

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

На правах рукописи

КИЯНЧУК МАРГАРИТА ВЛАДИМИРОВНА

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ
БРОНХОПНЕВМОНИЯХ ТЕЛЯТ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель –

Доктор биологических наук, профессор

Александр Александрович Сухинин

Санкт-Петербург, 2026

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	13
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Характеристика возбудителей бронхопневмонии телят инфекционной этиологии.....	13
1.2 Биоплёнка как фактор вирулентности возбудителей бронхопневмонии.....	23
1.3 Коллоидное серебро как ингибитор образования биоплёнки микроорганизмов	25
1.4 Классификация и таксономия бактериофагов	26
1.5 Особенности жизненных циклов бактериофагов	26
1.6 Фаготерапия на современном этапе. Пути доставки препаратов, содержащих бактериофаги	29
1.7 Защитные системы бактерий против бактериофагов и варианты их преодоления	40
1.8 Разнообразие методов выделения бактериофагов и оценки их характеристик	44
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1 Материалы и методы исследований	51
2.2 Результаты исследований	72
2.2.1 Мониторинг эпизоотологического состояния животноводческих комплексов	72
2.2.2 Спектр возбудителей бронхопневмонии телят в животноводческих комплексах	74
2.2.3 Анализ биологических свойств изолированных микроорганизмов	76
2.2.4 Оценка биоплёнкообразования возбудителей бронхопневмонии телят	78
2.2.5 Результаты оценки чувствительности возбудителей бронхопневмонии телят к антибиотикам	81
2.2.6 Выделение бактериофагов из окружающей среды животноводческих комплексов	94
2.2.7 Результаты оценки литической активности коммерческих и выделенных из животноводческих комплексов бактериофагов.....	97

2.2.8 Результаты ингаляции инфицированных <i>Klebsiella pneumoniae</i> лабораторных мышей коммерческими и выделенными из животноводческих комплексов бактериофагами	107
2.2.9 Разработка и применение схемы для интраназального введения бактериофагов	109
2.2.10 Экономическая эффективность применения фаготерапии при бронхопневмонии телят в условиях животноводческого комплекса	111
Обсуждение результатов.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДИССЕРТАЦИИ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	168
Приложение А. Справки о внедрении	169
Приложение Б. Базы данных	172
Приложение В. Методические рекомендации	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Одной из экономически важных проблем животноводства в мире и Российской Федерации, в том числе Ленинградской области являются инфекционные болезни респираторной системы крупного рогатого скота, а именно бронхопневмония [70, 61, 20, 28, 19]. По литературным данным у 25% телят регистрируют болезни дыхательной системы в течение первого года жизни [277, 68]. Болезни лёгких инфекционной этиологии являются одной из ведущих причин гибели крупного рогатого скота и ассоциированы с такими бактериальными возбудителями, как: «*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Gallibacterium anatis*». В пробах практически всех отделов респираторного тракта исследователи обнаруживают *M. haemolytica* и *P. multocida*. В 2020 году на территории Российской Федерации по данным информационно-аналитического центра Россельхознадзора выявлено 459 случая пастереллёза КРС. В условиях промышленного животноводства при скученном содержании животных, наличии стрессовых факторов наблюдается смешанная форма инфекционной пневмонии, когда среди возбудителей выделяют *Pasteurella sp.*, *Salmonella sp.* и другие условно-патогенные микроорганизмы [119, 38, 236].

Применение литических бактериофагов является альтернативой или дополнением использования антибиотиков и других антибактериальных средств. Однако в связи с возможностью развития фагоустойчивости бактерий необходим постоянный поиск новых природных, литических бактериофагов. Кроме того, природные, не модифицированные литические фаги являются не только первоначальной основой для фагосодержащей продукции, но и носителями генетической информации, позволяющей разрабатывать генетически-модифицированные фаги [204, 271].

Разработка и совершенствование лечебно-профилактических мероприятий при болезнях дыхательной системы животных не теряет своей актуальности. Антибиотики широко применяются в животноводстве, их бесконтрольное применение для борьбы с болезнями инфекционной этиологии приводит к значительному распространению антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов, что затрудняет дальнейшее проведение лечебных мероприятий. Согласно исследованиям Коцюмбаса И.Я. и савт. среди условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от телят с признаками катаральной бронхопневмонии высокий уровень резистентности, наблюдается к бензилпенициллину (89,8%), линкомицину (96,9%) [47].

Бактериофаги являются привлекательной альтернативой для разработки эффективных препаратов. Актуальность изучения фагов так же связана с возрастающей резистентностью микроорганизмов к антибиотикам. В отличие от антибиотиков они не обладают широким спектром действия. Фаговую терапию можно применять для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к лекарственным препаратам возбудителями [18, 7, 29, 70].

Возможно применение комбинированной схемы фаг-антибиотик. При этом усиливается эрадикация бактерий и предотвращается появление устойчивых штаммов, по сравнению с лечением одним фагом или антибиотиком в отдельности [49, 42, 33, 102].

Бактериофаги оказывают влияние на иммунную систему животного, поскольку обладают иммуногенностью. Влияние бактериофагов на иммунную систему животного не однозначно, в связи с этим при разработке новых препаратов на основе бактериофагов в лечебных и профилактических целях необходимо учитывать активацию вирусными частицами иммунных реакций животного. При местном введении они улучшают показатели завершенности фагоцитоза. Интраназальное введение бактериофагов представляет особый интерес при бронхопневмониях. Данный метод отличается высокой

биодоступностью по сравнению с пероральным введением, при котором наблюдается быстрое уничтожение фагов в печени [6].

Важным направлением поиска природных вирулентных бактериофагов по отношению к бактериям, образующим биоплёнки, является их выделение и включение в схему лечебно-профилактических мероприятий. Оценка бактериофагов, эффективных в отношении биопленкообразующих бактерий, важна, так как феномен повышенной, не обусловленной генетически антибиотикотолерантности бактерий, снижает эффективность фаготерапии [13, 74, 257].

Включение препаратов на основе бактериофагов в схему лечебно-профилактических мероприятий при бронхопневмонии крупного рогатого скота инфекционной этиологии на фоне нарастающей антибиотикорезистентности может быть эффективно в условиях животноводческих комплексов для сохранения поголовья и продуктивности животных.

Степень разработанности темы исследования.

Спектр возбудителей бактериальной бронхопневмонии у молодняка крупного рогатого скота в животноводческих комплексах весьма обширен (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Gallibacterium anatis*), однако наибольший интерес из всего многообразия представляет *Klebsiella pneumoniae*, биопленкообразование которой является одним из основных вирулентных характеристик данного микроорганизма. Внеклеточный матрикс может обуславливать значительное снижение терапевтического эффекта при назначении животным курса антибиотиков или бактериофагов. Тенденция к образованию биоплёнок усиливается при действии на *K. pneumoniae* ряда антибиотиков – гентамицина, амикацина, тетрациклина [66, 21].

Проблема нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей инфекционных болезней респираторной системы животных приводит к возрождению интереса к фаготерапии и активному внедрению её в схему лечебно-профилактических мероприятий в животноводстве.

Фаготерапия рассматривается в качестве альтернативы антибиотикам в условиях нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей ряда инфекционных болезней, в том числе бронхопневмонии. С целью улучшения эффективности фаготерапии ведутся исследования по выделению новых вирусов, специфичных к мультирезистентным бактериям и изучению экологии бактериофагов [74, 75, 62]. Несмотря на многообразие изолированных из различных объектов бактериофагов, наличие у бактерий систем противовирусной защиты актуализирует постоянный поиск новых фагов и оценку их литической активности [221].

Объектом исследования явилось изучение влияния комплекса бактериофага с коллоидным серебром на эффективность лечения телят при бактериальной бронхопневмонии, изучение биохимических свойств возбудителей бронхопневмонии и их чувствительность к АМП, изучение тенденции к образованию биоплёнки возбудителей бронхопневмонии.

Предметом исследования было изучение биологических свойств бактериофага, выделенного из сточных вод животноводческих комплексов, ингибирующего образование биоплёнки *Klebsiella pneumoniae*.

Цель исследований. Цель изучить спектр возбудителей бронхопневмонии и разработать научно-обоснованную схему интраназального применения бактериофагов при бронхопневмониях телят инфекционной этиологии.

Основные задачи исследования:

1. Провести эпизоотологическое обследование животноводческих комплексов Ленинградской области с целью выявления бронхопневмонии у телят бактериальной этиологии.
2. Определить спектр возбудителей бактериальной бронхопневмонии телят.
3. Выделить бактериофаг, потенциально эффективный при лечении животных при бронхопневмонии бактериальной этиологии и оценить его биологические свойства.
4. Оценить эффективность сочетанного применения бактериофагов с коллоидным серебром для ингибирования биоплёнки возбудителей бронхопневмонии и включить данный комплекс в схему лечебно-профилактических мероприятий животноводческих комплексов.
5. Разработать схему интраназального применения бактериофагов телятам с бронхопневмонией бактериальной этиологии в условиях животноводческого комплекса.

Научная новизна исследований.

1. Выделен бактериофаг эффективный в отношении гипермукоидной *Klebsiella pneumoniae*;
2. Экспериментально доказана способность комплекса бактериофага с коллоидным серебром ингибировать образование биоплёнки *in vitro*;
3. Экспериментально и практически доказано, что интраназальная фаготерапия при бронхопневмонии молодняка крупного рогатого скота рациональна при проведении терапевтических мероприятий.

Впервые предложен интраназальный метод введения препарата бактериофагов сельскохозяйственным животным (телята). Разработана и внедрена схема интраназального введения бактериофагов в условиях животноводческого комплекса при бронхопневмониях телят инфекционной этиологии. Экспериментально и практически доказана возможность применения бактериофагов при бронхопневмонии телят в условиях животноводческих комплексов. Помимо лечебных мероприятий предлагается

применять фаги в профилактических мероприятиях, однако данное направления является малоизученным. Существует незначительное количество исследований по эффективности фагопрофилактики. По данным различных исследований фаги предотвращают развитие патологического процесса при их введении, в том числе ингаляционно, за 6, 12 и 24 (в случае инфицирования *P. aeruginosa*) часов до инфицирования. Однако исследований по оценке фагорезистентности среди бактерий в данных работах не проводилось. Резистентность к фагам также может повлечь за собой дополнительные затраты. В экспериментах с применением лабораторных мышей, которых интраназально инфицировали *Klebsiella pneumoniae*, эффективность фаготерапии наблюдалась только в случае, если не допускалось задержки между заражением и лечением или вместо если проводилась 3-часовая предварительная обработка фагами. Так же было продемонстрировано, что применение интраназальной инстилляцией фаголизатов эффективно при поражении респираторной системы [178]. Бактериальная резистентность к фагам ограничивает их применимость в качестве эмпирического лечения [108, 211, 183, 179, 74, 157, 231].

Теоретическая и практическая значимость. Проанализирован спектр возбудителей бронхопневмонии среди телят животноводческих комплексов Ленинградской области.

Определен видовой состав и бактериологическая общность микроорганизмов, вызывающих бронхопневмонию у молодняка крупного рогатого скота. Изучены основные биологические свойства выделенной микрофлоры, их чувствительность к антибиотикам, бактериофагам, так же оценена способность возбудителей образовывать биоплёнку (База данных «Оценка тенденции к образованию биоплёнки *Klebsiella pneumoniae* спектрофотометрическим методом» № 2026620103 от 23.12.2025).

Разработан и подтверждён метод эффективного выделения вирулентных бактериофагов из объектов окружающей среды (База данных «Морфология

негативных колоний вирулентного бактериофага *Klebsiella pneumoniae*» № 2025625499 от 26.11.2025).

Экспериментально и практически доказано, что интраназальное введение бактериофагов рационально при лечении телят с бронхопневмонией в условиях животноводческого комплекса, что документально подтверждается справками о внедрении результатов научного исследования.

Полученные результаты создают перспективы использования препаратов на основе бактериофагов в комплексе мероприятий по профилактике и терапии крупного рогатого скота с бронхопневмонией, ассоциированной с антибиотико-резистентными биоплёнкообразующими возбудителями.

Методические указания по интраназальной фаготерапии (утверждены методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ, протокол № 10 от 17.12.2025) и справка о внедрении результатов научного исследования в учебный процесс демонстрируют практическую ценность проведённой работы. Разработанные учебно-методические материалы применяются на лекционных и практических занятиях в ФГБОУ ВО СПбГУВМ.

Методология и методы исследования. Методологическую основу работы составили анализ литературы по проблеме и традиционные общепринятые методики исследований (эксперимент). Анализ литературных данных проведён с использованием баз данных РИНЦ, Scopus, Web of Science, Library Genesis, Google Scholar, PubMed, Cyberleninka. В работе использовали микробиологические, биотехнологические, эпизоотологические и спектрофотометрические методы с последующей компьютерной статистической обработкой и научным анализом полученных данных. Более подробно этапы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы исследований». Статистическую обработку полученного цифрового материала проводили с использованием метода вариационной статистики и

применением критерия погрешности по Стьюденту и критерию Манна-Уитни (U test) в программном обеспечении Microsoft 365 (Office 365).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждается использованием репрезентативной выборки объектов исследования, соответствующей целям и задачам, согласно заранее утвержденному плану его проведения; неоднократной доказанностью повторения полученных результатов; проведением исследований на сертифицированном оборудовании; достаточным объемом обработанного фактического материала с использованием метода вариационной статистики, адаптированного к проведению биологических исследований.

Результаты диссертационной работы апробированы на научно-практических конференциях международного значения: XI международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 24 ноября 2022 года); I Международная научная конференция «Ветеринарная лабораторная практика» (Санкт-Петербург, 17 апреля 2023 года); II Международная научная конференция «Ветеринарная лабораторная практика» (Санкт-Петербург, 18 апреля 2024 года); Международная научно-практическая конференция «Теория и практика клинической биохимии и лабораторной диагностики», посвященной 105-летию кафедры биохимии и физиологии СПбГУВМ (Санкт-Петербург, 17-18 декабря 2024 года); XXXII Московский ветеринарный конгресс (Москва, 10-12 апреля 2024 года); Национальная научная конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ (Санкт-Петербург, 28 января 2025 года); III международная научная конференция «Ветеринарная лабораторная практика» (Санкт-Петербург, 27 февраля 2025 года); XXXIII Московский международный Ветеринарный конгресс (Москва, 9-11 апреля 2025).

Публикации научных исследований. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ в том числе 6 – в журналах из Перечня ВАК при Минобрнауки России. Часть исследований и публикации проведены и написаны в соавторстве. Соавторы научных публикаций не возражают против использования в диссертации материалов совместных исследований, что подтверждено справками.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 175 страницах компьютерного текста и включает в себя введение, обзор литературы, собственные исследования, материалы и методы исследований, выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 26 таблицами, 29 рисунками. Список литературы включает 285 источников в том числе 213 источников иностранных авторов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Бронхопневмония бактериальной этиологии у телят в животноводческих комплексах в Ленинградской области в 16,21% случаев вызвана *Proteus mirabilis*, 11,89% – *Escherichia coli*, 5,95% – *Klebsiella pneumoniae*, 3,24% – *Moraxella bovoculi*, 1,62% – *Mannheimia haemolytica*;
2. Установлено, что 100% изолятов *Klebsiella pneumoniae* полирезистентны и проявляют значительное биоплёнкообразование;
3. Выделенный из сточных вод животноводческих комплексов бактериофаг, обладает высокой специфичностью к *Klebsiella pneumoniae* и выраженной литической активностью ($9,6 \times 10^5 \pm 0,131$ БОЕ/мл) в отношении бактериальных культур;
4. Применение комплекса бактериофага с коллоидным серебром способствует ингибированию биоплёнки;

5. Применение бактериофага в комплексе с коллоидным серебром телятам интраназально в дозе 3,0 мл в каждое носовое отверстие, курсом 3 дня курсом эффективно при бактериальной бронхопневмонии.
6. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат, потраченных на лечение телят, больных бронхопневмонией, с применением комплекса бактериофага с коллоидным серебром составила 5,8 руб.

Личный вклад автора. Результаты исследований, представленных в диссертационной работе, выполнены аспирантом лично. Автором сформулированы цель и задачи исследования, а также выполнены экспериментальные исследования, интерпретированы полученные результаты исследований. Написание и оформление диссертационной работы автором осуществлены лично. Часть исследований и публикации проведены и написаны в соавторстве. Соавторы научных публикаций не возражают против использования в диссертации материалов совместных исследований, что подтверждено справками.

Соответствие работы паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных, пункты: 7, 9, 18, 20.

Благодарности. Автор выражает благодарность М.Я. Ярахмедову (ЗАО «Березовское»).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика возбудителей бронхопневмонии телят инфекционной этиологии

При бронхопневмониях у телят из биологического материала (носоглоточная слизь, образцы лёгочной ткани) выделяют широкий спектр

возбудителей: *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gallibacterium anatis*, *Klebsiella pneumonia* [28, 268].

Mannheimia haemolytica является гемолитической, грамотрицательной коккобациллой, имеет фимбрии, факультативный анаэроб. Большинство штаммов имеет капсулу. Спор не образует, оксидазо-положительна. Таксономия: надцарство Бактерии; тип *Proteobacteria*; класс *Gammaproteobacteria*; порядок *Pasteurellales*; семейство *Pasteurellaceae*; род *Mannheimia* [269, 263, 181]. Название *Mannheimia* дано в честь Вальтера Мангейма, немецкого биолога, занимавшегося анализом семейства *Pasteurellaceae* [269].

Mannheimia haemolytica выделяется из верхних дыхательных путей и заглочных лимфатических узлов [72]. Размеры клеток находятся в диапазоне 0,3- 1,0 x 1,0-2,0 мкм. Клетки в мазке располагаются одиночно, реже парно, наличие цепочек и нитей не зафиксировано. При окрашивании манхемий методом Романовского-Гимза клетки тёмно-синие, окружённые розовой капсулой [72]. По данным Т. Sisay и соавт вид *Pasteurella haemolytica* разделён на два биотипа: «к биотипу А относят микроорганизмы, способные к ферментации L-арабинозы, к биотипу Т – способные к ферментации трегалозы». В последующем биовар Т был обособлен в отдельный вид *Pasteurella trehalosi*, а в дальнейшем *Bibersteinia trehalosi* (ферментируют трегалозу) [252, 267].

У *Mannheimia haemolytica* выявлено 12 разных серологических типов. Серотипы А1 и А2 колонизируют верхние дыхательные пути крупного рогатого скота и овец, А1 и А6 вызывают респираторные болезни КРС, А2 – МРС. Только А1 обладает способностью индуцировать образование антител у подопытных животных [48, 32, 100]. Раньше *Mannheimia* входила в состав рода *Pasteurella*

как отдельный вид. Однако при изменении классификации *Mannheimia* была выделена в отдельный род. *M. haemolytica* известна как важный этиологический фактор возникновения фибринозной и некротической плевропневмонии крупного рогатого скота [165]. У мелкого рогатого скота, который так же восприимчив к *M. haemolytica*, заболевание развивается в септической форме. Описаны случаи индикации возбудителя от кроликов, свиней и других видов животных, в том числе птиц. В сыворотке крови овец обнаруживают антитела к серотипам А1, А5, А8 и А9 [165, 277, 250]. *M. Haemolytica* оказывает влияние на здоровье и яйценоскость кур пород уайт шейвер и хайсекс [244]. В экспериментальных исследованиях, проведённых R.Y. Lo et al. у 50% телят из контрольной группы, находившихся в контакте с животными, зараженными *M. haemolytica*, развиваются клинические признаки респираторного заболевания [100].

Так же *M. haemolytica* индицируется от клинически здоровых телят в носоглотке и миндалинах [100].

Поскольку вид возбудителя определяется не моментально в хозяйствах начинают применять антибиотикотерапию имеющимися препаратами, не учитывая чувствительность конкретного микроорганизма. *M. Haemolytica* проявляет устойчивость к большому количеству антимикробных препаратов. В основном обнаруживается резистентность против бета-лактамов, тетрациклинов, сульфаниламидов и аминогликозидов [266]. Резистентна к бензилпенициллину, карбенициллину, левомицетину, пенициллину, ампициллину, тетрациклину, сульфаниламидам и тилмикозину [100, 37, 73]. Промежуточная чувствительность проявляется в отношении канамицина, фосфомицина, бензилпенициллина, пефлоксацина, цефазолина, цефотаксима [29]. Устойчивость к макролидам и линкозамидам у *M. haemolytica* обусловлена наличием нуклеотида А2058. Один из механизмов устойчивости включает добавление одной метильной группы к нуклеотиду А2058 в 23S рРНК под действием гена монометилтрансферазы erm(42). У ряда изолятов *M. haemolytica*

обнаружен данный ген. Высокоустойчивые изоляты содержат три гена детерминанты *erm* (42), *msrE* и *mphE* [73].

Штаммы *Mannheimia haemolytica* вызывают гемолиз эритроцитов. Музейные штаммы бактерий имеют одинаковые биохимические характеристики, исключением является штамм №749. Он не ферментирует ксилозу. *Mannheimia haemolytica* характеризуется отрицательной реакцией на индол, сорбитол, орнитиндекарбоксилазу и положительной реакцией на ферментацию мальтозы и гидролиз ONPG (o-nitrophenyl- β , D-galactoside) [179]. *Mannheimia haemolytica* показывает негативный результат в реакциях на арабинозу, трегалозу, бета-глюкозидазу, уреазу [43]. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, желатиназа отрицательная, гидролиз эскулина отрицательная, восстанавливает нитрат, не образует углекислый газ [29]. К факторам патогенности *M. haemolytica* относят адгезины, нейраминидазу, лейкотоксины и липополисахариды. Липополисахариды являются одним из основных факторов вирулентности *M. haemolytica*. Токсичность обусловлена как раз липополисахаридами, поскольку они токсичны для эпителиальных клеток и снижают функциональность лейкоцитов и вызывают лизис тромбоцитов. Помимо прочего липополисахариды способствуют увеличению проницаемости сосудов и, как следствие, к отложению фибрина в альвеолах лёгких [167, 195].

Для культивирования используют различные питательные среды. МПБ, МПА, бульон и агар Хоттингера, триптон-соевый бульон, триптиказеин-соевый бульон, бульон с сердечно-мозговым экстрактом, эугоник бульон и агар, колумбийский агар, ПЖА, агар МакКонки, среды Гисса, среда СМ0898. Лучшее накопление бактериальной массы наблюдается при добавлении 5-10% дефибрированной крови барана или сыворотки крови. Инкубирование проводят при температуре 35-37°C. Для выделения эндотоксина *M. haemolytica* культуру выращивают на мясном бульоне в течение 18 часов. Клетки удаляют центрифугированием при 5000g в течение 30 мин. С полученного супернатанта белки осаждают сульфатом аммония. Смесь выдерживают 12 часов при

температуре 4 °С. Затем смесь центрифугируют при 5000 g в течение 30 мин. Осадок растворяют в трехкратном объеме сульфата аммония [33, 35].

Mannheimia растёт на кровяном агаре в виде мелких, гладких, полупрозрачных и блестящих колоний с небольшим возвышением в центре. На кровяном агаре лошади, овцы или кролика образует округлые колонии, окруженные узкой зоной β-гемолиза, на агаровых пластинах, с кровью ягнят наблюдается двойная зона β-гемолиза – внутренняя полная и внешняя широкая неполная. При 25 °С зоны гемолиза увеличиваются, при этом образуется диффундирующее вещество, которое усиливает гемолитический эффект β-токсина золотистого стафилококка. *Mannheimia* растёт на MacConkey агаре в виде мелких полупрозрачных розовых или красных колоний [29, 265]. На мясопептонном агаре рост скудный, колонии выпуклые, полупрозрачные. В бульонных средах наблюдается равномерное помутнение через 10-12 часов культивирования. Рост в полужидком агаре проявляется по ходу укола [29]. На среде CM0898 рост обильный, бактерии образуют гладкие, прозрачные, блестящие колонии [33, 35]. *Trehalosi* может подавить рост *M. Haemolytica* [121].

Диагноз ставится комплексно, особое внимание уделяется лабораторным исследованиям. Проводят анализ культуральных и биохимических свойств. Оценивают способность микроорганизмов к утилизации углеводов с образованием органических кислот или кислот в комплексе с газом. Определяют протеолитические свойства путём обнаружения протеаз, способствующих расщеплению белка. Определяют морфологию и проводят реакции на каталазу и оксидазу [179]. Экспресс диагностику применяют с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработаны ПЦР тест-системы на гены: *psl*, *kmt*, *16S* рРНК-23S рРНК, *Pm0762* и *Pm1231*. Для выявления генома *Mannheimia haemolytica* используют праймеры на гены *HP*, *Lkt*, *Lkt2*, *16S*. При проведении ПЦР следует учитывать, что гены лейкотоксина *lktC*, *lktA*, *lktB* и *lktD* присутствуют только у представителей рода *Mannheimia*. *Mannheimia haemolytica* необходимо дифференцировать от генетически

близкого вида – *Mannheimia glucosida*. Для молекулярного типирования применяют метод гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE). Ставят биопробу и определяют LD50, следует учитывать, что только серотип А1 обладает способностью индуцировать образование антител у подопытных животных [167, 57, 68, 168]. Антибиотикочувствительность определяют диско-диффузным методом [263].

