этапе оценивали методом spot-теста. В чашки Петри разливали 1,5 % МПА, в которые после застывания и подсушивания агара, наносили по 0,1 мл 16-18 часовой бульонной бактериальной культуры и распределяли её по всей поверхности чашки, чтобы получить равномерный сплошной рост культуры. После полного высыхания, на чашки Петри каплями (spot-тест) наносили бактериофаги. Затем, после впитывания жидкости в среду, чашки переворачивали вверх дном и ставили в термостат при 37°C на 24 ч. На следующие сутки производили учет результатов – наличие или отсутствие «пятна лизиса».

2.2.1.3. Выявление лизогенных штаммов бактерий. Для определения лизогенного состояния бактериальных штаммов использовали два метода индукции профага.

1) По 20 мкл ночной бульонной культуры переносили в 1 мл свежего питательного бульона и инкубировали 30 мин на качалке (160 об/мин, 37°C). В культуру добавляли митомицин С до конечной концентрации 0,5 – 1,0 мкг/мл, инкубировали 5 ч на качалке (160 об/мин, 37°C). Культуру фильтровали (фильтр с порами 0,22 мкм), фильтрат наносили в виде капель на свежеприготовленные газоны индикаторных штаммов, инкубировали ночь в термостате при температуре 37°C и оценивали наличие негативных зон лизиса в местах нанесения капель.

2) По 20 мкл ночной бульонной бактериальной культуры переносили в 1 мл стерильного питательного бульона, инкубировали 3 ч на качалке (160 об/мин, 37°C) и центрифугировали при 10000 g 10 мин при температуре 20-25°C. Клеточный осадок суспендировали в 50 мкл питательного бульона, переносили в ячейки иммунологического планшета и облучали в течение 20 с коротковолновой ультрафиолетовой лампой. Суспензию переносили в 1мл стерильного бульона, термостатировали при температуре 37°C в течение 3 ч в защищенном от света месте, фильтровали через фильтр с порами 0,22 мкм. Фильтрат наносили в виде

капель на свежеприготовленные газоны индикаторных штаммов, инкубировали ночь в термостате при температуре 37°C и оценивали наличие негативных зон лизиса в местах нанесения капель.

2.2.1.4. Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов. Для получения фагорезистентных мутантов использовали культуру бактерий в логарифмической фазе роста. Ночную культуру бактериального штамма разводили в 100 раз бульоном LB и подращивали на качалке при 37°C и 160 об/мин до концентрации клеток 2×10^8 в 1 мл. 0,1 мл бактериофага с титром не менее 2×10^9 БОЕ/мл наносили на поверхность плотной питательной 1,5%-ной среды в чашке Петри и затем равномерно распределяли шпателем, после полного впитывания фага, на поверхность среды наносили 0,1 мл бактериальной культуры и втирали ее стерильным шпателем. Чашки термостатировали при температуре 37°C в течение 1 суток. Таким образом происходит лизис чувствительных к фагу бактериальных клеток, и на поверхности питательной среды образуются колонии только тех клеток бактерий, которые являются фагорезистентными мутантами.

Частоту возникновения фагорезистентных мутантов определяли как отношение количества фагорезистентных клонов к количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл среды.

2.2.1.5. Подготовка штаммов бактериофагов и бактериальных культур к лиофильному высушиванию. Проверенные клоны производственных и контрольных бактериальных штаммов засеивали на чашки с питательным агаром и инкубировали (18 ± 2) ч в термостате при температуре 37 °C. Готовили суспензии бактериальных культур в защитной среде с концентрацией не менее 10^9 м.к./мл (по стандарту мутности). Защитная среда для бактериальных культур: сахароза 10 %, желатин 1%; стерилизуется автоклавированием при 0,5 атм. 30 мин. Для высушивания бактериофагов использовали фаголизаты, полученные, как указано в п. 1.6. Фаголизаты смешивали в равных объемах с защитной средой следующего состава: сахароза 20 %, желатин 2 %. Подготовленные суспензии бактериальных культур и бактериофагов в защитной среде фасовали во флаконы по 0,5 мл.

Лиофильное высушивание проводили в течение 24 час. на сублимационном оборудовании EPSILON 2-60, «CHRIST», Германия.

2.2.1.6. *Получение бактериофагов для производства экспериментальных серий ЛФ.* Нарботку бактериофагов проводили в соответствии с патентом РФ 2525141.

2.2.1.7. *Выделение и рестрикционный анализ ДНК бактериофагов.* ДНК выделяли из фаголизатов, полученных при размножении бактериофагов на культуре чувствительного бактериального штамма в жидкой питательной среде. В качестве материала для исследований использовали фаголизаты с титром фага не ниже 10^9 БОЕ/мл. Фаговые частицы разрушали инкубацией в 0,5 %-растворе SDS в присутствии протеиназы К (0,1 мг/мл) при 56 °С. Извлечение фаговой ДНК осуществляли смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1) с последующим переосаждением этанолом. Препараты выделенной ДНК контролировали электрофоретически в агарозном геле в трис-борат-ЭДТА буфере. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически в микрокуветах на приборе Genesys 6 UV-Visible Thermo Scientific (США).

После определения концентрации и качества полученных препаратов ДНК проводили гидролиз различными эндонуклеазами рестрикции. Гидролиз ДНК проводили в условиях и буферных растворах, рекомендованных фирмой производителем (Fermentas - Thermo Scientific). Анализ гидролизованной ДНК осуществляли методом электрофореза в 0,8-1,2 %-ном агарозном геле в трис-боратном буфере.

Маркеры молекулярных масс, используемые для электрофореза в агарозных гелях: Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas -Thermo Scientific, # SM0102). Размер фрагментов (пар оснований): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125; Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker (Fermentas -Thermo Scientific, # SM0192). Размер фрагментов (пар оснований): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125.

Визуализацию проводили после окрашивания агарозных гелей в течение 20 мин в растворе бромистого этидия (1 мкг /мл). Для регистрации полученных

результатов использовали систему DOCPRINT (Vilber Lourmat).

2.2.1.8. *Секвенирование ДНК бактериофагов. Подготовка геномных библиотек.* Ферментативную деградацию геномной ДНК проводили с помощью набора Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (США). Для очистки ДНК после фрагментации использовали набор Agencourt® AMPure® XP Reagent. (США). Лигирование адаптеров и коррекцию разрывов осуществляли с использованием наборов молекулярных баркодов Ion Xpress Barcode Adapters Set.

Реакционную смесь, приготовленную с помощью набора Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, с добавлением фрагментированной ДНК инкубировали в амплификаторе при следующем температурном режиме: 25°C – 15 мин, 72°C – 5 мин, 4°C – до остановки. После инкубации осуществляли очистку продукта с помощью Agencourt® AMPure® XP Reagent.

Отбор фрагментов ДНК необходимого размера (Size-select) осуществляли с использованием системы E-gel Size-select, позволяющей проводить мониторинг разделения фрагментов в режиме реального времени. Определение количества ДНК проводили методом ПЦР в реальном времени (количественный вариант) с использованием набора Ion Library Quantitation Kit при следующем температурном режиме: 50°C – 2 мин, 95°C – 20 сек; затем 40 циклов в режиме 95°C – 3 сек, 60°C – 30 сек (детекция FAM).

Клональную амплификацию на микросферах проводили на автоматизированной системе OneTouch 2. Данная система в автоматическом режиме формирует смесь для эмульсионной ПЦР, проводит амплификацию образцов, разрушает эмульсию, и отбирает положительные микросферы.

Обогащение образцов, позволяющее избавиться от микросфер, не имеющих ДНК, осуществляли с помощью модуля для обогащения Ion One Touch™ ES согласно инструкции.

Секвенирование осуществляли на приборе Ion Torrent Personal Genome Mashine (PGM) с программным обеспечением Torrent Suite™ и Ion PGM™ System с использованием набора реактивов Ion PGM Sequencing Kit 400, обеспечивающего длину прочтения до 400 п.н, и с помощью полупроводниковых микрочипов 314™.

Инициализацию прибора, проверку чипа и загрузку образца на чип проводили согласно инструкции.

Биоинформационный анализ секвенированных геномов проводили с использованием следующих пакетов программного обеспечения: Newbler – анализ набора фрагментов нуклеотидных последовательностей геномов фагов (ридов), полученных после секвенирования, сборка их в отдельные контиги и сборки геномов *de novo*; ресурсы BLAST биоинформационного портала NCBI – анализ гомологии фрагментов ДНК с нуклеотидными последовательностями, представленными в GeneBank, анализ гомологии транслированных пептидов с аминокислотными последовательностями, представленными в базах данных (Pfam, TIGRfam); Mauve и Vector NTITM - выравнивание собранных геномов на референс-последовательностях и другие программы.

2.2.1.9. Определение устойчивости фагов к повреждающим факторам внешней среды.

Устойчивость фагов к хлороформу. Фаголизаты по 50 мкл в герметичных пробирках типа эппендорф смешивали с 50 мкл хлороформа в течение 60 мин при интенсивном встряхивании на шейкере при комнатной температуре. В контрольную пробирку вместо хлороформа вносили SM-буфер. Фаголизат отделяли от хлороформа центрифугированием. Титр фагов определяли путем посева фаголизатов на газоны чувствительных штаммов из последовательных разведений с десятикратным шагом.

Устойчивость фагов к температурному воздействию. Полученные фаголизаты разливали по 50 мкл пробирки типа эппендорф термостатировали 3 ч при температуре $+25 \pm 2^\circ \text{C}$; в морозильной камере при $-20 \pm 3^\circ \text{C}$) и при температуре $+65 \pm 3^\circ \text{C}$). Титр фагов определяли путем посева фаголизатов на газоны чувствительных штаммов из последовательных разведений с десятикратным шагом.

2.2.1.10. Определение параметров инфекционного процесса в системе фag-клетка. Экспоненциально растущие бактериальные клетки смешивали с бактериофагом ($\text{MOI}=0.001$) и инкубировали при комнатной температуре. Образцы

(100 мкл) отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30 мин, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. После центрифугирования надосадочную жидкость титровали для определения неадсорбированных или обратимо адсорбированных фагов через разные временные интервалы.

Латентный период и выход фаговых частиц определяли следующим образом. 50 мл бактериальных клеток инкубировали до экспоненциальной стадии роста ($OD_{600}=0,3$), далее 20 мл полученной жидкой бактериальной культуры центрифугировали при 4 °С, 5 мин, 7000 g. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл свежего LB и смешивали с бактериофагом таким образом, что $MOI=0,01-0,005$. Смесь бактериофага и бактериальных клеток инкубировали 5 мин при температуре 37 °С. Неадсорбированные фаги удаляли путём центрифугирования в течение 2 мин при 13000 g. Осадок ресуспендировали в 10 мл предварительно подогретого LB. Образцы отбирали через 5 - 10 минные интервалы в течение 3 ч и немедленно титровали. Выход бактериофага определяли как отношение максимального количества высвободившихся фаговых частиц (максимального количества негативных колоний) в конце размножения к количеству инфицированных бактериальных клеток (к числу негативных колоний) во время латентного периода.

2.2.1.11. Метод двойной вложенной полимеразной цепной реакции (double-nested PCR). Выделение ДНК бактериофагов из крови проводили с помощью набора для выделения К-сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия). В реакцию брали 1 мкл выделенной ДНК. Высококчувствительное выявление фрагментов ДНК фагов осуществляли с помощью двойной вложенной ПЦР (double-nested PCR). Реакционные смеси готовили с использованием реагентов, входящих в комплект рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы («Fermentas», Литва). Для проведения реакций использовали олигонуклеотидные последовательности, приведенные в таблице 2.2. Детекцию результата амплификации проводили путем постановки горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Таблица 2.2 - Олигонуклеотидные последовательности для выявления фрагментов ДНК фагов.

Наименование олигонуклеотида	Назначение олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Описание
Мишень – ДНК псевдомонадного бактериофага PA5			
PB-1_1_fw	Прямой праймер	agc tca cgc agt aag gag gc	1 раунд ПЦР
PB-1_1_rv	Обратный праймер	agc tgg tca gcg gga tgt	
PA5_fw1_nest	Прямой праймер	taa gga ggc gtc atg agc c	2 раунд ПЦР
PA5_rv1_nest	Обратный праймер	ctt gat ctt ccc agg agc c	
PA5_fw2_nest	Прямой праймер	atc agc aag acc cat tcg c	3 раунд ПЦР
PA5_rv2_nest	Обратный праймер	agc caa cgg tat cga tgc c	
Мишень – ДНК колифага V18			
VPhEc2_fw1	Прямой праймер	cag aag gac gtt gat ccg g	1 раунд ПЦР
VPhEc2_rv1	Обратный праймер	tta acc tcg gaa ccc agc c	
VPhEc2_fw2	Прямой праймер	ata cga acg aag tgc agg g	2 раунд ПЦР
VPhEc2_rv2	Обратный праймер	tgg tgg aag atg gtt tcg c	
VPhEc2_fw3	Прямой праймер	agg aac tgt gat gat cgg g	3 раунд ПЦР
VPhEc2_rv3	Обратный праймер	tta tga tcg gca gac agg c	
Мишень – ДНК сальмонеллезного бактериофага SE40			
VPhSE1_fw1	Прямой праймер	tgc aga tat cga cta cgc c	1 раунд ПЦР
VPhSE1_rv1	Обратный праймер	tca acg cct gta cat ccc	
VPhSE1_fw2	Прямой праймериз	gtg ate cut gut tat ccc	2 раунд ПЦР
VPhSE1_rv2	Обратный примёр	cot tags cot tea gut tack g	
VPhSE1_fw3	Прямой праймериз	aaa cga cgc gga taa agc g	3 раунд ПЦР
VPhSE1_rv3	Обратный праймер	gtc cac ggt tta atc acc c	

2.2.2. Методы контроля качества лекарственных препаратов бактериофагов

2.2.2.1. *Прозрачность* лекарственных форм бактериофагов определяли в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей» [16]. Определение проводили путем сравнения лекарственных форм бактериофагов с эталонными растворами визуально.

2.2.2.2. *Цветность* лекарственных форм бактериофагов определяли в соответствии с требованиями ОФС 1.2.1.0006.15 «Степень окраски жидкостей».

Окрасу лекарственных форм бактериофагов определяли визуально путем сравнения с эталонными растворами.

2.2.2.3. *pH* растворов и готовых лекарственных препаратов проводили в соответствии с ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия» на pH-метре Metter-Toledo Seven Compact AG марки Ion S220 (Швейцария).

2.2.2.4 Для инъекционных лекарственных форм проводили определение *видимых механических включений* в соответствии с ОФС 1.4.2.005.18 «Видимые механические включения в ЛФ для парентерального применения и глазных ЛФ» на приборе СветоЧек®-ФМ (Россия). Флаконы с раствором бактериофагов для инъекционного применения плавно вращали и одновременно просматривали в течении 5 секунд на белом фоне, а затем эту процедуру повторяли на черном фоне при уровне освещенности 3500 Лк.

2.2.2.5. Показатель *извлекаемый объем* определяли в соответствии с ОФС 1.4.2.002.18 «Извлекаемый объем» для растворов для приема внутрь, а для инъекционных растворов в соответствии с ОФС 1.4.2.003.15 «Извлекаемый объем для ЛФ для парентерального применения».

2.2.2.6. Стабильность лекарственных форм бактериофагов определяли на основании ОФС 1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности ЛС» и Рекомендациям Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 февраля 2020 г. N 2 «О Руководстве по исчислению даты начала отсчета срока годности готовых ЛФ ЛП для медицинского применения и ветеринарных ЛП».

2.2.2.7. Лекарственные формы бактериофагов контролировали по показателю *стерильность* в соответствии с ОФС 1.2.4.0003.15 «Стерильность» методом прямого посева.

2.2.2.8. Инъекционную лекарственную форму контролировали по показателю *бактериальные эндотоксины* в соответствии с ОФС 1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» методом гель-тромб теста (метод А) с использованием набора реактивов Endosafe КТА с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл состава: ЛАЛ-реактив Endosafe КТА 0,03 ЕЭ/мл, контрольный стандарт эндотоксина 10 нг/флак, вода для ЛАЛ-теста «Пиротест», пробирки «Пиротест».

2.2.2.9. Лекарственные формы бактериофагов контролировали по показателю *аномальная токсичность* в соответствии с ОФС 1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность». По 1 мл раствора для приема внутрь или для инъекционного введения каждого образца подкожно вводили 5 мышам, после чего проводили наблюдение за животными в течение 7 суток. Препараты не должны вызывать гибель испытуемых животных.

2.2.2.10. *Определение экзотоксинов.* При культивировании *S. aureus* выделяет экзотоксины. Известно несколько серологических типов энтеротоксинов (SE), обозначаемых А, В, С1, С2, С3, D и Е. Количественное содержание экзотоксинов в фаголизате определяли методом ИФА с использованием тест-системы «RIDASCREEN® SET А, В, С, D, Е» (R-Biopharm AG, Германия), предназначенной для идентификации стафилококковых энтеротоксинов А, В, С, D, Е.

Для подтверждения отсутствия веротоксинов в конечном продукте использовали иммунохроматографический экспресс-тест для качественного *in vitro* определения токсинов «RIDARQWICK Verotoxin/ O157 Combi» (R-Biopharm AG, Германия).

2.2.3. Методы доклинических испытаний ЛФ бактериофагов

Безопасность лекарственных форм бактериофагов подтверждали изучением острой и хронической токсичности [45, 46]. В качестве модельных животных использовали белых аутбредных (беспородных) мышей (самцы/самки, 19-26 г) и альбиносов морских свинок (самцы/самки, 300-320 г) из питомника лабораторных животных "Андреевка" ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Все использованные животные прошли карантин. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями. Мыши имели свободный доступ к воде и корму. Мышей размещали в поликарбонатных клетках «Lab Products Inc.» (США) группами не более пяти животных в каждой и проводили за ними ежедневное наблюдение. Умерших в процессе эксперимента мышей удаляли из клеток незамедлительно.

2.2.3.1. *Острую токсичность* лекарственной формы бактериофагов оценивали на 10 опытных и 5 контрольных беспородных мышах (самках). Мышам опытной группы однократно внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл препарата с содержанием фаговых частиц $\sim 1 \times 10^8$ БОЕ. Контрольным животным тем же путём вводили физиологический раствор. За животными обеих групп наблюдали в течение 7 дней. У животных фиксировали внешние признаки интоксикации по следующим показателям – двигательная активность, аппетит, состояние шерстного покрова, масса тела. Через 7 дней после введения препарата у животных опытной и контрольной групп брали кровь для проведения гематологического анализа. Критерии безвредности препарата для мышей: отсутствие гибели, отсутствие признаков заболевания, отсутствие снижения веса у животных к концу срока наблюдения, сохранение аппетита и характерное данному виду состояние шерстного покрова. Состояние опытных (обработанных ЛФ бактериофагов) и контрольных животных не должно отличаться. Количество лейкоцитов в крови опытных мышей не должно значительно отличаться от количества лейкоцитов в крови контрольных животных. При вскрытии макроскопическая картина внутренних органов не должна иметь патологий, как в экспериментальной, так и контрольной группах.

2.2.3.2. *Хроническую токсичность* ЛФ бактериофагов оценивали на 10 опытных и 10 контрольных беспородных мышах. Каждая группа содержала по 5 самок и 5 самцов. Средний вес самок составлял $22,2 \pm 1,7$ г, самцов – $23,6 \pm 1,7$ г. Мышам опытной группы на протяжении 20 суток один раз в день внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл препарата ($\sim 1 \times 10^8$ БОЕ). Контрольным животным внутрибрюшинно вводили 0,5 мл физиологического раствора. Ежедневно всех животных осматривали с целью выявления внешних признаков интоксикации – изменение двигательной активности, аппетита, состояния шерстного покрова, снижение веса. Два раза в неделю проводили контрольное взвешивание опытных и контрольных животных, оценивая динамику изменения веса. На следующий день после окончания курса введения препарата (21 сутки эксперимента) и на 5-й день (27 сутки эксперимента) по 5 животных (самцы и самки) опытной и контрольной

групп эвтаназировали методом CO₂-ингаляции. После остановки сердца у мышей с помощью шприца забирали по 200 мкл крови для гематологического анализа. После взятия крови у животных брали материал (головной мозг, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, почки, брыжеечные лимфоузлы, селезенку, легкие, сердце, корень языка, почки) для гистологических исследований, на основании которых судили о возможном повреждающем действии ЛПП на организм мышей.

Хроническую токсичность ЛПП оценивали по результатам наблюдений за поведением и здоровьем животных, по результатам гематологических и гистологических исследований (в сравнении с аналогичными исследованиями в контрольной группе животных).

2.2.3.3. Общий клинический анализ крови подопытных животных. Гематологический анализ крови мышей проводили по стандартной методике на автоматическом гематологическом анализаторе PCE-90Vet (США). Для сбора крови (по 200 мкл) использовали микрокюветы с K₂-ЭДТА («СЦ-СангуисКаунтингГмбХ», Германия). Анализ образцов выполняли в течение 60 мин после взятия крови.

2.2.3.4. Гистологические исследования. Гистологические срезы органов готовили из фиксированного в 10%-ном формалине материала, по общепринятой методике. Срезы органов окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопирование препаратов проводили на световом микроскопе Nikon Eclipse 80i (Япония). Документирование изображений проводили с помощью камеры Nikon DS-Ri1.

2.2.3.5. Определение местного действия ЛФ бактериофагов. Оценку местного действия ЛФ бактериофагов проводили на 5 белых беспородных мышках (самки, 22-24 г) и 5 альбиносах морских свинок (самки, 300-320 г). За сутки до начала эксперимента на спине у мышей и морских свинок выстригали шерсть на участке размером 2×2 см и 4×4 см, соответственно. ЛПП вводили подкожно в объёме 0,5 мл. В течение трёх последующих суток осматривали место введения препарата с целью выявления признаков местной реакции (отёк, гиперемия, некроз и т.д.).

2.2.3.6. Фармакокинетику ЛФ бактериофагов изучали на интактных

беспородных белых мышах после внутрибрюшинного введения препарата в дозе $\sim 10^8$ БОЕ в объеме 0,5 мл. Наличие бактериофага определяли в крови, селезенке, легких, печени и лимфатических узлах через 1, 3, 6, 9, 12 и 24 ч после его введения животным. На каждый контрольный час у шести эвтаназированных мышей отбирали кровь из сердца и образцы паренхиматозных органов. Исследуемые органы тонко измельчали со стерильным кварцевым песком в фарфоровых ступках, затем в полученный растертый материал добавляли 0,9% раствор натрия хлорида и тщательно перемешивали. Образцы суспензий биологического материала переносили в стерильные пробирки и добавляли хлороформ. Определение количественного содержания бактериофага (БОЕ на 1 г или 1 мл исследуемого образца) осуществляли титрованием по методу Грациа на культуре соответствующего бактериального штамма.

2.2.3.7. Моделирование острой клебсиеллёзной инфекции. Острую летальную форму клебсиеллёзной инфекции воспроизводили на белых беспородных мышах, заражая их подкожно в дозе $\sim 1 \times 10^4$ м.к. (~ 660 ЛД₅₀) в объеме 0,5 мл. Бактериальную суспензию для инфицирования животных готовили из суточной агаровой культуры *K. pneumoniae* В 2580, суспендированной в физиологическом растворе до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда, что соответствует 1×10^8 м.к./мл, и титрованной до конечной концентрации 2×10^4 м.к./мл. Контроль количества клеток во взвеси осуществляли путём посева по 0,1 мл из соответствующих разведений приготовленной суспензии на плотную питательную среду. Посевы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С.

Для культивирования бактериальных культур использовали питательный бульон Лурия-Бертани и Nutrient Agar (HIMEDIA, Индия), а также питательный агар на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар, Оболенск).

2.2.3.8. Изучение профилактической эффективности ЛФ бактериофагов. Терапевтическую эффективность ЛФ бактериофагов в режиме профилактического применения при острой клебсиеллёзной инфекции у самок белых беспородных мышей изучали на четырёх экспериментальных и двух контрольных группах животных, каждая из которых включала 10 особей. Животным опытных групп

препарат вводили внутрибрюшинно однократно в объеме 0,5 мл ($\sim 1 \times 10^8$ БОЕ) за 24, 12, 6 и 1 час до их заражения. Суспензию вирулентного штамма *K. pneumoniae* B2580 вводили животным подкожно в дозе 1×10^4 м.к. в объёме 0,5 мл.

Первую контрольную группу бактериофагами не обрабатывали, но заражали в той же дозе, что и опытных мышей (контроль заражения). На второй контрольной группе мышей определяли токсичность фагового ЛП, который вводили животным однократно внутрибрюшинно в объёме 0,5 мл. Схема профилактического лечения мышей представлена в таблице 2.3.

За мышами опытных и контрольных групп, инфицированными вирулентным штаммом *K. pneumoniae* B2580, вели наблюдение в течение 14 дней, регистрируя гибель и изменения в поведении животных, состоянии их шерстного покрова и аппетита. В конце эксперимента выживших животных эвтаназировали, вскрывали и проводили бактериологический анализ образцов крови, селезенки, легких и печени с целью выявления клеток заражающего штамма. Уровень специфической бактериальной обсеменённости паренхиматозных органов и крови оценивали по количеству клеток *K. pneumoniae* B2580 в 1 г или 1 мл исследуемого образца.

Эффективность профилактики экспериментального острого клебсиеллёза у мышей лечебно-профилактическим препаратом бактериофагов оценивали по состоянию здоровья экспериментальных животных в течение срока наблюдения, выживаемости мышей, а также по степени элиминации возбудителя из паренхиматозных органов животных, получавших исследуемый фаговый препарат.

Таблица 2.3 – Схема эксперимента по изучению профилактической эффективности ЛФ бактериофагов.

Группы опытных животных	Количество мышей в группе	Доза заражения, объем и способ введения	Время введения ЛФ до заражения животных, ч.	Доза, объем и способ введения ЛФ	Кратность введения ЛФ
1	10	$\sim 1 \times 10^4$ КОЕ/0,5 мл (п/к)*	24	$\sim 1 \times 10^8$ БОЕ/ 0,5 мл (в/б)**	Однократное
2	10		12		Однократное
3	10		6		Однократное
4	10		1		Однократное
5 контроль заражения	10	-	-	-	-
6 контроль токсичности ЛФ	10	-	-	$\sim 1 \times 10^8$ БОЕ/ 0,5мл (в/б)	Однократно

* п/к – подкожное заражение

** в/бр – внутрибрюшинное введение

2.2.3.9. *Изучение лечебной эффективности ЛФ бактериофагов.* Лечебную эффективность ЛФ бактериофагов при острой клебсиеллёзной инфекции у белых беспородных мышей оценивали на четырёх экспериментальных и четырёх контрольных группах животных. Каждая группа включала по 10 мышей (самки). Животных из экспериментальных групп заражали подкожно культурой штамма *K. pneumoniae* B2580 в дозе $\sim 1 \times 10^4$ КОЕ в объеме 0,5 мл. Мышам из первых четырех групп начинали вводить внутривентриально препарат в объеме 0,5 мл ($\sim 1 \times 10^8$ БОЕ) один раз в сутки в течение 10 дней спустя 1, 6, 12 и 24 ч после их заражения. Животных пятой и шестой групп (контроль лечения) начинали лечить антибиотиком ципрофлоксацином (Cipro) через 12 ч и 24 ч после их заражения штаммом *K. pneumoniae* B2580, соответственно, вводя препарат внутривентриально в дозе 2 мг каждые 12 ч в течение пяти дней. Мышам седьмой группы (контроль эффективности заражения) вводили подкожно $\sim 1 \times 10^4$ КОЕ *K. pneumoniae* B2580 в объеме 0,5 мл. Мышей этой группы не лечили. Неинфицированным мышам восьмой группы (контроль токсичности препарата бактериофага) в течение 10 дней один раз в сутки внутривентриально вводили 0,5 мл препарата. Схема лечения мышей, инфицированных клебсиеллёзом, представлена в таблице 2.4.

Наблюдение за животными опытных и контрольных групп осуществляли в течение курса лечения и затем еще 14 суток, фиксируя поведение, состояние шерстного покрова и аппетит мышей. Павших животные вскрывали и методом отпечатков делали посевы из паренхиматозных органов на питательные среды для оценки обсемененности их клетками заражающего штамма *K. pneumoniae* B2580. Выживших животных эвтаназировали, их органы исследовали на наличие возбудителя – бактерий штамма *K. pneumoniae* B2580. Эффективность лечения острой клебсиеллёзной инфекции у мышей с помощью ЛФ бактериофагов и антибиотика оценивали по продолжительности жизни и поведению опытных животных во время срока наблюдения по сравнению с контрольными группами, по проценту выживших после заражения леченных бактериофагом животных, а также по степени элиминации возбудителя из паренхиматозных органов обработанных фагом животных.

Таблица 2.4 – Схема эксперимента по изучению лечебной эффективности ЛФ бактериофагов

Группы опытных животных	Количество особей в группе	Доза заражения, объем и способ введения	Время введения ЛФ после заражения животных, ч.	Доза, объем и способ введения ЛФ	Кратность и длительность лечения мышей ЛФ
1	10	~1×10 ⁴ КОЕ/ 0,5 мл (п/к)*	1	~1×10 ⁸ БОЕ/ 0,5мл (в/б)**	Один раз в сутки в течение 10 дней
2	10		6	~1×10 ⁸ БОЕ/ 0,5мл (в/б)	
3	10		12	~1×10 ⁸ БОЕ/ 0,5мл (в/б)	
4	10		24	~1×10 ⁸ БОЕ/ 0,5мл (в/б)	
<i>Изучение лечебной эффективности антимикробного препарата</i>					
5	10	~1×10 ⁴ КОЕ/ 0,5мл (п/к)	12	2 мг (в/ж***)	каждые 12 ч в течение 5 дней
6	10		24	2 мг (в/ж)	
7 контроль заражения	10	-	-	-	-
8 контроль токсичности ЛФ	10	-	-	~1×10 ⁸ БОЕ/ 0,5мл (в/б)	один раз в сутки в течение 10 дней

* п/к – подкожное заражение

**в/б – внутрибрюшинное введение

*** в/ж – внутривенное введение

2.2.4. Методы клинических исследований

Курсы фаготерапии были включены в состав комплексного лечения пациентов с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями, связанными с оказанием медицинской помощи, такими как: ИВЛ-ассоциированная пневмония, катетер-ассоциированная инфекция мочевыводящих путей, инфицированные кисты головного мозга и различные раневые повреждения поверхности головы. Клинические исследования представляли собой открытое рандомизированное контролируемое исследование в параллельных группах. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации, руководством ЮН по Качественной клинической практике (версия Е6, одобренная СРМР/135/95) и Национальному стандарту РФ ГОСТ Р 52379-2005 "Надлежащая клиническая практика".

Клинические базы: «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» МЗ России, отделение реанимации и интенсивной терапии; «Городская

клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова», отделение реанимации и интенсивной терапии; «3 Центральный Военный Клинический Госпиталь им. А.А. Вишневского», отделение реанимации и интенсивной терапии, Ганноверская медицинская школа (Ганновер, Германия).

В исследовании приняли участие 160 пациентов в возрасте 18 и старше, которые были рандомизированно распределены в 2 группы:

Группа 1 – 80 пациентов, страдающих инфекциями/колонизацией, связанными с оказанием медицинской помощи, получавшие стандартную терапию в сочетании с персонализированной фаготерапией.

Группа 2 – 80 пациентов, страдающих инфекциями/колонизацией, связанными с оказанием медицинской помощи, получавшие стандартную терапию.

Бактериофаги для персонализированной терапии назначали пациентам группы 1 на Осмотре 2. Курс составлял 5 дней перорально по 20 мл 1 раз в день за 1 час до приема пищи или внутривентрикулярно. Интервал между приемами препарата: 24 ч. Препарат не запивали водой. Возможно одновременное применение бактериофагов для персонализированной терапии местно и перорально или с учетом локализации инфекционного процесса, например, в область абсцесса. Местно применяли в виде полостных инстилляций в дозе 5 – 200 мл в зависимости от площади очага поражения 1 раз в день (Таблица 2.5).

Таблица 2.5 - Рекомендуемые дозировки препаратов бактериофагов для местного использования

Площадь очага поражения, см ²	Доза на 1 прием, мл
< 2	5-10
2-5	10-20
5-10	20-30
10-20	30-60
20 -40	60-120
> 40	120-200

Если полость абсцесса обрабатывали сначала антисептиками (диоксидином, бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмонием, хлоргексидином, повидон-йодом и др.), то перед применением бактериофага полость промывали стерильным

раствором натрия хлорида. В ограниченные полости (плевральную, суставную и другие) вводили препарат до 100 мл, после чего оставляли капиллярный дренаж, через который в течение нескольких дней повторно вводили бактериофаги.

Стандартная терапия для данного исследования — это весь комплекс антибактериальных и других препаратов, назначаемых в обычной врачебной практике: антибиотики; препараты симптоматической терапии (жаропонижающие, обезболивающие); препараты для лечения острых и хронических сопутствующих заболеваний; антимикробные препараты для местного применения по показаниям, не связанным с ИСМП (например, местные противогрибковые препараты при поверхностных микозах, ушные и глазные капли, содержащие антибиотики); флуконазол в/в для профилактики инвазивного кандидоза; ванкомицин *per os* и/или метронидазол в/в при диарее, ассоциированной с *C. difficile*.

Пациентам всех групп по показаниям назначался весь комплекс мероприятий, направленных на улучшение их состояния и снятие симптомов заболевания: дезинтоксикационная терапия, обезболивающая/противовоспалительная терапия, витамины и др.

В данном исследовании запрещалось применение других препаратов бактериофагов.

Порядок включения в исследование и рандомизация: пациентам, у которых в результате бактериологического анализа биологического материала было выявлено наличие штаммов бактерий *Acinetobacter baumannii/Pseudomonas aeruginosa/Klebsiella pneumoniae/Staphylococcus aureus*, рандомизация проводилась методом конвертов на Осмотре 1 и оценки критериев включения/не включения. Каждому пациенту, включенному в исследование, соответствующему всем критериям включения на Осмотре 1, непосредственно перед рандомизацией присваивали индивидуальный номер пациента для распределения по группам. Индивидуальный номер пациента присваивался по нарастанию (по порядку), состоял из трех цифр от 001 до 160, например: 001, 047, 100, фиксировался в индивидуальной регистрационной карте (ИРК) (см. приложение).

После присвоения пациенту номера, вскрывался конверт с номером пациента. Внутри конверта находился номер группы, в которую был рандомизирован пациент, и информация о лечении, которое ему назначалось на Осмотре 1 («персонализированная фаготерапия+стандартная терапия» или «Стандартная терапия»).

Критерии включения пациентов в клинические исследования.

- Наличие подписанного и датированного информированного согласия (пациентом, или законным представителем пациента, или консилиумом из трех независимых врачей).
- Наличие у пациента инфекции/колонизации, связанной с оказанием медицинской помощи.
- Лабораторно подтвержденное наличие в биологическом материале, полученном от пациента патогенов (таких как *Pseudomonas aeruginosa* и/или *Acinetobacter baumannii* и/или *Klebsiella pneumoniae* и/или *Staphylococcus aureus*), обладающих резистентностью к компонентам стандартной антимикробной терапии.
- Пациенты 18 лет и старше.

Критерии невключения пациентов в клинические исследования:

- аллергические реакции на компоненты исследуемой терапии;
- поливалентная аллергия;

Критерии исключения пациентов из клинических исследований:

- ошибочное включение;
- появление у пациента критериев невключения во время проведения исследования;
- желание пациента или его законного представителя завершить участие в исследовании.

Критерии завершения участия пациентов в клинических исследованиях.

Элиминация или значимое снижение титра возбудителя (на 3-4 порядка), либо смена возбудителя в биологическом материале, полученном от пациента по

данным микробиологического исследования и/или клиническое улучшение состояния пациента.

Регламент клинического исследования:

Скрининг/ Осмотр 1 0/1 сутки. Оценивали критерии включения/невключения; сбор медицинского анамнеза, физикальное обследование; клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи (в лаборатории клинической базы); оценивали состояние пациента с использованием клинико-инструментальных методов учитывая локализацию текущего инфекционного процесса. Рандомизация (распределение по группам). Для группы терапии с использованием фагов отправка в лабораторию отсевов бактериальных культур. Заполнение Индивидуальной Регистрационной Карты. Забор и последующая передача в лабораторию образцов венозной крови и сыворотки крови пациента для иммунологического исследования.

Осмотр 2 Для обеих групп пациентов проводили физикальное обследование; контроль за возможным развитием СНЯ и НЯ; оценка критериев исключения; заполнение Индивидуальной Регистрационной Карты. В группе терапии с использованием фагов: после получения из лаборатории препарата фага (в период с 3 по 5 день от включения пациента) осуществляли введение фагов, подобранных для пациента. Во второй группе проводили стандартную терапию.

Осмотр 3 Проводился через 5 суток от введения бактериофагов. На шестые сутки от введения фагов проводился: забор биологического материала для бактериологического анализа из инфицированных локусов; клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи (в лаборатории клинической базы), физикальное обследование; продолжение стандартной терапии; контроль за возможным развитием СНЯ и НЯ; оценка критериев исключения; заполнение ИРК.

В случае недостижения критериев эффективности исследуемой терапии проводились: оценка результатов бактериологического анализа и в случае наличия исследуемых патогенов проводится повторный цикл процедур, начиная с осмотра 2 для группы персонализированной фаготерапии; оценка напряженности

антифагового иммунного ответа методом ИФА и изменение состава препарата, а именно, замена штаммов бактериофагов, если были обнаружены антифаговые антитела.

В случае достижения критериев эффективности исследуемой терапии проводился визит завершения.

Осмотр 4 (завершение исследования) Осуществляли: забор и последующая передача в лабораторию образцов венозной крови и сыворотки пациента для иммунологического исследования; оценки эффективности терапии.

Продолжительность исследования зависела от скорости выздоровления.

Таблица 2.6 - Изучаемые параметры анализов крови и мочи

Анализ	Ед. измерения
Клинический анализ крови	
Количество эритроцитов	Млн./мкл
Гемоглобин	Г/л
Количество лейкоцитов	Тыс./мкл.
Количество тромбоцитов	Тыс./мкл
Нейтрофилы	%
Эозинофилы	%
Базофилы	%
Моноциты	%
Лимфоциты	%
Биохимический анализ крови	
Глюкоза	Ммоль/л
Общий белок	Г/л
Общий билирубин	Мкмоль/л
АСТ	Е/л
АЛТ	Е/л
Креатинин	Мкмоль/л
Мочевина	Ммоль/л
С-реактивный белок	Мг/л
Прокальцитонин	Нг/мл
Общий анализ мочи	
Цвет	
Прозрачность	
Относительная плотность/удельный вес	
Кислотность	
Глюкоза	Ммоль/л
Белок	г/л
Эритроциты	В поле/з
Лейкоциты	В поле/з
Бактерии	В поле/з
Цилиндры	В поле/з
Грибы	-

Во время визитов выполнялись следующие процедуры: сбор демографических и антропометрических данных (дата рождения, возраст (количество полных лет на момент участия в исследовании), пол, антропометрические данные включают вес и рост; сбор медицинского анамнеза. Данные медицинского анамнеза включают перенесенные заболевания, основное заболевание (по поводу которого пациент госпитализирован) и сопутствующие заболевания; физикальное обследование включает осмотр следующих органов и систем: кожа, волосы, ногти, эндокринная система, ЛОР-органы, сердечно-сосудистая система, дыхательная система, желудочно-кишечный тракт, нервная система, костно-мышечная система, репродуктивная система, мочевыделительная система; оценка жизненно важных показателей: АД, ЧСС, ЧД и аксиллярная температура; сбор информации о предшествующей терапии будет ограничиваться 30 днями до начала скрининга; взятие крови, мочи осуществляется в соответствии с рутинной практикой ЛПУ по параметрам, указанным в таблице 2.6, изучение посевов бактериальных культур из клинического материала.

2.2.5. Иммунологические методы

2.2.5.1. Получение кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток к использованным бактериофагам. Для получения антисывороток проводили внутримышечную иммунизацию кроликов растворами бактериофагов, смешанными с полным или неполным адьювантом Фрейнда («Difco», США).

Схема иммунизации:

- 1) 0,5 мл раствора фага (концентрация 10^{10} БОЕ/мл) + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда;
- 2) через 10 дней 0,25 мл раствора фага + 0,25 мл неполного адьюванта;
- 3) через 20 дней 0,1 мл раствора фага + 0,1 мл неполного адьюванта;
- 4) через 30 дней 0,5 мл раствора фага + 0,5 мл неполного адьюванта.

По окончании цикла иммунизаций проводили иммунохимический анализ полученных антисывороток методами преципитации в геле по Оухтерлони и иммуноэлектрофореза.

2.2.5.2. Метод преципитации в геле по Оухтерлони был выполнен согласно [47].

2.2.5.3. Метод иммуноэлектрофореза был выполнен согласно [51].

2.2.5.4. Оценка клеточного и гуморального антифагового иммунного ответа.

2.2.5.4.1. Определение антифагового гуморального иммунного ответа методом ИФА. Для определения антифаговых IgG-антител использовали иммуноферментный анализ с применением самостоятельно сконструированных тест-систем (рисунок 2.1.)

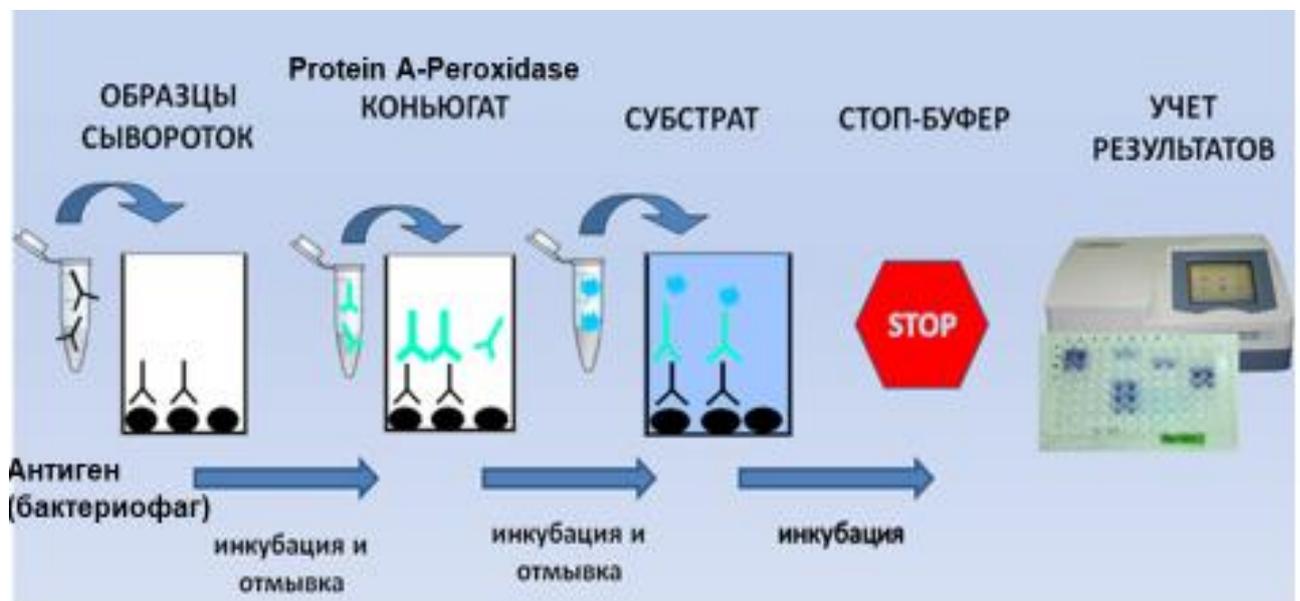


Рисунок 2.1 - Схема иммуноферментной тест-системы по выявлению антифаговых IgG-антител

Реагенты:

- 1) раствор исследуемого бактериофага в концентрации 10^8 - 10^{10} БОЕ/мл (антиген);
- 2) поликлональная кроличья моноспецифическая антифаговая антисыворотка (первый положительный контроль, контроль работы конъюгата);
- 3) пул сывороток крови, содержащих IgG-антитела к тестируемому бактериофагу (второй положительный контроль);
- 4) конъюгат Protein A-Peroxidase («Sigma», США);
- 5) забуференный фосфатами физиологический раствор, содержащий твин-20 в

концентрации 0,1% (PBS-T);

6) раствор для промывки планшетов («BSM Diagnostics», США);

7) субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5' тетраметилбензидина гидрохлорид («BSM Diagnostics», США);

8) стоп-реагент для остановки ферментной реакции («BSM Diagnostics», США).

Проведение иммуноферментного анализа и учет результатов.

1. Антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета («Вектор-Бест», Россия), для чего в лунки вносили по 100 мкл раствора бактериофага, закрывали пленкой и оставляли для инкубации на 18-20 ч при температуре $+(6-8)^{\circ}\text{C}$. В последние лунки рядов антиген не вносили – данные лунки служили контролем отсутствия антигена («пустые лунки»).

2. После инкубации удаляли содержимое лунок (резко встряхивали) и промывали планшет раствором для промывки 5-6 раз с обязательным внесением в лунки 300-400 мкл раствора. После промывки тщательно удаляли промывочный раствор, постукивая планшетом по фильтровальной бумаге, сложенной в несколько раз, для полного удаления жидкости из лунок. Возможно хранение герметично упакованного планшета с сорбированным антигеном при температуре $-(10-20)^{\circ}\text{C}$ до исследования. Перед работой планшет размораживали при комнатной температуре в течение 30 мин.

3. Делали ряд разведений исследуемых сывороток в PBS-T, начиная от минимального разведения 1:100.

4. Согласно протоколу в лунки вносили по 100 мкл исследуемых образцов в нескольких разведениях, положительных контролей и отрицательного контроля (PBS-T). Все образцы и положительные контроли вносили в дублях, отрицательный контроль – в триплете.

5. Планшет инкубировали 60 мин при 37°C , со встряхиванием 700 об/мин.

6. После инкубации промывали планшет 5-6 раз как описано ранее.

7. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении.

8. Планшет инкубировали 60 мин при 37°C , со встряхиванием 700 об/мин.

9. Промывали планшет как описано ранее.

10. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл субстратного раствора.
11. Планшет инкубировали 15-25 мин. в темноте при комнатной температуре.
12. Для прекращения реакции в каждую лунку вносили по 100 мкл стоп-реагента.
13. Проводили измерение оптической плотности при 450 нм на планшетном фотометре Infinite F50 («Tecan», Австрия).

После определения оптической плотности осуществляли учет результатов. Значения ОП в «пустых лунках» (отсутствие антигена) и в лунках с отрицательным контролем (отсутствие антифаговых антител) не должно превышать 0,1. Значение ОП в лунках с положительными контролями должно превышать 0,4. Вычисляли критическое значение ОП или cut-off:

$$\text{Cut-off} = K_{\text{cp}} \cdot x2$$

Образцы с ОП, превышающей cut-off, считались положительными, т.е. содержащими IgG-антитела к соответствующему бактериофагу. Титром антифаговых IgG-антител в исследуемом образце сыворотки крови считалось его максимальное разведение, показавшее положительный результат.

2.2.5.4.2. Определение антифагового гуморального иммунного ответа в реакции нейтрализации.

Оценить гуморальный иммунный ответ на бактериофаги можно также в реакции нейтрализации, учитывающей падение силы литической активности (титра) бактериофага при добавлении к нему сыворотки крови, содержащей соответствующие антитела.

Методика проведения реакции нейтрализации отработана в лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Исследуемую сыворотку крови человека или кролика разводили в 1500 раз в забуференном фосфатами физиологическом растворе (PBS), затем к 450 мкл разведенной сыворотки добавляли 50 мкл фаголизата исследуемого бактериофага в титре 10^6 БОЕ/мл. Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После инкубации смесь разводили в 100 раз МПБ и титровали по методу Грациа. Контроль – инкубация без добавления сыворотки. Падение титра бактериофага при

добавлении сыворотки крови свидетельствовало о наличии в ней нейтрализующих антифаговых антител. Результат учитывали в БОЕ на мл, как в стандартной методике Грация, описанной в фармакопее.

2.2.5.4.3. Изучение антифагового клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии.

Исследования выполнены на базе лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (рук. лаборатории – д.м.н., профессор Бляхер М.С.).

Стимуляция лимфоцитов пациентов бактериофагами.

Влияние бактериофагов при изучении реакций клеточного иммунитета пациента на фаготерапию было оценено *in vitro* в культуре лимфоцитов, выделенных из крови пациентов до начала фаготерапии и спустя 1-5 недель после. Лимфоциты в составе фракции мононуклеаров были выделены в градиенте плотности Histopaque-1077, путем 20-минного центрифугирования в basket-роторе при 400g. После отмывания в PBS клетки были разведены до концентрации 5×10^6 /мл в полной среде RPMI-1640 с антибиотиками и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и для дальнейшей стимуляции помещены в культуральный 96-луночный планшет в объеме 200 мкл. Процент лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров колебался от 92 до 95%.

Для проведения исследования по выявлению специфической активации клеточного иммунитета предварительно была отработана схема стимуляции лимфоцитов пациентов бактериофагами (рисунок 2.2.).

Исследуемые бактериофаги (в концентрации 10^6 БОЕ/мл) были сорбированы в лунках полистиролового планшета. Иммунофенотипирование лимфоцитов после антигенной стимуляции проведено с помощью 3-параметровой проточной цитометрии (реагенты и оборудование Beckman Coulter, США). Использованы следующие комбинации моноклональных антител с флюорохромами: CD3/FITC, CD4/PC7, CD8/PE, CD69/PC5. Активацию Т-лимфоцитов регистрировали по увеличению среди них количества клеток, экспрессирующих маркер активации

CD69: Т-хелперов (CD3+CD4+CD69+) или цитолитических Т-клеток (CD3+CD8+CD69+).

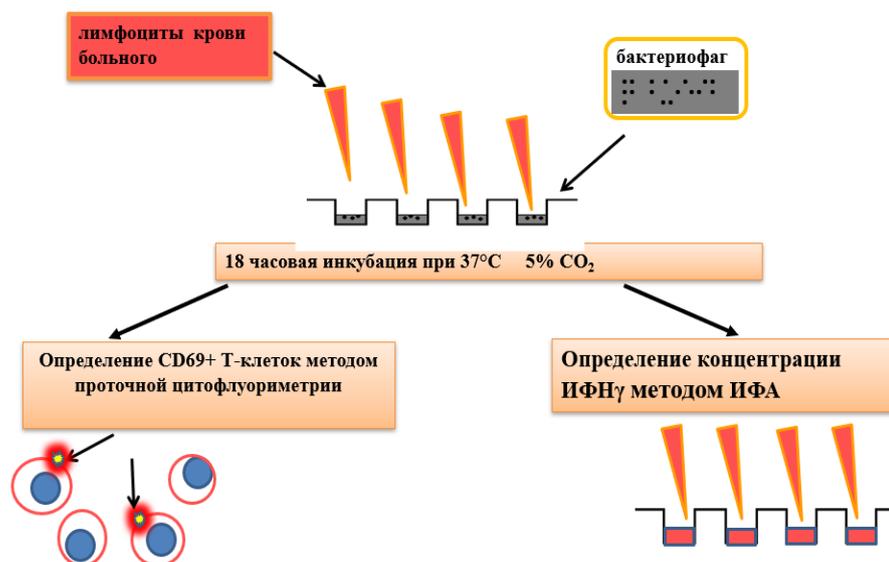


Рис 2.2 - Схема стимуляции лимфоцитов бактериофагами для выявления активированных Т-клеток

Культуральные супернатанты были отобраны из лунок до изъятия из планшета лимфоцитов для их иммунофенотипирования (см. схему рис 2.3.). В этих супернатантах определяли концентрацию ИФН γ , повышение уровня которого также происходит при появлении среди лимфоцитов больного антигенспецифических Т-клеток, распознающих бактериофаги [223, 239].

Помимо ИФН γ в присутствии бактериофагов лимфоциты продуцировали и другие цитокины: провоспалительные ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и противовоспалительные ИЛ-4, ИЛ-10. Концентрация перечисленных цитокинов определялась в тех же супернатантах, что и ИФН- γ . Этот подход применялся для оценки неспецифической активации лимфоцитов при контакте с бактериофагом (см. рис 2.3.). Концентрацию ИФН γ , ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 ИЛ-4, ИЛ-10 определяли методом ИФА (тест-системы «Вектор-Бест», Россия).

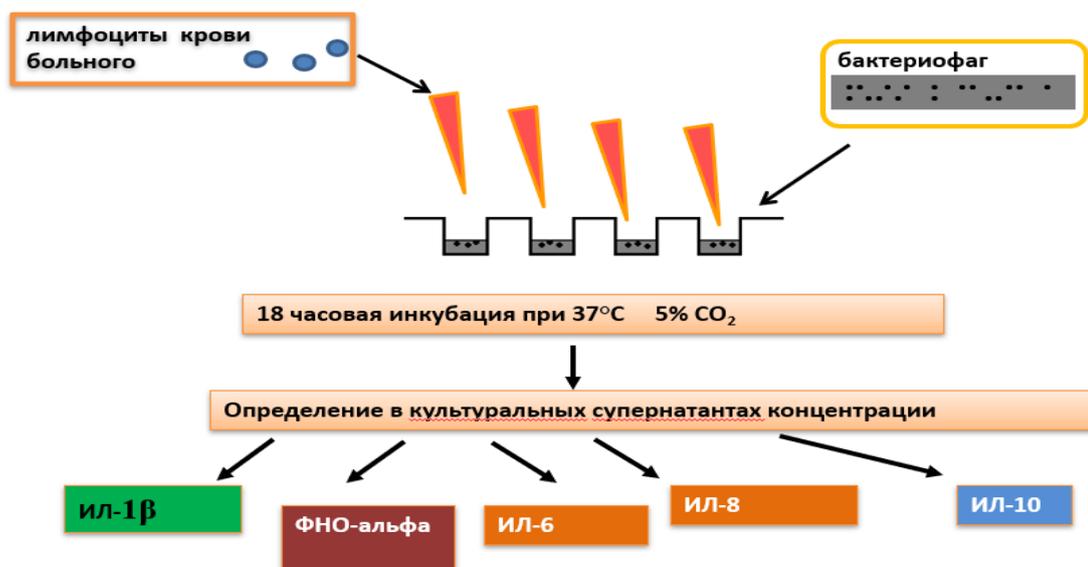


Рисунок 2.3 - Схема стимуляции лимфоцитов бактериофагами для выявления уровня их неспецифической активации

2.2.5.5. *Оценка параметров иммунного статуса больных.* До проведения фаготерапии и 1-3 раза в ходе нее (с интервалом в 1 неделю) у пациентов было проведено комплексное иммунологическое обследование, которое включало определение параметров:

- клеточного иммунитета
- гуморального иммунитета
- интерферонового статуса
- цитокинового статуса

2.2.5.5.1. Оценка клеточного иммунного статуса больных

Лимфоциты цельной крови метили антителами против CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD38, CD69, HLADR, конъюгированными с флуорохромами (FITC, PE, ECD, PC5, PC7) по безотмывочной технологии на автоматической станции пробоподготовки TQprep. Определение процента клеток, относящихся к той или иной субпопуляции лимфоцитов, проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 в протоколах для 2-х и 3-х цветной метки. Все оборудование и антитела – производства Beckman Coulter (США). Помимо процента клеток

оценивали абсолютную численность каждой субпопуляции лимфоцитов в 1 мкл крови.

2.2.5.5.2. Оценка гуморального иммунитета больных.

Сывороточная концентрация общих иммуноглобулинов – IgG, IgA, IgM – определена методом турбидиметрии (реагенты «Human», Германия на приборе Chem-7 (Erba Mannheim, Германия).

2.2.5.5.3. Оценка интерферонового статуса больных.

Интерфероновый статус оценивали методом определения биологической активности интерферонов в культуральных супернатантах. Методика основана на микрометоде С.С. Григорян, предназначенной для оценки интерферонового статуса в цельной гепаринизированной крови.

В анализ интерферонового статуса входят 4 основных параметра: содержание интерферонов в сыворотке крови, спонтанная продукция интерферонов клетками крови, индуцированная продукция IFN α и IFN γ клетками крови [30].

Для стимуляции преимущественно IFN α в культуру клеток крови вносили вирус болезни Ньюкасл штамм Н ((НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи), а для стимуляции продукции IFN γ – фитогемагглютинин Р (Sigma, США) в концентрации 12,5 мкг/мл. Индуцированная продукция интерферонов оценивалась после инкубации с индукторами при 37 $^{\circ}$ С в течение 24 ч. (для IFN α) или 72 ч. (для IFN γ). Спонтанная продукция интерферона лейкоцитами крови оценивалась после инкубирования без индуктора (в течение 72 ч.). Общее количество интерферонов в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием соответствующих тест-систем производства «Вектор-Бест» (Россия).

Для определения биологической активности продуцированных интерферонов супернатанты титровали на монослое фибробластов легкого человека (ФЛЭЧ) методом двукратных разведений. Для этого за сутки до титрования в 96-луночный плоскодонный культуральный планшет была внесена взвесь клеток ФЛЭЧ в концентрации 2×10^6 в мл по 100 мкл на лунку. Эту тестовую культуру инкубировали при температуре 37 $^{\circ}$ С в атмосфере с содержанием CO $_2$, равным 5%. Качество монослоя контролировалось под микроскопом. Через 24 ч

инкубации с раститрованными супернатантами в лунки планшета добавляли тест-вирус (вирус энцефаломиокардита мышей; рабочая доза – 100 цитопатогенных доз).

Уровень биологической активности интерферона (Ед/мл) выражали величиной, обратной максимальному разведению тестируемого супернатанта, задерживающему цитопатогенное действие вируса на 50%. В качестве внутрилабораторных референс-препаратов использовали супернатанты лейкоцитов, содержащие $IFN\gamma$ или $IFN\alpha$ в известном титре.

2.2.5.5.4. Определение способности клеток крови продуцировать цитокины (цитокиновый статус).

Определение этого вида функциональной активности лейкоцитов и лимфоцитов использовалось для характеристики общего уровня воспалительной реакции, регуляции формирования клеточного и гуморального ответа на вирусную инфекцию и оценки потенциальных возможностей иммунной системы для защиты организма от присоединения других инфекций в периоде реконвалесценции.

В супернатантах, снятых с культуры клеток цельной крови, после стимуляции различными индукторами (ФГА, ЛПС, ФМА) методом ИФА определяли концентрацию цитокинов, наиболее важных для формирования противоинфекционного иммунитета: IL4, IL6, IL8, IL10, ФНО α , $IFN\gamma$ и $IFN\alpha$.

Доза индуктора, его вид и длительность стимуляции указана в таблице 2.7.

Таблица 2.7 - Параметры индукции выработки цитокинов клетками крови.

<i>Цитокин</i>	<i>Индуктор</i>	<i>Рабочая концентрация</i>	<i>Длительность стимуляции, ч</i>
IL6, IL8, ФНО- α	ЛПС	100 пг/мл	24
IL10	ФГА	12 мкг/мл	72
IL4	ФМА иономицин	0,5 нг/мл 100мкг/мл	48

Примечание. Параметры индукции ИФН- γ и ИФН- α указаны выше в разделе

«Оценка интерферонового статуса больных».

Концентрацию ФНО α , ИФН γ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 ИЛ-4, ИЛ-10 определяли методом ИФА (тест-системы АО «Вектор-Бест», Россия).

2.2.6. Статистические методы

Статистический анализ данных, полученных в диссертационном исследовании, выполняли с использованием пакета прикладных программ «SAS» (SAS Institute Inc., USA) и включал следующие из элементов: построение гистограмм для визуальной оценки характера распределения; расчет средних значений и элементарная статистика для определения основных параметров распределений показателей и проверки их на соответствие нормальному закону распределения; расчет Т-критерия Стьюдента и непараметрических критериев для определения различий средних значений показателей в сравниваемых выборках.

Статистическая обработка результатов иммунологических исследований проведена с использованием программы Statistica 6 по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ II

1. В работе использованы материалы, соответствующие требованиям действующих в настоящее время нормативных документов.

2. В исследовании применены современные микробиологические, иммунологические, биотехнологические и др. методы исследования. Доклинические и клинические исследования проведены в соответствии с действующими в Российской Федерации методическими рекомендациями. Разработанные ЛФ бактериофагов оценивались в соответствии с современными требованиями Государственной фармакопеи XIV изд. Проведена статистическая обработка полученных экспериментальных данных, что свидетельствует о воспроизводимости и достоверности результатов исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время фаготерапию проводят с использованием серийно выпускаемой продукции. Производитель при серийном выпуске зарегистрированного ранее и разработке нового лекарственного средства на основе бактериофагов должен руководствоваться «Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств евразийского экономического союза» от 3.11.2016 г. В главу 4 данного документа были включены раздел 3 «Клинические исследования лечебно-профилактических бактериофагов» и раздел 4 «Отработка показаний к назначению исследуемого препарата и рекомендаций по его использованию в медицинской практике», определяющие дизайн клинических исследований лечебно-профилактических препаратов бактериофагов. В этом же документе приведены критерии определения эффективности лечебно-профилактических бактериофагов, основываясь на которых врач сможет объективно оценить результат проведенной фаготерапии:

- **лечебная** эффективность фаготерапии предполагает полное исчезновение всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания; уменьшение клинических проявлений или отсутствие прогрессирования по данным объективных исследований;
- **микробиологическая** эффективность (санация) оценивается после завершения курса фаготерапии и через 3-4 недели после проведения курса лечения и определяется как элиминация возбудителя – прекращение высева (выявления) возбудителя из очага первичной локализации инфекции.

На основании приведенных критериев эффективности можно оценить достоинства и недостатки персонифицированного подхода к лечению ИСМП в стационарах РФ. Во-первых, к бактериофагам обращаются только в случае инфекции, вызванной полирезистентным возбудителем, что отражает эксклюзивность фаготерапии как метода лечения пациентов, страдающих ИСМП.

Во-вторых, назначение бактериофагов без предварительного определения чувствительности к ним возбудителя нецелесообразно, так как в случае индивидуализированного алгоритма подбора бактериофагов появляется разница в составах тестируемого в лаборатории препарата и закупаемого родственниками пациента или клиникой для непосредственного проведения фаготерапии. Коллекции трех заводов, выпускающих препараты бактериофагов, различны, посерийная смена фагов в коктейлях повышает их эффективность в отношении внебольничных патогенов, но снижает вероятность совпадения, тестируемого в бактериологической лаборатории и назначаемого пациенту в ОРИТ препарата. Кроме того, в этой ситуации невозможно учесть возникновение штаммоспецифического антифагового иммунного ответа при повторном курсе бактериофагов, назначаемом пациентам, длительно находящимся в стационаре, при развитии рецидива инфекционного процесса. Серийно выпускаемые лекарственные формы бактериофагов ориентированы на пероральное или местное применение, для получения других лекарственных форм, например, для инъекционного, ингаляционного или ректального применения потребуется проведение фармакокинетических исследований. Если же удастся пройти весь представленный алгоритм подбора бактериофагового препарата из серийно-выпускаемой продукции, то это уже ничем не отличается от услуги по индивидуализированному подбору бактериофагов для персонифицированной фаготерапии (рисунок 3.1).

Таким образом, необходима разработка алгоритма эффективной многократной индивидуализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП, учитывающего взаимоотношения фаг-бактерия-мишень и фаг-макроорганизм.

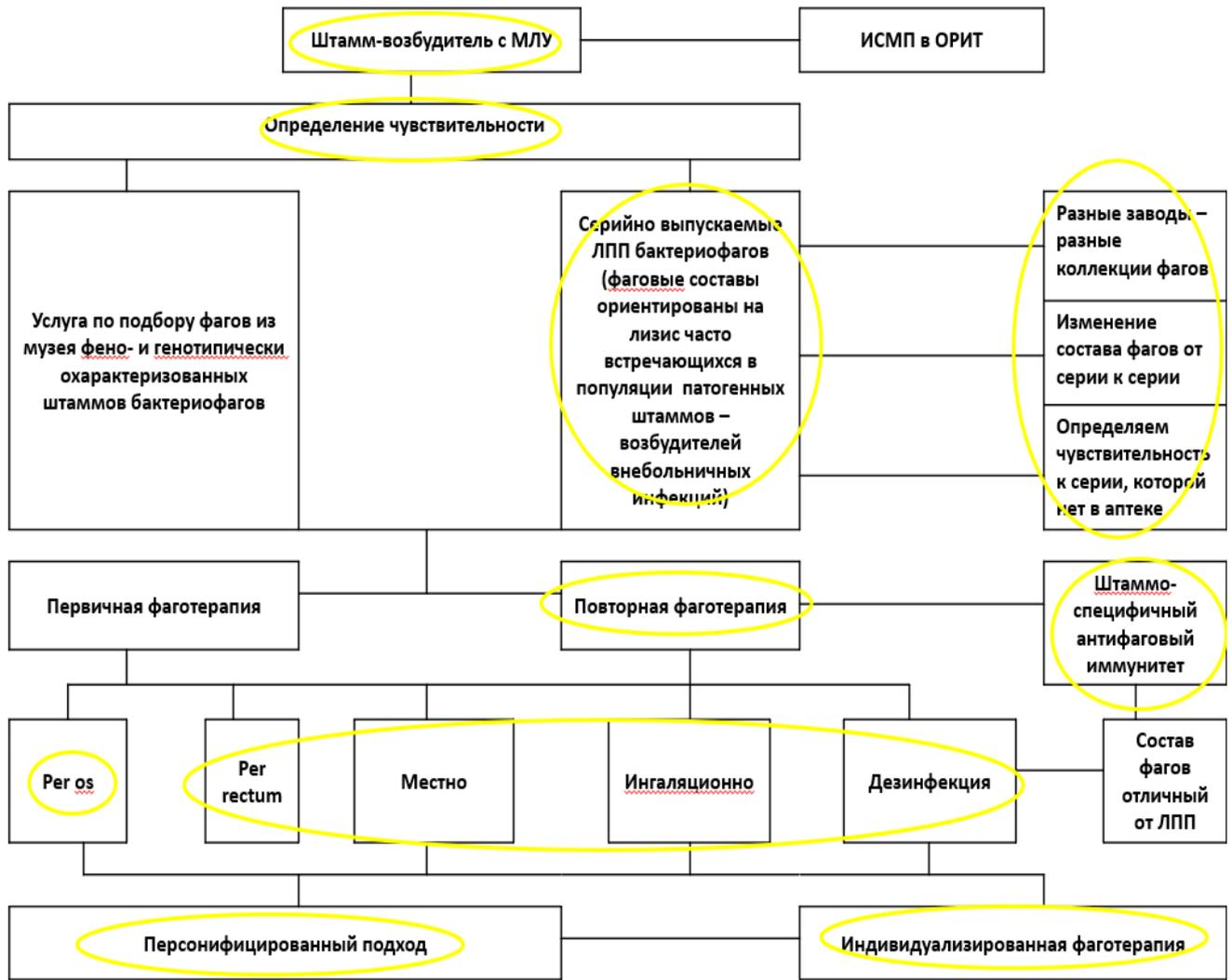


Рисунок 3.1 – Обоснование необходимости использования персонализированного подхода к фаготерапии пациентов с ИСМП в ОРИТ

ГЛАВА III. РАЗРАБОТКА ЛФ БАКТЕРИОФАГОВ

3.1. Создание коллекции производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*.