Для серотипирования *M. haemolytica* проводят реакцию непрямой гемагглютинации (ИНА test). Для родовой и подвидовой идентификации применяют коммерческие тест системы: «RapID NF Plus Panel (R8311005), API® NH, API® 20 E, API® 20 NE - ID 32 E». При определении патогенных свойств интраназально инфицируют мышей суточной бульонной культурой штаммов *Mannheimia haemolytica* с концентрацией 5 млрд. мкр. Кл. в 1 см³ в объёме 0,2 мл. Определение иммуногенных свойств проводят путём иммунизации морских свинок [33, 35]. При индификации также применяют непрямой иммуноферментный анализ (ИФА). При пастерелоносительстве результат иммуноферментного анализа может быть положительным, при отсутствии клинических признаков болезни [72, 111, 8]. В ФГБУ «ВНИИЗЖ» разработана тест-система для определения титра антител к липополисахаридному антигену *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови КРС посредством непрямого варианта ИФА [18]. Для серодиагностики применяют ВЮ К 139 – Monoscreen AbELISA *Mannheimia haemolytica*. В набор входят 96-луночные микротитрационные планшеты (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированные очищенным липополисахаридом из *Mannheimia haemolytica*. Для проведения анализа подготавливают сыворотку или плазму крови. Для диагностики методом ПЦР применяют набор Applied Biosystems™ VetMAX™ P. Multocida & M. Haemolytica Kit, согласно инструкции. При исследовании секрета лёгких телят, инфицированных *M. Haemolytica* можно выявить повышенный уровень АТФ. Кроме того, эпителиальные клетки лёгких могут активно высвобождать

АТФ при воздействии с *M. haemolytica* LPS (липополисахарид) или ИЛ-1 (интерлейкин-1).

Gallibacterium anatis, грамотрицательная коккобацилла из семейства Pasteurellaceae, относится к условно–патогенным микроорганизмам домашней птицы, от которой выделяется из верхних дыхательных путей. Laura Van Driessche сообщает об обнаружении нескольких независимых изолятов *G. Anatis* от крупного рогатого скота с инфекционной бронхопневмонией [268].

Histophilus somni, которая ранее именовалась «*Haemophilus somni*», «*Haemophilus agni*», «*Haemophilus somnifer*» и «*Histophilus ovis*», является представителем семейства *Pasteurellaceae* и вызывает гистофилёз (гемофилёз) крупного рогатого скота. Является вторым по распространенности бактериальным возбудителем после *Mannheimia haemolytica*. Клинические признаки чаще проявляются у телят в возрасте 6-12 месяцев. Эта грамотрицательная полиморфная палочка также вызывает септицемию крупного рогатого скота, тромботический менингенцефалит, миокардит, артрит, аборт. *H. Somni* является облигатным обитателем слизистых оболочек дыхательных путей и половых органов крупного рогатого скота.

По данным Рудняева Д.А. изоляты *Histophilus somni* образуют на колумбийском агаре с добавлением 5% дефибринированной крови барана мелкие колонии диаметром до 1 мм, при культивировании в условиях 10% CO₂ атмосферы в течение 48 часов. При определении чувствительности к АБП Моисеева Н.В. с успехом применила шоколадный агар с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота.

Факторы вирулентности включают липополисахарид, белки, связывающие иммуноглобулин (в виде поверхностной фибриллярной сети), основной белок внешней мембраны, другие белки внешней мембраны и экзополисахарид. Производство гистамина, образование биопленки и определение кворума также могут способствовать патогенезу [113, 128, 239].

Яцентюк С.П. и соавт. занимались изучением антибиотикорезистентности циркулирующих штаммов *Histophilus somni*. Наибольшая фенотипическая устойчивость выявлена к аминогликозидам. Для культивирования *H. somni* применяют СМ0898В, шоколадный агар, среду Мюллера-Хинтона с добавлением дрожжевого экстракта [11, 80]. Большинство патогенных изолятов продуцируют биопленки более крупные, чем синантропные изоляты. Основным компонентом биопленки является экзополисахарид, который также продуцируется в большем количестве в патогенном изоляте [224].

Есть данные об аэрозольном инфицировании телят *Histophilus somni* и *Mannheimia haemolytica* при экспериментальных исследованиях [158, 90].

Klebsiella pneumoniae входит в число наиболее значимых грамотрицательных возбудителей пневмоний у телят. Была описана Карлом Фридлендером в 1882 г. при исследовании материала лёгких пациента с признаками пневмонии [61, 146]. *Klebsiella pneumoniae* – вид грамотрицательных факультативно-анаэробных капсулообразующих бактерий, относящийся к роду *Klebsiella* семейству *Enterobacterales*. Спор не образуют, не имеют жгутиков, у некоторых штаммов встречаются фимбрии. Данный возбудитель обладает высокой устойчивостью к аминогликозидам [11].

Штаммы клебсиелл делят на типы путем серотипирования их К- и О-антигенов, фагового, бактериоцинового и биохимического типирования. Клебсиеллы покрыты полисахаридной капсулой значительной толщины, из-за этого клебсиеллы образуют блестящие слизистые колонии вязкой консистенции. Капсула так же обуславливает способность возбудителя избегать иммунного ответа организма. Она нарушает активацию системы комплемента путем экранирования поверхностных структур – активаторов комплемента. Рецепторы комплемента, расположенные на фагоцитирующих клетках, распознают С3b на бактериях, вызывая фагоцитоз опсонизированных бактерий.

После фагоцитоза бактерии оказываются в фагосоме, где они подвергаются атаке нескольких антимикробных белков. Осаждение C3b также вызывает образование C5-конвертазы, которая расщепляет C5 до C5b, что инициирует образование мембранного атакующего комплекса (МАС). Этот мультибелковый комплекс состоит из белков C5b, C6, C7, C8 и нескольких копий C9 (C5b-9) и может специфически уничтожать грамотрицательные бактерии, посредством образования пор во внешней мембране. Dennis J. и соавт. отмечают, что *K. pneumoniae* не выделяет специфические для хозяина ингибиторы комплемента.

В патогенезе особая роль приходится на высокоаффинные хелатирующие железо соединения, которые секретируются клебсиеллами – сидерофоры. Сидерофоры *K. pneumoniae* представлены энтеробактином, иерсинобактином, сальмохелином и аэробактином. Наиболее распространенным сидерофором является энтеробактин, кодируемый генным кластером entABCDEF. Сальмохелин кодируется генным кластером iroA. Сальмохелин и аэробактин не связываются тканевыми белками в организме животного. Колибактин – поликетидный пептид, экзотоксин из группы цикломодулинов, способный вызывать повреждения ДНК, в эукариотических клетках. Ферменты, обеспечивающие синтез колибактина – пептидсинтазы и поликетидсинтазы – кодируются геномным островом pks, содержащим 19 генов (clbA – clbS).

На плотных питательных средах образуют S- и R-формы колоний. Являются хемоорганотрофами, оксидаза-отрицательными и каталаза-положительными бактериями. Метаболизируют лактозу, сахарозу, L-арабинозу, мальтозу, D-маннозу, мелибиозу, L-раффинозу, салицин, трегалозу, целлобиозу. Характерным признаком является способность образовывать полисахаридную капсулу — основной фактор вирулентности (65, 66, 215, 126, 218).

Pseudomonas aeruginosa является комменсалами носовой полости животных и при соблюдении зоогигиенических мероприятий не вызывают

развития болезни. Выделяют данный микроорганизм от здоровых и больных животных [36]. При подозрении на наличие в материале *P. Aeruginosa* осуществляют посев на кровяной агар MacConkey и питательный агар и инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 часов [77]. На среде Эндо *P. aeruginosa* имеет вид мелких розовых лактозоотрицательных колоний S-формы. Некоторые изоляты *P. aeruginosa* могут образовывать слизь, состоящей из альгината (гелеобразующий полимер) [197]. Пигменты, продуцируемые синегнойной палочкой, принято делить на три основных химических группы: производные феназинов (группа пиоцианина), дериваты хинолина, связанным с пептидной и ацильной цепями (группа пиовердина), и производные гомогентизиновой кислоты (группа пиомеланина). Рост данного микроорганизма сопровождается специфическим запахом, что обусловлено выделением летучих соединений (2-аминоацетофенон, 2,4-диметилхиназолин и 4-метилхиназолин) [243]. Факторами адгезии синегнойной палочки являются пили (реснички, фимбрии), флагеллярные протеины, липид А, который инициирует закрепление липополисахарида [148]. Для *P. aeruginosa* характерно наличие липаз (LipA, LipB, LipC) и фосфолипазы С, что обуславливает β-гемолиз вокруг колоний при росте на кровяных питательных средах [79, 31].

Proteus spp. грамотрицательные факультативные анаэробные микроорганизмы (J. Zhang et al., 2021). *Proteus spp.* в настоящее время включают четыре вида: *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. hauseri* и *P. Penneri* [194]. *Proteus* имеют факторы патогенности: фимбрии, уреазы, биоплёнообразование, O- и капсульные полисахариды, гемолизины, протеазы, деаминазы, липополисахарид (ЛПС) [83, 236]. На среде Эндо колонии выглядят бесцветными или сероватыми с розовым оттенком, с характерным ползущим ростом. На агаре Плоскирева протей растёт в виде полупрозрачных колоний с перламутровым оттенком. На висмут-сульфит агаре колонии тёмно-коричневые блестящие. Представителя данного рода способны дезаминировать фенилаланин на специализированных питательных средах. Подвижность

опосредуется жгутиками, кодируемыми одной хромосомной последовательностью [10, 84]. Бактерии из рода *Proteus* также можно дифференцировать на основе их О-антигенной вариабельности, хотя серотипирование не входит в стандартную диагностику этих палочковидных бактерий [83]. *Proteus mirabilis* является продуцентом карбапенемазы ОХА-48. У поросят-отъёмышей при смене условий содержания в верхних дыхательных путях обнаруживают *Proteus spp.* [53].

E. coli характеризуется высокой частотой резистентности к антимикробным препаратам [51]. *Escherichia coli* O157:H7 — преобладающий серотип кишечной палочки, продуцирующей шига-токсин (STEC), который может выступать одним из факторов, способствующих возникновению бронхопневмонии у телят [228]. Известны случаи выделения *E. coli* при острой катаральной бронхопневмонии телят, что привлекает внимание к данному микробу как к возбудителю бронхопневмонии.

1.2 Биоплёнка как фактор вирулентности возбудителей бронхопневмонии

Концепция микробных сообществ, получивших название «биоплёнки» (англ. - biofilms) была сформирована всего 35 лет назад [259]. Биоплёнка — это сложное сообщество микробов, которые могут прикрепляться к поверхности или образовывать скопления, не прикрепляясь к поверхности, прочно фиксируясь во внеклеточном матриксе (ВКМ) [235]. Внеклеточный матрикс представляет собой сложную и высокополярную смесь биомолекул, включая белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты и липиды [217]. Формирование биоплёнки заключается в выработке популяцией бактерий внеклеточного матрикса. Наиболее изучен процесс биоплёнкообразования *P. aeruginosa*, из-за её способности вызывать тяжелые хронические болезни [254]. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* (ESKAPE) — одни из наиболее распространённых бактерий с множественной лекарственной устойчивостью,

ассоциированные с образованием биоплёнок [232]. Однако отмечено, что все представители сапрофитной микрофлоры существуют в организме животных в составе биоплёнок [64]. Биоплёнки защищают проникающих в организм животных возбудителей от иммунной системы хозяина, нарушая активацию фагоцитов и системы комплемента [235]. Важно заметить, что в составе биоплёнок находятся так называемые персистентные клетки, способны переносить высокие концентрации антибиотиков. Формирование биоплёнки начинается с прикрепления клеток, за которым следует образование микроколоний, созревание биоплёнок и, в конечном итоге, их распространение (рис.1). Первоначальное прикрепление клеток к поверхностям обратимо, поскольку эти клетки всё ещё восприимчивы к антибиотикам, в отличие от последующих этапов [232].

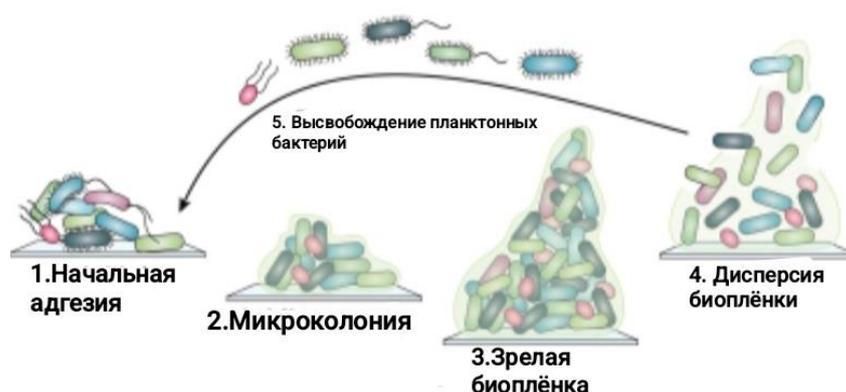


Рисунок 1 – Схематическое отображение стадий формирования биоплёнки микроорганизмов (R. Ramakrishnan, 2022)

По данным И.В. Чеботаря с соавт.: «Резистентность может быть связана с наличием в биоплёнках персистирующих форм бактерий и с фильтрующей способностью внеклеточного матрикса». Данный факт объясняет снижение эффективности терапевтических мероприятий при лечении болезни, вызванной микробом, образующим биоплёнку [66].

Существуют различные механизмы, препятствующие образованию биоплёнок: ингибирование посредством вмешательства в пути распознавания

кворума, механизм адгезии, разрушение внеклеточной ДНК, белков, липополисахаридов, экзополисахаридов и вторичных мессенджеров, участвующих в различных сигнальных путях [235].

Актуальной является разработка противомикробных препаратов, которые могут эффективно минимизировать и устранять инфекции, связанные с биопленками.

1.3 Коллоидное серебро как ингибитор образования биоплёнки микроорганизмов

Серебро в ионной форме и в составе соединений обладает высокой токсичностью для микроорганизмов и ввиду этого оказывает сильное бактерицидное действие на многие штаммы бактерий. Наночастицы серебра аккумулируются в клеточных мембранах, взаимодействуя с структурными элементами, что влечет за собой гибель бактерий [14]. Коллоидное серебро — это альтернативное лекарственное средство, состоящее из частиц серебра, взвешенных в воде. Серебро проявляет активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, грибов, простейших и даже некоторых вирусов. Коллоидное серебро обладает значительной противобиоплёночной активностью *in vitro* и *in vivo* против *S. aureus*, *MRSA* и *P. aeruginosa*. По данным Goggin R. et al коллоидное серебро ингибирует рост *in vitro* биоплёнки *S. aureus* [149, 214, 278]. Так же коллоидное серебро эффективно ингибирует планктонный рост *M. abscessus* [140]. Коллоидное серебро продемонстрировало антимикробные свойства как в лабораторных условиях, так и на животной модели риносинусита в исследовании Scott J.R. et al. [242].

В исследовании Rajiv S. et al. по оценке эффективности обработки раствором серебра различной концентрации лобных пазух овец после заражения золотистым стафилококком наблюдалось значительное снижение биомассы биопленки [230].

1.4 Классификация и таксономия бактериофагов

Бактериофаги – особый класс вирусов, которые заражают и реплицируются в бактериях и не способны инфицировать эукариотические клетки. По С.Н. Золотухину: «эти вирусные частицы состоят из генетического материала, ДНК или РНК, заключённого в простые или сложные белковые структуры – капсиды. ДНК-содержащие фаги отнесены к семействам: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Plasmaviridae*, *Corticoviridae*, *Fuselloviridae*, *Tectiviridae*, *Microviridae*, *Inoviridae* *Plectrovirus* и *Inoviridae* *Inovirus*. РНК-содержащие – *Cystoviridae* и *Leviviridae*» [108, 151, 19].

Бактериофаги идентифицированы в различных формах и могут содержать РНК или ДНК. Геномы различного размера, могут быть одно- или двухцепочечной нуклеиновой кислотой. Нуклеиновые кислоты фагов могут содержать модифицированные основания, которые защищают нуклеиновую кислоту фага от нуклеаз, разрушающих нуклеиновые кислоты хозяина во время фаговой инфекции. Основные структурные элементы бактериофагов: головка или капсид, хвост. Не все фаги имеют хвосты, прикрепленные к головке фага. Хвост представляет собой полую трубку, через которую проходит нуклеиновая кислота во время инфекции. Некоторые фаги имеют базовую пластинку и хвостовые волокна. Хвостатые бактериофаги содержат линейную двухцепочечную ДНК, входят в составе порядка *Caudovirales*, который подразделяется на три семейства на основе морфологии хвоста. Эти бактериальные вирусы имеют икосаэдрические головки, в то время как фаги с сокращающимися хвостами относятся к семейству *Myoviridae*, фаги с длинным не сокращающимся хвостом – в *Siphoviridae* и фаги с коротким хвостом относятся к семейству *Podoviridae* [244].

1.5 Особенности жизненных циклов бактериофагов

Бактериофаги являются вирусами, которые заражают исключительно бактерий, имеют общую длительную эволюционную историю со своими

хозяевами. Выделяют литический цикл, лизогенный цикл, псевдолизогению и хроническую инфекцию [166].

Наибольший интерес с точки зрения терапевтической эффективности представляют бактериофаги с литическим циклом развития. Литические фаги начинают литический цикл сразу после заражения клетки, что приводит к лизису и гибели клетки-хозяина. Во время литического цикла транскрипция фаговых генов инициируется тремя промоторами: P1 и P2, которые контролируют экспрессию ранних фаговых генов, участвующих в репликации генома, и P3, который контролирует экспрессию поздних генов, отвечающих за созревание вирионов [145]. Непосредственное участие в литическом цикле принимают литические трансгликозилазы, которые являются ферментами, воздействующими на пептидогликан клеточных стенок бактерий. Данные ферменты расщепляют гликозидную связь между остатками N-ацетилмурамоила и N-ацетилглюкозаминила с одновременным образованием 1,6-ангидромурамоила [145]. Стоит так же отметить эндолизины, которые вырабатываются инфицированными бактериофагами клетками для расщепления специфических связей в пептидогликане клеточной стенки бактерий, с целью высвободить потомство фага в конце литического цикла. Эти высокоэффективные ферменты обладают значительной специфичностью в отношении бактерии-мишени фага [258].

Лизогенные фаги способны стабильно встраивать свой геном в геном хозяина, образуя профаги (то есть латентные лизогенные фаги). В некоторых случаях хозяин получает пользу от вспомогательных метаболических генов, переносимых лизогенными фагами [264]. Лизогенные фаги играют значительную роль в адаптации бактерий к стрессовым факторам окружающей среды [195]. С лизогенией и лизогенной конверсией связаны изменения таких факторов патогенности бактерий, как токсины, адгезины, инвазины, системы секреции, транспорта железа. Условиями для данных процессов являются горизонтальная (от бактерии к бактерии) и вертикальная (от бактерии к её

потомству) передача фаговых геномов. Среди вирусов с однонитевыми ДНК-геномами (онДНК), преобладающих в окружающей среде, наиболее распространены онДНК-бактериофаги семейства *Microviridae* [1]. Умеренные бактериофаги участвуют в формировании бактериального разнообразия и способствуют появлению новых патогенных штаммов, распространяя гены, кодирующие факторы вирулентности, такие как токсины, посредством механизма горизонтального переноса генов [142, 179]. Известны случаи перехода вирусов от литического к лизогенному циклу. Erez Z. и соавт. продемонстрировали, что фаги группы SPbeta (поражают *Bacillus subtilis*) используют систему межмолекулярной коммуникации для координации решений о лизисе или о лизогении (рис.2) [137, 94].

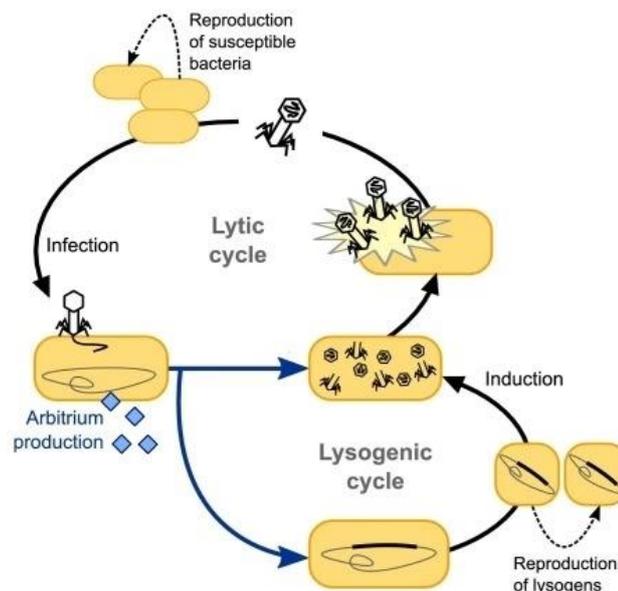


Рисунок 2 – Схематическое отображение взаимосвязи литического и лизогенного циклов бактериофагов (Н.М. Doekes et al., 2021)

Псевдолизогению можно определить как стадию приостановленного развития бактериофага в клетке-хозяине без размножения генома фага (как при литическом развитии) или его репликации, синхронизированной с клеточным циклом и стабильной в клеточной линии (как при лизогенизации), которая протекает без разрушения вирусного генома, что позволяет впоследствии возобновить развитие вируса. Это явление обычно вызвано неблагоприятными

условиями роста для клетки-хозяина (например, недостаточность питательных веществ в субстрате) и прекращается с началом либо истинной лизогенизации, либо литического роста, когда условия роста улучшаются. Это явление может быть важным аспектом фагозависимой гибели бактерий и влиять на вирулентность некоторых бактериальных штаммов [188].

При хронической инфекции микробная клетка остаётся жизнеспособной, не смотря на сборку вирусных частиц, сопряжённую с их выходом из клетки. Такой жизненный цикл характерен для бактериофагов белки оболочки, которых синтезируются в виде интегральных мембранных белков.

1.6 Фаготерапия на современном этапе. Пути доставки препаратов, содержащих бактериофаги

Начало изучения бактериофагов тесно связано с именем Ф.У. Туорта, который впервые описал «стекловидную трансформацию» при работе по анализу осповакцины. Авторство термина «бактериофаг» принадлежит канадско-французскому микробиологу Феликсу д'Эреллю. Он же и положил начало фаготерапии, применив фаги при лечении дизентерии. Д'Эрелль так же исследовал специфичность фагов по отношению к хозяевам. Он выделял бактериофагов из сточных вод, воды и фекалий животных [45].

Можно выделить следующие поколения фаговой терапии:

1. Фаговая терапия 1.0. Основана на применении природного разнообразия бактериофагов, в сочетании с эмпирической селекцией.
2. Фаговая терапия 1+. Использование детально охарактеризованных штаммов фагов. Применение эффективных методов очистки и контроля биопрепаратов.
3. Фаговая терапия 2.0. Включает в себя применение научно обоснованного подбора эффективных фагов.
4. Фаговая терапия 3.0. Переход от использования природного разнообразия бактериофагов к их созданию *in vitro*.

В настоящее время в связи с ростом антибиотикорезистентности возобновляется интерес к фаготерапии не только на территории Российской Федерации, но и во всём мире. Фаготерапия имеет ряд преимуществ перед антибактериальными препаратами:

1. Фаги реплицируются в месте инфекционного процесса за счёт наличия таргетных возбудителей
2. Препараты бактериофагов целесообразно включать в схему терапевтических мероприятий совместно с антибиотиками
3. Налаженное биофабричное производство препаратов на основе фагов является высокорентабельным [155].

Вакцинация на основе бактериофагов становится одной из самых перспективных профилактических стратегий [156].