3.1.1. Выделение бактериофагов, активных в отношении отобранных бактерий-мишеней, из объектов окружающей среды.

Бактериофаги выделены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФГУН ГНЦ ПМБ. Бактериофаг AP22 [40] предоставлен А.В. Поповой. Выделение бактериофагов, активных в отношении *Staphylococcus aureus*, производили из клинических образцов и перевязочного материала больниц Москвы и Челябинска, а также из ливневых стоков и сточных вод очистных сооружений Москвы и Серпухова. Для поиска бактериофагов в исследуемых образцах использовали метод обогащения в жидкой питательной среде (ГРМ-бульон – бульон на основе гидролизата рыбной муки) (ФБУН ГНЦПМБ) с последующим высевом инактивированного хлороформом супернатанта на газоны штаммов бактерий *S. aureus*. Для обогащения использовали 40 штаммов *S. aureus*, выделенных в 2010 – 2015 гг. из клинических образцов, взятых от больных в Москве и Челябинске. При исследовании 37 образцов было выделено четыре бактериофага (SCH1, SCH111, SCH61 и StA1) с различной литической активностью по отношению к индикаторным культурам *S. aureus*.

Бактериофаги, активные в отношении клинических культур *Klebsiella pneumoniae*, выделяли из образцов перевязочных средств хирургических отделений, мокроты больных, мазков из носоглотки, смывов дренажных трубок и аппаратов искусственной вентиляции легких медицинских учреждений Москвы (инфекционная КБ №1, НИИ нейрохирургии им. Бурденко, КДЦ института МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора), Санкт-Петербурга, Протвино, Серпухова, Надыма. Бактериофаги искали также в образцах стоков

животноводческих хозяйств Центральной России, сточных вод городской канализации и очистных сооружений водоемов-отстойников г. Москвы.

Образцы взятого материала анализировали на наличие в них специфических бактериальных вирусов методом прямого тестирования и методом предварительного обогащения образца бактериофагами путем добавления в среду обогащения штаммов *K. pneumoniae*. В результате анализа исследуемых образцов было изолировано 10 бактериофагов с различной литической активностью в отношении индикаторных культур *K. pneumoniae*.

Бактериофаги, активные в отношении клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделяли их образцов сточных вод городов Москвы и Серпухова, используя метод обогащения исследуемого образца бактериофагами, добавляя в питательную среду клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa*. В результате проведенных исследований из образцов сточных вод были выделены три бактериофага: PA5, PA10 и PA30, лизирующие индикаторные клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa*.

Бактериофаги, лизирующие клинические штаммы *Acinetobacter baumannii*, выделяли из клинического материала от больных ожогового центра Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (Москва) и больных НИИ хирургии им. Н.Н. Бурденко, а также из сточных вод (Москва и Серпухов). Из исследуемых образцов было выделено два бактериофага в разной степени литически активных против клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*. Таким образом, из различных источников были выделены бактериофаги, специфически лизирующие клинические штаммы *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, и *A. baumannii*.

3.1.2. Фенотипическая характеристика изолированных штаммов бактериофагов. Отбор производственно-перспективных штаммов бактериофагов на основании их биологических свойств.

Стафилококковые бактериофаги. Все четыре выделенных бактериофага, активные против *S. aureus*, имеют однотипные по морфологии негативные колонии: на газоне чувствительного штамма фаги образуют мелкие негативные

колонии диаметром 1 – 2 мм с ровными краями без ореола, негативные колонии фагов SCH1, SCH111 и StA1 – прозрачные, колонии фага SCH61 – мутные. При размножении на чувствительных к бактериофагам штаммах *S. aureus* в жидкой питательной среде (ГРМ-бульон) с аэрацией при температуре 37 °С за 3 – 3,5 ч нарабатываются фаговые частицы в титре по Грациа от 10⁹ БОЕ/мл (фаг SCH61) до 10¹⁰ БОЕ/мл (фаги SCH1, SCH111, StA1). Фотографии негативных колоний бактериофагов SCH1 и SCH111 представлены на рис. 3.2 (С, D).

Оценку спектра литических свойств фагов определяли на 40 индикаторных клинических штаммах *S. aureus* методом спот-теста. Нарботанные фаголизаты стерилизовали хлороформом и наносили на свежесосеянные газоны *S. aureus*. О чувствительности штаммов *S. aureus* к фагам судили по появлению стерильного пятна на выросшем через 16 – 18 ч газоне индикаторного штамма. Результаты изучения спектра литического действия стафилококковых бактериофагов представлены в табл.3.1. Как следует из полученных данных, самым широким спектром литического действия в отношении индикаторных культур обладает бактериофаг SCH1: он подавляет рост 92,5 % стафилококковых штаммов; в меньшей степени активны бактериофаг StA1 (87%) и бактериофаги SCH111 и SCH61 (72%). Следует отметить, что на чувствительных культурах *S. aureus* в спот-тесте бактериофаги SCH1 и SCH111 образовывали стерильные пятна лизиса при разведении их в 10000 раз.

Все четыре бактериофага *S. aureus* устойчивы к действию хлороформа: титр их в фаголизатах, стерилизованных фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, не превышал титр в аналогичных фаголизатах, обработанных хлороформом.

При изучении жизнеспособности стафилококковых фагов выявлена их чувствительность к сравнительно невысоким температурам: нагревание препаратов бактериофагов до температуры выше 56°С полностью инактивирует их за 15 мин. Оптимальная температура для поддержания исходного титра фагов в течение нескольких месяцев составляет от 4 до 10°С.

Исходя из результатов по изучению спектра литического действия стафилококковых бактериофагов, морфологии и прозрачности образуемых ими негативных колоний, а также по степени урожайности на штаммах-хозяевах *S. aureus*, в качестве перспективных фагов для создания ЛП отобрали бактериофаги SCH1 и SCH111, хорошо размножающиеся на штамме *S. aureus* 2004.

Таблица 3.1 - Спектр литического действия стафилококковых бактериофагов в отношении клинических штаммов *S. aureus* (по результатам спот-теста).

Штаммы <i>S. aureus</i>	Бактериофаги, активные против <i>S. aureus</i>			
	SCH1	SCH111	SCH61	StA1
2001	+	+	+	+
2004	+	+	+	+
2006	-	-	-	-
2008	+	+	+	+
2010	+	-	-	-
2014	+	-	-	+
2017	+	+	+	+
2025	+	+	+	+
2031	+	+	+	+
2033	+	+	+	+
2038	+	+	+	+
2042	+	+	+	+
2045	+	+	+	+
2050	+	-	-	+
2053	+	+	+	+
2059	+	+	+	+
2065	+	+	+	+
2067	+	+	+	+
2070	+	+	+	+
25923 ATCC	-	-	-	-
209-P	+	+	+	+
BH-2012	+	-	-	-
Wood 1789	+	+	-	+
MO2	+	-	-	-
MO3	-	-	-	-
2071	+	+	+	+
2072	+	+	+	+
2073	+	+	+	+
2074	+	+	+	+
2075	+	+	+	+
2077	+	+	+	+
2078	+	+	+	+
2079	+	+	+	+
2080	+	+	+	+
2081	+	+	+	+
2082	+	+	+	+

В-1493	+	-	-	+
В-1209	+	-	-	+
В-1499	+	+	+	+
В-1959	+	-	-	+

Примечание: «+» - наличие лизиса (прозрачное пятно); «-» - отсутствие лизиса

Клебсиеллезные бактериофаги. Из различных образцов исследуемого материала было получено 10 изолятов клебсиеллезных бактериофагов, однако для дальнейшей оценки были взяты два бактериофага, спектры литической активности которых дополняют друг друга – КРV15 и КРV811 (см. таблицу 3.2.). Оба бактериофага выделены из образцов сточных вод. На чувствительных штаммах они образуют мелкие прозрачные негативные колонии диаметром 1 – 2 мм со слабым ореолом (1 – 2 мм) или без него. Фотографии негативных колоний бактериофагов КРV15 и КРV811 представлены на рис.3.2. (Е, F). Оба фага устойчивы к хлороформу: титры их в фаголизатах, стерилизованных фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, не превышал титр в аналогичных фаголизатах, стерилизованных хлороформом. При нагревании препаратов бактериофагов КРV15 и КРV811 до температуры выше 60°C в течение 30 мин они полностью инактивировались. Оптимальная температура для поддержания исходного титра фагов в течение четырех месяцев составляет от 4 до 10°C.

Литический спектр бактериофагов КРV15 и КРV811 в отношении штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в клинических учреждениях в последние 5 лет, представлены в табл. 3.4. Как следует из представленных данных, бактериофаг КРV15 активно размножается и лизирует 14 из 40 клинических индикаторных штаммов *K. pneumoniae*: чувствительные к нему культуры *K. pneumoniae* лизируются при разведении фаголизата до титра 1×10^{-7} – 1×10^{-8} . На газоне чувствительных культур фаг КРV15 образует прозрачные бляшки. Кроме того, фаголизат бактериофага КРV15 в нулевом разведении лизирует еще 20 индикаторных штаммов *K. pneumoniae*, образуя на их газоне мутные пятна. Таким образом, из 40 индикаторных штаммов бактериофаг КРV15 с разной степенью активности лизирует 34 штамма (85%).

Бактериофаг КРV811 активно размножается (бляшкообразование наблюдается при разведении фаголизата до 10^{-7} – 10^{-8}) и лизирует 7 из 40

индикаторных культур *K. pneumoniae*, причем бактериофаг реплицируется на тех штаммах, на которых не реплицируется бактериофаг KPV15, т. е. два бактериофага, KPV15 и KPV811 лизируют с разной степенью активности 92,5% клинических штаммов *K. pneumoniae*.

Таблица 3.2. - Литический спектр бактериофагов KPV15 и KPV811 в отношении клинических штаммов *K. pneumoniae*.

Штаммы <i>K. pneumoniae</i>	Источник штамма и дата его выделения	Последнее разведение, с зафиксированными визуальными признаками литической активности бактериофага (спот-тест по 10 мкл из фаголизатов с титрами 10^{10} БОЕ/мл)	
		KPV 15	KPV 811
В-1224	ин.Бурденко, Москва, 2012	-	-
В-335	ин.Бурденко, Москва, 2013	-	8, пиб
В-463	ин.Бурденко, Москва, 2013	8, пиб	-
В-500	ин.Бурденко, Москва, 2013	8, пиб	-
В-550	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	7, пиб
В-567	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	8, пиб
В-584	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	7, пиб
В-612-1	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	7, пиб
В-612-2	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	0, мп
В-690 К	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	0, мп
В-697-1	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	7, пиб
В-697-2	ин.Бурденко, Москва, 2013	8, пиб	-
В-716	ин.Бурденко, Москва, 2013	8, пиб	0, мп
В-811	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	8, пиб
В-940	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	-
В-1493	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	-
В-1514	ин.Бурденко, Москва, 2013	0, мп	-
В-1667	ин.Бурденко, Москва, 2013	-	-
В-1759	ин.Бурденко, Москва, 2013	4, пиб	-
В-1896	ин.Бурденко, Москва, 2013	-	-
В-4010	ин.Бурденко, Москва, 2013	-	0, мп
В-54	ин.Бурденко, Москва, 2014	8, пиб	-
В-420/14	ин.Бурденко, Москва, 2014	0, мп	-
В-953/14	ин.Бурденко, Москва, 2014	0, мп	-
i-2504	ИКБ №1, Москва, 2013	0, мп	-
i-3008	ИКБ №1, Москва, 2013	0, мп	-
i-3016	ИКБ №1, Москва, 2013	4, пиб	-
i-8289	ИКБ №1, Москва, 2014	-	0, мп
409	Санкт-Петербург, 2013	0, мп	-
410	Санкт-Петербург, 2013	0, мп	-
197	КДЦ ин.им.Габрич., 2012	8, пиб	-
220	КДЦ ин.им.Габрич., 2012	0, мп	-
254	КДЦ ин.им.Габрич., 2012	0, мп	-
А 5	Надым, 2012	0, мп	-
5023	Московская обл., 2012	8, пиб	-
5044	-"-	8, пиб	-
5045	-"-	7, пиб	-
5047	-"-	7, пиб	-
5057	-"-	8, пиб	-
5058	-"-	8, пиб	-

Примечание: «пиб» - прозрачные изолированные бляшки (негативные колонии) на месте нанесения бактериофага;

«мп» - полупрозрачное или мутное литическое пятно на месте нанесения бактериофага.

Следует особо отметить, что в набор индикаторных штаммов входят культуры *K. pneumoniae*, выделенные в основном в 2012 – 2014 годах в крупных клинических центрах г. Москвы.

Псевдомонадные бактериофаги. Бактериофаги PA5, PA10 и PA30, активные против клинических штаммов *P. aeruginosa*, выделены в 2014 г. из сточных вод Москвы и Серпухова. Бактериофаг PA5 на газоне штамма *P. aeruginosa* B1304 образует прозрачные негативные колонии диаметром 1- 2 мм; бактериофаг PA10 на хозяйском штамме *P. aeruginosa* 176 формирует колонии диаметром 4 – 5 мм с прозрачным центром и ореолом на периферии. Бактериофаг PA30 размножается на штамме *P. aeruginosa* 3078 и образует прозрачные негативные колонии диаметром 2 – 3 мм.

Фотографии негативных колоний бактериофагов PA10 и PA30 представлены на рис.3.2. (А, В). Все три бактериофага устойчивы к хлороформу и чувствительны к нагреванию: при температуре 55°C они инактивируются в течение 15 мин. Имеют высокую стабильность при температуре 4 – 8°C после лиофильного высушивания. Максимальный титр бактериофагов PA5 и PA10 при размножении их на жидких и плотных питательных средах составляет около 10^{10} фаговых частиц в 1 мл фаголизата, титр бактериофага PA30 - не превышает 10^9 БОЕ/мл.

Спектр литической активности псевдомонадных бактериофагов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa* представлен в табл. 3.3. Как следует из таблицы, выделенные бактериофаги имеют сравнительно узкий спектр литической активности: для фагов PA5, PA10 и PA30 он составляет соответственно 27, 29 и 36%. Однако смесь этих фагов обуславливает лизис 52% индикаторных штаммов *P. aeruginosa*.

Исходя из представленных данных, наиболее перспективными в плане получения лечебно-профилактического продукта являются бактериофаги PA5 и PA10.

Таблица 3.3. - Спектр литической активности псевдомонадных фагов в отношении клинических штаммов *P. aeruginosa*

Штаммы <i>P. aeruginosa</i>	Бактериофаги			Источник штаммов	
	РА5	РА10	РА30		
3072	-	+	-	коллекция лаборатории	
3073	+	-	+		
3074	-	-	-		
3076	-	+	+		
3077	-	-	-		
3078	-	-	+		
3083	-	+	-		
3086	+	+	+		
3088	+	+	+		
3092	+	+	+		
3093	+	+	+		
3094	-	-	-		
3095	-	+	+		
3096	+	+	+		
3003	-	-	-		Челябинск, коллекция лаборатории
3011	-	+	-		
3013	-	-	-		
3017	-	-	-		
3018	-	-	-		
3019	-	-	+		
3020	-	-	-		
3026	+	+	+		
3033	-	-	+		
3038	-	-	-		
3041	-	-	-		
3045	-	-	-		
3047	-	-	-		
3055	-	-	-		
3060	-	-	-		
3062	-	-	-		
3063	-	-	-		
3064	-	-	-		
В120	-	-	-	Ин-т Бурденко, коллекция лаборатории	
В458	+	-	+		
В690	+	-	-		
В1304	+	+	-		
В1560	-	+	-		
В2546	+	-	-		
1	+	+	-	МНИИЭМ им. Габричевского, коллекция лаборатории	
176	-	+	-		
175	-	+	-		
V31	-	-	-	Вологда, вспышка, коллекция лаборатории	
V32	-	+	-		
V33	-	-	-		
V34	-	-	-		
ATCC 27853	-	+	-	коллекция лаборатории	
Литическая активность, %	27	36	29		

Примечание: «+» - наличие негативного пятна; «-» - отсутствие негативного пятна.

Ацинетобактерные бактериофаги. Работу по выделению и изучению молекулярно-генетических свойств бактериофага АМ24 проводили совместно сотрудниками ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии. Бактериофаг АР22 предоставлен А.В. Поповой. Бактериофаги АР22 и АМ24, активные против клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделены в период с 2010 по 2014 г.г. методом обогащения из образцов клинического материала, полученных из больниц г. Москвы.

Бактериофаг АР22 на газоне чувствительного штамма *Acinetobacter baumannii* 1053 формирует круглые прозрачные негативные колонии диаметром около 2 – 3 мм с ровными краями, окруженные непрозрачным ореолом. Фотографии негативных колоний бактериофагов АР22 и АМ24 представлены на рис.3.2. (G, H). Бактериофаг АМ24 на газоне чувствительного штамма В-05 формирует круглые прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром около 1 мм, окруженные непрозрачным ореолом. Диаметр ореола - от 2 до 6 мм. Оба бактериофага устойчивы к хлороформу и чувствительны к нагреванию: при температуре 55°C они инактивируются в течение 15 мин. Хорошо сохраняются в лиофильно высушенном состоянии при температуре 4 – 8 °С. Максимальный титр бактериофага АР22 при размножении его в жидких и на плотных питательных средах составляет 5×10^{10} БОЕ/мл, титр бактериофага АМ24 не превышает 7×10^9 БОЕ/мл.

Спектр литической активности ацинетобактерных бактериофагов в отношении 80 клинических штаммов *Acinetobacter baumannii* представлен в таблице 3.4.

Из таблицы 3.4. видно, что литические спектры фагов АР22 и АМ24 не перекрываются. Таким образом, при совместном использовании бактериофагов АР22 и АМ24 обеспечивается в совокупности лизис 56,25% штаммов *Acinetobacter baumannii*. Они депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» ФБУН ГНЦПМБ.

Таблица 3.4 - Спектр литического действия ацинетобактерных бактериофагов в отношении клинических штаммов *Acinetobacter baumannii* (по результатам спот-теста).

Штаммы <i>Acinetobacter baumannii</i>	Бактериофаг AP22	Бактериофаг AM24	Место выделения штаммов <i>Acinetobacter baumannii</i>
1002	-	-	Челябинск
1004	+	-	Челябинск
1005	+	-	Челябинск
1013	-	-	Челябинск
1014	+	-	Челябинск
1024	+	-	Челябинск
1035	-	-	Челябинск
1044	-	-	Челябинск
1045	+	-	Челябинск
1047	+	-	Челябинск
1053	+	-	Челябинск
1057	+	-	Челябинск
1058	+	-	Челябинск
1061	+	-	Челябинск
1064	+	-	Челябинск
1080	+	-	Челябинск
1082	-	-	Челябинск
1083	+	-	Челябинск
1085	+	-	Челябинск
1366	+	-	Челябинск
1367	+	-	Челябинск
1373	+	-	Челябинск
1378	+	-	Челябинск
1392	+	-	Челябинск
1396	-	-	Челябинск
1399	-	-	Челябинск
1402	-	-	Челябинск
1403	+	-	Челябинск
1406	+	-	Челябинск
1407	-	-	Челябинск
1412	-	-	Челябинск
1414	-	-	Челябинск
1417	-	-	Челябинск
1419	+	-	Челябинск
1425	-	-	Челябинск
1426	+	-	Челябинск
1427	+	-	Челябинск
1430	-	-	Нижний Новгород
1431	-	-	Нижний Новгород

Продолжение таблицы 3.4

Штаммы <i>Acinetobacter baumannii</i>	Бактериофаг AP22	Бактериофаг AM24	Место выделения штаммов <i>Acinetobacter baumannii</i>
1432	-	-	Нижний Новгород
1433	+	-	Нижний Новгород
1434	-	-	Нижний Новгород
1438	+	-	Нижний Новгород
1440	-	-	Нижний Новгород
1441	+	-	Нижний Новгород
1443	-	-	Нижний Новгород
1444	+	-	Нижний Новгород
1447	-	-	Нижний Новгород
1448	+	-	Нижний Новгород
2081	-	-	Москва
2082	-	-	Москва
2083	-	+	Москва
2184	-	-	Москва
2185	-	-	Москва
B-1691	-	+	Москва
B-171	-	+	Москва
B-176	-	-	Москва
B-202	-	+	Москва
B-229	-	+	Москва
B-266	-	-	Москва
B-3817	-	+	Москва
B-435	-	+	Москва
B-443	-	-	Москва
B-05	-	+	Москва
B-118	-	+	Москва
B-120	-	-	Москва
B-121	-	+	Москва
B-126	-	+	Москва
B-1504	-	-	Москва
B-1551	-	+	Москва
B-1623	-	+	Москва
B-177	-	-	Москва
B-188	-	+	Москва
B-2197-2	-	-	Москва
B-229	-	+	Москва
B-300	-	-	Москва
B-306-2	-	-	Москва
B-3817	-	+	Москва
B-5	-	-	Москва
B-672	-	-	Москва
Литическая активность, %	36,25	20	

Примечание: «+» - наличие негативного пятна; «-» - отсутствие негативного пятна.

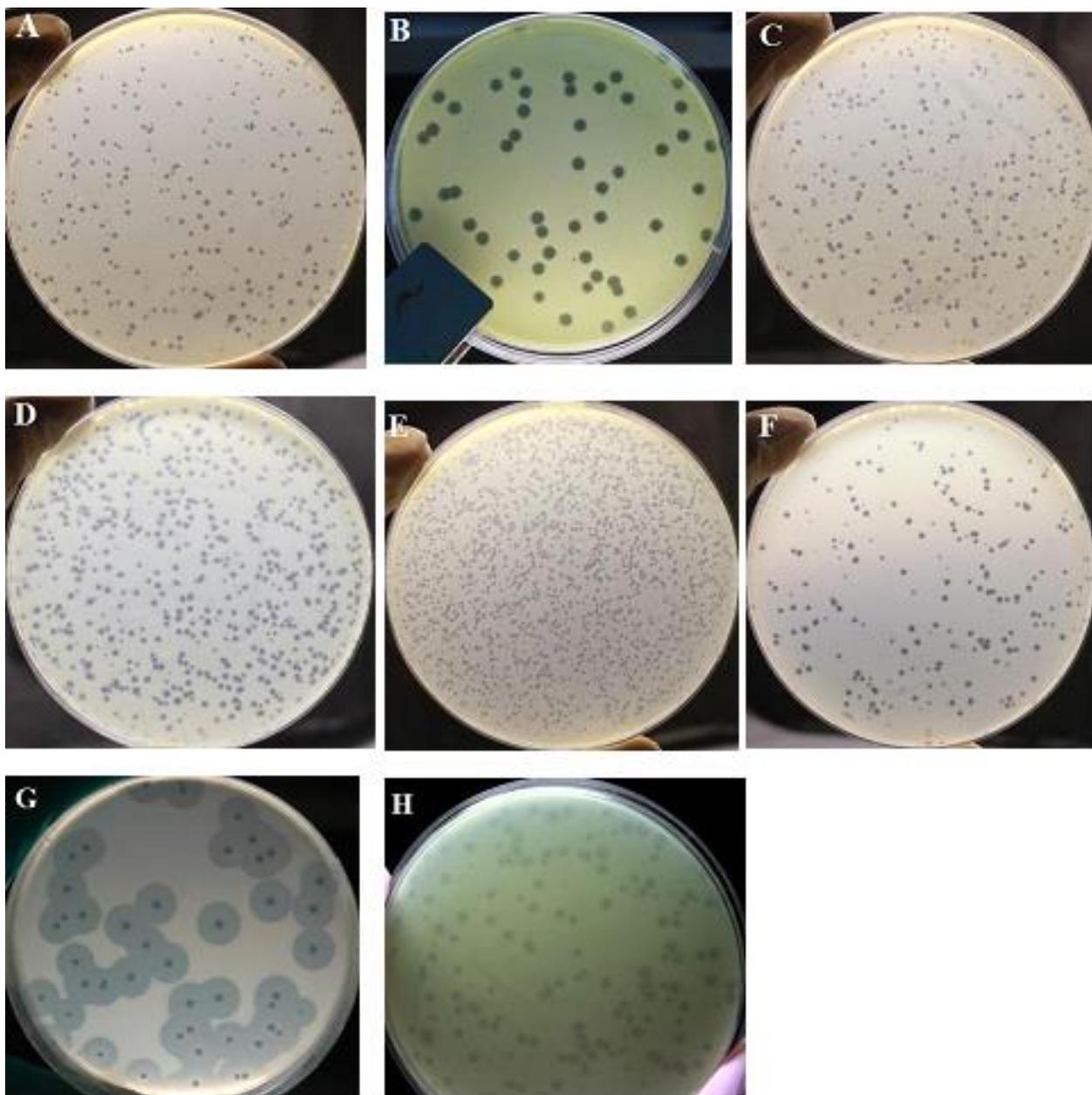


Рисунок 3.2 - Морфология негативных колоний бактериофагов PA-5 (A), PA-10 (B), SCH1 (C), SCH111 (D), KpV15 (E), KpV811 (F), AP22 (G), AM24 (H)

3.1.3 Отбор и наработка производственно-перспективных штаммов бактериофагов, лизирующих *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*, и бактериальных штаммов для размножения бактериофагов

По результатам исследований, представленным выше, для включения в состав ЛП отобраны восемь бактериофагов – по два фага, лизирующих бактерии видов *Pseudomonas aeruginosa* (PA5 и PA10), *Klebsiella pneumoniae* (KpV15 и

КрV811), *Staphylococcus aureus* (SCH1 и SCH111), *Acinetobacter baumannii* (AM24 и AP22).

Для размножения каждого бактериофага подобраны бактериальные штаммы-хозяева. В таблице 3.5. представлены титры бактериофагов в фаголизатах, полученных при размножении на культуре штаммов-хозяев в жидкой питательной среде.

Таблица 3.5 - Урожайность бактериофагов

№п/п	Бактериофаг	Штамм для размножения бактериофага	Выход бактериофага (урожайность), БОЕ/мл
1	PA5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-1304	2×10^{10}
2	PA10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 176	2×10^{10}
3	KPV15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-716	1×10^{10}
4	KPV811	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-811	1×10^{10}
5	SCH111	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	2×10^{10}
6	SCH1	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	2×10^{10}
7	AM24	<i>Acinetobacter baumannii</i> B-05	1×10^{10}
8	AP22	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1053	3×10^{10}

Отработаны защитные среды и режим лиофильного высушивания фагов и бактерий на сублимационной сушке EPSILON 2-60 (CHRIST, Германия). В защитной среде для бактериальных культур (сахароза 10%, желатин 1%) готовили суспензию бактерий с концентрацией 1×10^9 м.к./мл. Защитную среду для бактериофагов (сахароза 20%, желатин 2%) добавляли к фаголизату в равном объеме. Приготовленные суспензии фагов и бактериальных культур-хозяев разливали в стеклянные флаконы по 5,0 мл и высушивали в течение 24 ч при температуре - 85°C.

Наработанные и лиофильно высушенные препараты восьми бактериофагов и восьми бактериальных штаммов охарактеризованы по концентрации. 8 штаммов бактериофагов и 8 бактериальных штаммов бактериальных культур депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» (таблица 3.6.). Эти фаги затем использовали как стартовые культуры для наработки субстанции для получения ЛФ.

Таблица 3.6 - Бактериофаги и бактериальные штаммы, депонированные в «ГКПМ – Оболенск»

Вид м/о	Наименование штамма	Инвентарный № «ГКПМ - Оболенск»	Дата депонирования
Бактериофаги			
б/фаг <i>P. aeruginosa</i>	PA5	Ph-88	10.07.2014
б/фаг <i>P. aeruginosa</i>	PA10	Ph-89	10.07.2014
б/фаг <i>K. pneumoniae</i>	KPV15	Ph-90	10.07.2014
б/фаг <i>K. pneumoniae</i>	KPV811	Ph-91	10.07.2014
б/фаг <i>S. aureus</i>	SCH111	Ph-95	10.07.2014
б/фаг <i>A. baumannii</i>	AM24	Ph-100	10.07.2014
б/фаг <i>A. baumannii</i>	AP22	Ph-42	15.04.2010
б/фаг <i>S. aureus</i>	SCH1	Ph-105	04.10.2012
Бактериальные штаммы для размножения бактериофагов			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1053	B-7704	08.09.2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-05	B-7705	08.09.2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B-716	B-7706	08.09.2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B-811	B-7707	08.09.2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-1304	B-7708	08.09.2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	176	B-7709	08.09.2014
<i>Staphylococcus aureus</i>	2004	B-7710	08.09.2014

3.1.4 Устойчивость бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 к воздействию повреждающих факторов внешней среды

Устойчивость к температурному воздействию. Как видно из данных таблицы 3.7 титр всех изучаемых бактериофагов значительно снижается при воздействии температуры 65°C (таблица 3.7). Наиболее существенное снижение активности при температуре 65°C отмечено для бактериофагов SCH1 и SCH111 *Staphylococcus aureus*. Наименее подвержены инактивации при высокой температуре бактериофаги PA10 *Pseudomonas aeruginosa* и AP22 *Acinetobacter baumannii*.

Устойчивость к хлороформу. В экспериментах по изучению влияния хлороформа на бактериофаги установлено, что обработка им фаголизатов в течение

60 мин не приводит к снижению титра ни одного из исследуемых фагов (таблица 3.8.)

Таблица 3.7 - Влияние температуры на выживаемость бактериофагов.

№ п/п	Бактериофаг	Бактериальный тест-штамм	Титр фага, БОЕ/мл		
			+ 25 °С	- 20 °С	+ 65 °С
1	PA5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> В-1304	$8,6 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^4$
2	PA10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3086	$4,9 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$7,2 \times 10^5$
3	SCH1	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	$4,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	0
4	SCH111	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	$4,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{10}$	40
5	KpV15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> В-716	$5,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$0,72 \times 10^5$
6	KpV811	<i>Klebsiella pneumoniae</i> В-811	$8,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^7$
7	AP22	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1053	$7,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
8	AM24	<i>Acinetobacter baumannii</i> В-05	$6,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,0 \times 10^5$

Таблица 3.8 - Влияние хлороформа на стабильность бактериофагов.

№ п/п	Бактериофаг	Бактериальный тест-штамм	Титр фага, БОЕ/мл	
			хлороформ	SM-буфер (Контроль)
1	PA5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> В-1304	$8,2 \times 10^{10}$	$8,6 \times 10^{10}$
2	PA10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3086	$5,9 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$
3	SCH1	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	$4,8 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$
4	SCH111	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	$5,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
5	KpV15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> В-716	$4,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
6	KpV811	<i>Klebsiella pneumoniae</i> В-811	$8,7 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$
7	AP22	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1053	$2,7 \times 10^{10}$	3×10^{10}
8	AM24	<i>Acinetobacter baumannii</i> В-05	$6,6 \times 10^9$	$6,0 \times 10^9$

Стабильность бактериофагов при хранении. Бактериофаги хранили в виде фаголизатов, обработанных хлороформом, в течение 24 месяцев при 4-8 °С (в бытовом холодильнике). Титр фагов определяли по Грациа. Показано, что хранение бактериофагов в течение 24 месяцев в указанных условиях не приводит к существенному снижению их активности (табл. 3.10)

Таблица 3.9. - Стабильность бактериофагов при хранении

№ п/п	Бактериофаг	Титр, БОЕ/мл исходный	Титр, БОЕ/мл через 6 мес.	Титр, БОЕ/мл через 12 мес.	Титр, БОЕ/мл через 18 мес.	Титр, БОЕ/мл через 24 мес.
1	KPV15	$1,0 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$	$0,3 \times 10^{10}$	$0,7 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$
2	KPV811	$5,0 \times 10^9$	$0,8 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$
3	AM24	$1,3 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^{10}$	$0,7 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$	$0,2 \times 10^{10}$
4	AP22	$3,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$
5	PA5	$2,0 \times 10^{11}$	$1,16 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	$8,0 \times 10^{10}$	$6,5 \times 10^{10}$
6	PA10	$5,5 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$
7	SCH1	$1,4 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$0,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
8	SCH111	$2,0 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^{10}$	$0,5 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$

Изучение биосовместимости бактериофагов в составе коктейля.

Бактериофаги не подавляют активность друг друга в смеси (коктейле), на этом основано применение бактериофагов, производимых компанией Микроген.

Однако, для обоснования совместного применения бактериофагов в коктейле изучали стабильность коктейля с 8 изучаемыми бактериофагами. Данные представлены в таблице 3.10.

Таблица 3.10. - Стабильность бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 при хранении в коктейле

№ п/п	Бактериофаг	Титр, БОЕ/мл исходный	Титр, БОЕ/мл через 6 мес.	Титр, БОЕ/мл через 12 мес.	Титр, БОЕ/мл через 18 мес.	Титр, БОЕ/мл через 24 мес.
Коктейль бактериофагов	KPV15	$1,3 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$
	KPV811	$3,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
	AM24	$1,6 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$
	AP22	$3,1 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$
	PA5	$2,4 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^{10}$	$5,5 \times 10^{10}$
	PA10	$5,5 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{10}$
	SCH1	$1,5 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
	SCH111	$2,5 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$

Как видно из данных таблицы активность бактериофагов в коктейле не снижается в течение 24 месяцев.

3.1.5. Определение частоты возникновения фагорезистентных мутантов бактерий

Частоту формирования фагорезистентных мутантов определяли для бактериальных штаммов, которые использовали для получения бактериофагов, включенных в ЛП. Как видно из данных таблицы 3.11 частота образования бактериальных колоний, образующихся в зоне фаголизиса газонов бактериальных культур, существенно варьирует: от 10^{-3} (для *Klebsiella pneumoniae* B-811) до 2×10^{-7} (для *Pseudomonas aeruginosa* 3086) на одну бактериальную клетку. Большая часть штаммов, используемых для наработки фагов, входящих в состав ЛП, имеет частоту образования фагоустойчивых мутантов не выше 10^{-5} (таблица 3.11).

Таблица 3.11 - Частота возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов (ВМ).

Бактериофаг	Штамм	ВМ
AP22	<i>Acinetobacter baumannii</i> 1053	1×10^{-6}
AM24	<i>Acinetobacter baumannii</i> B-05	1×10^{-5}
KPV15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-716	1×10^{-4}
KPV811	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-811	1×10^{-3}
SCH1	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	1×10^{-4}
SCH111	<i>Staphylococcus aureus</i> 2004	1×10^{-4}
PA5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-1304	1×10^{-6}
PA10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3086	2×10^{-7}

3.1.6 Определение параметров инфекционного процесса в системе фаг-клетка для бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111

Адсорбция. Результаты по изучению адсорбции бактериофагов представлены на рис.3.3. Время адсорбции бактериофагов на поверхности бактериальной клетки находится в интервале от 4 до 10 мин. наиболее быстрая (в течение 4 – 5 мин) и полная (до 90 – 100%) адсорбция наблюдается у клебсиеллезного бактериофага KPV811, AP22 и стафилококкового бактериофага SCH1. Полная адсорбция ацинетобактерного фага AM24 происходит за 10 мин.

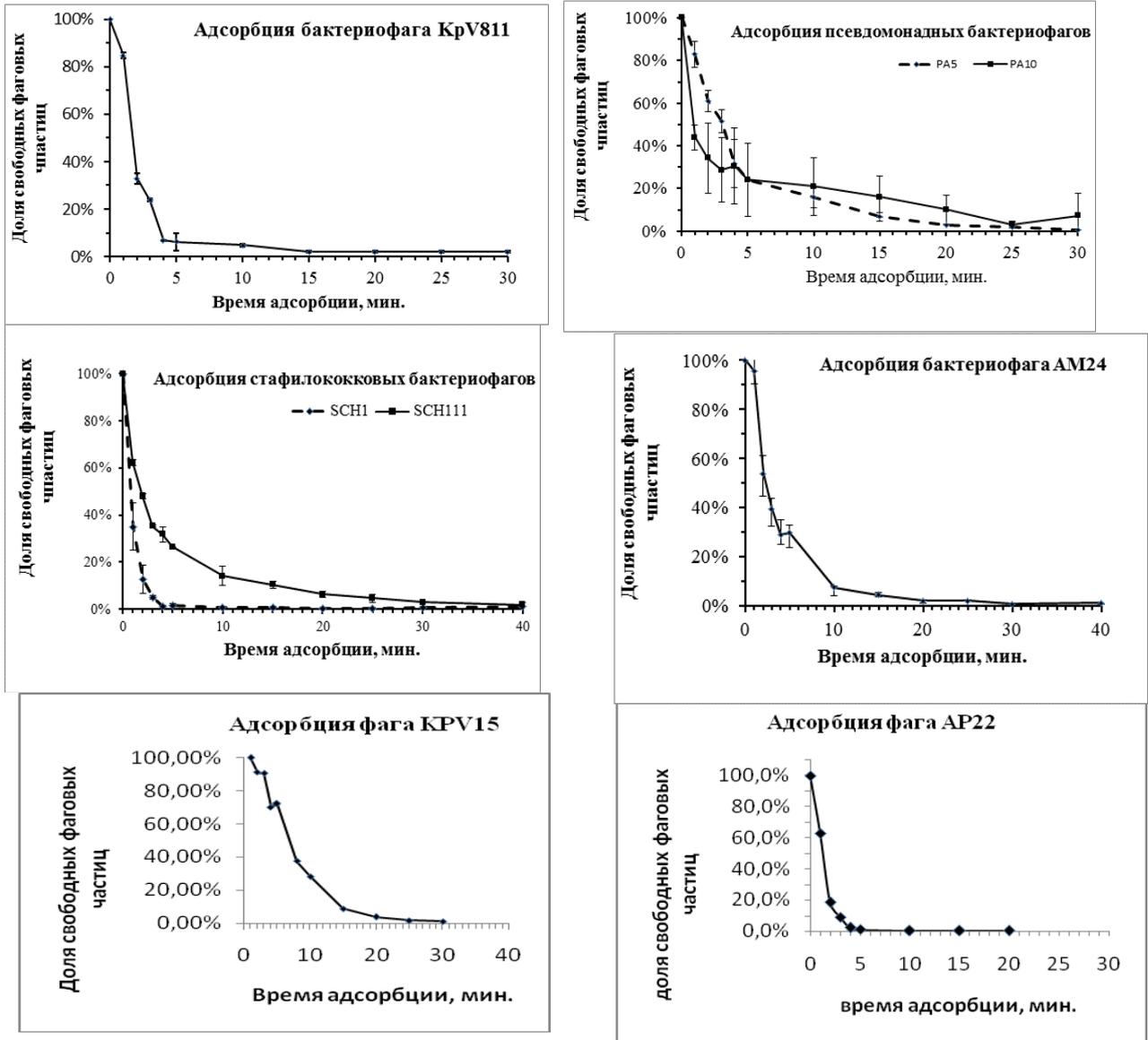


Рисунок 3.3 - Кривые адсорбции бактериофагов, входящих в состав лечебно-профилактического продукта.

В отношении псевдомонадных фагов следует отметить, что адсорбция их на клетках бактерий значительно растянута во времени, однако около семидесяти процентов фаговых частиц адсорбируется в течение первых 5 мин, затем процесс замедляется и заканчивается к 15 – 25 миам от его начала.

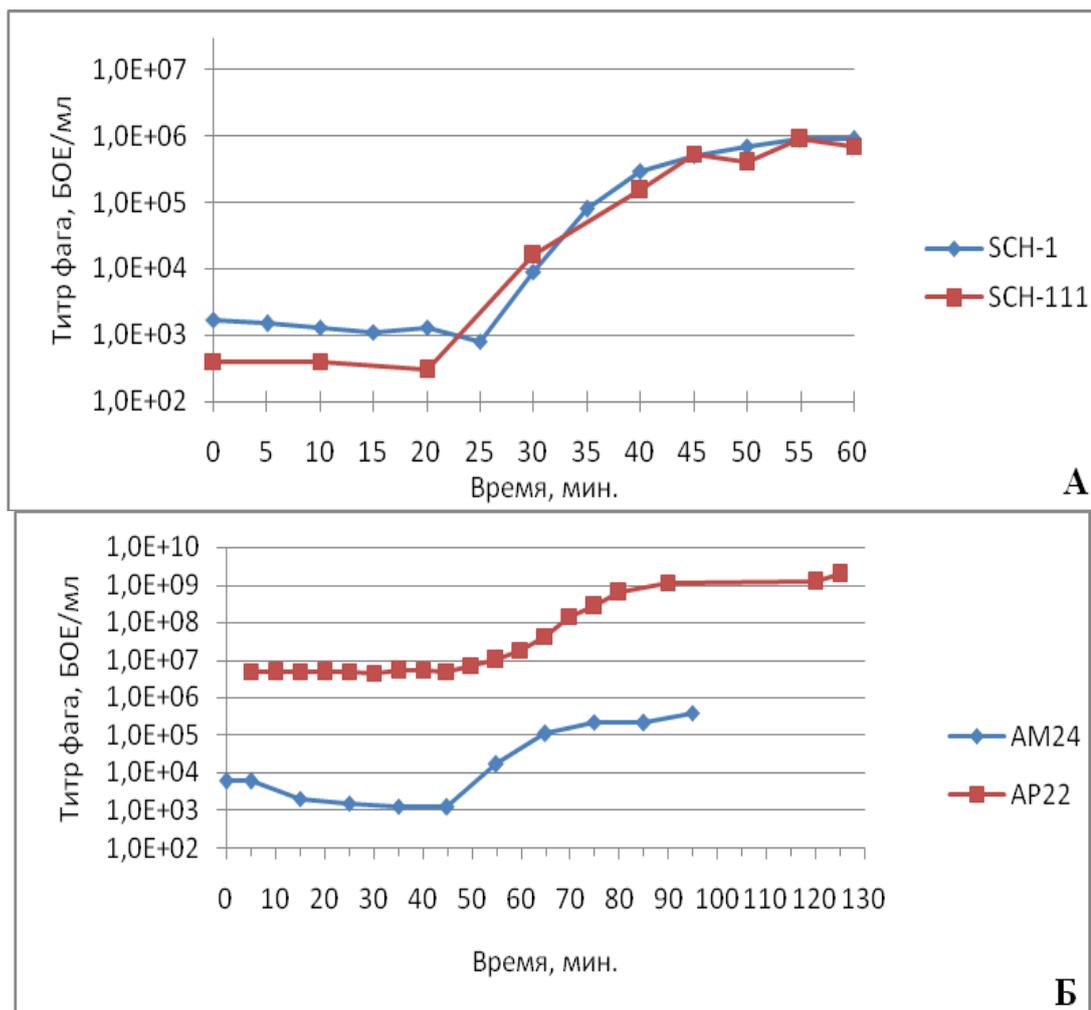
Латентный период и выход фаговых частиц. Латентный период и выход фаговых частиц из одной бактериальной клетки определяли при анализе кривых одиночного цикла развития бактериофагов, представленных на рисунке 3.4. Получены следующие значения для исследуемых бактериофагов:

SCH1 (A): продолжительность латентного периода – 25 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 234;
 SCH111 (A): продолжительность латентного периода – 20 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 400;

AM24 (Б): продолжительность латентного периода – 45 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 180;
 AP22 (Б): продолжительность латентного периода – 40 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 240;

KPV15 (B): продолжительность латентного периода – 25 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 12;
 KPV811(B): продолжительность латентного периода – 10 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 30;

PA5 (Г): продолжительность латентного периода – 25 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 700;
 PA10 (Г): продолжительность латентного периода – 10 мин., выход фаговых частиц на 1 клетку – 55.



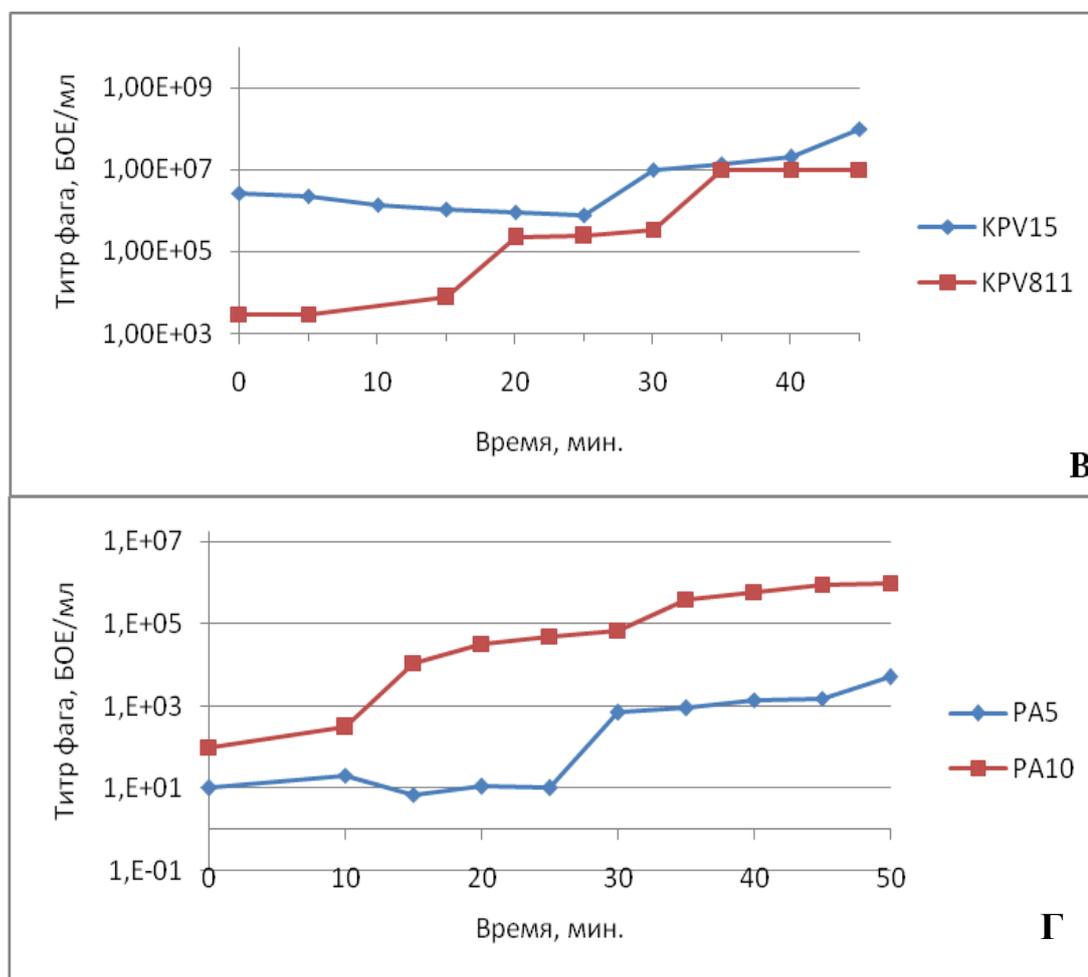


Рис. 3.4 – Одиночный цикл развития бактериофагов: стафилококковых (А), ацинетобактерных (Б), клебсиеллезных (В), псевдомонадных (Г).

3.2 Молекулярно-генетический анализ бактериофагов КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111

3.2.1 Молекулярно-генетическое исследование бактериофагов методом рестрикционного анализа

В качестве материала для исследований использовали 7 препаратов ДНК вновь выделенных бактериофагов, специфичных к *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Staphylococcus aureus* (2), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Acinetobacter baumannii* (1).

В таблице 3.12. представлены результаты спектрофотометрического анализа ДНК бактериофагов, который показал пригодность выделенных препаратов для дальнейшего исследования с помощью картирования рестриктазами. Спектрофотометрическое измерение концентрации ДНК позволило рассчитать

количество препаратов, необходимое для последующих исследований. При гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции в 25 мкл реакционной смеси в зависимости от концентрации препарата вносили 50-100 нг фаговой ДНК. На рисунке 3.5. представлена электрофореграмма нативной ДНК, выделенной из анализируемых бактериофагов.

Таблица 3.12 - Спектрофотометрическое измерение концентрации фаговой ДНК

Бактериофаг	Бактерии, чувствительные к бактериофагу	Концентрация ДНК, мкг/мл	Характеристики ДНК, A260/A280
Pa5	<i>P.aeruginosa</i>	60,0	1,8
Pa10		20,0	1,95
KPV15	<i>K.pneumoniae</i>	19,0	2,0
KPV811		32,5	1,8
SCH1	<i>S.aureus</i>	40,0	1,8
SCH111		45,0	1,9
AM24	<i>A. baumannii</i>	50,8	1,8
AP22	<i>A. baumannii</i>	60,0	1,8

Для генетического картирования ДНК бактериофагов использовали эндонуклеазы рестрикции, расщепляющие нуклеотидные последовательности длиной 6 нуклеотидов: EcoRI (G↓AATTC), NdeI (CA↓TATG), HindIII (A↓AGCTT), KspAI (HpaI) (GTT↓AAC), EcoRV (GAT↓ATC).

На рисунках 3.6-3.10 приведены электрофореграммы с результатами гидролиза ДНК бактериофагов эндонуклеазами рестрикции EcoRI, KspAI, NdeI, EcoRV, HindIII. В качестве контроля работы ферментов использовали гидролиз ДНК фага лямбда (λ).

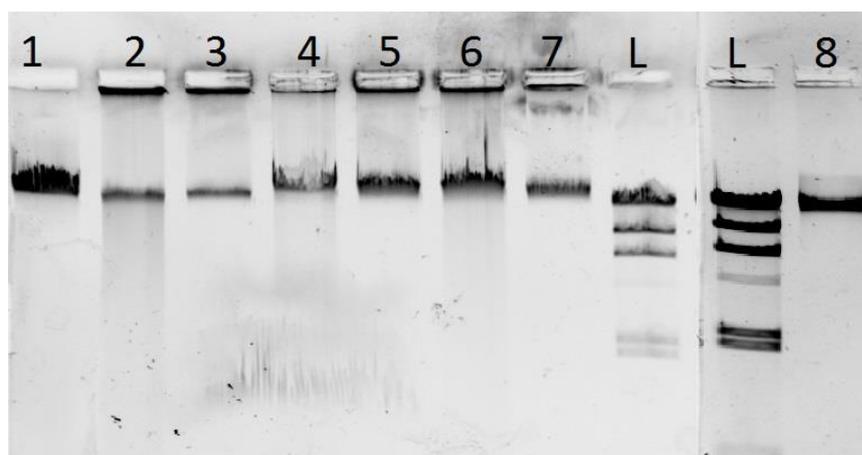


Рисунок 3.5. - Препараты нативных ДНК бактериофагов.

1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6 - SCH111; 7 - AM24; L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез в 0,8 % агарозном геле (трис-боратный буфер)

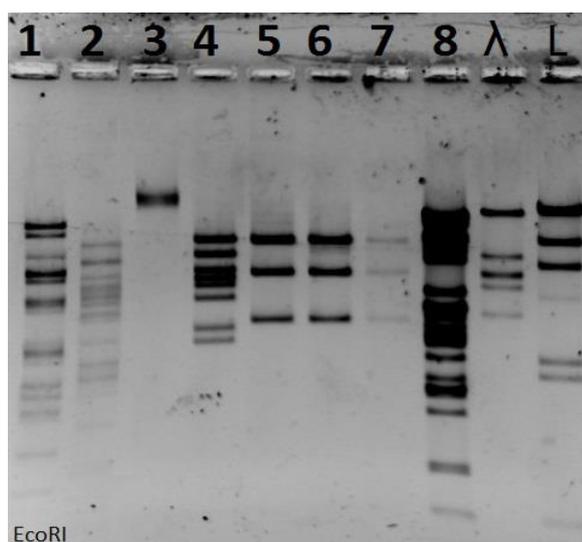


Рисунок 3.6. - Гидролиз ДНК бактериофагов рестриктазами EcoRI.

1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6, 7 - SCH111; 8 - AM24; λ - ДНК фага лямбда гидролизованная рестриктазой EcoRI (контроль рестрикции). L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез проводили в 1,0 % агарозном геле (трис-боратный буфер).

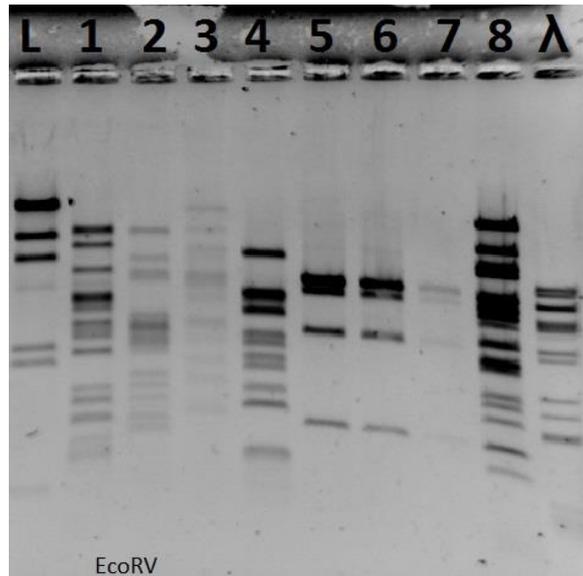


Рисунок 3.7. - Гидролиз ДНК бактериофагов рестриктазами EcoRV.
 1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6, 7 - SCH111; 8 - AM24; λ - ДНК фага лямбда гидролизованная рестриктазой EcoRV (контроль рестрикции).
 L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез в 1,0 % агарозном геле (трис-боратный буфер)

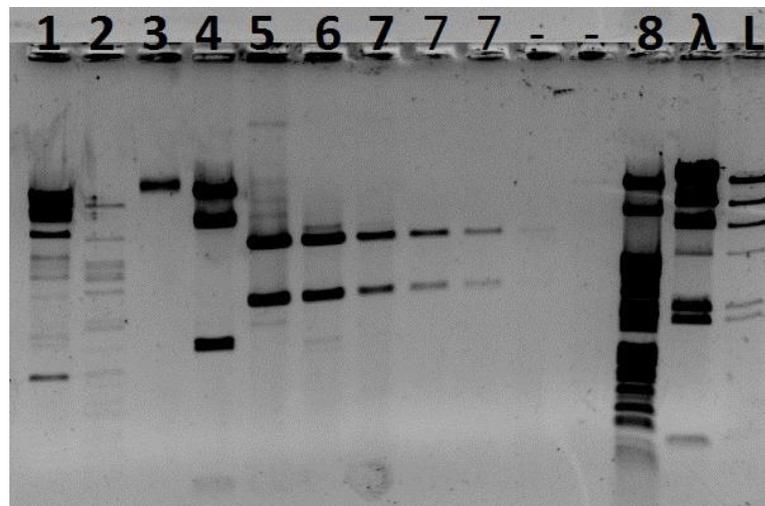


Рисунок 3.8. - Гидролиз ДНК бактериофагов рестриктазой HindIII.
 1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6, 7 - SCH111; 8 - AM24; λ - ДНК фага лямбда гидролизованная рестриктазой HindIII (контроль рестрикции).
 L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез в 1,0 % агарозном геле (трис-боратный буфер).

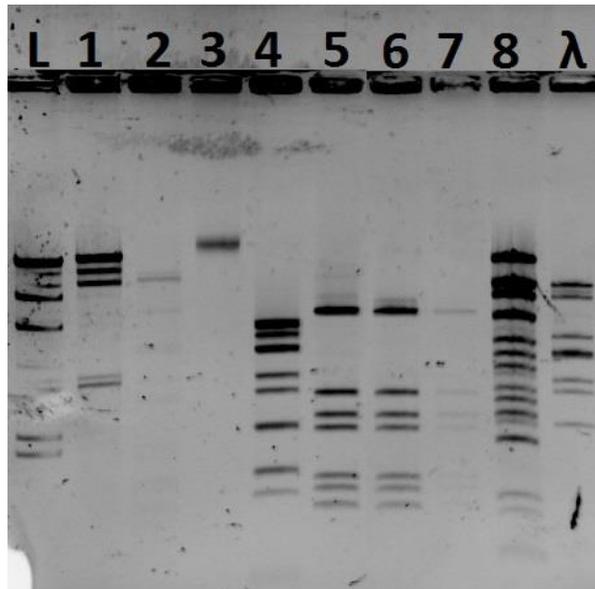


Рисунок 3.9. - Гидролиз ДНК бактериофагов рестриктазой KspAI. 1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6, 7 - SCH111; 8 - AM24; λ -ДНК фага лямбда гидролизованная рестриктазой KspAI (контроль рестрикции). L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез в 1,0 % агарозном геле (трис-боратный буфер).

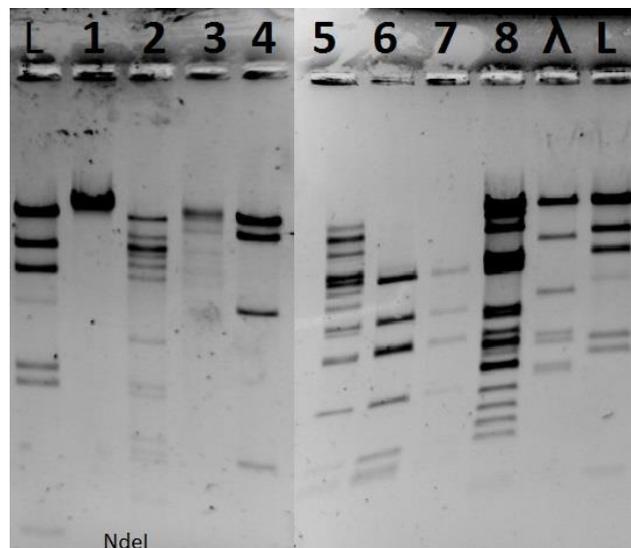


Рисунок 3.10. - Гидролиз ДНК бактериофагов рестриктазой NdeI. 1 - Pa5; 2 – Pa10; 3 - KPV15; 4 - KPV811; 5 - SCH1; 6, 7 - SCH111; 8 - AM24; λ - ДНК фага лямбда гидролизованная рестриктазой NdeI (контроль рестрикции). L – маркер молекулярных масс Lambda DNA/HindIII Marker (Fermentas-Thermo Scientific, #SM0102). Электрофорез в 1,0 % агарозном геле (трис-боратный буфер).

При исследовании ДНК бактериофагов SCH1 и SCH111 (*S. aureus*) получены специфические картины гидролиза эндонуклеазами рестрикции HindIII, EcoRV, EcoRI, KspAI, NdeI. Эти два препарата ДНК гидролизуются одинаково рестриктазами HindIII, EcoRV, EcoRI, KspAI. При гидролизе рестриктазой NdeI наблюдается присутствие дополнительных фрагментов для ДНК фага SCH1.

При исследовании ДНК бактериофагов Pa5 и Pa10 (*P. aeruginosa*) получены специфические картины гидролиза эндонуклеазами рестрикции EcoRI, KspAI, NdeI, EcoRV, HindIII. Эти два фага имеют значительные отличия при картировании указанными рестриктазами.

При исследовании ДНК бактериофага KPV811 (*K. pneumoniae*) получены специфические картины гидролиза эндонуклеазами рестрикции EcoRI, KspAI, NdeI, EcoRV, HindIII. ДНК фага KPV15 не гидролизуются рестриктазами EcoRI, KspAI, HindIII.

При исследовании ДНК бактериофага AM24 (*A. baumannii*) получены специфические картины гидролиза эндонуклеазами рестрикции EcoRI, KspAI, NdeI, EcoRV, HindIII.

Рестрикционный анализ ДНК бактериофага AP22, проведенный с использованием 28 эндонуклеаз рестрикции, показал, что ДНК фага расщепляется ферментами HindIII, DraI, VspI, SspI, TaqI, AluI, RsaI, HinfI, MspI, CfrI, EcoRI, частично гидролизуются EcoRV, PstI, Sall, XmiI, SmlI, ClaI, BamHI, PvuII, BglII, EcoR91I, NcoI, NheI и не гидролизуются ферментами SmaI, ApaI, NotI, DraII, Eco52I. Для определения размера генома фага AP22 проводили двойной и тройной гидролиз фаговой ДНК эндонуклеазами рестрикции NheI и PstI, SmlI и PstI, SmlI и EcoRV, NheI, EcoRV и PstI (рисунок 3.11).

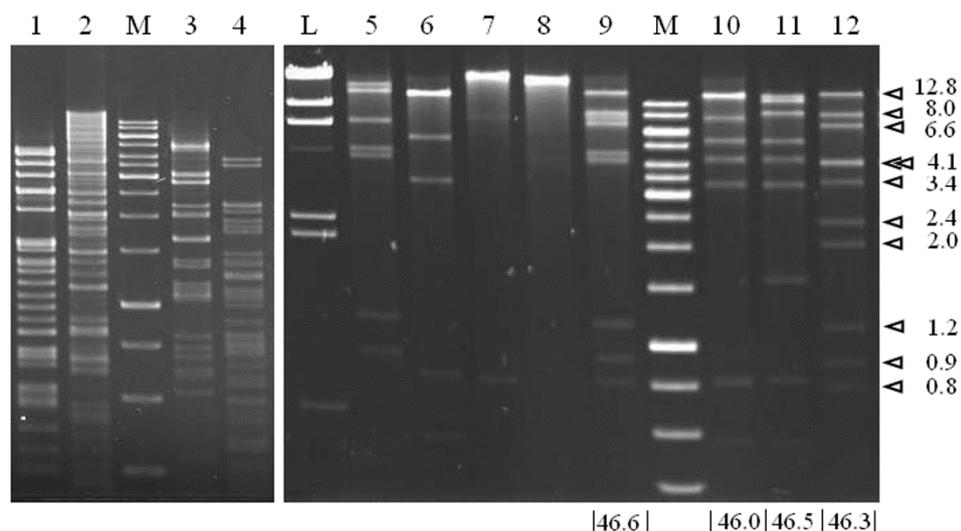


Рисунок 3.11. - Электрофореграммы продуктов гидролиза ДНК фага AP22 рестрикционными эндонуклеазами VspI (1), SspI (2), HindIII (3), DraI (4), NheI (5), SmlI (6), PstI (7), EcoRV (8), NheI и PstI (9), SmlI и PstI (10), SmlI и EcoRV (11), NheI, EcoRV и PstI (12, рестрикционные фрагменты отмечены треугольниками); L – гидролиз ДНК фага λ эндонуклеазой HindIII; M – маркер молекулярных масс 1-kb DNA Ladder (Fermentas, Литва). Сумма размеров рестрикционных фрагментов (для 9-12) указана в kb.

3.2.2 Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов, биоинформатический анализ

На первом этапе исследования проведена пробоподготовка образцов для секвенирования, включающая оценку качества и количества выделенной геномной ДНК бактериофагов, создание баркодированных геномных библиотек (фрагментация исходной геномной ДНК до участков определенного размера, лигирование полученных фрагментов с Ion P1-адаптером и соответствующим баркодом для дифференцирования последовательностей геномов разных фагов, секвенированных на одном чипе) с использованием набора Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США), очистку сшитых с адаптером и баркодом фрагментов с использованием магнитных частиц Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, США), отбор их по размеру с использованием системы E-gel Size-select (Thermo Fisher Scientific Inc., США),

оценку количества полученных геномных библиотек, постановку клональной амплификации библиотек методом эмульсионной ПЦР на автоматизированной системе OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и обогащение субстрата для секвенирования с помощью модуля Ion One Touch™ ES (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно инструкциям производителя. Непосредственно секвенирование проводили на полупроводниковом секвенаторе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием микрочипов 314™ и набора реактивов Ion PGM Sequencing Kit 400 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно инструкции производителя.

В результате секвенирования был получен набор фрагментов нуклеотидных последовательностей геномов семи бактериофагов, входящих в препарат для контроля нозокомиальных инфекций: AM24, инфицирующего *A. baumannii*, PA-10 и PA-5, инфицирующих *P. aeruginosa*, KpV15 и KpV811, инфицирующих *K. pneumoniae*, SCH1 и SCH111, инфицирующих *S. aureus*.

Сборку геномов в режиме de-novo проводили с использованием ассемблера GS De Novo Assembler v. 2.6 из программного пакета Newbler (Roche Diagnostics, Германия). Проверку качества сборки проводили методом выравнивания прочтений на референсную последовательность, собранную de-novo, с использованием алгоритма Bowtie2 в программном обеспечении UGENE (Unipro, Россия). Далее проводили аннотирование полученных контигов с использованием программного обеспечения Prokka с пороговым значением e-value равным 10^{-6} и известными аминокислотными последовательностями ранее аннотированных бактериофагов из базы данных GenBank. Аннотированные геномы бактериофагов проверяли на наличие известных генов, кодирующих интегразы и факторы антибиотикорезистентности бактерий в «ручном» режиме. Результаты по сборке и аннотирования геномов представлены в таблице 3.13.

Геномы исследованных бактериофагов были представлены дцДНК размером от 18 т.п.н. до 167 т.п.н. с Г-Ц составом от 29,34% до 55,49%. При этом гены, кодирующие интегразы и факторы антибиотико-резистентности бактерий среди найденных открытых рамок считывания не были обнаружены.

Следует отметить, что ДНК еще одного бактериофага, включенного в состав лечебно-профилактического продукта, - *Acinetobacter baumannii* AP22 секвенирована ранее с использованием метода Сэнгера на приборах ABI PRISM 310 (Applied BioSystem, США) и MegaBace (Amersham Biosciences, США). Нуклеотидная последовательность генома AP22 депонирована в Европейскую базу данных EMBL под номером HE806280 и базу данных GenBank под номером NC_017984. Геном бактериофага AP22 представлен двухцепочечной ДНК размером 46387 п.н. с Г-Ц составом 37,74 %. С помощью биоинформационных программ GeneMark.hmm и Soft-Berry FGENE в геноме фага AP22 выявлено 89 открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих предполагаемые пептиды размером не менее 35 а.о., из которых 77 ОРС располагаются на прямой, 12 – на обратной цепях ДНК. ОРС организованы как минимум в 17 транскрипционных единиц, определенных с помощью биоинформационной программы GeneMark.hmm.