В настоящее время набирает популярность применение бактериофагов в составе вакцин. Фаговые вакцины способны индуцировать как клеточные, так и гуморальные иммунные ответы. Вакцины на их основе содержат экспрессированные на поверхности фага антигены. На данный момент разработано три типа вакцин на основе фагов: фаг-диспергированные, фаг-ДНК и гибридные фаг-ДНК вакцины. Гибридные бактериофаговые вакцины производятся путем комбинации фагового дисплея и фага ДНК-вакцины. Для получения ДНК-вакцины ген антигена внедряют в организм реципиента и ожидают генерацию антигена из внедренной ДНК. В этом случае ген присоединяется к последовательности, стимулирующей экспрессию, которая имитирует одну из последовательностей, стимулирующих экспрессию реципиента. Основным принцип использования фагов в качестве транспортных средств для доставки антигена включает сборку антигена патогена на капсиде фага *in vivo* или *in vitro* с образованием вирусоподобной частицы (VLP) путем слияния антигена с белком капсида вируса. Для сборки *in vivo*, ген антигена должен быть вставлен в геном фага, чтобы образовался слитый ген антигена и капсидного белка. F1 mutV антиген *Yersinia pestis* активирован как тип 1, так и тип

2 хелперных Т-клеток у мышей при сборке на капсиде Т4, тогда как растворимый антиген F1mutV в основном активирует хелперные Т-клетки второго типа [151, 118, 255]. Фаговые вакцины применяют для профилактики и лечения ряда заболеваний, включая рак, вирусные, паразитарные, грибковые инфекции и для иммуноконтрацепции. Разработана противораковая вакцина на основе бактериофага λ , содержащего пептид GP2. Иммуногенная вакцина на основе бактериофага индуцирует цитотоксическую активность Т-лимфоцитов против модели опухоли мышей, сверхэкспрессирующей HER2/neu [263, 233]. Фаги интернализуются путём эндоцитоза и процессируются APCs. После того как фаговые частицы попадают в APC, антигены представляются через главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса I и II, стимулируя клеточный и гуморальный иммунные ответы. Представленные фагами антигены вызывают специфические ответы CD^{4+} и CD^{8+} Т-клеточных лимфоцитов (CTLs), что приводит к выработке специфических антител и гуморального иммунного ответа, к выработке специфических антител и активации Т-хелперных клеток [263]. Фаги легко поддаются генной инженерии и очищаются, поэтому их применяют в качестве био-наночастиц.

Фаговый дисплей – технология, которая заключается в экспрессии пептидов или белков, связанных с белками оболочки поверхности фага. Фаговый дисплей недорогой и быстрый метод для идентификации иммуногенных белков и пептидов, что позволяет разрабатывать эффективные вакцины [263]. Преимущество данной методологии заключается в прямой физической сцепленности фенотипа и генотипа анализируемого полипептида и кодирующего его фрагмента ДНК. Эту технологию применяют для получения векторов, содержащих антигены, и для идентификации новых протективных антигенов [59]. Филаментозные фаги (M13, fd и f1), литические фаги (Т4 и Т7) и умеренный фаг лямбда (A) успешно используются в качестве дисплейных систем. Наиболее широко используется в фаговом дисплее M13, поскольку его очистка из лизата кишечной палочки проще по сравнению с другими фагами.

Короткие аминокислотные последовательности (мимотопы) используются для получения антител против специфических эпитопов антигена [263]. Для индикации крупных антигенов применяют λ -фаг. Так β -галактозидазу, (белок размером более 400 кДа) удаётся распределить на поверхности λ -фага [263, 59].

Метод рекомбинирования бактериофагов при помощи электропорации ДНК (BRED) трудно использовать на грамположительных бактериях, которые демонстрируют низкую эффективность трансформации. Для повышения частоты гомологичной рекомбинации используют кодируемую фагом систему рекомбинации (Red система фага лямбда и RecE/RecT система профага λ cas). Система Red является хорошо изученной системой рекомбинации фага, состоящей из генов *gam* (γ), *exo* (α) и *bet* (β). Gam ингибирует экзонуклеазный комплекс RecBCD *E. coli* для предотвращения деградации субстрата линейной ДНК. Exo нацеливается на концы двухцепочечной ДНК для деградации одной нити ДНК в направлении от 5' к 3' для создания одноцепочечной ДНК субстрата. Бета является ДНК-связывающим белком, который отжигает субстрат к своей мишени рекомбинации в геноме фага. BRED требует совместной электропорации шаблона фаговой ДНК и донорской ДНК в бактериальные клетки экспрессирующих белки, такие как RecE/RecT, через плазмиды или хромосомно вставленные геномы для продвижения гомологичной рекомбинации. Рекомбинация происходит после начала репликации фагового генома [118, 171, 114, 111, 58, 101, 99, 95, 102].

В качестве альтернативы методам гомологической рекомбинации, предложены сконструированные фаги, которые могут быть получены путём трансформации клеток-хозяев с полноразмерной геномной ДНК фага, содержащей желаемые мутации. Полноразмерная геномная ДНК может быть собрана с перекрывающимися фрагментами генома *in vivo* посредством трансформационно-ассоциированной рекомбинации (TAR). TAR допустимо использовать для сборки ДНК длиной до 300 кб. Грамположительные бактерии обычно демонстрируют низкую эффективность трансформации [102].

Клостридиальные бактериофаги применяют для лечения газовой гангрены. Интактные бактериофаги обнаруживают внутри бактериальной клетки через 75 минут после заражения, а лизис клеток начинался через 105-115 минут после заражения. После ультрафиолетового облучения одного лизогенного штамма *C. perfringens* выделен длиннохвостый, ДНК-содержащий бактериофаг с неконтрактильным хвостом, обозначенный СРТ1. Фаг имеет фазу эклипса приблизительно 45 минут с максимальное увеличение титра через 45 минут после высвобождения дочернего вируса. Бактериофаг, обозначенный как СРТ4, имеет сходные характеристики, но более короткий хвост по сравнению с СРТ1. Из смывов субпродуктов цыплят-бройлеров и фекалий домашней птицы выделены бактериофаги, обозначенные phiCP39O и phiCP26F. Геном двухцепочечной ДНК бактериофага phiCP39O составил 38 753 п.о., в то время как геном phiCP26F – 39 188 п.о. [244].

Разработан ряд новых бактериофагов против штаммов *Escherichia coli*: ЕСТА-47, ЕСМЛ-83, ЕСМЛ-117, ЕСМЛ-119, ЕСМЛ-122 и/или ЕСМЛ-134, обладающих литической специфичностью для целевых бактерий («депонированный бактериофаг»). Против штаммов *Pseudomonas aeruginosa* литические бактериофаги: PAML-2, PAML-14, PAML-20, PAML-22, PAML-31-1, PAML-73 И PAML-75. Против золотистого стафилококка литические бактериофаги: SAML-4, SAML-150 и SATA-8505 [238]. Против штаммов *Shigella*: SHFML-26, SHFML-11, SHSML-45, SHSML-52-1, SHBML-50-1, SHBML-50-2, SHSML-52-2, SHSML-36 и SHFML-21 [227]. Из *C. Perfringens* выделены бактериофаги phi3626 и phi8533. Phi3626 содержит муреин-гидролазу (фермент эндолизин) [244]. PhiX174 (инфицирует *Escherichia coli*) - бактериофаг из семейства *Microviridae* с кольцевым, одноцепочечным геномом ДНК, кодирующим 11 белков используется в молекулярной и синтетической биологии [171]. Из почвы выделен фаг 0305ф8-36 (инфицирующий *Bacillus thuringiensis*). Это литический бактериофаг с двухцепочечной ДНК, имеет сократительный хвост, который используется для введения генома в клетку

хозяина [220]. Выявлено 4 изолята бактериофагов Citrobacter из воды, почвы и песка [55]. Из сточных вод животноводческих ферм и мясокомбинатов выделяют бактериофаги *Hafnia alvei* [20]. Изолировано восемь бактериофагов заражающих *E. amylovora* ATCC 29780: Special G (KU886222), Simmy50 (KU886223), RAY (KU886224), Deimos-Minion (KU886225), Bosolaphorus (MG655267), Desertfox (MG655268), MadMel (MG655269) и Mortimer (MG655270). *Agrican357virus* – род бактериофагов-*Myoviridae* с dsDNA, крупными капсидами, длинными сократительными хвостами [248]. Фаг *Serratia marcescens* инактивируется при температуре 45-55°C в течение 10 минут [20]. *Pasteurella multocida* обладает широким спектром бактериофагов *Siphoviridae* и *Myoviridae* (203).

Разработаны различные методы введения препаратов, содержащих фаги:

1. Перорально. Бактериофаги могут быть введены перорально в виде растворов, капсул или таблеток. Данный метод доставки применяется при желудочно-кишечных заболеваниях инфекционной этиологии. Таблетки с фагами производят путём распылительной сушки фагов, прямого прессования порошков фагов в таблетки, а затем покрытия таблеток оболочкой. Фаги чувствительны к инаktivации при воздействии физических, термических и химических факторов во время производства и хранения таблеток. Твердая лекарственная форма фагов потенциально может обеспечить защиту от деградации фагов, вызванной рН, и надежно доставлять высокую дозу фагов в желудочно-кишечный тракт [172].

2. Парентерально. Бактериофаги могут быть введены инъекционно в поврежденные ткани или непосредственно в область инфекционного процесса.

3. Интраназально. Интраназальный путь введения предусматривает введение жидкого фагосодержащего препарата на слизистую оболочку носовых ходов. Это неинвазивный метод, который позволяет обойти гематоэнцефалический барьер и доставить лекарственные препараты

непосредственно в ЦНС и лёгкие. Лекарственные препараты, вводимые интраназально, не подвергаются первичному метаболизму в печени и оказывают ограниченное воздействие на периферические органы по сравнению с лекарствами, вводимыми системно. Ff-фаги при интраназальном введении быстро накапливаются в мозге мышей и могут замедлять прогрессирование ортотопической глиобластомы [127].

4. Аэрозольный метод. Бактериофаги могут быть распылены в виде аэрозоля, для наилучшей биодоступности при инфекционных болезнях дыхательной системы.

5. Местное применение. Бактериофаги могут использоваться в виде гелей или мазей, которые наносятся непосредственно на инфицированные участки кожи или слизистые оболочки. Данный метод актуален при раневых инфекциях.

6. Ректальный путь введения. Erica A. Rozema и соавт. показали эффективность ректального способа введения бактериофагов крупному рогатому скоту для снижения фекального выделения *Escherichia coli* [237].

Ингаляционная фаготерапия в свою очередь потенциально может изменить схему лечения бактериальных респираторных инфекций, в том числе вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями. Ингаляционные инструменты доставки препаратов помимо прочего позволяют осуществить доставку бактериофагов непосредственно в очаг поражения. Немаловажным преимуществом, особенно если говорить про бактериофаги, является возможность применять меньшие дозы лекарственных средств, чем потребовались бы при выборе другого способа введения [265, 132]. К тому же в случае поражения респираторного тракта ингаляционный метод доставки эффективнее внутривенного, что было продемонстрировано Takemura-Uchiyama и соавт. Они наблюдали наличие фагов после внутривенного введения в жидкости для бронхоальвеолярного лаважа (BALF) только у

животных, зараженных бактериями, а не в группе, не подвергшейся заражению, и пришли к выводу, что бактериальная инфекция может вызывать образование микропор в тканях (включая эндотелий кровеносных сосудов), тем самым облегчая диффузию фагов из кровотока. Помимо потенциальной эффективности при бактериальных инфекциях препараты на основе фагов относительно безопасны, что было показано в исследовании, опубликованном ещё в 1938 году, в котором автор приводит данные по эффективному введению бактериофагов новорождённым и грудным детям. Для фаготерапии следует применять вирусы с литическим циклом. Не зависимо от способа введения фаготерапию принято делить на пассивную и активную. Пассивная терапия подразумевает применение большего количества фагов по отношению к бактериям, в отличие от активной, когда эффективность зависит от саморепликации и вторичной инфекции. При ингаляции фагосодержащего препарата существенное значение имеет репликация фагов *in situ*, то есть пассивная терапия. Известны исследования по применению фаготерапии для лечения инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia* и *Mycobacterium tuberculosis*. Для успешной ингаляции фагов необходимо, чтобы они обладали биохимической стабильностью, которой легче достигнуть, применяя жидкую форму препарата. Часть исследований направлена на получение наиболее подходящего для бактериофагов стабилизатора, на данный момент они не разнообразны (фосфаты, Tris). Несмотря на популярность жидкой формы фагосодержащих препаратов данные о стабилизации вирусов в суспензиях ограничены. Поскольку фаги не сохраняют стабильность в воде для хранения применяют буферные системы (PBS) и Tris. Стабилизации способствуют ионы Mg^{2+} , желатин (800 мкг/мл) и фикоилл (3 – 6%). На данный момент промышленностью для получения лекарственных форм респираторного фага используются следующие три рецептурных метода: суспензия фагов в жидкой среде, сублимационная сушка и распылительная сушка [222, 251, 262, 270, 92].

Не зависимо от способа введения фаготерапию принято делить на пассивную и активную. Пассивная терапия подразумевает применение большего количества фагов по отношению к бактериям, в отличие от активной, когда эффективность зависит от саморепликации и вторичной инфекции.

На данный момент на территории Российской Федерации изготавливаются разнообразные фагосодержащие лечебно-профилактические препараты, эффективные против различных возбудителей (табл.1)

Таблица 1 – Лечебно-профилактические бактериофаги (входящие в «ОФС.1.7.1.0002.15. Общая фармакопейная статья. Бактериофаги») и их целевая направленность

Наименование препарата	Специфическая направленность	Форма выпуска
Бактериофаг стафилококковый (<i>Bacteriophag staphylococcum</i>)	<i>Staphylococcus spp. (S. aureus)</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг стрептококковый (<i>Streptococcal bacteriophag</i>)	<i>Streptococcus spp.</i> (в том числе, <i>Enterococcus spp.</i>)	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг псевдомонаса аеругиноза (синегнойный) (<i>Bacteriophage Pseudomonas aeruginosa fluid</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг коли (<i>Bacteriophagum coli</i>)	<i>Escherichia coli</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг протейный (<i>Bacteriophagum proteus</i>)	<i>Proteus mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг дизентерийный поливалентный (<i>Bacteriophage dysentericum polyvalentus</i>)	<i>Shigella flexneri 1, 2, 3, 4, 6 сероваров; S. sonnei</i>	Раствор для приема внутрь или ректального введения
Бактериофаг брюшнотифозный (<i>Typhoid bacteriophage</i>)	<i>Salmonella typhi</i>	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой

Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE (<i>Bacteriophage Salmonellicum ABCDE</i>)	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. 38ublin38</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i>	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг колипротейный (<i>Bacteriophagum coliprotei</i>)	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Клебсифаг (<i>Klebsiphage</i>)	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (<i>Pyobacteriophage polyvalent purified</i>)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Секстафаг (<i>Sextafag</i>)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Интести-бактериофаг (<i>Intesti-bacteriophage</i>)	<i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i> , <i>P. mirabilis</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения

	<i>и P. vulgaris, E. coli, Enterococcus spp., Staphylococcus spp., P. aeruginosa</i>	
--	--	--

Помимо НПО МИКРОГЕН, АО на территории Российской Федерации производств фагосодержащих препаратов, не входящих в «ОФС.1.7.1.0002.15. Общая фармакопейная статья. Бактериофаги», занимается ООО НПЦ «МикроМир». Продукция, выпускаемая ООО НПЦ «МикроМир» (табл.2).

Таблица 2 - Продукция, выпускаемая ООО НПЦ «МикроМир»

Наименование	Форма выпуска	Назначение
Отофаг гель с бактериофагами	Гель для наружного применения	ОРВИ, ринит, отит, синусит, фарингит, аденоидит, ангина, ларингит, хронический тонзиллит
Фагодент гель с бактериофагами	Гель для наружного применения	Гингивит, стоматит, пародонтит, пародонтоз, другие воспалительные процессы
Фагодерм гель с бактериофагами	Гель для наружного применения	Атопический дерматит, розацеа, другие дерматозы, раны и повреждения кожного покрова
Фагогин гель с бактериофагами	Гель для наружного применения	Бактериальный вагиноз, вагинит, цистит, цервицит, уретрит

За пределами Российской Федерации так же находятся предприятия по производству препаратов, содержащих бактериофаги: Proteon Pharmaceuticals S. A. (Республика Польша), Phagelux (Республика Польша), Intralytix (США), Microeos (Королевство Нидерландов), Eliava BioPreparations (Республика Грузия), Intralytix, Inc. (США), Phagelux, Inc. (Китайская Народная Республика),

TechnoPhage (Португальская Республика), Eligo Bioscience (Французская Республика), BiomX Inc. (Государство Израиль), Microgen (Республика Индия), Adaptive Phage Therapeutics, Inc. (США), Armata pharmaceuticals Inc. (США), OmniLytics (США), ATCC (США), Pherecydes Pharma (Французская Республика), iNtRON Biotechnology, Inc.(США), Fixed-Phage Limited (Соединённое Королевство Великобритании и Северной Ирландии), Cytophage Technologies Inc. (Канада) [207; 152; 154; 223].

1.7 Защитные системы бактерий против бактериофагов и варианты их преодоления

Бактериофаги оказывают существенное селективное давление на популяцию бактерий. Бактерии и связанные с ними бактериофаги проходят непрерывные циклы эволюции, вырабатывая устойчивость друг к другу как в естественных, так и в искусственных экосистемах (Stern et al., 2011). В процессе эволюции бактерии выработали разнообразные специализированные системы, задача которых сводится к защите от бактериофагов. Одни противовирусные бактериальные системы обеспечивают защиту на уровне отдельной клетки, препятствуя инфицированию, другие – препятствуют эффективной продукции вирусного генома. На данный момент изучены следующие противовирусные системы защиты бактерий:

1. Системы, блокирующие адсорбцию бактериофагов
2. Системы рестрикции-модификации (R-M)
3. Pgl и BREX системы
4. DISARM
5. Белки-аргонавты
6. CRISPR/Cas-системы
7. Abi-системы
8. Токсин-антитоксиновые системы

В значительной степени устойчивость бактерий ассоциирована с модификацией или с нарушением синтеза поверхностных структур клетки,

которые выступают в качестве рецептора для фага. У некоторых штаммов сальмонелл наблюдается высокая активность транспозиций мобильных элементов, которые могут инактивировать гены, отвечающие за синтез поверхностных бактериальных структур. Рецепторы могут быть скрыты капсулой. Например, капсула K1 кишечной палочки напрямую взаимодействует с фагом T7 и предотвращает его прикрепление к рецепторам липополисахарида. Рецептор-связывающий белок pb5(T5) бактериофага T5, экспрессируемый из гена oad связывается со своим рецептором FhuA на поверхности *E. coli*, где он блокирует FhuA для последующей адсорбции T5. Бактериальные плазмиды могут содержать гены, способные изменять конформацию рецепторов фагов. Механизмы бактериофагов для преодоления адсорбционной устойчивости включают в себя наличие множественных рецептор-узнающих белков для распознавания альтернативных рецепторов, использование ретронных элементов, протеолитический процессинг рецептор-узнающей центральной фибриллы, деградирующие полисахариды ферменты. Белок Imm фага T4 блокирует процесс введения ДНК суперинфицирующих бактериофагов [246, 201].

Системы рестрикции-модификации (R-M) — это прокариотические системы самораспознавания с метилтрансферазой и эндонуклеазой рестрикции, которые позволяют бактериальным клеткам различать свою и чужеродную ДНК, происходит посредством модификации (метилования ДНК) или деградации ДНК. Из четырёх основных типов систем R-M наиболее изученным и простым по структуре является тип II. Большинство из них включают два независимых фермента: эндонуклеазу рестрикции (Rease) и ДНК-метилтрансферазу (Mtase). Оба фермента распознают одну и ту же короткую последовательность ДНК, которую Mtase модифицирует, добавляя метильную группу. Системы R-M типа I состоят из белкового комплекса, обладающего как метилирующей, так и рестрикционной эндонуклеазной активностью, нацеленной на двухцепочечную ДНК в двухкомпонентном

мотиве, разделённом неспецифическим промежутком. Фаги выработали различные стратегии борьбы с системами R-M, в том числе отсутствие сайтов распознавания эндонуклеаз в их геномах в результате точечных мутаций [206, 213].

Системы противовирусного иммунитета BREX встречаются примерно в 7% геномов прокариот и часто группируются вместе с другими генами. На основе белкового состава системы BREX классифицируются на шесть типов. BREX типа II ранее описывался как система Pgl (ограничения роста фагов) *Streptomyces*. Система Pgl включает 4 компонента: PglX — аденин-метилтрансферазу, PglY — АТФазу, PglW — протеинкиназу и PglZ — щелочную фосфатазу. Системы защиты от бактериофагов (BREX) обнаружены только у *Actinomyces*. Основные компоненты систем BREX 1-го типа включают VrxX (PglX), аденин-специфичную метилтрансферазу, VrxZ (PglZ), щелочную фосфатазу, VrxC, АТФазу, VrxL, Lon-подобную протеазу, и белок VrxB. Системы BREX метилируют собственную ДНК клетки, а наличие специфических для BREX модификаций в геноме фага позволяет преодолеть защиту [150]. Системы противовирусного иммунитета BREX встречаются примерно в 7% геномов прокариот и часто группируются вместе с другими генами. В системах BREX типа I для защиты и метилирования требуется связывание ДНК-сайта BREX с метилтрансферазой VrxX (PglX), использующей S-аденозилметионин в качестве кофактора. В системах BREX типа I для защиты и метилирования требуется связывание ДНК-сайта BREX с метилтрансферазой VrxX (PglX), использующей S-аденозилметионин в качестве кофактора [150, 129, 191].

DISARM (Defence Island System Associated with Restriction-Modification) — система островков защиты, связанная с системами ограничения-модификации широко распространена у бактерий и архей. DISARM включает в себя ДНК-метиразу и четыре других гена, обозначенных как домен хеликазы, домен фосфолипазы-D (PLD) и домен DUF1998 [212].

Белки-аргонавты играют значительную роль в противовирусной защите, распознавая и расщепляя чужеродные ДНК или РНК. Ферменты, подобные РНКазе III (Dicer-подобные, DCL), распознают и впоследствии преобразуют различные двухцепочечные РНК вирусного происхождения (например, геномные внутримолекулярные структуры обратной транскрипции, репликативные промежуточные продукты) в первичные вирусные миРНК (vsiРНК) длиной 2–24 нуклеотида [189].

Системы кластерных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas — это системы приобретённого иммунитета, широко распространённые у архей и бактерий. Последовательности CRISPR функционируют в рамках системы биологической защиты, аналогичной эукариотической системе РНК-интерференции, и защищают клетки от проникновения чужеродных мобильных генетических элементов. Близкородственные штаммы могут значительно различаться по содержанию и распределению CRISPR. Cas3, Cas4 содержат семь мотивов, характерных для хеликаз суперсемейства 2, одновременно Cas4 ассоциирована с экзонуклеазами RecB, которые работают в составе комплекса RecBCD для терминальной репарации двухцепочечных разрывов, чтобы запустить гомологичную рекомбинацию. Очищенный комплекс Cas9-CRISPR РНК (crRNA) способен расщеплять ДНК-мишень *in vitro* [161].

Абортивная инфекция (Abi) — это стратегия защиты бактерий от бактериофагов, которая заключается в самоуничтожении инфицированной клетки. Обратные транскриптазы (ОТ) — это ферменты, способные синтезировать ДНК, используя РНК в качестве матрицы. Известны прокариотические ОТ с различными противовирусными свойствами, такие как DRT (обратные транскриптазы, ассоциированные с защитой) и связанные с обратными транскриптазами системы прерывания инфекции (Abi). Системы Abi могут функционировать как прокариотические защитные механизмы против определённых фагов. Как правило, они состоят из сенсорного модуля,

распознающего специфичный для фага сигнал, и эффекторного модуля, который генерирует ответную реакцию, блокируя цикл вирусной инфекции, останавливая метаболизм хозяина или вызывая гибель клетки. AbiA, AbiK и AbiP2 имеют общий N-концевой домен RT (13–17), AbiA содержит дополнительный С-концевой домен NEPN (нуклеотид-связывающий домен высших эукариот и прокариот) с активностью РНКазы. AbiA, и AbiK обнаруживаются в плазмидах, AbiP2 содержится в гипервариабельной области профагов P2 в *E. coli* и обеспечивает устойчивость к фагу T5. Фаги, избегающие воздействия AbiK и AbiA, содержат точечные мутации в белках одноцепочечного отжига (SSAP), участвующих в репликации ДНК [198, 210, 143].

1.8 Разнообразие методов выделения бактериофагов и оценки их характеристик

Бактериофаги – особый класс вирусов, которые заражают и реплицируются в бактериях и не способны инфицировать эукариотические клетки. Бактериофаги состоят из генетического материала, ДНК или РНК, заключённого в капсиды. ДНК-содержащие фаги отнесены к семействам: «*Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Lipothrixviridae, Plasmaviridae, Corticoviridae, Fuselloviridae, Tectiviridae, Microviridae, Inoviridae Plectrovirus* и *Inoviridae Inovirus*». РНК-содержащие – *Cystoviridae* и *Leviviridae* Бактериофаги уничтожают бактериальные клетки путём внутренней репликации и лизиса с помощью сложного литического цикла. Бактериофаги могут вызывать иммунный ответ сами по себе, что позволяет их использовать в качестве перспективных носителей вакцин. Фаги способны стимулировать врожденный иммунитет и поэтому потенциально могут действовать как естественный адъювант. Представление антигенов на поверхности капсида фага в высокоупорядоченном и повторяющемся формате облегчает связывание IgM с антигенной детерминантой [151, 118, 59]. Бактериофаги идентифицированы в различных формах и могут содержать РНК или ДНК. Геномы различного

размера, могут быть одно- или двухцепочечной нуклеиновой кислотой. Нуклеиновые кислоты фагов могут содержать модифицированные основания, которые защищают нуклеиновую кислоту фага от нуклеаз, разрушающих нуклеиновые кислоты хозяина во время фаговой инфекции. Основные структурные элементы бактериофагов: головка или капсид, хвост. Не все фаги имеют хвосты, прикрепленные к головке фага. Хвост представляет собой полую трубку, через которую проходит нуклеиновая кислота во время инфекции. Некоторые фаги имеют базовую пластинку и хвостовые волокна. Хвостатые бактериофаги содержат линейную двухцепочечную ДНК, входят в составе порядка *Caudovirales*, который подразделяется на три семейства на основе морфологии хвоста. Эти бактериальные вирусы имеют икосаэдрические головки, в то время как фаги с сокращающимися хвостами относятся к семейству *Myoviridae*, фаги с длинным не сокращающимся хвостом – в *Siphoviridae* и фаги с коротким хвостом относятся к семейству *Podoviridae* [244]. Бактериофаги имеют литический или лизогенный цикл, некоторые бактериофаги способны осуществлять оба цикла.

Процесс репродукции бактериальных вирусов делят на стадии, один процесс постепенно переходит в следующий: адсорбция, инфицирование, репликация фага и лизис клетки. Первый этап в инфекционном процессе – адсорбция фага на бактериальной клетке. Прикрепление фага к бактерии через хвостовые волокна является слабым и является обратимым. Необратимое связывание фага с бактерией опосредуется одним или несколькими компонентами базовой пластинки. Адсорбция включает в себя две фазы, первая из которых является обратимой, другая необратимой.

Во время фазы затмения инфекционные частицы фага не могут быть обнаружены ни внутри, ни снаружи бактериальной клетки. Нуклеиновая кислота фага берёт на себя управление биосинтетическим механизмом клетки-хозяина, в результате чего образуются м-РНК и белки, специфичные для фага. После создания фаговой ДНК создаются поздние м-РНК и поздние белки.

Поздние белки — это структурные белки, из которых состоит фаг, а также белки, необходимые для лизиса бактериальной клетки. На фазе внутриклеточного накопления нуклеиновая кислота и структурные белки, которые были получены, собираются, и инфекционные частицы фага накапливаются внутри клетки-хозяина. Во время фазы лизиса и высвобождения бактерии лизируются и внутриклеточный фаг высвобождается [59].

Существуют различные модификации методов для выделения литических бактериофагов из объектов окружающей среды. Выбор метода зависит от особенностей объекта, из которого выделяется бактериофаг, и бактерии-хозяина.

Wen-Yuan и соавт. успешно выделили бактериофаг SapYZU01 из образца почвы методом обогащения. 10 г почвы суспендировали в 50 мл солевого магниевого (SM) буфера (0,05 М Трис-HCl, pH 7,5, 0,1 М NaCl, 0,008 М MgSO₄ и 0,01% желатина) и центрифугировали при 8000 × g в течение 10 минут. Для обогащения супернатант (от 3 до 5 мл) инкубировали в течение ночи при 37°C при слабом встряхивании с 5 мл 2-кратного бульона LB, в который были добавлены культуры штамма-хозяина в экспоненциальной фазе роста (100 мкл). Культуры центрифугировали при 8000 × g в течение 10 минут, надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм для получения лизата бактериофага. Для выделения литического фага лизат (100 мкл) разводили в SM-буфере и смешивали со 100 мкл штамма-хозяина в 4 мл расплавленного агара LB. Затем смесь выливали на чашку Петри с агаром LBA, чтобы образовался двойной слой агара, и инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C. После инкубации брали одну бляшку и ресуспендировали в буфере SM, чтобы получить суспензию фага. Эту суспензию последовательно разбавляли буфером SM, смешивали с соответствующим хозяином, выливали на чашки Петри с агаром LBA и инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C, чтобы получить отдельные бляшки. Бактериофаги из отдельных бляшек

очищали как минимум три раза для обеспечения чистоты, а очищенные фаги хранили в 20% глицерине при температуре -80°C [280].

Urban-Chmiel и соавт. для выделения литического бактериофага к *M. Haemolytica* применили Дэвиса и Ли. Согласно данному протоколу при совместном инкубировании бактериофага и бактерии-хозяина добавляется митомицин С до конечной концентрации 0,3 мг/мл. Частицы фагов отделяли от бактериальных клеток путем центрифугирования культур при 3000 g в течение 20 минут при 4°C и фильтрации надосадочной жидкости через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм [203; 267].

Yanyan Ma и соавт. успешно выделили бактериофаг phiAxp-3 специфичный в отношении *Achromobacter xylosoxidans*. Их исследование демонстрирует, что титр фага зависит от pH, температуры и концентрации этанола. При pH 4 и pH 10 количество частиц фага снижается на 90,25% и 75,76% соответственно. При 50°C , 60°C , 70°C и 80°C титры фага снижаются. Титр фага снижается на 20,75%, 69,76% и 99,62% после 75 минут обработки изопропанолом в концентрации 10%, 50% и 95% соответственно [190].

Cross и соавт. предлагают модифицированный метод для выделения бактериофагов к *Arthrobacter sp.* Из образцов почвы. 400 г исследуемого материала вносят в буферный раствор. Затем экстракт фильтруют через бумагу, чтобы удалить частицы почвы. Для получения стерильного фильтрата применяют фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. 50 мл пермеата вносят в 250 мл питательной среды. Добавляют от 1 до 2,5 мл (OD600 от 0,5 до 0,7) культуры бактерий в поздней экспоненциальной/ранней стационарной фазе. Инкубируют при температуре 30°C в течение 24 часов постоянно помешивая. После инкубирования образцы обогащённой среды разводят в десять раз буфером. Смешивают 4,5 мл питательной среды LB и выливают смесь на чашку Петри плотной питательной средой. Аккуратно перемешивают, чтобы равномерно распределить по чашке Петри, и дают питательной среде застыть в течение 15

минут. Инкубируют при температуре 30 °С от 24 до 72 часов. Через 24 часа инкубации чашки оценивают на наличие негативных колоний. При отсутствии бляшек инкубацию продолжают до 72 часов [116, 135].

Бактериофаг может быть получен путём ресуспендирования очищенного препарата фага в водной среде, такой как деионизированная вода, буферный раствор (например, Tris-HCl pH 7,4), минеральная вода, 5% раствор сахарозы, глицерин, декстран, полиэтиленгликоль, сорбит или другие составы, которые поддерживают жизнеспособность фага и нетоксичны для животных. Подходящие составы, в которых носителем является жидкость, для введения (например, назальный спрей или в виде назальных капель), включают водные или масляные растворы активного ингредиента.

Для анализа характеристик бактериофага целесообразно применять питательные среды наилучшим образом, подходящие для культивирования специфического микроорганизма-хозяина.

При выделении фагов из принято применять два метода. Сущность первого состоит в том, что исследуемый материал (фекалии, почва) фильтруют через бактериальные фильтры, фильтрат высевают с индикаторными бактериями в питательный бульон, который инкубируют в термостате при 37°С в течение 14 - 18 часов. Сущность второго метода сводится к тому, что материал, помещают в питательный бульон совместно с индикаторной культурой, после чего культуру фильтруют через бактериальные фильтры. Фильтрат исследуют на наличие фага на плотных и в жидких питательных средах. Наличие фага в фильтрате выявляют путём посева на плотные питательные среды методом агаровых слоёв. Бактерий, подвергавшиеся обработке, выращивают в бульоне при комнатной температуре (22°С±3°С), затем высевают на поверхность агаровой среды, чтобы обеспечить их плотный, не сливной рост.

Выделение бактериофагов методом обогащения проводится по следующей схеме:

1. В жидкую питательную среду вносят исследуемый материал и молодую тестовую культуру.

2. Среду помещают в термостат при температуре 30-35/37°C. Каждые 30 минут проводят наблюдения за исследуемыми пробирками под контролем среды, в которую добавлена только культура микроба без исследуемого материала.

3. При наличии фага в исследуемых пробирках, после появления роста наступает в разной степени выраженное просветление. В пробирке, в которую добавлена только культура, наблюдают усиливающийся рост микроорганизма.

Суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 30 минут. При увеличении количества оборотов время центрифугирования сокращают.

Важной биологической характеристикой бактериофагов является «урожай фага». Фаги, обладающие высокой урожайностью, обеспечивают большую чувствительность метода нарастания титра фага, увеличение титра в реакции бывает в результате инфицирования даже небольшого количества бактерий. Фаги применяют при титре 10^9 корпускул в 1 см^3 . Для этого готовят систему вирус-клетка: К $0,9 \text{ см}^3$ бульонной культуры, содержащей 5×10^6 микробных клеток, добавляют $0,1 \text{ см}^3$ бактериофага в концентрации 5×10^6 корпускул в $1,0 \text{ см}^3$, чтобы множественность инфекции составляла 0,1. Приготовленную смесь помещают в термостат при 37°C. По истечении времени адсорбции фага на бактериях $0,1 \text{ см}^3$ смеси добавляют к $0,9 \text{ см}^3$ антифаговой сыворотки в разведении 1:80. Через 5 минут для прекращения нейтрализации фага $0,1 \text{ см}^3$ смеси разводили в $0,9 \text{ см}^3$ питательного бульона. Из этой пробирки берут $0,1 \text{ см}^3$ жидкости, которую вносят к $9,9 \text{ см}^3$ бульона. Из четвертой пробирки берут $0,1 \text{ см}^3$ жидкости и вносят в $9,9 \text{ см}^3$ бульона (пятая пробирка). Из 4 и 5 пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2 минуты берут по $0,1 \text{ см}^3$ жидкости и засевают в две бактериологические чашки по методу агаровых слоёв. Подсчёт негативных колоний проводят после 16-18 часового

инкубирования чашки при 37°C. Специфичность выделенных бактериофагов проводят методом агаровых слоёв [10, 59, 248].

Литическую активность фагов определяют на плотных и в жидких питательных средах методами Грациа и Аппельмана.

При методе Аппельмана в ряд пробирок вносят питательный бульон. В первую пробирку вносят взвесь фага. Делают последовательные разведения. Инкубирование проводят в термостате при температуре оптимальной для тест-штамма.

Титр фага устанавливают по последней, прозрачной пробирке ряда и выражают разведением фага.

При методе Грациа (агаровых слоёв) 1,5% мясопептонный агар разливают по чашкам Петри в количестве 25-30 см³. Чашки, прикрытые стерильными фильтровальными бумажками, подсушивают в термостате или под бактерицидной лампой в течение нескольких часов. Это необходимо для абсолютной сухости чашек, так как малейшее их увлажнение может исказить результаты количественного изучения фага. Агар 0,7%, предварительно разлитый в стерильные пробирки, расплавляют и остужают до 46-48°C. Фаги вносят в 0,7% агар, туда же вносят суточную бульонную культуру индикаторного микроорганизма, содержимое перемешивают, вращением пробирки в ладонях, и выливают на поверхность 1,5% агара. Смесь осторожным движением распределяют по поверхности агара, чашки для застывания оставляют на 30 минут, а затем инкубируют в термостате при 37°C в течение 18-20 часов. После инкубации подсчитывают количество негативных колоний фага и умножают полученное число на степень разведения. Титр фага выражают количеством фаговых корпускул (бляшкообразующих единиц) в 1,0 см³ жидкости.

Устойчивости бактериофагов к нагреванию. Готовят разведение бактериофагов 1:10 в МПБ (рН 7,4). Пробирки прогревают в термостате при

температуре от 60°C до 90°C с интервалом 2-3°C в течение 30 минут. Параллельно ставят контроль – фаги, разведенные 1:10 без прогревания. Количество негативных колоний определяли в 1,0 см³ методом агаровых слоёв.

Чувствительность бактериофагов к хлороформу. Проводят обработку фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании с последующим изучением литической активности исходных и обработанных фагов методом агаровых слоев [59].

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена аспирантом в период с 2022 года по 2025 год на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Основные данные исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Основные данные исследования

Количество телят (гол.)	369
Количество образцов носоглоточной слизи (шт.)	369
Количество образцов сточных вод (шт.)	50
Доля (%) грамотрицательных изолированных микробов	68,3
Доля (%) грамположительных изолированных микробов	31,7
Исследовано биохимических свойств микроорганизмов (шт.)	229
Количество исследованных микроорганизмов (шт.), в том числе:	

<i>Proteus mirabilis</i>	39
<i>Proteus vulgaris</i>	26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Moraxella bovoculi</i>	6
<i>Mannheimia haemolytica</i>	3
Определена чувствительность к АМП (шт.)	229
Количество биопроб (шт.)	15
Оценка биоплёнкообразования <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Оценка способности коллоидного серебра к ингибированию биоплёнки <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Оценка способности бактериофага к ингибированию биоплёнки <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Оценка способности комплекса бактериофагов с коллоидным серебром к ингибированию биоплёнки <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15

В рамках выполнения диссертационных исследований проведён мониторинг эпизоотического состояния двух животноводческих комплексов Ленинградской области по содержанию крупного рогатого скота согласно Закону РФ от 14.05.1993 N 4979-1 (ред. от 28.12.2024) "О ветеринарии". В работе использован комплексный эпизоотологический подход (по В.П. Урбану). Провели общий и санитарный осмотр объектов, также изучили документацию ветеринарного учёта, руководствуясь Едиными ветеринарными (ветеринарно-санитарными) требованиями, предъявляемые к объектам, подлежащим

ветеринарному контролю (надзору), утверждённые Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 г. №27. Доминирующие нозологические единицы оценивали путём построения диаграмм Парето.

При взятии и подготовке для исследований образцов сточных вод и носоглоточной слизи телят соблюдали меры, предупреждающие контаминацию возбудителями объектов внешней среды.

Отбор биологического материала. Образцы носоглоточной слизи отбирали от телят йоркширской породы (n=369) в возрасте от 1 до 3 месяцев, содержащихся в животноводческих хозяйствах Ленинградской области. Один раз в квартал проводили комплексное обследование телят в возрасте 1 – 3 месяца по следующим параметрам: наличие выделения из носовых отверстий, активность, аппетит, кашель, одышка, ректальная температура тела. На основании полученных результатов формировали по две опытные группы животных: 1- больные бронхопневмонией, 2 – (контроль) клинически здоровые телята. Диагноз «бронхопневмония» был поставлен комплексно на основании результатов клинического обследования и анализа спектра выделенных микроорганизмов.

Все животные находились под постоянным наблюдением в течение 7 дней. Помимо этого, у телят из группы контроля в 1 день, а у больных животных в 1 и 3 дни были отобраны пробы носоглоточной слизи. Животные каждой группы содержались изолировано друг от друга. Отбор материала проводили при помощи стерильного тупфера и помещали в транспортную систему со средой Кэри-Блэйра (ООО «ПОЛИГЕМ», ТУ 20.59.52-004-18847814-2021). Тупфер вводили вращательными движениями в носоглотку по нижнему носовому ходу поочередно в обе ноздри. Крылья носа прижимали к тупферу и носовой перегородке для более плотного контакта со слизистой оболочкой (МУ 4.2.2039—05 Техника сбора и транспортирования биоматериалов в

микробиологические лаборатории). Материал транспортировали не более 3 часов с момента отбора (рис.3,4).



Рисунок 3 – Образец биологического материала (носоглоточной слизи) после отбора в транспортную систему со средой Кэри-Блэйра



Рисунок 4 – Телёнок йоркширской породы (1 мес.) с признаками поражения респираторной системы до отбора биологического материала (носоглоточной слизи)

Для выделения чистых культур микроорганизмов из образцов носоглоточной слизи (n=369) проводили посев биоматериала на дифференциально-диагностические питательные среды.

Обнаружение различных штаммов микроорганизмов осуществляли на желточно-солевом агаре на основе ГМФ-агара (ФГБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агаре МакКонки (HiMedia Labs), ГРМ-агаре (ФГБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной (ФГБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), кровяной 5% агар, ГРМ-бульон(ФГБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для дифференциации микроорганизмов по их способности ферментировать

различные углеводы использовали (10мм, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). С целью проверки наличия цитохромоксидазы применили коммерческий набор дисков для тестирования на оксидазную активность (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия), каталазы – 3% раствор «Водород перидоксида» (Тульская фармацевтическая фабрика). Продукцию индола оценивали с помощью реактива Ковача (НИЦФ), внося на поверхность МПБ с суточной культурой 0,1 мл реактива. С целью определения наличия желатиназы изолированную колонию пересеяли бактериологической иглой с ГРМ-агара на МПЖ и инкубировали при 25°C 24 часа. Для постановки теста на орнитиндекарбоксилазу воспользовались набором «Микро-ОРНИТИН-НИЦФ для определения бактериальной орнитиндекарбоксилазной активности». Наличие лецитиназы оценивали путём посева изолированной колонии на желточный агар. Тест на утилизацию цитрата провели на среде «№ 13 цитратный агар Симмонса» (Оболенск). Способность утилизировать карбогидрата экулина оценили с применением желчно-эскулинового агара (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Для выполнения дифференциального теста на наличие фермента β-галактозидазы был взят набор реагентов «Микро-ГАЛАКТОЗИДАЗА-НИЦФ». Тест на продукцию лизиндекарбоксилазы провели на среде Мюллера (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). С целью биохимической дифференциации по способности расщеплять фенолфталеинфосфат применили набор реагентов «Микро-ФОСФАТАЗА-Ф-НИЦФ» с фенолфталеин-фосфатом. Заключительную типизацию провели с помощью MALDI-TOF (настоельного времяпролетного масспектрометра с лазерной десорбцией).

Гипермукоидность изолятов *Klebsiella pneumoniae* (n=11) определяли при постановке string-теста по методике, описанной Y. Hadano (Y. Hadano, 2013). Через 24 ч инкубирования изолированную колонию, выращенную на МПА, снимали стерильной бактериологической петлёй, после чего вертикально

тянули, при этом за петлёй тянулась слизеподобная нить, длину которой измеряли в мм (Kumabe et al.,2014) [177].

Проведение микробиологического исследования проводилось с применением коллекционных штаммов микроорганизмов для оценки качества питательных сред согласно Правилам создания, пополнения, ведения и использования коллекций патогенных микроорганизмов и вирусов от 30 сентября 2021 года N 1668 (табл.4).

Таблица 4 – Референсные микроорганизмы, используемые в исследовании

Референс-штамм	Коллекция
<i>Escherichia coli</i> K-12 B-73	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)
<i>Escherichia coli</i> 18 B-7794	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)
<i>Proteus vulgaris</i> HX 19 222	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск)

Первичный посев осуществляли стерильным тупфером на поверхность плотных питательных сред дробным методом. Изначально материал штрихом наносили на первый сектор чашки Петри с питательной, затем параллельными штрихами распределяли по оставшимся секторам. С целью обнаружения *Clostridium spp.* проводили глубинный посев в питательные среды. Инкубировали при 37,0°C ±0,5°C в охлаждающем термостате (диапазон температур –10 °C до +100 °C). Учёт результатов проводили через 18, 24 и 48 ч визуально. Пересев характерных колоний осуществляли стерильной

бактериологической петлёй на поверхность плотных и жидких питательных сред. Характерные колонии пересеивали на МПА и окрашивали по Граму (HiMedia K001-1КТ), по Ожешки (НИЦФ 021211 Микро-ОЖЕШКИ-НИЦФ для окраски спор по методу Ожешки) и метиленовым синим на наличие биполярности.

Окрашивание фиксированных в пламени спиртовой горелки микропрепаратов чистых культур микроорганизмов по Граму проводили согласно инструкции HiMedia K001-1КТ:

1. На фиксированный микропрепарат наносили кристаллвиолет ($C_{25}H_{30}N_3Cl$) на 1 мин
2. Смывали остатки первого красителя дистиллированной водой
3. Наносили йодный раствор на 1 мин
4. Смывали остатки йодного раствора дистиллированной водой
5. Обесцвечивали микропрепарат специализированным раствором (этиловый 95% спирт и 2-пропанон 1:1)
6. Споласкивали микропрепарат дистиллированной водой до исчезновения видимого фиолетового окрашивания
7. Наносили 0,5% раствор сафранина (3,6-диамино-2,7-диметил-10-фенилфеназинхлоргидрат) на 1 мин
8. Промывали окрашенный микропрепарат дистиллированной водой

Окрашивание микропрепаратов чистых культур микроорганизмов по методу Ожешки согласно инструкции НИЦФ 021211 Микро-ОЖЕШКИ-НИЦФ:

1. На нефиксированный нативный микропрепарат наносили 0,5 мл 0,5% раствор HCl (соляная кислота)
2. Нагревали препарат в пламени спиртовой горелки до появления паров
3. Высушили препарат на воздухе (температура $25^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$)
4. Зафиксировали микропрепарат в пламени спиртовой горелки

5. На фиксированный препарат пинцетом поместили полоску фильтровальной бумаги (3см×2см)
6. На поверхность фильтровальной бумаги пипетировали 1,0 мл раствор фуксина основного карболового (парафуксин, $C_{20}H_{20}N_3Cl$)
7. Нагрели препарат в пламени горелки до появления паров
8. Выдержали препарат при температуре $25^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ 5 мин
9. Промыли стекло с препаратом дистиллированной водой
10. Пипетировали на микропрепарат 0,5 мл 7,0 % раствора H_2SO_4 (серная кислота) на 3 мин
11. В наклонном положении промывали стекло с препаратом дистиллированной водой
12. Заливали поверхность микропрепарата метиленовым синим по Лёффлеру (3,7-бисдиметиламинофенотиазин хлорид) на 2 мин
13. Промывали микропрепарат дистиллированной водой

Оценку биологических характеристик изолированных из носоглоточной слизи телят микроорганизмов проводили с применением коммерческих питательных сред и диагностических наборов.

Наличие каталазной активности оценивали при помощи теста на каталазу на предметном стекле. На чистое, обезжиренное 96% этиловым спиртом, предметное стекло нанесли 0,5 мкл 3,0% раствора перекиси водорода, в котором эмульгировали суточную культуру микроорганизма. Учёт реакции проводили через 3 с.

Оксидазную активность оценивали при помощи оксидазных дисков, пропитанных раствором оксалатом N,N-диметил-пара-фенилендиамина, аскорбиновой кислотой и альфа-нафтолом (DD018, Himedia Labs). На поверхность оксидазного диска наносили бактериологической петлёй суточную культуру микроорганизма. Учёт проводили визуально через 5 с.

С целью оценки ферментации микроорганизмами специфического углевода были применены диски с углеводами (HiMedia Labs): адонит, арабиноза, целлобиоза, глюкоза, дульцит, галактоза, фруктоза, ксилоза, рамноза, сорбит, сахароза, трегалоза, ксилоза. Диск с углеводом помещали в стерильный МПБ куда так же вносили феноловый красный для оценки кислотообразования. Для регистрации газообразования в МПБ помещали пробирку-поплавок Уленгута. Затем в МПБ проводили посев исследуемого микроорганизма и инкубировали 24 ч при $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Для биохимической идентификации изолированных из носоглоточной слизи микроорганизмов применили набор для биохимической идентификации HiMedia KB003R-20КТ. Данная тест-система включает в себя следующие панели: β -галактозидазная активность (ОНПГ), наличие декарбоксилаз лизина и орнитина, уреазная активность, дезаминирование фенилаланина, редукция нитратов, выделение сероводорода, использование цитрата, реакция Фогеса-Проскауэра на ацетоин, с метиловым красным, выделение индола в результате дезаминирования триптофана, утилизация малоната.

Вирулентность выделенных культур определяли постановкой биопробы на белых мышах путём интраназального введения смыва суточной агаровой культуры в дозе 20 мкл. Заражённых мышей осматривали ежедневно, обращая внимание на наличие павших мышей, состояние шерсти, наличие хрипов, активность, аппетит. У павших мышей отбирали кровь из сердца и ткань лёгких с последующим посевом на питательные среды.