Таблица 3.13 – Характеристика геномов бактериофагов

Фаг	Размер генома, п.н.	GC-состав, %	Количество ОРС	Наличие генов интеграз, факторов антибиотико-резистентности бактерий
PA5	66182	55,49	101	нет
PA10	91212	49,30	127	нет
SCH1	18023	29,34	21	нет
SCH111	18018	29,35	22	нет
KpV15	167034	39,52	299	нет
KpV811	42641	51,35	43	нет
AM24	97177	37,26	166	нет
AP22	46387	37,74	89	нет

3.2.3. Определение степени гомологии секвенированных фаговых геномов с геномами известных бактериофагов, представленных в международных базах данных

Первоначально таксономическую принадлежность бактериофагов определяли с использованием программного пакета BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), алгоритмов blastn и megablast, позволяющих провести поиск как высоко гомологичных нуклеотидных последовательностей, так и частичных гомологов, представленных в международных базах данных GenBank/EMBL-EBI/DDBJ).

Для определения уникальности геномов бактериофагов, включенных в состав лечебно-профилактического продукта, проводили исследование средней нуклеотидной идентичности (англ. average nucleotide identity – ANI) используя онлайн средства для расчета ANI, разработанный Rodriguez-R LM и Konstantinidis KT в 2016 году (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>) [196], и OrthoANIu, разработанный Yoon SH с соавт. в 2017 году (<https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoaniu>) [238]. Результаты определения таксономической принадлежности и уникальности геномов представлены в таблице 3.14.

Для подтверждения таксономической принадлежности геномов бактериофагов, включенных в состав лечебно-профилактического продукта, проводили их множественное полногеномное выравнивание с известными бактериофагами, имеющими одинаковую родовую принадлежность. Полногеномное выравнивание и генерирование информации для построения филогенетических деревьев проводили с использованием алгоритма progressiveMauve (Darling A.E. et. al., 2010) [84], построение филогенетических деревьев проводили в программном обеспечении Geneious Prime (Biomatters Ltd., Новая Зеландия).

Таблица 3.14 – Таксономическая принадлежность и уникальность бактериофагов

Наименование бактериофага (номер депонирования в Genbank)	Известный родовой бактериофаг (номер депонирования в GenBank)	Таксономическая принадлежность (классификация ICTV 2021, Email ratification March 2022 (MSL #37))	ANI к известному родовому фагу (Rodriguez-R и Konstantinidis, 2016)	OrthoANIu к известному родовому фагу (Yoon SH et al., 2017)
<i>Staphylococcus phage SCH1</i> (KY000084.1)	<i>Staphylococcus phage 44AHJD</i> (NC_004678.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; семейство <i>Rountreeviridae</i> ; подсемейство <i>Rakietenvirinae</i> ; род <i>Rosenblumvirus</i>	88,87%	90,13%
<i>Staphylococcus phage SCH111</i> (KY000085.1)	<i>Staphylococcus phage 44AHJD</i> (NC_004678.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; семейство <i>Rountreeviridae</i> ; подсемейство <i>Rakietenvirinae</i> ; род <i>Rosenblumvirus</i>	88,87%	90,15%
<i>Pseudomonas phage PA5</i> (KY000082.1)	<i>Pseudomonas phage PB1</i> (NC_011810.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; род <i>Pbunavirus</i>	90,36%	90,28%
<i>Pseudomonas phage PA10</i> (KY000083.1)	<i>Pseudomonas phage PaP1</i> (NC_019913.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; род <i>Pakpunavirus</i>	93,55%	93,39%
<i>Klebsiella phage KPV811</i> (KY000081.1)	<i>Klebsiella phage KP34</i> (NC_013649.2)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; семейство <i>Autographiviridae</i> ; подсемейство <i>Slopekvirinae</i> ; род <i>Drulisvirus</i>	82,5%	80,89%
<i>Klebsiella phage KPV15</i> (KY000080.1)	<i>Klebsiella phage JD18</i> (NC_028686.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; семейство <i>Straboviridae</i> ; подсемейство <i>Tevenvirinae</i> ; род <i>Jiaodavirus</i>	95,49%	95,66%
<i>Acinetobacter phage AP22</i> (NC_017984.1)	Не применимо	Класс <i>Caudoviricetes</i> ; род <i>Obolenskivirus</i>	Не применимо	Не применимо
<i>Acinetobacter phage AM24</i> (KY000079.2)	<i>Acinetobacter phage YMC13/03/R2096</i> (KM672662.1)	Класс <i>Caudoviricetes</i>	95,46%	94,85%

Ниже представлены результаты анализа, проведенного по каждому фагу, с использованием наиболее близких бактериофагов, размещенных на момент получения нуклеотидных последовательностей (фаги KPV811, PA5, PA10) и к настоящему времени (фаги KPV15, SCH1, SCH111, AP22, AM24) в международных базах данных, у которых выявлены протяженные участки гомологии.

Бактериофаг KPV811. Наиболее близкими по нуклеотидному составу гомологами являлись клебсиеллезные бактериофаги семейства *Autographiviridae* (ранее *Podoviridae*), рода *Drulivirus*: NTUH-K2044-K1-1 (gb|AB716666.1|), KP34 (gb|GQ413938.2|) vB_KpnP_SU552A (gb|KP708986.1|), vB_KpnP_SU503 (gb|KP708985.1|) и F19 (gb|KF765493.2|) (рисунок 3.12). В настоящее время известно по меньшей мере 60 бактериофагов рода *Drulivirus* с полногеномной последовательностью.

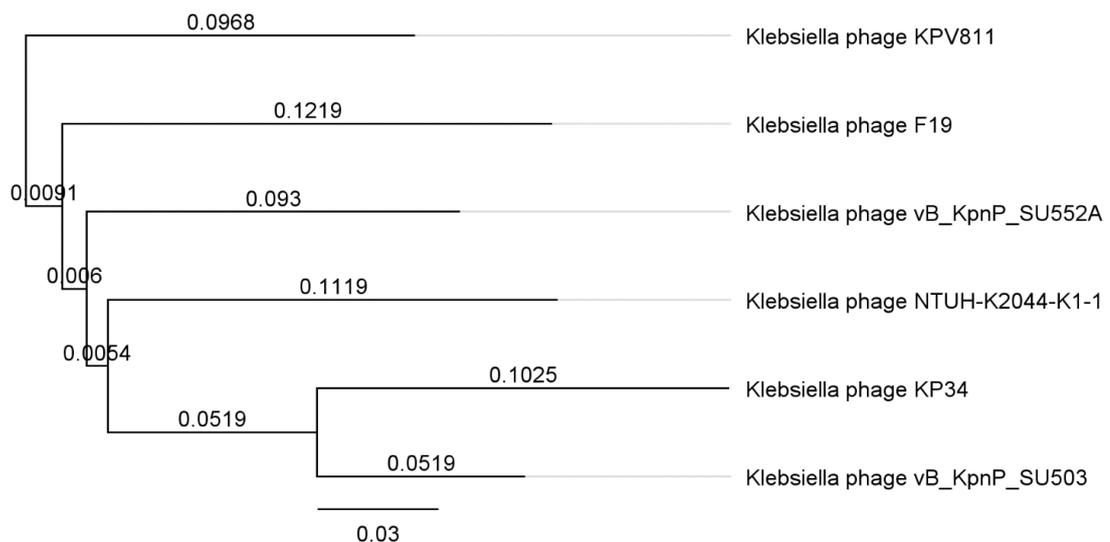


Рисунок 3.12 – Филогенетическое дерево близких гомологов фага KPV811 из рода *Drulivirus*.

Бактериофаг KPV15. На момент получения нуклеотидных последовательностей только 3742 п.н. фага KPV15 из 167037 (2,2 %) на 99 % гомологичны нуклеотидным последовательностям гена *gp17* клебсиеллезного бактериофага KPP95 (gb|AY538772.1|). Однако, в последние годы были выделены по меньшей мере 31 бактериофаг, геномы которых гомологичны фагу KPV15 (рисунок 3.13).

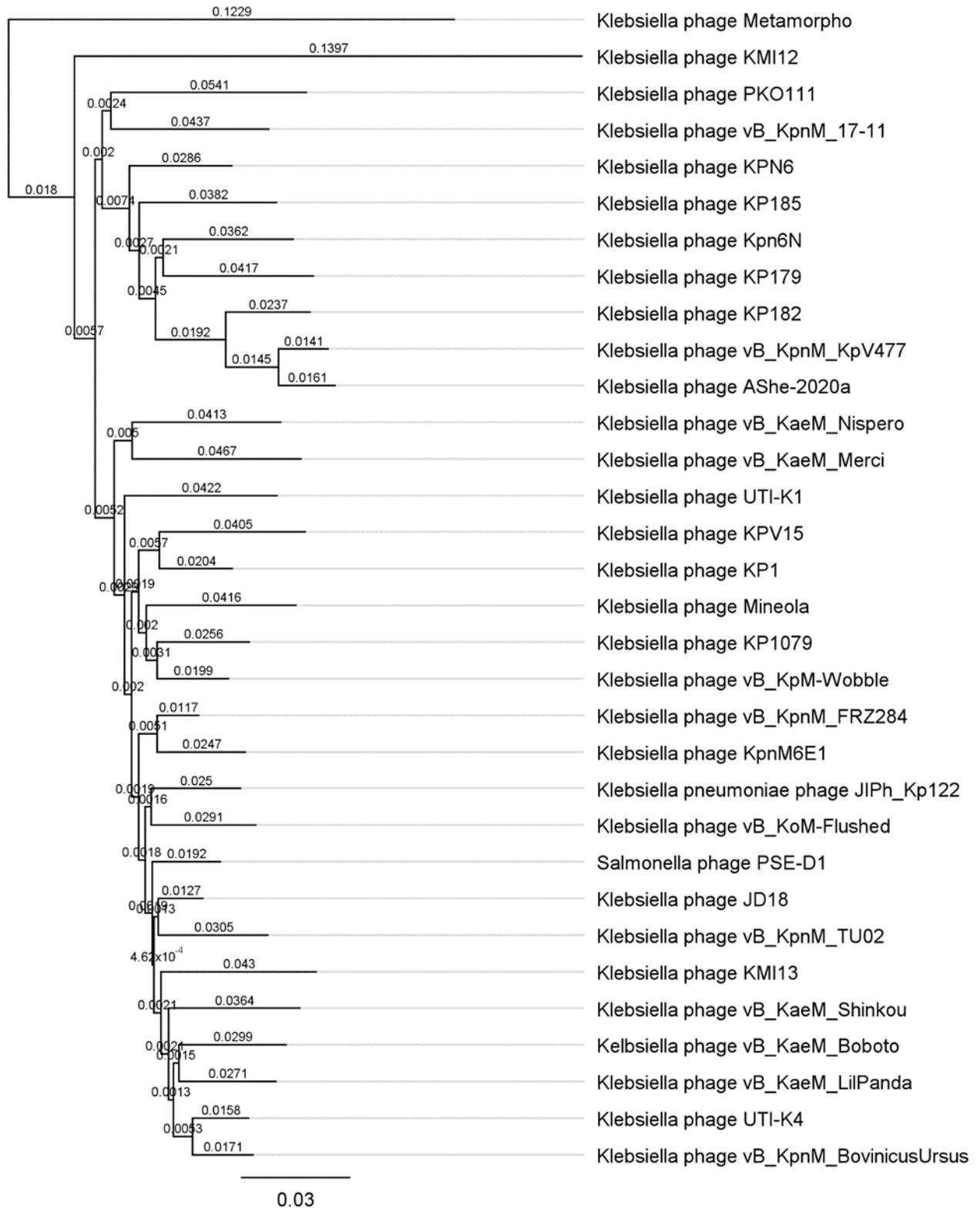


Рисунок 3.13 – Филогенетическое дерево близких гомологов фага KPV15 из рода *Jiaodavirus*.

Бактериофаг PA5. В геноме фага PA5 выявлены протяженные участки гомологии (идентичность до 94 %) с псевдомонадными бактериофагами семейства *Myoviridae* рода *Pbunavirus*: vB_PaeM_PAO1_Ab27 ([embLN610579.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/embLN610579.1)), KPP12

([dbj|AB560486.1|](#)) и LBL3 ([emb|FM201281.1|](#)), а также еще с 10 фагами с идентичностью не выше 90 %. В настоящее время в базе данных NCBI Genbank депонировано по меньшей мере 143 полногеномных нуклеотидных последовательности бактериофагов этого рода.

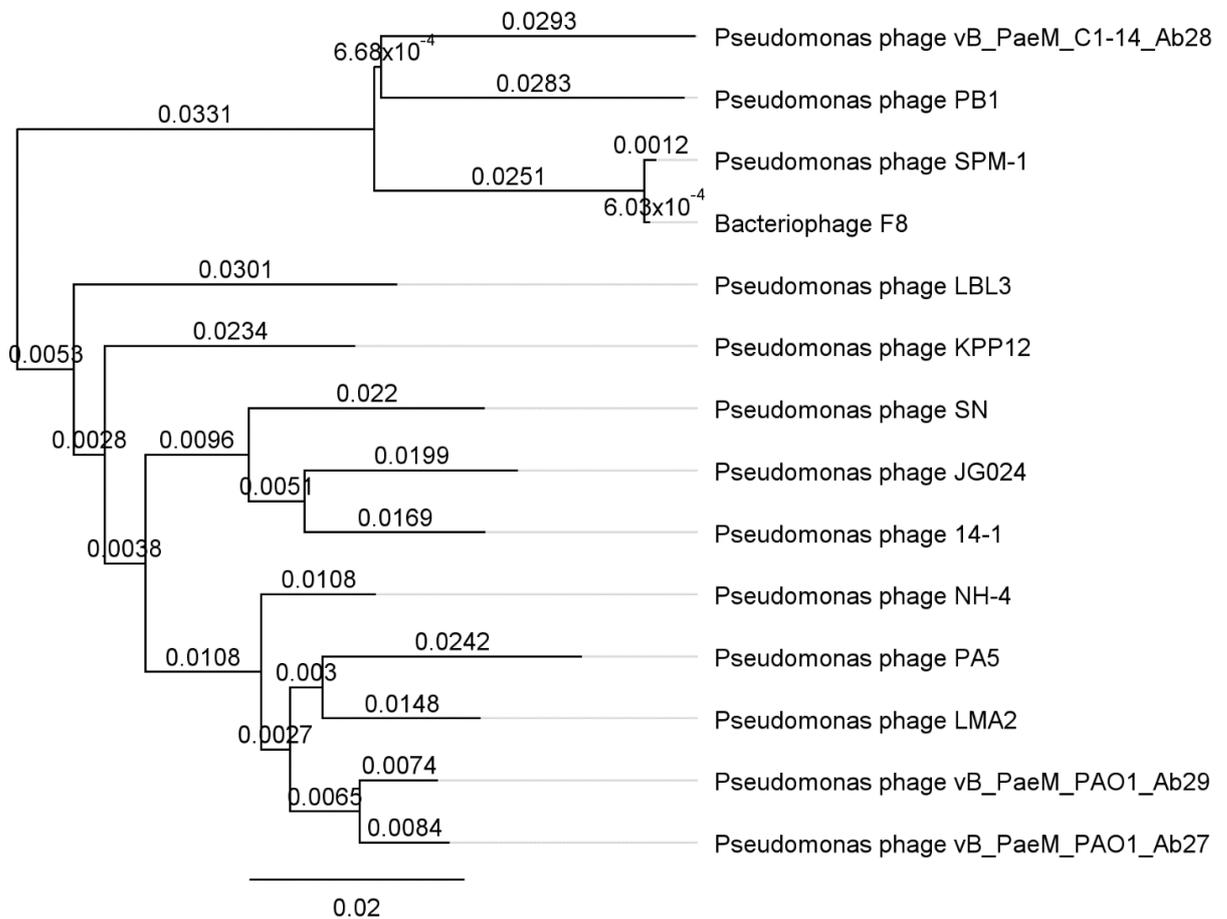


Рисунок 3.14 – Филогенетическое дерево близких гомологов фага PA5 из рода *Pbunavirus*.

Бактериофаг PA10. На момент получения нуклеотидных последовательностей были известны десять псевдомонадных бактериофагов, в том числе: JG004 ([gb|GU988610.2|](#)), PaP1 ([gb|HQ832595.1|](#)), PAK_P1 ([gb|KC862297.1|](#)), vB_PaeM_C2-10_Ab1 ([gb|HE983845.1|](#)), vB_PaeM_C2-10_Ab02 ([gb|LN610572.1|](#)) и vB_PaeM_C2-10_Ab10 ([gb|LN610586.1|](#)), в геномах которых имелись протяженные участки гомологии с геномом фага PA10 (рисунок 3.15). Эти бактериофаги в настоящее время включены в состав рода *Pakpunavirus* из семейства *Myoviridae*. В настоящее время в базе данных NCBI Genbank депонировано по меньшей мере 39 полногеномных нуклеотидных последовательностей бактериофагов этого рода.

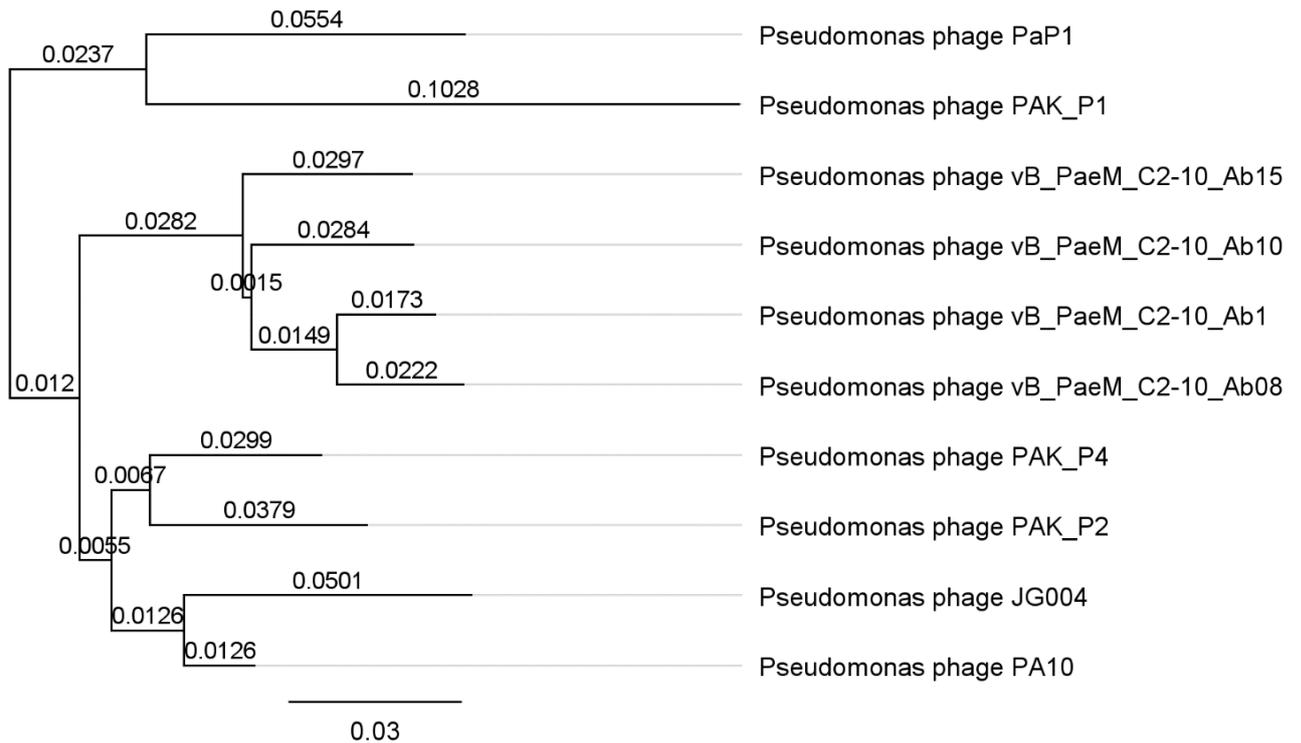


Рисунок 3.15 – Филогенетическое дерево близких гомологов фага PA10 из рода *Pakpnavirus*.

Бактериофаги SCH1 и SCH111. Бактериофаги SCH1 и SCH111 отличаются по спектру литического действия. Вместе с тем, при секвенировании оказалось, что геномы фагов на 99 % идентичны. Наиболее близкими по нуклеотидному составу гомологами этих фагов на момент получения нуклеотидных последовательностей являлись стафилококковые бактериофаги семейства *Rountreeviridae* (ранее *Podoviridae*), рода *Rosenblumvirus*: S13' ([dbj|AB626963.1](https://dbj.dl.ac.uk/AB626963.1)) – идентичность в пределах 94 %, 66 ([gb|AY954949.1](https://gb.dl.ac.uk/AY954949.1)) – 91 %, phiP68 ([gb|AF513033.1](https://gb.dl.ac.uk/AF513033.1)) – 90 %, а также ряд фагов с меньшей ДНК-гомологией. В настоящее время депонировано по меньшей мере 30 полногеномных нуклеотидных последовательностей бактериофагов этого рода (рисунок 3.16).

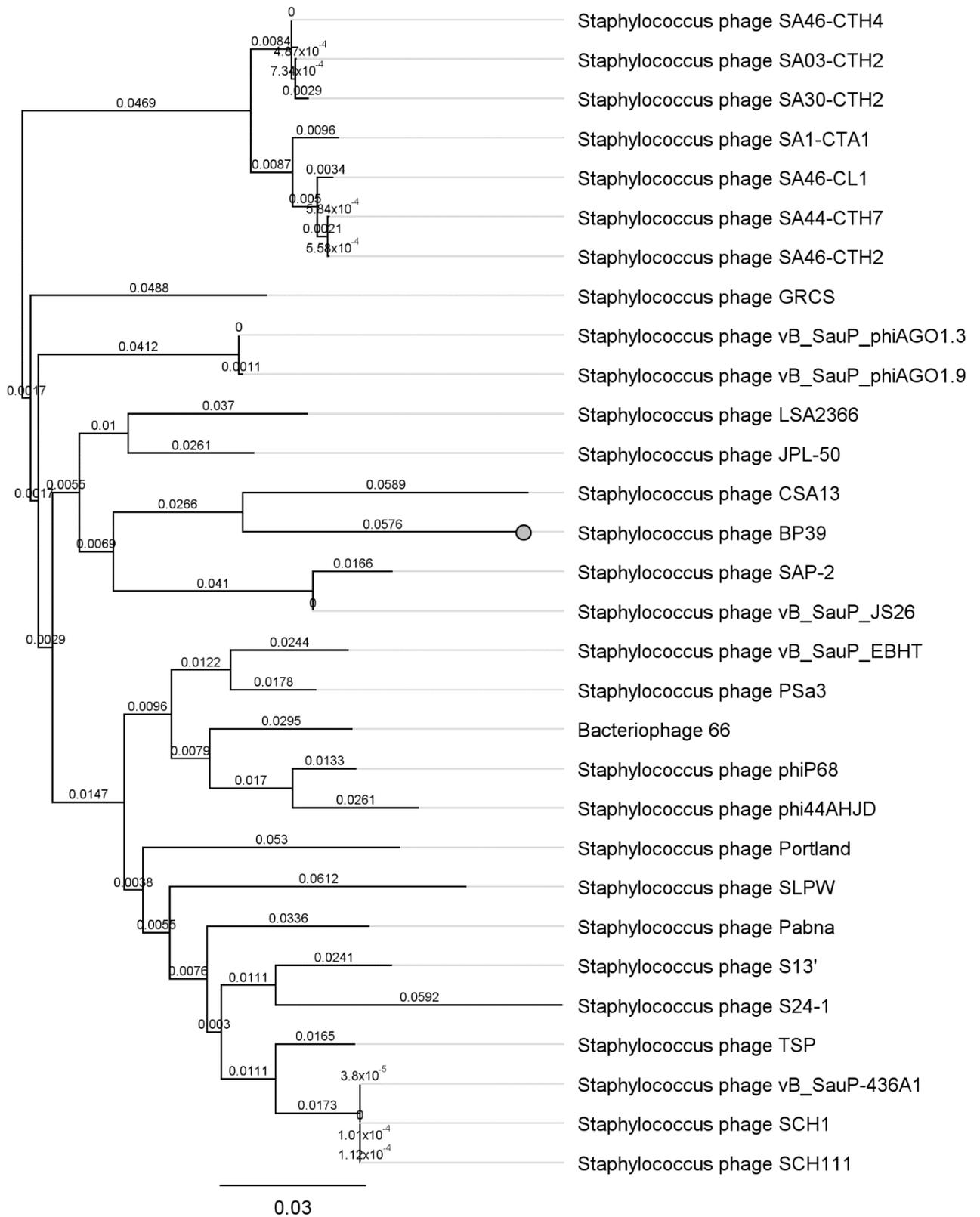


Рисунок 3.16 – Филогенетическое дерево близких гомологов фагов SCH1 и SCH111 из рода *Rosenblumvirus*.

Бактериофаг AM24. В настоящее время геномы бактериофага AM24 и его гомологов формируют филогенетическую группу из пяти представителей (рисунок

3.17). На момент получения нуклеотидных последовательностей фага AM24 был известен единственный бактериофаг YMC13/03/R2096 ([gb|KM672662.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/gb|KM672662.1|)), в геноме которого выявлены протяженные участки гомологии.

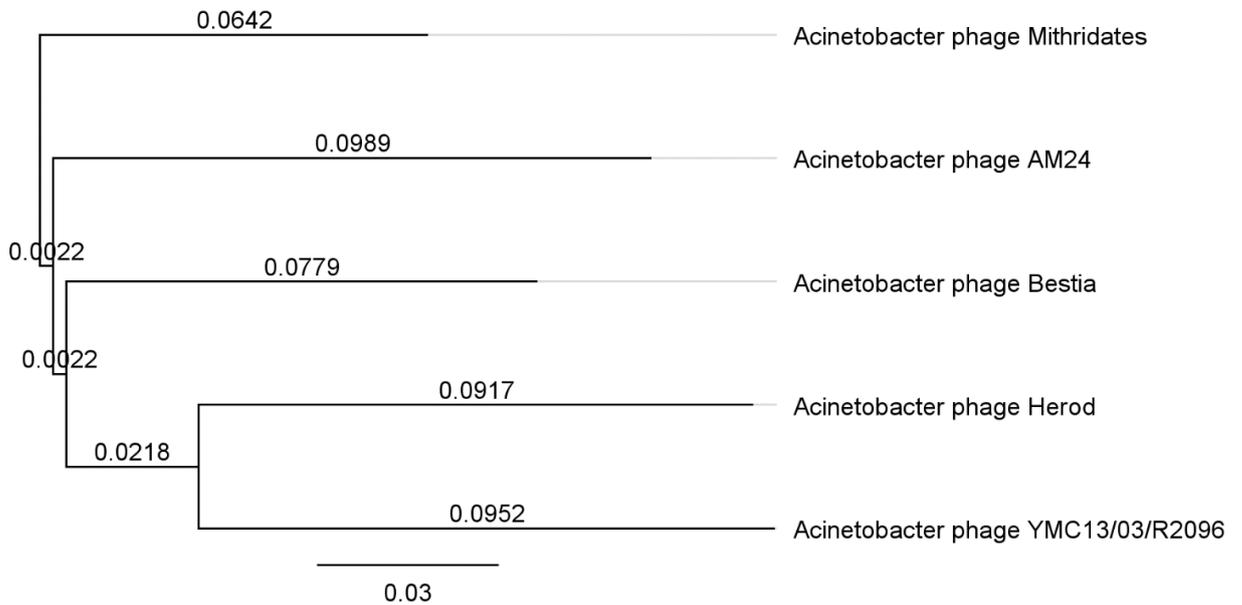


Рисунок 3.17 – Филогенетическое дерево близких гомологов фагов AM24.

Бактериофаг AP22. Наиболее близким гомологом фага AP22 на момент разработки лечебно-профилактического продукта являлся бактериофаг AB1 ([gb|HM368260.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/gb|HM368260.1|)): 92 % гомологии в пределах 50 % генома. Геномы еще пяти бактериофагов имели значимые участки (в пределах 47-48 % геномов) фрагментарной гомологии с геномом AP22. В настоящее время в бактериофаг AP22 является типовым представителем рода *Obolenskivirus*, в который входят по меньшей мере 24 известных фага (рисунок 3.18).

Таким образом, проведенные исследования показали, что все изучаемые бактериофаги являлись уникальны. Среди выявленных в базах данных гомологов на момент получения нуклеотидных последовательностей бактериофагов, включенных в состав ЛПП, нет было ни одного с полной или фрагментарной гомологией, превышающей 96 %.

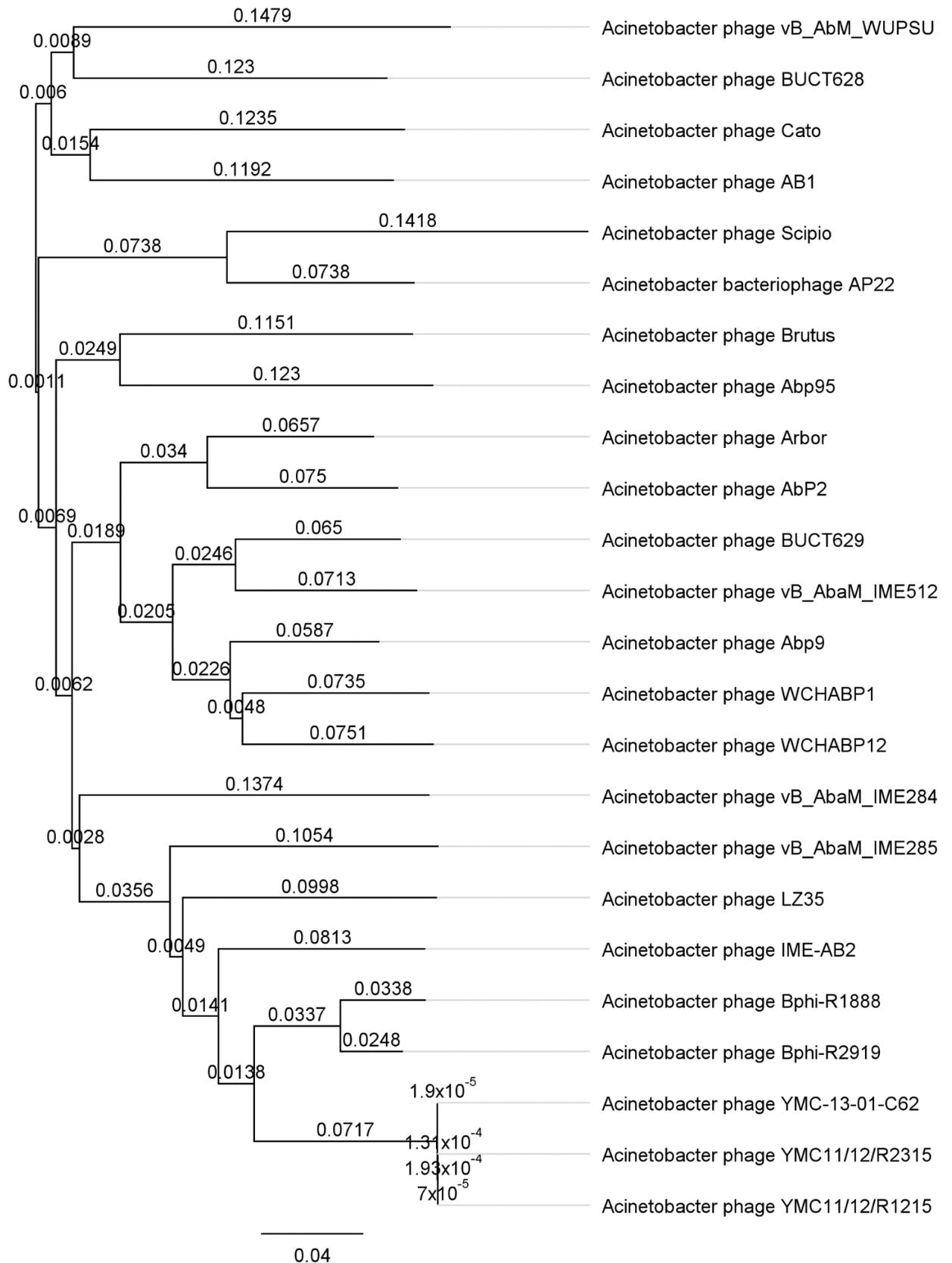


Рисунок 3.18 – Филогенетическое дерево близких гомологов фага AP22 из рода *Obolenskvirus*.

3.2.4. Выявление бактериальных генов вирулентности в геномах бактериофагов

Для выявления генов вирулентности в геномах бактериофагов использовали программу blastx ресурса NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с анализом в «ручном» режиме, а также автоматический поиск с использованием программы VirulenceFinder (порог идентичности – 90 %) Центра геномной эпидемиологии (<http://www.genomicerpidemiology.org/>). В качестве примера на рисунок 3.19 представлены результаты определения генов вирулентности одного из бактериофагов, сгенерированные программой VirulenceFinder. Аналогичные результаты, свидетельствующие об отсутствии бактериальных факторов патогенности, получены при анализе геномов остальных семи бактериофагов.

Анализ белковых гомологов, выявленных среди транслированных в программе blastx аминокислотных последовательностей бактериофагов, также не выявил каких-либо генов, кодирующих токсины, адгезины, инвазины, а также фрагменты так называемых «островков патогенности».

VirulenceFinder-1.2 Server - Results

SETTINGS:
Selected %ID threshold: 90.00

S. aureus - Adherence
No virulence factors found.

S. aureus - Toxin
No virulence factors found.

S. aureus - Exoenzyme
No virulence factors found.

S. aureus - Host Immune evasion
No virulence factors found.

S. aureus - Secretion system
No virulence factors found.

extended output

Results as text Results tab separated Hit in genome sequences Virulence gene sequences

Input Files: *phage_SCH1_final-v1.txt*

Рисунок 3.19 – Выявление потенциальных генов вирулентности в геноме бактериофага SCH1 с использованием программы VirulenceFinder. Отмечено отсутствие факторов вирулентности «No virulence factors found».

Таким образом, при использовании двух алгоритмов поиска ни в одном из геномов бактериофагов, включенных в состав ЛПП, не обнаружено генов или фрагментов генов, детерминирующих синтез бактериальных факторов вирулентности.

3.2.5 Оценка характера взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой

Большое значение для бактериофагов – кандидатов в ЛПП имеет определение характера взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой: литический (вирулентный) или умеренный (интегративный) тип развития. С достаточной степенью достоверности это позволяет сделать биоинформационный анализ фаговых геномов.

С использованием ресурсов RAST-сервера (<http://rast.nmpdr.org/>) во всех фаговых геномах были определены открытые рамки считывания (потенциальные гены), кодируемые ими полипептиды, а также предсказаны функции полипептидов, имеющих гомологию с известными белками.

Анализ полученных данных показал, что ни в одном из геномов не обнаружены гены, кодирующие ферменты, необходимые для интеграции фагового генома в бактериальную хромосому, т.е. белки, определяющие умеренный (интегративный) путь развития бактериофага: интегразы, инвертазы, репрессорные белки.

Следует отметить, что при оценке степени гомологии секвенированных фаговых геномов с геномами известных бактериофагов, наиболее близкие гомологи являлись вирулентными фагами. Этот факт также является подтверждением вирулентного типа развития исследуемых нами фагов. Таким образом, биоинформационный анализ геномов бактериофагов, включенных в состав ЛПП, предполагает литический (вирулентный) тип взаимодействия исследуемых фагов с бактериальной клеткой.

3.3. Разработка состава и технологии получения раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов и инъекционного раствора

Для разработки методики персонализированной фаготерапии было необходимо разработать универсальные составы двух ЛФ: раствора для приема внутрь и местного применения (РПВМП) и инъекционного раствора (ИР). Под «универсальным» составом ЛФ мы понимали составы, которые при включении в них различных коктейлей бактериофагов не потребуют изменения количественного и качественного соотношения эципиентов. Технология получения жидкой субстанции фага отработана и описана в патенте РФ 2424141 «Способ получения бактериофага».

В состав универсальных ЛФ предполагается вводить бактериофаги из коллекции бактериофагов лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, приведенные в разделе «Материалы и методы». Для получения фаголизата (субстанции) и ЛФ используют лиофилизированные штаммы бактерий-хозяев, на которых культивируют бактериофаги, и лиофилизаты стартерных (матричных) культур бактериофагов. В качестве примеров таких ЛФ рассмотрим технологию получения РПВМП с коктейлем бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 (на примере которого изучена острая и хроническая токсичность), РПВМП с коктейлем бактериофагов KpV15, KpV811 и РПВМП с коктейлем бактериофагов PA5, PA10 (использованы для лечения конкретных больных, их применение описано в главе V).

Технология получения этих составов аналогична и складывается из следующих этапов:

BP-1. Водоподготовка, то есть подготовка или получение воды для инъекции.

BP-2. Подготовка производства, которая складывается из стадий подготовки дезинфицирующих растворов для санитарной обработки, помещений, оборудования и персонала.

BP-3. Подготовка сырья и материалов: мойка, сушка и стерилизация флаконов и укупорочного материала, получение и стерилизация изотонического

раствора хлорида натрия с рН 7,1±2. Подготовка и стерилизация питательных сред (МПА, МПБ, Сабуро).

ТП-4. Получение фаголизата.

ТП 4.1 Получение ночной (18-ти часовой) культуры штамма-хозяина для каждого фага, входящего в состав коктейля для получения лекарственной формы. Для этого флакон с лиофилизированной культурой вскрывают асептически, содержимое растворяют в изотоническом растворе хлорида натрия и полученную взвесь микробных клеток наносят на чашку Петри с плотной питательной средой для получения одиночных колоний. Культивируют при 37°C в течение 24 ч. одиночные колонии секторами пересевают на чашку Петри с питательной средой. Культивируют сутки при 37°C. Бактериальные культуры 2-го пассажа, выросшие на плотной питательной среде, микробиологической петлей засевают в МПБ, разлитый по 4,5 мл из расчета, одна пробирка на одну матрасную колбу. Посеянные таким образом индикаторные штаммы культивируют в термостате 18 ч при 37°C, через 18 ч экспозиции достигая 10^8 - 10^9 КОЕ/мл.

ТП 4.2. Нанесение штамма-хозяина на поверхность плотной питательной среды. В матрасные колбы с плотным питательным агаром толщиной слоя от 10 мм до 25 мм вносят 18-ти часовую культуру штамма-хозяина с соблюдением всех правил асептики. Раскатывают культуру по всей поверхности питательной среды, создавая монослой. Стерильной микробиологической пипеткой удаляют лишнюю жидкость. Культивируют в течение 3,5 ч.

ТП 4.3. Нанесение маточного (стартерного) штамма бактериофага. В образовавшийся газон культуры вносят стерильной микробиологической пипеткой 2 мл одноименного (маточного) бактериофага в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл. Для этого флакон с лиофильно высушенным штаммом бактериофага асептически вскрывают и растворяют в 2 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия и затем переносят в матрас. Соотношение посевной культуры и бактериофага составляет 100 клеток к 1 вирусной частице. Инкубируют в течение 13-15 ч для роста культуры штамма-хозяина и одноименного бактериофага.

ТП 4.4. Сбор бактериофага. В матрас в асептических условиях вносят физиологический раствор с рН 7,0-7,2 в количестве 0,04-0,045 мл на 1 см² и производят смыв фага с поверхности питательного агара. Стерильной микробиологической пипеткой собирают жидкую фракцию и переносят в стерильные центрифужные пробирки. Для освобождения фаголизата от нелизированных бактерий в пробирки добавляют хлороформ из расчета 1/10. Экспонируют полученную суспензию 30 мин при непрерывном шуттелировании, центрифугируют 30 мин при 5000 – 6000 об/мин. Собирают полученный супернатант в стерильную емкость.

ТП 4.5-4.6. Очистка фаголизата проводится в две стадии: двухстадийная стерилизующая фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и затем через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и очистка от эндотоксинов на хроматографической колонке типа Endo Trap HD (Hyglos GmbH, Германия) согласно инструкции производителя с использованием буфера, разработанного этой фирмой.

ТП-5. Получение ЛФ, которое складывается из сведения бактериофагов, входящих в состав коктейля, и разведения стерильным 0,9% раствором натрия хлорида до титра не менее 10^7 для каждого бактериофага.

УМО-6. Фасовка и упаковка раствора. Раствор разливают в асептических условиях по 20,6 мл во флакон, укупоривают резиновыми пробками и вальцуют алюминиевыми колпачками, наносят этикетку с указанием даты производства и серии.

Таким образом, в состав ЛФ входит только фаговый коктейль и изотонический раствор. Так как при этом составе обеспечивается стабильность ЛФ, что подтверждено исследованиями, описанными ниже, посчитали нецелесообразным усложнять состав препарата.

Пример технологической схемы РПВМП приведён на рисунке 3.20.

В качестве примеров инъекционных растворов получали раствор для инъекций с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, АМ24, АР22 и раствор для

инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111, которые также использовали для персонализированной фаготерапии, описанной в главе V.

Технология получения лекарственных форм совпадает с технологией растворов для приема внутрь и местного применения кроме методов очистки.

После пункта ТП 4.6 осуществляют стадии:

ТП 4.7. Ультрацентрифугирования с хлоридом цезия. Бактериофаг центрифугируют в градиенте плотности CsCl (распределяя плотности сверху вниз в следующем порядке 1,45, 1,50 и 1,70 г/мл) с использованием ультрацентрифуги ОПТИМА XE-100, ротора SW 32 Ti и пробирок UC 25×89 мм (Beckman Coulter, США) при ускорении $87000\times g$, температуре 4°C в течение 2 ч. Фракцию между плотностями 1,45 и 1,5 г/мл собирают при помощи стерильных шприцов [197].

ТП 4.8. Диализ. Собранную фракцию переносят в диализные мешки OrDial D14, размер пор 12-14 кДа (Orange Scientific, Бельгия) и проводят диализ в 0,9% растворе NaCl pH 7,2-7,4.

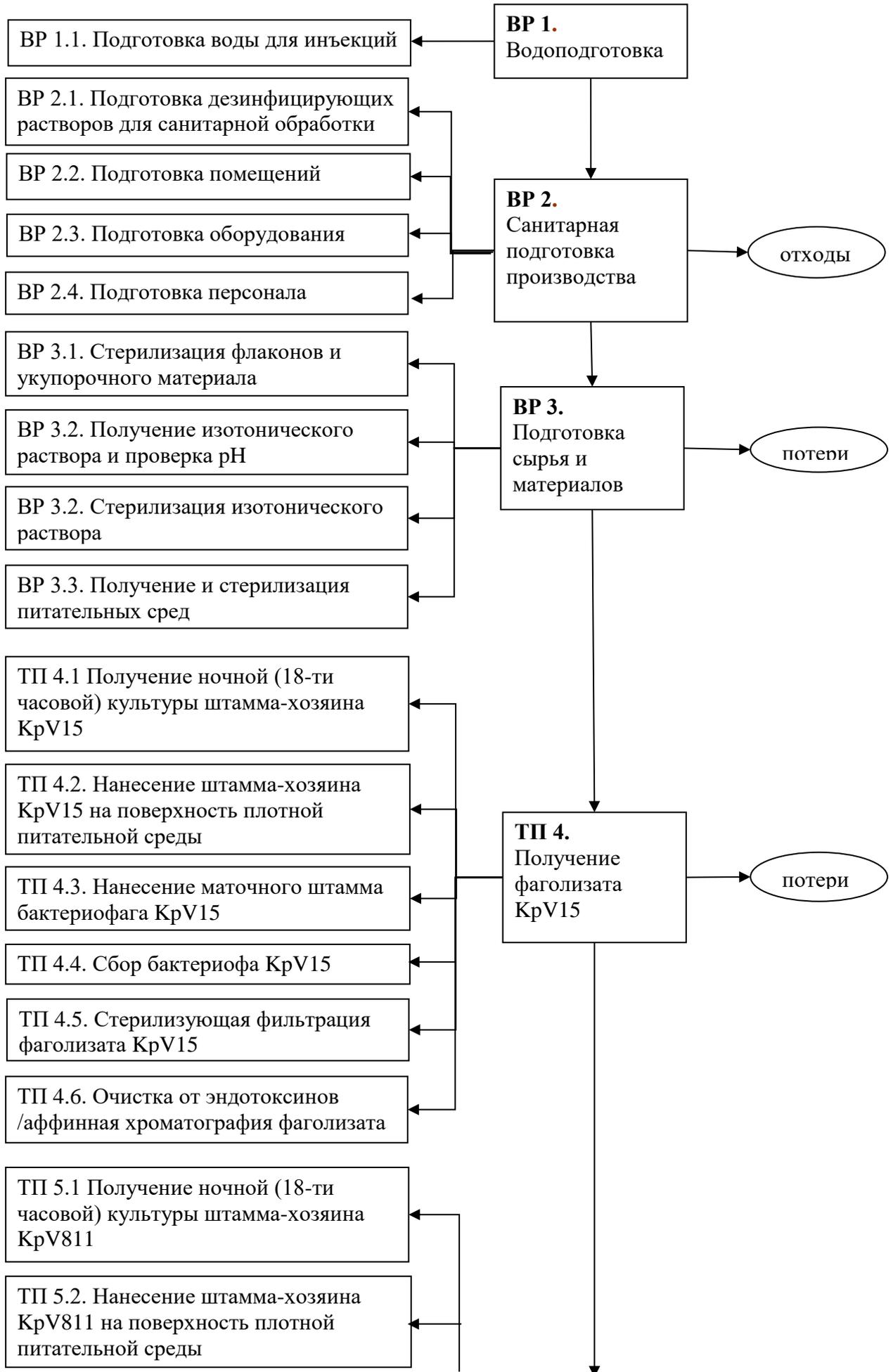
ТП 4.9. Полученный диализат стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм с мембраной PES (Millipore, США).

Остальные стадии совпадают с технологией получения раствора для приема внутрь и местного применения.

Пример технологической схемы получения раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов представлен на рисунке 3.21.

Состав раствора для инъекции также состоит из коктейля бактериофагов и изотонического раствора натрия хлорида.

Универсальная схема производства ЛФ бактериофагов, а также процедуры контроля качества продукта на всех этапах производственного цикла, приведена на рисунке 3.22.



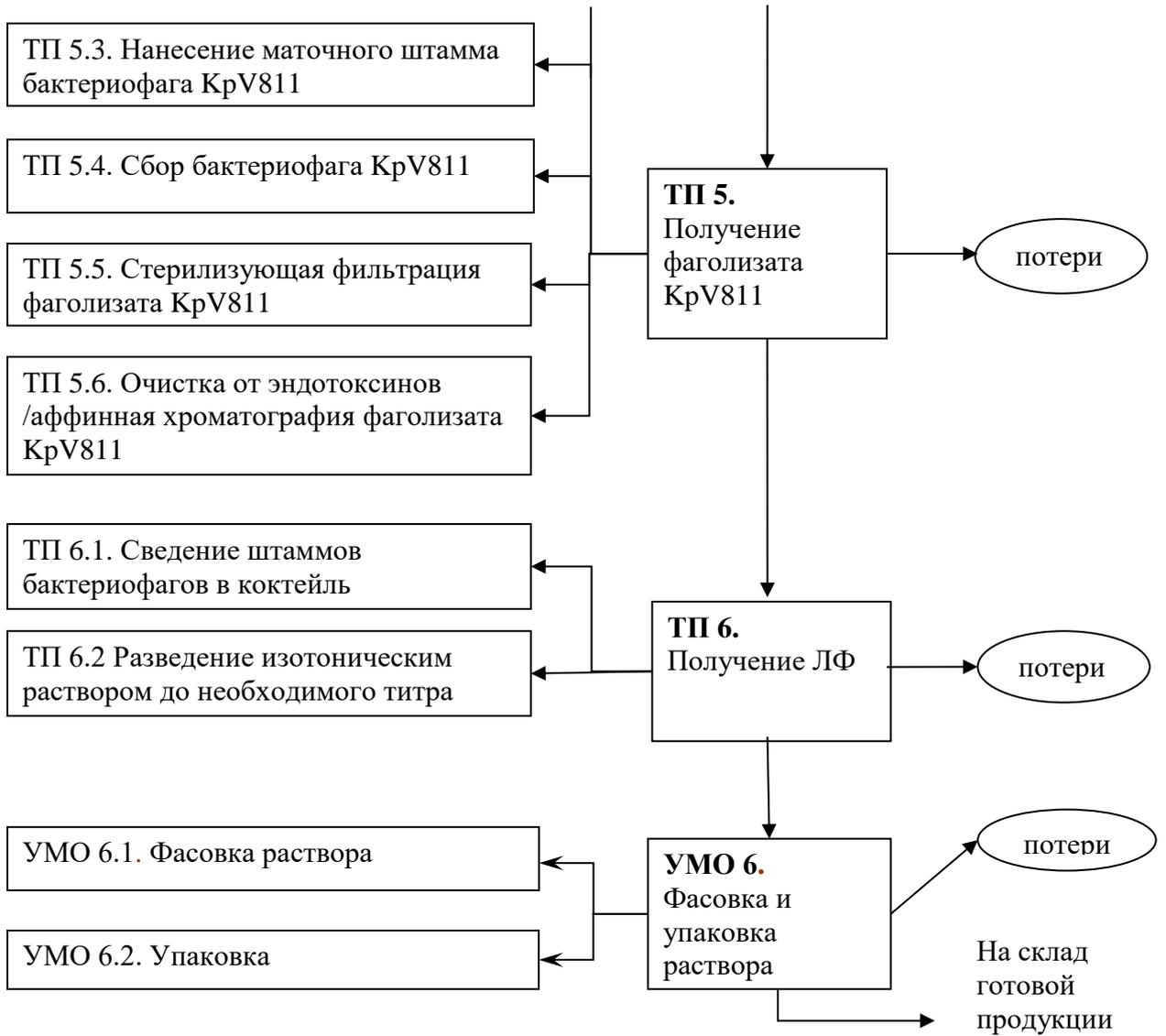
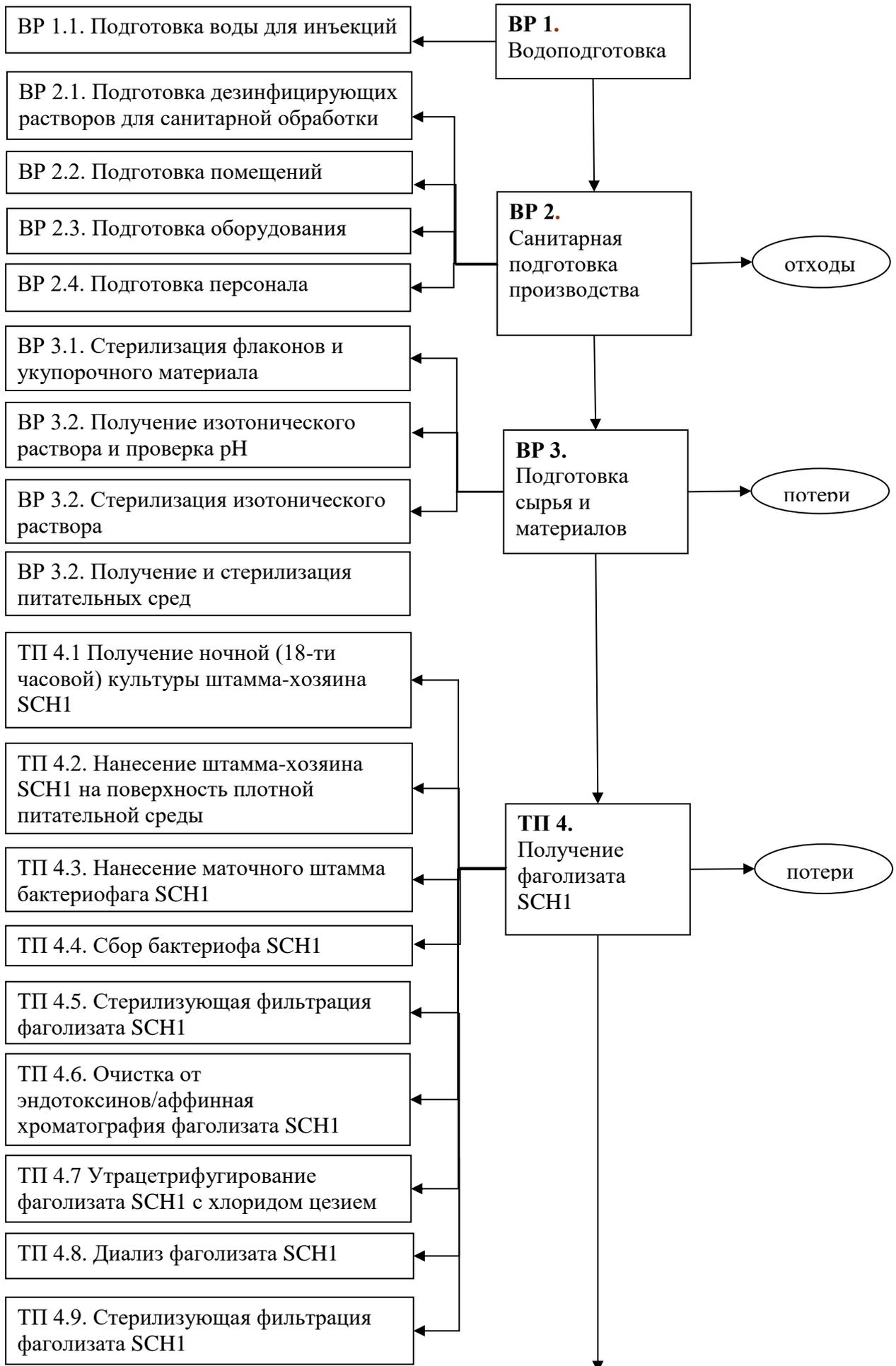


Рисунок 3.20 - Технологическая схема получения РПВМП с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811



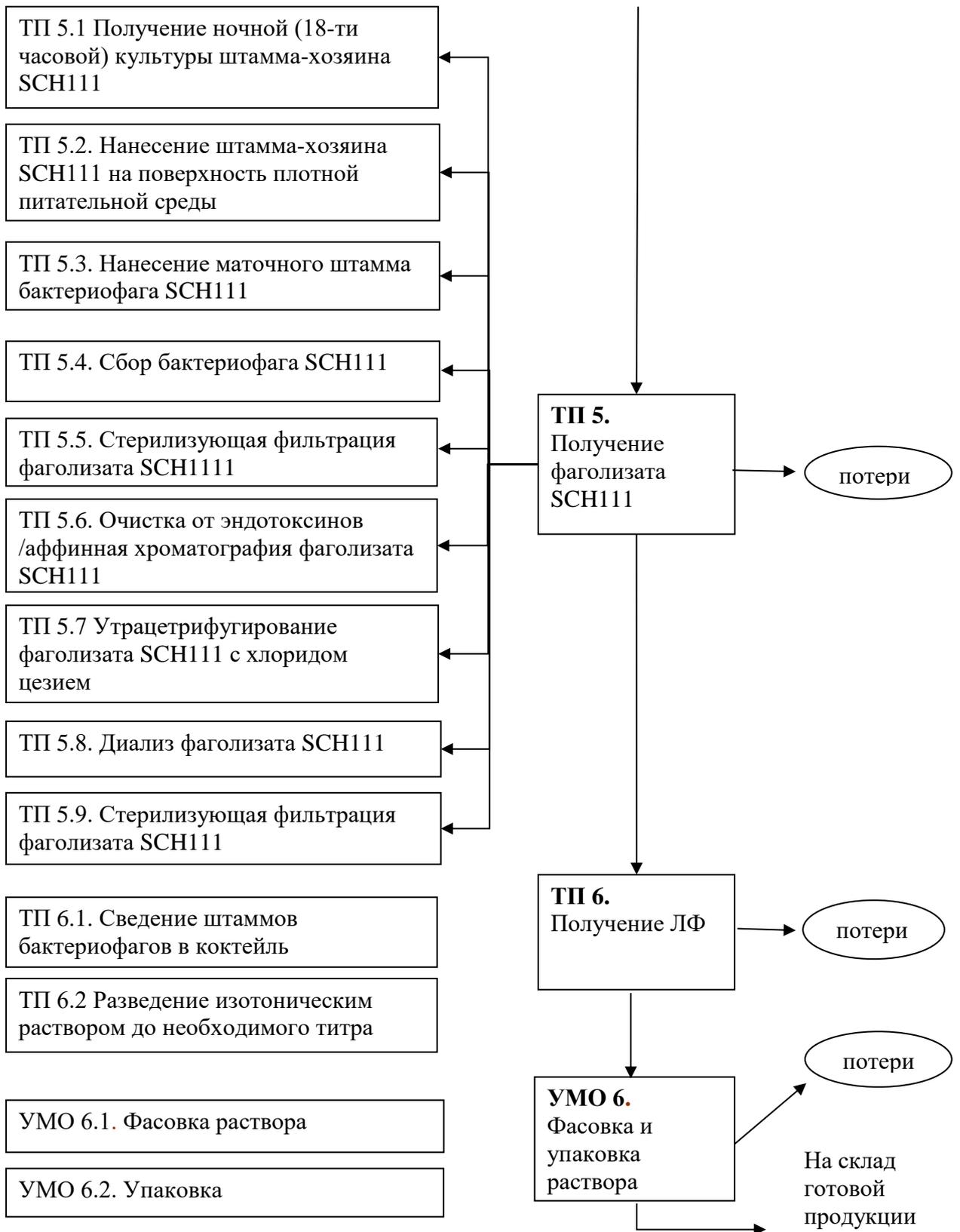


Рисунок 3.21 - Технологическая схема получения раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111

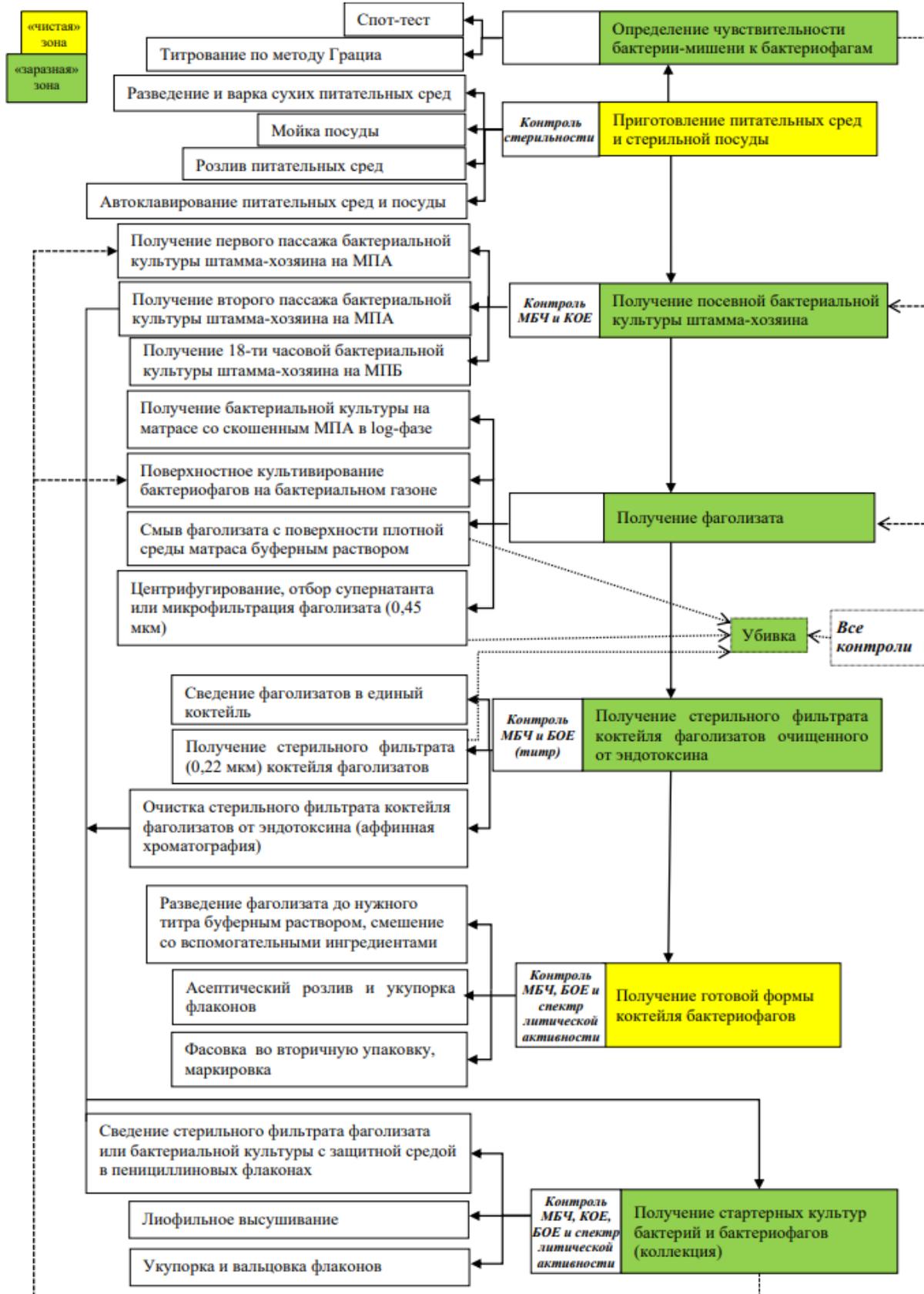


Рисунок 3.22 - Универсальная схема производства ЛПП, а также процедуры контроля качества продукта на всех этапах производственного цикла.

3.4. Разработка методов анализа РПВМП и ИР с коктейлем бактериофагов

Для универсальных лекарственных форм с коктейлями бактериофагов разработали спецификации для проектов Нормативных документов на лекарственные препараты в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ 14-го издания, представленные ниже.

Обе лекарственные формы и для приема внутрь и местного применения и для инъекционного раствора контролируются по показателям: описание, прозрачность (раствор для инъекций), цветность (раствор для инъекций), подлинность, специфическая активность, извлекаемый объем, механические включения (раствор для инъекций), рН, бактериальные эндотоксины, стерильность, аномальная токсичность.

Описание. Обе лекарственные формы представляют собой растворы бесцветные, могут иметь желтоватый оттенок, и/или слегка опалесцировать в зависимости от фагового состава.

Цветность определяют только для раствора для инъекций в соответствии с требованиями ГФ определяют визуально по методу 1, в качестве эталона используют раствор хлорида железа Y_6 , приготовленный как указано в ОФС.

Прозрачность также определяют для раствора для инъекций в соответствии с требованиями ГФ, визуально сравнивая с эталоном, представляющим собой взвесь из гидразина и гексаметилентетрамина, эталон II, полученный по методике из ОФС.

Подлинность препаратов подтверждается методом Апельмана по специфической способности лизировать бактерии *Staphylococcus aureus* или *Pseudomonas aeruginosa* или *Klebsiella pneumoniae* или *Acinetobacter baumannii* в зависимости от фагового состава коктейля.

Специфическую активность оценивают по методу Грация для каждого штамма бактериофага, входящего в состав лекарственной формы. В растворе для перорального и местного применения содержание фагов должно быть не менее 10^7 БОЕ/мл, а в инъекционном растворе на порядок ниже (не менее 10^6 БОЕ/мл) для обеспечения его безопасности.

Извлекаемый объем для обеих лекарственных форм должен быть не менее номинального, то есть 20 мл.

Механические включения оценивают только для раствора для инъекций визуально по методике, описанной в ГФ.

pH растворов для приема внутрь и местного применения и для инъекционного применения должно в соответствии с ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги» составлять от 6,8 до 7,8.

Бактериальные эндотоксины, определяют гель-тромб тестом, и в полученных экспериментальных сериях этот показатель находился в интервале от 33 до 90 Единиц эндотоксина на 1 мл.

Стерильность для раствора для приема внутрь и местного применения возможно проводить методом прямого посева. Несмотря на то, что бактериофаги обладают бактерицидным действием, это действие строго специфично. Возможно использовать также методику мембранного фильтрования. Мы предлагаем включить в спецификацию в раствор для приема внутрь и местного применения обе методики, а инъекционного раствора, для исключения

Аномальная токсичность определяют на мышах, путем введения им внутрибрюшинного 1 мл лекарственной формы. Для каждой серии берут 5 мышей. Препарат не должен вызывать гибель животных в течение 7 суток.

Для экспериментальных серий раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, РА5, РА10, АМ24, АР22, SCH1 и SCH111, раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов РА5, РА10, раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, АМ24, АР22, раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111, определяли все показатели качества, результаты даны в таблицах 3.17 -3.26 по изучению стабильности препаратов.

Дополнительно к показателям качества, указанным в спецификации, полученные серии оценивали по наличию *экзотоксинов*. Грамположительные бактерии способны выделять экзотоксины, представляющие собой,

водорастворимые белки, обладающие энтеротоксигенными свойствами. Оценивали их содержание в экспериментальных сериях лекарственных форм с целью доказательства высокой степени очистки и безопасности. Определение наличия экзотоксинов в ЛП проводили иммунохроматографическим экспресс-тестом для качественного *in vitro* обнаружения токсинов. При контроле данного показателя в экспериментальных сериях ЛП экзотоксинов не обнаружено, поэтому посчитали, что контроль для посерийного производства не нужен, так как метод получения препаратов исключает возможность их попадания в готовую лекарственную форму.

На каждую серию лекарственной формы бактериофага оформляют паспорт качества, с которым препарат передают в клинический центр. Все показатели качества указаны в паспорте, кроме стерильности и аномальной токсичности, эти показатели вносят в паспорт после получения результатов (через 7 суток), остальные показатели качества определяют в течение суток. Так как скорость получения препарата больным определяет эффективность лечения, то ждать как для классических лекарственных препаратов результатов всех показателей качества невозможно. Однако за счет высокой степени очистки и обработанности технологии, валидации технологического процесса, считаем эти показатели достоверными, то есть мы можем отдать пациенту препарат без этих результатов, но с обязательным последующим контролем.

Примеры паспортов на серию раствора для приема внутрь и местного применения, и раствора для приема внутрь представлены ниже.

ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ

«Раствор для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов»

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор
Подлинность	Метод Аппельманна ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)
Специфическая активность	Метод Грация ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15	Препарат должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля) в разведении не менее 10^7 в 1 мл препарата
Извлекаемый объем	ГФ РФ ОФС 1.4.2.003.15	Не менее номинального
рН	Потенциометрически ГФ РФ ОФС 1.2.1.0004.15	От 6,8 до 7,8
Бактериальные эндотоксины	Гель-тромб тест (метод А) ГФ РФ ОФС 1.2.4.0006.15	Не более 100 ЕЭ/доза
Стерильность	Метод прямого посева или мембранная фильтрация с использованием тиогликолевой среды	Должен быть стерильным

Показатели	Методы	Нормы
	и жидкой среды Самбуро ГФ РФ ОФС 1.2.4.0003.15	
Аномальная токсичность	Биологический ГФ РФ ОФС 1.2.4.0004.15	Должен быть нетоксичен
Упаковка	Стеклянные флаконы из нейтрального стекла ФО-1-20 НС-3 по 20 мл, резиновые пробки медицинские тип 1-1 для пенициллиновых флаконов, колпачки алюминиевые под обжим для пенициллиновых флаконов 12А20	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	При температуре от 2 °С до 8 °С	
Срок годности	24 месяца	

ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ
«Раствор для инъекций с коктейлем бактериофагов»

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор
Прозрачность	ГФ РФ ОФС 1.2.1.0007.15	Должен выдерживать сравнение с эталоном II
Цветность	ГФ РФ ОФС 1.2.1.0006.15	Должен быть бесцветным или интенсивность окраски раствора не должна превышать интенсивность окраски эталона Y ₆
Подлинность	Метод Аппельманна ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)
Специфическая активность	Метод Грация ГФ РФ ОФС 1.7.1.0002.15	Препарат должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля) в разведении не менее 10 ⁶ в 1 мл препарата
Извлекаемый объем	ГФ РФ ОФС 1.4.2.003.15	Не менее номинального
Механические включения	Визуально ГФ РФ ОФС 1.4.2.005.18	Видимые механические включения должны отсутствовать
pH	Потенциометрически ГФ РФ ОФС 1.2.1.0004.15	От 6,8 до 7,8

Показатели	Методы	Нормы
Бактериальные эндотоксины	Гель-тромб тест (метод А) ГФ РФ ОФС 1.2.4.0006.15	Не более 50 ЕЭ/доза
Стерильность	Мембранная фильтрация с использованием тиогликолевой среды и жидкой среды Самбуро ГФ РФ ОФС 1.2.4.0003.15	Должен быть стерильным
Аномальная токсичность	Биологический ГФ РФ ОФС 1.2.4.0004.15	Должен быть нетоксичен
Упаковка	Стекланные флаконы из нейтрального стекла ФО-1-20 НС-3 по 20 мл, резиновые пробки медицинские тип 1-1 для пенициллиновых флаконов, колпачки алюминиевые под обжим для пенициллиновых флаконов 12А20	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	При температуре от 2 °С до 8 °С	
Срок годности	24 месяца	

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

ПАСПОРТ

«Раствор для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811»

Производители активных фармацевтических субстанций:

1. бактериофагов SCH1 – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского;

2. бактериофагов SCH111 – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского;

Вспомогательные вещества: 0,9% раствор натрия хлорида

Серия номер Серия 05052015
 Дата изготовления 15.05.2015 г.
 Срок годности до 15.05.2017 г.
 Анализ выполнен по проекту НД
 Количество флаконов 15 шт.
 Производитель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
 Фасовщик (первичная упаковка) ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
 Выпускающий контроль качества ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Описание	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор
Подлинность	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)	Соответствует
Специфическая активность	Препарат должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> в разведении не менее 10^6 в 1 мл препарата	КрV15 - $3,0 \cdot 10^8$ КрV811 - $5,5 \cdot 10^8$
Извлекаемый объем	Не менее номинального	20,1 мл
pH	От 6,8 до 7,8	7,1
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	25 ЕЭ/доза
Стерильность	Должен быть стерильным	Стерилен
Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичен	Не токсичен
Условия хранения	При температуре от 2 °С до 8 °С	

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

ПАСПОРТ

«Раствор для инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111»

Производители активных фармацевтических субстанций:

1. бактериофагов SCH1 – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского;

2. бактериофагов SCH111 – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского;

Вспомогательные вещества: 0,9% раствор натрия хлорида

Серия номер Серия	04052015
Дата изготовления	10.05.2015 г.
Срок годности до	10.05.2017 г.
Анализ выполнен по проекту НД	
Количество флаконов	15 шт.
Производитель	ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Фасовщик (первичная упаковка)	ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Выпускающий контроль качества	ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

Наименование показателя	Требования НД	Результаты анализа
1	2	3
Описание	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор	Однородный бесцветный или с желтоватым оттенком слегка опалесцирующий раствор
Прозрачность	Должен выдерживать сравнение с эталоном II	Соответствует
Цветность	Должен быть бесцветным или интенсивность окраски раствора не должна превышать интенсивность окраски эталона Y ₆	Соответствует
Подлинность	Препарат должен специфически лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> или <i>Pseudomonas aeruginosa</i> или <i>Klebsiella pneumoniae</i> или <i>Acinetobacter baumannii</i> (в зависимости от фагового состава коктейля)	Соответствует
Специфическая активность	Препарат должен лизировать бактерии <i>Staphylococcus aureus</i> в разведении не менее 10 ⁶ в 1 мл препарата	SCH1 - 5,6 · 10 ⁶ SCH111 - 6,0 · 10 ⁶
Извлекаемый объем	Не менее номинального	20,1 мл
Механические включения	Видимые механические включения должны отсутствовать	Отсутствуют
pH	От 6,8 до 7,8	6,9
Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/доза	5 ЕЭ/доза
Стерильность	Должен быть стерильным	Стерилен
Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичен	Не токсичен
Условия хранения	При температуре от 2 °С до 8 °С	

3.5. Изучение стабильности ЛФ бактериофагов

Изучение стабильности лекарственных форм бактериофагов проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ и Рекомендациями ЕАЭС к «Требованиям к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций» № 69 от 10.05.2018 (с изменениями на 30 июня 2020 года).

Исследование проводили для трех серий препаратов пяти составов в долгосрочных исследованиях при хранении препаратов при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $60\pm 5\%$ в течение 24 месяцев. Контроль показателей качества осуществляли каждые 6 месяцев по всем пунктам спецификации, а в промежутках (через 3 месяца) по показателям «специфическая активность» и «рН». Краткосрочные исследования (ускоренные) проводили при хранении препаратов при $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $60\pm 5\%$ в течение 6 месяцев. Стрессовые испытания для лекарственных форм не проводили, так как влияние температуры и рН было изучено на отдельных бактериофагах.

Результаты изучения стабильности лекарственных форм представлены в таблицах 3.15-3.24. На основании этих результатов можно установить срок годности 24 месяца для раствора для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов и раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов переменного состава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ III

Для получения лекарственных препаратов бактериофагов с целью апробации алгоритма персонализированной фаготерапии было наработано восемь бактериофагов: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, активных в отношении бактерий, вызывающих ИСМП и обладающих МЛУ. Было показано, что данные бактериофаги являются производственно-перспективными штаммами, так как имеют широкий спектр литической активности (от 30 до 92%) в отношении гомологичных бактериальных штаммов, высокую урожайность (до 10^{10} БОЕ/мл), устойчивы к температурным воздействиям и действию хлороформа.

Бактериофаги KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 и их штаммы-хозяева депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». На основе изучения молекулярно-генетических свойств бактериофагов был сделан вывод о том, что бактериофаги KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 – вирулентны, оригинальны и генетически безопасны (ДНК фагов не содержат нежелательных генов).

Разработаны «универсальный» состав и технология получения лекарственных форм для включения в их состав коктейлей бактериофагов различного штаммового состава, а именно, раствор для приема внутрь и местного применения и инъекционный раствор. Разработаны спецификации на лекарственные формы, нормативные документы и лабораторные регламенты. Срок годности лекарственных форм, содержащих различные варианты коктейлей бактериофагов, на основании изучения стабильности в рамках краткосрочных и долгосрочных испытаний составил 24 месяца как для РПВМП, так и для ИР.

Таблица 3.15 - Изучение стабильности РПВМП с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 в долгосрочных испытаниях

<i>Время, мес.</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>15</i>	<i>18</i>	<i>21</i>	<i>24</i>
<i>Показатель</i>										
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10
Серия 01022015										
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
	<i>КрV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$8,0 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$0,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$
	<i>SCH1</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$0,7 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>SCH111</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$0,2 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^8$	$7,1 \cdot 10^7$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,3
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен						
Серия 02032015										
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
	<i>КрV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$7,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$
	<i>SCH1</i>	$2,2 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>SCH111</i>	$2,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^8$	$7,1 \cdot 10^7$

Продолжение таблицы 3.15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>pH</i>	7,0	7,0	7,1	7,1	7,1	7,0	7,1	7,1	7,1	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	
Серия 03052015										
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Специфическая активность</i>	<i>KpV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
	<i>KpV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$8,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$
	<i>SCH1</i> <i>SCH111</i>	$2,1 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>pH</i>	6,8	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	

Таблица 3.16 - Изучение стабильности РПВМП с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 в краткосрочных испытаниях

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Серия 01022015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	<i>КрV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$8,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$
	<i>SCH1</i>	$2 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
	<i>SCH111</i>	$2 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	Стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен
Серия 02032015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>КрV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$7,0 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$
	<i>SCH1</i>	$2,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
	<i>SCH111</i>	$2,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$

Продолжение таблицы 3.16

1	2	3	4
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	7,0	7,0	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	Стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен
Серия 03052015			
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>KpV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$
	<i>KpV811</i>	$5,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$
	<i>PA5</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>PA10</i>	$8,0 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$
	<i>AM24</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$
	<i>AP22</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$
	<i>SCH1</i> <i>SCH111</i>	$2,1 \cdot 10^8$ $1,8 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$ $1,0 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	6,8	6,8	6,8
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	Стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен

Таблица 3.17 - Изучение стабильности РПВМП с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811 в долгосрочных
ИСПЫТАНИЯХ

<i>Показатель</i> \ <i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>15</i>	<i>18</i>	<i>21</i>	<i>24</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
Серия 04052015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> <i>КрV15</i> <i>КрV811</i>	$4,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$
	$2,0 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^7$	$6,5,0 \cdot 10^7$	$6,2 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	6,9	6,9	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен
Серия 05052015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> <i>КрV15</i> <i>КрV811</i>	$3,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$0,0 \cdot 10^7$
	$5,5 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.

Продолжение таблицы 3.17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен						
Серия 06072015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> <i>КрV15</i> <i>КрV811</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$	$0,9 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$
	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	7,0	7,0	7,0
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен						

Таблица 3.18 - Изучение стабильности РПВМП с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811 в краткосрочных
ИСПЫТАНИЯХ

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
	1	2	3	4
Серия 04052015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	4,0·10 ⁸	2,5·10 ⁸	1,3·10 ⁸
	<i>КрV811</i>	2,0·10 ⁸	1,1·10 ⁸	1,0·10 ⁸
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		6,9	6,9	7,0
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	Стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен
Серия 05052015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	3,0·10 ⁸	2,5·10 ⁸	2,3·10 ⁸
	<i>КрV811</i>	5,5·10 ⁸	5,1·10 ⁸	4,0·10 ⁸
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1

Продолжение таблицы 3.18

1	2	3	4
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен
Серия 06072015			
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>KpV15</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
	<i>KpV811</i>	$2,0 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	6,9	6,9	6,9
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен

Продолжение таблицы 3.19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	
Серия 02052016										
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Специфическая активность</i>	<i>РА 5</i>	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,3 \cdot 10^8$	$8,5 \cdot 10^7$	$6,9 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
	<i>РА 10</i>	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$6,0 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>pH</i>	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	

Таблица 3.20 - Изучение стабильности РПВМП с коктейлем бактериофагов РА 5 и РА 10 в краткосрочных испытаниях

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
	1	2	3	4
Серия 01042016				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>РА 5</i>	$4,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
	<i>РА 10</i>	$5,8 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>		7,0	7,0	7,0
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен
Серия 02052016				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>РА 5</i>	$8,0 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$
	<i>РА 10</i>	$3,0 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$	$0,5 \cdot 10^8$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	Стерилен

Продолжение таблицы 3.20

1	2	3	4
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен
Серия 02052016			
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>РА 5</i>	$1,0 \cdot 10^8$	$7,5 \cdot 10^7$
	<i>РА 10</i>	$1,0 \cdot 10^8$	$7,1 \cdot 10^7$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>pH</i>	7,2	7,2	7,2
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен

Таблица 3.21 - Изучение стабильности раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811 в
долгосрочных испытаниях

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>9</i>	<i>12</i>	<i>15</i>	<i>18</i>	<i>21</i>	<i>24</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Серия 04082016										
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$8,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
	<i>КрV811</i>	$5,2 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$
	<i>AM24</i>	$6,4 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
	<i>AP22</i>	$3,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен						
Серия 05082016										
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$
	<i>КрV811</i>	$3,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$
	<i>AM24</i>	$9,4 \cdot 10^6$	$8,1 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^6$	$7,3 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$
	<i>AP22</i>	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$

Продолжение таблицы 3.21

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	
<i>pH</i>	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	
Серия 06102016										
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$8,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
	<i>КрV811</i>	$7,2 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$
	<i>AM24</i>	$6,6 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$
	<i>AP22</i>	$3,2 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	
<i>pH</i>	7,0	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	-	не токсичен	

Таблица 3.22 - Изучение стабильности раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов КрV15, КрV811 в краткосрочных испытаниях

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
	1	2	3	4
Серия 04082016				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$8,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$
	<i>КрV811</i>	$5,2 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен
Серия 05082016				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>КрV15</i>	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$
	<i>КрV811</i>	$3,2 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		7,0	7,0	7,0

Продолжение таблицы 3.22

1	2	3	4
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен
Серия 06102016			
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>KpV15</i>	$8,0 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$
	<i>KpV811</i>	$7,2 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен

Таблица 3.23 - Изучение стабильности раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111 в
долгосрочных испытаниях

<i>Показатель</i> \ <i>Время, мес.</i>	0	3	6	9	12	15	18	21	24
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Серия 04052015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> SCH1, SCH111	5,6·10 ⁶	4,6·10 ⁶	5,0·10 ⁶	4,6·10 ⁶	5,4·10 ⁶	5,2·10 ⁶	5,4·10 ⁶	6,0·10 ⁶	6,0·10 ⁶
	6,0·10 ⁶	6,0·10 ⁶	5,6·10 ⁶	4,2·10 ⁶	3,6·10 ⁶	3,8·10 ⁶	3,0·10 ⁶	2,6·10 ⁶	2,8·10 ⁶
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен						
Серия 05052015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> SCH1, SCH111	4,6·10 ⁶	4,2·10 ⁶	4,0·10 ⁶	3,8·10 ⁶	3,4·10 ⁶	3,8·10 ⁶	3,4·10 ⁶	3,0·10 ⁶	3,4·10 ⁶
	5,0·10 ⁶	5,0·10 ⁶	4,6·10 ⁶	4,2·10 ⁶	3,6·10 ⁶	3,8·10 ⁶	3,2·10 ⁶	3,6·10 ⁶	2,0·10 ⁶
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.

Продолжение таблицы 3.23

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен						
Серия 06072015									
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i> <i>SCH1,</i> <i>SCH111</i>	$5,8 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
	$5,0 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен						

Таблица 3.24 - Изучение стабильности раствора для инъекций с коктейлем бактериофагов SCH1, SCH111 в краткосрочных испытаниях

<i>Показатель</i>	<i>Время, мес.</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>6</i>
	1	2	3	4
Серия 04052015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>SCH1, SCH111</i>	5,6·10 ⁶	5,0·10 ⁶	4,6·10 ⁶
		6,0·10 ⁶	5,5·10 ⁶	4,0·10 ⁶
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		6,9	6,9	6,9
<i>Бактериальные эндотоксины</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>		стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>		не токсичен	-	не токсичен
Серия 05052015				
<i>Описание</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>SCH1, SCH111</i>	4,6·10 ⁶	4,0·10 ⁶	3,6·10 ⁶
		5,0·10 ⁶	3,0·10 ⁶	3,2·10 ⁶
<i>Извлекаемый объем</i>		соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>		отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>		6,9	6,9	6,9

Продолжение таблицы 3.24

1	2	3	4
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен
Серия 06072015			
<i>Описание</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Прозрачность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Цветность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Подлинность</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Специфическая активность</i>	<i>SCH1,</i>	$5,8 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
	<i>SCH111</i>	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
<i>Извлекаемый объем</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Механические включения</i>	отсутствуют	-	отсутствуют
<i>pH</i>	7,1	7,1	7,1
<i>Бактериальные эндотоксины</i>	соотв.	-	соотв.
<i>Стерильность</i>	стерилен	-	стерилен
<i>Аномальная токсичность</i>	не токсичен	-	не токсичен

ГЛАВА IV. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛФ БАКТЕРИОФАГОВ

Доклинические исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории биологических испытаний ФБУН ГНЦ ПМБ (зав. лабораторией А.И. Борзилов). Для изучения безопасности применения ЛФ бактериофагов, в состав препарата было решено включить коктейль из 8 бактериофагов: *Acinetobacter baumannii* AP22 и AM 24, *Klebsiella pneumoniae* KPV15 и KPV811, *Staphylococcus aureus* SCH1 и SCH111, *Pseudomonas aeruginosa* PA5 и PA10, с содержанием каждого из перечисленных выше штаммов бактериофагов, равным 1×10^8 БОЕ/мл. Если коктейль покажет свою безопасность, то применение любого из этих бактериофагов или их комбинаций, можно считать безопасным, при условии, что литическая активность ни одного из бактериофагов не будет превышать исследуемую (1×10^8 БОЕ).

4.1. Острая токсичность ЛФ бактериофагов

Острую токсичность ЛФ оценивали путём однократного внутрибрюшинного введения 10 беспородным мышам (самки, $22,2 \pm 1,2$ г) 0,5 мл исследуемого препарата. Полученные результаты показали, что однократное введение ЛФ животным не приводило к гибели или появлению признаков общей интоксикации в течение 7 суток – срока наблюдения. Все животные из экспериментальной группы оставались подвижными, а их поведенческие реакции были адекватными. У 100% животных шерсть оставалась гладкой и блестящей. Препарат не влиял на физическое развитие мышей, которые набирали вес с той же динамикой, что и контрольные животные, получавшие однократно внутрибрюшинно физиологический раствор. На рисунке 4.1 представлены графики изменения массы тела опытных и контрольных животных. Сравнительный гематологический анализ крови мышей из опытной и контрольной групп через неделю после введения показал отсутствие достоверных различий в количестве лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и тромбоцитов, показатели которых оставались в пределах

физиологической нормы для данного вида животных (таблица 4.1).

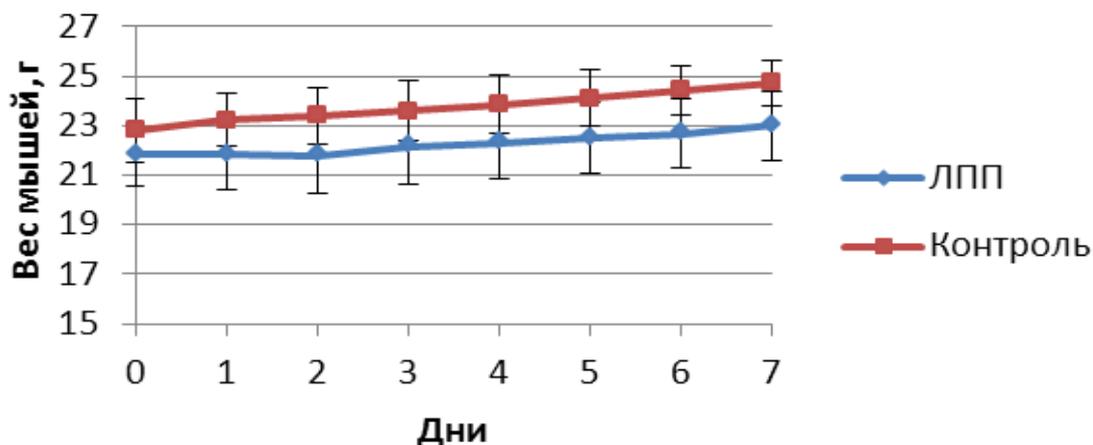


Рисунок 4.1 - Динамика массы тела беспородных белых мышей (самок) после однократного внутрибрюшинного введения им 0,5 мл ЛПП с бактериофагами и физиологического раствора (контроль).

Таблица 4.1 - Результаты общего анализа крови мышей, получавших однократно внутрибрюшинно ЛФ бактериофагов или физиологический раствор (контроль) на седьмые сутки после введения их животным.

Показатели	Ед. измерения	Контроль* (n=5)	ЛПП*(n=10)
Лейкоциты	$\times 10^9/\text{л}$	6,7 \pm 3,0	6,5 \pm 2,5
Лимфоциты	$\times 10^9/\text{л}$	4,1 \pm 2,1	3,2 \pm 1,2
Моноциты	$\times 10^9/\text{л}$	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
Гранулоциты	$\times 10^9/\text{л}$	2,3 \pm 0,9	3,0 \pm 1,4
Лимфоциты	%	59,7 \pm 8,7	49,9 \pm 7,3
Моноциты	%	4,2 \pm 0,8	4,5 \pm 0,7
Гранулоциты	%	36,1 \pm 7,9	45,6 \pm 7,0
Эритроциты	$\times 10^{12}/\text{л}$	9,1 \pm 0,8	9,4 \pm 0,67
Гемоглобин	г/л	122 \pm 9	125 \pm 13
Гематокрит	%	42,3 \pm 2,4	43,4 \pm 4,7
Тромбоциты	$\times 10^9/\text{л}$	1065 \pm 234	1087 \pm 367
Тромбокрит	%	0,537 \pm 0,123	0,519 \pm 0,4

* Указано средние значения и стандартные отклонения.

4.2. Хроническая токсичность ЛФ бактериофагов

Длительное (в течение 20 дней) ежедневное внутрибрюшинное введение белым беспородным мышам 0,5 мл ЛФ бактериофагов показало отсутствие общетоксического действия препарата. На протяжении всего срока назначения ЛФ все животные оставались живыми. Поведение мышей было адекватным, а состояние их шерстистого покрова нормальным и не отличалось от такового у контрольных мышей, получавших в течение 20 дней физиологический раствор.

Продолжительное введение ЛФ бактериофагов не повлияло на физическое развитие мышей: животные, после начала введения препарата стали набирать в весе с той же динамикой, что и контрольные животные, причём прирост массы тела у самцов был более интенсивным. Следует отметить, что симптомов общетоксического действия ЛФ не наблюдали ни у самцов, ни и у самок мышей. Показатели веса животных из опытной и контрольной групп достоверно не отличались на всём протяжении эксперимента. На рисунке 4.2 представлены весовые кривые животных, получавших ЛПП или физиологический раствор в течение 20 суток эксперимента. На графиках представлены средние значения и интервалы стандартного отклонения.

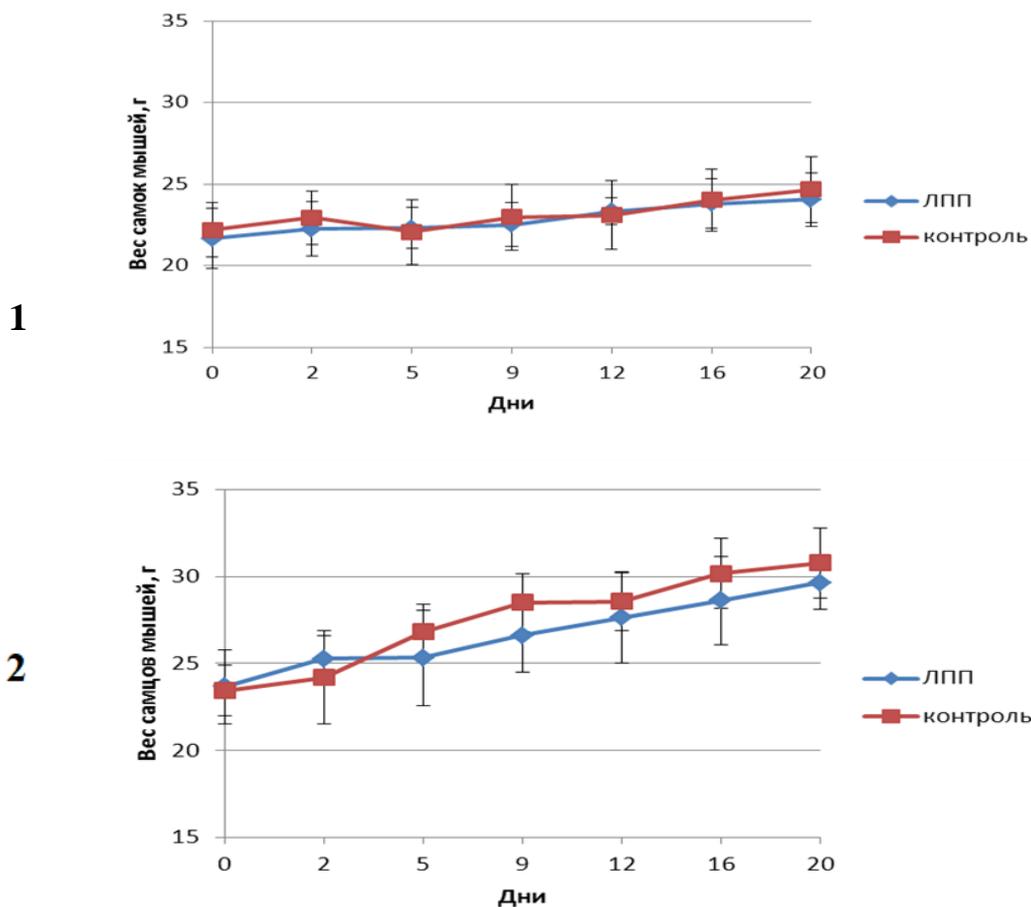


Рисунок 4.2 - Динамика прироста массы тела самок (1) и самцов (2) аутбредных белых мышей, получавших в течение 20 дней однократно внутрибрюшинно по 0,5 мл ЛПП или физиологического раствора (контроль).

Общий клинический анализ крови мышей из опытной и контрольной групп показал, что длительное внутрибрюшинное введение ЛФ бактериофагов приводит

к снижению в 1,2 раза общего количества лейкоцитов по сравнению с контролем. Однако эти изменения находятся в пределах физиологической нормы для данного вида животных. Через неделю после окончания курса введения ЛФ количество лейкоцитов в крови мышей возвращается к нормальным значениям. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о функциональных и обратимых изменениях в лейкоцитарной системе организма животных и отсутствии токсического действия исследуемого препарата. В таблице 4.2 представлены некоторые гематологические показатели крови мышей, полученные на первые и седьмые сутки после окончания 20-ти дневного курса внутрибрюшинного введения ЛФ бактериофагов. Макроскопическое исследование внутренних органов самцов и самок мышей, проведённое на 1 и 7 день после окончания курса введения ЛФ бактериофагов состояние органов грудной и брюшной полости, а также головного мозга без отклонений от нормы. Органы брюшной и грудной полости нормальной величины, окраски и консистенции.

Таблица 4.2 - Определение гематологических показателей у беспородных мышей на первые и седьмые сутки после окончания внутрибрюшинного введения им ЛФ бактериофагов в дозе 0,5 мл

Показатели	Ед. измерен	1-е сутки после окончания введения		7-е сутки после окончания введения	
		Контроль	ЛПП	Контроль	ЛПП
Лейкоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$4,6 \pm 1,0^*$	$3,7 \pm 1,2$	$5,7 \pm 2,0$	$6,8 \pm 1,5$
Лимфоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$2,0 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,6$	$3,7 \pm 1,0$
Моноциты	$\times 10^9/\text{л}$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Гранулоциты	$\times 10^9/\text{л}$	$2,4 \pm 0,8$	$2,3 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,5$	$2,7 \pm 0,5$
Лимфоциты	%	$43,3 \pm 14,2$	$37,8 \pm 16,8$	$54,9 \pm 1,9$	$54,5 \pm 3,6$
Моноциты	%	$5,2 \pm 1,1$	$5,3 \pm 1,2$	$4,3 \pm 0,5$	$4,9 \pm 1,2$
Гранулоциты	%	$51,5 \pm 13,5$	$56,9 \pm 16,2$	$40,8 \pm 10,6$	$40,6 \pm 2,8$
Эритроциты	$\times 10^{12}/\text{л}$	$10,23 \pm 0,76$	$9,21 \pm 0,69$	$9,57 \pm 0,47$	$10,04 \pm 0,61$
Гемоглобин	г/л	146 ± 12	130 ± 21	148 ± 9	148 ± 6
Гематокрит	%	$41,4 \pm 3,3$	$37,1 \pm 6,2$	$44,7 \pm 5,2$	$46,0 \pm 5,6$
Тромбоциты	$\times 10^9/\text{л}$	1608 ± 558	1249 ± 220	1230 ± 618	1517 ± 233
Тромбокрит	%	$0,689 \pm 0,243$	$0,577 \pm 0,276$	$0,449 \pm 0,118$	$0,662 \pm 0,135$

* - указано среднее значение и стандартное отклонение (n=5)

Головной мозг. Вещество головного мозга равномерно окрашено. Хорошо видны ядра клеток. Кровенаполнение сосудов не отличается от контроля (Рисунок

4.3).

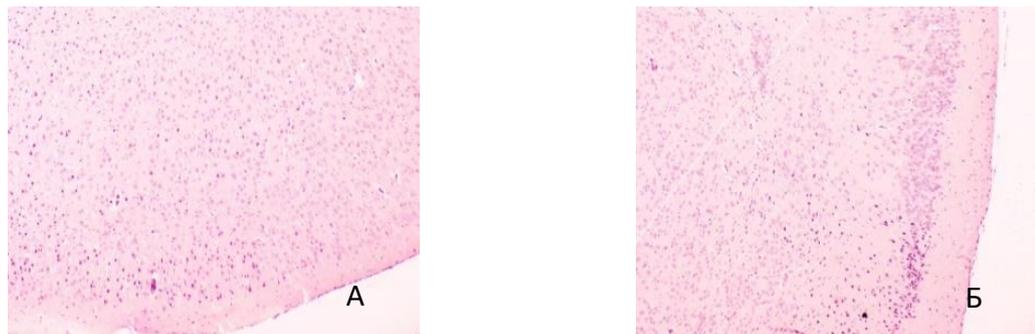


Рисунок 4.3 - Гистологический срез головного мозга мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 4$.

Сердце. Структура миокарда без отклонений от нормы. В цитоплазме кардиомиоцитов не выявлено включений или повреждений. Прослойка соединительной ткани между клетками сердечной мышцы, как и в контроле, слабо выражена. Эндокард в полости желудочков без утолщений и наложений (Рисунок 4.4).

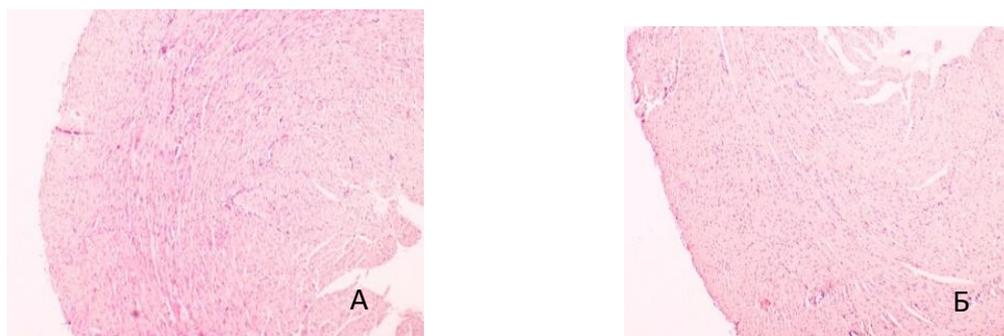


Рисунок 4.4 – Гистологический срез сердечной мышцы мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 4$.

Легкие. Воздухоносные пути без патологии: просвет бронхов чистый. В респираторном отделе лёгких межальвеолярные перегородки и альвеолы без отклонений от нормы (Рисунок 4.5).

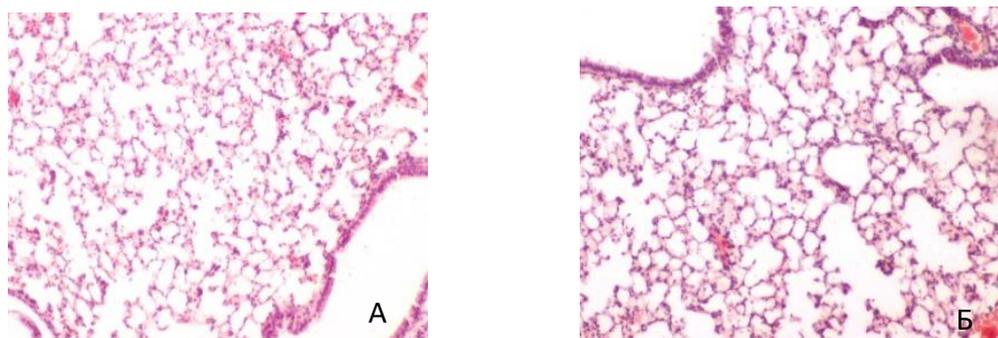


Рисунок 4.5 – Гистологический срез лёгочной ткани мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 4$.

Пищеварительная система. Спинка языка покрыта многослойным плоским эпителием с небольшим количеством сосочков. Повреждений слизистой травматического или воспалительно-некротического характера не выявлено (Рисунок 4.6).

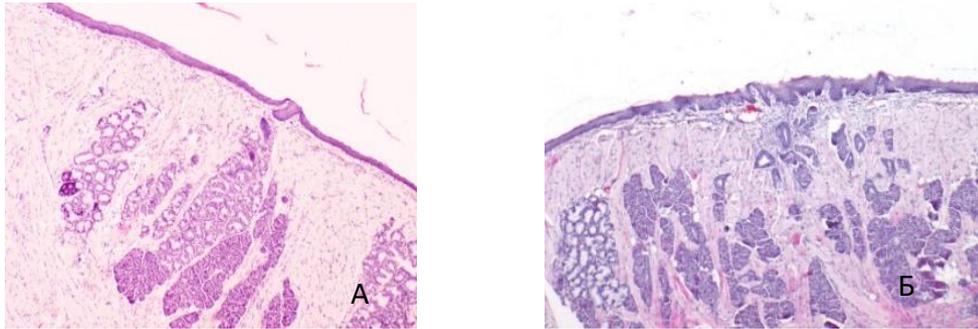


Рисунок 4.6 - Гистологический срез корня языка мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 4$.

Поверхность слизистой оболочки желудка ровная, выстлана непрерывным слоем эпителиальных клеток. Трубоччатые железы плотно расположены в слизистой, без признаков деструкции и воспаления (Рис.4.7).

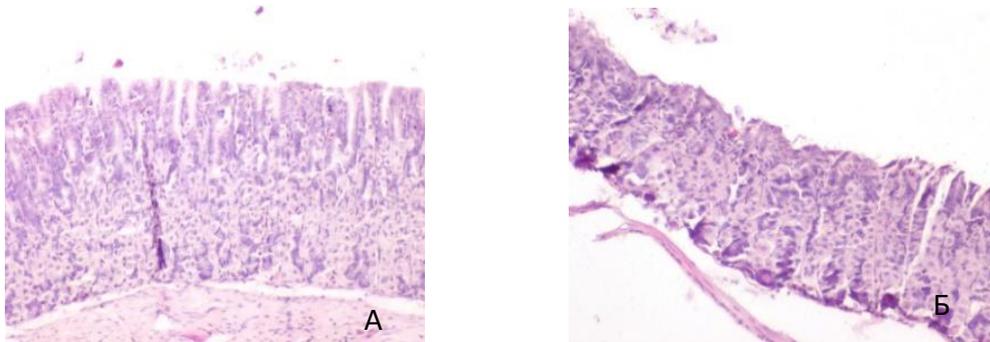


Рисунок 4.7 - Гистологический срез стенки желудка мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 10$.

В тонком кишечнике поверхность ворсинок равномерно покрыта однослойным цилиндрическим эпителием. Все энтероциты имеют нормальное строение, с хорошо выраженным базально расположенным ядром и равномерно окрашенной цитоплазмой. Соединительная ткань внутри ворсинок инфильтрирована небольшим количеством лимфоцитов как у экспериментальных, так и у контрольных животных (Рисунок 4.8 .Увеличение $\times 10$).

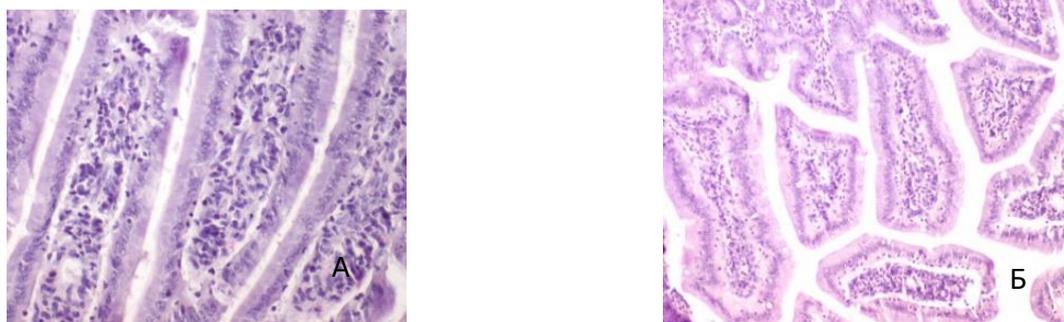


Рисунок 4.8. - Гистологический срез стенки тонкого кишечника мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б).

В покровном эпителии слизистой оболочки толстого кишечника, как и у контрольных животных, имеется большое количество слизистых бокаловидных клеток. Деструктивных или воспалительных изменений не выявлено во всех слоях слизистой (Рисунок 4.9, Увеличение $\times 4$).

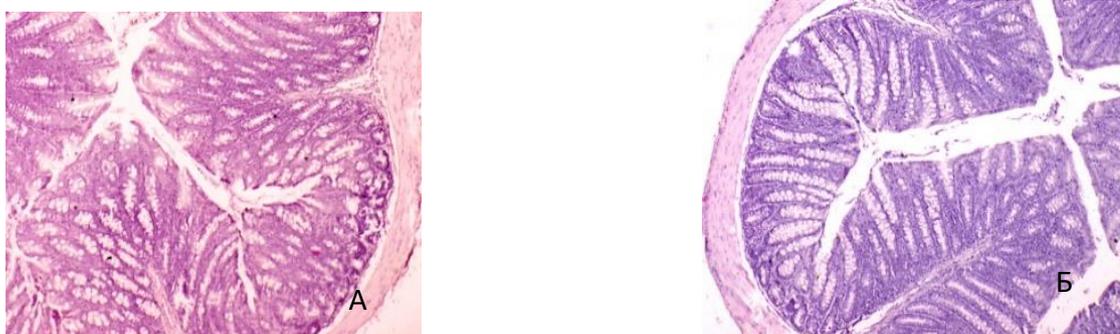


Рисунок 4.9. - Гистологический срез стенки толстого кишечника мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б).

Паренхима **печени** имеет нормальное трабекулярное строение (Рисунок 4.10). Цитоплазма гепатоцитов равномерно окрашена, мелкозернистой структуры. Строма без изменений, как в контроле, мало заметна.

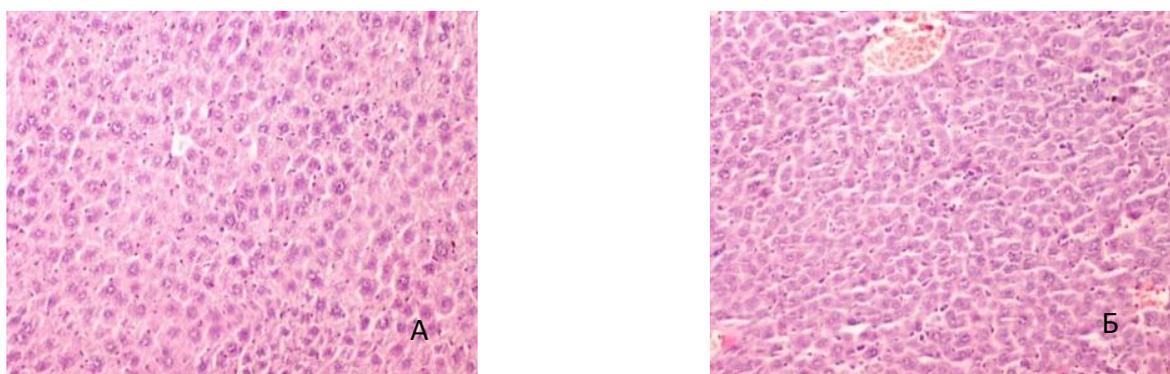


Рисунок 4.10. - Гистологический срез печени мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 10$.

Структура **почечной ткани** также не имела отклонений от нормы (Рисунок 4.11). Почечные клубочки обычных размеров, нормального кровенаполнения. Эпителий канальцев, в корковом и мозговом веществе, без повреждений. Состояние ядер и цитоплазмы клеток нефроэпителия не отличается от контроля.

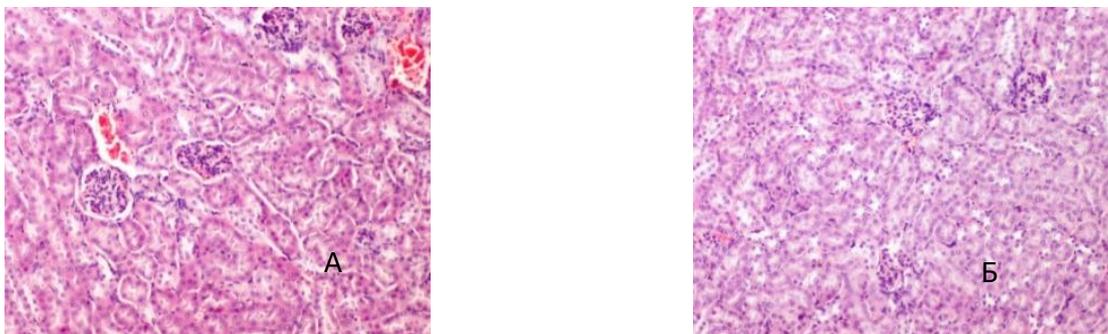


Рисунок 4.11 - Гистологический срез почки мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 10$.

Лимфатическая система. В селезенке белая пульпа занимает относительно небольшую площадь. Лимфатические фолликулы без центров размножения. Клеточный состав красной пульпы не отличается от контроля, преобладают лимфоциты. В лимфоцитах и клетках ретикуло-макрофагальной стромы белой и красной пульпы не было выявлено изменений некробиотического или дистрофического характера (Рис. 4.12).

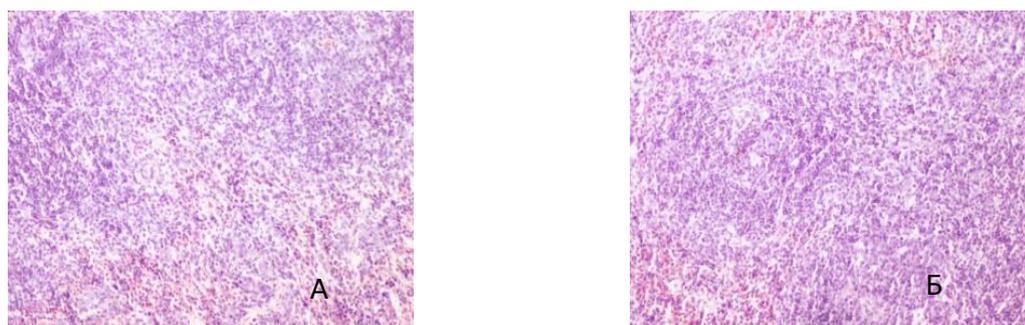


Рисунок 4.12. - Гистологический срез селезёнки мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 10$.

В лимфатических узлах все зоны относительно равномерно заполнены лимфоцитами. Центры размножения в лимфатических фолликулах слабо выражены. Среди клеток лимфоцитарной популяции и макрофагов стромы не выявлено клеток с патологически измененной цитоплазмой и ядрами или погибших клеток (Рисунок 4.13).

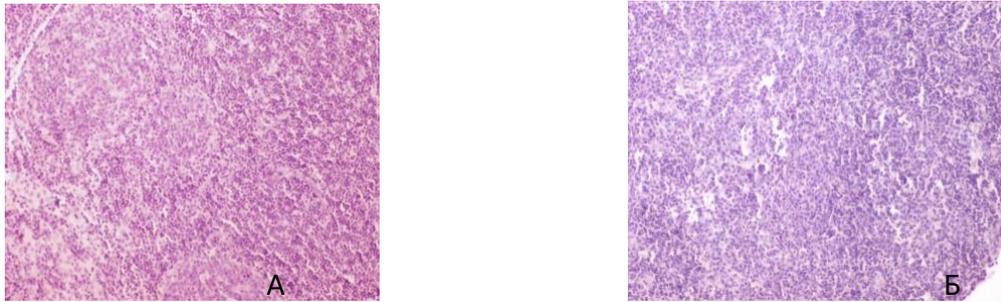


Рисунок 4.13 - Гистологический срез лимфатического узла мыши, получавшей ЛФ бактериофагов (А) и контрольного животного (Б). Увеличение $\times 10$.

Таким образом, макроскопическое и микроскопическое исследования внутренних органов мышей показали, что длительное – в течение 20 дней – внутрибрюшинное введение ЛФ бактериофагов не вызывает обратимых или необратимых морфологических изменений в тканях головного мозга, органах дыхания, органах пищеварения, почках и лимфоидных органах.

4.3. Изучение местного действия ЛФ бактериофагов

Подкожное введение мышам 0,5 мл ЛФ бактериофага не приводит к видимым признакам воспаления или раздражения в месте введения препарата. У морских свинок через 5-6 ч после инъекции препарата на коже появляется лёгкое покраснение, которое вскоре исчезает (менее, чем через 12 ч). Таким образом, препарат обладает слабой реактогенностью при подкожном введении.

4.4. Фармакокинетика клебсиеллёзного бактериофага КРV15

Изучение фармакокинетики бактериофагов представлено на примере ЛФ, содержащей клебсиеллёзный бактериофаг КРV15.

Динамику изменения концентрации клебсиеллёзного бактериофага КРV15 в органах и тканях животных изучали на модели интактных беспородных белых мышей через 1,3, 6, 9, 12 и 24 ч после внутрибрюшинного введения им препарата в дозе $\sim 10^8$ БОЕ. Диссеминацию фаговых частиц в организме мышей исследовали в образцах крови, селезенки, легких, печени и лимфатических узлов. В таблице 4.3 представлены результаты определения количественного содержания бактериофага в органах животных (БОЕ на 1 г (мл) исследуемого образца).

Результаты исследования показали, что у 2 из 6 мышей через 1 час после

инъекции максимальная концентрация бактериофага в крови (C_{\max}) достигала $1-3 \times 10^4$ БОЕ/мл. У четырёх других мышей к этому времени фаг в крови отсутствовал. В период с 3 по 24 час наблюдения фаговые частицы КРV15 в крови всех животных отсутствовали. Максимальные количества фага КРV15 в печени, селезёнке, лёгких и лимфатических узлах некоторых особей достигали $1,0 \times 10^5$, $4,3 \times 10^4$, $8,0 \times 10^4$ и $1,6 \times 10^5$ БОЕ/г, соответственно. Время достижения максимальной концентрация фага (T_{\max}) в печени, селезёнке, лёгких и лимфоузлах одинаково и составляет 1 час, после чего концентрация фаговых частиц начинает постепенно снижаться.

Через 3 ч после парентерального введения количество фаговых частиц в печени, селезёнке, лёгких и лимфоузлах уменьшается в 36, 4, 12 и 23 раза, соответственно. Следует отметить, что через 3 час фаг удалось выделить из печени у 33,3 %, а из селезёнки, лимфоузлов и лёгкого – у 66,6 % мышей. Через 6 ч после внутрибрюшинного введения испытуемого препарата персистенция фага КРV15 в печени, селезёнке, лёгких и лимфоузлах была обнаружена у 4, 3, 3 и 2 животного из шести, соответственно. Среднее количество фаговых частиц в этих органах составило $4,6 \times 10^3$; $4,6 \times 10^4$; $5,2 \times 10^4$ и $1,3 \times 10^4$ БОЕ/г. В период с 9 до 24 час после введения фага у большинства животных вирусные частицы в паренхиматозных органах не были обнаружены. У некоторых мышей количество фагов в исследуемых образцах было минимальным и составляло 24-164 БОЕ/г.

В таблице 4.3 представлены результаты определения фага КРV15 в крови и паренхиматозных органах мышей после однократного внутрибрюшинного введения его в дозе $\sim 1 \times 10^8$ БОЕ. Фармакокинетические кривые фага представлены на рисунке 4.14.

Таблица 4.3 - Количество фаговых частиц в крови и паренхиматозных органах мышей после однократного внутрибрюшинного введения препарата фага КРV15.

Время после введения препарата, ч	Среднее содержание фаговых частиц в 1 г (мл), \bar{x}				
	Печень	Селезёнка	Легкое	Л/узлы	Кровь
1	102034	43431	80126	157604	20500
3	2797	11326	6524	6916	<10
6	4590	4620	5171	12987	<10
9	<10	46	<10	<10	<10
12	24	98	38	96	<10
24	<10	164	96	124	<10

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что клебсиеллёзный бактериофаг KPV15 после однократного внутрибрюшинного введения быстро (в течение часа) распространяется в организме мышей, колонизируя печень, селезёнку, лёгкие и лимфатические узлы. Однако через 9 ч после инъекции количество фаговых частиц в паренхиматозных органах снижается до минимальных значений, после чего фаг продолжает персистировать в печени, селезёнке, лёгких и лимфоузлах в небольших количествах до 24 ч.

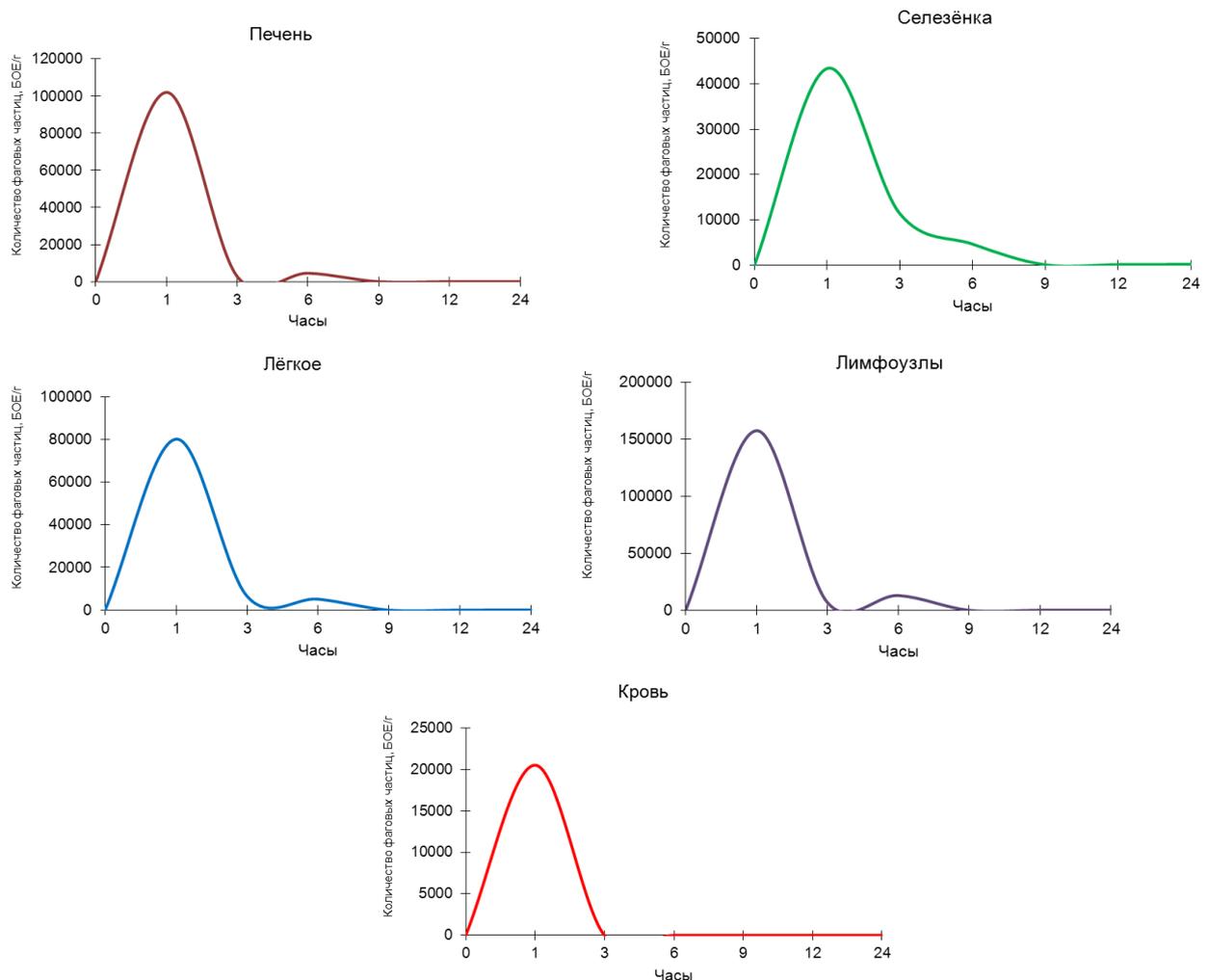


Рисунок 4.14 – Динамика изменения концентрации фаговых частиц в крови, печени, селезёнке, лёгких и лимфатических узлах мышей после однократного внутрибрюшинного введения бактериофага KPV15 в дозе 1×10^8 БОЕ (представлены средние значения).

4.5. Профилактическая эффективность ЛФ бактериофага

Профилактическую эффективность исследуемой ЛФ изучали на модели летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей по схеме, описанной в Главе 2. Материалы и методы. В различные сроки до инфицирования животным из опытных групп однократно парентерально вводили по 0,5 мл коктейля бактериофагов, а затем мышей заражали подкожно культурой высоковирулентного штамма *K. pneumoniae* B2580. Результаты исследования представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 - Эффективность профилактики острой клебсиеллезной инфекции у беспородных белых мышей препаратом ЛФ бактериофагов (разовая доза фага $\sim 1 \times 10^8$ БОЕ/мышь).

№ группы	Схема терапии	Кол-во мышей в группе	Пало животных	Средние сроки гибели, сутки	% выживших животных	Эрадикация возбудителя <i>K. pneumoniae</i> из органов и крови, %
1	Однократно в/бр* за 24 ч до заражения	10	0	-	100	100
2	Однократно в/бр за 12 ч до заражения	10	0	-	100	100
3	Однократно в/бр за 6 ч до заражения	10	1	3	90	100
4	Однократно в/бр за 1 ч до заражения	10	1	11	90	67
5	Контроль заражения	10	10	3,3	0	0
6	Контроль токсичности ЛПП	10	0	-	-	-

* - внутрибрюшинно

Представленные в таблице 4.4. данные свидетельствуют о высокой профилактической эффективности фаготерапии. При применении ЛФ бактериофагов за 12-24 ч до инфицирования мышей культурой штамма *K. pneumoniae* B2580 100 % животных выживают, если препарат вводили за 1-6 ч до инфицирования, то выживаемость падает до 90%. Все инфицированные животные,

которым не вводили внутрибрюшинно ЛФ, погибли в течение 7 суток, в том числе 80 % животных, которым ввели фаговый препарат через двое-трое суток после заражения. У всех погибших животных выделили культуру *K. pneumoniae* B2580, чувствительную к литическому действию специфического фага KPV15, входящего в состав исследуемого препарата. Графики выживаемости мышей из опытных и контрольной групп представлены на рисунке 4.15.

Обращает на себя внимание тот факт, что ни из крови, ни из паренхиматозных органов (селезенка, легкие, печень) выживших животных, получавших бактериофаг KPV15 за 24, 12 и 6 ч до заражения, культура бактериального штамма *K. pneumoniae* B2580 не была выделена. В то же время у трёх из девяти мышей из опытной группы № 4 возбудитель экспериментального клебсиеллёза был выделен из печени, селезёнки и крови. Обсеменённость органов клетками *K. pneumoniae* составляет 50 КОЕ/г, 195 КОЕ/г и 40-200 КОЕ/мл, соответственно. Следовательно, использование схемы профилактического применения ЛФ за один час до заражения *K. pneumoniae* B2580 saniрует 60 % животных.

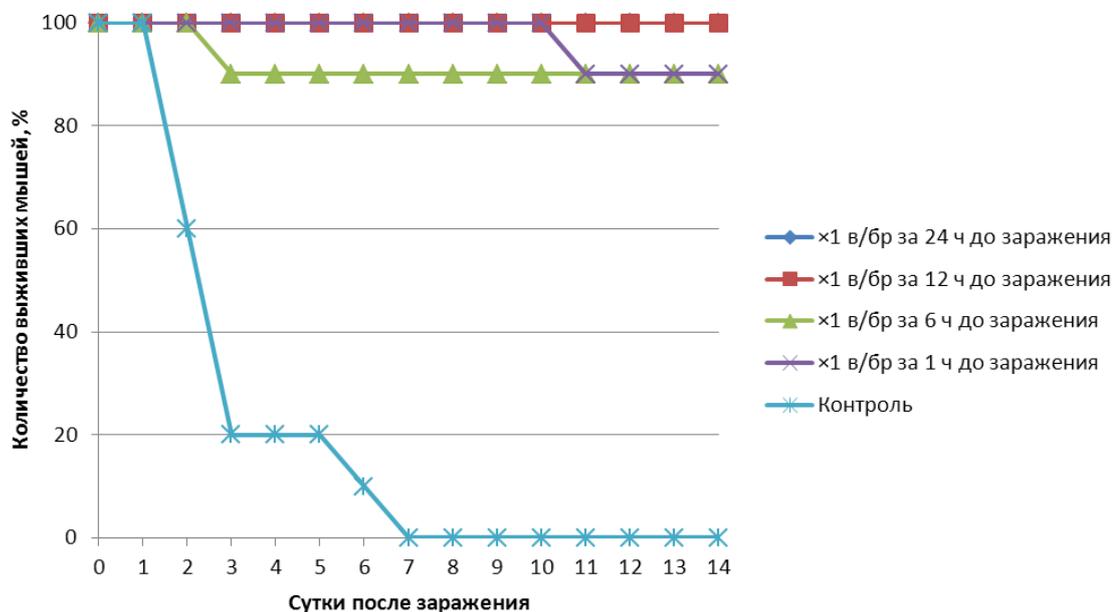


Рисунок 4.15 - Выживаемость беспородных белых мышей, получавших парентерально ЛФ бактериофагов за 1, 6, 12 и 24 ч до подкожного заражения культурой штамма *K. pneumoniae* B2580. Контрольным животным ЛФ не вводили.

У выживших животных из экспериментальных групп №№ 1-3 (табл. 4.4), и у животных контрольной группы № 6 в течение двух недель после заражения признаков инфекционного заболевания или интоксикации не обнаруживали. Мыши не теряли в весе и имели нормальный аппетит, шерсть оставалась гладкой и блестящей, поведение было адекватным для данного вида животных.

Все погибшие мыши и 3 мыши из группы четыре имели симптомы острого септического заболевания: угнетённость поведения, снижение или отсутствие аппетита, взъерошенность шерсти, диарею, а также характерный признак инфекции, обусловленной штаммом *K. pneumoniae* B2580, – обширный отёк в месте введения бактериальной культуры.

4.6. Изучение лечебной эффективности ЛФ бактериофагов

Лечебную эффективность ЛФ бактериофагов также изучали на модели острой летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей по схеме, описанной в Главе 2. Материалы и методы. Результаты исследования представлены в таблице 4.5.

Полученные данные показали, что эффективность фаготерапии экспериментального клебсиеллёза у мышей, вызванного штаммом *K. pneumoniae* B2580, напрямую зависит от сроков начала курса терапии. Более раннее начало лечения (через 1 и 6 ч после заражения) обеспечивает не только 100 % выживаемость мышей, но и способствует полной элиминации возбудителя из органов и тканей животных. На протяжении 14 дней после заражения у этих животных (группы №№ 1 и 2) отсутствовали симптомы острой клебсиеллезной инфекции. Все животные контрольной группы № 7, не получавшие бактериофаг, погибли в период с 2 по 5 сутки после заражения культурой штамма *K. pneumoniae* B2580.

В случае более позднего начала применения ЛФ бактериофагов эффективность терапии клебсиеллёза у мышей снижается. Выживаемость животных в опытных группах № 3 (начало лечения через 12 ч) и № 4 (начало лечения через 24 ч) составила 70 % и 20 %, соответственно. Средний срок гибели

мышей в этих группах более чем в два раза превышал этот показатель в контрольной группе № 7. Количество санированных животных в группе № 3 – 20 %, а в группе № 4 - обе выжившие мыши являлись носителями *K. pneumoniae* B2580.

Таблица 4.5 - Эффективность фаготерапии острой клебсиеллёзной инфекции у беспородных белых мышей препаратом ЛФ бактериофагов (разовая доза фага $\sim 1 \times 10^8$ БОЕ/мышь).

№ группы	Схема введения ЛПП спустя «п» ч после заражения животных	Кол-во особей в группе	Пало живых	Средний срок гибели (ССГ), сутки	% выживших животных	% эрадикации возбудителя <i>K. pneumoniae</i> из органов и крови
1	Через 1 ч, в/бр 1 р/д, 10сут.	10	0	-	100	100
2	Через 6 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	10	0	-	100	100
3	Через 12 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	10	3	7,7	70	20
4	Через 24 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	10	8	8	20	0
5	Сipro, через 12 ч, в/ж ** 2 р/д, 5 сут.	10	2	9,5	80	70
6	Сipro, через 24 ч, в/ж 2 р/д, 5 сут.	10	6	10,3	40	20
7	Контроль заражения	10	10	3,3	0	-
8	Контроль токсичности ЛПП	10	-	-	10	-

Примечание: в/бр - внутрибрюшинное введение; в/ж- внутрижелудочное введение

Сipro – ципрофлоксацин.

Сравнительное изучение эффективности фаготерапии препаратом и химиотерапии с ципрофлоксацином экспериментального клебсиеллёза у мышей показало схожие результаты: более позднее начало лечения инфекции обоими препаратами даёт худшие результаты, как по выживаемости, так и по санации организма животных. Тем не менее, применение ципрофлоксацина немного более результативно. Антибиотик защищает от гибели 80 и 40 % мышей при начале лечения через 12 и 24 ч после заражения, соответственно. Количество вылечившихся (по данным бактериологического анализа) животных в группах № 5 и 6 достигает 70 и 20 %. Кроме того, средний срок гибели животных в этих группах

приблизительно в 3 раза больше, чем у контрольных животных. На рисунке 4.16 представлены кривые выживаемости мышей, инфицированных *K. pneumoniae* B2580, в процессе и после окончания курса терапии ЛФ бактериофагов и ципрофлоксацином.

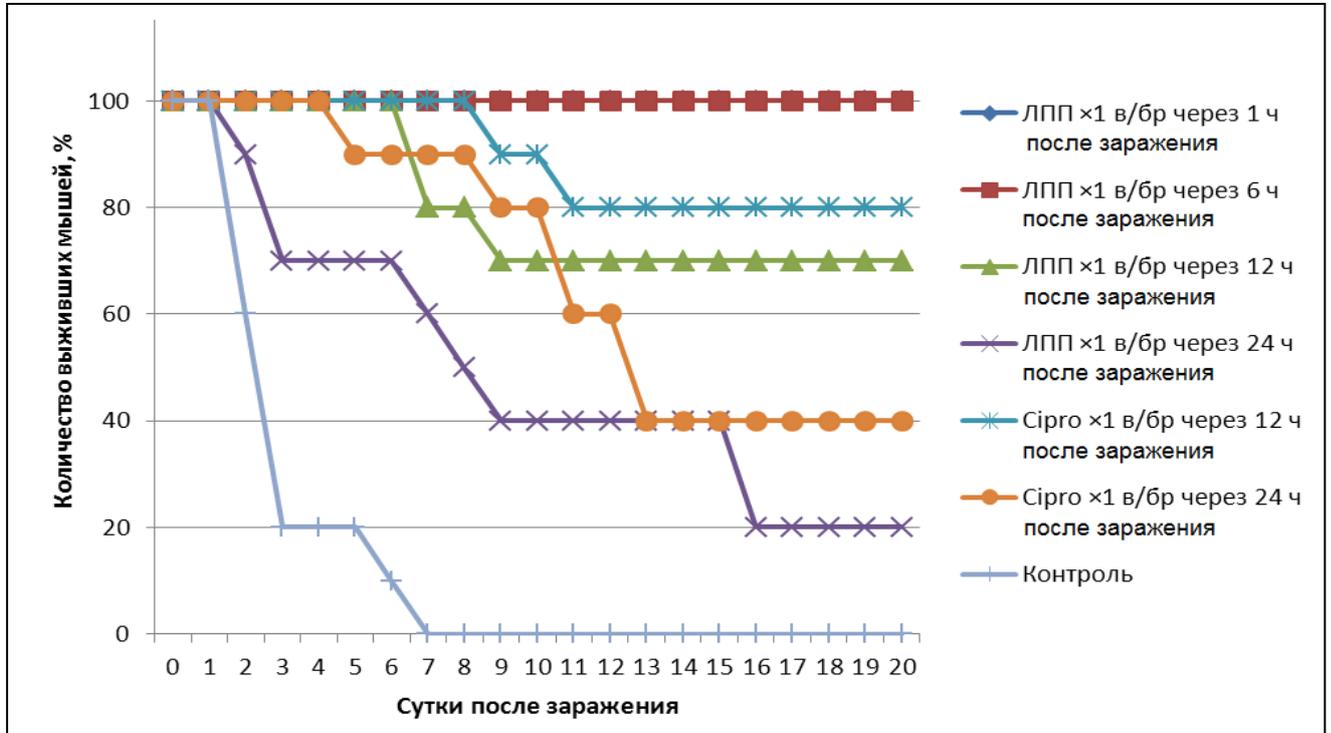


Рисунок 4.16 - Выживаемость беспородных белых мышей, получавших парентерально ЛФ бактериофагов через 1, 6, 12 и 24 ч после подкожного заражения культурой штамма *K. pneumoniae* B2580. Контрольным животным ЛФ и ципрофлоксацин не вводили.

Уровень эрадикации возбудителя клебсиеллёза из паренхиматозных органов и крови у носителей *K. pneumoniae* B2580 также зависит от сроков начала лечения и снижается при более позднем начале терапии (таблица 4.6).

Неинфицированные мыши из контрольной группы № 8, получавшие только фаговый препарат внутрибрюшинно один раз в сутки в течение 10 дней, не имели внешних признаков интоксикации на протяжении всего периода введения и последующих 14 дней наблюдения. Животные не теряли в весе и имели обычный аппетит, шерстный покров оставался гладким и блестящим, поведение было адекватным для данного вида животных.

В режиме лечения исследованный препарат даёт хороший терапевтический эффект только при использовании его на ранних стадиях развития клебсиеллёзной инфекции (начало лечения не позднее 6 ч после заражения). Ежедневное в течение 10 суток введение препарата способствует клиническому и бактериологическому выздоровлению 100 % инфицированных мышей.

Таблица 4.6. - Показатели обсеменённости паренхиматозных органов и крови бактериями *K. pneumoniae* B2580 в организме белых беспородных мышей, выживших после подкожного инфицирования и последующего лечения ЛФ бактериофагов и ципрофлоксацином.