Оценку биоплёнкообразования у *Klebsiella pneumoniae* провели при помощи спектрофотометрического метода с использованием кристаллического фиолетового (Crystal Violet Assay) по методике, предложенной O'Toole [216]. Измерения проводили на спектрофотометре КФК-3-01 при длине волны 570 нм:

1. Пересеяли чистую культуру возбудителя с ПЖА в 1,5 мл МПБ и инкубировали 24 ч при $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в пробирке типа «Эппендорф»

2. Пересеяли 100 мкл чистой культуры возбудителя с МПБ в 1,5 мл МПБ и инкубировали 24 ч при $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

3. После инкубации аккуратно перелили культуральную жидкость в другую пробирку, чтобы не повредить биоплёнку

4. Трижды промыли внутреннюю поверхность пробирки типа «Эппендорф», в которой проводили культивирование возбудителя, 1,0 мл физиологического раствора (0,9% NaCl), чтобы удалить свободные клетки. Клетки, которые подвергаются гибели, теряют адгезию и впоследствии исчезают из популяции клеток, что приводит к уменьшению количества кристаллического фиолетового в культуре.

5. Внесли 2,0 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{Cl}$) в пробирку после промывки и инкубировать при $25,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут

6. Удалили раствор кристаллического фиолетового и трижды промыли 1,0 мл дистиллированной воды

7. Внесли в пробирку 2,0 мл 95% этанола и инкубировали при $25,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут

8. 1,0 мл раствора перенесли в кювету для спектрофотометрии и измерили оптическую плотность при длине волны 570 нм на спектрофотометре КФК-3-01

Полученные значения оценивали согласно шкале:

- Слабое образование биоплёнки: $\text{OD}_{570} \approx 0,1-0,3$

- Умеренное образование биоплёнки: $\text{OD}_{570} \approx 0,3-0,6$

- Сильное образование биоплёнки: $\text{OD}_{570} \approx 0,6-1,0$

При оценке чувствительности возбудителей бронхопневмонии, изолированных из носоглоточной слизи телят придерживались МУ 3.1.4110-24 «Профилактика инфекционных болезней. Безопасная техника выполнения микробиологических работ с патогенными биологическими агентами. Методические указания», утверждены Главным государственным санитарным

врачом РФ 25.12.2024, «Диско-диффузионный метод EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01) (рис.5). Учитывали наличие данных о природной чувствительности отдельных видов микроорганизмов, поскольку целесообразно включать антибиотики, обладающие в отношении выделенных микроорганизмов природной активностью и клинически подтверждённой эффективностью.



Рисунок 5 – Диски с антибиотиками (ООО «НИЦФ»), которые применили в исследовании

При определении чувствительности к АМП применили контрольные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* К-12 В-73, *Escherichia coli* 18 В-7794, *Proteus vulgaris* НХ 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853, *Klebsiella pneumoniae* sp.АТСС 13883, *Proteus mirabilis* АТСС 12453, *Mannheimia haemolytica* №29696.

Выделение бактериофагов осуществляли из сточных вод животноводческих комплексов (n=50). После отбора образцов, в которых предположительно есть бактериофаг, необходимо должным образом провести пробоподготовку, после чего приступить к последующим этапам выделения вируса (Рис.6).

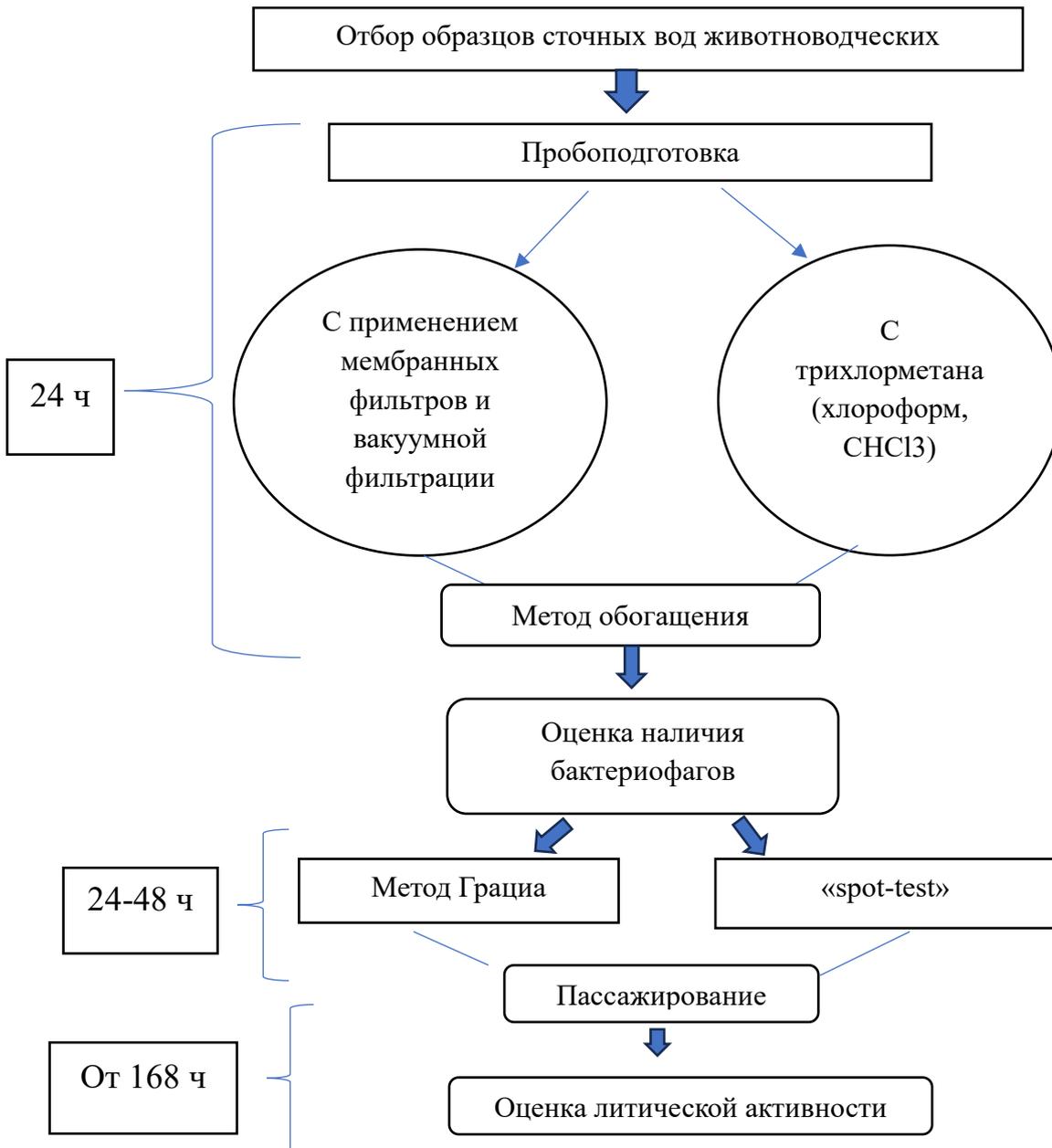


Рисунок 6 – Схема выделения бактериофагов

При подготовке проб объектов окружающей среды, к которым относят в том числе сточные воды, к изолированию фагов, наиболее привлекательным представляется классический метод микробного обогащения, разработанный С.Виноградским и М. Бейеринком (Виноградский С.Н., 1891). Данный метод можно модифицировать для обогащения вирусов, при исследовании воды, сточных вод и почвы.

В ходе проведённой работы применили несколько модификаций: 1. С применением мембранных фильтров и вакуумной фильтрации; 2. С применением трихлорметана (хлороформ, CHCl_3).

Экстракцию и элюирование бактериофагов из образцов сточных вод, с применением мембранной вакуумной фильтрации, проводили следующим образом:

1. Образцы сточных вод пропускали через мембранные фильтры 0,45 мкм (Microfilm, США), помещённые на фестонах воронок, закреплённых на колбе Бунзена.

2. Пермеат переливали в пробирки тип Фалькон 50 мл (Accumax Lab Devices Pvt Ltd, India) и центрифугировали $5000 \times g$ в течение 30 мин при 20°C (рис.13)

3. Надосадочную жидкость фильтровали с применением стерильных шприцевых фильтров 0,22 мкм (Ks-Tek, China)

Экстракцию и элюирование бактериофагов из образцов сточных вод, с применением трихлорметана (хлороформ, CHCl_3), проводили следующим образом:

1. Образцы сточных вод пропускали через стерильные ватно-марлевые фильтры (1 фильтр на каждые 10,0 мл образца), закреплённые на стеклянной лабораторной воронке.

2. Пермеат переливали в конические стерильные центрифужные пробирки на 15 мл (Lifesciences, Южная Корея) и центрифугировали $5000 \times g$ в течение 30 мин при 20°C .

3. Надосадочную жидкость аликвотировали в стерильную лабораторную пробирку посредством одноканального дозатора.

С целью увеличения количества бактериофагов и получения ярко выраженных негативных колоний при оценке литической активности проводили пассажирование выделенного вируса (рис. 7) (Kutter, E., 2005).

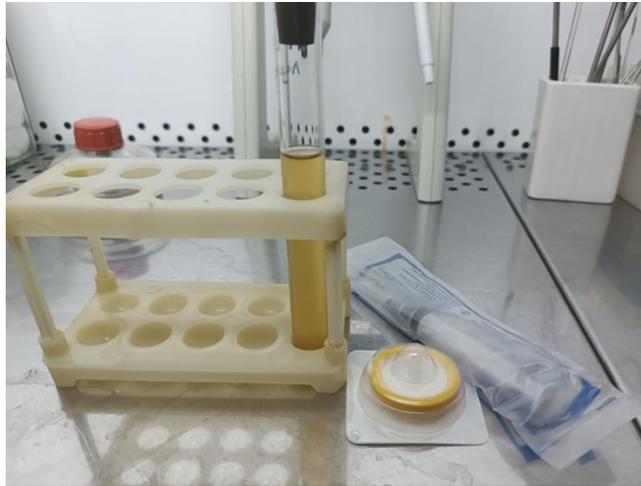


Рисунок 7 – Подготовка к пассажированию бактериофагов

Метод накопления. В флакон с ГРМ-бульоном (200мл) вносили 10 мл фильтрата и суточную бульонную бактериальную культуру *Klebsiella pneumoniae* (0,3 мл) и инкубировали при 37 °С, периодически перемешивая. После инкубирования 10 мл МПА посредством одноканального дозатора переносили в пробирки 15 мл (Lifesciences, Южная Корея). Добавили трихлорметан (хлороформ, CHCl_3) в количестве 0,5 мл (5% от объема) и перемешали круговыми движениями между ладоней. Центрифугировали смесь при 5,000 x g в течение 10 минут, чтобы отделить фазы. Верхняя фаза будет содержать бактериофаги. Верхнюю фазу фильтровали через стерильный шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Ks-Tek, China).

Оценка наличия фагов проводилась идентично, а именно с применением метода Грациа (агаровых слоёв) и метода «spot-test».

Метод Грациа (агаровых слоёв) для оценки вероятного наличия бактериофагов в образцах (A. Gratia, 1936):

1. В стерильные стеклянные чашки Петри (диаметр 90 мм) наливали расплавленный и охлаждённый до 45 °С $\pm 0,5^\circ\text{C}$ МПА. Оставляли чашки Петри с агаром на 15 мин в стерильном ламинарном шкафу для застывания.

2. Расплавляли и остужали до $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ПЖА и разливали в стерильные пробирки по 4 мл.
3. В остуженный ПЖА вносили 100 мкл фильтрата и 100 мкл суточной бульонной культуры *Klebsiella pneumoniae*, применяя одноканальный дозатор со сменным наконечником. Параллельно подготавливали контрольную пробу с фильтратом без чистой культуры микроорганизма и с чистой культурой *Klebsiella pneumoniae* без внесения фильтрата.
4. Содержимое пробирок тщательно примешивали и наносили вторым слоем на ранее подготовленный МПА в чашках Петри.
5. Оставляли чашки Петри для застывания верхнего слоя агара в стерильном ламинарном шкафу в условиях отсутствия УФ на 15 мин.
6. Инкубировали чашки Петри вверх дном при $37,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18-24 ч. По истечении времени инкубирования проводили визуальную оценку на наличие негативных колоний бактериофага.

Метод «spot-test» для оценки вероятного наличия бактериофагов в образцах (M. F. D'Herelle, 1961) [251]:

1. В стерильные чашки Петри из нейтрального прозрачного полистирола (диаметр 90 мм) наливали расплавленный и охлаждённый до $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ МПА. Оставляли чашки Петри с агаром на 15 мин в стерильном ламинарном шкафу для застывания.
2. Расплавляли и остужали до $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ПЖА и разливали в стерильные пробирки по 3 мл.
3. В ПЖА вносили 100 мкл суточной бульонной культуры *Klebsiella pneumoniae* и тщательно перемешивали.
4. Полученную взвесь распределяли на поверхности МПА и оставляли в стерильном ламинарном шкафу до застывания верхнего слоя в условиях отсутствия УФ на 15 мин.

5. На поверхность застывшего ПЖА с культурой *Klebsiella pneumoniae* наносили 50 микролитров фильтрата, в котором предположительно можно обнаружить бактериофагов.

6. Инкубировали чашки Петри вверх дном при $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18-24 ч. По истечении времени инкубирования проводили визуальную оценку на наличие зон лизиса.

С целью увеличения количества бактериофагов и получения ярко выраженных негативных колоний при оценке литической активности проводили пассажирование выделенного вируса (Kutter, E., 2005):

1. Фламбированной раскалённой в пламени спиртовой горелки бактериологической петлёй прожигали слой агара вокруг негативных колоний, полученных при совместном культивировании индикаторного микроорганизма и фага в глубине ПЖА (метод Грация и «spot-test»).

2. Изолированный образец агара с негативной колонией посредством бактериологической петли перенесли в пробирку с МПА и суспендировали. Затем внесли суточную культуру *Klebsiella pneumoniae*.

3. Инкубировали при $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 ч, перемешивая каждые 6 ч.

4. По истечении указанного времени очищали бактериофаг от бактерий путём пропускания через стерильный шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Ks-Tek, China).

5. 1 мл фильтрата вносили в пробирку с МПБ. В эту же пробирку пересеивали суточную культуру *Klebsiella pneumoniae*.

6. Инкубировали при $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 ч, перемешивая каждые 6 ч.

7. Повторяли пункты 4 – 5 минимум 7 раз подряд, после чего оценивали литическую активность методом Грация, «spot-test» и методом Аппельмана.

В качестве тест-штамма на данном этапе исследования взяли *Klebsiella pneumoniae* sp.ATCC 13883 и сравнивали с *Klebsiella pneumoniae* (n=3),

выделенных из носоглоточной слизи телят животноводческих комплексов Ленинградской области.

Не зависимо от метода подготовки образцов (с применением мембранной фильтрации или трихлорметана)

С целью оценки литической активности коммерческих и выделенных из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатов применили общепринятые методы: метод Грация (агаровых слоёв), «spot-test» и метод Аппельмана. При оценке литической активности применили контрольные штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* К-12 В-73, *Escherichia coli* 18 В-7794, *Proteus vulgaris* НХ 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Mannheimia haemolytica* №29696.

Коммерческие препараты бактериофагов были выбраны исходя из спектра изолированных от телят с клиническими признаками бронхопневмонии возбудителей (табл.5).

Таблица 5 - Коммерческие препараты бактериофагов, взятые для исследования

Наименование препарата	Производитель	Специфическая направленность	Форма выпуска
Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный) (<i>Bacteriophage Pseudomonas aeruginosa fluid</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения

Клебсифаг (<i>Klebsiphage</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (<i>Pyobacteriophage polyvalent purified</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)	<i>Staphylococcus sp p.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения

Для оценки литической активности коммерческих и выделенных из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатов применили метод Грациа (агаровых слоёв) («ОФС.1.7.1.0002.15. Общая фармакопейная статья. Бактериофаги»).

Для оценки литической активности коммерческих и выделенных из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатов применили метод «spot-test» (M. F. D'Herelle, 1961).

Для оценки литической активности коммерческих и выделенных из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатов применили метод Алпельмана (J. Appelman, 1921, M. Delbrück, 1940).

Ингаляции инфицированных *Klebsiella pneumoniae* лабораторных мышей проводили коммерческими и выделенными из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатами. Перед исследованием все лабораторные животные были подвергнуты профилактическому карантинированию и клиническому

осмотру. При работе с животными соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и «Правила надлежащей лабораторной практики» (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 года N 199н).

Условия содержания лабораторных мышей соответствуют требованиям СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и ГОСТу 33216-2014. Помещение вивария оборудовано системами хозяйственно-питьевого, горячего водоснабжения и канализацией. Помещениям, предназначенным для содержания лабораторных мышей, присвоен номер и наименование. Доступ в помещения для содержания животных ограничивается определенным кругом лиц, закрепленных за данными помещениями. Дезинфекция боксов и клеток, в которых содержатся животные, проводится при каждом перемещении животных. Ведутся журналы, в которых фиксируется дезинфекция помещений вивария, дезинфекция оборудования и клеток, количество животных, термометрические данные лабораторных животных, расход кормов и воды. В помещениях по содержанию мышей температура воздуха обеспечивается в пределах $20^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Относительная влажность в помещениях для содержания мышей поддерживается в диапазоне от 55% до 60%. Устройство вентиляции исключает перетекание воздушных масс из "грязных" помещений в "чистые". С целью снижения уровня ультразвука, к которому чувствительны мыши, во всех помещениях исключено нахождение электронно-вычислительных машин (ЭВМ).

Мышей разделяли на три группы при оценке эффективности каждого препарата или фаголизата (1- животные, подвергшиеся заражению и проходящие курс ингаляции бактериофага (n=3), 2- животные, подвергшиеся заражению и не проходившие терапию (n=3), 3- контрольная группа животных,

не подвергшихся заражению (n=3)). Животные второй группы содержались в боксе для заражённых животных №1, первой – в боксе для заражённых животных №2, третьей – в виварии.

При оценке эффективности ингаляционной фаготерапии на мышинной модели применили ряд коммерческих препаратов, которые проявили значительную литическую активность *in vitro* (табл.6).

Таблица 6 - Коммерческие препараты бактериофагов (НПО МИКРОГЕН, АО (Россия)), взятые для оценки ингаляционной фаготерапии при экспериментальном заражении лабораторных мышей *Klebsiella pneumoniae*, изолированной из носоглоточной слизи телят животноводческих комплексов.

Наименование препарата	Специфическая направленность	Форма выпуска
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения

Ингаляции проводили с применением компрессорного четырехрежимного ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия). Использовали распылитель «Рапидфлаем 2» в режиме I (размер частиц 0,8-2,0 µm). После каждой

ингаляции распылитель подвергали дезинфекции, промывке и просушке при температуре 25 °С (рис. 8,9,10).



Рисунок 8 – Подготовка ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия) к ингаляции бактериофагом

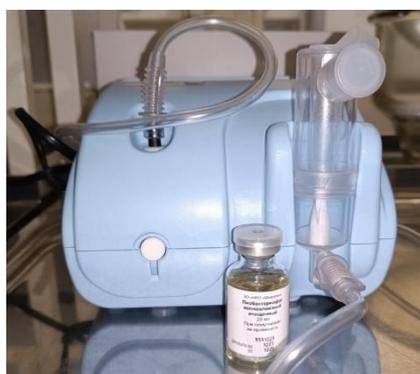


Рисунок 9 – Подготовка ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия) к ингаляции бактериофагом



Рисунок 10 – Распылитель «Рапидфлаем 2» с внесённым бактериофагом

Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Мониторинг эпизоотологического состояния животноводческих комплексов

В рамках выполнения диссертационного исследования проведён профилактический мониторинг эпизоотического состояния двух животноводческих комплексов Ленинградской области по содержанию крупного рогатого скота. Провели профилактический эпизоотологический осмотр объектов, изучили документацию ветеринарного учёта. Нами собраны данные о животноводческих комплексах за 2015 – 2024 годы согласно производственно-финансовому плану. Нозологические единицы оценили путём построения диаграммы Парето (рис.11).



Рисунок 11 – Структура болезней телят

Хозяйства специализируются на разведении молочного крупного рогатого скота, производстве сырого молока (ОКВЭД 01.41). Кормовая база включает в себя собственно выращенные травостои (люцерну, красный клевер, козлятник восточный, лядвенец рогатый, эспарцет) и закупаемый фураж (овёс, пшеница, рожь, кукуруза, горох, чина). Численность поголовья в первом

животноводческом комплексе составляет 800 голов, во втором – 1618 голов. Тип содержания привязный (первое хозяйство) и беспривязный (второе хозяйство). Порода крупного рогатого скота голштинская. Система содержания животных поточно-цеховая.

Величина санитарных разрывов в исследуемых животноводческих комплексах соответствует СНиП II-97-76 «Генеральные планы сельскохозяйственных предприятий». При въезде на территорию комплексов расположен пункт санитарного пропуска. Для обработки колёс транспортных средств въезд оборудован бетонной для дезинфекции ванной. Температура в помещениях, где содержатся животные составляет $15^{\circ}\text{C}\pm 1,5^{\circ}\text{C}$, влажность – $65\%\pm 5\%$, что соответствует приказу Минсельхоза России от 13.12.2016 №551. Максимальное количество животных в пределах одной секции – 10 телят (1,5–2 кв. м на одно животное). Поение животных осуществляется из индивидуальных поилок с постоянной подачей к ним воды. Животноводческие комплексы оборудованы водопроводной сетью. Новорожденным телятам выпаивают первую порцию молозива не позднее 30 мин после рождения. Навозохранилища размещены с подветренной стороны на расстоянии не менее 60,0 м от животноводческих помещений. Доильный зал оборудован автоматической системой доения «Карусель» на 60 голов.

Согласно плану профилактических противоэпизоотических мероприятий, в исследуемых хозяйствах проводят плановые вакцинации поголовья комбинированной вакциной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи, что позволяет исключить вирусную этиологию бронхопневмонии в исследуемых животноводческих комплексах. Дератизацию и дезинсекцию проводят планоно, наличие грызунов и эктопаразитов не зарегистрировано, однако в хозяйстве №1 отмечены нарушения герметичности в зоне крыши, что объясняет появление птиц в комплексе.

Соблюдение норм микроклимата исключает неспецифическую бронхопневмонию. Среди телят в исследуемых комплексах у 15-20% зарегистрирована бронхопневмония, инфекционная этиология которой подтверждена дальнейшими исследованиями.

Результаты эпизоотологического обследования выявили наличие телят с бронхопневмонией. Вирусная этиология исключена исходя из наличия плановых профилактических мероприятий. Подтверждена роль содержания, кормления и соблюдения санитарных норм в развитие болезней дыхательной системы в животноводческих комплексах.

2.2.2 Спектр возбудителей бронхопневмонии телят в животноводческих комплексах

Было установлено, что патология вызвана ассоциацией возбудителей, а у больных имеет место угнетение, вялость, снижение аппетита, одышка, кашель, слизисто-гнойные выделения из носовых ходов.

В результате микробиологического исследования носоглоточной слизи были выделены и типизированы микроорганизмы, которые представлены в таблице 7, из данных которой видно, что верхние дыхательные пути у здоровых телят не являются стерильными, однако микробиота у здоровых и больных животных различна.

Таблица – 7 Видовой состав микроорганизмов выделенных их носоглоточной слизи здоровых и больных телят

Наименование изолята	Количество животных
<i>Proteus mirabilis</i>	39
<i>Proteus vulgaris</i>	26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12

<i>Staphylococcus xylosus</i>	77
<i>Staphylococcus lentus</i>	2
<i>Comamonas kerstersii</i>	29
<i>Escherichia coli</i>	103
<i>Moraxella bovoculi</i>	6
<i>Aerococcus viridans</i>	70
<i>Corynebacterium casei</i>	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15
<i>Comamonas jiangduensis</i>	2
<i>Mannheimia haemolytica</i>	3
<i>Clostridium sp.</i>	9
<i>Staphylococcus equorum</i>	36
<i>Bacillus licheniformis</i>	37

При этом, видно, что локальный биоценоз у этих животных включает в себя представители комменсальной микрофлоры открытых полостей и бактерии, циркулирующие в окружающей среде (воздух). К числу первых относятся *Aerococcus viridians*, *Corynebacterium casei* и *Bacillus licheniformis*, хотя имеются сведения об участии их в возникновении патологий у человека и животных или осложняют течение респираторных заболеваний. У больных животных исходя из данных таблицы 6 среди возбудителей грамотрицательные микробы достигают 68,3%, грамположительные – 31,7%.

У больных пневмонией выявлена принципиально иная микробиота носоглоточной слизи (табл.7), сравнительная структура которой более наглядно представлена на Рисунке 11.

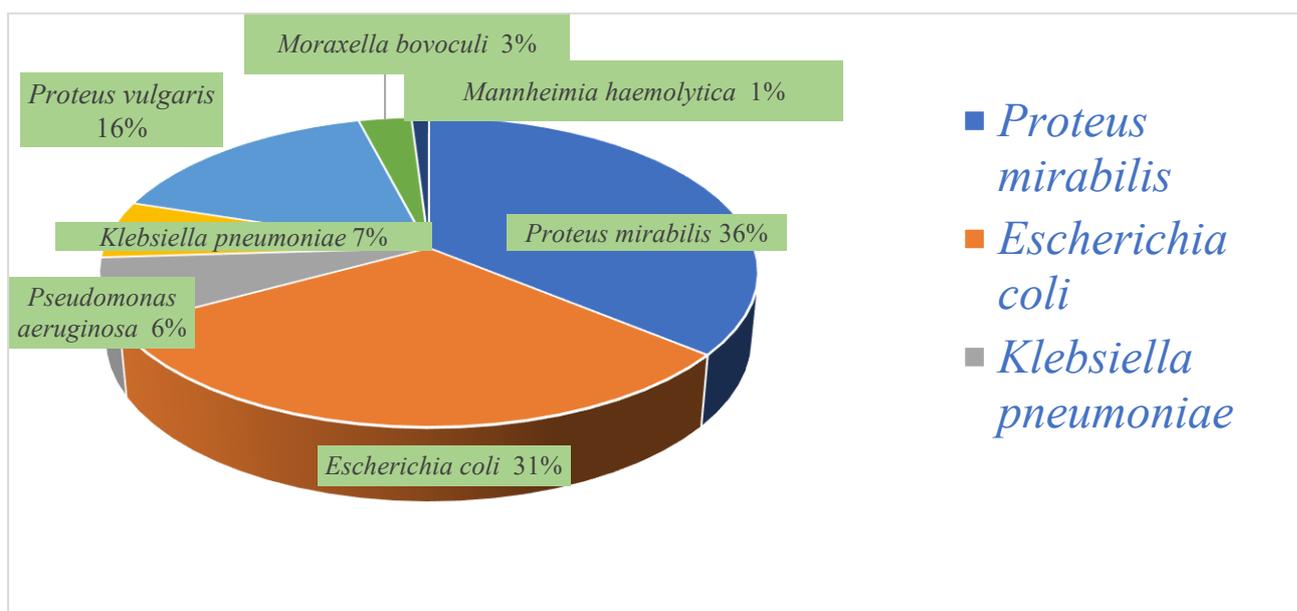


Рисунок 12 – Соотношение изолятов, выделенных из носоглоточной слизи телят (%)

На рисунке 12 показано процентное соотношение изолятов выделенных исключительно от телят с бронхопневмонией. Все представленные изоляты являются грамотрицательными.

2.2.3 Анализ биологических свойств изолированных микроорганизмов

Среди изолированных возбудителей бронхопневмонии крупного рогатого скота наибольший интерес представляют следующие микробы: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Moraxella bovoculi*. Биологические характеристики данных возбудителей были детально проанализированы и представлены в таблицах (табл. 8,9).

Изучение биохимического профиля изолятов позволило не только провести идентификацию изолятов, но и оценить неоднородность видовых популяций возбудителей бронхопневмонии. Все выделенные в ходе исследования изоляты характеризовались однородностью популяции за исключением *Klebsiella pneumoniae* (hvKp –hypervirulent *K. pneumoniae*) 25% изолятов которой проявили гипермукоидный фенотип. Гипермукоидность оценивали string-тестом, в ходе которого чистая культура образовывала тянущуюся за бактериологической петлёй необращающуюся нить длиной $6,3 \pm 0,2$ мм.

При интраназальном заражении *Escherichia coli* для оценки вирулентности зарегистрировали гибель 45,5% мышей, *Pseudomonas aeruginosa* – 81,8%, *Mannheimia haemolytica* – 36,4%, *Moraxella bovoculi* – 54,5%, *Proteus vulgaris* – 63,6%, *Proteus mirabilis* – 72,7%, *Klebsiella pneumoniae* – 100%.

Для оценки вирулентности *Klebsiella pneumoniae* применили интраназальное инфицирование белых мышей (n=11) смывом суточной агаровой культуры. LD50 составило 10^3 КОЕ, что указывает на вирулентность.

Выделенные за период написания диссертационной работы бактерии идентифицировали до вида по совокупности типичных биохимических реакций при этом наблюдали соответствие с Определителем бактерий Берджи, 1997 (ОББ).

2.2.4 Оценка биоплёнкообразования возбудителей бронхопневмонии телят

Результаты оценки наличия биоплёнки у изолированных возбудителей бронхопневмонии, в том числе у гипермукоидного изолята *Klebsiella pneumoniae* с использованием кристаллического фиолетового (Crystal Violet Assay) по методике, предложенной O'Toole демонстрируют различную частоту встречаемости тенденции к биоплёнкообразованию у выделенных из носоглоточной слизи телят возбудителей бронхопневмонии (табл. 10) [216].

Таблица 10 – Частота (%) выявления биоплёнки у возбудителей бронхопневмонии, выделенных из носоглоточной слизи молодняка крупного рогатого скота

Микроорганизм	Биоплёнкообразование (%)
<i>Escherichia coli</i>	61,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
<i>Proteus mirabilis</i>	75,4
<i>Proteus vulgaris</i>	68,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90,2
<i>Moraxella bovoculi</i>	100
<i>Mannheimia haemolytica</i>	48,4

По данным таблицы 10 видно, что наибольшая тенденция к образованию биоплёнки характерна для *Klebsiella pneumoniae* (100%) и *Moraxella bovoculi* (100%), при этом только 48,4% изолятов *Mannheimia haemolytica* проявили данную тенденцию.

Полученные результаты так же демонстрируют различную степень биоплёнкообразования, зависящую от времени культивирования и наличия ингибиторов (коллоидное серебро, бактериофаг) у гипермукоидного изолята *Klebsiella pneumoniae* (табл.11).

Таблица 11 – интенсивность биоплёнкообразования *Klebsiella pneumoniae* при различных условиях культивирования

Тестируемый образец	Время инкубирования (ч)	Значение OD	Интенсивность образования биоплёнки	Время инкубирования (ч)	Значение OD	Интенсивность образования биоплёнки
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	0,36±0,01*	умеренное	168	0,6±0,01*	сильное
<i>Klebsiella pneumoniae</i> +бактериофаг	24	0,07±0,01*	отсутствует	168	0,09±0,01*	отсутствует
<i>Klebsiella pneumoniae</i> +бактериофаг+ серебро	24	0,04±0,01*	отсутствует	168	0,06±0,01*	отсутствует

*достоверность $P1 \leq 0,05$

По данным, приведённым в таблице 11 видно, что без внесения ингибиторов *Klebsiella pneumoniae* проявляет тенденцию к биоплёнкообразованию уже через 24 часа инкубирования ($0,36 \pm 0,01$ OD), которая достигает пика ($0,6 \pm 0,01$ OD) на седьмые сутки инкубирования. При внесении бактериофага тенденция к образованию биоплёнки снижена на 81%, при комплекса бактериофага с коллоидным серебром на 89%.

Исследование так же продемонстрировало эффективность бактериофагов для снижения образования биоплёнок. Бактериофаг вносили в количестве 100 мкл для совместного культивирования с *Klebsiella pneumoniae*, однако наилучшие результаты получены при применении комплекса бактериофага с коллоидным серебром (интенсивность $< 0,07$).

Нами продемонстрировано снижение тенденции к образованию биоплёнок и других возбудителей бронхопневмонии при внесении коллоидного серебра (табл.12). 100 мкл серебра вносили одноканальным дозатором через 48 ч

инкубирования чистой культуры возбудителя, после чего продолжали инкубирование ещё 24 ч.

Таблица 12 – интенсивность биоплёнкообразования микроорганизмов, изолированных от телят с признаками бронхопневмонии до внесения коллоидного серебра и после внесения коллоидного серебра

Микроорганизм	Время инкубирования (ч)	Значение OD без внесения серебра	Значение OD при внесении серебра
<i>Escherichia coli</i>	72	0,46±0,03*	0,16±0,05*
<i>Proteus mirabilis</i>	72	0,71±0,09*	0,22±0,03*
<i>Proteus vulgaris</i>	72	0,65±0,01*	0,14±0,07*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72	0,54±0,05*	0,17±0,01*
<i>Moraxella bovoculi</i>	72	0,27±0,01*	0,08±0,03*
<i>Mannheimia haemolytica</i>	72	0,22±0,06*	0,01±0,01*

*достоверность $P1 \leq 0,05$

По данным таблицы 12 видно, что внесение коллоидного серебра снижает тенденцию к образованию биоплёнки до 53%, что говорит о возможности его применения для ингибирования роста биоплёнки возбудителей бронхопневмонии.

2.2.5 Результаты оценки чувствительности возбудителей бронхопневмонии телят к антибиотикам

В ходе проведённых исследований нами установлена чувствительность выделенных от телят животноводческих комплексов Ленинградской области возбудителей бронхопневмонии (табл.13–20) (рис.12). Результаты демонстрируют недостаточную эффективность проводимых лечебных мероприятий с применением антибактериальных препаратов, что связано с резистентностью ряда возбудителей бронхопневмонии.

Изоляты проявили различную чувствительность *in vitro*. Значительная доля изолятов *Escherichia coli* (n=67) проявила резистентность к амоксициллину

(R =100%), ампициллину (R =100%), цефтазидину (R =93,3%), цефтиофуру (R =86,7%), гентамицину (R =100%), офлоксацину (R =100%), левофлоксацину (R =90%), тетрациклину (R =100%) и оказались резистентны к бензилпенициллину (R=100%), немицину (R=100%) и доксициклину (R=100%).

Изоляты *Klebsiella pneumoniae* (n=15) проявили полирезистентность по отношению к АМП (R=100%): амоксициллину, ампициллину, цефтазидину, цефтиофуру, гентамицину, офлоксацину, левофлоксацину, тетрациклину бензилпенициллину и доксициклину.

Различную чувствительность продемонстрировали изоляты *Pseudomonas aeruginosa* (n=12). *Pseudomonas aeruginosa* оказалась резистентна (R=100%) к ампициллину и цефтазидину. Изоляты проявили резистентность так же к АМП: бензилпенициллин (R =90%), амоксициллину (R =100%), цефтиофуру (R =100%), гентамицину (R =100%), офлоксацину (R =100%) и левофлоксацину (R =100%).

Значительная часть изолятов *Proteus mirabilis* (n=39) оказалась резистентна к бензилпенициллину (R=100%), амоксициллину (R=86,7%), цефтазидину (R=100%), левофлоксацину (R=93,3%), доксициклину (R=100%) и тетрациклину (R=100%).

У изолятов *Proteus vulgaris* (n=26) отметили резистентность к бензилпенициллину (R=100%), цефтиофуру (R=80%), доксициклину (R=100%) и тетрациклину (R=100%).

Moraxella bovoculi (n=6) и *Mannheimia haemolytica* (n=3) продемонстрировали значительную (S =70,5–100%) чувствительность ко всем тестируемым АМП.

Таблица 13 – Результаты оценки чувствительности выделенных возбудителей бронхопневмонии телят диско-диффузионным методом к пеницилинам и цефалоспорином

Микроорганизм	Диаметр зоны подавления роста, мм	Чувствительность
Пенициллины		
Бензилпенициллин		
<i>Escherichia coli</i>	0	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,7±0,3	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	19,4±0,1	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	21,6±0,7	чувствителен
Амоксициллин		
<i>Escherichia coli</i>	13,9±0,2	чувствителен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	11,3±0,5	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,4±0,9	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	18,9±0,6	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	21,1±0,1	чувствителен
Ампициллин		
<i>Escherichia coli</i>	10,3±0,7	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	11,4±0,2	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	10,2±0,5	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,1±0,3	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	19,4±0,8	чувствителен
Цефалоспорины		
Цефтазидин		

<i>Escherichia coli</i>	13,2±0,6	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	16,4±0,2	чувствителен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	19,7±0,3	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	18,9±0,1	чувствителен
Цефтиофул		
<i>Escherichia coli</i>	11,8±0,2	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	17,3±0,2	чувствителен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,9±0,7	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,1±0,3	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	15,6±0,9	чувствителен

Исходя из данных Таблицы 13 можно отметить, что возбудители бронхопневмонии устойчивы к пеницилинам и цефалоспорином за исключением *Moraxella bovoculi* с *Mannheimia haemolytica*.

Таблица 14 – Результаты оценки чувствительности выделенных возбудителей бронхопневмонии телят диско-диффузионным методом к аминогликозидам и макролидам

Микроорганизм	Диаметр зоны подавления роста, мм	Чувствительность
Аминогликозиды		
Гентамицин		
<i>Escherichia coli</i>	12,0±0,5	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив

<i>Proteus mirabilis</i>	11,4±0,8	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	13,6±0,3	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,2±0,6	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	18,7±0,2	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	20,2±0,7	чувствителен
Макролиды		
Азитромицин		
<i>Escherichia coli</i>	0	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,6±0,1	чувствителен
<i>Moraxella bovoculi</i>	17,1±0,5	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	20,7±0,3	чувствителен
Эритромицин		
<i>Escherichia coli</i>	14,2±0,5	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,3±0,1	чувствителен

<i>Mannheimia haemolytica</i>	21,1±0,6	чувствителен
Тилозин		
<i>Escherichia coli</i>	12,4±0,7	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	19,9±0,7	чувствителен

По данным Таблицы 14 возбудители бронхопневмонии устойчивы к аминогликозидам и макролидам за исключением *Moraxella bovoculi*.

Таблица 15 – Результаты оценки чувствительности выделенных возбудителей бронхопневмонии телят диско-диффузионным методом к фторхинолонам, тетрациклинам, амфениколам и полипептидам

Микроорганизм	Диаметр зоны подавления роста, мм	Чувствительность
Фторхинолоны		
Офлоксацин		
<i>Escherichia coli</i>	15,8±0,2	чувствителен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	14,1±0,9	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	16,3±0,4	чувствителен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,8±0,2	чувствителен
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,6±0,4	чувствителен

<i>Mannheimia haemolytica</i>	21,1±0,7	чувствителен
Левофлоксацин		
<i>Escherichia coli</i>	18,3±0,6	чувствителен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	16,6±0,5	чувствителен
<i>Proteus vulgaris</i>	17,4±0,2	чувствителен
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,7±0,1	чувствителен
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,4±0,5	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	20,0±0,1	чувствителен
Тетрациклины		
Тетрациклин		
<i>Escherichia coli</i>	16,4±0,7	чувствителен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	20,3±0,7	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	16,7±0,2	чувствителен
Доксициклин		
<i>Escherichia coli</i>	0	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив

<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	19,4±0,2	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	17,1±0,8	чувствителен
Амфениколы		
Левомицетин		
<i>Escherichia coli</i>	11,3±0,5	устойчив
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	12,5±0,1	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	12,2±0,8	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	устойчив
<i>Moraxella bovoculi</i>	19,4±0,7	чувствителен
<i>Mannheimia haemolytica</i>	19,1±0,4	чувствителен
Полипептиды		
Полимиксин		
<i>Escherichia coli</i>	15,3±0,3	чувствителен
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	устойчив
<i>Proteus mirabilis</i>	0	устойчив
<i>Proteus vulgaris</i>	0	устойчив
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,8±0,7	чувствителен
<i>Moraxella bovoculi</i>	18,4±0,1	чувствителен

<i>Mannheimia haemolytica</i>	19,0±0,8	чувствителен
-------------------------------	----------	--------------

Результаты оценки чувствительности выделенных возбудителей бронхопневмонии телят диско-диффузионным методом к фторхинолонам, тетрациклинам, амфениколам и полипептидам, приведённые в Таблице 15, демонстрируют устойчивость *Klebsiella pneumoniae* ко всем перечисленным группам АМП.

Таблица 16 – Спектр чувствительности изолятов *Escherichia coli*

Антимикробный препарат	R	S
Бензилпенициллин	30/100	0
Амоксициллин	0	30/100
Ампициллин	0	30/100
Цефтазидин	28/93,3	2/6,7
Цефтиофур	26/96,7	4/13,3
Гентамицин	30/100	0
Азитромицин	н/д	н/д
Эритромицин	н/д	н/д
Офлоксацин	0	30/100
Левифлоксацин	27/90	3/10
Тетрациклин	0	30/100
Доксициклин	30/100	0
Левомецетин	н/д	н/д
Полимиксин	н/д	н/д

Примечание:

R – устойчивые микроорганизмы; S – чувствительные микроорганизмы; - в числителе абсолютное число чистых культур, - в знаменателе % от общего числа исследованных чистых культур; н.д. – нет данных согласно EUCAST

(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01)

Изоляты *Escherichia coli* проявили чувствительность к амоксициллину (100%), ампициллину (100%), цефтиофуру (13,3%) офлоксацину (100%), левофлоксацину (10%), тетрациклину (100%).

Таблица 17 – Спектр чувствительности изолятов *Klebsiella pneumoniae*

Антимикробный препарат	R	S
Бензилпенициллин	7/100	0
Амоксициллин	7/100	0
Ампициллин	7/100	0
Цефтазидин	7/100	0
Цефтиофур	7/100	0
Гентамицин	7/100	0
Азитромицин	н/д	н/д
Эритромицин	н/д	н/д
Офлоксацин	7/100	0
Левофлоксацин	7/100	0
Тетрациклин	7/100	0
Доксициклин	7/100	0
Левомецетин	н/д	н/д
Полимиксин	н/д	н/д

Примечание:

R – устойчивые микроорганизмы; S – чувствительные микроорганизмы; - в числителе абсолютное число чистых культур, - в знаменателе % от общего числа исследованных чистых культур; н.д. – EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01)

Klebsiella pneumoniae проявила резистентность ко всем тестируемым препаратам.

Таблица 18 – Спектр чувствительности изолятов *Proteus mirabilis*

Антимикробный препарат	R	S
Бензилпенициллин	25/100	0
Амоксициллин	23/86,7	2/13,3
Ампициллин	0	25/100
Цефтазидин	25/100	0
Цефтиофур	25/100	0
Гентамицин	25/100	0
Азитромицин	н/д	н/д
Эритромицин	н/д	н/д
Офлоксацин	25/100	0
Левифлоксацин	24/93,3	1/6,7
Тетрациклин	25/100	0
Доксициклин	25/100	0
Левомецетин	н/д	н/д
Полимиксин	н/д	н/д

Примечание:

R – устойчивые микроорганизмы; S – чувствительные микроорганизмы; - в числителе абсолютное число чистых культур, - в знаменателе % от общего числа исследованных чистых культур; н.д. – нет данных согласно EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01)

Таблица 19 – Спектр чувствительности изолятов *Proteus vulgaris*

Антимикробный препарат	R	S
Бензилпенициллин	20/100	0
Амоксициллин	20/100	0
Ампициллин	0	20/100
Цефтазидин	0	20/100
Цефтиофур	18/80	2/20
Гентамицин	20/100	0
Азитромицин	н/д	н/д
Эритромицин	н/д	н/д
Офлоксацин	0	20/100
Левифлоксацин	0	20/100
Тетрациклин	20/100	0
Доксициклин	20/100	0
Левомецетин	н/д	н/д
Полимиксин	н/д	н/д

Примечание:

R – устойчивые микроорганизмы; S – чувствительные микроорганизмы; - в числителе абсолютное число чистых культур, - в знаменателе % от общего числа исследованных чистых культур; н.д. – нет данных согласно EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01)

Таблица 20 – Спектр чувствительности изолятов *Pseudomonas aeruginosa*

Антимикробный препарат	R	S
Бензилпенициллин	4/80	1/20
Амоксициллин	5/100	0
Ампициллин	5/100	0
Цефтазидин	5/100	0

Цефтиофур	5/100	0
Гентамицин	5/100	0
Азитромицин	н/д	н/д
Эритромицин	н/д	н/д
Офлоксацин	5/100	0
Левифлоксацин	0	5/100
Тетрациклин	5/100	0
Доксициклин	5/100	0
Левомецетин	н/д	н/д
Полимиксин	н/д	н/д

Примечание:

R – устойчивые микроорганизмы; S – чувствительные микроорганизмы; - в числителе абсолютное число чистых культур, - в знаменателе % от общего числа исследованных чистых культур; н.д. – нет данных согласно EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) по оценке антимикробной чувствительности» (Версия 15.0, 2025-01-01)

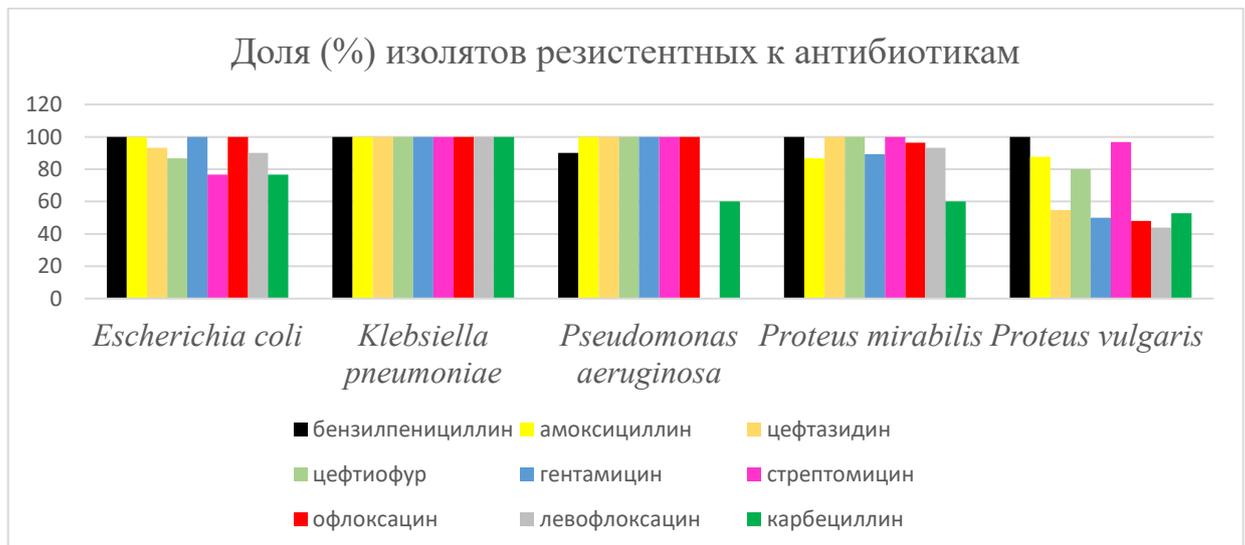


Рисунок 13– Доля (%) изолятов резистентных к антибиотикам

Рисунок 13 наглядно демонстрирует, что *Klebsiella pneumoniae* проявляет полирезистентность к АМП.

Мониторинг чувствительности к антибиотикам выделенных возбудителей способствует снижению риска распространения резистентных штаммов. Данные, полученные в результате мониторинга, могут быть использованы для научных исследований, направленных на совершенствование лечебно-профилактических мероприятий в скотоводстве.

2.2.6 Выделение бактериофагов из окружающей среды животноводческих комплексов

В ходе проведённой работы применили несколько методов для изолирования бактериофагов: 1. С применением мембранных фильтров и вакуумной фильтрации; 2. Применением трихлорметана (хлороформ, CHCl_3).

Пермеат переливали в пробирки тип Фалькон 50 мл и оценивали его на наличие посторонних примесей, мутность и цвет (рис.13).



Рисунок 14 - Пермеат сточных вод животноводческих комплексов после первичной фильтрации с применением мембранных фильтров (диаметр пор 0,45 мкм) до центрифугирования

На рисунке 14 видно, что пермеат не содержит посторонних примесей, что говорит об эффективности фильтрации. Однако образец всё ещё мутный, не прозрачный, что обуславливает дальнейшие этапы очистки.

После центрифугирования надосадочную жидкость фильтровали с применением стерильных шприцевых фильтров 0,22 мкм (Ks-Tek, China) (рис.15) и вносили в флакон с МПБ.



Рисунок 15 - Вторичная фильтрация образца через стерильный шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Ks-Tek, China) для выделения бактериофагов методом обогащения

Экстракцию и элюирование бактериофагов из образцов сточных вод, с применением трихлорметана (хлороформ, CHCl_3) проводили с применением стерильных ватно-марлевых фильтров (1 фильтр на каждые 10,0 мл образца), закреплённые на стеклянной лабораторной воронке.

Пермеат при данном способе фильтрации после центрифугирования оставался мутным(рис.16).



Рисунок 16 - Образец сточных вод животноводческих комплексов после первичной очистки через ватно-марлевый стерильный фильтр и центрифугирования $5000 \times g$ в течение 30 мин при 20°C .