№ группы	Схема введения ЛПП спустя “n” ч после заражения животных	Количество носителей <i>K. pneumoniae</i>	Количество <i>K. pneumoniae</i> B2580, КОЕ/г(мл)			
			печень	легкое	селезенка	кровь
1	Через 1 ч, в/бр 1 р/д, 10сут.	0	0	0	0	0
2	Через 6 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	0	0	0	0	0
3	Через 12 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	5	25-652	118-208	501-1968	130-850
4	Через 24 ч, в/бр 1 р/д, 10 сут.	2	$3,7 \times 10^5$ - 56×10^5	$1,1 \times 10^6$ - $3,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$ - $4,9 \times 10^6$	$30 \cdot 10^6$
5	Сipro, через 12 ч, в/ж 2р/д, 5 сут.	1	1568	197	6517	80
6	Сipro, через 24 ч, в/ж 2 р/д, 5 сут.	2	1995	249-256	847-8230	240

Более позднее начало фаготерапии (через 12-24 ч) экспериментального клебсиеллёза испытуемым препаратом приводит к выживанию 70-20 % животных, среди которых количество носителей бактерий *K. pneumoniae* B2580 может достигать 70-100 %. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что прогноз экспериментального клебсиеллёза напрямую связан со сроками начала лечения: более ранняя фаготерапия обеспечивает лучший терапевтический результат. Это подтверждают данные антибиотикотерапии экспериментального клебсиеллёза ципрофлоксацином, активным *in vitro* против *K. pneumoniae* B2580. Эффективность ранней терапии экспериментального

клебсиеллёза объясняется особенностью патогенеза данного заболевания у мышей – стремительно развивающимся сепсисом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ IV

ЛФ бактериофагов не оказывают острого токсического действия при однократном внутрибрюшинном введении лабораторным животным. Результаты гематологического анализа, внешнего наблюдения, патологоанатомических и гистологических исследований органов и тканей экспериментальных животных свидетельствуют о том, что изученные препараты не обладают общетоксическим действием на организм белых беспородных мышей и при длительном (в течение 20 дней) парентеральном применении. Незначительное снижение количества лейкоцитов в крови обработанных препаратом животных исчезает после окончания курса введения препарата, что свидетельствует о функциональном характере изменений показателей крови у мышей.

Изучение фармакокинетики показало, что после однократного внутрибрюшинного введения мышам препарата, содержащего бактериофаг KPV15 в количестве 1×10^8 БОЕ, фаговые частицы быстро (в течение 1 ч) проникают в кровь и паренхиматозные органы, достигая в них максимальных концентраций. В течение 9 ч фаговые частицы практически полностью элиминируются из организма, продолжая персистировать до 24 ч в незначительных количествах в паренхиматозных органах отдельных животных.

На примере летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей продемонстрирована высокая профилактическая эффективность препарата. Однократное внутрибрюшинное введение коктейля бактериофагов в период от 24 до 1 ч до заражения мышей вирулентным штаммом *Klebsiella pneumoniae* B2580 защищает от гибели 90-100 % инфицированных животных. У 67-100 % выживших мышей происходит полная санация организма от возбудителя клебсиеллёза.

На мышинной модели экспериментального клебсиеллёза показана также терапевтическая эффективность ЛФ бактериофагов.

ГЛАВА V. РАЗРАБОТКА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ИСМП

5.1. Разработка алгоритма проведения индивидуальной (персонализированной) фаготерапии

На базе четырех клинических площадок (указаны во второй главе) было проведено инициативное научное исследование с целью оценки эффективности и безопасности персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Для его проведения был разработан пакет необходимой документации, утвержденный Этическим комитетом (Протокол инициативного научного исследования, Индивидуальная регистрационная карта, Информация для пациента и Форма информированного согласия) (Приложения 4,5). Необходимо было решить две основные задачи: оценка эффективности применения персонализированной фаготерапии на фоне стандартной терапии у пациентов, страдающих ИСМП; оценка безопасности применения персонализированной фаготерапии на фоне стандартной терапии у пациентов данной группы.

На первом этапе проведения персонифицированной фаготерапии выделяют от больного и идентифицируют штаммы бактерий-мишеней. Для идентификации используют микробиологические методы, заключающиеся в посеве биологического материала от пациентов на ряд питательных сред, и последующее использование российских и импортных коммерческих биохимических тест-систем. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI-TOF MS.

На основании определения чувствительности/резистентности выделенных бактериальных штаммов к антимикробным средствам – антибиотикам, антисептикам – определяли поли- и панрезистентные штаммы.

Дополнительно выделенные штаммы бактерий могут быть исследованы иммуноферментным методом для идентификации фактора, обеспечивающего

резистентность. Кроме того, известные локусы антибиотикорезистентности тестируют методом ПЦР со специфическими праймерами. Параллельно отбирают вирулентные штаммы бактериофагов, специфически лизирующие эти патогенные микроорганизмы.

При подборе бактериофагов в рамках данного исследования проводили выбор из банка бактериофагов, описанных во второй главе, таблица 2.1.

Процедуру подбора бактериофагов проводят в два этапа:

- на первом этапе используют spot-тест. Получают бактериальный газон в чашке Петри на плотной питательной среде, состоящей из 1,5-2 % агара. Отбирают бактериофаги или бактериофаг, под воздействием которых происходит полный или частичный лизис бактериального газона или если в зоне нанесенного пятна есть отдельные негативные колонии.

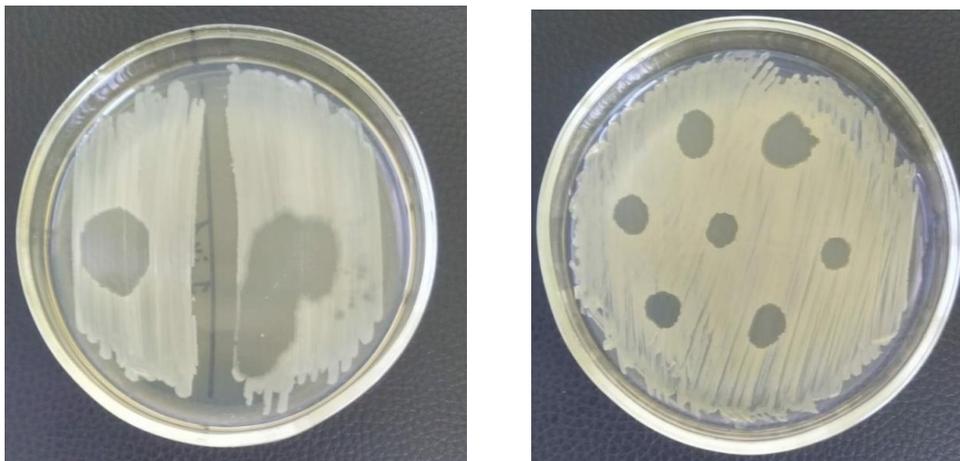


Рисунок 5.1 - Пример результатов spot-теста при подборе бактериофагов в рамках персонализированной фаготерапии

- на втором этапе отобранный бактериофаг или бактериофаги в объеме 10-100 мкл переносят на газоны бактериальных штаммов, нанесенных на поверхность питательного агара в полужидкой (0,6 %-ной) агарозе, первым слоем является 1,5-2,0% агаризованной среды в чашке или чашках Петри. Бактериофаги предварительно готовят в десятикратных разведениях (исходный титр около 10^{10} БОЕ/мл) в ф-буферном растворе в 96-луночной планшете (максимальное разведение $1/10^5$). Необходимо наносить бактериофаги в титре, обеспечивающем множественность инфицирования от 0,01 до 1 с учетом титра бактерии-мишени, высеянной из очага инфекции (модифицированный метод Грация). Результаты

учитывали после инкубации чашек при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Штаммы, на которых негативные зоны наблюдали в разведениях 1/100 и выше, считали чувствительными. Штаммы, на которых зоны лизиса наблюдали при нанесении нативного препарата фага (неразведенного) или разведенного не более чем в 10 раз, относили к условно чувствительным. Штаммы, на которых зоны лизиса отсутствовали, считали резистентными. Таким способом одновременно на одном бактериальном газоне оценивали литическую активность нескольких бактериофагов (рисунок 5.2), чашки Петри при этом делят на сектора для проверки различных разведений фага и/или разных фагов на одной чашке одновременно.



Рисунок 5.2 - Пример результатов модифицированного метода Грациа при подборе бактериофагов в рамках персонализированной фаготерапии

Этот этап позволяет оценить возможную эффективность назначения данного бактериофага/бактериофагов конкретному пациенту, т.е. убедиться в возможности размножения фаговых частиц на бактериальном штамме-возбудителе при попадании *in vivo* в очаг воспаления в титре, соизмеримом с концентрацией вирионов в раститрованном испытуемом препарате.

Использование такого двухэтапного определения чувствительности выделенных микроорганизмов к тестируемым фагам позволяет исключить все сомнительные случаи, отобрать штаммы бактериофагов, способные к репликации на бактерии-мишени *in vivo*.

В предварительных экспериментах было обнаружено, что даже при таком двухэтапном подборе бактериофагов конкретному пациенту возникают случаи неэффективности фаготерапии. И было высказано предположение, что

эффективности фаготерапии может препятствовать наличие антител к выбранным бактериофагам у пациентов, а именно, нейтрализующих антител. Антитела к бактериофагам у пациентов могут появиться на фоне дезинфекции помещений больниц бактериофагами, так как штаммы, применяемые для обработки больничной среды, а также в составе коммерческих препаратов бактериофагов, используемых для терапии, могут быть одинаковыми, кроме того, если пациент проходил лечение бактериофагами ранее, антитела могут персистировать до одного года.

Поэтому следующим этапом стало определение антифагового иммунитета к выбранному фагу или фагам иммуноферментным анализом в сыворотке крови пациента. Результаты определения иммунного ответа описаны в Главе VI.

Затем необходимо выбрать способ введения лекарственного препарата и лекарственную форму. В рамках данного научного исследования были разработаны две лекарственные формы, представляющие собой растворы для приема внутрь и местного применения и для инъекционного применения (описаны в Главе III). Лекарственные препараты назначались перорально, внутривенно, местно, вводились непосредственно в очаг воспаления. При выборе пути введения и соответственно лекарственной формы необходимо учитывать локализацию инфекционного процесса и фармакокинетику бактериофагов, входящих в состав назначаемого препарата. Это должно обеспечить доставку бактериофагов к очагу инфекции и длительное персистирование в нём для осуществления активной фаготерапии.

Изучали фармакокинетику лекарственной формы бактериофагов с коктейлем KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 на ограниченном количестве пациентов после пятидневного курса фаготерапии при пероральном введении, образцы биологического материала (эндотрахиальный аспират (ЭТА), моча, кал) отбирали через 24 ч после последнего приема препарата (таблица 5.1). Из результатов, представленных в таблице 5.1 видно, что при пероральном приеме коктейля бактериофагов, все штаммы попадают в кровеносную систему через стенку кишечника, и через 24 ч после последнего приема индивидуальные штаммы

бактериофагов обнаруживаются в моче, эндотрахеальном аспирате и кале пациентов.

Таблица 5.1 - Результаты изучения наличия бактериофагов в клиническом материале пациентов после 5-ти дневного курса фаготерапии

Пациент, №	PA5	PA10	KpV15	KpV811	AM24	AP22	SCH1/ SCH111	Биологический материал
1	20*	25	-	-	+++	+	-	Кал
2	+++**	+++	+	-	+++	+	-	Кал
3	4·10 ⁴	3·10 ⁵	-	-	-	-	-	ЭТА
	-	10	-	-	-	-	-	Кал
4	+	30	+	-	++	-	++++	Кал
5	-	-	-	+	-	-	-	Моча
	-	-	-	-	++	+	-	Кал
6	+++	+++	++	+	+++	++	-	Кал
7	2·10 ²	++++	2·10 ²	+++	+++	-	-	Моча
	5·10 ⁴	4·10 ⁵	-	-	-	-	-	ЭТА
	18	10	-	-	++	+	-	Кал
8	-	+++	+	10 ⁴	-	-	-	Моча
	-	-	-	-	++	-	-	Кал
9	-	-	-	-	3·10 ⁸	-	-	Моча
	17	25	++	-	+++	++	-	Кал
10	+++	+++	++	-	+++	+++	-	Кал

* титр бактериофага по методу Грация БОЕ/мл

** зона лизиса на чувствительном штамме-хозяине методом спот-теста, где меньшее количество плюсов означает нечистый лизис в результате недостаточной концентрации бактериофага в данном образце. «-» отсутствие бактериофага в данном образце

Титр бактериофагов определяется множественностью инфицирования, учитывающим КОЕ выделенного из очага инфекции штамма-мишени. При введении пациенту отношение количества бактериофагов к титру бактерий возбудителей, высеваемых из очага воспаления, составляет от 1 до 100, с учетом максимального падения титра бактериофага от исходного в препарате в момент достижения очага инфекции не более двух порядков. Условием терапевтического эффекта фаготерапии является то, что концентрация фага должна быть не выше количества бактериальных клеток. Активная терапия может продолжаться только в том случае, если общее количество фагов увеличивается, фаги, полученные в результате репликации, могут заменить те, которые были потеряны в результате деградации. То есть, если скорость размножения фагов *in situ* превышает скорость их рассеяния и (или) разрушения, то концентрация фагов будет расти до исчерпания доступных клеток-хозяев. В этом случае говорят об активной фаготерапии [74]. Кроме того, необходимо учитывать потери титра бактериофагов

при достижении очага инфекции. Так, если препарат вводят непосредственно в очаг воспаления, то титр может быть ниже, при пероральном введении необходимо учитывать потери титра, происходящие из-за воздействия кислой среды желудка.

Далее препарат назначался пациенту и исследование проводилось в соответствии с пунктами, описанными в Главе II, и индивидуальной регистрационной картой пациента (см. Приложения).

Таким образом, методика проведения персонализированной фаготерапии осуществлялась на основании следующего алгоритма:

1. Запускается разработанная «дорожная карта» процесса:
 - ✓ в течение первых суток определяется возможность фаготерапии для пациента, учитывая данные о чувствительности выделенных штаммов-возбудителей к бактериофагам из имеющегося банка фагов;
 - ✓ проводится первичный забор и отправка в лабораторию крови для оценки иммунологического ответа пациентов, инфицированных чувствительными к бактериофагам банка бактериальными штаммами;
 - ✓ через двое-трое суток подобранный бактериофаг/бактериофаги в виде выбранной ЛФ, оценённой по показателям качества, указанным в спецификации, отправляется к пациенту, находящемуся в ОРИТ больницы.
2. Препарат индивидуально подобранных бактериофагов применяется в соответствии с локализацией инфекционного процесса и после консультации с лечащим врачом.
3. С целью контроля эффективности проводимой фаготерапии, каждые пять суток проводят бактериологическое исследование биоматериала пациента.
 - ✓ В случае отсутствия микробиологической эффективности применяемого препарата бактериофагов, проводится: проведение повторного курса фаготерапии (со сменой набора фагов) до достижения критериев клинической и микробиологической эффективности фаготерапии; забор и передача в лабораторию образцов крови пациента для оценки наличия антифагового иммунитета на повторно подобранные фаги. В общем виде алгоритм проведения персонализированной фаготерапии представлен на рисунке 5.3.



Рисунок 5.3 – Рациональный алгоритм проведения персонализированной фаготерапии

5.2. Определение критериев эффективности персонализированной фаготерапии

Общие критерии эффективности лечения бактериофагами описаны в Правилах проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза [41]. В документе сказано, что должна оцениваться лечебная и микробиологическая эффективность препарата.

Под лечебной эффективностью в этом случае принимают полное исчезновение всех клинических признаков заболевания, уменьшение клинических проявлений или отсутствие прогрессирования по данным клинических исследований. Под неэффективной терапией подразумевают ухудшение состояния пациента, нарастание клинических признаков заболевания, появление новых симптомов или летальный исход. Описаны варианты, когда невозможно оценить эффективность терапии, а именно, в случае выхода пациентов из исследования по каким-либо причинам, в том числе летальный исход во время проведения исследований, не связанный с данным заболеванием.

В документе предлагается оценивать микробиологическую эффективность сразу после завершения курса фаготерапии и затем повторно через 3-4 недели после лечения. Фаготерапия считается эффективной, если был достигнут один из следующих вариантов: элиминация возбудителя, то есть возбудитель не высеивается из очага первичной локализации инфекции; снижение уровня наличия возбудителя в биологическом материале из очага первичной локализации инфекции (на 2-3 порядка); смена возбудителя или суперинфекция; колонизация, то есть обнаружение новых штаммов микроорганизмов, отличающихся от первоначального возбудителя, в местах первичной локализации инфекции.

При наличии инфекции, вызванной двумя или несколькими бактериями, микробиологическую эффективность необходимо оценивать по каждому виду инфекционного агента отдельно.

Кроме того, для комплексной оценки эффективности в соответствии с данным документом предлагается оценивать безопасность, нежелательные явления и реакции.

На основании данного документа и Национального стандарта РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» для данного исследования были выделены первичные (микробиологические) и вторичные (лечебные) критерии эффективности проводимой фаготерапии.

Первичные критерии эффективности:

- ✓ элиминация бактерий рода *Pseudomonas* и/или *Acinetobacter*, и/или *Klebsiella*, и/или *Staphylococcus* из инфицированного локуса;
- ✓ значительное снижение уровня контаминации (КОЕ/г) бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и/или *Acinetobacter baumannii*, и/или *Klebsiella pneumoniae*, и/или *Staphylococcus aureus* (на 3-4 порядка или до единичного присутствия колониеобразующих единиц возбудителя);
- ✓ смена возбудителя.

Вторичные критерии эффективности: положительная динамика состояния пациента по данным клинико-лабораторных показателей.

5.3. Результаты проведения персонализированной фаготерапии на клинических базах

5.3.1. Оценка эффективности применения бактериофагов для пациентов ОРИТ

Для оценки эффективности применения бактериофагов у пациентов ОРИТ после проведения высокотехнологичных операций по основному заболеванию ретроспективно были сформированы опытная группа и группа сравнения в зависимости от включения бактериофагов в схему лечения. В зависимости от вида патогенного микроорганизма опытная группа и группа сравнения (контрольная группа) были разделены на 3 подгруппы каждая. Исследовали эффективность бактериофагов в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Численность опытной группы составляла 80

человек, из них подгруппа *A. baumannii* - 13 человек; *K. pneumoniae* – 37 человек; *P. aeruginosa* – 30 человек. Численность группы сравнения составляла 80 человека из них подгруппа *A. baumannii* - 37 человек; *K. pneumoniae* – 23 человека; *P. aeruginosa* – 20 человек. Гендерные различия не учитывались.

Для оценки эффективности санации (микробиологическая эффективность) сравнивали частоту встречаемости элиминации патогенных микроорганизмов в опытной и контрольной группах. Результаты представлены на рисунках 5.4, 5.5 и в таблице 5.2.

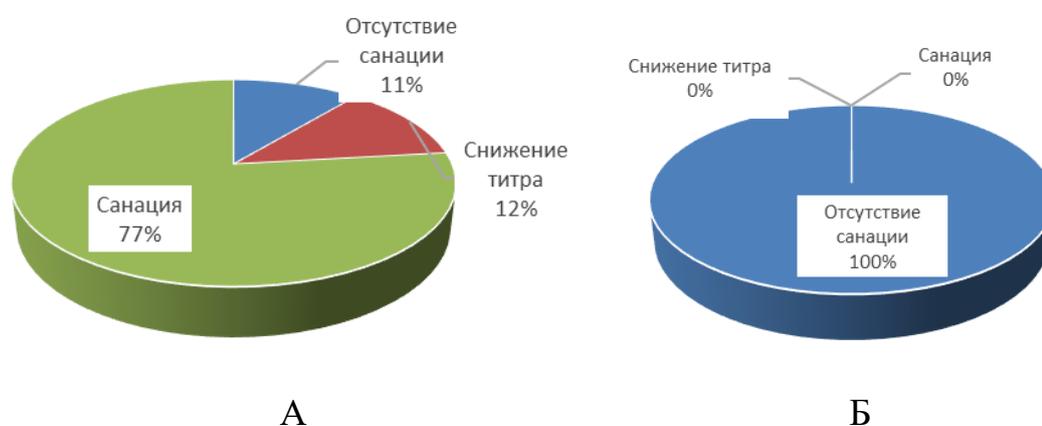


Рисунок 5.4 - Частота встречаемости различных эффектов (микробиологическая эффективность) в результате применения бактериофагов у пациентов ОРИТ.

А – опытная группа, Б – группа сравнения

На рисунке 5.4 показано, что в 77% случаев применение бактериофагов приводит к элиминации микроорганизмов, в 12% к снижению титра микроорганизма, а в 11% действие бактериофагов не влияет на интенсивность обсемененности патогенной микрофлорой. В группе сравнения в 100% случаев отсутствует санация и снижение интенсивности обсемененности патогенными микроорганизмами.

На рисунке 5.5 показано, что применение бактериофагов в отношении *P. aeruginosa* является наиболее эффективным, так как у 83,3% пациентов наблюдается элиминация микроорганизма, а у 13,3% снижается титр. Несколько менее эффективны бактериофаги к *K. pneumoniae*, так как санация

наблюдается у 78,4%, снижение титра у 16,2%, а отсутствие санации у 5,4% пациентов.

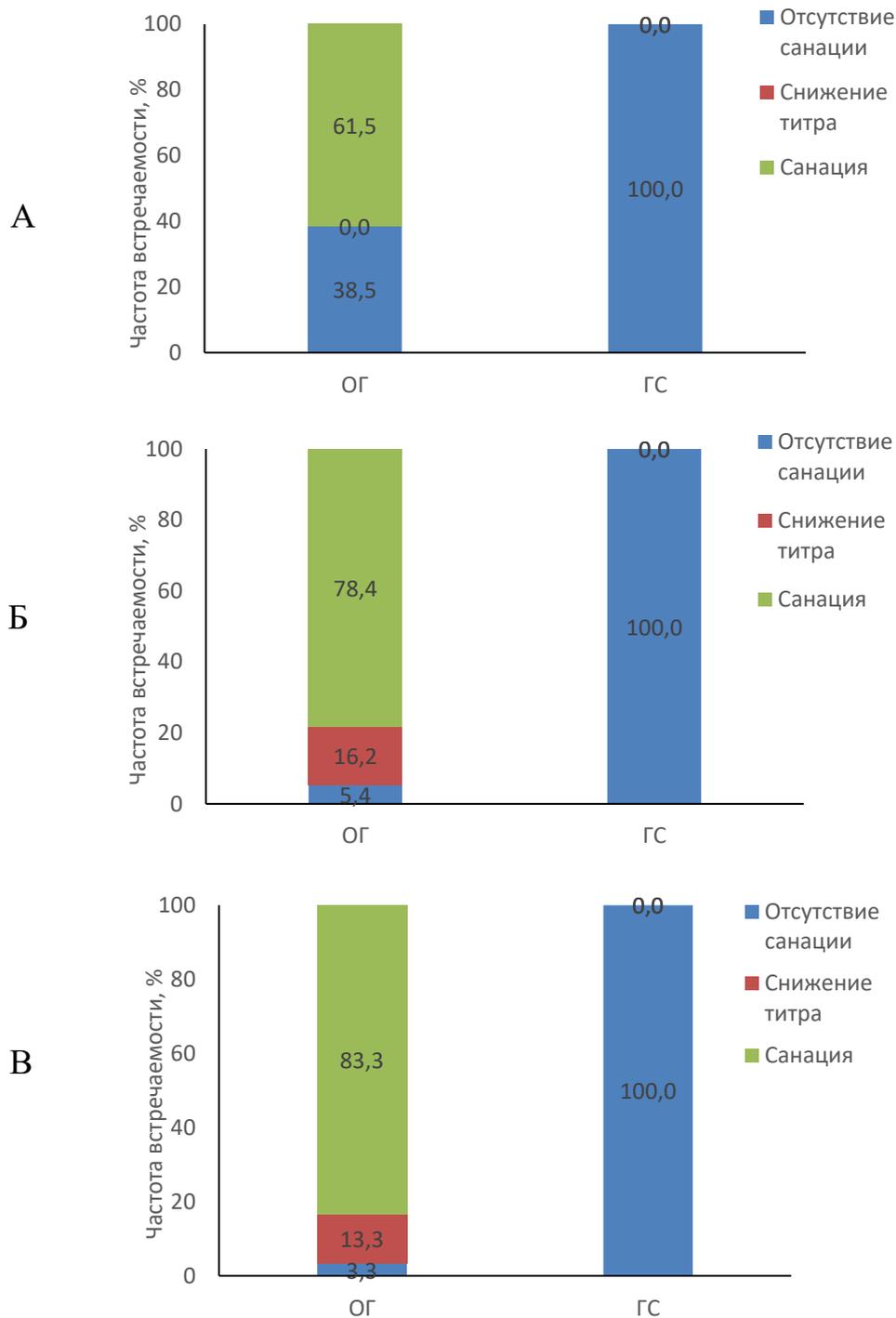


Рисунок 5.5 - Частота встречаемости различных эффектов (микробиологическая эффективность) в результате применения бактериофагов, специфичных в отношении различных патогенных микроорганизмов.

А – *A. baumannii*, Б – *K. pneumoniae*, В – *P. aeruginosa*

Наименее эффективны бактериофаги к *A. baumannii*, фаготерапия которыми приводит к санации 61,5% пациентов, а у остальных 38,5% отсутствует снижение титра и элиминация микроорганизмов.

Таблица 5.2 – Частота встречаемости различных эффектов (микробиологическая эффективность) в результате применения бактериофагов, специфичных в отношении различных микроорганизмов (%)

Эффект применения бактериофагов	Опытная группа	Группа сравнения	Статистическая значимость, $p < 0,05$
Суммарно по всем использованным фагам			
Отсутствие санации	11,0	100	$p < 0,01$
Снижение титра	12,2	0	$p < 0,01$
Санация	76,8	0	$p < 0,01$
<i>A. baumannii</i>			
Отсутствие санации	38,5	100	$p < 0,01$
Снижение титра	0,0	0	1
Санация	61,5	0	$p < 0,01$
<i>K. pneumoniae</i>			
Отсутствие санации	5,4	100	$p < 0,01$
Снижение титра	16,2	0	$p < 0,01$
Санация	78,4	0	$p < 0,01$
<i>P. aeruginosa</i>			
Отсутствие санации	3,3	100	$p < 0,01$
Снижение титра	13,3	0	$p < 0,01$
Санация	83,3	0	$p < 0,01$

Примечание. Полужирным курсивом выделены значения, имеющие статистическую значимость, рассчитанную по критерию согласия Пирсона (χ^2)

Из таблицы 5.2 видно, что в подавляющем большинстве случаев различия между опытной группой и группой сравнения по частоте встречаемости различных эффектов (отсутствию санации, снижению титра

микроорганизмов и элиминации микроорганизмов) статистически значимы, за исключением снижения титра *A. baumannii*, которое не наблюдалось ни в опытной группе, ни в группе сравнения.

Таким образом, применение бактериофагов эффективно в борьбе с патогенной микрофлорой у пациентов ОРИТ. Наибольшую эффективность показывает бактериофаг к *P. aeruginosa*.

Применение бактериофагов у пациентов ОРИТ может снижать риск летальных исходов, что связано с эффективной элиминацией аутогенной микрофлоры.

Для оценки динамики основного заболевания сравнили частоту встречаемости исходов основного заболевания в опытной и контрольной группах (клиническая эффективность). Результаты представлены на рисунках 5.6, 5.7 и в таблице 5.3.



Рисунок 5.6 – Частота встречаемости различных эффектов (клиническая эффективность) в результате применения бактериофагов у пациентов ОРИТ

А – опытная группа, Б – группа сравнения

На рисунке 5.6 показано, что в целом при применении бактериофагов улучшение наступает у 77% пациентов, ухудшение — у 16%, а в 7% случаев наступает летальный исход. В группе сравнения только в 29% случаев наблюдается улучшение, а в 60% – ухудшение состояния пациентов. У 11% пациентов отмечается летальный исход.

На рисунке 5.7 показано, что применение бактериофагов, специфичных в отношении *K. pneumoniae*, является наиболее эффективным по исходу

основного заболевания, так как у 75,7% пациентов наблюдается динамика в сторону улучшения, а в группе сравнения – только у 25%, что в 3 раза меньше.

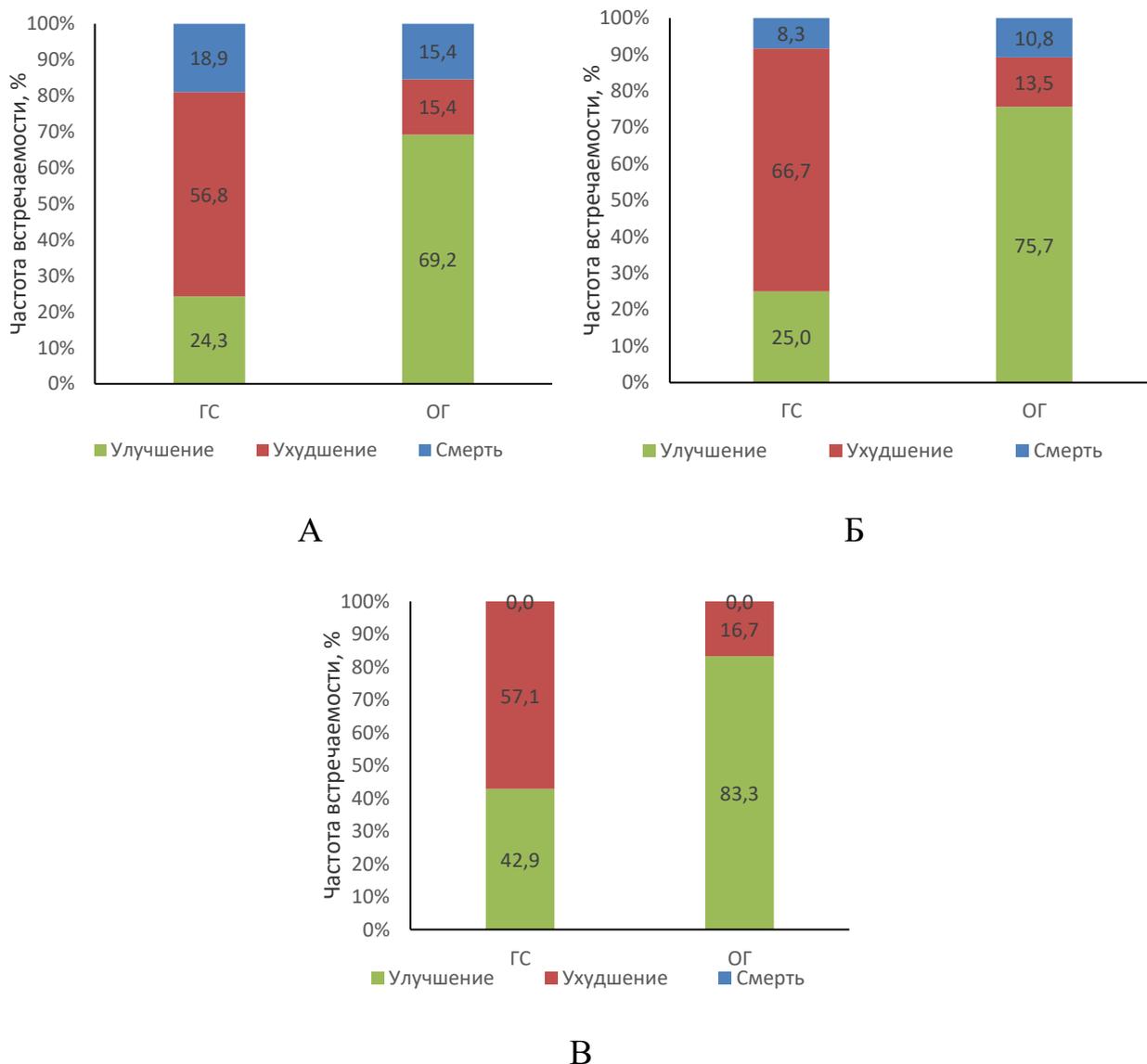


Рисунок 5.7. - Частота встречаемости различных эффектов (клиническая эффективность) в результате применения бактериофагов, специфичных в отношении различных патогенных микроорганизмов
А – *A. baumannii*, Б – *K. pneumoniae*, В – *P. aeruginosa*

Несколько менее эффективны по отношению к исходу основного заболевания бактериофаги, лизирующие *A. baumannii*, так как улучшение наблюдается у 69,2% пациентов, а в группе сравнения – у 24,3%, что в 2,8 раза ниже. Наименее эффективны бактериофаги к *P. aeruginosa*, которые способствуют

улучшению состояния у 83,3% пациентов, а в группе сравнения – у 42,9%, что в 1,9 раза ниже.

В таблице 5.3 показано, что различия между опытной группой и группой сравнения по частоте встречаемости основных исходов (за исключением летальных) статистически значимы для всех микроорганизмов, причем преимущественное улучшение характерно для опытной группы, а ухудшение для группы сравнения.

Таблица 5.3 – Частота встречаемости различных исходов в отношении основного заболевания в результате применения бактериофагов, специфичных к различным микроорганизмам (%)

Исход основного заболевания	Опытная группа	Группа сравнения	Статистическая значимость, $p < 0,05$
Суммарно по всем использованным фагам			
Улучшение	77,5	29,3	<i>$p < 0,01$</i>
Ухудшение	15	59,8	<i>$p < 0,01$</i>
Смерть	7,5	11	0,416
<i>A. baumannii</i>			
Улучшение	69,2	24,3	<i>$p < 0,01$</i>
Ухудшение	15,4	56,8	<i>$p < 0,01$</i>
Смерть	15,4	18,9	0,55
<i>K.pneumoniae</i>			
Улучшение	75,7	25	<i>$p < 0,01$</i>
Ухудшение	13,5	66,7	<i>$p < 0,01$</i>
Смерть	10,8	8,3	0,567
<i>P.aeruginosa</i>			
Улучшение	83,3	42,9	<i>$p < 0,01$</i>
Ухудшение	16,7	57,1	<i>$p < 0,01$</i>
Смерть	0	0	1

Примечание. Полужирным курсивом выделены значения, имеющие статистическую значимость, рассчитанную по критерию согласия Пирсона (χ^2)

Таким образом, применение бактериофагов положительно влияет на динамику исходов основного заболевания у пациентов ОРИТ. В большей степени это показано для бактериофага к *K.pneumoniae*.

Сравнили абсолютный и относительный риски летального исхода по частоте встречаемости случаев применения бактериофагов и количеству

летальных исходов. Исследовали вероятность события, которая измеряется по формуле:

$$AR = \frac{a}{A}$$

где AR – вероятность события;

a – количество пациентов для которых наступило событие;

A – число пациентов в группе

Доверительный интервал рассчитывается по формуле:

$$CI = t \cdot \sqrt{\frac{AP \cdot (1 - AP)}{A}}$$

где CI – Доверительный интервал;

t – критическое значение, задаваемое для различной степени значимости. Для 95% - t=1,96.

AR – вероятность;

A – число пациентов в группе

Для оценки влияния коррекционных мероприятий оценили разницу вероятностей на 1 и 2 стадии исследования и отношение вероятностей, а для оценки статистической значимости оценили доверительный интервал отношения.

Отношение вероятностей в экспериментальной группе к отношению вероятностей в контрольной группе рассчитывается по формуле:

$$RR = \frac{EER}{CER}$$

где RR – отношение вероятностей;

EER – вероятность события в основной группе;

CER – вероятность события в контрольной группе

В простом сравнении между опытной и контрольной группами:

- Отношение вероятностей равно 1 значит, что нет разницы в риске между двумя группами
- Отношение вероятностей < 1 значит, что в экспериментальной группе событие развивается реже, чем в контрольной

- Отношение вероятностей > 1 значит, что в экспериментальной группе событие развивается чаще, чем в контрольной.

Для отношения вероятностей рассчитывается доверительный интервал по формуле:

$$CI = t \cdot \sqrt{F \cdot (1 - F) \cdot \left(\frac{1}{A} + \frac{1}{B}\right)}$$

где $RR \pm CI$ – Доверительный интервал;

- t – критическое значение, задаваемое для различной степени значимости. Для 95% - $t=1,96$.
- F – суммарная вероятность в контрольной и опытной группах отнесенное к суммарной численности исследуемых групп;
- A – число пациентов в опытной группе
- B – число пациентов в контрольной группе.

Если в границы доверительного интервала входит 1, то отмечается отсутствие статистической значимости отношения вероятностей.

Результаты, представленные в таблице 5.4, демонстрируют, что в опытной группе в 1,5 раза ниже риск летального исхода. Доверительный интервал отношений вероятностей группы сравнения и опытной группы ($1,5 \pm 0,088$) изменяется от 1,412 до 1,588, то есть 1 (отношение рисков 1:1) в доверительный интервал не входит. Это является показателем статистической значимости более высокого риска летального исхода в группе сравнения относительно опытной группы.

Таблица 5.4 - Сравнение рисков летального исхода при применении бактериофагов у пациентов ОРИТ

	Вероятность, ед.		Отношение вероятностей	
	Опытная группа	Группа сравнения	Группа сравнения / опытной группа	Статистическая значимость, $p < 0,05$
Летальный исход	$0,073 \pm 0,056$	$0,11 \pm 0,068$	$1,5 \pm 0,088$	$p < 0,05$

Результаты исследования биохимических показателей воспалительного процесса в крови у пациентов ОРИТ представлены в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Биохимические показатели воспалительного процесса у пациентов опытной группы и группы сравнения (ед. изм. см. в таблице 2.6).

Параметры	1 этап	2 этап	Корреляция	Статистическая значимость, р
Опытная группа				
СРБ	31,275 [18,5 - 81,1]	55,7 [19 - 121]	0,756	0,001
Прокальцитонин	0,365 [0,29 - 0,44]	0,45 [0,42 - 0,47]	0,666	0,0002
Креатинин	53 [42 - 72]	70 [48 - 93]	0,469	0,034
Мочевина	5,25 [2,8 - 8,2]	5,75 [3,3 - 7,8]	0,834	0,390
Лейкоциты	10,07 [7,56 - 13,4]	11 [7,6 - 17,36]	0,528	0,021
Группа сравнения				
СРБ	31,45 [19 - 82,05]	55,7 [20 - 121]	0,751	0,001
Прокальцитонин	2,7 [0,0875 - 4,4]	3,2 [2,4 - 5,8]	0,602	0,016
Креатинин	54 [43 - 72]	65 [42 - 95]	0,462	0,050
Мочевина	5,25 [2,8 - 8,2]	5,75 [3,3 - 7,8]	0,834	0,390
Лейкоциты	10,07 [7,56 - 13,4]	11 [7,6 - 17,36]	0,528	0,021

Примечание. Полужирным курсивом обозначены статистические значимые показатели корреляции и разницы выборок, рассчитанные по парному критерию Вилкоксона.

В таблице 5.5 показано, что в опытной группе и группе сравнения для СРБ, прокальцитонина и лейкоцитов характерно увеличение их содержания в крови, что подтверждается прямой статистически значимой корреляцией и значением парного критерия Вилкоксона ($p < 0,05$). Увеличение содержания креатинина в опытной группе не подтверждается статистически значимой корреляцией. Тенденция роста концентрации мочевины в крови, которая следует из прямой корреляции в опытной группе и группе сравнения не имеет статистической значимости по парному критерию Вилкоксона.

Сравнение биохимических показателей крови опытной группы и группы сравнения представлены в таблице 5.6.

Таблица 5.6 – Сравнение биохимических показателей воспалительного процесса у обследуемых групп пациентов (ед. изм. см. в таблице 2.6).

Параметры	Опытная группа	Группа сравнения	Статистическая значимость, p
1 этап			
СРБ	31,28 [18,5 - 81,1]	31,45 [19 - 82,05]	0,880
Прокальцитонин	0,365 [0,29 - 0,44]	2,7 [0,0875 - 4,4]	0,059
Креатинин	53 [42 - 72]	54 [43 - 72]	0,903
Мочевина	5,25 [2,8 - 8,2]	5,25 [2,8 - 8,2]	0,998
Лейкоциты	10,07 [7,56 - 13,4]	10,07 [7,56 - 13,4]	0,998
2 этап			
СРБ	55,7 [19 - 121]	55,7 [20 - 121]	0,866
Прокальцитонин	0,45 [0,42 - 0,47]	3,2 [2,4 - 5,8]	<0,01
Креатинин	70 [48 - 93]	65 [42 - 95]	0,950
Мочевина	5,75 [3,3 - 7,8]	5,75 [3,3 - 7,8]	0,998
Лейкоциты	11 [7,6 - 17,36]	11 [7,6 - 17,36]	0,998

Примечание. Полужирным курсивом обозначены статистические значимые показатели разницы выборок, рассчитанные по U-критерию Манна - Уитни.

В таблице 5.6 показано, что в опытной группе и группе сравнения на 1 этапе показатели не имеют статистически значимой разницы, то есть выборки однородны. На 2 этапе, после проведенной терапии, все показатели также не имеют статистической значимой разницы кроме содержания прокальцитонина, которое более выражено повышается в опытной группе.

Проведено сравнение изменений биохимических показателей в исследуемых группах по частотам встречаемости выше референсных значений нормы. Результаты представлены в таблице 5.7.

В таблице 5.7 показано, что количество образцов с повышенным содержанием прокальцитонина разное в опытной группе и группе сравнения, как на 1, так и на 2 этапе, и эти различия статистически значимы. При этом

статистически значимых изменений частот встречаемости количества образцов с повышенным уровнем прокальцитонина между 1 и 2 этапом ни в опытной группе, ни в группе сравнения не происходит. Таким образом, сохраняется неоднородность групп. Количество образцов с повышенным содержанием креатинина относительно референсных значений статистически значимо увеличивается от первого этапа ко второму в обеих группах. При этом на 1 и на 2 этапе между группами нет статистически значимой разницы.

Таблица 5.7 – Частота встречаемости превышения референсных значений биохимических показателей воспалительного процесса у пациентов обследуемых групп

Параметры	1	2	Статистическая значимость (p) при сравнении 1 и 2 этапа	Статистическая значимость (p) различий между группами на 1 этапе	1	2	Статистическая значимость (p) при сравнении 1 и 2 этапа	Статистическая значимость (p) различий между группами на 2 этапе
	этап, %	этап, %			этап, %	этап, %		
	Опытная группа				Группа сравнения			
СРБ	95,5	97,2	0,903	0,902	93,8	97,1	0,811	0,994
Прокальцитонин	14,5	19,2	0,418	<i>p<0,01</i>	57,1	79,5	0,055	<i>p<0,01</i>
Креатинин	0	9,7	0,002	1,000	0	11,1	0,001	0,759
Мочевина	24,1	21,2	0,667	1,000	24,1	21,2	0,667	1,000
Лейкоциты	95,5	97,2	0,903	0,902	93,8	97,1	0,811	0,994

Примечание. Полужирным курсивом обозначены статистически значимые показатели разницы выборок, рассчитанные по критерию согласия Пирсона - χ^2 , для $p < 0,05$.

5.3 2. Оценка безопасности применения бактериофагов для пациентов ОРИТ

Оценку безопасности фаготерапии проводили по следующим показателям:

- частота возникновения серьезных нежелательных явлений (СНЯ) и нежелательных явлений (НЯ), возникших в ходе исследования;

- анализ результатов лабораторных исследований (общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи);
- анализ результатов физикальных обследований.

Контроль за возможным развитием НЯ и СНЯ проводился на приемах: втором, третьем, четвертом и заключительном.

К СНЯ относили летальный исход, угрозу для жизни пациента, увеличение срока госпитализации. НЯ в рамках данного исследования являлись отклонения лабораторных параметров, клинические проявления.

Так как все пациенты, включенные в данное исследование, имеют сопутствующие патологии и находятся в отделениях ОРИТ, то необходимо выявить критерии, по которым можно связать возникновение и развитие нежелательного явления с проведением фаготерапии. К таким критериям относили четкую временную связь между прекращением применения препарата бактериофага или снижением дозы и исчезновением НЯ, а также, если НЯ возникает при повторных курсах фаготерапии.

При проведении фаготерапии 160 пациентам за все время исследования не было достоверно выявлено наличия НЯ и СНЯ. Таким образом, подтверждено, что применение бактериофагов для лечения пациентов, страдающих ИСПМ, безопасно.

5.3.3. Примеры клинических случаев

Пациент 1. Диагноз пациента - перелом зубовидного отростка С2 позвонка. После стабилизирующей операции – атланта-аксиальный спондилодез с использованием фиксатора с эффектом памяти – развились гнойно-септические осложнения. Проведенная на первом этапе антибиотикотерапия ванкомицином и меропенемом не привела к купированию осложнений. Из раневого отделяемого выделена *Klebsiella pneumoniae*. Бактерия показала отсутствие чувствительности к широкому спектру антибиотиков: ампициллину, сульбактаму, гентамицину, цефуроксиму, тобрамицину, цефуроксиму/аксетилу, налидиксовой кислоте, цефокситину,

ципрофлоксацину, цефтазидиму, тетрациклину, цефтриаксону, цефоперазону/сульбактаму, нитрофурантоину, цефепиму, хлорамфениколу, имипенему/циластатину и триметоприму. Имела чувствительность к амикацину и тигециклину. На следующем этапе лечения проводили следующую терапию: тигециклин+бактериофаг+вакуум-аспирация раневого отделяемого (ЛФ бактериофагов: перорально + экспозиция губки, пропитанной раствором для местного применения, в ране). Пероральное и местное использование подобранных по чувствительности и титру бактериофагов, а именно KPV811, на втором этапе комплексного антибактериального лечения позволило добиться положительного терапевтического эффекта, послеоперационная рана спокойная, зажила первичным натяжением, дефект от раневого дренажа слева затягивается вторичным натяжением, после чего пациент был выписан.



Рисунок 5.8 - Открытая, в условиях перевязочной, операционная рана

Пациент 2. Диагноз – открытая черепно-мозговая травма, перелом 9 ребра справа с ушибом легких, эмпиема плевры, признаки двухсторонней пневмонии, бронхиальный лаваж. На первом этапе проводили антимикробную терапию меропенемом, эртапенемом и колистином. Наблюдалось резкое ухудшение дыхательной функции, жидкость в плевральной полости. После дренирования (гнойная жидкость за весь период наблюдения – около 6 л) из гнойного отделяемого выделена *Klebsiella pneumoniae*. Бактерия показала отсутствие чувствительности к широкому спектру антибиотиков: ампициллину, сульбактаму, цефуроксиму, тобрамицину,

цефуроксиму/аксетилю, налидиксовой кислоте, цефокситину, ципрофлоксацину, цефтазидиму, тигециклину, тетрациклину, цефтриаксону, цефоперазону/сульбактаму, нитрофурантоину, цефепиму, хлорамфениколу, имипенему/циластатину и триметоприму. Имела чувствительность частичную к амикацину и гентамицину. На следующем этапе проводили антиминокробную терапию теми же препаратами, но дополнительно внутривентрично через зонд вводили препарат бактериофага, представляющий собой коктейль из KPV811 и KPV15. После лечения пациент был выписан.



Рисунок 5.9. - Эмпиема плевры. Признаки 2-х-сторонней пневмонии.

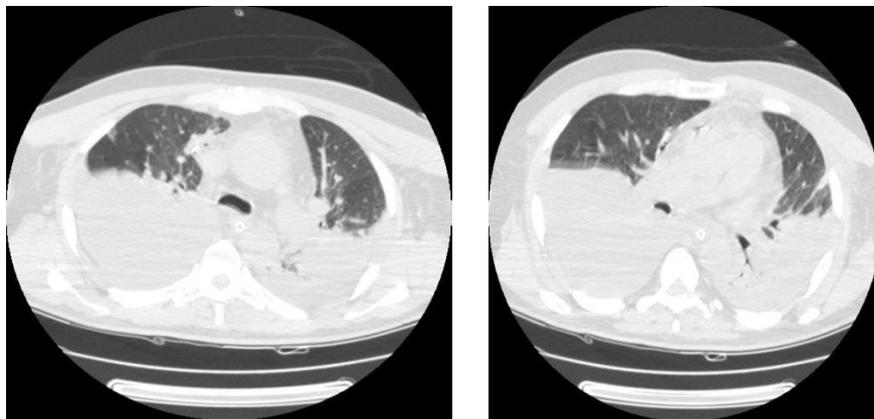


Рисунок 5.10 - Компьютерная томография плевральной полости до фаготерапии

Пациент 3. У пациента на фоне онкологического заболевания диагностирована двусторонняя полисегментарная нижнедолевая пневмония, осложненная эмпиемой плевры. При микробиологическом исследовании содержимого плевральной полости высеяны *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Назначенная антибактериальная терапия: цефотаксим и имипенем, в сочетании с промыванием и дренированием плевральной полости методом

активной аспирации, не привела к положительному результату, в образцах клинического материала остается рост *K. pneumoniae*. Добавление в комплексную антибактериальную терапию подобранного в соответствии с персонализированным алгоритмом бактериофага против *K. pneumoniae* (коктейль из KPV811 и KPV15) при введении через зонд внутривентрикулярно не приводит к элиминации возбудителя. На следующем этапе лечения назначают колистин с меропенемом и препарат бактериофага вводят внутривентрикулярно. На фоне терапии происходит повышение уровня лабораторных показателей воспаления, фиксируется гектическая температура, что можно объяснить реакцией организма на массивный бактериолиз *in situ* после введенного в полость с учетом оптимального соотношения множественности инфицирования фага. На консилиуме было принято решение продолжить лечение бактериофагом. В результате удалось санировать вентрикулярную полость от указанного возбудителя.

Пациент 4. Диагноз - ишемический (тромбоэмболический) инсульт в бассейне правой средней мозговой артерии, внутримозговая гематома, полость абсцесса с признаками кольцевидного патологического контрастирования по периферии. Микробиологическое исследование (ЭТА и содержимое полости абсцесса) выявило *Klebsiella pneumoniae*. На первом этапе антибактериальная терапия проводилась меропенемом и колистином, которым возбудитель чувствителен. Однако после повторного микробиологического исследования (ЭТА и содержимого полости абсцесса) по-прежнему высевалась *Klebsiella pneumoniae*. К проводимой терапии добавили внутривентрикулярное введение препарата бактериофага, однако это тоже не привело к улучшениям. Было принято решение вводить препарат бактериофага в полость абсцесса мозга, после чего произошла элиминация *Klebsiella pneumoniae*. Пациент выписан после удаления гематомы и иссечения абсцесса без опасения генерализации инфекционного процесса.

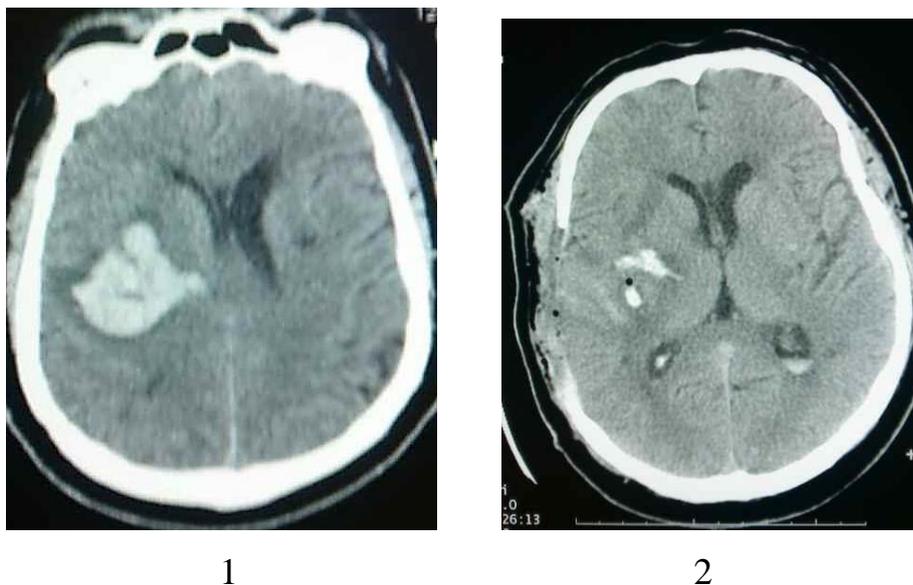


Рисунок 5.11 - Компьютерная томография головного мозга до (1) и после фаготерапии (2). Внутримозговая гематома. Полость абсцесса с признаками кольцевидного патологического контрастирования по периферии.

Пациент 5. У пациента запущенная флегмона передней брюшной стенки, вскрытие и последующее дренирование которой вместе с медикаментозной терапией на фоне прогрессирования инфекционного процесса привели к неклостридиальному некротическому целлюлофасциомиозиту передней брюшной стенки и левой поясничной области. В раневом отделяемом – *S. aureus* (MRSA-штамм). Проведение комплексной эндолимфатической иммуно-антибактериальной терапии – меропенем, метрогил, полиоксидоний, циклоферон, галавит, клиндамицин, гепарин, бактериофаг – включавшей применение бактериофага, подобранного по чувствительности к возбудителю (коктейль из SCH111 и SCH1) и в необходимом титре для нанесения на повязки и внутримышечное обкалывание по краям раны, привели к полному выздоровлению и выписке пациента.



Рисунок 5.12 - Неклостридиальный некротический целлюлофасциомиозит передней брюшной стенки, левой поясничной области в процессе (1) и после лечения

Пациент 6. У больного с диабетической стопой в раневом содержимом был обнаружен панрезистентный штамм *A. baumannii*. Применение в комплексной терапии обкалывания мягких тканей по краям раны бактериофагом (коктейль из AP22 и AP24), активным в отношении высеянного штамма возбудителя, позволило после элиминации патогена провести ампутацию и зашить рану.



1

2

Рисунок 5.13 - Синдром диабетической стопы, смешанная форма. Стопа Шарко. Остеомиелит костей предплюсны. Патологический поперечный перелом правой стопы до (1) и после лечения

Пациент 7. Пациент с множественными переломами костей голени, осложнившимися свищевой формой остеомиелита, перенесший во второй

половине 2018 года 4 операции. Назначенная антибактериальная терапия: цефтриаксон и метрогил, а позднее и меропенем – была признана безрезультатной. Обсуждался вопрос о возможной ампутации голени. Однако было принято решение о назначении высокообъемной прямой эндолимфатической антибактериальной терапии (клиндомицин, меропенем и метрогил) и проведении пятой операции, заключавшейся в перемонтаже аппарата Илизарова, санации остеомиелитического очага, удалении костно-цементных бус, установлении системы лечения ран отрицательным давлением (т.н. VAC-терапия). Дополнительное введение предварительно подобранного по чувствительности к MRSA-штамму и с учетом титра высеваемого возбудителя бактериофага через трубчатый дренаж в область санированного остеомиелитического очага (коктейль SCH1 и SCH111), а также обкалывание тем же фагом мягких тканей по краям раны позволило купировать инфекционный процесс и выписать пациента на долечивание по месту жительства.

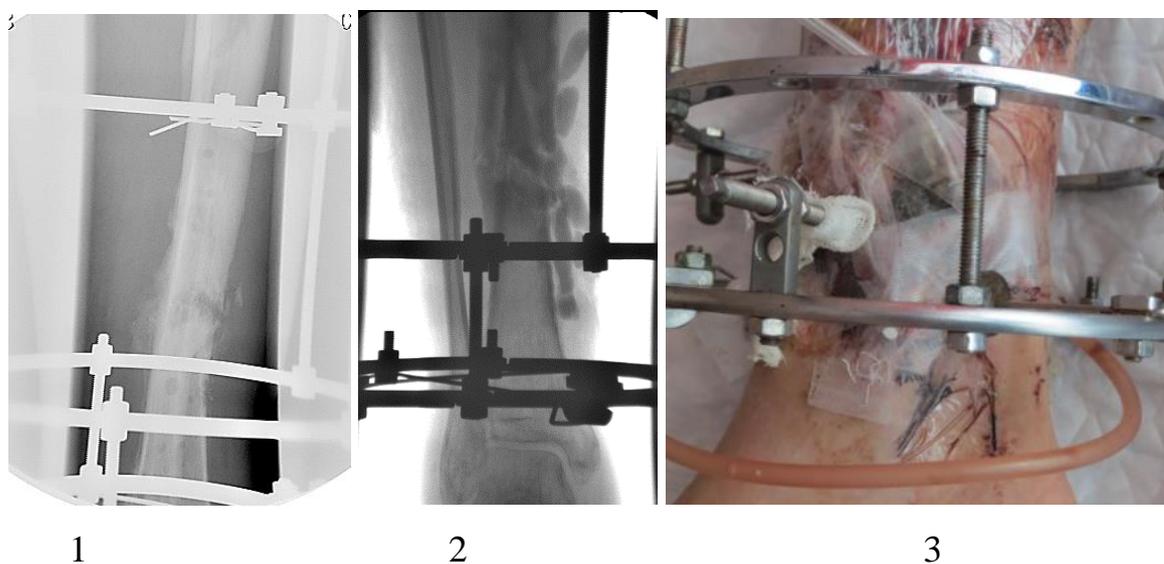


Рисунок 5.14 - Открытый неконсолидированный перелом н/3 правой большеберцовой кости со смещением. Многооскольчатый консолидированный перелом в/3 правой малоберцовой кости со смещением отломков. Консолидированный перелом заднего края дистального метаэпифиза большеберцовой кости. Рентген до лечения (1), после перемонтажа аппарата Илизарова (2) и внешний вид (3)

Проводили лечение препаратами бактериофагов пациентов отделения кардиоторакальной хирургии Ганноверской медицинской школы. Ниже приведены примеры лечения трех пациентов.

Пациент 8 страдал от инфицированного трансплантата аорты после диссекции по Стэнфорду типа А с подтвержденным положительным на *S. aureus* посевом крови и ПЭТ-КТ (рисунок 5.15). Инфекция не отвечала на обычную терапию антибиотиками. Пациент получал фаги через дренаж, установленный под контролем КТ рядом с зараженным трансплантатом. После последнего применения фага образцы культуры крови не содержали *S. aureus*. Сканирование с помощью ПЭТ-КТ, полученное через 7 месяцев после фаготерапии, не выявило признаков инфекции имплантата.

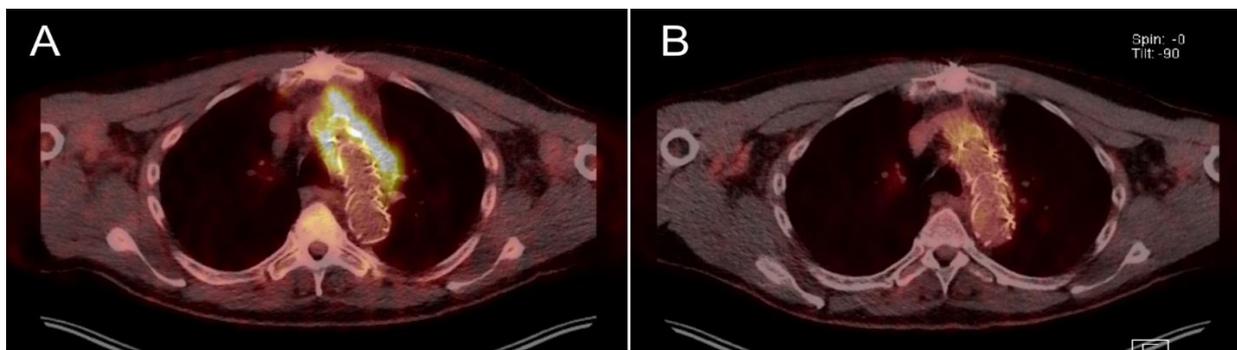


Рисунок 5.15 - Результаты ПЭТ-КТ пациента до (А) и через семь месяцев после (В) фаготерапии в области протеза аорты. Эмиссия желтого цвета показывает накопление меченного вещества (2-[18F]флюоро-2-дезоксид-глюкоза), что соответствует наличию воспаления.

Пациент 9 с молниеносной левосторонней эмпиемой плевры, вызванной *S. aureus*, после имплантации вспомогательного устройства для левого желудочка (LVAD). Рисунок 5.16 иллюстрирует степень воспаления в зараженной области, несмотря на терапию антибиотиками. Бактериофаги вводили дважды в день в течение 5 суток через дренаж, установленный во время операции по поводу декорткации эмпиемы. После фаготерапии в посевах из раневого отделяемого бактерий обнаружено не было. LVAD оставался незараженным, что было отражено на ПЭТ-КТ через два месяца после фаготерапии.

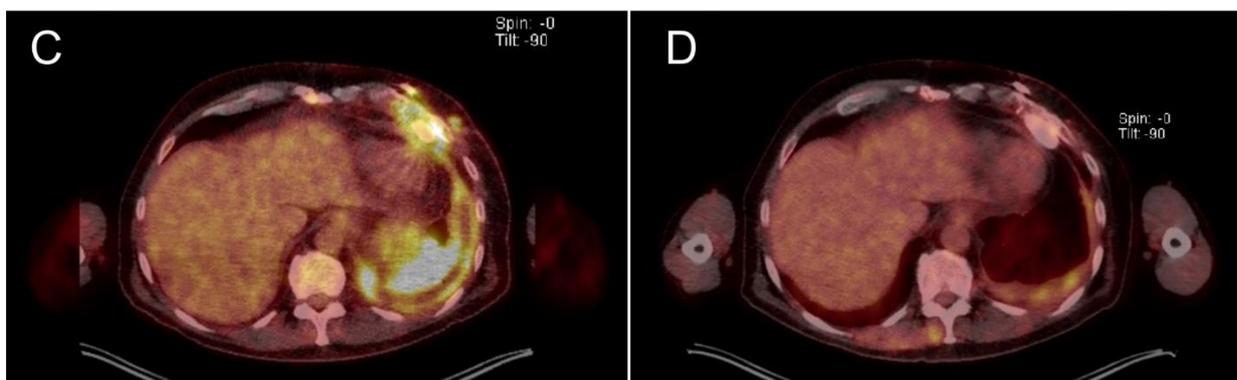


Рисунок 5.16 - Результаты ПЭТ-КТ пациента до (С) и через два месяца после (D) фаготерапии в области устройства поддержки левого желудочка и полости эмпиемы плевры. Эмиссия желтого цвета показывает накопление меченого вещества (2-[18F]флюоро-2-дезоксид-глюкоза), что соответствует наличию воспаления.

Пациент 10 имел легочную инфекцию *Klebsiella pneumoniae* после трансплантации сердца. Режим иммуносупрессии пациента состоял из микофеноловой кислоты, такролимуса и преднизолона. Антибиотикограмма клебсиеллы, выделенной из легких и кишечника, показала пан-резистентность к воздействию всех соответствующих антибиотиков. Фаги применяли один раз в день путем ингаляции и через назогастральный зонд в течение двух дней. Впоследствии частота фаготерапии увеличилась до двух раз в день еще на два дня. После фаготерапии *K. pneumoniae* не была обнаружена в образцах бронхиального лаважа, но была обнаружена в образцах стула. Однако, в отличие от пан-резистентного штамма, вызвавшего инфекцию легких, штамм *K. pneumoniae*, выделенный из стула пациента, был чувствительным к антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ V

Как показали проведенные исследования, применение разработанного алгоритма персонализированной фаготерапии пациентов с ИСМП показало высокую микробиологическую эффективность, которая составила 89%, и лечебную эффективность, значительно (в 1,5 раза) снижался риск летального

исхода у больных с ИСПМ в ОРИТ. Это было достигнуто за счет повышения точности определения чувствительности бактериальных агентов к бактериофагам двухэтапным (спот-тест и модифицированный метод Грациа) тестированием выделенных от пациентов бактерий-мишеней к штаммам бактериофагов; правильным подбором индивидуальных доз бактериофагов с учетом множественности инфицирования и эффективного отношения количества бактериофагов к титру бактерий-возбудителей, высеваемых из очага инфекции; определением способа введения фага и вида лекарственной формы в зависимости от фармакокинетики бактериофагов и локализации очага воспаления.

ГЛАВА VI. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ИСМП

6.1. Конструирование иммуноферментных тест-систем для определения IgG-антител, специфичных в отношении штаммов изучаемых бактериофагов

Для проведения исследований на наличие или отсутствие антифаговых антител были сконструированы и апробированы тест-системы, выявляющие методом ИФА IgG-антитела к штаммам бактериофагов, активных в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

Для разработки иммуноферментных тест-систем были использованы как коммерческие реактивы, так и реагенты, приготовленные в лабораторных условиях. Были подобраны условия иммуноферментной реакции – продолжительность и температура стадий инкубации, концентрация реагентов (положительные контроли, конъюгат), необходимость встряхивания планшета при инкубации. Для выявления связавшегося с сорбированным антигеном иммуноглобулина G использовали конъюгат Protein A-Peroxidase, выбранный на том основании, что содержащийся в нем реагент Protein A стафилококка имеет сродство к иммуноглобулинам G разных видов млекопитающих, в том числе человека и кролика.

Для каждого исследуемого фага предварительно подбирали рабочее разведение конъюгата (диапазон – 1:4000-1:64000) и рабочее разведение кроличьей поликлональной моноспецифической сыворотки (первый положительный контроль), обеспечивающее значение оптической плотности (ОП) положительного контроля в диапазоне 0,4-1,0. В первоначальных исследованиях выявлялись сыворотки крови больных, имеющих IgG-антитела к данному бактериофагу, из которых формировали пул, использованный в

дальнейшем как второй положительный контроль антител к конкретному фагу.

Получение кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток к использованным бактериофагам.

При выполнении исследований по конструированию иммуноферментных тест-систем, выявляющих IgG-антитела к новым штаммам бактериофагов, активных в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, были получены кроличьи поликлональные моноспецифические антифаговые антисыворотки.

Иммунохимическая характеристика кроличьих антисывороток была выполнена с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони, иммуноэлектрофореза (ИЭФ) и в реакции нейтрализации фагов.

Иммунопреципитация по Оухтерлони – один из классических иммунохимических методов – позволил нам убедиться, что иммунизация животных привела к выработке антител к бактериофагам (рисунок 6.1.). В центральные лунки вносили соответствующие антигены-бактериофаги (РА5, АР22, КРV15), а в периферические лунки – сыворотки крови иммунизированных кроликов. Линии преципитации свидетельствуют о специфичности сывороток в отношении исследуемых антигенов. В случае с фагом КРV15 обнаруживается несколько линий преципитации с соответствующей кроличьей антисывороткой, поэтому эта антисыворотка была проанализирована также методом иммуноэлектрофореза. Было выявлено, что антисыворотка содержит как минимум три вида антител к трем различным эпитомам фага (рисунок 6.1).

На примере фагов, лизирующих *S. aureus* и *K. pneumoniae*, и соответствующих антисывороток, показано, что антисыворотки строго специфичны (рисунки 6.2 и 6.3). При взаимодействии бактериофагов SCH1 и КРV15 с антисыворотками, полученными в результате иммунизации другими бактериофагами, линии преципитации отсутствовали.