Метод накопления позволил увеличить титр фага. При применении метода с трихлорметаном наблюдали разделения фаз после центрифугирования (рис.17,18).



Рисунок 17 - Пробирки с 10 мл подготовленного методом обогащения образца и 0,5 мл трихлорметана (хлороформ, CHCl_3) до центрифугирования



Рисунок 18 - Пробирки с образцами после центрифугирования $5,000 \times g$ в течение 10 минут для отделения фаз

Метод Грациа (агаровых слоёв) для оценки вероятного наличия бактериофагов в образцах (А. Gratia, 1936) показал наличие бактериофага в образцах сточных вод.



Рисунок 19 – Зоны отсутствия роста *Klebsiella pneumoniae* при совместном культивировании с бактериофагом по методу Грациа

На рисунке 19 видны округлые зоны отсутствия роста *Klebsiella pneumoniae*, что указывает на наличие бактериофага.

Метод «spot-test» для оценки вероятного наличия бактериофагов в образцах подтвердил наличие бактериофагов.



Рисунок 20 – Отсутствие роста *Klebsiella pneumoniae* на месте нанесения фаголизата методом «spot-test»

На рисунке 20 видно зону отсутствия роста *Klebsiella pneumoniae* в области нанесения капли фаголизата.

2.2.7 Результаты оценки литической активности коммерческих и выделенных из животноводческих комплексов бактериофагов

Для оценки литической активности коммерческих и выделенных из сточных вод животноводческих комплексов фаголизатов применили метод Алпельмана и метод Грациа.

Коммерческие препараты бактериофагов характеризуются различной литической активностью (табл.20,22), (рис21-26). Однако все перечисленные препараты характеризуются значительной литической активностью в отношении *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, изолированных из носоглоточной слизи телят с клиническими признаками бронхопневмонии.

Расчёты проводили по формуле:

$$N = y/vx, \text{ где:}$$

N — титр фага;

y — количество негативных колоний (шт);

v — объём использованного фильтрата фага в мл;

x — разведение суспензии фага.

Таблица 21 – Литическая активность коммерческих препаратов бактериофагов при применении метода Грациа

Препарат	Тест-штамм	Концентрация бактериофага, БОЕ/мл
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	$9,0 \times 10^5 \pm 0,368^*$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	$4,8 \times 10^5 \pm 0,124^*$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	$4,7 \times 10^5 \pm 0,216^*$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>sp.ATCC 13883</i>	$6,1 \times 10^5 \pm 0,365^*$
Пиобактериофаг комплексный	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	$8,4 \times 10^5 \pm 0,163^*$

(Pyobacteriophage complex)		
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	$9,3 \times 10^5 \pm 0,357^*$
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	$7,2 \times 10^5 \pm 0,103^*$
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp.ATCC 13883	$8,3 \times 10^5 \pm 0,257^*$
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Proteus mirabilis</i>	$5,1 \times 10^2 \pm 0,1^*$
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Escherichia coli</i>	$6,8 \times 10^5 \pm 0,265^*$
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	$9,6 \times 10^5 \pm 0,131^*$
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	$5,3 \times 10^5 \pm 0,632^*$
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	$4,7 \times 10^5 \pm 0,133^*$
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp.ATCC 13883	$4,9 \times 10^5 \pm 0,158^*$

Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный) (Bacteriophage <i>Pseudomonas aeruginosa</i> fluid)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
--	-------------------------------	---

*достоверность $P1 \leq 0,05$



Рисунок 21 – Негативные колонии бактериофага при совместном культивировании *Escherichia coli* с Пиобактериофагом комплексным (Pyobacteriophage complex), метод Грация



Рисунок 22 – Негативные колонии бактериофага при совместном культивировании *Escherichia coli* с Пиобактериофагом поливалентным очищенным (Pyobacteriophage polyvalent purified), метод Грация



Рисунок 23 – Негативные колонии бактериофага при совместном культивировании *Klebsiella pneumoniae* №1 с Пиобактериофагом комплексным (Pyobacteriophage complex), метод Грация



Рисунок 24 – Негативные колонии бактериофага при совместном культивировании *Klebsiella pneumoniae* №2 с Пиобактериофагом поливалентным очищенным (Pyobacteriophage polyvalent purified), метод Грация

Таблица 22 – Литическая активность выделенного бактериофага при применении метода Грация

Тест-штамм	Концентрация бактериофага, БОЕ/мл
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	$3,95 \times 10^5 \pm 0,76^*$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	$3,73 \times 10^5 \pm 0,53^*$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	$3,84 \times 10^5 \pm 0,82^*$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp.ATCC 13883	$3,88 \times 10^5 \pm 0,12^*$

*достоверность $P1 \leq 0,05$

Таблица 23 – Спектр литической активности коммерческих бактериофагов в отношении бактериальных культур, выделенных из носоглоточной слизи телят при применении метода «spot-test»

Препарат	Тест-штамм	Литическая активность
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	«++++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	«+++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	«+++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (Bacteriophage <i>klebsiella pneumoniae</i> purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp. ATCC 13883	«+++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	«++++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	«++++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	«++++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp. ATCC 13883	«++++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Proteus mirabilis</i>	«+++»
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Escherichia coli</i>	«++++»
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	«++++»

(Pyobacteriophage polyvalent purified)		
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	«++++»
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp. ATCC 13883	«++++»

Таблица 24 – Спектр литической активности выделенного бактериофага в отношении бактериальных культур, изолированных из носоглоточной слизи телят при применении метода «spot-test»

Тест-штамм	Литическая активность
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	«++++»
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	«+++»
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	«++++»
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp. ATCC 13883	«+++»

При анализе морфологии негативных колоний фагов их делили на пять групп, оценивая размер и форму негативных колоний, прозрачность, наличие зон вторичного роста микробов вокруг негативных колоний (Е.А. Бульканова, 2006).

С целью оценки морфологии негативных колоний проводили совместное культивирование фаголизата с индикаторным микробом по методу Грациа. В расплавленный и остуженный ПЖА вносили 100 мкл фаголизата (разведение 10^{-3}) и 100 мкл суточной бульонной культуры индикаторного микроорганизма, инкубировали при $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 – 24 ч (табл.24). Учёт проводили визуально с применением измерительного инструмента (линейка).

Таблица 25 – Морфология негативных колоний бактериофагов

Препарат	Индикаторный микроб	Морфология негативных колоний	Тип негативных колоний
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	Прозрачные негативные полиморфные колонии, 3,0-4,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	Прозрачные негативные колонии округлой формы 3,0-4,0 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	Прозрачные негативные полиморфные колонии 3,5-4,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	Прозрачные негативные колонии округлой формы 3,0-4,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	Прозрачные негативные колонии округлой формы 2,0-3,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	Прозрачные негативные колонии округлой формы 2,0-4,0 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг комплексный	<i>Proteus mirabilis</i>	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 0,7-1,0 мм в	I

(Pyobacteriophage complex)		диаметре, отсутствие вторичного роста	
Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex)	<i>Escherichia coli</i>	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 0,5-1,0 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	I
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	Прозрачные негативные полиморфные колонии, 2,5-3,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	Прозрачные негативные колонии округлой формы 3,0-4,5 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	Прозрачные негативные колонии округлой формы 3,5-4,0 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II

Морфология выделенного бактериофага проявила изменчивость до пассажирования и после (табл.25) (рис.16,17).

Таблица 26 – морфология негативных колоний выделенного бактериофага

Индикаторный микроб	Морфология негативных колоний до пассажирования	Тип негативных колоний до пассажирования	Морфология негативных колоний после пассажирования	Тип негативных колоний после пассажирования
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	Мутные негативные колонии округлой формы с выраженным вторичным ростом	IV	Прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по	V

	бактерий в центре и ореолом по периферии, 7,5-8,0 мм в диаметре		периферии, 2,0-3,0 мм в диаметре	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №2	Прозрачные негативные полиморфные колонии с выраженным вторичным ростом бактерий в центре и ореолом по периферии, 6,5-8,5 мм в диаметре	IV	Прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, 2,5-3,0 мм в диаметре	V
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №3	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0-1,5 мм в диаметре	I	Прозрачные негативные колонии округлой формы 3,0-4,0 мм в диаметре, отсутствие вторичного роста	II
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sp. ATCC 13883	Прозрачные негативные полиморфные колонии с выраженным вторичным ростом бактерий в центре и ореолом по периферии, 6,5-7,5 мм в диаметре	I	Прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, 2,0-3,0 мм в диаметре	V



Рисунок 25 – Морфология негативных колоний выделенного бактериофага при совместном культивировании с *Klebsiella pneumoniae* №2

На рисунке 25 показаны прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, 2,5-3,0 мм в диаметре.



Рисунок 26 – Морфология негативных колоний выделенного бактериофага при совместном культивировании с *Klebsiella pneumoniae* №1

На рисунке 26 продемонстрированы прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, 2,0-3,0 мм в диаметре.

2.2.8 Результаты ингаляции инфицированных *Klebsiella pneumoniae* лабораторных мышей коммерческими и выделенными из животноводческих комплексов бактериофагами

С целью оценки эффективности фаготерапии моделировали индуцировали бронхопневмонию у лабораторных мышей.

Klebsiella pneumoniae, изолированную от телёнка с признаками бронхопневмонии, и *Klebsiella pneumoniae* sp.ATCC 13883 пересеяли с ПЖА в МПБ и инкубировали при $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 18 – 24 ч. Подготавливали суспензию бактерий в фосфатно-солевом буфере (PBS) до концентрации 10^8 КОЕ/мл.

Лабораторным мышам (возраст 12 недель) вводили 50 мкл суспензии *Klebsiella pneumoniae* (10^6 КОЕ/мл) и *Klebsiella pneumoniae* sp. ATCC 13883 (10^6 КОЕ/мл) в каждое носовое отверстие с помощью микропипетки. Контрольной группе вводили 50 мкл суспензии PBS в каждое носовое отверстие с помощью микропипетки (Bengoechea JA).

При оценке эффективности ингаляционной фаготерапии на мышинной модели применили три коммерческих препарата (Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный, Пиобактериофаг поливалентный очищенный, Пиобактериофаг комплексный), которые проявили значительную литическую активность *in vitro* и выделенный фаголизат.

Ингаляции проводили с применением компрессорного четырёхрежимного ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия). Использовали распылитель «Рapidфлаем 2» в режиме I (размер частиц 0,8-2,0 μm). После каждой ингаляции распылитель подвергали дезинфекции, промывке и просушке при температуре 25 °C (рис.27).



Рисунок 27 – Ингаляция лабораторных мышей

Ингаляции проводили в течении 3 суток, три раза в сутки (интервал не более 6 часов). На каждую ингаляцию затрачивали 5,0 мл фаголизата. Контроль за всеми группами животных осуществляли на протяжении 10 суток, оценивая ряд показателей: жизнеспособность, активность, аппетит, состояние шёрстного покрова, наличие хрипов и кашля.

Среди животных 2-ой группы была отмечена гибель через 24-48 ч. В тканях лёгких и в крови сердца павших мышей обнаружена *Klebsiella pneumoniae*. У животных 1-ой группы на протяжении всего курса ингаляций не было отмечено патологических изменений.

Интраназальное введение фаголизата осуществляли на протяжении трёх суток. Три раза в сутки мышам вводили 50 мкл исследуемого бактериофага в каждое носовое отверстие с помощью микропипетки. Контроль за всеми группами животных осуществляли на протяжении 3 суток, оценивая ряд показателей: жизнеспособность, активность, аппетит, состояние шерстного покрова, наличие хрипов и кашля.

Среди животных 2-ой группы была отмечена гибель через 24-48 ч. В тканях лёгких и в крови сердца павших мышей обнаружена *Klebsiella pneumoniae*. У животных 1-ой группы на протяжении всего курса ингаляций не было отмечено патологических изменений.

2.2.9 Разработка и применение схемы для интраназального введения бактериофагов

Была разработана следующая схема интраназального применения бактериофагов при бронхопневмонии у телят в условиях животноводческого комплекса (рис.28):

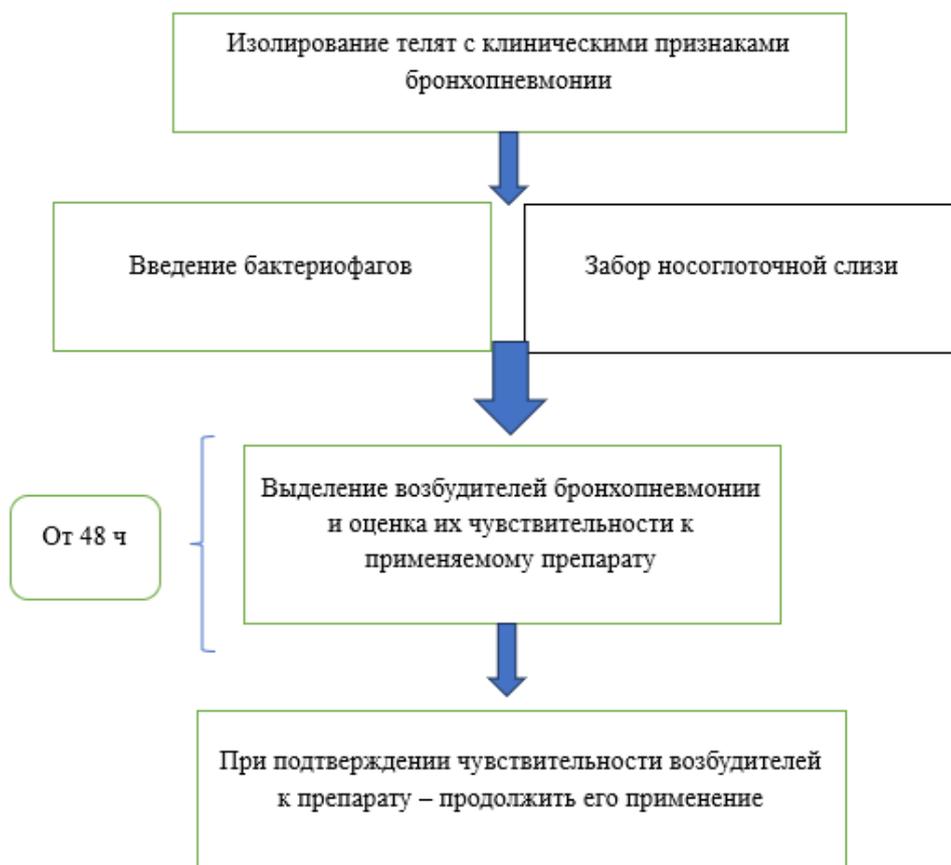


Рисунок 28 – схема интраназального применения фаголизата

В двух животноводческих комплексах сгруппировали телят йоркширской породы ($n=9$) с признаками бронхопневмонии и изолировали с целью оценки эффективности интраназального применения двух коммерческих фаголизатов (Пиобактериофаг комплексный (Pyobacteriophage complex), Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Pyobacteriophage polyvalent purified)) и выделенный бактериофаг *Klebsiella pneumoniae* (10^8 БОЕ/мл фагов). Для введения комплекса бактериофагов с коллоидным серебром сформировали группу телят с бронхопневмонией ($n=9$). Интраназально вводили одновременно 1 мл коллоидного серебра и 2 мл фаголизата ($n=9$). Диагноз «бронхопневмония» был поставлен комплексно на основании результатов клинического обследования и анализа спектра выделенных микроорганизмов. У больных имело место угнетение, вялость, снижение аппетита, одышка, кашель, слизисто-гнойные выделения из носовых ходов.

Вводили интраназально 3,0 мл препарата в каждое носовое отверстие три раза в сутки в течение трёх суток (рис.29).



Рисунок 29 – Интраназальное введение фаголизата телёнку йоркширской породы

За состоянием животных вели мониторинг каждые три часа. Улучшение клинического состояния (нормализация аппетита, повышение двигательной активности, отсутствие обильных гнойных выделений из носовых отверстий) телят наблюдалось через 18-24 ч после первого интраназального введения фагосодержащего препарата. Помимо улучшения клинического состояния животных после трёхдневного курса фаготерапии в носоглоточной слизи не были повторно обнаружены следующие возбудители, которые были выделены у больных телят до введения фаголизатов: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumoniae* (10^8 БОЕ/мл фагов и 10 мг/л серебра).

2.2.10 Экономическая эффективность применения фаготерапии при бронхопневмонии телят в условиях животноводческого комплекса

Затраты на лечение телят, больных бронхопневмонией, определяли по формуле:

$$Зв = Омз + От + Онф \quad (1)$$

где Омз – материальные затраты на препараты;

От – затраты на оплату труда при выполнении лечебных манипуляций;

Онф – налоговые отчисления.

Материальные затраты (Омз) на лечение телят, больных бронхопневмонией, с применением фаготерапии без коллоидного серебра и с применением комплекса коллоидного серебра с бактериофагом, определяли по формуле (с учётом стоимости фаголизата – 1318 руб. за 100 мл, коллоидного серебра – 357 руб. за 100 мл):

$$\text{Омз} = \text{Цпр} \times \text{Кз. ж.} \times \text{Стерапии} \quad (2)$$

где, Ц пр. – цена препарата (на курс), руб.;

К з. ж. – количество заболевших животных, гол.;

С терапии – количество интраназальных введений на курс лечения, гол.

Таким образом затраты на лечение телят, больных бронхопневмонией составили:

$$\text{Омз}_{\text{фаголизат}} = 355,86 \cdot 6 \cdot 3 = 6405,48 \text{ руб.}$$

$$\text{Омз}_{\text{фаголизат+серебро}} = 548,86 \cdot 6 \cdot 3 = 9879,48 \text{ руб.}$$

Расчет трудовых затрат (От) для лечения телят, больных бронхопневмонией, определяли по формуле (с учётом территориального местонахождения животноводческого комплекса):

$$\text{От} = \text{В о} \times \text{К з. ж.} \times \text{М} : \text{Ч} \quad (3)$$

где, В о – время, затраченное ветеринарным врачом на обработку одного животного, мин;

К з. ж. – количество заболевших животных, гол.;

М – количество интраназальных введений препарата на курс лечения, раз;

Ч – часовая ставка, мин;

Расчет трудовых затрат для лечения телят, больных бронхопневмонией составил:

$$\text{От} = 1 \text{ мин/гол.} \cdot 6 \text{ гол.} \times 9 \text{ введений} : 60 \text{ мин} = 0,9 \text{ ч}$$

Расчет оплаты труда (Оптв) ветеринарного врача животноводческого комплекса за один час определяли по формуле:

$$\text{Оптв} = \text{Мо} : \text{Рн} \quad (4)$$

где, Мо – месячный оклад ветеринарного врача, руб.;

Рн – рабочая неделя по 8 ч (166 ч)

Оплата труда составила:

$$\text{Оптв} = 70\,000 \text{ руб.} : 166 \text{ ч} = 421,69 \text{ руб./час}$$

Расчет заработной платы ветеринарного врача животноводческого комплекса проводили по формуле:

$$\text{Зв.} = \text{Оптв} \times \text{От} \quad (5)$$

где,

Оптв – зарплата ветеринарного врача за 1 час;

От-трудовые затраты.

Зарплата ветеринарного врача животноводческого комплекса при лечении бронхопневмонии у телят составила:

$$\text{Зв фаголизат} = 421,69 \text{ руб./час} \cdot 0,9 \text{ ч} = 379,52 \text{ руб.}$$

$$\text{Зв фаголизат} + \text{серебро} = 421,69 \text{ руб./час} \cdot 0,9 \text{ ч} = 379,52 \text{ руб.}$$

Расчет налоговых отчислений (Онф) от зарплаты ветеринарного врача животноводческого комплекса при лечении бронхопневмонии у телят вычисляли по формуле:

$$\text{Онф} = \text{Зв} \times \text{ЕСН} (30\%) : 100\% \quad (6)$$

где, Зв – зарплата ветеринарного врача, руб.

ЕСН – налоговые отчисления

Расчет налоговых отчислений (Онф) от зарплаты ветеринарного врача животноводческого комплекса при лечении бронхопневмонии у телят составил:

$$\text{Онфл фаголизат} = 379,52 \text{ руб.} \times 30\% : 100\% = 113,86 \text{ руб.}$$

$$\text{Онфл фаголизат} + \text{серебро} = 379,52 \text{ руб.} \times 30\% : 100\% = 113,86 \text{ руб.}$$

Затраты на проведение ветеринарных мероприятий (Зв) для лечения телят, больных бронхопневмонией, составили:

$$\text{Зв фаголизат} = 6405,48 \text{ руб.} + 379,52 \text{ руб.} + 113,86 \text{ руб.} = 6\,898,86 \text{ руб.}$$

$$\text{Зв фаголизат} + \text{фаголизат} = 9879,48 \text{ руб.} + 379,52 \text{ руб.} + 113,86 \text{ руб.} = 10\,372,86 \text{ руб.}$$

Потеря от смертности одного телёнка составляет 50,000 руб.

Средний процент смертности от бронхопневмонии: 5%.

Ущерб от падежа, вынужденного убоя, отчуждения и уничтожения молодняка:

$$U_1 = M_m \times C_p - B_p \times T \times C_j - C_f \quad (7)$$

Где, M_m — количество павшего, вынужденно убитого молодняка;

C_p — условная стоимость одной головы приплода, руб.;

B_p — среднесуточный прирост живой массы здорового молодняка, кг;

T — возраст павшего, вынужденно убитого животного, дни;

C_j — средняя цена реализации единицы живой массы скота, руб./кг;

C_f — выручка от реализации продуктов убоя, трупного сырья.

Ущерб от падежа, вынужденного убоя, отчуждения и уничтожения молодняка при бронхопневмонии составил:

$$U_1 = 6 \text{ гол.} \cdot 50\,000 \text{ руб.} - 100 \text{ кг} \cdot 10 \text{ кг} \cdot 200 \text{ руб.} - 8000 \text{ руб.} = 92\,000 \text{ руб.}$$

Ущерб от снижения прироста живой массы (U_2) при бронхопневмонии у телят вычисляли по формуле:

$$U_2 = M_z \times B_z - B_b \times T \times C \quad (8)$$

Где, M_z — количество переболевших животных;

B_z — среднесуточный прирост здоровых животных, кг;

B_b — среднесуточный прирост больных животных, кг;

T — количество дней болезни;

C — стоимость 1 кг живого веса.

Ущерб от снижения прироста живой массы ($У_2$) при бронхопневмонии у телят в животноводческих комплексах Ленинградской области составил:

$$У_2 = 6 \text{ гол} \cdot 7 \text{ кг} \cdot 200 \text{ руб.} = 84000 \text{ руб}$$

Фактический экономический ущерб ($У_1+У_2$) составил 176 000 руб

Ущерб, предотвращённый в результате лечения животных ($Пу$) с применением фаготерапии, вычислили по формуле:

$$Пу = Мз \times Ж \times Ц - У$$

где, $Пу$ — ущерб, предотвращённый в результате лечения животных;

$Мз$ — количество заболевших животных, подвергнутых лечению;

$Ж$ — средняя живая масса;

$Ц$ — закупочная цена единицы соответствующей продукции (руб.);

$У$ — фактический экономический ущерб.

Ущерб, предотвращённый в результате лечения животных с применением фаготерапии, составил:

$$Пу = 6 \text{ гол} \cdot 100 \text{ кг} \cdot 7908 \text{ руб} - 176 000 \text{ руб} = 614 800 \text{ руб}$$

Экономический эффект ветеринарных мероприятий при бронхопневмонии телят рассчитывали по формуле:

$$Эв = Пу - Зв \tag{9}$$

где, $Пу$ – предотвращенный ущерб, вследствие проведения ветеринарных манипуляций, руб.;

$Зв$ – затраты на проведение ветеринарных мероприятий, руб.

Экономический эффект ветеринарных мероприятий при бронхопневмонии телят, с применением фаготерапии, составил 607 901,14 руб.

Экономический эффект ветеринарных мероприятий при бронхопневмонии телят, с применением фаготерапии в комплексе с коллоидным серебром, составил 604 427,14 руб.

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат, потраченных на лечение бронхопневмонии, с применением фаготерапии вычислялась по формуле:

$$Эр = Эв : Зв \quad 10\,372,86 \quad (10)$$

где, Эв – Экономический эффект, проводимых ветеринарных мероприятий, руб.;

Зв – затраты на проведение ветеринарных мероприятий, руб.

Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат, потраченных на лечение телят больных бронхопневмонией составила 8,1 руб (при монотерапии) и 5,8 руб (при применении комплекса бактериофага с коллоидным серебром), что говорит о том, что фаготерапия экономически выгодна.

Обсуждение результатов

Мясное и молочное скотоводство играют ключевую роль в сельскохозяйственной экономике и продовольственной безопасности. В условиях глобального роста населения и увеличения спроса на продукты питания, стабильное производство мясной и молочной продукции становится критически важным для обеспечения продовольственной безопасности. Можно сказать, что скотоводство является объектом интенсивных научных исследований, направленных на улучшение продуктивности, здоровья животных и качества продукции. Совершенствование существующих и разработка новых схем лечения и профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота способствует повышению эффективности скотоводства.