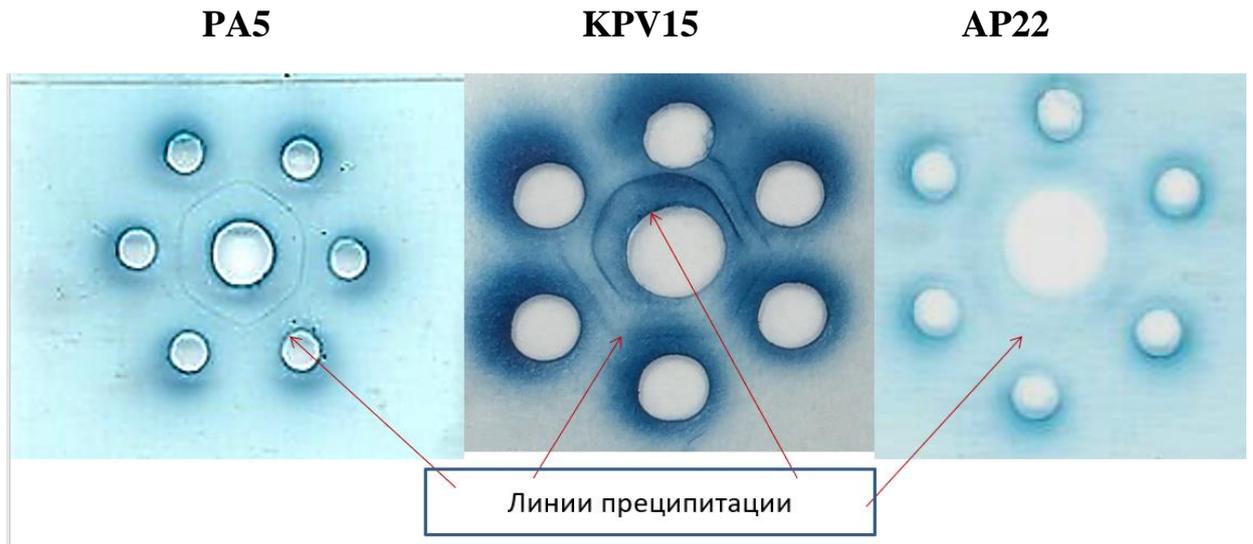


Рисунок 6.1 - Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони

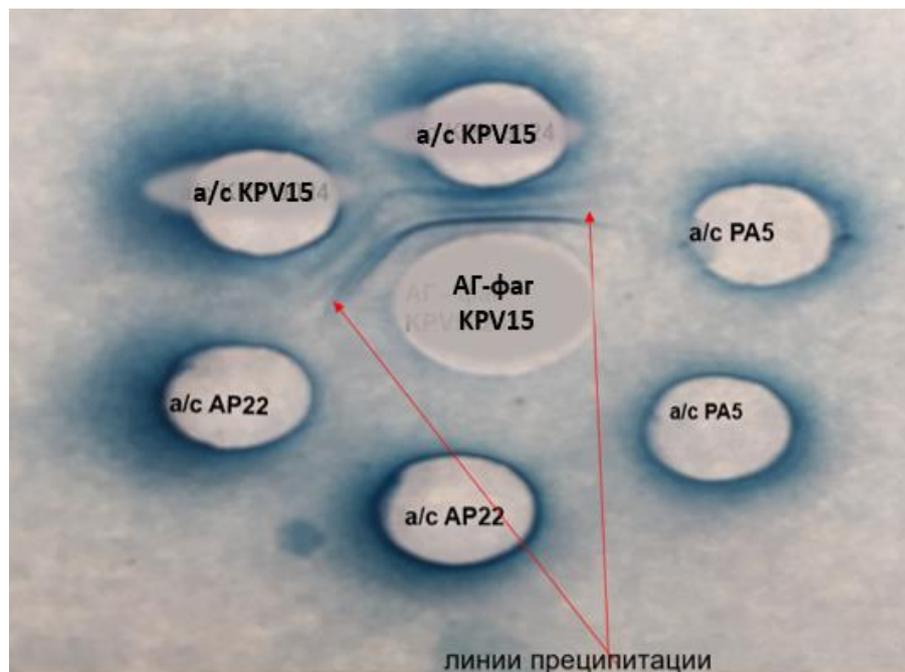


Рисунок 6.2 - Проверка специфичности антисыворотки к фагу KPV15, лизирующему *K. pneumoniae*, методом иммунопреципитации по Оухтерлони (центральная лунка – фаг KPV15 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам KPV15, PA5, AP22)

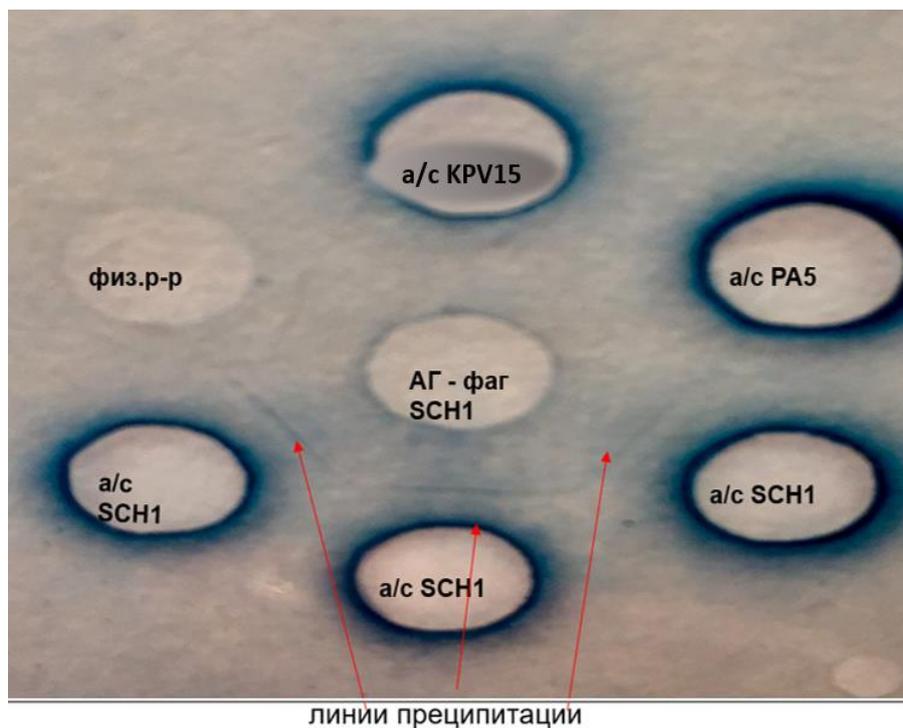


Рисунок 6.3 - Проверка специфичности антисыворотки к фагу SCH1, лизирующему *S. aureus*, методом иммунопреципитации по Оухтерлони (центральная лунка – фаг SCH1 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам SCH1, KPV15, PA5, физ. раствор)

В реакции нейтрализации было показано влияние антител на возможность фага лизировать бактерию-мишень. Инкубация фага с соответствующей антисывороткой приводила к значительному ослаблению (для фага AP22) или даже полному отсутствию (в случае фага PA5) лизиса бактерий, а вот в случае с фагом KPV15 нейтрализующая активность у сыворотки не наблюдалась (рисунок 6.4).

Полученные кроличьи антифаговые антисыворотки были исследованы методом ИФА с помощью сконструированных тест-систем. В качестве примера в таблице 6.1 представлены значения оптической плотности при разных разведениях сывороток, полученных при иммунизации фагами PA5 и AP22. Видно, что разведение до 1:6400 кроличьей антисыворотки к PA5 и до 1:3200 антисыворотки к AP22 – давало оптическую плотность около 0,30, т.е. регистрировалась положительная реакция.

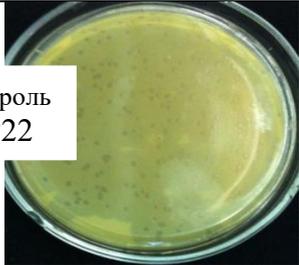
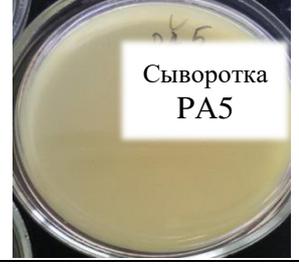
<i>Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)</i>		<i>БОЕ/мл (титр образца по Грация после 30 минной инкубации при температуре 37°C)</i>	
AP22	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10^2	Контроль AP22 
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	5	Сыворотка AP22 
KPV15	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10^3	Контроль KPV15 
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	10^3	Сыворотка KPV15 
PA5	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10^3	Контроль PA5 
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	0	Сыворотка PA5 

Рисунок 6.4 - Результаты реакции нейтрализации литического действия фагов сыворотками крови иммунизированных животных, исходный титр фаголизатов PA 5, AP 22, KPV15 – 10^6 БОЕ/мл

В то же время сыворотка неиммунизированного (интактного) кролика не вызывала появления окрашивания (оптическая плотность на уровне отрицательного контроля – 0,1). Не развивалось окрашивание также в «пустых лунках» (без фага), что подтверждает специфический характер реакции при наличии в иммуноферментной системе всех необходимых элементов (антиген-антитело-конъюгат-субстрат).

Таблица 6.1 - Выраженность иммуноферментной реакции при анализе кроличьих антисывороток к бактериофагам PA5 и AP22 по сравнению с сывороткой крови неиммунизированного кролика (в ед. оптической плотности)

Оптическая плотность, Ед			
Разведение а/с	РА 5	AP22	Сыворотка крови неиммунизированного кролика
	а/с	а/с	
Без разведения	0,89	0,69	0,1
1:100	0,99	0,86	-
1:200	0,94	0,75	-
1:400	0,84	0,63	-
1:800	0,81	0,47	-
1:1600	0,61	0,32	-
1:3200	0,53	0,27	-
1:6400	0,30	0,18	-
1:12800	0,16	0,13	-

В качестве апробации сконструированных тест-систем на наличие антифаговых антител были проанализированы сыворотки крови, полученные от разных контингентов испытуемых, как взрослых, так и детей, а также препараты, полученные из крови человека – «Габриглобин» (представляет собой IgG человека и предназначен для внутривенного введения) и «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (представляет собой комбинацию IgG, IgA и IgM человека, пероральный препарат). Результаты представлены в таблице 6.2. В сыворотках крови детей в возрасте до одного

года антитела не обнаружены, в крови людей, работавших с бактериофагами титры антител более чем в два раза выше (1:128 к PA5, 1:64 к AP22), чем в препаратах «Габриглобин» (1:64 к PA5, 1:32 к AP22) и «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (1:32 к PA5, 1:16 к AP22).

Таблица 6.2 - Апробация сконструированных тест-систем (на примере тест-систем по выявлению IgG-антител к фагам PA5 и AP22), указаны средние титры антител.

<i>Исследуемые образцы</i>	<i>Фаг</i>	
	<i>PA5</i>	<i>AP22</i>
Сыворотки крови лиц, работающих с фагами (n=20)	1:128	1:64
Сыворотки крови детей в возрасте до 1 года (n=40)	Антитела отсутствуют	
«Габриглобин» (внутривенный иммуноглобулиновый препарат) (n=5)	1:64	1:32
«Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (для перорального применения) (n=5)	1:32	1:16

6.2. Определение антифагового иммунного ответа у больных на фоне фаготерапии

Важным аспектом оценки антифагового гуморального иммунитета является не только обнаружение специфических антител, но и выяснение вопроса о том, являются ли эти антитела нейтрализующими фаговую активность в отношении бактерии-мишени, что определяется в реакции нейтрализации. При исследовании в реакции нейтрализации кроличьих антифаговых сывороток было обнаружено (см. выше), что инкубация фагов с соответствующими антисыворотками приводила к значительному ослаблению (в 100 раз в случае фагов AP22 и SCH1) или даже полному отсутствию (в

случае фага PA5) лизиса бактерий, а в случае с фагом KPV15 нейтрализующая активность антисыворотки отсутствовала. Таким образом, было выявлено, что образовавшиеся антитела необязательно обладают свойством нейтрализовать антибактериальную активность фага, что может иметь принципиальное значение при проведении фаготерапии у больных, особенно при повторных курсах.

Результаты исследований выявили, что антитела после первого курса фаготерапии образуются преимущественно против бактериофагов, лизирующих *A. baumannii*, *P. Aeruginosa* и *S.aureus* (таблица 6.3). Результаты исследований так же показали, что образующиеся через три недели после первичного курса фаготерапии, нейтрализующие IgG-антитела штаммоспецифичны (таблица 6.4). Следовательно, замена штаммов при проведении последовательных курсов фаготерапии позволяет поддерживать ее высокую эффективность.

Таблица 6.3 - Характеристика продукции антител у больных ИСМП

Курс фаготерапии	Количество пациентов	Вид бактерии, против которой проводилась терапия	Средний уровень титр антител
Первый	13	<i>A. baumannii</i>	1:16
Второй	5		1:256
Третий	1		1:512
Первый	37	<i>K.pneumoniae</i>	0
Второй	12		1:64
Третий	4		1:128
Первый	30	<i>P.aeruginosa</i>	1:32
Второй	7		1:256
Третий	4		1:1024
Первый	20	<i>S.aureus</i>	1:16
Второй	8		1:128
Третий	2		1:256

В отношении бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*, необходимо отметить, что после первого курса фаготерапии в большинстве случаев

антител зафиксировано не было (таблица 6.5). Выявленные в единичных случаях антитела не обладали нейтрализующей активностью, следовательно, не влияли на эффективность проводимой фаготерапии.

Таблица 6.4. - Штаммоспецифичность IgG-антител к бактериофагам

Номер пациента (курс фаготерапии)	Наименование бактериофага	Наличие титра антител к фагу
лизирующего <i>P. aeruginosa</i>		PA5
Пациент 1 (первый курс) (второй курс)	PA1C	Отр.
	PA1C, PA10	Отр.
Пациент 2 (первый курс) (второй курс) (третий курс)	PA5	1:16
	PA5	1:256
	PA10, PAV 5	1:256
Пациент 3 (первый курс)	PAV5, PA10	Отр.
Пациент 4 (первый курс)	PAV10	Отр.
лизирующего <i>S. aureus</i>		SCH1
Пациент 5 (первый курс) (второй курс)	SCH1, SCH111	1:128
	Sa30, CH1	1:128
Пациент 6 (первый курс) (второй курс)	SCH111, CH1	Отр.
	Sa30	Отр.
лизирующего <i>A. baumannii</i>		AP22
Пациент 6 (первый курс)	AP24	Отр.
(второй курс)	AP22	1:256

Таблица 6.5 - Определение методом ИФА IgG-антител к различным бактериофагам, лизирующим *K. pneumoniae*, после повторных курсов фаготерапии.

Пациент. (к-во курсов).	Штамм фага/АТ, выявляемые методом ИФА	Нейтрализующие антитела в р-ции нейтрализации (используемый в терапии штамм фага)	Нейтрализующие антитела в перекрестной р-ции нейтрализации (не используемый в терапии штамм фага)	Нейтрализующие антитела в перекрестной р-ции нейтрализации (не используемый в терапии штамм фага)	Нейтрализующие антитела в перекрестной р-ции нейтрализации (не используемый в терапии штамм фага)	Нейтрализующие антитела в перекрестной р-ции нейтрализации (не используемый в терапии штамм фага)
1. (1).	KPV 811 -Отс.	KPV 811 -Отс.	KPV 15-Отс.	KPS3 -Отс.	KPV9024- Отс.	Y33Г- Отс.
2. (1)	KPS3 -отс.	KPS3-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPV9024-отс.	Y33Г-отс.
3. (1)	KPV9024 – отс.	KPV9024-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	Y33Г-отс.
4. (1)	Y33Г- отс.	Y33Г-отс.	KPV9024-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.
5. (1)	KPV 811 – отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.	Y33Г-отс.
7. (1)	KPS3 – отс.	KPS3-отс.	KPV 811-отс.	Y33Г-отс.	KPV15-отс.	KPV9024-отс.
8. (1)	KPV9024- отс.	KPV9024-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	Y33Г-отс.
10. (1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
11. (1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
12.(1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
14. (1)	KPS3-отс.	KPS3-отс.	KPV 811-отс.	Y33Г-отс.	KPV15-отс.	KPV9024-отс.
15. (1)	KPV9024-отс.	KPV9024-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс	Y33Г-отс.
16. (1)	KPS3-отс.	KPS3-отс.	KPV 811-отс.	Y33Г-отс.	KPV15-отс.	KPV9024-отс.
17. (1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
18. (1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
19. (1)	Y33Г-отс.	Y33Г-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3-отс.	KPV9024-отс.
20. (1)	KPV 811-отс.	KPV 811-отс.	KPV 15-отс.	KPS3	KPV9024-отс.	Y33Г-отс.

На примере 3-х пациентов, получавших несколько последовательных курсов бактериофагов, лизирующих *Klebsiella pneumoniae*, путем сочетанного внутрижелудочного введения через зонд и инстилляций в инфицированный локус, показано, что иммуноферментным методом были зафиксированы антитела, однако эти антитела не обладали нейтрализующей активностью. Были выявлены пациенты, у которых несмотря на проводимые последовательные курсы одним и тем же штаммом фага антитела зафиксированы не были.

6.3. Изучение параметров клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии

В предыдущем разделе было показано формирование у пациентов специфического гуморального иммунного ответа на бактериофаги, примененные для их лечения. В данном разделе описаны результаты изучения клеточного иммунитета на фоне фаготерапии, поскольку существуют данные об активном влиянии фагов на данное звено иммунитета [135, 195, 224].

6.3.1. Влияние бактериофага на функциональную активность мононуклеаров, выделенных из крови человека

Влияние бактериофага на иммунофенотип лимфоцитов in vitro

Результаты эксперимента по подбору дозы бактериофага при оценке количества активированных лимфоцитов представлены в таблице 6.6.

Подбор дозы для последующего изучения Т-клеточного иммунитета в отношении бактериофагов проводился методом проточной цитометрии. После инкубации лимфоцитов с различными дозами фагов оценивалось количество активировавшихся (экспрессирующих на мембране маркер CD69+) Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Пороговое значение для регистрации увеличения активированных Т-хелперов (CD3+CD4+CD69+) или ЦТЛ (CD3+CD8+CD69+) равно 2%.

Вначале определили, при какой максимальной дозе бактериофага не происходит активации лимфоцитов, о которой свидетельствовало бы повышение экспрессии CD69+ на их поверхности (таблица 6.6).

Таблица 6.6 - Дозозависимость неспецифического стимулирующего влияния бактериофага на лимфоциты здоровых доноров

Доза бактериофага	Количество лимфоцитов здоровых людей, активирующихся при стимуляции бактериофагом (%)
10^7 - 5×10^7 БОЕ/мл	100%
5×10^6 БОЕ/мл	44%
10^6 БОЕ/мл	0

Высокие дозы бактериофагов (10^7 – 5×10^7 БОЕ/мл) вызывали активацию клеток даже у здоровых лиц, никогда не имевших контакта с фагами, в 100% случаев. Промежуточная доза 5×10^6 БОЕ/мл активировала лимфоциты в 44% случаев, а доза 10^6 БОЕ/мл не вызывала активации лимфоцитов у здоровых лиц и была в дальнейшем использована для анализа активированных лимфоцитов у больных. Предполагалось, что активация лимфоцитов в ответ на дозу фага 10^6 БОЕ/мл и одновременное отсутствие активации «посторонним» бактериофагом будет указывать на присутствие в крови пациента антигенспецифических Т-лимфоцитов.

В таблице 6.7 продемонстрировано, что при дозах бактериофага 10^7 - 5×10^7 БОЕ/мл, когда 100% проб проходят пороговое значение положительной реакции, увеличение количества активированных Т-клеток в среднем составляет 3,6-9,7%. При дозе 5×10^6 БОЕ/мл этот порог проходит менее половины проб, и среднее значение количества активированных клеток колеблется от 2,2 до 5,7%. При дозе 10^6 все пробы отрицательны как среди Т-хелперов, так и среди ЦТЛ. Обращает на себя внимание, что в большинстве случаев, активация Т-хелперов выражена слабее, чем ЦТЛ (0,8 против 1,8%, 2,2 против 5,7%, 3,6 против 7,3 %).

Таким образом, после анализа нескольких вариантов концентраций бактериофагов для стимуляции лимфоцитов была подобрана максимальная из возможных концентрация, не вызывающая неспецифическую активацию

лимфоцитов у здоровых людей, не подвергавшихся фаготерапии, – 106 БОЕ/мл.

Таблица 6.7 - Среднее увеличение количества активированных (CD69+) Т-хелперов и ЦТЛ среди лимфоцитов здоровых людей, стимулированных *in vitro* разными дозами бактериофагов

Субпопуляция лимфоцитов крови	Прирост (%) активированных (CD69+) лимфоцитов при различных дозах бактериофага (БОЕ/мл)			
	10^6	5×10^6	10^7	5×10^7
Т-хелперы CD3+CD4+	0,8	2,2	3,6	9,7
ЦТЛ CD3+CD8+	1,8	5,7	7,3	5,6

В качестве апробации использованного подхода к оценке параметров антифагового ответа клеточного звена иммунитета на выраженность экспрессии CD69 и способность к продукции ИФН γ были исследованы лимфоциты, полученные от здоровых добровольцев, пациентов, получающих фаготерапию впервые, и пациентов, проходящих повторные курсы фаготерапии. Образцы лимфоцитов от больных были получены в динамике фаготерапии (до введения каких-либо фагов, через 2 недели и через 6 недель после введения – перед началом следующего курса фаготерапии).

Влияние бактериофага на продукцию цитокинов мононуклеарами *in vitro*

Антигенная (АГ) активация Т-лимфоцитов может быть выявлена также по увеличению продукции ими ИФН γ . Для этого также необходимо было подобрать дозу бактериофага для антигенной стимуляции и выбрать граничное значение показателя, при превышении которого эффект активации может быть с уверенностью зарегистрирован.

В группе здоровых людей, не контактировавших ранее с примененными в исследовании различными бактериофагами, стимуляция лимфоцитов крови высокими дозами фага (10^7 – 5×10^7 БОЕ/мл) вызывала повышение продукции ИФН γ этими клетками на 50-340 пг/мл. При дозе бактериофага 5×10^6 БОЕ/мл в 33% образцов наблюдалось повышение концентрации более чем на 50 пг/мл, а при дозе 10^6 БОЕ/мл – ни в одном образце лимфоцитов, полученном от

здоровых лиц, активация не превышала 50 пг/мл (в среднем она составляла 26 пг/мл). Таким образом, доза бактериофага 10^6 БОЕ/мл была признана оптимальной для обследования больных, а прирост 50 пг/мл ИФН γ – граничным значением для регистрации эффекта антигенной активации.

Хотя исследование АГ-стимулированной продукции ИФН γ , как признака формирования Т-клеточной памяти против бактериофагов, было одной из важнейших задач данного раздела, одновременные изменения в синтезе других цитокинов также были изучены.

Культивирование мононуклеаров, выделенных из крови человека с тем или иным штаммом бактериофага в дозе 10^6 БОЕ/мл стимулирует продукцию этими клетками ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, причем как у пациентов с ИСМП так и у здоровых людей, не принимавших бактериофаги (табл. 6.8). Эти результаты согласуются с данными научной литературы [224].

В таблице 6.8 и ниже на рисунках 6.4, 6.5 стимулирующий эффект бактериофагов на выделенные из крови мононуклеары показан в виде величины прироста концентрации для каждого цитокина (Δ = концентрация в пробе, стимулированной бактериофагом минус концентрация в контрольной пробе).

В таблице 6.8 все концентрации приведены в пикограммах (пг/мл), хотя концентрация ФНО α , ИЛ-1 β превышает ИФН γ на 3 порядка и ее более корректно было бы исчислять не пикограммами (пг/мл), а нанограммами (нг/мл), как и концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8.

Стимуляция мононуклеаров взвесью бактериофага, примененного для терапии, через 1 неделю после начала лечения приводила к подъему концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8

У пациентов на фоне фаготерапии уровень продукции мог претерпевать выраженную динамику (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8) или быть монотонным как у ИЛ-10 (рисунки 6.5, 6.6).

Таблица 6.8 - Стимулирующее влияние бактериофагов на продукцию цитокинов в культурах мононуклеаров, выделенных из крови пациентов с ИСМП на разных сроках фаготерапии

Цитокин	Средний прирост концентрации цитокинов	
	У пациентов на фаготерапии	У здоровых лиц
ИЛ-10	1537,2 ± 89,7	801,7 ± 101,9
ФНО	1469,5 ± 246,5	635,7 ± 57,7
ИЛ-6	17901,4 ± 1026,2	24645,1 ± 987,0
ИЛ-8	39 871,3 ± 978,5	35465,5 ± 1580,9
ИЛ1β	2835,3 ± 128,6	1031,2 ± 87,9
ИФН _γ	17,3 ± 2,1	0
ИФН _α	5,3 ± 1,0	2,6 ± 0,9

В то же время, продукция ИФН_γ у большинства пациентов не увеличивалась, и это обстоятельство представляло контраст с высокой концентрацией других цитокинов в тех же супернатантах: ФНО_α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8. Не зарегистрировано и стимулирующее действие бактериофага на продукцию ИФН_α.

Антиген-стимулированное повышение продукции ИФН_γ в сочетании с иммунофенотипическими признаками активации Т-лимфоцитов (повышение экспрессии CD69+) принято считать признаком формирования Т-клеточного иммунитета к данному антигену. Поэтому данный вопрос был исследован более детально.

До начала 1 курса фаготерапии внесение взвеси бактериофагов в культуру мононуклеаров, выделенных из крови больного, практически не стимулировало повышения секреции ИФН_γ (прирост составлял 1,5–9,4 пг/мл). Значимый прирост концентрации ИФН_γ после первичного курса был зарегистрирован только у 1 больного из 17 (АГ-стимулированная продукция ИФН_γ составила 225 пг/мл на 3й неделе наблюдения), тогда как при повторном курсе уже у 72,7% больных в разные сроки наблюдения регистрируется стимуляция продукции ИФН_γ фагом, примененным для их терапии (таблица 6.9)

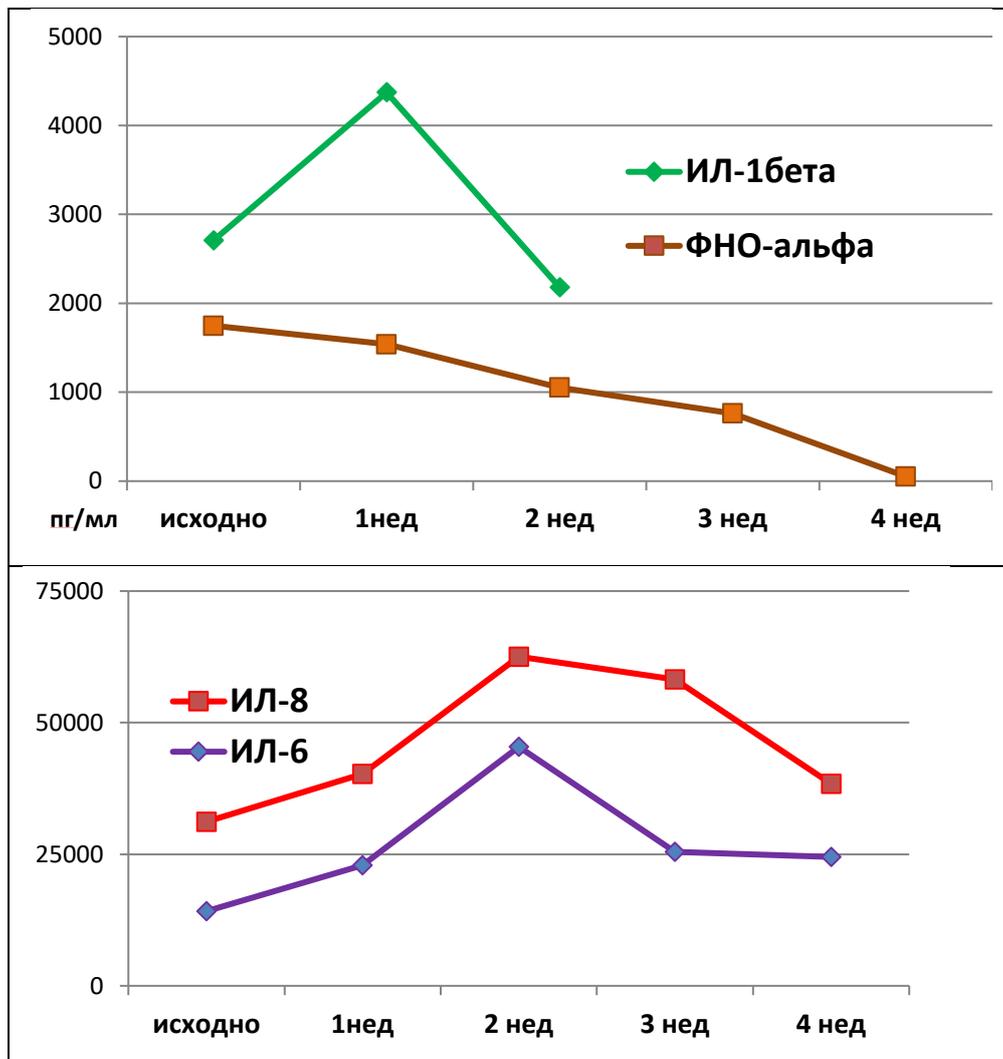


Рис. 6.5 - Влияние антигенов бактериофага на способность мононуклеаров крови пациентов продуцировать провоспалительные цитокины после 1 курса фаготерапии

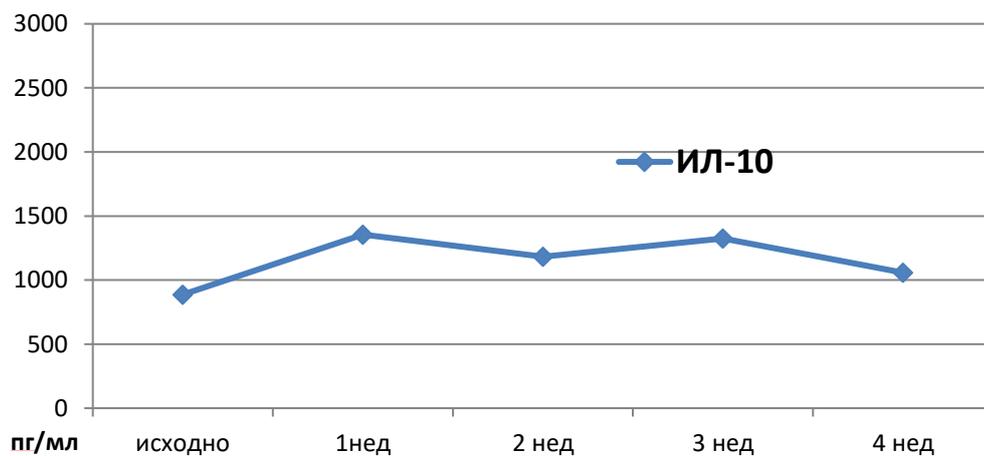


Рис. 6.6 - Влияние антигенов бактериофага на способность мононуклеаров крови пациентов продуцировать противовоспалительные цитокины после 1 курса фаготерапии

Таблица 6.9 - Различия в частоте и интенсивности АГ-активации Т-лимфоцитов у больных при первичном и повторном курсе фаготерапии

	Курс фаготерапии	
	Первичный	повторный
Количество образцов с АГ-стимулированным повышением концентрации ИФН γ , %	5,9	72,7
Средний прирост концентрации ИФН γ , пг/мл	16,8 \pm 13,9	74,2 \pm 28,3*

* значимое отличие от образцов после первичного курса фаготерапии (p<0,05)

Динамика появления АГ-стимулированной продукции ИФН γ при первичных и повторных курсах фаготерапии показаны на рисунках 6.7 и 6.8.

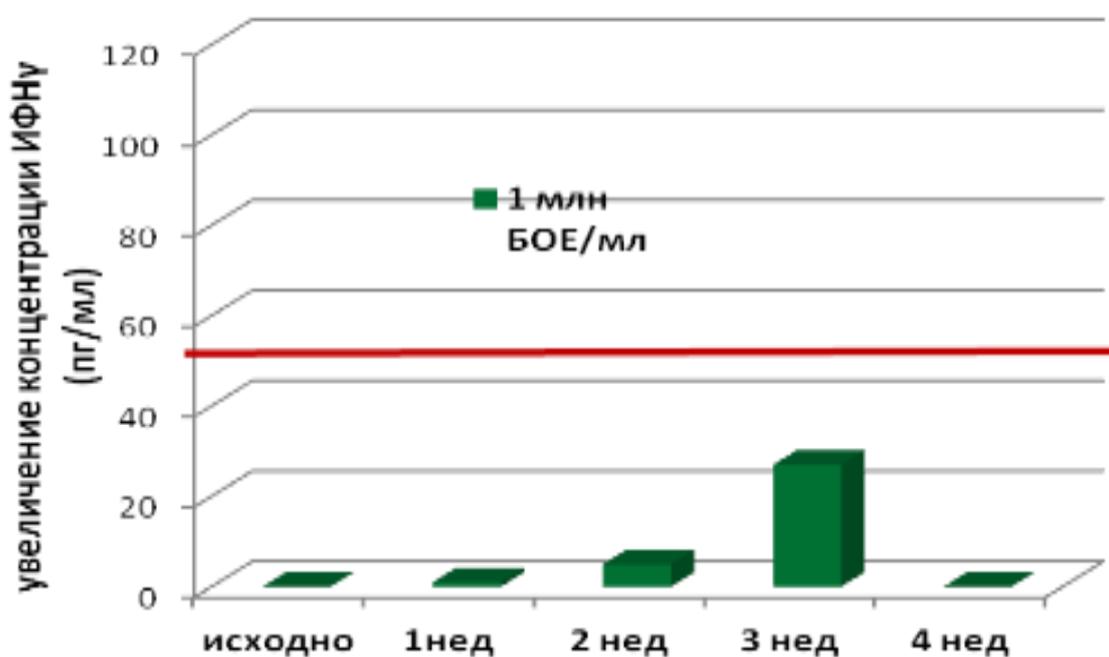


Рисунок 6.7 - Активации продукции ИФН γ при первичном курсе фаготерапии.

При повторном курсе АГ-активация продукции ИФН γ у некоторых пациентов наблюдалась уже исходно - как результат 1-го курса фаготерапии. Затем активация снова регистрировалась у ряда пациентов на 2, и 3 неделях,

но не отражалась на средних показателях динамики, а с 4 недели была характерна для большинства лиц с ИСПП, прошедших повторные курсы с применением того же самого, что и при первом курсе, или другого бактериофага.

Исследование иммунофенотипа Т-лимфоцитов, которые могли бы обеспечивать наблюдаемое повышение продукции ИФН γ при АГ-стимуляции мононуклеаров, выделенных из крови больных, показало следующее.

Перед началом первого курса фаготерапии в крови пациентов не выявлялись Т-лимфоциты, способные активироваться в присутствии бактериофагов с повышением экспрессии CD69+. Однако, через 3 недели ЦТЛ, активирующиеся в присутствии бактериофага, применяемого для терапии, обнаруживались у 58% больных и, напротив, Т-хелперы активировались только у 15%. При повторных курсах фаготерапии повышенные уровни активированных Т-лимфоцитов выявляются уже со 2-ой недели.

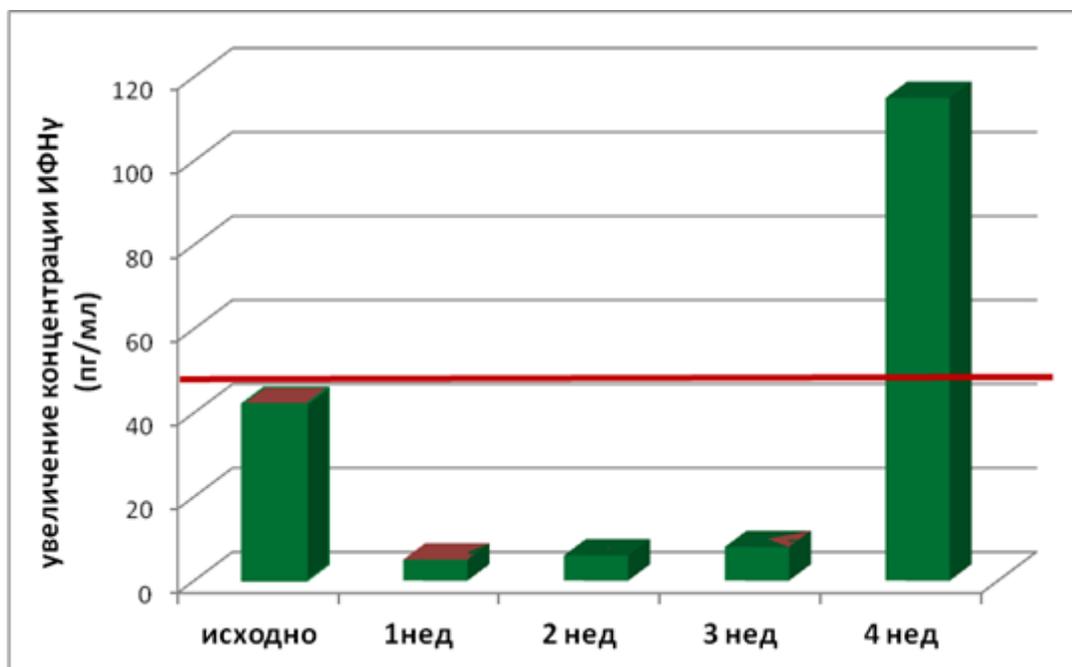


Рисунок 6.8 - Активации продукции ИФН γ при повторном курсе фаготерапии.

Оказалось, что для АГ-стимулированной продукции ИФН γ большое значение имело, чтобы в присутствии фага активировались как Т-хелперы, так

и цитотоксические лимфоциты. В обследованной нами группе больных это происходило не на всех сроках, и в целом признаки АГ-активации ЦТЛ регистрировались чаще, чем признаки активации Т-хелперов. Если активация затрагивала только одну субпопуляцию, то прирост продукции ИФН γ выше 50 пг/мл вообще не происходил.

У пациентов, обе субпопуляции Т-лимфоцитов которых активировались в присутствии бактериофага и имели фенотип CD3+CD4+CD69+ и CD3+CD8+CD69+, прирост продукции ИФН γ также отмечался не в каждом из культуральных супернатантов этих клеток, но все же наблюдался чаще: в 46,6% образцов. В этом случае АГ-стимулированная продукция ИФН γ демонстрирует статистически значимый прирост (таблица 6.10).

Таблица 6.10 - Соотношение между появлением активационного фенотипа на Т-лимфоцитах и АГ-стимулированной продукцией ИФН γ .

Средние показатели АГ-активации	АГ-стимуляция вызвала повышение экспрессии CD69+	
	только на Тх или ЦТЛ	на обеих субпопуляциях
прирост CD3+CD4+CD69+, %	0,8±0,3	4,4±0,9
прирост CD3+CD8+CD69+, %	2,2±0,9	7,2±1,1
прирост продукции ИФН γ , пг/мл	5,4±1,9	45,1±16,1*

* значимое отличие от образцов с активацией только одной субпопуляции (p< 0,05)

Исследования, направленные на выяснение вопроса о том, формируется ли в клеточном звене специфический иммунный ответ на вводимые больному бактериофаги, показали следующее.

- активация ЦТЛ бактериофагом *in vitro* происходит чаще, чем Т-хелперов;
- возможно, в активации этой субпопуляции высока доля неспецифического компонента, связанного с активацией цитокиновой сети во взвеси мононуклеаров после контакта с бактериофагом;

- одновременная активация бактериофагом Т-хелперов и ЦТЛ вызывает повышение продукции ИФН γ почти в половине образцов клеток с такими характеристиками;
- большинство образцов клеток, в которых была зарегистрирована АГ-стимулированная продукция ИФН γ , принадлежит больным, получившим более 1 курса бактериофага, причем максимум АГ-стимулированной продукции ИФН γ регистрируется на 3-4 неделе после 2 курса.

Таким образом, предварительно была подобрана доза бактериофага, при использовании которой *in vitro* не выявляются в крови здоровых людей и пациентов перед началом фаготерапии Т-лимфоциты, способные распознавать фаг и специфически активироваться с экспрессией на мембране маркера CD69+ и продукцией ИФН γ . На фоне фаготерапии подобные лимфоциты выявляются. Сочетание активированных Т-хелперов и ЦТЛ сопровождалось АГ-стимулированным увеличением продукции ИФН γ только на 3-4 неделе как после первичного, так и повторного курса фаготерапии. Вероятно, цитотоксические Т-лимфоциты чаще, чем Т-хелперы, подвергались неспецифической активации через посредство цитокиновой сети, т.к. появление активационного фенотипа CD3+CD8+CD69+ регистрировалось на 1-2 недели раньше, чем CD3+CD4+CD69+. Необходимо также отметить, что активация ЦТЛ без Т-хелперов не приводила к повышению продукции ИФН γ в присутствии бактериофага.

Одна и та же доза бактериофага, которая не на всех сроках наблюдения после фаготерпии вызывала продукцию ИФН γ , абсолютно всегда неспецифически стимулировала мононуклеары крови, в результате чего они активно продуцировали провоспалительные (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8) цитокины. Это стимулирующее влияние бактериофага способствовало активизации иммунной системы больных в целом.

6.3.2 Изменение количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови больных после проведения фаготерапии

При первом обследовании у больных был выявлен лейкоцитоз и лимфопения. Среднее количество лейкоцитов в крови больных составляло $9,0 \pm 0,7 \times 10^9$ /мл с небольшим сдвигом лейкоцитарной формулы влево (72,0 \pm 1,9% нейтрофильных гранулоцитов, в том числе 5,2 \pm 1,6% незрелых форм (палочкоядерные, метамиелоциты, миелоциты)). Сразу по окончании курса фаготерапии (на 5-7 день) среднее количество лейкоцитов снизилось, а доля лимфоцитов у большинства пациентов увеличилась с 16,7 \pm 1,4 до 24,2 \pm 3,3% ($p=0,042$). Затем количество лейкоцитов и соотношение между лимфоцитами и нейтрофильными гранулоцитами вернулись к исходному уровню и сохранялись на этом уровне на 2, 3 и 4 неделях наблюдения (таблица 6.11).

Таблица 6.11 - Изменение клеточного состава крови у пациентов в динамике фаготерапии ($M \pm m$)

	Лейкоциты ($\times 10^9$ /мл крови)	Лимфоциты		Нейтрофильные гранулоциты		
		%	($\times 10^9$ мл крови)	%	в том числе незрелые (%)	($\times 10^9$ /мл крови)
до лечения	9,0 $\pm 0,7$	** 16,7 $\pm 1,4$	1,5 $\pm 0,1$	** 72,0 $\pm 1,9$	5,2 $\pm 1,6$	** 6,5 $\pm 0,6$
через 1 неделю	* 7,3 $\pm 0,8$ $p=0,047$	* 24,2 $\pm 3,3$ $p=0,042$	1,6 $\pm 0,2$	* 61,8 $\pm 4,3$ $p=0,048$	3,5 $\pm 1,1$	* 4,8 $\pm 0,8$ $p=0,040$
через 2 недели	9,0 $\pm 1,6$	19,2 $\pm 3,3$	1,6 $\pm 0,2$	67,8 $\pm 3,6$	3,8 $\pm 1,2$	6,2 $\pm 0,8$
через 3 недели	9,8 $\pm 2,2$	15,7 $\pm 1,7$	1,5 $\pm 0,3$	74,8 $\pm 1,9$	3,5 $\pm 1,7$	7,2 $\pm 1,5$
через 4 недели	9,9 $\pm 1,7$	18,8 $\pm 2,8$	1,7 $\pm 0,3$	70,8 $\pm 2,8$	4,4 $\pm 1,4$	6,4 $\pm 1,6$
здоровые лица (n=21)	6,4 $\pm 0,5$	34,5 $\pm 3,2$	2,1 $\pm 0,4$	56,8 $\pm 3,5$	1,9 $\pm 0,7$	3,7 $\pm 0,5$

* значимое отличие от уровня до фаготерапии

** значимое отличие от нормы ($p < 0,05$)

Снижение количества лейкоцитов в крови сразу после окончания фаготерапии происходило за счет нейтрофильных гранулоцитов. Среднее абсолютное количество лимфоцитов в крови начиная с первой недели после

фаготерапии повышалось, но незначимо. В то же время, индивидуальная динамика этого показателя у разных больных могла быть очень существенной. На рисунке 6.9 представлены характерные варианты динамики. Количество лимфоцитов в крови увеличивалось сразу после окончания фаготерапии у 73,7% пациентов, причем как у тех, в крови которых до начала лечения имелась лимфопения (показатель менее $1,4 \times 10^6$ / мл крови), так и у лиц с исходными показателями, укладывающимися в нормальный диапазон. Среди обследованных были пациенты, у которых уже на 2 неделе этот параметр возвращался в исходному уровню или даже снижался (группа 1). У других достигнутое повышение сохранялось (группа 2).

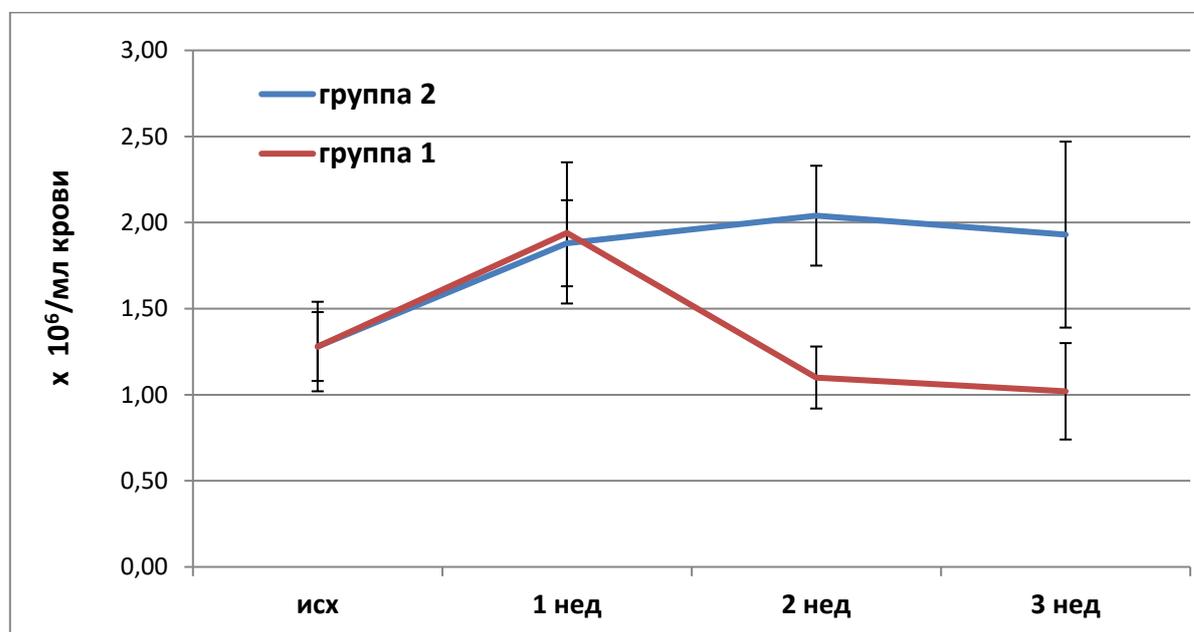


Рисунок 6.9 - Варианты изменения содержания лимфоцитов ($M \pm m$) в крови пациентов в ходе фаготерапии: временное повышение (группа 1), устойчивая нормализация (группа 2)

Таким образом, самым общим и самым ранним положительным эффектом фаготерапии на иммунную систему больного является повышение количества лимфоцитов в крови через 1 неделю после начала лечения. Возможно, эти быстро происходящие изменения были связаны не столько с активирующим влиянием бактериофагов непосредственно на клетки иммунной системы сколько с перераспределением лейкоцитов между

респираторной системой и кровотоком. Возможно, снижение антигенной нагрузки в дыхательных путях, достигаемое сразу при успешной фаготерапии, снижает потребность в лимфоцитах (в частности, в Т-хелперах и НК –клетках, роль которых в разрешении пневмонии описана в научной литературе), и в периферической крови появляется дополнительное количество лимфоцитов.

6.3.3. Изменение функциональной активности лейкоцитов и лимфоцитов в крови больных после проведения фаготерапии

Ввиду различной степени исходных нарушений в количественном составе лейкоцитов и лимфоцитов у разных больных, а также несколько различной динамики содержания лимфоцитов в ходе лечения, для оценки влияния фаготерапии на функциональную активность клеток крови была использована удельная активность лейкоцитов и лимфоцитов.

Для этого способность лимфоцитов и лейкоцитов продуцировать цитокины выражали в пересчете на 10^3 клеток-продуцентов: ИФН γ и ИЛ-4 в пересчете на 10^3 лимфоцитов, а ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 – на 10^3 лейкоцитов.

Этот подход может выявить общий характер изменений активности клеток крови больных, если он существует, тогда как при анализе продукции цитокинов не на 10^3 клеток-продуцентов, а, например, на 10 мкл цельной крови, вклад абсолютного содержания этих клеток, в разной степени измененного у разных больных, будет вносить значительные помехи в оценку собственно их активности.

В таблице 6.12 можно видеть, что продукция всех исследованных цитокинов перед началом фаготерапии у больных основной группы в пересчете на 1000 клеток ниже, чем у лиц контрольной группы (здоровые люди).

Повышение способности лимфоцитов крови продуцировать ИФН γ при ФГА-стимуляции происходит практически сразу после проведенной фаготерапии и сохраняется в течение всего периода наблюдения. ЛПС-

индуцированная продукция ИФН α , ФНО α , ИЛ-4 оставалась низкой во всем периоде наблюдения, тогда как продукция ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 повышалась со 2 по 3 неделю. Далее этот показатель снижался, но индекс стимуляции для ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, т.е. отношение LPS-стимулированной продукции к спонтанной, увеличивался, что означало увеличение функционального резерва мононуклеаров.

Таблица 6.12 - Изменение способности лейкоцитов крови пациентов продуцировать цитокины ($M \pm m$) в динамике фаготерапии

		Здоровые лица	Пациенты				
			до терапии	после фаготерапии			
				1 неделя	2 недели	3 недели	4 недели
Концентрация цитокинов (удельная активность, пг/10 ³ клеток)	ИФН α	57,2 ±5,6	** 29,3 ± 4,5	37,8 ± 11,1	** 30,2 ± 5,8	** 30,1 ± 5,5	** 18,2 ± 4,7
	ИФН γ	4824 ±533	** 2113,4 ± 532,0	2994,0 ±1235,0	* 4108,9 ± 1096,3 p=0,045	* 4229,0 ±569,9 p=0,047	4241,0 ±782,1
	ФНО α	95,1 ±11,8	** 47,9 ±18,7	** 38,9 ±13,6	** 45,2 ± 10,8	** 49,4 ± 13,5	** 41,6 ± 26,9
	ИЛ-1 β	206,6 ±25,1	** 80,2 ±15,5	** 72,2 ± 25,5	** 109,1 ± 28,9	125,3 ± 38,1	** 30,1 ± 2,5
	ИЛ-6	1240 ±102	** 763,3 ±141,2	** 693,3 ± 179,5	814,6 ± 125,2	* 1192,1 ± 154,9 p=0,030	584,4 ± 218,3
	ИЛ-8	2080 ±274	** 888,2 ±221,4	** 501,8 ± 140,0	1124,2 ± 276,2	* 2460,4 ±796,8 p=0,041	** 623,8 ± 185,4
	ИЛ-10	85,8 ±8,0	** 49,8 ±10,7	85,7 ±31,0	75,5 ± 19,2	98,4 ±49,2	* 102,0 ± 38,0 p=0,031
	ИЛ-4	64,7 ±7,8	42,9 ±10,0	** 31,6 ±9,5	** 30,2 ± 5,8	** 36,9 ±9,9	** 33,7 ± 7,2

* значимое отличие от состояния до фаготерапии

** значимое отличие от нормы ($p < 0,05$)

В таблице 6.13 показано изменение этого показателя в динамике лечения больных. Со второй недели после окончания фаготерапии виден устойчивый, хотя и незначимый рост индекса стимуляции для всех трех цитокинов.

В большинстве случаев увеличение индекса стимуляции происходило за счет повышения способности лейкоцитов к индуцированной продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, но в 20-28,5% случаев (для разных монокинов) это изменение

было связано со снижением спонтанной продукции, что свидетельствует о снижении уровня воспаления в организме больного.

Из двух противовоспалительных цитокинов – ИЛ-10 и ИЛ-4 – постепенно к концу месяца наблюдений увеличивается продукция только ИЛ-10.

Таблица 6.13 - Изменение в динамике фаготерапии индекса стимуляции монокинов, продуцируемых лейкоцитами крови пациентов ($M \pm m$)

	Индекс стимуляции продукции		
	ИЛ- 6	ИЛ- 8	ИЛ- 1 β
до лечения	10,2 \pm 1,8	14,4 \pm 3,8	* 18,6 \pm 2,1 (p=0,038)
через 1 нед.	10,5 \pm 1,9	15,2 \pm 5,5	25,7 \pm 7,4
через 2 нед.	17,9 \pm 4,5	25,0 \pm 8,1	33,2 \pm 8,0
через 3 нед.	20,1 \pm 6,5	19,6 \pm 6,1	22,1 \pm 4,1
через 4 нед.	18,6 \pm 4,7	20,8 \pm 5,7	23,9 \pm 9,6
Здоровые лица (n=21)	11,8 \pm 3,2	17,3 \pm 4,0	40,2 \pm 14,3

* значимое отличие от нормы

В целом способность мононуклеаров обследованных больных к продукции цитокинов, имеющих наибольшее значение для эффективной кооперации клеток иммунной системы в ходе инфекционного воспаления и для формирования противоинфекционного иммунитета, в динамике фаготерапии увеличивалась. С 1 по 3 неделю после начала фаготерапии повышалась способность мононуклеаров крови пациентов продуцировать провоспалительные цитокины ИФН γ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, что было показано как по уровню их индуцированной продукции, так и по увеличению индекса стимуляции, т.е. увеличению функционального резерва иммунной системы.

Такие изменения в цитокиновой сети, касающиеся провоспалительных цитокинов (увеличение индуцированной продукции, уменьшение спонтанной продукции, увеличение индекса стимуляции), могут указывать на повышение способности клеток иммунной системы к элиминации патогенных бактерий, происходящей после фаготерапии, активное формирование иммунного ответа.

Тенденция к повышению продукции ИЛ-10, нарастающая к 3-4 неделям, может указывать на постепенное переключение иммунорегуляции текущего воспаления на ограничение его интенсивности.

6.3.4. Изменение иммунного статуса пациентов в динамике фаготерапии

Поскольку удельная способность лимфоцитов к продукции ИФН γ устойчиво возрастает начиная с 1 недели от начала фаготерапии, представлялось важным проанализировать, как изменяется численность лимфоцитов-продуцентов этого цитокина, а также сопоставить показатели удельной активности лимфоцитов с динамикой абсолютного количества этих клеток.

В таблице 6.14 приведены данные об абсолютном количестве клеток на 1 мл крови в таких субпопуляциях как Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), NK и NKT-клетки. В нижней части этой таблицы указано содержание (%) активированных клеток (HLADR $^{+}$ и CD38 $^{+}$) среди Т-хелперов и ЦТЛ.

Постепенное, хотя и незначимое, повышение среднего количества ЦТЛ и NK сопровождалось значимым повышением активированных ЦТЛ (CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ HLADR $^{+}$). Доля CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ CD38 $^{+}$ ЦТЛ в крови больных была больше, чем аналогичный показатель у здоровых людей на всем протяжении наблюдений.

В таблице 6.14 можно видеть, что по окончании 1 курса фаготерапии средние показатели численности и функциональной активности лимфоцитов увеличиваются, однако большинство изменений статистически незначимо. Причиной этого является вероятное влияние на состояние иммунной системы больных не только самой пневмонии, но факторов, связанных с основным заболеванием пациентов, являвшимся причиной их госпитализации.

Чтобы статистически оценить полученные результаты и при этом учесть межиндивидуальную вариабельность, изменение каждого параметра было

проанализировано нами не только в единицах лабораторного анализа, но и в процентах к исходному состоянию.

Таблица 6.14 - Субпопуляционный состав лимфоцитов крови больных в динамике после фаготерапии (M±m)

		Здоровые лица	Пациенты				
			до терапии	после фаготерапии			
				1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.
10 ³ клеток/мл крови	Т хелперы	875± 52	711± 64	774± 94	739± 107	664± 156	732± 117
	ЦТЛ	600± 54	**381±38 p=0,001	480± 70	439± 86	**379±59 p=0,001	567± 96
	NK	323± 38	** 148± 27 p=0,001	201± 50	245± 58	202± 55	270±76
	NKT	113± 11	106± 18	124± 34	118± 24	108± 28	150± 36
% Т клеток	CD3+ CD4+ HLADR+	4,1±0,3	4,4± 0,9	9,1±3,1	7,0± 2,0	11,2± 4,5	5,1±1,1
	CD3+ CD8+ HLADR+	10,5± 3,3	13,6± 2,8	*28,6± 6,1 p=0,048	24,6± 6,9	*33,4± 8,4 p=0,039	18,4± 6,3
	CD3+ CD8+ CD38+	9,1± 1,5	**14,1±1,8 p=0,043	14,8± 2,6	13,3± 2,0	**17,2±2,6 p=0,047	**18,3±3,2 p=0,048

* значимое отличие от уровня до фаготерапии (p< 0,05)

** значимое отличие от нормы (p< 0,05)

В таблице 6.15 в этом аспекте представлена динамика отдельных показателей за период в 3 недели после начала фаготерапии.

Таблица 6.15 - Динамика состояния иммунной системы больных в течение 3 недель после фаготерапии

Показатель	Средняя величина изменений, в % к исходному состоянию		
	через 1 нед.	через 2 нед.	через 3 нед.
NKклетки (CD3-CD16+56+,)	188* p=0,01	206* p=0,02	135
Т-хелперы(CD3+CD4+)	149 * p=0,03	142	126* p=0,01
Активированные Т-клетки (CD3+HLADR)	157* p=0,04	227* p=0,01	211* p=0,03
Активированные ЦТЛ (CD3+CD8+CD38+)	110	120	180

* значимое отличие от уровня до фаготерапии

6.3.5. Изменение интерферонового статуса пациентов в динамике фаготерапии

Оценено состояние интерфероновой защиты (интерфероновый статус) пациентов в динамике фаготерапии как в сравнении с показателями здоровых людей так и в процентах к исходному уровню каждого пациента.

Одной из основных инфекционных проблем, возникших в ходе терапии пациентов с ИСМП, была бактериальная пневмония, влияние которой на интерфероновый статус обычно незначительно, хотя в некоторых исследованиях прямо показано, что передача сигналов интерферонов I типа (ИФН α , ИФН β) необходима для создания защитного иммунного ответа против *K. pneumoniae*, способствующего клиренсу этих бактерий [123].

Отдельный интерес в работе представлял эффект от введения в схему терапии бактериофагов, вероятная способность этих вирусов влиять на интерфероновую защиту у пациентов.

Исходные параметры интерферонового статуса и их изменение в динамике фаготерапии приведены в таблице 6.16.

Перед началом фаготерапии концентрация интерферона в плазме пациентов была даже несколько ниже, чем в контрольной группе здоровых лиц. Спонтанная продукция интерферона не отличалась от нормы, но индуцированная – как ИФН α , так и ИФН γ – была снижена в 2 и в 3 раза, соответственно, по сравнению с нормой. Это обстоятельство делало пациентов уязвимыми в случае присоединения другой инфекции.

Как можно видеть в таблице 6.16, через 1-2 недели после проведенной фаготерапии наблюдается увеличение способности лимфоцитов больных к индуцированной продукции ИФН γ .

Супернатанты, полученные от больных, были способны защищать тестовую культуру от вируса в большем титре, чем при первичном обследовании. Статистически значимое увеличение биологической активности супернатантов достигалось к концу периода наблюдения, тогда

как приведенное ранее в таблице 6.16 возрастание концентрации ИФН γ было значимо уже с 1-2 недели.

Таблица 6.16 - Сравнение показателей интерферонового статуса в группах обследованных людей

Группа		Биологическая активность интерферона (1/титр)			
		спонтанная	индуцированная		в плазме
			ИФН α	ИФН γ	
Пациенты	до лечения	3,6 3,0÷4,2	119,5** 100,0÷144,5	13,3** 10,2÷16,9	1,2 1,1÷1,4
	через 1-2 недели	3,0 2,6÷3,5	158,5 134,9÷186,2	24,5 20,0÷30,2	1,0 1,0÷1,0
	через 3-4 недели	2,1 1,6÷2,7	104,7 85,1÷128,8	28,5* 20,0÷35,2	1,0 1,0÷1,03
Здоровый контроль		1,0 1,0÷1,1	218,8 190,5÷251,2	52,5 44,7÷61,7	4,6 3,9÷5,4

* значимое отличие от уровня до фаготерапии ($p < 0,05$)

** значимое отличие от нормы ($p < 0,05$)

Некоторый подъем защитной активности супернатантов, содержащих ИФН α , наблюдаемый на 1-2 неделе заболевания, был кратковременным, и средняя концентрация ИФН α соответствовала этому.

Удельная активность лейкоцитов крови у обследованных нами пациентов в плане их способности продуцировать цитокины исходно была ниже, чем у здоровых людей. На 3 неделе увеличивается не только индуцированная продукция ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 (пг/10³кл), но и индекс стимуляции продукции для каждого из этих монокинов, что свидетельствует об увеличении функционального потенциала лейкоцитов. Фактически только в этот момент активность лейкоцитов больных становится сравнимой с активностью лейкоцитов здорового контроля. Продукция ИЛ-10 становится значимо выше исходного уровня только на 4 неделе после курса фаготерапии, а некоторых других цитокинов (ИФН α , ФНО α , ИЛ-4) так и остается низкой.

В литературе имеются примеры того, что бактериофаги могут стимулировать противовирусную защиту посредством активации Toll-подобных рецепторов (TLRs). Было показано, что филаментозный фаг M13 стимулирует

продукцию интерферонов и тем самым защищает мышей от инфекции vacciniavirus [209]. В нашей работе мы наблюдали после фаготерапии повышение способности лейкоцитов продуцировать ИФН γ , но не ИФН α .

Интерфероновый статус больных, являющийся всесторонней характеристикой интерфероновой защиты, после фаготерапии изменялся в сторону низкой концентрации интерферона в плазме крови, низкой спонтанной продукции интерферона (оба показателя характеризуют уровень текущего воспаления), повышения способности лейкоцитов к индуцированной продукции ИФН γ (увеличение функционального резерва, т.е. возможности поддерживать активность иммунной системы), но неизменных показателей индуцированной продукции ИФН α . Последнее дает нам основание полагать, что бактериофаг в количествах, применяемых для санации локусов бактериальной инфекции, не стимулирует клетки пациента к выработке ИФН α , в противоположность тому, как это бывает при острых вирусных инфекциях человека за счет взаимодействия вируса с Toll-подобными рецепторами внутри клетки (TLR 3, TLR 7, TLR 8, TLR 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ к ГЛАВЕ VI

Повторный курс приема фагов сопровождается более быстрым подъемом уровня соответствующих антител. Анализируя связь эффективности фаготерапии и интенсивности антифагового иммунного ответа, можно отметить, что первичная фаготерапия характеризовалась выраженным клиническим эффектом у обследуемого контингента больных, выразившимся, в том числе, и в санации исходно инфицированных возбудителями ИСМП локусов. Однако повторный курс терапии тем же штаммом фага уже не давал удовлетворительного эффекта, в этот период в крови больных обязательно находились соответствующие антитела. Таким образом, полученные нами результаты подтвердили необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для корректировки штаммового состава препаратов при проведении повторных курсов фаготерапии.

В целом, наблюдаемые нами *ex vivo* изменения функциональной активности в иммунной системе больных, после фаготерапии можно оценить как стимуляцию клеточного иммунитета, точнее, как нормализацию, возвращение к уровню его активности у здоровых людей. Только количество активированных ЦТЛ: CD3+ CD8+ HLADR+ или CD3+CD8+CD38+ было исходно выше нормы в нашей группе пациентов или повышалось после фаготерапии. Другие параметры функционирования иммунной системы не только нормализовались, но не выходили за пределы нормального диапазона. В этом отношении наши данные отличаются от обнаруженного Riquelme S. A. et al. иммуносупрессирующего влияния фаготерапии со снижением экспрессии HLADR на лимфоцитах и повышением продукции ИЛ-10 [195].

Увеличение способности лейкоцитов и лимфоцитов больного продуцировать цитокины после фаготерапии можно расценить как признак нормализации состояния иммунной системы после снижения бактериальной нагрузки. Однако, на эти реакции оказывает влияние и основное заболевание, приведшее больного в отделение реанимации и интенсивной терапии, и, видимо, поэтому длительность сохранения показателей на уровне здорового контроля у разных больных варьировала.

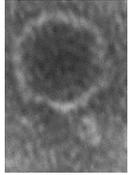
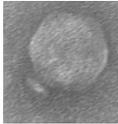
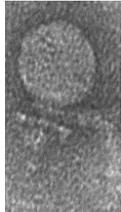
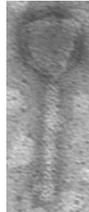
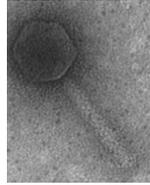
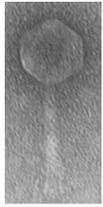
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сконструированы препараты бактериофагов для лечения инфекций у больных, страдающих ИСМП. Для этого были наработаны бактериофаги, активные в отношении штаммов-возбудителей ИСМП – KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, охарактеризованы фенотипические свойства изолированных штаммов бактериофагов, включая: морфологию негативных колоний, спектр литической активности, максимальный титр при культивировании на жидких и плотных питательных средах, устойчивость к агрессивным факторам внешней среды, продолжительность литического цикла и ряд других. На основании биологических свойств проведен отбор производственно перспективных штаммов бактериофагов. Характеристика штаммов приведена в таблице 6.8.

Молекулярно-генетические исследования фагов-кандидатов включали рестрикционный анализ, фрагментарное и полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов, а также биоинформатический анализ их полных нуклеотидных последовательностей. На основании полученных данных сделано заключение, что отобранные бактериофаги вирулентны, не содержат нежелательных генов, а их бактериальные штаммы-хозяева не содержат профагов. Пары фаг-штамм хозяин депонированы в ГКПМ-Оболensk, нуклеотидные последовательности бактериофагов депонированы в GenBank NCBI.

На следующем этапе исследования разрабатывали составы и технологию получения «универсальных» лекарственных форм для включения в них коктейлей различного штампового состава. Получены две лекарственные формы – РПВП и раствор для инъекций. Состав обеих лекарственных форм идентичен, это растворенный в изотоническом растворе натрия хлорида фаговый коктейль, который показал наилучшую биосовместимость в определенном титре. Титр подбирается в рамках персонализированной терапии.

Таблица 6.8 - Характеристика производственно-перспективных штаммов бактериофагов, включенных в состав ЛФ.

Фаг	SCH1	SCH111	KPV15	KPV811	PA5	PA10	AP22	AM24
Бактерия-хозяин	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
Источник и место выделения	Клинический материал, Челябинск	Клинический материал, Москва	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Клинический материал, Москва	Клинический материал, Москва
Спектр литической активности (%/штаммы бактерий)	Суммарно 95% штаммов (в т.ч. MRSA)		Суммарно 92,5% штаммов <i>K. pneumoniae</i> (в т.ч. панрезистентных)		76% штаммов <i>P. aeruginosa</i> (в т.ч. антибиотико-резистентных)		56,25% штаммов <i>A. baumannii</i> (в т.ч. антибиотико-резистентных)	
Устойчивость к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Температурная устойчивость	-20 - 55 °С	-20 - 55 °С	-20 - 60 °С	-20 - 65 °С	-20 - 60 °С	-20 - 65 °С	-20 - 65 °С	-20 - 60 °С
Размер и форма ДНК (пн)	18023, линейная	18018, линейная	167034, линейная	42641, линейная	66182, линейная	91212, линейная	46387, кольцевая	97139, линейная
Урожайность (титр), БОЕ/мл	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰
Семейство/ Подсемейство/ Род	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Rountreeviridae; подсемейство Rakietenvirinae; род Rosenblumvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Rountreeviridae; подсемейство Rakietenvirinae; род Rosenblumvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Straboviridae; подсемейство Tevenvirinae; род Jiaodavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Autographiviridae; подсемейство Slopekvirinae; род Drulisvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; под Pбunavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; под Pakpunavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; под Obolenskvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes</i>
Электронные микрофотографии								

Бактериофаги выделены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФГУН ГНЦ ПМБ. Бактериофаг AP22 предоставлен А.В. Поповой [40].

Различия у лекарственных форм в стадиях технологического цикла, а именно, в очистке препарата и в показателях качества. Технология получения ЛФ складывается из следующих этапов:

- вспомогательные работы (водоподготовка, подготовка производства, которая состоит из стадий подготовки дезинфицирующих растворов для санитарной обработки помещений, оборудования и персонала, подготовка сырья и материалов: мойка, сушка и стерилизация флаконов и укупорочного материала, получение и стерилизация изотонического раствора хлорида натрия, подготовка и стерилизация питательных сред);
- получение фаголизата: получение ночной (18-ти часовой) культуры штамма-хозяина для каждого фага, входящего в состав коктейля, нанесение штамма-хозяина на поверхность плотной питательной среды, нанесение маточного (стартерного) штамма бактериофага, сбор бактериофага, очистка фаголизата в две стадии: стерилизующая фильтрация и хроматографическая очистка от эндотоксинов;
- разведение бактериофага стерильным 0,9% раствором натрия хлорида до нужного титра;
- фасовка и упаковка раствора.

Раствор для инъекций дополнительно ультрацентрифугируют с хлоридом цезия, затем проводят диализ, и еще раз подвергают стерилизующей фильтрации. На основе разработанной технологии составлены лабораторные регламенты. Определены в соответствии с действующей нормативной базой показатели качества лекарственных форм, разработаны спецификации и проекты НД. ЛФ бактериофагов контролируют по показателям: описание, подлинность, специфическая активность, стерильность, извлекаемый объем, рН, аномальная токсичность, бактериальные эндотоксины. ЛФ для инъекционного применения дополнительно проверяют по показателям: прозрачность, цветность и механические включения. Получены результаты по изучению стабильности лекарственных форм с различными составами

фаговых коктейлей и обоснован срок годности препаратов, который составил 24 месяца.

Следующий этап – доклинические исследования ЛФ бактериофагов. Для определения безопасности был выбран коктейль бактериофагов следующего состава: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Посчитали, что если состав ЛФ, содержащей 8 фагов, не будет оказывать токсического действия, то препараты с меньшим штаммовым составом также будут безопасны. Было показано, что ЛФ бактериофагов не оказывает острого и хронического токсического действия. Однако наблюдается небольшое снижение количества лейкоцитов в крови животных, принимавших препарат, этот эффект пропадает после окончания курса введения препарата, что говорит о функциональном характере изменений показателей крови у экспериментальных животных.

Фармакокинетические исследования на животных на примере ЛФ, содержащей бактериофаг KPV15, продемонстрировали, что фаговые частицы в течение 1 ч проникают в кровь и паренхиматозные органы, достигая в них максимальных концентраций. В течение 9 ч фаговые частицы практически полностью элиминируются из организма, продолжая циркулировать в незначительных количествах в организме у единичных животных до 24 ч.

Лечебную и профилактическую эффективность бактериофагов исследовали на модели летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей. При однократном внутрибрюшинном введении в период от 24 до 1 ч до заражения мышей вирулентным штаммом *Klebsiella pneumoniae* B2580 ЛФ защищает от гибели 90-100 % инфицированных животных. У 67-100 % выживших мышей происходит полная санация организма от возбудителя клебсиеллёза. При лечении максимальная эффективность препарата наблюдается при его использовании на ранних стадиях развития клебсиеллезной инфекции (начало лечения не позднее 6 ч после заражения). Введение бактериофага в течение 10 суток приводит к клиническому и

бактериологическому выздоровлению 100% инфицированных мышей. Если лечение начато через 12-24 ч., то выживают, в среднем, 50% животных. Можно сделать вывод, что терапевтический эффект фаготерапии зависит от сроков начала лечения.

Получение безопасных лекарственных форм бактериофагов было необходимым этапом для решения основной задачи данной работы – разработки рационального алгоритма подбора бактериофагов в составе фагового коктейля для эффективной фаготерапии и фагопрофилактики инфекций у больных, страдающих ИСМП.

Разработан алгоритм персонализированной фаготерапии, основными этапами которого являются:

- двухстадийное определение чувствительности выделенных от больного бактерий-мишеней к отдельным штаммам вирулентных фагов, взятых из банка бактериофагов;
- определение наличия в сыворотке крови пациента IgG-антител к выбранному фагу или фагам методом ИФА, с обязательным подтверждением нейтрализующих свойств выявленных антител;
- определение титра бактериофага в лекарственной форме с учетом множественности инфицирования;
- выбор способа введения препарата с учетом локализации инфекционного процесса и фармакокинетики подобранных фагов или фага;
- производство партии лекарственной формы бактериофага для конкретного пациента, которая обеспечивает сохранение бактериофагов в очаге инфекции в титре, не более чем на два порядка ниже исходного, в течение всего периода выделения из очага инфекции бактерии-мишени и не менее чем через 24-48 ч после ее элиминации;
- оценка качества полученной серии препарата и передача ее в лечебное учреждение;
- введение пациенту ЛФ;

- контроль эффективности проводимой фаготерапии по бактериологическим исследованиям; в случае отсутствия микробиологической эффективности применяемого препарата бактериофагов проводится повторный подбор бактериофагов и оценка наличия антифагового иммунитета.

В таблице 6.9 показан объем проведенных исследований для разработки алгоритма персонализированной терапии.

Данный алгоритм был апробирован на базе четырёх лечебных учреждений на 160 пациентах отделений ОРИТ. Как показали проведенные исследования, персонализированная фаготерапия имеет высокую микробиологическую эффективность (в 77% случаев применение бактериофагов приводит к элиминации микроорганизмов, в 12% – к снижению титра микроорганизма на 3-4 порядка) по сравнению с группой, не получавшей фаги, у пациентов которой в 100% случаев отсутствовала элиминация патогена. Наиболее эффективным оказалось применение бактериофагов, лизирующих *P.aeruginosa* (у 83,3% пациентов наблюдается элиминация микроорганизма, а у 13,3% снижается титр), несколько менее эффективны бактериофаги, специфичные к *K.pneumoniae* (элиминация наблюдается у 78,4% пациентов, снижение титра у 16,2%, а отсутствие элиминации у 5,4%), наименее эффективными оказались бактериофаги, лизирующие *A.baumannii* (элиминация у 61,5% пациентов, а у остальных 38,5% отсутствует снижение титра и санация микроорганизмов).

При оценке терапевтической эффективности было показано, что риск летального исхода в группе, получавшей лечение препаратами бактериофагов, в 1,5 раза ниже, чем в группе сравнения. Это достаточно высокий показатель, так как клинические исследования проводились для пациентов ОРИТ, находящихся в тяжелом и крайне тяжёлом состоянии.

В исследованиях подтверждена безопасность терапии препаратами бактериофагов, за все время исследования не было достоверно выявлено наличие НЯ и СНЯ, за исключением нарастания уровней белков острой фазы

в первые сутки фаготерапии, свидетельствовавшего о выделении эндотоксинов при бактериолизе в очаге инфекции.

В данной работе изучено влияние иммунного антифагового ответа на эффективность терапии. Результаты оценки антифагового иммунитета у пациентов демонстрируют, что образующиеся после первого курса фаготерапии антитела не влияют на эффективность проводимой фаготерапии, что также было подтверждено клинически. Повторный курс приема фагов сопровождается достаточно быстрым подъемом уровня соответствующих антител, что приводит к неэффективности терапии. Таким образом, полученные результаты подтвердили необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для корректировки штаммового состава препаратов при проведении курсов фаготерапии, как первичных, так и повторных. При первичном назначении бактериофагов для конкретного больного существует вероятность наличия к ним антител в крови пациента, например, если в лечебном учреждении проводят обработку помещений фагами, или если пациенту ранее назначались коммерческие препараты бактериофагов.

Было изучено также влияние фаготерапии на клеточное звено иммунитета. Исследование в клеточном звене специфического иммунного ответа на вводимые больному бактериофаги, показало, что активация ЦТЛ бактериофагами *in vitro* происходит чаще, чем Т-хелперов; одновременная активация бактериофагами Т-хелперов и ЦТЛ в 50% случаев вызывает повышение продукции ИФН γ у больных; увеличение продукции ИФН γ наблюдается на 3-4 неделе как после первичного, так и повторного курса фаготерапии. Бактериофаги в дозе выше 10^6 БОЕ/мл неспецифически стимулировали мононуклеары крови.

Таблица 6.9 - Объекты и объем проведенных исследований в рамках разработки алгоритма персонализированной фаготерапии

Раздел работы	Методы исследования (производственные операции)	Объем исследования/ количество анализов
I. Выделение и идентификация штаммов бактерий-мишеней от пациента ОРИТ	1. Микробиологические методы	1.1. Посев патологического материала на несколько видов питательных сред/ <u>1560</u> 1.2. Использование отечественных и импортных биохимических тест-систем/ <u>1350</u>
	2. Видовая идентификация для труднокультивируемых микроорганизмов	2.1. Масс-спектрометрический метод с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI-TOF MS/ <u>840</u>
	3. Определение возбудителей ИСМП, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)	3.1. Определение чувствительности/резистентности бактериальных штаммов к антимикробным средствам, антибиотикам, антисептикам/ <u>650</u> 3.2. Тестирование микроорганизмов с МЛУ иммуноферментным методом для идентификации фактора, обеспечивающего резистентность/ <u>175</u>
	4. Определение количества выделяемого (КОЕ) из очага возбудителя	360
II. Подбор бактериофага	1. Spot-test на возбудителе	100
	2. Модифицированный метод Грация на возбудителе с определением максимального количества БОЕ	132
III. Определение наличия антифаговых антител в сыворотке крови пациента ОРИТ	1. Получение моноспецифической антисыворотки к бактериофагу	42
	2. Конструирование иммуноферментной тест-системы	14
IV. Производство препарата бактериофага для пациента ОРИТ	Получение серий лекарственного препарата с подобранным штаммовым составом с учетом способа введения	132
V. Контроль готовой ЛФ	В соответствии со спецификацией	132
VI. Оценка лечебной и санационной эффективности после курса бактериофага у пациента ОРИТ	1. Аналогично разделу I.	458
	2. Определение наличия антифаговых IgG-антител	250
	3. Реакция нейтрализации	260
	4. Иммунный статус	40
	5. Клинический анализ крови	352
	6. Биохимический анализ крови	352

С 1 по 3 неделю после начала фаготерапии повышалась способность мононуклеаров крови пациентов продуцировать провоспалительные цитокины ИФН γ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, что было показано как по уровню их индуцированной продукции, так и по увеличению индекса стимуляции, т.е. увеличению функционального резерва иммунной системы. Такие изменения в цитокиновой сети, касающиеся провоспалительных цитокинов, могут указывать на повышение способности клеток иммунной системы к элиминации патогенных бактерий, происходящей после фаготерапии, активное формирование иммунного ответа.

Полученные в рамках проведенных исследований результаты подтвердили предположения, что при разработке лекарственных форм бактериофагов для борьбы с ИСМП нельзя придерживаться классического пути разработки лечебно-профилактических продуктов бактериофагов — стратегии фиксированного штаммового состава коктейля. Во-первых, влияние антибиотиков и дезинфектантов на патогенные микроорганизмы, особенно в замкнутой экологической нише больничных учреждений, ускоряет эволюционный процесс в направлении формирования штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Следовательно, изменение штамма возбудителя требует внесения изменений и в штаммовый состав фагового коктейля для поддержания необходимого уровня спектра его литической активности. А во-вторых, снижение клинической эффективности используемого фагового коктейля может возникать при проведении повторного курса препаратом того же штаммового состава у одного и того же пациента в связи с образованием специфических антифаговых антител к используемым в данном препарате штаммам бактериофагов. Решением возникшей проблемы является индивидуальный подбор бактериофагов, активных в отношении инфекционного патогена, выделенного у конкретного больного.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны штаммы вирулентных бактериофагов, в том числе КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH11, обладающие широким (до 92%) спектром литической активности в отношении гомологичных бактериальных штаммов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*), полученных из клинического материала пациентов, находящихся в тяжелом и крайне тяжелом состоянии в отделениях реанимации и интенсивной терапии после проведения высокотехнологичных операций. Доказано, что указанные фаги обладают свойствами производственно-перспективных: высокой урожайностью (до 10^{10} БОЕ/мл) на депонированных в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» незлизогенных штаммах-хозяевах, устойчивостью к агрессивным факторам внешней среды, оригинальностью и генетической безопасностью (ДНК фагов не содержат нежелательных генов).

2. Разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейлей бактериофагов, а именно, раствора для приема внутрь и местного применения, и инъекционного раствора, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов для конструирования фаговых препаратов различного штаммового состава. Подготовлены проекты спецификации на готовые лекарственные формы бактериофагов, а также нормативная документация.

3. Подготовлен лабораторный регламент, описывающий технологию производства препаратов, содержащих различные варианты коктейлей бактериофагов. Разработанная технология прошла успешную апробацию при выпуске валидационных серий, что подтверждено соответствием показателей качества произведенных готовых лекарственных форм нормативной документации, а также сохранностью их физико-химических и биологических свойств в течение 2-х летнего периода изучения их стабильности.

4. Доклинические испытания безопасности коктейлей бактериофагов показали, что бактериофаги не оказывают острого и хронического

общетоксического действия. Фармакокинетические исследования внутрибрюшинного введения бактериофагов (на примере бактериофага KPV15) продемонстрировали, что фаговые частицы быстро проникают в кровь и внутренние органы, элиминация бактериофага происходит через 9 ч. На примере летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей продемонстрирована высокая терапевтическая и профилактическая эффективность препарата. Показано, что при профилактическом применении бактериофага в период от 24 до 1 ч. до заражения выживают 90-100 % инфицированных животных, причем у 67-100% выживших мышей происходит полная санация организма от возбудителя, а при лечении бактериофагами высокий терапевтический эффект (100% выживших животных) наблюдается при раннем начале терапии (не позднее 6 ч. после заражения). Показано, что более позднее начало фаготерапии (через 12-24 ч. после заражения) приводит к выживанию 70-20 % животных.

5. Были сконструированы и апробированы в клинической практике иммуноферментные тест-системы для оценки наличия в сыворотке крови IgG-антител к бактериофагам KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111.

6. Изучены показатели гуморального антифагового иммунитета у больных с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, на фоне фаготерапии. Выявлено, что уже после первого курса фаготерапии в крови пациентов, как правило, обнаруживаются нейтрализующие антифаговые антитела в титре, зависящем от вида применяемого фага (в среднем 1:16-1:32). Показано, что при повторных курсах фаготерапии тем же штаммом бактериофага регистрировался более высокий уровень антител (средний титр 1:64-1:1024), что приводило к снижению эффективности лечения и являлось основанием для смены штаммового состава препарата. Исключение составляла фаготерапия препаратами, лизирующими *Klebsiella pneumoniae*, при которой антитела вырабатывались в единичных случаях и не обладали нейтрализующей активностью.

7. Изучены показатели клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Обнаружено дозо-зависимое влияние бактериофагов на лимфоциты. При первичном курсе фаготерапии не было выявлено специфической активации Т-лимфоцитов. Показано, что при повторных курсах фаготерапии наблюдается повышение уровня активированных Т-лимфоцитов со 2-ой недели терапии, и увеличение специфической продукции ИНФγ. Продемонстрировано, что на фоне фаготерапии происходит неспецифическая стимуляция продукции провоспалительных цитокинов – ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 – при отсутствии изменений в продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Наблюдаемые *ex vivo* изменения функциональной активности иммунной системы больных после фаготерапии можно оценить как стимуляцию клеточного иммунитета, точнее, как нормализацию, возвращение к уровню его активности у здоровых людей.

8. Доказано, что оценка эффективности фаготерапии у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, должна затрагивать три аспекта – микробиологический, клинический и иммунологический.

9. Разработан алгоритм персонализированной фаготерапии, состоящий из следующих этапов: выделение штаммов возбудителей от пациента; подбор из банка бактериофагов, лизирующих данные штаммы инфекционного агента; оценка антифагового иммунитета к выбранным фагам; определение титра бактериофага в лекарственной форме и способа введения препарата, обеспечивающих множественность инфицирования в очаге инфекции от 0,01 до 1, производство партии лекарственной формы бактериофага для конкретного пациента, оценка качества полученной серии препарата и передача ее в лечебное учреждение, контроль эффективности проводимой фаготерапии; в случае отсутствия эффективности повторный подбор бактериофагов. Апробация данного алгоритма на четырех клинических базах в отделениях реанимации и интенсивной терапии продемонстрировала высокую эффективность персонализированной фаготерапии. В целом, по всем

использованным лекарственным формам бактериофагов, микробиологическая эффективность составила 89%, риск летальных исходов снизился в 1,5 раза.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Разработанная концепция эффективной персонализированной фаготерапии подразумевает следующие направления развития.

1. Разработка новых лекарственных форм с универсальным составом для включения в них подобранного коктейля бактериофагов.
2. Разработка новых комбинаций с бактериофагами и/или их ферментами, например, эндолизинами.
3. Расширение спектра литического действия бактериофагов за счет изменения их генома.

По некоторым из этих направлений уже активно ведутся исследования.

Разработан состав *суппозиториев* на основе коктейля бактериофагов и проведены фармакокинетические исследования на животных для подтверждения возможности системного эффекта при ректальном введении бактериофагов [10, 63].

Объектами исследования являлись субстанции бактериофагов в виде растворов, активных в отношении *Salmonella enteritidis* – SEM 4 SE 40 (номер в коллекции ГКПМ-Оболensk Ph 59; GenBank NCBI KY626163.1) и *Pseudomonas aeruginosa* – PA 5 (номер в коллекции ГКПМ-Оболensk Ph 88; GenBank NCBI KY000082.1). В составе суппозиториев их можно заменить другим коктейлем.

В качестве суппозиторных основ рассматривали твердые жиры типа А (*Adepssolidus*01/2009:0462) различных марок и производителей, подходящих как для вагинального, так и для ректального применения: Witepsol® H15, Witepsol® W 35, Witepsol® S 51 (OleochemicalsGmbH), Suppocire® BS2XPellets, Suppocire® BMPellets (Gattefosse, France), Estaram® H15, Estaram® W35 (Croda, UK). В качестве эмульгатора рассматривали возможность применения полисорбата-80 (*Polysorbatum-80*01/2011:0428) (ГЛБ

14,6).

Технологические характеристики экспериментальных образцов суппозиторий, согласно требованиям ведущих мировых фармакопей, изучали по параметрам: время полной деформации (*Soft eningtime determination of lipophilic suppositories* 01/2008:20922), распадаемость (*Disintegration of suppositories and pessaries* 01/2008:20902), температура плавления. По результатам комплексного изучения экспериментальных образцов как наиболее перспективный для проведения фармакокинетических исследований в качестве основы был выбран состав, содержащий Witepsol® W 35 и Witepsol® H15 (1:1), а также эмульгатор Polysorbate 80 (3,0%).

В эксперимент по изучению фармакокинетики были включены 20 кроликов (самцы) с весом от 2,5 до 3 кг. Каждому кролику в прямую кишку вводили суппозиторий, прямая кишка зажималась на 15-20 мин, после чего производился отбор проб. Моча и кал отбирались отдельно в стерильные пакеты, что исключало перекрестную контаминацию образцов.

Кровь забирали из ушной вены кроликов в пробирки с ЭДТА, после чего использовали без предварительной обработки. Мочу взбалтывали с хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 мин, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, отбирали для исследования верхний слой жидкости. Кал растирали с 10-15 мл физиологического раствора, добавляли хлороформ в соотношении 1:10 и взбалтывали в течение 15 мин, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, отбирали для исследования верхний слой жидкости.

В ходе фармакокинетических исследований для подтверждения наличия в клиническом материале фаговых частиц кровь, мочу и кал кроликов до и после однократного назначения бактериофагов последовательно исследовали микробиологическими – спот-тестом, методом Грация, и молекулярно-генетическим – двойной вложенной ПЦР, методами. Морфологическую полноценность фаговых частиц в крови кроликов подтверждали путем определения специфических антител к одному из бактериофагов, входящих в

суппозитории.

Выделение ДНК бактериофагов из крови животных проводили с помощью набора для выделения К-сорб (ООО «НПФ Синтол», Москва). В реакцию брали 1 мкл выделенной ДНК. Высокочувствительное выявление фрагментов ДНК фагов осуществляли с помощью двойной вложенной ПЦР (double-nestedPCR). Реакционные смеси готовили с использованием реагентов, входящих в комплект рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва). Для проведения реакций использовали олигонуклеотидные последовательности, приведенные в таблице 3. Детекцию результата амплификации проводили путем постановки горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле.

Таблица 7.1 - Олигонуклеотидные последовательности для выявления фрагментов ДНК фагов

Наименование олигонуклеотида	Назначение олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Описание
Мишень – ДНК псевдомонадногобактерофагаРА5			
PВ-1_1_fw	Прямой праймер	agctcacgcagtaaggaggc	1 раунд ПЦР
PВ-1_1_rv	Обратный праймер	agctggtcacgctggatgt	
РА5_fw1_nested	Прямой праймер	taaggaggcgtcatgagc c	2 раунд ПЦР
РА5_rv1_nested	Обратный праймер	ctt gat ctt ccc aggagc c	
РА5_fw2_nested	Прямой праймер	atcagcaag acc cat tcg c	3 раунд ПЦР
РА5_rv2_nested	Обратный праймер	agccaacgg tat cgatgc c	
Мишень – ДНК сальмонеллезногобактерофагаSE40			
VPhSE1_fw1	Прямой праймер	tgcagatatcgactacg c	1 раунд ПЦР
VPhSE1_rv1	Обратный праймер	tcaacgcctgta cat ccc	
VPhSE1_fw2	Прямой праймер	gtg atgctggtttct ccc	2 раунд ПЦР
VPhSE1_rv2	Обратный праймер	ctttgcccttagctcc g	
VPhSE1_fw3	Прямой праймер	aaacgacgcggataaagc g	3 раунд ПЦР
VPhSE1_rv3	Обратный праймер	gtccacggtttaac acc c	

Двадцати лабораторным животным (кроликам самцам породы шиншилла) однократно вводили лекарственную форму *perrectum*. Забор биоматериала производили через 15, 30,45, 60,75 мин, 6,9 и 24 ч. и изучали методом спот-теста (таблицы 7.2) и Грация (таблица 7.3).

Следующим этапом фармакокинетических исследований было выявление фрагментов ДНК фагов в крови кроликов после введения суппозиторий. Для выявления фрагментов ДНК фагов в клиническом материале был применен метод двойной вложенной ПЦР с тремя парами специфических праймеров. Разрешающая способность метода составляет 2 копии в мкл. При наличии положительного сигнала в первом раунде, с каждым последующим раундом увеличивается интенсивность сигнала, что свидетельствует о специфичности реакции. При отсутствии сигнала в первом раунде, применение *doublenested* PCR позволяет, при наличии копий ДНК в матричной пробе, получить сигнал на втором раунде.

Таблица 7.2 - Наличие изучаемых бактериофагов в крови, моче и кале кроликов до и после введения суппозиторий (метод спот-теста), БОЕ/мл

Время после введения, ч	Вид биоматериала		кровь		моча		кал	
	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5
Фон	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	+++	+++	-	-	-	-	-	-
0,5	+++	+++	-	-	-	-	-	-
0,75	++	++	-	-	-	-	-	-
1,0	+	+	++	++	-	-	-	-
1,5	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++
3,0	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6,0	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
9,0	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
24,0	+	+	+	+	++	++	++	++
Штаммы бактериофагов	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5

«-» - отсутствие «зоны лизиса» и отсутствие роста вирусных частиц, +++ - «пятно лизиса» с отдельными бактериальными колониями, +, ++ - в «пятне лизиса» единичные вирусные частицы, у единичных кроликов

В первом раунде используется матричная ДНК, далее с полученным ампликоном проводится второй раунд, далее полученный во втором раунде ампликон разводится и ставится третий раунд. С каждым последующим

раундом повышается специфичность реакции. Полученные данные представлены на рисунках 7.1 и 7.2, положительные результаты выделены красным.

Таблица 7.3 - Наличие изучаемых бактериофагов в крови кроликов до и после введения суппозиторий (метод Грациа), БОЕ/мл

Вид биоматериала	Титр бактериофагов в					
	крови		моче		кале	
Время после введения, ч						
Фон	-	-	-	-	-	-
0,25	$5,0 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^0$	-	-	-	-
0,5	$4,5 \cdot 10^1$	$3,2 \cdot 10^0$	-	-	-	-
0,75	$3,5 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^0$	-	-	-	-
1,0	$5,0 \cdot 10^0$	$7,0 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^1$	-	-
1,5	$5,0 \cdot 10^0$	$5,0 \cdot 10^0$	$4,0 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^0$
3,0	$4,0 \cdot 10^0$	$5,0 \cdot 10^0$	$3,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$
4,5	$4,0 \cdot 10^0$	$3,0 \cdot 10^0$	$3,5 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$
6,0	$4,0 \cdot 10^0$	$3,0 \cdot 10^0$	$3,5 \cdot 10^2$	$5,2 \cdot 10^2$	$7,6 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^2$
9,0	$3,0 \cdot 10^0$	$2,0 \cdot 10^0$	$1,5 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^1$
24,0	$1,0 \cdot 10^0$	$0,5 \cdot 10^0$	$1,2 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^1$	$5,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^1$
Штаммы бактериофагов	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5	SE 40	PA 5

«-» - нет фаговых частиц

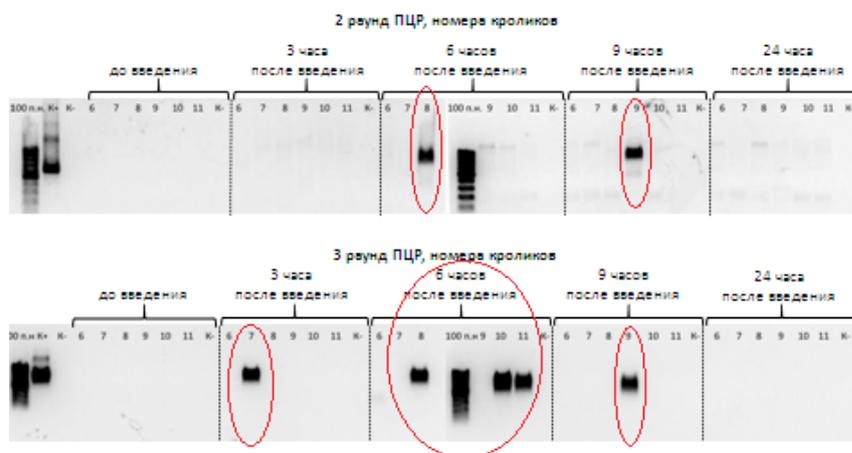


Рисунок 7.1 - Динамика наличия ДНК сальмонеллезного бактериофага SE40 в крови кроликов

Результаты подтверждают наличие в крови кроликов ДНК бактериофагов от 100-200 копий (3 раунд ПЦР) до 1000 - 10000 копий (2 раунд ПЦР). Вероятность выявления фаговых ДНК (максимальные количества копий различных штаммов фагов) увеличивается к 6 ч. после введения суппозиторий кроликам.

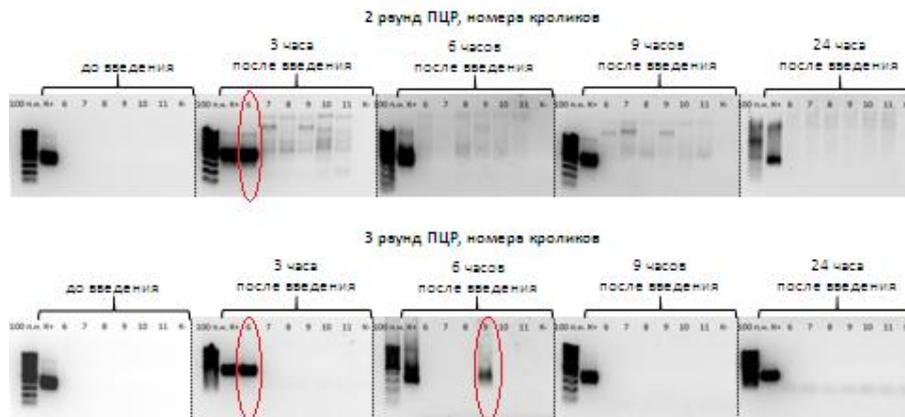


Рисунок 7.2 - Динамика наличия ДНК псевдомонадного бактериофага PA5 в крови кроликов

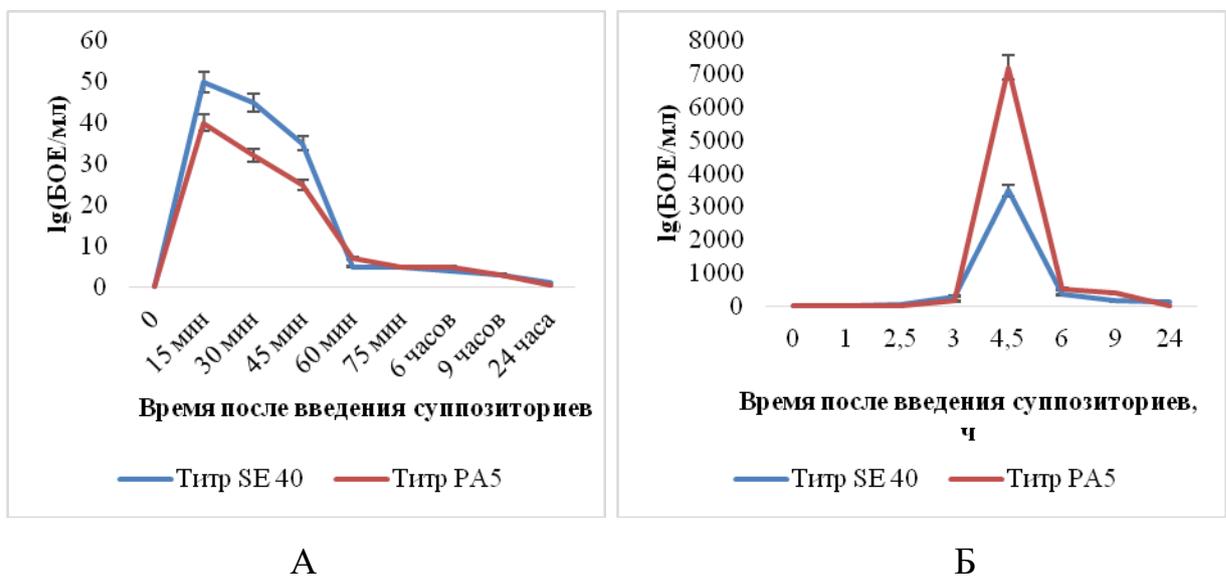


Рисунок 7.3 - Динамика концентрации бактериофагов SE 40 и PA 5 в крови кроликов (Метод Грация) (А) и моче Б.

Исследуемые фаги были выявлены в полученных образцах крови уже через 15 мин после введения. Фаги обнаруживались в крови и в другие сроки наблюдения (через 30, 45, 60, 75 мин, а также через 3, 6, 9 и 24 ч). Пик концентраций в крови фагов SE 40 и PA 5 наблюдается в интервале времени

15 – 45 мин. При этом следует отметить совпадение результатов, полученных двумя использованными методами выявления бактериофагов: микробиологическим методом титрования по Грациа и молекулярно-генетической ПЦР. Полученные результаты подтверждают наличие в крови кроликов ДНК бактериофагов в количестве от 100-200 копий (2-й раунд ПЦР) до 1000-10 000 копий (3-й раунд ПЦР). Вероятность выявления фаговых ДНК (максимальные количества копий различных штаммов фагов) увеличивается через 3-6 ч после введения суппозитория кроликам. Таким образом, оба исследуемых фага попадали из суппозитория в кровь при ректальном введении.

В моче исследуемые фаги начинали выявляться уже через 1 ч после введения суппозитория, т.е. при первом мочеиспускании от начала эксперимента. При введении суппозитория с фагами SE 40 и PA 5 фаговые частицы выявлялись во всех исследуемых пробах (начиная с 1 ч и заканчивая 24 ч наблюдения).

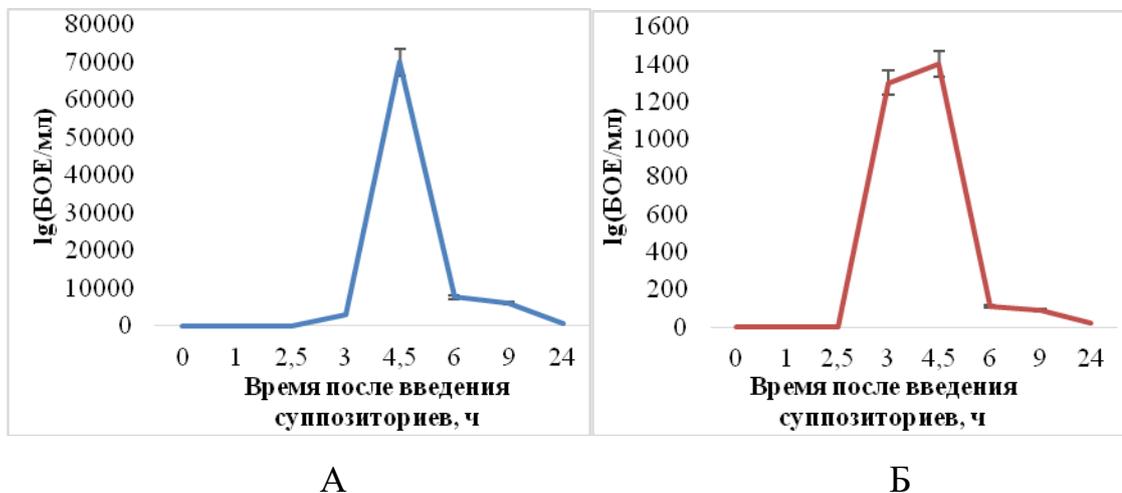


Рисунок 7.4 - Динамика концентрации бактериофагов SE 40 (А) и PA 5 в кале кроликов (Б)

В образцах фекалий фаги выявлялись не ранее чем через 1,5 ч от момента введения суппозитория. Пик обнаружения фагов в кале составляет 3 – 6 ч, и затем содержание фагов постепенно снижается до минимального к 24 ч.

Обращает на себя внимание нарастание титров фагов в образцах мочи и фекалий с максимумом в диапазоне 3-6 ч, что свидетельствует о постепенном поступлении фагов в организм при ректальном введении.

В проведенном исследовании оба фага преодолевали слизистую оболочку кишечника и в дальнейшем обнаруживались в крови и моче. Активное попадание фагов в организм при ректальном введении подтверждается также обнаружением фаговых частиц в фекалиях. Если наличие фаговых частиц в ранних образцах фекалий (до 3 ч от момента введения препаратов) можно объяснить прямым попаданием остатков суппозитория из прямой кишки в кал во время дефекации, то обнаружение фаговых частиц в поздних образцах фекалий, причём полученных в разное время (через 4,5, 6, 9 и 24 ч от момента введения суппозитория), свидетельствует уже об активном попадании фаговых частиц из просвета прямой кишки в кровь и далее с желчью обратно в кишечник животных.

Фармакокинетические исследования суппозитория на основе данного коктейля бактериофагов, показавшее наличие фаговых частиц как в крови, так и в моче, и в фекалиях животных (даже через 24 ч), свидетельствуют о возможности системного действия фагов при ректальном введении.

Еще один пример универсальной лекарственной формы – это **ушные капли**. В соавторстве с сотрудниками кафедры фармацевтической технологии Сеченовского Университета разработан состав лекарственного препарата для местного лечения инфекционных заболеваний наружного уха [8]. Действующими веществами разработанного препарата являются бактериофаги, лизирующие бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: PA5 и PA10. Литическая активность бактериофагов в одной капле (0,05 мл) составляла 2×10^8 БОЕ PA5 и $2,2 \times 10^8$ БОЕ PA10. В качестве растворителей и формообразующих веществ рассматривали возможность использования смесей воды очищенной и глицерина (ХИММЕД, Россия) в соотношениях 1/2,5 и 1/1,25, макрогола 400 (ХИММЕД, Россия) в соотношении 1 /2,5 и смеси макрогола 6 и глицерилкаприлокапратамарки Softigen 767 (Cremer, Германия)

в соотношении 1 / 2,5. В качестве антиоксиданта вводили этилетдиаминотетрауксусную кислоту (ЭДТА), в качестве консервантов использовали парабены, как единственную группу стабилизаторов антимикробной устойчивости, разрешенную для применения в ушных лекарственных формах, обеспечивающую активность в диапазоне pH от 4 до 8 и не оказывающую литического действия на бактериофаги.

Для всех экспериментальных составов изучали стабильность титра бактериофагов в течение 12 месяцев, определяемого по методу Грациа, а также технологические фармакопейные характеристики лекарственной формы. Состав на основе 40% водного раствора глицерина, с добавлением 0,05% этилендиаминоуксусной кислоты и 0,03% смеси нипагина/ нипазола (1:3) посчитали наиболее перспективными для дальнейших исследований.

Оценку местнораздражающего и системного действия проводили на 10 кроликах самцах породы шиншилла массой 3,5-4 кг. Для оценки местнораздражающего действия однократно проводили инстилляцию 3 капель экспериментального состава в одно ухо, второе ухо оставляли для контроля. Состояние кожи регистрировали визуально ежедневно в течение пяти дней. Отмечали функционально-морфологические нарушения кожи (эритема, отек, трещины, некроз, шелушение, сухость, изъязвления). Ушные кали должны оказывать только местное действие, для доказательства отсутствия системного действия производили забор крови кроликов из ушной вены через каждые 15 мин, считая от момента введения капель. Титр бактериофагов в крови определяли по методу Грациа. Титрование производили до 5-ого разведения. Делали посев из «0», 1, 2, 3, 4 и 5-ого разведений. Было доказано отсутствие местнораздражающего и системного действия препарата.

Другим направлением является разработка лекарственных форм с ферментами бактериофагов – *эндолизинами* [12, 220]. Совместно с сотрудниками НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи разрабатывали комплексный антибактериальный гель, содержащий три фаговых эндолизина: LysECD7, LysAm24 и LysAp22. Антибактериальная композиция на основе эндолизина

была приготовлена в виде геля, содержащего 150 мкг/г каждого LysAp22, LysAm24 и LysECD7, а также Natrosol 250 ННХ (гидроксиэтилцеллюлоза), 1% по массе, и PEG 1500 (полиэтиленгликоль), 1,5% по массе, в качестве вспомогательных веществ. Изучали эффективность разработанной лекарственной формы для местного лечения на кроличьей модели анаэробной раневой инфекции, сопровождающейся острым образованием абсцесса. Раневую инфекцию и образование абсцесса кожи индуцировали *F. Necrophorum*. В холку кролика подкожно вводили ночную суспензию штамма *F. necrophorum*, растущего в питательной среде Kitt-Tarozzi в концентрации 3×10^9 микробных клеток в объеме 1 мл. Точность манипуляции была подтверждена образованием абсцесса в месте инъекции в течение 4-7 дней. Планируемый период наблюдения за животными составлял 30 дней или до их гибели. Лечение начинали после образования абсцесса у всех животных на 7-е сутки. Экспериментальный гель вводили животным после дренирования абсцесса, установки активного дренажа и промывания полости абсцесса стерильным физиологическим раствором. В полость раны шприцем вводили объем геля 5 мл, достаточный для полного заполнения раны. Орошение ран и обработку проводили в течение 5 дней подряд два раза в день. Кролики, получавшие плацебо ($n = 6$), получали стерильный гель без эндолизинов в том же объеме, что и в группе, обрабатываемой экспериментальным гелем ($n = 10$).

В течение всего исследования животных осматривали ежедневно. Обследование включало термометрию, оценку поведения и общего состояния здоровья животных, патологоанатомическое и бактериологическое исследование животных. Для подтверждения причины гибели животных проводили немедленную некропсию. Определены патологические изменения, характерные для некробактериоза, и выделены инфекционные агенты.

Выживаемость групп, получавших плацебо и экспериментальный гель, показала выживаемость 12,5 дней и 22,0 дней соответственно. Максимальная продолжительность жизни кроликов в группе плацебо составила 14 дней, тогда как в группе, получавшей лечения, - 25 дней.

Кроме того, было доказано отсутствие иммунного ответа при применении разработанного препарата на раневой поверхности. Исследования эффективности и безопасности препарата продолжаются.

Доказана возможность разработки эффективных препаратов для терапии инфекций, вызванных резистентными возбудителями, на основе рекомбинантных белков бактериофагов, разрушающих клеточную стенку бактерий. Полученный препарат обладает широким спектром действия, активен в отношении резистентных возбудителей и не обладает иммуногенностью.

Еще одно перспективное направление — это создание препаратов, представляющих собой комбинацию бактериофагов и эндолизинов. Например, для лечения остеомиелита, которое чаще всего вызвано золотистым стафилококком, чьи штаммы способны образовывать бактериальные биопленки, трудно поддающиеся воздействию антибиотиков, и, нередко, обладающим устойчивостью к различным антибиотикам, включая метициллин. Комбинация этих двух агентов позволяет, не только избирательно воздействовать на бактериальные штаммы планктонной формы, но и разрушать бактериальные биопленки. Данная тема активно сейчас изучается.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. У пациентов с ИСМП, находящихся в ОРИТ, при выделении поли- и панрезисентных возбудителей рекомендуется при проведении фаготерапии использовать алгоритм персонализированного подбора бактериофагов, основными элементами которого являются: определение чувствительности выделенных от больного бактерий-мишеней к фагам с подбором рабочего титра препарата, оценка уровня нейтрализующих IgG-антител в сыворотке крови пациента к входящим в состав коктейля бактериофагам, выбор (с учетом локализации инфекционного процесса и фармакокинетических свойств отобранных для терапии фагов) способа введения и соответствующей ему лекарственной формы.

2. В связи с формированием у пациентов штаммоспецифического иммунного ответа на бактериофаги рекомендуется, особенно перед повторными курсами фаготерапии, определение уровня IgG-антител к использованным фагам с оценкой их нейтрализующей активности, что необходимо для поддержания высокой эффективности фаготерапии.

3. При разработке новых лечебно-профилактических препаратов бактериофагов рекомендуется: 1) в качестве "золотого стандарта" подтверждения вирулентной природы фага использовать полногеномное секвенирование с последующим биоинформационным анализом, исключающим наличие в фаговом геноме нежелательных генов; 2) обязательно проводить фармакокинетические исследования, позволяющие оценить потери в титре фага при достижении очага воспаления; 3) использовать в качестве одного из контрольных параметров готовой формы концентрацию фага в БОЕ/мл; 4) при производстве препаратов бактериофагов оценивать уровень эндотоксина в готовой форме, что особенно важно при внутриполостном использовании бактериофагов.

Список используемых сокращений

АлАТ – Аланинаминотрансфераза

АсАТ – Аспартатаминотрансфераза

БАК – Биохимический анализ крови

БОЕ – бляшкообразующие единицы

ГФ – Государственная Фармакопея

ЕЭ/мл – единица эндотоксина в миллилитре

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИЛ – интерлейкин

ИР – инъекционный раствор

ИРК – индивидуальная регистрационная карта

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

КОЕ – колониобразующие единицы

ЛП – лекарственный препарат

ЛПП – лечебно-профилактический препарат

ЛФ – лекарственная форма

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МПБ – мясопептонный бульон

МПА – мясопептонный агар

ННР – непредвиденная нежелательная реакция

НР – нежелательная реакция

НЯ – нежелательное явление

ОАК – общий анализ крови

ОАМ – общий анализ мочи

ОИТ – отделение интенсивной терапии

ОКИ – острые кишечные инфекции

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ОФС – общая фармакопейная статья

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РПВП – раствор для приема внутрь и местного применения

СНР – серьезная непредвиденная нежелательная реакция

СНЯ – серьезное нежелательное явление

УФО – ультрафиолетовое облучение

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

ФНО – фактор некроза опухоли

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

GMP – Good Manufacturing Practice

GCP – Good Clinical Practice

FDA – Food and Drug Administration

EMA – European Medicines Agency

Список источников

1. Аветисян, Л.Р. Основные механизмы формирования эпидемически значимых госпитальных клонов бактерий / Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. // Успехи современной биологии. - 2016. - Т. 136 (1) - С. 41-52.
2. Акимкин, В.Г. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень / Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Орлова О.А., Голубкова А.А., Квасова О.А., Сычева Н.В., Скачкова Т.С. - М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. - 51 с.
3. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: история исследований до широкого применения антибиотиков / Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М, Рубальский О.В, Теплый Д.Л., Ахминеева А.Х., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Рубальская Е.Е., Рубальский Е.О., Смирнова К.Н., Зулькарнеев Э.Р., Теплый А.Д. // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т.11, №2. – С.8-16.
4. Анпилов, Л.И. Профилактическая эффективность сухого поливалентного дизентерийного бактериофага в организованных коллективах / Анпилов Л.И., Прокудин А.А. // Военно-медицинский журнал. – 1984. – № 5. – С. 39–40.
5. Анурова, М.Н. Разработка термореверсивного вагинального геля с бактериофагами / Анурова М.Н., Бахрушина Е.О., Демина Н.Б., Алешкин А.В., Киселева И.А. // Биофармацевтический журнал. - 2019. - Т. 11, № 2. - С. 30–33.
6. Асланов, Б.И. Бактериофаги как эффективные противоэпидемические средства для купирования вспышек внутрибольничных инфекций / Асланов Б.И., Любимова А.В., Зуева Л.П. // Журнал инфектологии. - 2019. - Т. 11, № 1. - С. 65-70.
7. Бабалова, Г.Г. О профилактическом значении дизентерийного сухого бактериофага / Бабалова Г.Г., Кацитадзе К.Т., Сакварелидзе Л.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1968. – № 2. – С. 143–145.

8. Бахрушина, Е.О. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa* / Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Бочкарева С. С., Воробьев А. М., Щербина Ю. О., Пасивкина М. А., Крехтунова Л. О., Демина Н. Б., Алешкин А. В. // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2022. - Т. 11, № 2. - С. 74-78.
9. Бахрушина, Е.О. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов / Бахрушина Е.О., Анурова М.Н., Алешкин А.В., Демина Н.Б., Краснюк И.И., Пятигорская Н.В., Береговых В.В.// Вестник Российской академии медицинских наук. - 2021. - Т. 76, № 4. - С. 351-360.
10. Бочкарева, С.С. Изучение фармакокинетики суппозиторных форм препаратов бактериофагов / Бочкарева С.С., А.В. Караулов, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Мехтиев, А.О. Стышнев, Э.Р. Зулькарнеев // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. - 2019. - Т. 168, № 12. - С. 707–711.
11. Власов, В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине / Власов В.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. // Биохимия. - 2020. - Т. 85, № 11. - С. 1587-1600.
12. Воробьев, А.М. Определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов бактериофагов ECD7, AM24, AP22, SI3 и ST11 / Воробьев А.М., М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гущин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулькарнеев, А.И. Лаишевцев// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т.170, №11. – С.597-601.
13. Воробьев, А.М. Разработка лекарственных форм на основе эндолизинов для терапии раневых инфекций / Воробьев А.М., А.В. Алешкин, В.А. Гущин, М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев, А.И. Лаишевцев, О.Г. Ефимова, Э.Р. Мехтиев, Е.О. Рубальский // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» - Москва - 2020. - С.21-23.

14. Ворошилова, Н.Н. Изучение клинической эффективности препарата бактериофага Энтеробактер поливалентного очищенного / Ворошилова Н. Н., Алферова Э. В., Дарбеева О. С. // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. - 2010. - № 2 (38). - С. 31-33.
15. Всемирная Организация Здравоохранения. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. Женева: Всемирная Организация Здравоохранения. - 2001. - 168 с.
16. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. - М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2018.
17. Ермолаев, А.В. К истории открытия бактериофагов / Ермолаев А.В., Сорокина Т.С. // История медицины. - 2018. - Т. 5, № 1. - С. 90-98.
18. Есипов, А.В. Бактериофаги в условиях поглощающей антибиотикорезистентности / Есипов А.В., Алехнович А.В., Кисленко А.М., Маркевич П.С., Зайцев А.Е., Мишина Л.В. // Госпитальная медицина: наука и практика. - 2018. - Т. 1, № 2. - С. 39-42.
19. Зефирова, Т.П. Вирусная польза бактериофаги и профилактическая медицина / Зефирова Т.П., Алёшкин А.В. // Status Praesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак. - 2019. - № 4 (59). - С. 125-130.
20. Зуева, Л.П. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике ИСМП / Зуева Л.П., Асланов И., Акимкин В.Г. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2014. - № 1 (74). - С. 43-49.
21. Из истории борьбы против микробов и вирусов / Кажал Н., Ифтимович. - Р. Бухарест: Научное издательство, 1968. - 404 с.
22. Каргина, Т.М. Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты - бактериофаги / Каргина Т.М., Саканян Е.И., Давыдов Д.С., Парфенюк Р.Л. // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2019. - Т. 19, № 4. - С. 233-241.

23. Киселева, И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: автореферат дис. канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Киселева Ирина Анатольевна. - М., 2015. – 26 с.
24. Ковязина, Н.А. Разработка и стандартизация таблеток Секстафаг®: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.01 / Ковязина Наталья Анатольевна. – Пермь, 2009. - 25 с.
25. Ковязина, Н.А. Технологические аспекты разработки капсул с бактериофагами / Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Николаева А.М., Орлова Е.О., Ефимова М.Г., Шитова О.И. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2015. - № 1. - С. 132-136.
26. Куракин, Э.С. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи как глобальная проблема современности // Журнал МедиАль. - 2017. - № 2 (20). - С. 42-44.
27. Ландышев, Н.Н. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов / Ландышев Н.Н., Воронько Я.Г., Тимошина О.Ю., Суслина С.Н., Акимкин В.Г., Мирошников К.А.// Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65, № 5. – С. 259-266.
28. Литвинова, А.М. К оценке эффективности применения коли-протейного бактериофага при дисбактериозе кишечника у новорожденных недоношенных детей / Литвинова А. М., Чтецова В. М., Кавтрева И. Г. // Вопросы охраны материнства и детства. – 1978. – № 9. – С. 42–44.
29. Лусс, Л.В. Вторичная иммунная недостаточность и иммунокомпрометированный пациент. В чем проблемы? // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2007. - № 2 (11). - С.11-17.
30. Луцкий, А.А. Интерферон-у: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа / Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейерер М., Лобзин Ю.В. // Журнал Инфектологии. – 2015. – Т. 7. - №4. – С. 10-22.

31. Методические указания №105 Департамента здравоохранения города Москвы: Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП).
32. Миклис, Н.И. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: классификация, этиология, эпидемиологические особенности, структура (обзор литературы) / Миклис Н.И., Семенов В.М., Оладько А.А // Клиническая инфектология и паразитология. - 2018. - Т. 7, № 2. - С. 234-248.
33. Милютина, Л.Н. Фаготерапия острых кишечных инфекций у детей // Актуальные вопросы кишечных инфекций: мат-лы науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию чл.-кор. АМН СССР, д. чл. АН УзССР, проф. И. К. Мусабаева (Ташкент, октябрь 1990 г.) / под ред. Т. А. Даминова и др. – Ташкент: Изд-во «ФАН», 1990. – С. 107–109.
34. Михалёва, Т.В. Антибиотикорезистентность: современные подходы и пути преодоления / Михалёва Т.В., Захарова О.И., Ильясов П.В. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. - Т. 55, № 2. – С. 124-132.
35. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Утверждена 06.11.2011г. Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко. – Текст: электронный. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/499002572> (дата обращения: 05.12.2021).
36. Нилова, Л.Ю. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при диагностике дисбактериоза толстого кишечника: автореф. дис. канд. мед. наук: 03.02.03 / Нилова Людмила Юрьевна. - СПб; 2009. – 22 с.
37. Орлова, О.А. Эпидемиологическая диагностика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, на современном этапе / Орлова О.А., Тутельян А.В., Замятин М.Н., Акимкин В.Г.// Медицинский алфавит. - 2019. - Т. 3, № 32 (407). - С. 5-10.
38. Патент 2525141 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, А61К 35/76. Способ получения бактериофага: № 2013126187/10; заяв. 07.06.2013; опубл. 10.08.2014 / Киселева И.А., Алешкин А.В., Верёвкин В.В., Светоч Э.А.,

Афанасьев С.С., Рубальский Е.О., Рубальская Е.Е., Рубальский М.О., Ефимова О.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.; заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) (RU). – Бюл. 22. – 5 с.

39. Перепанова, Т.С. Терапевтическое применение бактериофагов: назад в будущее. / Перепанова Т.С., Казаченко А.В., Хазан П.Л., Малова Ю.А. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2021. - Т. 23, № 1. - С. 55-64.

40. Попова А.В. Бактериофаг AP22, лизирующий клинические штаммы *Acinetobacter baumannii*: выделение и изучение молекулярно-биологических свойств: автореферат дис. кандидата биологических наук. 2012. – с. 24.

41. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза решение от 3 ноября 2016 года N 89. – Текст: электронный. - URL: <http://eaeunion.org> (дата обращения: 03.01.2020).

42. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / под ред. С.В. Яковлева, Н.И. Брико, С.В. Сидоренко, Д.Н. Проценко. - М.: Издательство “Перо”, 2018. – 156 с.

43. Реакции, основанные на взаимодействии антигена с антителом: учебно-методические рекомендации / Будчанов Ю.И. - Тверь, 2012. – 33 с.

44. Решетникова, О.В. Биотехнология культивирования бактериофагов // Вестник науки и образования Северо-Запада России. - 2018. - Т. 4, № 2. - С. 136-141.

45. Руководство по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных

препаратов, утвержденного Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. N 202.

46. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012.

47. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая, Иммунобиологические лекарственные препараты, под ред. А.Н. Миронова, изд-во: Гриф и К, Москва, 2013, - 212 с.

48. Сметанин, В.Н. Влияние социальных факторов на патологические процессы инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в российской федерации // *International Journal of Medicine and Psychology*. - 2021. - Т. 4, № 1. - С. 148-153.

49. Солодовников, Ю.П. Профилактическое применение сухого поливалентного дизентерийного бактериофага с пектином в детских дошкольных учреждениях. Сообщение I. Результаты строго контролируемого эпидемиологического опыта (Ярославль, 1968) / Солодовников Ю.П., Павлова Л.И., Емельянов П.И., Гарнова Н.А., Ногтева И.Б., Сотемский Ю.С., Богдашич О.М., Аршинова В.В. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1970. – № 5. – С. 131–137.

50. Ф. д'Эрелль. Бактериофаг и феномен выздоровления // Тифлис: Тифлисский государственный университет. - 1935. – С. 262.

51. Фримель, Г. Иммунологические методы Пер. с нем. А. П. Тарасова. - Москва: Медицина, 1987. - 472 с.

52. Aleshkin, A. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections / Aleshkin A., Shkoda A., Bochkareva S., Ershova O., Mitrkhin S., Kiseleva I., Zul'karneev E., Rubal'sky E., Novikova L. // *Infectious diseases*. – 2017. – Vol.15, N. 4. – P.49-54.

53. Aleshkin, A.V. A small-scale experiment of using phagebased probiotic dietary supplement for prevention of E. coli traveler's diarrhea / Aleshkin A. V.,

Rubalskii E. O., Volozhantsev N. V. // *Bacteriophage*. – 2015. - Vol. 5, N. 3. - P. 10743291 - 10743296.

54. Aleshkin, A.V. Bacteriophages as probiotics and decontaminating agents for food products / Aleshkin A. V., Volozhantsev N. V., Svetoch E. A. // *The book: Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease*. Editors C. Denton, R. J. Crosby, New York: NOVA Biomedical Publications. – 2013. – P. 93–110.

55. Alfadhel, M. Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for *Staphylococcus aureus*: in vitro evaluation / Alfadhel M., Puapermpoonsiri U., Ford S.J., van der Walle CF. // *Int. J. Pharm.* – 2011. - Vol. 416, N. 1. – P. 280 – 287.

56. Alp, E. Healthcare-associated infections in Intensive Care Units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries / Alp E, Damani N. // *The Journal of Infection in Developing Countries*. – 2015. - Vol. 9, N. 10. – P. 1040-1045.

57. Álvarez, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: latest trends and treatments based on bacteriophages / Álvarez A., Fernández L., Gutiérrez D. // *J. Clin. Microbiol.* – 2019. Vol. 57, N. 12. – P. 1006–1019.

58. Arias, C.A. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. / Arias C. A., Murray B. E. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2012. –Vol.10. – P. 266–278.

59. Ashurst J.V., Dawson A. *Klebsiella Pneumonia* // StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). – 2021. - Текст: электронный. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/> (дата обращения: 12.02.2022).

60. Aslam, S. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the United States / Aslam S., Lampley E., Wooten D., Karris M, Benson C, Strathdee S, Schooley RT.// *Open Forum Infect. Dis.* – 2020. – P. 389-398.

61. Astudillo, A. Nebulization effects on structural stability of bacteriophage PEV 44 / Astudillo A., Leung S.S.Y., Kutter E., Morales S, Chan HK.// *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2018. – Vol. 125. – P. 124–130.

62. Ayoub, Moubareck C. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen / Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. // *Antibiotics (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, N. 3. – P. 119 – 148.
63. Bakhrushina, E.O. Development of the composition and pharmacokinetic studies of suppositories with combined substance of bacteriophages / Bakhrushina E.O., Anurova M.N., Demina N.B., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S., Vorobev A.M., Bagandova K.M. // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. - 2020. - Vol. 59. - P. 101841- 101849.
64. Balasubramanian, G. An overview of compassionate use programs in the European union member states / Balasubramanian G., Morampudi S., Chhabra P. et. al. // *Intractable Rare Dis. Res.* - 2016. – Vol. 5. – P. 244–254.
65. Barbier, F. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end? / Barbier F, Wolff M. // *Med. Sci. (Paris)*. – 2010. - Vol. 26, N. 11. – P. 960-968.
66. Barros, JAR. Encapsulated bacteriophages in alginate-nanohydroxyapatite hydrogel as a novel delivery system to prevent orthopedic implant-associated infections / Barros JAR, Melo LDR, Silva RARD, Azeredo JCVR, Pinheiro VMC, Colaço BJA, Fernandes MHR, Gomes PS, Monteiro FJ. // *Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 24. – P. 102145 – 102154.
67. Bassetti, M. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach / Bassetti M., Poulakou G., Ruppe E., Bouza E, Van Hal SJ, Brink A. // *Intensive Care Med.* – Vol.43. – P. 1464–1475.
68. Bonilla, N. Phage on tap-a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks / Bonilla N., Rojas M.I., Netto Flores Cruz G. // *Peer J*. – 2016. - Vol. 4. – P. 2261 – 2272.
69. Boucher, H.W. Bad bugs, No drugs: No ESKAPE! An update from the infectious disease's society of America / Boucher H.W., George H., Talbot J. // *Clin. Infect. Dis.* - 2009. – Vol. 48, N. 1. – P. 1-12.

70. Briers, Y. Phage Lytic Enzymes // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, N. 2. – P. 113 – 116.
71. Brown, T.L. Characterization and formulation into solid dosage forms of a novel bacteriophage lytic against *Klebsiella oxytoca* / Brown T.L., Petrovski S., Hoyle D. et. al. // *PLoS One*. – 2017. - Vol. 12, N. 8. – P. 183510 – 183526.
72. Bruttin, A. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy / Bruttin A., Brüssow H. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. - Vol. 49, N. 7. – P. 2874–2878.
73. Caflisch, K.M. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review. / Caflisch K.M., Suh G.A., Patel R. // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2019. – Vol. 17, N. 12. – P. 1011-1041.
74. Cairns, B. Quantitative models of in vitro bacteriophage–host dynamics and their application to phage therapy. / Cairns B., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. // *PLoS Pathog.* - 2009. – V. 5, N. 1– P. 1000253-63.
75. Campos, W.F. Transdermal permeation of bacteriophage particles by choline oleate: potential for treatment of soft-tissue infections / Campos W.F., Silva E.C., Oliveira T.J., Oliveira JM Jr, Tubino M, Pereira C, Vila MM, Balcão VM. // *Future Microbiol.* – 2020. – Vol. 15. – P. 881–896.
76. Cano, E.J. Phage Therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity / Cano E.J., Caflisch K.M., Bollyky P.L., Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, Brownstein MJ, Horne B, Biswas B, Henry M, Malagon F, Lewallen DG, Suh GA. // *Clin. Infect. Dis.* – 2020. - P. 144 – 151.
77. Cassini, A. Burden of AMR Collaborative Group Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis / Cassini A., Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleeschauwer B, Cecchini M. // *Lancet Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 19, N. 1. – P. 56 – 66.

78. Chang, R.Y. Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection / Chang R.Y., Wong J., Mathai A., Morales S, Kutter E, Britton W, Li J, Chan HK. // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2017. – Vol. 121. – P. 1–13.
79. Chang, R.Y.K. Hydrogel formulations containing non-ionic polymers for topical delivery of bacteriophages / Chang R.Y.K., Okamoto Y., Morales S. et.al. // Int. J. Pharm. – 2021. - Vol. 605. . – P. 120850–120859.
80. Chang, R.Y.K. Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions / Chang R.Y.K., Wallin M., Kutter E. et. al. // Int. J. Pharm. – 2019. - Vol. 560. – P. 11–18.
81. Chang, S. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene / Chang S., Sievert D., Hageman J. et. al. // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol. 348. – P. 1342–1347.
82. Clark, N.M. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter species*: A global threat. / Clark N.M., Zhanel G.G., Lynch J.P. // Curr. Opin. Crit. Care. – 2016. – Vol. 22. – P. 491–499.
83. Cortés, G. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia / Cortés G., Borrell N., de Astorza B. et.al. // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 70. – P. 2583–2590.
84. Darling, A.E. progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement / A.E. Darling, B. Mau, N.T. Perna // PLoS One. – 2010. – Vol. 5(6). – P. 11147 – 11164.
85. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / Davies J, Davies D. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2010. – Vol. 74. – P. 417–433.
86. De Kraker, M. E. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? / De Kraker M. E., Stewardson A. J., Harbarth S. // PLoS Med. - 2016. – Vol. 13. – P. 1002184–1002190.

87. De Oliveira, DMP. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / De Oliveira DMP., Forde B.M., Kidd T.J., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., Walker M.J. // Clin. Microbiol. Rev. – 2020. – Vol. 33, N. 3. – P. 181–230.
88. Dedrick, R.M. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* / Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. // Nat. Med. – 2019. – Vol. 25. – P. 730–733.
89. Dexter, C. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. / Dexter C., Murray G.L., Paulsen I.T., Peleg A.Y. // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. – 2015. - Vol. 13. – P. 567–573.
90. Donovan, P. Access to unregistered drugs in Australia // Aust. Prescr. – 2017. – Vol. 40. – P. 194–196.
91. Dropulic, L.K. Overview of Infections in the Immunocompromised Host / Dropulic L.K., Lederman H.M. // Microbiol. Spectr. – 2016. – Vol. 4, N. 4. – P. 1128 – 1195.
92. Duerkop, B. A. Resident viruses and their interactions with the immune system / Duerkop B. A., Hooper L. V. // Nat. Immunol. – 2013. - Vol. 14, N. 7. – P. 654 – 659.
93. Effah, C.Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health / Effah C.Y., Sun T., Liu S. // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2020. – Vol. 19, N. 1. – P. 1 – 9.
94. El Haddad, L. Microencapsulation of a *Staphylococcus* phage for concentration and long-term storage / El Haddad L., Lemay M.J., Khalil G.E., Moineau S., Champagne C.P. // Food Microbiol. - 2018. – Vol. 76. – P. 304–309.
95. Esteban, P.P. Enhancement of the antimicrobial properties of bacteriophage-K via stabilization using oil-in-water nano-emulsions / Esteban P.P., Alves D.R., Enright M.C., Bean J.E., Gaudion A., Jenkins A.T., Young A.E., Arnot T.C. // Biotechnol. Prog. – 2014. – Vol. 30, N. 4. – P. 932–944.

96. European strategic action plan on antibiotic resistance. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. - Текст: электронный. - URL: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/policy/european-strategic-action-plan-2011-2020> (дата обращения: 21.04.2022).
97. Facciola, A. The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature / Facciola A., Pellicano G.F., Visalli G., Paolucci I.A., Venanzi Rullo E., Ceccarelli M., D'Aleo F., Di Pietro A., Squeri R., Nunnari G., La Fauci V. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2019. – Vol. 23, N. 3. – P. 1266-1278.
98. Fadlallah, A. Corneal infection therapy with topical bacteriophage administration / Fadlallah A., Chelala E., Legeais J.M. // *Open Ophthalmol. J.* – 2015. – Vol. 9. – P.167-168.
99. Fauconnier, A. Phage therapy regulation: From night to dawn // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, N. 4. – P. 352 – 360.
100. Ferry, T. The potential innovative use of bacteriophages within the dac® hydrogel to treat patients with knee megaprosthesis infection requiring “debridement antibiotics and implant retention” and soft tissue coverage as salvage therapy / Ferry T., Batailler C., Petitjean C., Chateau J., Fevre C., Forestier E., Brosset S., Leboucher G., Kolenda C., Laurent F., Lustig S. // *Front Med. (Lausanne).* – 2020. – Vol. 7. – P. 342 – 350.
101. Food and Drug Administration. (2018). FDA alerts health care professionals of significant safety risks associated with cesium chloride. – Текст: электронный.- URL:<https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/PharmacyCompounding/ucm614211.htm> (дата обращения: 13.11.2021).
102. Founou, R.C. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. / Founou R.C., Founou L.L., Essack S.Y. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, N. 12. – P. 189621 – 189639.

103. Furfaro, L.L. Front bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles / Furfaro L.L., Payne M.S., Chang B.J. // *Cell Infect. Microbiol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 376 – 383.
104. G20 Leaders' Declaration: Shaping an interconnected world. Hamburg. - 2017. – Текст: электронный. – URL: [https:// www.g20. org/en/ g20/timeline](https://www.g20.org/en/g20/timeline) (дата обращения: 03.08.2021).
105. García-Solache, M. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment/García-Solache M., Rice L.B.//*Clin. Microbiol. Rev.* – 2019. –Vol.32, N. 2. . – P. 58 – 90.
106. Giammanco, A. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial / Giammanco A., Cala C. // *mSphere* 2. – 2017. – Vol. 2, N. 1. . – P. 310 – 320.
107. Giske, C.G. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli / Giske C.G., Monnet D.L., Cars O., Carmeli Y.// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52, N. 3. – P. 813-821.
108. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2015. – Текст: электронный. - URL: [https:// www.who.int/publications/i/item/9789241509763](https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763) (дата обращения: 02.03.2022).
109. Gordillo Altamirano F.L. Phage Therapy in the Postantibiotic Era / Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. – V. 32, N. 2. – P. 66–91.
110. Górski, A. Phage as a modulator of immune responses: Practical implications for phage therapy / Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Dąbrowska K, Wierzbicki P., Ohams M., Korczak-Kowalska G., Olszowska-Zaremba N., Łusiak-Szelachowska M., Kłak M., Jończyk E.// *Adv. Virus Res.* – 2012. – Vol. 83. – P. 41–47.
111. Górski, A. Phage Therapy: Towards a successful clinical trial / Górski A., Borysowski J., Międzybrodzki R. // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9, N. 11. – P. 827 – 834.

112. Guzman Prieto, A.M. Global emergence and dissemination of *Enterococci* as nosocomial pathogens: attack of the clones? / Guzman Prieto A.M., van Schaik W., Rogers M.R., Coque T.M., Baquero F., Corander J., Willems R.J. // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 788 – 803.
113. Harding, C.M. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence / Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2018. – Vol. 16, N. 2. – P. 91-102.
114. Hassoun, A. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment / Hassoun A., Linden P.K., Friedman B. // *Crit. Care.* – 2017. – Vol. 21, N. 1. – P. 211 – 221.
115. Hausler, T. Viruses vs. Superbugs: a solution to the antibiotic's crisis? // *MacMillan.* - 2008. – 292 p.
116. Hayden, M. K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci // *Clinical Infectious Diseases.* – 2000. – Vol. 31, N. 4. – P. 1058-1065.
117. Henein, A. What are the limitations on the wider therapeutic use of phage? // *Bacteriophage.* - 2013. – Vol. 3, N. 2. . – P. 24872 – 24879.
118. Hietala, V. The removal of endo- and enterotoxins from bacteriophage preparations / Hietala V., Horsma-Heikkinen J., Carron A., Skurnik M., Kiljunen S. // *Front Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1674 – 1683.
119. Hodyra-Stefaniak, K. Mammalian Host - Versus - Phage immune response determines phage fate *in vivo* / Hodyra-Stefaniak K., Miernikiewicz P., Drapała J., Drab M., Jończyk-Matysiak E., Lecion D., Kaźmierczak Z., Beta W., Majewska J., Harhala M., Bubak B. // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 14802 - 14817.
120. Hollenbeck, B.L. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus / Hollenbeck B.L., Rice L.B. // *Virulence.* – 2012. – Vol. 3, N. 5. – P. 421-433.

121. Hsu, B.B. *In situ* reprogramming of gut bacteria by oral delivery / Hsu B.B., Plant I.N., Lyon L., Anastassacos F.M., Way J.C., Silver P.A. // Nat. Commun. – 2020. – Vol. 11. – P. 5030 – 5041.
122. Huys, I. Paving a regulatory pathway for phage therapy. Europe should muster the resources to financially, technically and legally support the introduction of phage therapy / Huys I., Pirnay J.P., Lavigne R. // EMBO Rep. – 2013. – Vol. 14, N. 11. – P. 951-954.
123. Ivin, M. Natural killer cell-intrinsic type I IFN signaling controls *Klebsiella pneumoniae* growth during lung infection. / Ivin M., Dumigan A., Vasconcelos F. N., Ebner F., Borroni M., Kavirayani A., Przybyszewska K. N., Ingram R. J., Lienenklaus S., Kalinke U., Stoiber D., Bengoechea J. A., Kovarik P. // PLoS Pathog. – 2017. – Vol. 13, N. 11. – P. 1006696 – 1006725.
124. Jabbari Shiadeh, S.M. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis / Jabbari Shiadeh S.M., Pormohammad A., Hashemi A. // Infect. Drug Resist. – 2019. – Vol.12. – P. 2713-2725.
125. Jarow, J.P. Overview of FDA’s expanded access program for investigational drugs / Jarow J.P., Lurie P., Ikenberry S.C. // Ther. Innov. Regul. Sci. – 2017. – Vol. 51. – P. 177–179.
126. Jault, P. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial / Jault P., Leclerc T., Jennes S., Pirnay J.P., Que Y.A., Resch G., Rousseau A.F., Ravat F., Carsin H., Le Floch R. // Lancet Infect. Dis. – 2018. – Vol.19. – P. 35–45.
127. Jennes, S. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury – a case report / Jennes S., Merabishvili M., Soentjens P., Pang K.W., Rose T., Keersebilck E., Soete O., François P.M., Teodorescu S., Verween G. // Crit. Care. – 2017. – Vol. 21. – P. 129 -131.

128. Jikia, D. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90 / Jikia D., Chkhaidze N., Imedashvili E. // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2005. – Vol. 30, N. 1. – P. 23–26.
129. Karen, Guerin. residual cesium chloride in aav vectors purified by cscl gradient centrifugation does not cause obvious inflammation or retinal degeneration in C57Bl6/J Mice Following Subretinal Injection / Karen Guerin, Vivian Choi, Jorge Aranda. // *Molecular Therapy.* – 2015. – Vol. 23, N. 1. – P. 240 – 241.
130. Kaur, P. A novel wound dressing consisting of PVA-SA hybrid hydrogel membrane for topical delivery of bacteriophages and antibiotics / Kaur P., Gondil V.S., Chhibber S. // *Int. J. Pharm.* - 2019. – Vol. 572. – P. 118779 – 118801.
131. Kaźmierczak, Z. Immune response to therapeutic staphylococcal bacteriophages in mammals: kinetics of induction, immunogenic structural proteins, natural and induced antibodies / Kaźmierczak Z., Majewska J., Miernikiewicz P., Międzybrodzki R., Nowak S., Harhala M., Lecion D., Kęska W., Owczarek B., Ciekot J. // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 639570 – 639585.
132. Khan, H.A. Nosocomial infections and their control strategies / Khan H.A., Ahmad A., Mehboob R. // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2015. - V. 7. – P. 509-514.
133. Khanal D. Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections / Khanal D., Chang R.Y.K., Hick C., Chan H.K. // *Int. J. Pharm.* – 2021. – Vol. 609, - P. 121206 - 121217.
134. Khatami, A. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child / Khatami A, Lin R.C.Y., Petrovic-Fabijan A., Alkalay-Oren S., Almuzam S., Britton P.N., Brownstein M.J., Dao Q., Fackler J., Hazan R. // *EMBO Mol. Med.* – 2021. – Vol. 13, N. 9. – P. 13936–13945.
135. Kim, K.P. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T - helper type 1 immune response / Kim K.P., Cha J.D., Jang E.H., Klumpp J., Hagens S., Hardt W. D., Lee K.Y., Loessner M. J. // *Microb. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 1, N. 3. – P. 247–257.

136. Kishimoto, T. Therapeutic effects of intravitreally administered bacteriophage in a mouse model of endophthalmitis caused by vancomycin-sensitive or -resistant *Enterococcus faecalis* / Kishimoto T., Ishida W., Fukuda K., Nakajima I., Suzuki T., Uchiyama J., Matsuzaki S., Todokoro D., Daibata M., Fukushima A. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – Vol. 63, N. 11. – P. 1088–1100.
137. Kollef, M.H. Nosocomial infection / Kollef M.H., Torres A., Shorr A.F., Martin-Loeches I., Micek S.T. // *Crit. Care Med.* – 2021. – Vol. 49, N. 2. – P. 169-187.
138. Kramer, A. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review / Kramer A., Schwebke I., Kampf G. // *BMC Infectious Diseases.* – 2006. – Vol. 6. – P. 130 – 138.
139. Krut, O. Contribution of the immune response to phage therapy. / Krut O., Bekeredjian-Ding I. // *J. Immunol.* – 2018. – Vol. 200, N. 9. – P. 3037-3044.
140. Kurihara, M.N.L. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings / Kurihara M.N.L., Sales R.O., Silva K.E.D., Maciel W.G., Simionatto S. // *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* – 2020. – Vol. 53. – P. 20200248 - 2020161.
141. Lakhundi, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology / Lakhundi S., Zhang K. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2018. – V. 31, N. 4. – P. 20 – 123.
142. Lee, C. R. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms / Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Kim Y.B., Cha C.J., Jeong B.C., Lee S.H. // *Front Cell Infect. Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 483 - 496.
143. Lee, C.R. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options / Lee J.H., Park M. // *Front Cell Infect. Microbiol.* – 2017. – Vol.7. – P. 55 – 90.
144. Leitner, L. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebocontrolled, doubleblind clinical trial / Leitner L., Sybesma W., Chanishvili N., Goderdzishvili

- M., Chkhotua A., Ujmajuridze A., Schneider M.P., Sartori A., Mehnert U., Bachmann L.M. // BMC Urol. – 2017. – Vol. 17, N. 1. – P. 90 – 96.
145. Leitner, L. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial / Leitner L., Ujmajuridze A., Chanishvili N., Goderdzishvili M., Chkonia I., Rigvava S., Chkhotua A., Changashvili G., McCallin S., Schneider M.P.// Lancet Infect. Dis. – 2021. – Vol. 21, N. 3. – P. 427-436.
146. Leszczyński, P. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker — Case report / Leszczyński P., Weber-Dabrowska B., Kohutnicka K.M., Luczak M., Górecki A., Górski A.// Folia. Microbiol. – 2006. – Vol. 51. – P. 336–338.
147. Letkiewicz, S. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—case report / Letkiewicz S., Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dabrowska B., Górski A.// FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 54. – P. 457–461.
148. Leung, S.S.Y. Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders / Leung S.S.Y., Parumasivam T., Gao F.G., Carter E.A., Carrigy N.B., Vehring R., Finlay W.H., Morales S., Britton W.J., Kutter E., Chan H.K. // Int. J. Pharm. – 2017. – Vol. 521. – N. 1–2. – P. 141–149.
149. Leung, S.S.Y. Jet nebulization of bacteriophages with different tail morphologies — Structural effects / Leung S.S.Y., Carrigy N.B., Vehring R., Finlay W.H., Morales S., Carter E.A., Britton W.J., Kutter E., Chan H.K. // Int. J. Pharm. – 2019. – Vol. 554. – P. 322–326.
150. Li, M. Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections / Li M., Chang R.Y.K., Lin Y., Kutter E., Chan H.K. // Int J Pharm. – 2021. - Vol. 596.
151. Livermore, D.M. Minimising antibiotic resistance // Lancet Infect. Dis. - 2012. – N. 5. - P. 450-459.

152. Lob, S.H. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* / Lob S.H., Hoban D.J. // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2016. – Vol. 47. – P. 317–323.
153. Łusiak-Szelachowska, M. Antiphage activity of sera from patients receiving staphylococcal phage preparations / Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B. // Microbes in the spotlight - recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms – 2016. – P. 245–249.
154. Łusiak-Szelachowska, M. Anti-phage serum antibody responses and the outcome of phage therapy / Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Fortuna W. // Folia Microbiol. (Praha). – 2021. – Vol. 66, N. 1. – P. 127-131.
155. Łusiak-Szelachowska, M. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy / Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Kłak M., Fortuna W., Letkiewicz S., Rogóż P., Szufnarowski K., Jończyk-Matysiak E. // Viral. Immunol. – 2014. – Vol. 27, N. 6. – P. 295–304.
156. Maddocks, S. Bacteriophage therapy of ventilator-associated pneumonia and empyema caused by *Pseudomonas aeruginosa* / Maddocks S., Fabijan A.P., Ho J., Lin R.C.Y., Ben Zakour N.L., Dugan C., Kliman I., Branston S., Morales S., Iredell J.R. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2019. – Vol. 200. - P. 1179–1181.
157. Magill, S.S. Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections / Magill S.S., Edwards J.R., Bamberg W. // N. Engl. J. Med. – 2014. - Vol. 370, N. 13. – P. 1198-208.
158. Magill, S.S. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections / Magill S.S., Edwards J.R., Bamberg W., Beldavs Z.G., Dumyati G., Kainer M.A., Lynfield R., Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J.// N. Engl. J. Med. – 2014. - V. 370. – P. 1198–1208.
159. Magiorakos A.P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y.,

Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18, N. 3. – P. 268-281.

160. Magnani, Robert. Sampling guide. Food Security and Nutrition Technical Assistance (FANTA). Academy for Educational Development. - 1997. - Washington, DC.

161. Majewska, J. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood / Majewska J., Beta W., Lecion D., Hodyra-Stefaniak K., Kłopot A., Kaźmierczak Z., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Ciekot J., Owczarek B., Kopciuch A., Wojtyna K., Harhala M., Mąkosa M., Dąbrowska K. // *Viruses.* – 2015. - Vol. 7, N. 8. – P. 4784-4799.

162. Malik, B. Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse / Malik B. Bhattacharyya S. // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 9788–9800.

163. Marcuk, L. M. Clinical studies of the use of bacteriophage in the treatment of cholera / Marcuk L. M., Nikiforov V. N., Scerbak J. F., Levitov T.A., Kotljarova R.I., Naumsina M.S., Davydov S.U., Monsur K.A., Rahman M.A., Latif MA. // *Bulletin of the World Health Organization* – 1971. - Vol. 45, N. 1. – P. 77–83.

164. Mari-Almirall, M. MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species / Marí-Almirall M., Cosgaya C., Higgins P.G., Van Assche A., Telli M., Huys G., Lievens B., Seifert H., Dijkshoorn L., Roca I. // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2016. – Vol. 23, N. 3. – P. 210 – 219.

165. Martone, W. J. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System / Martone W. J., Gaynes R. P., Horan T. C., Danzig L., Emori T.G., Monnet D., Stroud L. A., Wright G. C., Culver D. H., Banerjee S. N. // *Am. J. Infect. Control.* – 1995. – Vol. 23, N. 6. – P. 377 – 385.

166. McCallin, S. Bacterial resistance to phage and its impact on clinical therapy / McCallin S., Oechslin F. // *Phage Therapy: A Practical Approach*. Cham: Springer International Publishing. – 2019. – P. 59 – 88.

167. McCallin, S. Current state of compassionate phage therapy / McCallin S., Sacher J.C., Zheng J. et. al. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, N. 4. – P. 343 - 357.
168. McGuinness, W.A. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* / McGuinness W.A., Malachowa N., DeLeo F.R. // *Yale J. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 90, N. 2. – P. 269-281.
169. Metersky, M.L. New guidelines for nosocomial pneumonia. / Metersky M.L., Kalil A.C. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2017. – Vol. 23, N. 3. – P. 211-217.
170. Miedzybrodzki, R. Clinical aspects of phage therapy / Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P., Kłak M., Wojtasik E. // *Adv. Virus Res.* – 2012. – Vol. 83. – P. 73–121.
171. Mirski, T. Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides - the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs. / Mirski T, Lidia M, Nakonieczna A. // *Ann. Agric. Environ Med.* – 2019. - Vol. 26, N. 2. – P. 203 – 209.
172. Morello, E. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention / Morello E., Sausseureau E., Maura D., Huerre M., Touqui L., Debarbieux L. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, N. 2. – P. 16963 – 16972.
173. Navon-Venezia, S. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance / Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2017. – Vol. 41, N. 3. – P. 252 – 275.
174. Nelson, M. I. Genetic diversity of noroviruses circulating in a pediatric cohort in Bangladesh / Nelson M. I., Mahfuz M., Chhabra P., Haque R., Seidman J.C., Hossain I., McGrath M., Ahmed A.M.S., Knobler S., Vinjé J. // *J. Infect. Dis.* – 2018. - Vol. 218. - P. 1937–1942.
175. Nordmann, P. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* / Nordmann P., Naas T., Poirel L. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17, N.10. – P. 1791-1798.

176. Oechslin, F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, N. 7. – P. 351 – 374.
177. Olesen, S.W. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance / Olesen S.W., Barnett M.L., MacFadden D.R., Brownstein J.S., Hernández-Díaz S., Lipsitch M., Grad Y.H. // *Elife*. – 2018. – Vol. 7. – P. 39435–39450.
178. Ooi, M.L. Safety and tolerability of bacteriophage therapy for chronic rhinosinusitis due to *Staphylococcus aureus* / Ooi M.L., Drilling A.J., Morales S. et al. // *JAMA Otolaryngol. - Head Neck Surg.* – 2019. – Vol. 145. – P. 723–729.
179. Otto, M. Community-associated MRSA: what makes them special? // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 303, N. 6-7. – P. 324 – 354.
180. Pang, Z. Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies / Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z. // *Biotechnol. Adv.* – 2019. – Vol. 37, N. 1. – P. 177-192.
181. Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen / Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2008. – Vol. 21, P. 538–582.
182. Pelfrene, E, Sebris Z, Cavaleri M. Developing phages into medicines for europe. phage therapy: a practical approach, Switzerland AG: Springer International Publishing. – 2019. – P. 351–361.
183. Pelfrene, E. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective / Pelfrene E., Willebrand E., Cavaleiro Sanches A., Sebris Z., Cavaleri M. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – P. 2071–2074.
184. Pescovitz, M. D. Effect of rituximab on human in vivo antibody immune responses / Pescovitz M. D., Ocheltree E., McGee P., Krause-Steinrauf H., Lachin J.M., Canniff J., Greenbaum C., Herold K.C. // *Journal allergy clinical immunology.* – 2011. – Vol. 128, N. 6. – P. 1295 – 1302.
185. Petrovic Fabijan, A. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection / Petrovic Fabijan A., Lin R. C. Y., Ho J., Ben Zakour N.L., Iredell J.R. // *Nat. Microbiol.* – 2020. – Vol. 5. – P. 465-472.

186. Pires, D.P. Current challenges and future opportunities of phagetherapy / Pires D.P., Costa A.R., Pinto G., Azeredo J. // J. FEMS Microbiol. Rev. – 2020. – Vol. 44, N. 6. – P. 684 – 700.
187. Pirnay, J.P. The magistral phage / Pirnay J.P., Verbeken G., Ceysens P.J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. // Viruses. - 2018. – Vol. 10, N. 2. – P. 64 – 71.
188. Potter, R.F. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* / Potter R.F., D'Souza A.W., Dantas G. // Drug Resist Updat. – 2016. – Vol. 29. – P. 30 – 46.
189. Prazak, J. Nebulized bacteriophages for prophylaxis of experimental ventilator-associated pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Prazak J., Valente L., Iten M., Grandgirard D., Leib S.L., Jakob S.M., Haenggi M., Que Y.A., Cameron D.R. // Crit. Care Med. – 2020. – Vol. 48, N. 7. – P. 1042–1046.
190. Prokesch, B.C. Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumonia* / Prokesch B. C., TeKippe M., Kim J., Raj P., TeKippe E.M., Greenberg D.E. // Lancet Infect. Dis. – 2016. – P. 190–195.
191. Ray, A. Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients / Ray A., Pultz N., Bhalla A., ron D.C., Donskey C.J. // Clin. Infect. Dis. – 2003. - Vol. 37. – P. 875–881.
192. Raza, T. Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review. / Raza T., Ullah S.R., Mehmood, K. // J. Pak. Med. Assoc. – 2018. – Vol. 68, N. 5. – P. 768 – 772.
193. Reindel, R. Phage therapy: considerations and challenges for development / Reindel R., Fiore C.R. // Clin. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 64. – P. 1589–1590.
194. Richards, K. Microencapsulation of bacteriophages using membrane emulsification in different pH-triggered controlled release formulations for oral administration / Richards K., Malik D.J. // Pharmaceuticals (Basel). -2021. – Vol. 14, N. 5. – P. 424 – 465.
195. Riquelme, S.A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia* adaptation to innate immune clearance mechanisms in the lung / Riquelme S. A., Ahn D., Prince A. // J. Innate Immun. – 2018. – Vol. 10, N. 5-6. – P. 442–454.

196. Rodriguez-R, L.M. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes / L.M. Rodriguez-R, K.T. Konstantinidis // PeerJ. – 2016. – Preprint. – 16 p.
197. Sambrook, J.F., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Vol. 1, 2, 3. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 2001. – 2100 p.
198. Santajit ,S. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / Santajit S., Indrawattana N. // Biomed. Res. Int. – 2016. – P. 2475067 - 2475075.
199. Sarker, S.A. Oral application of *Escherichia coli* bacteriophage: safety tests in healthy and diarrheal children from Bangladesh / Sarker S.A., Berger B., Deng Y. // Environ Microbiol. - Vol. 19. – P. 237–250.
200. Sarker, S.A. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh / Sarker S.A., Sultana S., Reuteler G., Moine D., Descombes P., Charton F., Bourdin G., McCallin S., Ngom-Bru C., Neville T. // EBioMedicine. – 2016. – Vol. 4. – P. 124–137.
201. Sarker, S.A. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh / Sarker S.A., McCallin S., Barretto C., Berger B., Pittet A.C., Sultana S., Krause L., Huq S., Bibiloni R., Bruttin A., Reuteler G. // Virology. - 2012. – Vol. 434. – P. 222–232.
202. Schooley, R. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. / Schooley R., Biswas B., Gill J.J., Hernandez-Morales A., Lancaster J., Lessor L., Barr J.J., Reed S.L., Rohwer F., Benler S.// Antimicrob. Agents Chemother. – 2017. - Vol. 61, N. 10. – P. 954–968.
203. Semler, D.D. Aerosol phage therapy efficacy in *Burkholderia cepacia* complex respiratory infections / Semler D.D., Goudie A.D., Finlay W.H., Dennis J.J. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58, N. 7. – P. 4005–4013.
204. Shen, H.Y. Controlled-release of free bacteriophage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing / Shen H.Y., Liu Z.H., Hong J.S., Wu MS, Shiue SJ, Lin HY. // J. Control Release. – 2021. – Vol. 331. – P. 154-163.

205. Shi, Z. RNA nanoparticle distribution and clearance in the eye after subconjunctival injection with and without thermosensitive hydrogels / Shi Z., Li S.K., Charoenputtakun P., Liu C.Y., Jasinski D., Guo P. // J. Control Release. – 2018. – Vol. 270. – P. 14–22.
206. Shon, A. S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / Shon A. S., Bajwa R. P., Russo T. A. // Virulence. – 2013. – Vol. 4. – P. 107–118.
207. Sievert, D. M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010 / Sievert D.M., Ricks P., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Srinivasan A., Kallen A., Limbago B., Fridkin S. // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. – 2013. – Vol. 34. - P. 1–14.
208. Sikora, A. Nosocomial Infections. / Sikora A., Zahra F. // StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL) – 2021. – Текст: электронный. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/> (дата обращения: 21.03.2022).
209. Sinha, A. Bacteriophages: uncharacterized and dynamic regulators of the immune system mediators. / Sinha A., Maurice C. F. // Inflamm. – 2019.
210. Sreeramoju, P. Recent advances in understanding the epidemiology of healthcare-associated infections // F1000Research. – 2019. - Vol. 8 – P. 106 113.
211. Stiller, A. ICU ward design and nosocomial infection rates: a cross-sectional study in Germany. / Stiller A., Schröder C., Gropmann A., Schwab F., Behnke M., Geffers C., Sunder W., Holzhausen J., Gastmeier P. // J. Hosp. Infect. – 2017. – Vol. 95, N. 1. – P. 71-75.
212. Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy / Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Jr. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45. – P. 649–659.
213. Summers, W.S. Felix d'herelle and the origins of molecular biology // Yale New Haven, CT: UniversityPress. - 1999. – 230 p.

214. Sydnor, E.R. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. / Sydnor E.R., Perl T.M. // Clin. Microbiol. Rev. – 2011. – Vol. 24, N. 1. – P.141 – 73.
215. Szermer-Olearnik, B. Removal of endotoxins from bacteriophage preparations by extraction with organic solvents / Szermer-Olearnik B., Boratyński J. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N. 3. – P.122672 – 122682.
216. Technical review on monitoring and evaluation protocol for communicable disease surveillance and response systems Report of a WHO meeting. Geneva: Switzerland. - 2012. –13 p.
217. Todd, K. The promising viral threat to bacterial resistance: The uncertain patentability of phage therapeutics and the necessity of alternative incentives // Duke Law J. – 2018. – Vol. 68, № 4. – P. 767-805.
218. Tong, S.Y. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management / Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler VG. Jr. // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 28, N. 3. – P. 603-661.
219. Translating phage-based applications into clinically and commercially viable therapeutics–Текст: электронный.–URL: <https://www.kisacoresearch.com/events/phage-futures-europe> (дата обращения: 19.01.2022).
220. Tümmler, B. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. // F1000Res. – 2019. – Vol. 8. – P. 1371 – 1385.
221. Turner, N.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research / Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A. // Nat. Rev. Microbiol. – 2019. - Vol. 17, N. 4. – P. 203-218.
222. Ujmajuridze, A. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections / Ujmajuridze A., Chanishvili N., Goderdzishvili M., Leitner L., Mehnert U., Chkhotua A., Kessler T.M., Sybesma W.// Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1832 – 1839.

223. Van Belleghem, J.D. Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system / Van Belleghem J.D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M. // *Viruses*. - 2019. – Vol. 11, N. 1. – P. 10 – 32.
224. Van Belleghem, J.D. Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. / Van Belleghem J.D., Clement F., Merabishvili M., Lavigne R., Vaneechoutte M. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 8004 – 8017.
225. Vasina, D.V. Efficacy of the endolysin-based antibacterial gel for treatment of anaerobic infection caused by *Fusobacterium necrophorum* / Vasina D. V., Antonova N. P., Vorobev A. M., Laishevtsev A. I., Kapustin A. V., Zulkarneev E. R., Bochkareva S. S., Kiseleva I. A., Anurova M. N., Aleshkin A. V., Tkachuk A. P., Gushchin V. A. // *Antibiotics*. – 2021. – Vol.10, N.10. – P. 1260 – 1274.
226. Vinner, G.K. High precision microfluidic microencapsulation of bacteriophages for enteric delivery / Vinner G.K., Malik D.J. // *Res. Microbiol.* – 2018. – Vol. 169, N. 9. – P. 522-530.
227. Vinner, G.K. microencapsulation of enteric bacteriophages in a pH-responsive solid oral dosage formulation using a scalable membrane emulsification process. / Vinner G.K., Richards K., Leppanen M., Sagona A.P., Malik D.J. // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11, N. 9. – P. 475 – 493.
228. Weber-Dabrowska, B. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients / Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. // *Clin. Appl. Immunol. Rev.* – 2001. – Vol. 1. – P. 131 – 134.
229. Weber-Dabrowska, B. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience / Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. – 2000. – Vol. 48. – P. 547-551.
230. Weber-Dabrowska, B. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man / Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. // *Transplant. Proc.* – 2003. – Vol. 35. – P. 1385–1386.
231. Weiner, L.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety

- network at the centers for disease control and prevention, 2011–2014. / Weiner L.M., Webb A.K., Limbago B. // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* – 2016. Vol. 37. - P. 1288–1301.
232. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, Switzerland. World Health Organization. – 2014. – Текст: электронный. – URL: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (дата обращения: 14.04.2022).
233. World Health Organization. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. - Switzerland: WHO, 2000. - 27 p.
234. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects // *JAMA.* - 2013. – V. 310. – P. 2191–2194.
235. Worley-Morse, T.O. The long-term effects of phage concentration on the inhibition of planktonic bacterial cultures / Worley-Morse T.O., Zhang L., Gunsch C.K. // *Environ. Sci. Process. Impacts.* – 2014. – Vol. 16. - P. 81–87.
236. Wright, A.A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic - resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy / Wright A, Hawkins C.H., Änggård E.E., Harper D.R. // *Clin. Otolaryngol.* - 2009. – Vol. 34. – P. 349–357.
237. Yan, W. Development of thermosensitive hydrogel wound dressing containing *Acinetobacter baumannii* phage against wound infections / Yan W, Banerjee P, Liu Y et.al. // *Int. J. Pharm.* – 2021. – Vol. 602. – P. 12058–12069.
238. Yoon, S.H. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity / S.H. Yoon, S. Ha, J. Lim, S. Kwon, J. Chun // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2017. – Vol. 110. – P. 1281-1286.
239. Żaczek, M. Antibody production in response to staphylococcal ms-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy / Żaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jończyk-Matysiak E., Międzybrodzki R., Owczarek B., Kopciuch A., Fortuna W., Rogóż P., Górski A. // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1681 – 1695.

240. Zhang, Y. Manufacturing stable bacteriophage powders by including buffer system in formulations and using thin film freeze-drying technology / Zhang Y., Soto M., Ghosh D., Williams RO 3rd. // Pharm. Res. – 2021. – Vol. 38, № 10. – P. 1793-1804.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключении хочу выразить глубочайшую благодарность научным консультантам Караулову Александру Викторовичу и Ершовой Ольге Николаевне, коллегам за помощь в выполнении и оформлении работы:

Новиковой Лидии Ивановне

Бляхер Марии Сергеевне

Федоровой Ирине Михайловне

Капустину Ивану Всеволодовичу

Котелевой Светлане Игоревне

Киселевой Ирине Анатольевне

Шкоде Андрею Сергеевичу

Митрохину Сергею Дмитриевичу

Назаренко Антону Герасимовичу

Савину Ивану Анатольевичу

Затевалову Александру Михайловичу

Алехнович Александру Владимировичу

Дятлову Ивану Алексеевичу

Светоч Эдуарду Арсеньевичу

Воложанцеву Николаю Валентиновичу

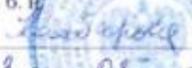
Поповой Анастасии Владимировне

ПРИЛОЖЕНИЯ**Приложение 1**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН МНИИЭМ
Им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

д. б. и.  С.Ю. Комбарова

« 3 / 01 / 2022 г.  2022 г.

Конфиденциальность гарантируется

Получателем информации

Для служебного пользования.

Экз. № 1**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ**

На производство

препарата

«Раствор для приема внутрь и местного применения с коктейлем бактериофагов»

ЛР 01-2022

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН МНИИЭМ

Им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

д. б. в.

 С.Ю. Комбарова

«19 01 2022»

Конфиденциальность гарантируется

Получателем информации

Для служебного пользования.

Экз. № 1

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

На производство

препарата

«Раствор для инъекций с коктейлем бактериофагов»

ЛР 02-2022



ООО «Биннофарм Групп»

115114, г. Москва, ул. Кожевническая, д. 14, стр. 5

e-mail: info@binnopharmgroup.ru

тел.: +7 (495) 646-28-68

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор по разработкам и регистрации

ООО «Биннофарм Групп»

А.Н. Чупин



2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» Бочкаревой Светланы Сергеевны

Комиссия в составе:

Директора по исследованиям и разработкам Вальдемара Жозвика,

Руководителя Центра фармацевтической

разработки (Север) Давыдова Тимура Юрьевича,

Руководителя Центра фармацевтической

разработки (Юг) Агафонова Андрея Алексеевича,

составили акт о том, что материалы докторской диссертационной работы Бочкаревой С.С. на тему: «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» внедрены в практическую деятельность ООО «Биннофарм Групп», в т.ч. на базе производственной площадки отработаны лабораторные регламенты и проекты нормативных документов на представленные в рамках диссертационного исследования лекарственные формы бактериофагов.

Председатель комиссии:

Вальдемар Жозвик

Члены комиссии:

Давыдов Т.Ю.

Агафонов А.А.



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова
Минздрава России,
академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Маев И.В.

«27» _____ 2022 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертации Бочкаревой Светланы Сергеевны
(фамилия, имя, отчество)
в учебный процесс кафедры клинической микробиологии и фаготерапии факультета
дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова
Минздрава России
(название кафедры)
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации
кандидатской (докторской) диссертации Бочкаревой Светланы Сергеевны
(фамилия, имя, отчество)
на тему «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты
фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи»
(название диссертации)
внедрены в учебный процесс кафедры клинической микробиологии и фаготерапии ФДПО
(название кафедры)
при изучении дисциплин «Фаготерапия, фагопрофилактика, клиническая и лабораторная
диагностика инфекционных заболеваний с применением бактериофагов», «Вопросы бактериологии»
(название дисциплин)
читаемых слушателям кафедры по специальности Бактериология

Заведующий кафедрой клинической
микробиологии и фаготерапии ФДПО
доктор биологических наук, профессор
Алешкин В.А.

Алешкин В.А.
(подпись)



УТВЕРЖДАЮ
 Главный врач
 ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им.
 акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России
 проф., д.м.н. Назаренко А.Г.

«05» 09 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации

Бочкаревой Светланы Сергеевны

(фамилия, имя, отчество)

в лечебный процесс отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ)

(наименование отделения)

ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России

(название организации)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации докторской диссертации «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи»

(название диссертации)

внедрены в лечебный процесс отделения

реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им.

акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России

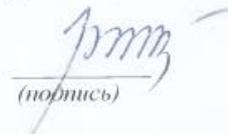
(наименование организации)

Заведующий отделением реанимации
и интенсивной терапии


(подпись)

Савин И.А.
(ФИО)

Заместитель главного врача
по эпидемиологической работе


(подпись)

Ершова О.Н.
(ФИО)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН МНИИЭМ

им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

д.б.н. Комбарова С.Ю.

« 5 » декабря 2022 г.



Акт внедрения

Об использовании результатов диссертационной работы Бочкаревой С.С. на тему: «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «1.5.6. – Биотехнология».

Комиссия в составе зам. директора ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора по биотехнологии, руководителя Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора, член-корр. РАН, профессора РАН, д.б.н. Алешкина А.В., в.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, к.б.н. Киселевой И.А., в.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, к.б.н. Ефимовой О.Г., с.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, к.б.н. Зулькарнеева Э.Р. составила настоящий акт о том, что материалы диссертации Бочкаревой С.С., посвященные разработке иммуноферментных тест-систем для определения в сыворотке крови IgG-антител к бактериофагам KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111

внедрены в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора. Иммуноферментные тест-системы используются для выявления антифагового гуморального ответа при проведении фаготерапии указанными бактериофагами.

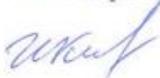
Председатель комиссии

Зам. директора ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора по биотехнологии, руководитель Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора,

член-корр. РАН, профессор РАН, д.б.н.  Алешкин А.В.

Члены комиссии:

В.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского,

к.б.н.  Киселева И.А.

В.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского,

к.б.н.  Ефимова О.Г.

С.н.с. лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского,

к.б.н.  Зулкарнеев Э.Р.

ДОГОВОР
о научном сотрудничестве
03/06-НТС-2018

г. Москва

«25» июня 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России), г. Москва, в лице проректора по научной работе, Е.А. Вольской, действующего на основании доверенности № 02.03-3160 от 25.09.2017 г. и Федеральное государственное автономное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России) г. Москва, в лице Директора Потапова А.А., действующего на основании Устава (вместе именуемые – Стороны), заключили настоящий договор (далее – Договор) о нижеследующем:

1. ЦЕЛЬ СОГЛАШЕНИЯ

Целью научного сотрудничества ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России является совместно выполняемый научный проект (далее-НИР) по теме: «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. Совместные исследования проводятся участниками соглашения в соответствии с Планом выполнения НИР.

2.2. Стороны прилагают совместные усилия к повышению квалификации сотрудников, проводя их обучение на рабочих местах каждой из Сторон, консультируют друг друга в рамках компетенции каждого из участников, проводят совместные обсуждения, планируя публикации и диссертационные работы, основанные на результатах совместных исследований.

2.3. Стороны пришли к договоренности, что исключительное право на результаты интеллектуальной деятельности, созданные Сторонами в результате совместных исследований в рамках данного Договора, будет принадлежать Сторонам совместно. Распоряжение исключительным правом на результаты интеллектуальной деятельности, правообладателями которого являются совместно ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России (включая определение отдельных условий такого распоряжения), будут осуществляется Сторонами совместно на основании отдельных договоров и соглашений.

2.3. Публикация результатов исследования в журналах, трудах конференций, оформление патентов на изобретение, упоминание в публичных выступлениях возможны лишь с ведома и согласия обеих сотрудничающих сторон.

2.4. Стороны будут прилагать усилия для получения целевого финансирования совместных работ по настоящему Договору.

3. ОБЯЗАТЕЛЬСТВА СТОРОН

3.1. В рамках договора ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России обязуются выработать согласованные позиции по вопросам, возникающим в ходе реализации настоящего Договора, направленные на достижение поставленной цели.

3.2. Для достижения цели сотрудничества Стороны обязуются на взаимовыгодных условиях обмениваться имеющимися в их распоряжении научно-техническими разработками, результатами исследований, документацией, информационными и иными материалами, включая издаваемую сторонами литературу, если они не имеют перед третьими лицами обязательств, препятствующих такой передаче.

3.3. Стороны обязуются информировать друг друга о своей деятельности, осуществляемой в рамках настоящего Договора, а также о результатах такой деятельности.

3.4. Стороны обязуются при необходимости налаживать контакты с третьими лицами и информировать друг друга о результатах таких контактов.

3.5. Стороны обязуются соблюдать нормы международного права и законодательство РФ.

3.6. Стороны обязуются получать всю необходимую для проведения НИР разрешительную документацию.

3.7. Настоящий договор не предусматривает финансовых обязательств сторон.

4. ПРОЧИЕ УСЛОВИЯ

4.1. Претензии Сторон, возникающие в связи с исполнением настоящего Договора рассматриваются Сторонами путем переговоров.

4.2. Все вопросы, не урегулированные настоящим Договором, решаются в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

4.3. Расторжение настоящего Договора допускается по соглашению Сторон, или одной из сторон. Если инициатором расторжения договора является одна из сторон, она письменно уведомляет о своем решении другую сторону Договора.

5. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

5.1. Настоящий Договор составлен в 2-х экземплярах, идентичных по содержанию и имеющих одинаковую юридическую силу, по одному для каждой из сторон.

6. ПОДПИСИ СТОРОН:

Федеральное государственное автономное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Юридический адрес: 125047, г. Москва, ул. 4-я Тверская – Ямская, д. 16

Юридический адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1



Потапов А.А.

Ответственные исполнители:

Заместитель главного врача по эпидемиологической работе

Ершова О.Н.

Проректор по научной работе



Е. А. Вольская

Заведующий кафедрой клинической микробиологии и фаготерапии

Алешкин В.А.

ПОТОВА Н.В.
25.06.2017

ДОГОВОР
о научном сотрудничестве

г. Москва

«06 11/2017» 2018 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (далее – ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России), г. Москва, в лице проректора по научной работе, Е.А. Вольской, действующего на основании доверенности № 02.03-3160 от 25.09.2017 г. и Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 67 имени Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы» (далее – ГБУЗ «ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ») г. Москва, в лице Главного врача Шкоды Андрея Сергеевича, действующего на основании Устава (вместе именуемые – Стороны), заключили настоящий договор (далее – Договор) о нижеследующем:

1. ЦЕЛЬ ДОГОВОРА

Целью научного сотрудничества ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ГБУЗ «ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ» является совместно выполняемый научный проект (далее-НИР) по теме: «Разработка персонализированной фэготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».

2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

2.1. Совместные исследования проводятся участниками договора в соответствии с Планом выполнения НИР.

2.2. Стороны прилагают совместные усилия к повышению квалификации сотрудников, проводят их обучения на рабочих местах каждой из Сторон, консультируют друг друга в рамках компетенции каждого из участников, проводят совместные обсуждения, планируя публикации и диссертационные работы, основанные на результатах совместных исследований.

2.3. Стороны пришли к договоренности, что исключительное право на результаты интеллектуальной деятельности, созданные Сторонами в результате совместных исследований в рамках данного Договора, будет принадлежать Сторонам совместно. Распоряжение исключительным правом на результаты интеллектуальной деятельности, правообладателями которого являются совместно ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ (включая определение отдельных условий такого распоряжения), будут осуществляется Сторонами совместно на основании отдельных договоров и соглашений.

2.4. Публикация результатов исследования в журналах, трудах конференций, оформление патентов на изобретение, упоминание в публичных выступлениях возможны лишь с ведома и согласия обеих сотрудничающих сторон.

2.5. Стороны будут прилагать усилия для получения целевого финансирования совместных работ по настоящему Договору.

3. ОБЯЗАТЕЛЬСТВА СТОРОН

3.1. В рамках договора ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ обязуются выработать согласованные позиции по вопросам, возникающим в ходе реализации настоящего Договора, направленные на достижение поставленной цели.

3.2. Для достижения цели сотрудничества Стороны обязуются на взаимовыгодных условиях обмениваться имеющимися в их распоряжении научно-техническими разработками, результатами исследований, документацией, информационными и иными материалами, включая издаваемую сторонами литературу, если они не имеют перед третьими лицами обязательств, препятствующих такой передаче.

3.3. Стороны обязуются информировать друг друга о своей деятельности, осуществляемой в рамках настоящего Договора, а также о результатах такой деятельности.

3.4. Стороны обязуются при необходимости налаживать контакты с третьими лицами и информировать друг друга о результатах таких контактов.

3.5. Стороны обязуются соблюдать нормы международного права и законодательство РФ.

3.6. Стороны обязуются получать всю необходимую для проведения НИР разрешительную документацию.

3.7. Настоящий договор не предусматривает финансовых обязательств сторон.

4. ПРОЧИЕ УСЛОВИЯ

4.1. Претензии Сторон, возникающие в связи с исполнением настоящего Договора рассматриваются Сторонами путем переговоров.

4.2. Все вопросы, не урегулированные настоящим Договором, решаются в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.

4.3. Расторжение настоящего Договора допускается по соглашению Сторон, или одной из сторон. Если инициатором расторжения договора является одна из сторон, она письменно уведомляет о своем решении другую сторону Договора.

5. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

5.1. Настоящий Договор составлен в 2-х экземплярах, идентичных по содержанию и имеющих одинаковую юридическую силу, по одному для каждой из сторон.

6. ПОДПИСИ СТОРОН:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Городская клиническая больница № 67 имени Л.А.Ворохобова
Департамента здравоохранения города Москвы

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Юридический адрес: 123423, г. Москва, ул. Саляма Адила, 2/44

Юридический адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

Главный врач


А.С. Шкода

Проректор по научной работе

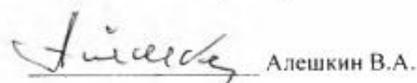

Е. А. Вольская

Ответственные исполнители

Заведующий отделом клинической фармакологии


Митрохин С.Д.

Заведующий кафедрой клинической микробиологии и фаготерапии


Алешкин В.А.



ДОГОВОР № 159

г. Москва

«24» сентября 2018 г.

Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (в дальнейшем именуемый – «Сторона 1»), юридический адрес: 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, в лице Врио директора С.Ю. Комбаров, действующего в соответствии с Приказом и Уставом, с одной стороны и **Федеральное государственное бюджетное учреждение «3 Центральный военный клинический госпиталь имени А.А. Вишневого» Министерства обороны Российской Федерации** (в дальнейшем – «Сторона 2»), юридический адрес: 143420, Московская область, г.о. Красногорск, поселок Новый, 3 ЦВКГ им. А.А. Вишневого, д.1 в лице начальника Есипова Александра Владимировича, действующего в соответствии с Уставом, с другой стороны, в дальнейшем совместно именуемые «Стороны», заключают следующего содержания договор о научно-практическом сотрудничестве (в дальнейшем – «Договор»):

1. Предмет Договора

Настоящий Договор заключается с целью долгосрочного сотрудничества Сторон в сфере фаготерапии, фагопрофилактики, клинической и лабораторной диагностики инфекционных заболеваний с применением бактериофагов, в рамках клинической, образовательной, научной и методической деятельности Сторон.

2. Формы и направления сотрудничества

- 2.1. обмен клиническим опытом,
- 2.2. подготовка медицинских и научных кадров,
- 2.3. организационно-методическая работа,
- 2.4. работа экспертных групп, комиссий, комитетов,
- 2.5. организация и проведение научно-практических мероприятий,
- 2.6. организация и проведение научных исследований,
- 2.7. подготовка совместных научных публикаций,
- 2.8. информационные технологии,
- 2.9. трансляционная медицина,
- 2.10. иные направления сотрудничества по согласию Сторон.

3. Финансирование

3.1. Настоящий договор не предусматривает финансовых обязательств сторон. Финансирование работ по Договору производится каждой Стороной самостоятельно, а также из источников, определяемых совместными договорами и грантами, которые оформляются в письменном виде и подписываются обеими Сторонами.

4. Прочие условия

4.1. Стороны назначают ответственных лиц за выполнение настоящего Договора:
от ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора – Алешкин Андрей Владимирович, руководитель Федерального научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов, тел. +7(964) 646-43-79, e-mail: andreialeshkin@gmail.com,
от ФГБУ «3ЦВКГ им. А.А. Вишневого» Минобороны России – Алехнович Александр Владимирович, заместитель начальника госпиталя по исследовательской и научной работе, тел. 8(903)610-64-71, e-mail: vmnauka@mail.ru.

4.2. Настоящий Договор составлен в двух экземплярах, по одному для каждой из Сторон, имеющих одинаковую юридическую силу.

- 4.3. Настоящий Договор может быть изменен либо дополнен соглашением Сторон, оформляемым в письменном виде и подписанным уполномоченными лицами.
- 4.4. Ни одна из Сторон не вправе передавать свои права по настоящему Договору третьей стороне без письменного согласия с другой Стороны.
- 4.5. Все возникающие споры по настоящему Договору разрешаются путем переговоров.
- 4.6. При осуществлении научно-практического сотрудничества в рамках настоящего Договора Стороны руководствуются действующим законодательством Российской Федерации.

5. Срок договора

- 5.1. Договор вступает в силу с момента подписания и действителен в течение 5 лет от начала действия Договора с возможным продлением Договора на такой же срок, при письменном согласии обеих Сторон.
- 5.2. Стороны могут по обоюдной договорённости расторгнуть Договор до истечения указанного в пункте 5.1. срока.
- 5.3. Каждая Сторона вправе в одностороннем порядке расторгнуть Договор, письменно известив другую Сторону за 1 (один) месяц перед этим.

6. Адреса и реквизиты сторон.

ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора
Юридический адрес: 125212, г. Москва, ул.
Адмирала Макарова д.10
Адрес местонахождения: 125212, г. Москва,
ул. Адмирала Макарова д.10
ИНН 7712025880, КПП 774301001
Р/СЧ 40501810845252000079
в ГУ Банка России по ЦФО
УФК по г.Москве (ФБУН МНИИЭМ
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
л/с 20736U24100)
БИК 044525000
ОГРН 1037739396507
ОКПО 01966727
Тел.: 8(495)452-18-16
Факс: 8(495)452-18-30
Email: info@gabrich.com

Врио директора,
д.б.н.
С.Ю. Комбарова



ФГБУ «ЗЦВКГ им. А.А. Вишневого»
Минобороны России
ОГРН 1035004452361
ИНН 5024000030

Юридический адрес:
143420, Московская область, г.о.
Красногорск, поселок Новый, ЗЦВКГ им.
А.А. Вишневого, д.1
Тел. +7 (495) 562-12-74
e-mail: zhospital@mil.ru

Начальник госпиталя,
генерал-майор медицинской службы, д.м.н.



**Межвузовский
КОМИТЕТ ПО ЭТИКЕ**

119002, г. Москва, пер. Гагаринский, д.37, стр.2 тел.: 8 916 2607664, www.ethicmke.ru

**Выписка из протокола №06-18
Межвузовского Комитета по этике
от 14.06.2018**

Присутствовали: Председатель Комитета Вольская Е.А., члены Комитета Береснева С.Л., Волкова Е.А., Карамышева Е.И., Климанов М.Н., Кузьмин В.Н., Майчук Е.Ю., Рогова И.В., Субботина О.А., Тырановец С.В.

Секретарь: Тимофеева И.Г.

Слушали: Рассмотрение вопроса об одобрении инициативного научного исследования «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи», которое будет проводиться кафедрой Клинической микробиологии и фаготерапии ФГБОУ ВО МГМСУ им.А.И. Евдокимова Минздрава России при участии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России и ГБУЗ «Городская клиническая больница № 67 имени Л.А.Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ГКБ № 67 имени Л.А.Ворохобова ДЗМ»).

Представленные документы:

1. Протокол инициативного научного исследования.
2. Индивидуальная регистрационная карта.
3. Информация для пациента и форма информированного согласия.
4. Биография Главного исследователя и исследователей клинических центров.
5. Договор о сотрудничестве с исследовательским центром.

Постановили: Одобрить инициативное научное исследование «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи», которое будет проводиться кафедрой Клинической микробиологии и фаготерапии ФГБОУ ВО МГМСУ им.А.И. Евдокимова Минздрава России при участии ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России и ГБУЗ «Городская клиническая больница № 67 имени Л.А.Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ГКБ № 67 имени Л.А.Ворохобова ДЗМ»).

Ответственный секретарь

21.06.2018



Береснева С.Л.

Межвузовский
КОМИТЕТ ПО ЭТИКЕ
т. 8-916-260-76-64

ИНДИВИДУАЛЬНАЯ РЕГИСТРАЦИОННАЯ КАРТА

«Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»

Номер центра	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Номер пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Инициалы пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Дата рождения	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Пол	<input type="checkbox"/> м <input type="checkbox"/> ж

Конфиденциально

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»		Номер центра	<input type="text"/>
		Номер пациента	<input type="text"/>
		Инициалы пациента	<input type="text"/>
СКРИНИНГ/ РАНДОМИ ЗАЦИЯ.	ДАТА ВИЗИТА	<input type="text"/>	Страница
Другое		<input type="checkbox"/> нет <input type="checkbox"/> да, какой	

Комментарии (указать проводимые диагностические мероприятия, подтверждающие диагноз ИСМП) _____

ДАнные ФИЗИКАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ: удовлетворительное средней степени тяжести тяжелое

№ п/п	Показатель	Значение/описание
1.	Температура, °C	
2.	ЧДД /мин.	
3.	ЧСС уд./мин	
4.	АД мм рт. ст.	
5.	Изменения органов и систем, выявляемые при объективном осмотре, связанные с инфекционным процессом	

Комментарии _____

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»		Номер центра	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		Номер пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		Инициалы пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
СКРИНИНГ/ РАНДОМИ ЗАЦИЯ.	ДАТА ВИЗИТА	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Страница
			4

ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ (Возможно использование данных, полученных в ходе рутинной практики в течение суток до Визита):

КРОВИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ПРОВЕДЕН Дата проведения ___ / ___ / _____
Д Д М М Г Г Г Г

НЕ ПРОВЕДЕН, укажите причину _____

КРОВИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ПРОВЕДЕН Дата проведения ___ / ___ / _____
Д Д М М Г Г Г Г

НЕ ПРОВЕДЕН, укажите причину _____

МОЧИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

ПРОВЕДЕН Дата проведения ___ / ___ / _____
Д Д М М Г Г Г Г

НЕ ПРОВЕДЕН, укажите причину _____

РЕЗУЛЬТАТ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

ПРОВЕДЕН Дата проведения ___ / ___ / _____

НЕ ПРОВЕДЕН, укажите причину _____

Acinetobacter baumannii Титр _____ Материал для посева _____

Резистентность _____

Pseudomonas aeruginosa Титр _____ Материал для посева _____

Резистентность _____

Klebsiella pneumoniae Титр _____ Материал для посева _____

Резистентность _____

Staphylococcus aureus Титр _____ Материал для посева _____

Резистентность _____

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»		Номер центра	<input type="text"/>
		Номер пациента	<input type="text"/>
		Инициалы пациента	<input type="text"/>
СКРИНИНГ/РАНДОМИЗАЦИЯ.	ДАТА ВИЗИТА	<input type="text"/>	Страница
			5

ДРУГИЕ КЛИНИКО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БОЛЬНОГО С ИСМП

Заключение _____

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНЫХ АНАЛИЗОВ

Анализ	Значение	Ед. измерения
Клинический анализ крови		
Количество эритроцитов		Млн./мкл
Гемоглобин		Г/л
Количество лейкоцитов		Тыс./мкл.
Количество тромбоцитов		Тыс./мкл
Нейтрофилы		%
Эозинофилы		%
Базофилы		%
Моноциты		%
Лимфоциты		%
Биохимический анализ крови		
Глюкоза		Ммоль/л
Общий белок		Г/л
Общий билирубин		Мкмоль/л
АСТ		Е/л
АЛТ		Е/л
Креатинин		Мкмоль/л
Мочевина		Ммоль/л
С-реактивный белок		Мг/л
Общий анализ мочи		
Цвет		
Прозрачность		
Относительная плотность/удельный вес		
Кислотность		
Глюкоза		Ммоль/л
Белок		г/л
Эритроциты		В поле/з
Лейкоциты		В поле/з
Бактерии		В поле/з
Цилиндры		В поле/з
Грибы		-

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»		Номер центра	□ □	
		Номер пациента	□ □	
		Инициалы пациента	□ □ □	
СКРИНИНГ/РАНДОМИЗАЦИЯ.	ДАТА ВИЗИТА	□ □ . □ □ . □ □	Страница	6

РАНДОМИЗАЦИЯ

Дата:

□	□	/	□	□	/	□	□	□	□
д	д		м	м		г	г	г	г

Группа (1 (исследуемая терапия) или 2 (стандартная терапия) _____

Для группы терапии с использованием фагов (№ 1):

- Отправка в лабораторию заказчика отсевов бактериальных культур.
- Не проведена, указать причину _____

Осуществлен забор и последующая передача в лабораторию заказчика образцов венозной крови и сыворотки пациента для иммунологического исследования:

- Отправка в лабораторию заказчика образцов.
- Не проведено, указать причину _____

ВВЕДЕНИЕ ФАГОВ:**РАЗВИТИЕ НЯ/СНЯ ПОСЛЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ПАЦИЕНТА В ИССЛЕДОВАНИЕ:**(При наличии НЯ необходимо заполнить специальную форму учета) ДА НЕТЕсли ДА, то является ли это НЯ серьезным (СНЯ) ДА НЕТ

(При наличии СНЯ необходимо заполнить специальную форму учета)

Подпись исследователя

□	□	/	□	□	/	□	□	□	□
д	д		м	м		г	г	г	г

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»				Номер центра	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
				Номер пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
				Инициалы пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
ОСМОТР	2	ДАТА ВЗИТА	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Страница	7
№ ЦИКЛА					

В ГРУППЕ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАГОВ:

- Введение фагов, подобранных для пациента.

- Не проведено, указать причину _____

Путь введения, определённый в лаборатории заказчика: _____

ПРОВОДИТСЯ ДЛЯ ОБОИХ ГРУПП:**ДАННЫЕ ФИЗИКАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ**

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ: удовлетворительное средней степени тяжести тяжелое

№ п/п	Показатель	Значение/описание
1.	Температура, °С	
2.	ЧДД /мин.	
3.	ЧСС уд./мин	
4.	АД мм рт. ст.	
5.	Изменения органов и систем, выявляемые при объективном осмотре, связанные с инфекционным процессом	

Комментарии _____

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»				Номер центра	<input type="text"/> <input type="text"/>
				Номер пациента	<input type="text"/> <input type="text"/>
				Инициалы пациента	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
ОСМОТР	2	ДАТА ВЗИТА	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/>	Страница	8
№ ЦИКЛА					

НАЛИЧИЕ КРИТЕРИЕВ ИСКЛЮЧЕНИЯ:

нет да _____

РАЗВИТИЕ НЯ/СНЯ ЗА ПЕРИОД С МОМЕНТА ОКОНЧАНИЯ ПРЕДЫДУЩЕГО ВЗИТА:

(При наличии НЯ необходимо заполнить специальную форму учета) ДА НЕТ

Если ДА, то является ли это НЯ серьезным (СНЯ) ДА НЕТ

(При наличии СНЯ необходимо заполнить специальную форму учета)

Подпись исследователя

____ / ____ / ____ / ____ / ____ / ____

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»			Номер центра	□ □
			Номер пациента	□ □
			Инициалы пациента	□ □ □
ОСМОТР	3	ДАТА ВЗИТА	□ □ . □ □ . □ □	Страница
№ ЦИКЛА				

ПРОВОДИТСЯ НА ШЕСТЬЕ СУТКИ ОТ ВВЕДЕНИЯ ФАГОВ

- Забор биологического материала для бактериологического анализа из инфицированных локусов (Указать характер материала _____)

- Не проведено, указать причину _____

ДАННЫЕ ФИЗИКАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ: удовлетворительное средней степени тяжести тяжелое

№ п/п	Показатель	Значение/описание
1.	Температура, °С	
2.	ЧДД /мин.	
3.	ЧСС уд./мин	
4.	АД мм рт. ст.	
5.	Изменения органов и систем, выявляемые при объективном осмотре, связанные с инфекционным процессом	

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»				Номер центра	<input type="text"/> <input type="text"/>
				Номер пациента	<input type="text"/> <input type="text"/>
				Инициалы пациента	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
ОСМОТР	3	ДАТА	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Страница	11
№ ЦИКЛА		ВИЗИ ТА			

ДАННЫЕ ФИЗИКАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ: удовлетворительное средней степени тяжести тяжелое

№ п/п	Показатель	Значение/описание
1.	Температура, °С	
2.	ЧДД /мин.	
3.	ЧСС уд./мин	
4.	АД мм рт. ст.	
5.	Изменения органов и систем, выявляемые при объективном осмотре, связанные с инфекционным процессом	

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»			Номер центра	<input type="text"/>	<input type="text"/>
			Номер пациента	<input type="text"/>	<input type="text"/>
			Инициалы пациента	<input type="text"/>	<input type="text"/>
ОСМОТР	3	ДАТА ВИЗИТА	<input type="text"/>	Страница	12
№ ЦИКЛА			<input type="text"/>		

Комментарии _____

РЕЗУЛЬТАТ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРОВЕДЁННОГО НА ОСМОТРЕ 3

ПРОВЕДЕН Дата проведения ___ / ___ / _____

НЕ ПРОВЕДЕН, укажите причину _____

Acinetobacter baumannii Титр ___ Материал для посева _____

Резистентность _____

Pseudomonas aeruginosa Титр ___ Материал для посева _____

Резистентность _____

Klebsiella pneumoniae Титр ___ Материал для посева _____

Резистентность _____

Staphylococcus aureus Титр ___ Материал для посева _____

Резистентность _____

В зависимости от чувствительности к другим антибактериальным препаратам, микроорганизмы будут отнесены к одной из трех групп:

- чувствительные - S;

- промежуточные (умеренно резистентные) - I;

- резистентные - R.

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»				Номер центра	□ □
				Номер пациента	□ □
				Инициалы пациента	□ □ □
ОСМОТР	3	ДАТА ВЗИТА	□ □ . □ □ . □ □	Страница	15
№ ЦИКЛА					

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ:

- Элиминация или значимое снижение титра возбудителя (на 3-4 порядка), либо смена возбудителя в биологическом материале, полученного от пациента по данным микробиологического исследования
- Клиническое улучшение состояния пациента.

ПРИ НАЛИЧИИ УКАЗАННЫХ КРИТЕРИЕВ ПРОВОДИТСЯ ОСМОТР ЗАВЕРЩЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В СЛУЧАЕ НЕ ДОСТИЖЕНИЯ КРИТЕРИЕВ ПРОВОДИТСЯ:

1. Оценка результатов бактериологического анализа с учётом данных о резистентности возбудителей:

Acinetobacter baumannii

Резистентность _____

Pseudomonas aeruginosa

Резистентность _____

Klebsiella pneumoniae

Резистентность _____

Staphylococcus aureus

Резистентность _____

В зависимости от чувствительности к другим антибактериальным препаратам, микроорганизмы будут отнесены к одной из трех групп:

- чувствительные - S;
- промежуточные (умеренно резистентные) - I;
- резистентные – R.

2. Проводится повторный цикл процедур протокола, начиная с осмотра 2 для группы персонализированной фаготерапии с оценкой напряженности антифагового иммунного ответа методом ИФА и коррекция штаммового состава препарата, в случае обнаружения антифаговых антител.

ПРОТОКОЛ «Разработка персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи»				Номер центра	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
				Номер пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
				Инициалы пациента	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
ОСМОТР	3	ДАТА ВЗИТА	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> . <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Страница	16
№ ЦИКЛА					

НАЛИЧИЕ КРИТЕРИЕВ ИСКЛЮЧЕНИЯ:

нет да _____

РАЗВИТИЕ НЯ/СНЯ ЗА ПЕРИОД С МОМЕНТА ОКОНЧАНИЯ ПРЕДЫДУЩЕГО ВИЗИТА:

(При наличии НЯ необходимо заполнить специальную форму учета) ДА НЕТ

Если ДА, то является ли это НЯ серьезным (СНЯ) ДА НЕТ

(При наличии СНЯ необходимо заполнить специальную форму учета)

Подпись исследователя

____/____/____/____

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

«СОГЛАСОВАНО»

Главный внештатный специалист
по анестезиологии - реаниматологии
Департамента здравоохранения
города Москвы, к.м.н.

Д.Н. Проценко



« ___ » _____ 20__ г.

«РЕКОМЕНДОВАНО»

Решением
Экспертного совета по
Департамента здравоохранения
города Москвы № 17



« 30 » 15 - 11 - 20__ г.

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ ФАГОТЕРАПИЯ ПАЦИЕНТОВ,
СТРАДАЮЩИХ ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ
МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ (ИСМП)**

Методические рекомендации № 105

Москва, 20__ г.



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 664 681** (13) **C1**(51) МПК
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/76 (2018.05)

(21)(22) Заявка: 2017131353, 06.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.09.2017Дата регистрации:
21.08.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.09.2017

(45) Опубликовано: 21.08.2018 Бюл. № 24

Адрес для переписки:
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габрического,
Роспотребнадзора, патентный отд.

(72) Автор(ы):

Алешкин Владимир Андрианович (RU),
Алешкин Андрей Владимирович (RU),
Ершова Ольга Николаевна (RU),
Бочкарева Светлана Сергеевна (RU),
Шкода Андрей Сергеевич (RU),
Вайншток Игорь Измаилович (RU),
Ведяшкина Светлана Георгиевна (RU),
Митрохин Сергей Дмитриевич (RU),
Калачева Ольга Сергеевна (RU),
Орлова Ольга Евгеньевна (RU),
Киселева Ирина Анатольевна (RU),
Рубальский Евгений Олегович (RU),
Зулькарнеев Эльдар Ринатович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Алешкин Андрей Владимирович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: АЛЕШКИН А.В. и др.
Иновационные направления
использования бактериофагов в сфере
санитарно-эпидемиологического
благополучия населения Российской
Федерации // Бактериология, 2016, том 1, N1,
с. 22-31. RU 2306563 C1, 20.09.2007. RU
2296163 C2, 27.03.2007. SU 1409661 A1,
15.07.1988. EA 7472 B1, 27.10.2006.

(54) Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии и инфекционным болезням, и может быть использовано для лечения инфекции, вызванной возбудителем или возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью путем проведения персонифицированной фаготерапии. Для этого подбирают бактериофаг или бактериофаги в две стадии, определяя чувствительность выделенных от больного бактерий-мишеней к отдельным штаммам

вирулентных фагов. При этом на первой стадии используют спот-тест на чашке с бактериальным газоном, посеянным на плотной питательной среде, содержащей 1,5-2% агара, отбирая фаг или фаги, под воздействием которых произошел полный или частичный лизис бактериального газона или в зоне нанесенного пятна есть отдельные негативные колонии. На второй стадии отобранные фаг или фаги каплей объемом 10-100 мкл наносят поверх застывшего второго слоя

агаризованной среды в чашку или чашки Петри, при этом первым слоем наносят 1,5-2% питательный агар, на который после его застывания вторым слоем наносят 0,7% агаризованную среду, содержащую выделенную от больного бактериальную культуру. Для нанесения используют бактериофаги в титре, обеспечивающем множественность инфицирования от 0,01 до 1 с учетом титра бактерии-мишени, высеянной из очага инфекции; выбирают фаг или фаги, под воздействием которых произошло формирование отдельных негативных колоний или сливной лизис бактериальной культуры, учет результатов на первой и второй стадиях проводят после инкубации чашек при 37°C в течение 18 ч. Затем с помощью иммуноферментного анализа определяют наличие в сыворотке пациента IgG-антител к выбранному фагу или фагам, после чего проводят реакции нейтрализации, подтверждая нейтрализующие свойства найденных антител, и отбирают фаг или фаги, к которым у пациента отсутствуют IgG-антитела, обладающие

подтвержденными нейтрализующими свойствами. Далее, учитывая локализацию инфекционного процесса и фармакокинетику отобранных фага или фагов, определяют по меньшей мере один из следующих путей введения: *per os*, *per rectum*, ингаляционно, местно и соответствующую этому пути введения лекарственную форму, обеспечивая сохранение бактериофагов в очаге инфекции в титре не более чем на два порядка ниже исходного, содержащегося в применяемом у пациента препарате, в течение всего периода выделения из очага инфекции бактерии-мишени и не менее 24-48 ч после ее элиминации. Использование данного способа позволяет эффективно проводить фаготерапию инфекций, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью, путем персонифицированного подбора штаммового состава бактериофагов, установления индивидуальных доз вводимого препарата, а также с учетом антифагового иммунного ответа пациента. 2 з.п. ф-лы, 4 пр.

R U 2 6 6 4 6 8 1 C 1

R U 2 6 6 4 6 8 1 C 1