Проблема нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей бронхопневмонии крупного рогатого скота является серьёзной проблемой как в Российской Федерации, так и за её пределами. В Российской Федерации, как и во многих других странах, наблюдается рост антибиотикорезистентности среди

возбудителей бронхопневмонии молодняка крупного рогатого скота. Согласно Яцентюку С.П. и соавт. (2021) можно ожидать формирование устойчивости микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae* к аминогликозидам, сульфаниламидам, бета-лактамам, тетрациклинам и макролидам. Однако Лаишевцев А.И. и соавт. (2017) выявили: «*Mannheimia haemolytica* чувствительна к моксифлоксацину, канамицину, фосфомицину, имипенему, котримоксазолу, доксициклину, норфлоксацину, ципрофлоксацину, энрофлоксацину, цефазолину и цефалексину». Несмотря на это в Австралии Alhamami T. et al. (2021) обнаружили, что ряд изолятов *P. multocida* устойчивы к макролидам, тетрациклину и тилмикозину, а *M. haemolytica* – к макролидам. По данным Анганова Е.В. и соавт. (2017) *K. pneumoniae* входят в группу наиболее распространенных клинически значимых патогенов, к которым в последние годы существенно увеличилась и достигла пандемического масштаба скорость формирования антибиотикорезистентности к основным группам антимикробных препаратов. Кроме того, Infectious Diseases Society of America обозначило *K. pneumoniae* как «ESKAPЕ» и включила её в группу наиболее распространенных патогенов с высоким уровнем устойчивости. Исакова М.Н. и соавт. (2022) отмечают, что у 28,46% изолятов *Escherichia coli* фиксируется промежуточная резистентность к цефалоспорином III поколения, что необходимо учитывать при выборе препаратов для терапевтических мероприятий. Более того их данные демонстрируют широкое распространение *Escherichia coli* с фенотипом резистентности к ансамицинам (рифампицину), полусинтетическим пенициллинам (ампициллину и амоксициллину), тетрациклинам (доксициклину). По данным Yukawa S. et al. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* демонстрирует устойчивость к ряду антибиотиков: к ципрофлоксацину - 9%, цефотаксиму - 12,5%, гентамицину - 4,5%, амикацину - 2,5%, фосфомицину - 35,5%.

Таким образом, всё большее внимание на себя обращает фаготерапия. Однако для успешной фаготерапии необходимо проанализировать микробиоту

респираторного тракта животных и оценить чувствительность к бактериофагам возбудителей бронхопневмонии.

Проведённый нами анализ микробиоты носоглоточной слизи телят демонстрирует неоднородность микробного состава в исследуемом материале и сложную структуру возбудителей при поражении респираторной системы. *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas kerstersii*, *Escherichia coli*, *Moraxella bovoculi*, *Mannheimia haemolytica*, *Clostridium sp.*, *Acinetobacter baumannii* изолированы исключительно из биологического материала животных с поражением респираторной системы, из них *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* – не обнаружены у клинически здоровых животных. У животных, проходящих курс антимикробной терапии, наблюдается отсутствие в носоглоточной слизи *Mannheimia haemolytica*, *Moraxella bovoculi*, и *Staphylococcus xylosus*, но обнаруживаются *Klebsiella pneumoniae* (на 2,44% реже), *Proteus mirabilis* (на 3,27% чаще), так же у данной группы отмечено улучшение общего состояния (нормализация аппетита, отсутствие одышки, кашля, истечений из носовых ходов с примесью гноя). Изоляты *Klebsiella pneumoniae*, по данным Xiong et al. (2015) чувствительностью к антибиотикам, составом капсулы и мукоидным фенотипом. Согласно исследованию, проведённому Rahimi et al. (2023), инкапсулированные штаммы *K. pneumoniae* более вирулентны и устойчивы к фагоцитозу и антибиотикам, чем неинкапсулированные штаммы.

При бронхопневмонии, ассоциированной с бактериальными возбудителями, целесообразно вводить в схему лечебных мероприятий препараты для разжижения мокроты. По информации Sui et al. (2025) между бактериофагами и лекарственными препаратами возможен синергизм. В ходе нашего исследования оценили сочетанное ингибирующее действие коллоидного серебра с бактериофагом.

Согласно данным Mason C. et al. (2022), у крупного рогатого скота клинические признаки бронхопневмонии вызывает *M. haemolytica* трёх сероваров: A1, A2 и A6. Согласно Bavananthasivam J. et al. (2018) лейкотоксин *M. haemolytica* является важнейшим фактором вирулентности, способствующим развитию бронхопневмонии у крупного рогатого скота. Именно лейкотоксин обуславливает лизис и дегрануляцию нейтрофилов, что вызывает острое воспаление и повреждение лёгких у животных, по данным Highlander S.K. et al. (2001). Выделенные нами изоляты *M. haemolytica* проявили тенденцию к β -гемолизу (100%) и биоплёнкообразованию (48,4%). Boukahil M. et al. (2016) в 2016 году успешно определили способность *M. haemolytica* образовывать биопленку на эпителиальных клетках крупного рогатого скота. Figueroa-Valenzuela C. et al. (2022) указали на то, что белок внешней мембраны *M. haemolytica* принимает непосредственное участие в образовании биоплёнки. Вирусы могут усилить восприимчивость крупного рогатого скота к *M. haemolytica*, что подтверждается в работе Moore S.J. et al. (2015). Однако в хозяйствах, включённых в наше исследование, вирусная этиология болезней у животных исключена исходя из наличия профилактических вакцинаций.

Куликов Е.В. и соавт. (2024) сообщают, что в 5,2% случаев бронхопневмонии телят изолируется *Pseudomonas aeruginosa*, а Басова Н.Ю. и соавт. (2017) выделяли данного возбудителя в 6,3%. В ходе проведённой работы мы выделяли *Pseudomonas aeruginosa* в 6%. Mulcahy L.R. et al. (2013) указывают на то, что биоплёнка защищает бактерии от защитных механизмов макроорганизма и воздействия антибиотиков. Полисахарид, входящий в состав биоплёнки *P. aeruginosa* снижает фагоцитоз нейтрофилов и окислительную реакцию за счёт ограничения комплемент-опосредованной опсонизации, по данным Mishra M. et al. (2012). Комбинация ципрофлоксацина и маннитола полностью уничтожает биоплёнку (Ziemytè M. et al., 2021). В ходе проведённой работы мы подтвердили эффективность применения коллоидного серебра в качестве ингибитора роста биоплёнки. Результаты продемонстрировали, что

ингибирование биоплёнки на 33,3% эффективнее при применении комплекса бактериофагов с коллоидным серебром. Feizi S. et al. (2012) доказали, коллоидное серебро ингибирует *P. aeruginosa* в планктонной форме и в форме биопленки.

Armijo et al. (2020) сообщают о способности наночастиц оксида железа со средним гидродинамическим диаметром 16 нм ингибировать рост бактерий. Несмотря на наличие разнообразных исследований, посвящённым ингибирующим свойствам коллоидного серебра, разработка новой схемы с его применением не теряет актуальности, что согласуется с данными Vishwanath N. et al. (2022). По сообщению Kumar A. et al. (2020) 70 % коммерческих препаратов содержат ионное серебро, а не коллоидное. Domínguez A. et al. (2020) продемонстрировали эффективность коллоидного серебра при борьбе с возбудителями инфекционных болезней, причём она повышается через 24 часа инкубирования. Kheybari S. et al. (2010) показали, что диаметр наночастиц серебра в коллоидном растворе составляет примерно 50 нм и они демонстрируют высокую антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Красочко П.А. и соавт. (2023) установили, что препарат с коллоидным серебром имеет 92% лечебную эффективность для телят поражением респираторной системы.

Acinetobacter baumannii одна из самых опасных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, согласно данным Ahuatzin-Flores et al. (2024). Биоплёнка *Acinetobacter baumannii* обеспечивает устойчивость к дезинфицирующим средствам и лекарственным препаратам.

Отдельного внимания заслуживает *Escherichia coli*, поскольку роль данного возбудителя в возникновении бронхопневмонии не однозначна. Куликов Е.В. и соавт. (2024) отмечают, что *E. coli* один из часто изолируемых бактерий при бронхопневмонии телят (13,1%). При наличии в месте содержания животных неблагоприятных условий, по данным Руденко А. и соавт. (2022):

скученное содержание, снижение резистентности и иммунологической реактивности организма новорожденных животных, воздействие неблагоприятных факторов внешней среды, стресс и несбалансированное кормление *E. coli* верхних дыхательных путей может приобретать патогенные свойства и проникать в нижние дыхательные пути, обуславливая тяжесть течения болезни. По данным Гусейновой Р.Г. и соавт. (2023) образование биоплёнки с $OD > 0,1$ характерно для *E. coli*, способной вызывать патологические изменения в организме. На то, что образование биоплёнок *E. coli* является основным фактором, определяющим развитие инфекций так же указывает Zamani H. et al. (2018). Выделенные нами изоляты проявили биоплёнкообразование $0,46 \pm 0,03$, что указывает на их роль в патогенезе болезни. Коллоидное серебро способно ингибировать биоплёнку *E. coli*, что было продемонстрировано Shahverdi A.R. et al. (2007). Токарев А.Р. и соавт. (2024) продемонстрировали антибактериальную активность коллоидного раствора серебра в отношении *E. coli*. Наши результаты показывают, что коллоидное серебро снижает биоплёнкообразование *E. coli* на 65,2%. Wan Q. et al. (2024) выяснили, что литический бактериофаг SQ17 эффективен в отношении образования и уменьшения количества биоплёнок, формируемых энтерогеморрагической кишечной палочкой O157:H7. Бактериофаг Henu8 характеризуется синергетическим противомикробными действиями в сочетании с несколькими антибиотиками и не подвержен развитию резистентности, исходя из данных Zhou F. et al. (2025). Erol H.B. et al. (2022) выделили бактериофаг *E. coli* из воды, применив метод обогащения. Нами успешно применён метод обогащения при изолировании бактериофага *Klebsiella pneumoniae* из сточных вод. Бактериофаг vB_EcoM_CBA120 обладает разнообразным каталитическим аппаратом, согласно Greenfield J. et al. (2022). В качестве альтернативного метода, который можно использовать для борьбы с *Escherichia coli*, Rizkinata D. et al. (2025) разработали метод с применением бактериофага. Бактериофаги столь же эффективны, по информации Cierlak T. et

al. (2018), как и ципрофлоксацин, в борьбе с *E. coli*, но не оказывает воздействие на комменсальные, нецелевые бактерии по сравнению с антибиотиком. Callaway T.R. et al. (2006) предложили в качестве стратегии для борьбы с *E. coli* литические бактериофаги. В Китае из фекалий Xiao T. et al. (2023) выделили 52 фага из 816 образцов, в том числе фаг vB_EcoStr-FJ63A, характеризующийся литической активностью на широкий спектр устойчивых к колистину *E. coli*. Ali S. et al. (2023) изолировали из сточных вод бактериофаги с высокой литической активностью и отсутствием генов вирулентности и устойчивости к антибиотикам. Совместное применение фWL-3 с антибиотиками повышает эффективность антибиотиков в отношении биоплёнки, особенно после поэтапного воздействия, снижая минимальную бактерицидную концентрацию в биопленке до 512 раз. Inbaraj S. et al. (2022) выделили и характеристика бактериофагов, поражающих лекарственно-устойчивые шигатоксигенные *E. coli*. Abozahra R. et al. (2025) выделили и охарактеризовали бактериофаг фЕсМ-vB1 с подтвержденной литической активностью в отношении *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью. Исследование Sivakumar L. et al. (2025) позволило выделить из сточных вод литический фаг с 10^{10} БОЕ/мл, нацеленный на *Escherichia coli*. Rajab A.A.H. et al. (2025) определили фенотипические и генотипические характеристики бактериофага, активного в отношении *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью и серотипов *E. coli* O78: K80: H12 и O26: H11. Hasan M. et al. (2024) оценили возможность использования эндолизинов, кодируемых бактериофагами, для контроля планктонных клеток и биоплёнок.

Ограниченное число изолятов *P. mirabilis*, исходя из данных Shikh-Bardsiri H. et al. (2013), образует прочную биоплёнку. 75,4% изолятов, выделенных нами проявили тенденцию к образованию биоплёнки.

Важно отметить, что выделение новых фагов позволяет разрабатывать и совершенствовать фаговые препараты, которые могут быть включены в схему противоэпизоотических мероприятий. К тому же поиск новых вирулентных

бактериофагов обоснован наличием у бактерий защитных противовирусных систем, что может спровоцировать появление резистентности к имеющимся препаратам. Значительное количество работ по поиску бактериофагов подтверждает актуальность дальнейших исследований. Наиболее привлекательным материалом для поиска вирусов являются образцы сточных вод, что продемонстрировано Kumari S. et al. (2010) и Drulis-Kawa Z. (2011), которые успешно изолировали из образцов сточных вод бактериофаги, специфичные к *Klebsiella pneumoniae*. Городничев Р. Б. и соавт (2022) выделяли бактериофагов из природных источников. В ходе нашей работы так же был изолирован из сточных вод животноводческих комплексов вирулентный бактериофаг, активный в отношении *Klebsiella pneumoniae*. Из сточных вод успешно был выделен бактериофаг *Proteus vB_PvuS_Pm34* Sun Y. et al. (1974). По данным Schmidt W.C. et al. (2022), выделенные бактериофаги сохраняют свои титры при хранении при температуре 4 °С в течение нескольких месяцев, что подтверждается результатами наших исследований.

Особое значение имеет выбор пути доставки препарата при конкретном патологическом процессе. При болезнях респираторной системы привлекательными являются интраназальный и ингаляционный методы. Ингалирование и интраназальное введение позволяет доставлять фаголизат непосредственно в дыхательные пути, что обеспечивает высокую концентрацию фагов в очаге поражения. Ингаляционная терапия использует ингаляторы, похожие на те, что используются для лечения астмы, для непосредственной доставки фаговых препаратов в лёгкие для борьбы с инфекцией (Chang et al., 2018). Morello et al. (2021) оценили эффективность интраназальной фаготерапии на мышцах, заражённых *Pseudomonas aeruginosa*. Согласно их данным, четырехдневное интраназальное введение фаголизата обеспечивает 100 % выживаемость животных. Debarbieux L. et al. (2010) подтвердили, что интраназальное лечение бактериофагами не только эффективно при лечении животных, но и предотвращает повреждение лёгких,

если проводить фаготерапию за 24 часа до инфицирования. Cao F. et al. (2015) показали, что однократная интраназальная доза 2×10^9 КОЕ/мышь через 2 часа после введения *Klebsiella pneumoniae* предотвращает развитие пневмонии у мышей. В ходе собственных исследований успешно проведена ингаляционная и интраназальная фаготерапия на лабораторных мышах, так же разработана рациональная схема интраназального введения фаголизата крупному рогатому скоту в условиях животноводческого комплекса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был изучен обширный спектр бактериальных возбудителей бронхопневмонии у молодняка крупного рогатого скота (телят). Оценена фенотипическая чувствительность выделенных нами от телят возбудителей бронхопневмонии к коммерческим фаголизатам и выделенному бактериофагу. Так же экспериментально и практически доказано, что фаготерапия сочетанно с коллоидным серебром при бронхопневмонии молодняка крупного рогатого скота рациональна при проведении терапевтических мероприятий, что позволяет значительно усовершенствовать лечебно-профилактические мероприятия при инфекционных болезнях дыхательных путей у животных (телята) в условиях животноводческого комплекса.

По результатам исследований сделаны следующие **выводы**:

1. Проведён мониторинг эпизоотического состояния животноводческих комплексов Ленинградской области, который показал, что бронхопневмония инфекционной этиологии занимает существенное место среди болезней крупного рогатого скота (15-20 %).
2. Бронхопневмония бактериальной этиологии у телят в животноводческих комплексах Ленинградской области в 16,21% случаев вызвана *Proteus mirabilis*, 11,89% – *Escherichia coli*, 5,95% – *Klebsiella pneumoniae*, 3,24% – *Moraxella bovoculi*, 1,62% – *Mannheimia haemolytica*;

3. Установлено, что 100% изолятов *Klebsiella pneumoniae* полирезистентны и проявляют значительное биоплёнкообразование; при определении чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам установлено, что 65,3% исследованных микроорганизмов были устойчивы к 2 – 6 фармакологическим группам АМП, из них к трём группам АМП было устойчиво 7,0% штаммов.
4. Выделенный из сточных вод животноводческих комплексов бактериофаг, обладает высокой специфичностью к *Klebsiella pneumoniae* и выраженной литической активностью ($9,6 \times 10^5 \pm 0,131$ БОЕ/мл) в отношении бактериальных культур; литическая активность выделенного бактериофага в отношении бактериальных культур, при применении метода «spot-test» составила «++++».
5. Применение комплекса бактериофага с коллоидным серебром способствует ингибированию биоплёнки;
6. Применение бактериофага в комплексе с коллоидным серебром телятам интраназально в дозе 3,0 мл в каждое носовое отверстие, курсом 3 дня эффективно при бактериальной бронхопневмонии.
7. Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат, потраченных на лечение телят с бактериальной бронхопневмонией с применением бактериофага составила 8,1 руб. ($>1,0$), с применением комплекса бактериофага с коллоидным серебром –5,8 руб.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Выделенный из сточных вод животноводческих комплексов, бактериофаг эффективен при лечении телят с бактериальной бронхопневмонией.
2. Добавление коллоидного серебра к бактериофагу повышает эффективность лечения телят с бактериальной бронхопневмонией.

3. Применение бактериофага в комплексе с коллоидным серебром телятам интраназально в дозе 3,0 мл в каждое носовое отверстие, курсом 3 дня эффективно при бактериальной бронхопневмонии.
4. При применении бактериофага в комплексе с коллоидным серебром экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат, потраченных на лечение телят с бактериальной бронхопневмонией составляет 5,8 руб.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

АМП – антимикробный препарат

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

ПЖА – полужидкий агар

БОЕ – бляшкообразующая единица

КОЕ – колонеобразующая единица

мл – миллилитр

мкл – микролитр

нм - нанометр

РНК - рибонуклеиновая кислота

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

MALDI-TOF - времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

OD – оптическая плотность

R (resistant) - резистентные микроорганизмы

S (susceptible) – чувствительные микроорганизмы

LD50 (Lethal Dose, 50%) - средняя доза возбудителя, вызывающая гибель 50% исследуемой группы живых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин Г. И., Смелкова О. И., Тимакова Н. В., Добрынина О. Ю., Умяров А. М., Русина О. Ю., Марков А. П., Большакова Т. Н. Роль лизогении фага 107 в генетической изменчивости *Escherichia coli* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. №6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-lizogenii-faga-107-v-geneticheskoy-izmenchivosti-escherichia-coli> (дата обращения: 15.02.2025).
2. Алиев А. Ю., Патенко А. В. Макролид в современной ветеринарной практике при лечении бронхопневмонии у телят // Эффективное животноводство. 2024. №6 (196). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/makrolid-v-sovremennoy-veterinarnoy-praktike-pri-lechenii-bronhopnevmonii-u-telyat> (дата обращения: 19.04.2025).
3. Амирбеков, М. Респираторные болезни рогатого скота в условиях промышленного и отгонного животноводства Таджикистана (этиология, профилактика и лечение): специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Амирбеков Мулложон. – Москва, 1993. – 39 с. – EDN ZKGQTD.
4. Анганова Е. В., Ветохина А. В., Распопина Л. А., Кичигина Е. Л., Савилов Е. Д. Состояние антибиотикорезистентности *Klebsiella pneumoniae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sostoyanie-antibiotikorezistentnosti-klebsiella-pneumoniae> (дата обращения: 03.05.2025).
5. Антибиотикорезистентность эпизоотических изолятов *Mannheimia haemolytica*, выделенных на территории Российской Федерации / А. И. Лаишевцев, А. В. Капустин, Э. А. Якимова [и др.] // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – № 10(70). – С. 327-330. – DOI 10.18551/rjoas.2017-10.46.

6. Антимикробная активность цефинеля при респираторных болезнях телят / Е. Е. Айшпур, С. А. Нычик, Н. В. Сапон, Д. О. Тополь // Ветеринарна біотехнологія. – 2015. – № 26(26). – С. 12-19.
7. Антонеvский И. В., Плешакова В. И., Лещёва Н. А. Биоплёнкообразующая микрофлора в структуре микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных и домашних животных // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2025. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bioplenkoobrazuyuschaya-mikroflora-v-strukture-mikroorganizmov-vydelennyh-ot-selskohozyaystvennyh-i-domashnih-zhivotnyh> (дата обращения: 30.07.2025).
8. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И. А. Иванова, А. А. Труфанова, А. В. Филиппенко [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 79-84. – DOI 10.36233/0372-9311-2019-6-79-85. – EDN RCNNQU.
9. Бульканова, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Бульканова Елена Анатольевна. - Саратов, - 2006.
10. Васильев Дмитрий Аркадьевич, Феоктистова Наталья Александровна, Золотухин Сергей Николаевич Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* // Вестник Ульяновской ГСХА. 2017. №2 (38). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vydelenie-i-izuchenie-biologicheskikh-svoystv-bakteriy-roda-proteus> (дата обращения: 17.03.2025).
11. Выявление и количественная оценка вирусных и бактериальных возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота при помощи ПЦР в реальном времени / А. В. Нефедченко, А. Г. Глотов, С. В. Котенева, Т. И. Глотова // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 4. – С. 695-706. – DOI 10.15389/agrobiology.2021.4.695rus. – EDN SPTTQP.
12. Выявление устойчивости к антибиотикам у возбудителя гистофилеза крупного рогатого скота *Histophilus somni* / С. П. Яцентюк, Ю. И.

Поболелова, Д. А. Рудняев [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 2. – С. 304-314. – DOI 10.15389/agrobiology.2021.2.304rus. – EDN EVGQVY.

13. Галимзянов Халил Мингалиевич, Башкина Ольга Александровна, Досмуханова Эльмира Галиевна, Абдрахманова Радмила Охасовна, Демина Юлия Заурбековна, Даудова Адиля Джигангировна, Алешкин Андрей Владимирович, Несвижский Юрий Владимирович, Рыбкин Владимир Семенович, Афанасьев Станислав Степанович, Чикобава Мераб Георгиевич, Аршба Илона Мурмановна, Рубальский Максим Олегович, Рубальский Евгений Олегович Клиническое значение биопленкообразования у бактерий // Астраханский медицинский журнал. 2018. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskoe-znachenie-bioplenkoobrazovaniya-u-bakteriy> (дата обращения: 17.05.2025).

14. Гладких П. Г. Эффект наночастиц серебра в отношении биопленок микроорганизмов (литературный обзор) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/effekt-nanochastits-serebra-v-otnoshenii-bioplenok-mikroorganizmov-literaturnyy-obzor> (дата обращения: 01.07.2025).

15. Городничев Р. Б., М. А. Корниенко, Д. А. Беспярых, М. В. Малахова, В. А. Веселовский, О. В. Голощапов, А. Б. Чухловин, Ю. А. Беспярых, Е. А. Шитиков Выделение и характеристика бакериофагов *Klebsiella pneumoniae*, кодирующих полисахарид-деполимеразы с уникальной капсульной специфичностью // Медицина экстремальных ситуаций. 2022. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vydelenie-i-harakteristika-bakteriofagov-klebsiella-pneumoniae-kodiruyuschih-polisaharid-depolimerazy-s-unikalnoy-kapsulnoy> (дата обращения: 04.05.2025).

16. Гусейнова Р. Г., Алиева Х. М. Образование биоплёнки энтеротоксигенными штаммами *Escherichia coli*, выделенными у здоровых и больных детей // Медицинские новости. 2023. №6 (345). URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/obrazovanie-bioplunki-enterotoksigennymi-shtammami-escherichia-coli-vydelennymi-u-zdorovyh-i-bolnyh-detey> (дата обращения: 20.12.2025)

17. Диагностическое значение сероконверсии к лейкотоксину *mmeimia haemolytica* у крупного рогатого скота / О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако, М. А. Ананчиков, Д. Л. Белянко // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2018. – Т. 16. – С. 215-223.

18. Донник, И. М. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики в современных условиях промышленного производства / И. М. Донник, О. Г. Петрова, С. А. Марковская // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 10(116). – С. 25-27.

19. Золотухин Д.С., Выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов *Nafnia alvei*// Д.С.Золотухин, Д.А.Васильев, С.Н.Золотухин, А.М.Семенов, Е.М.Романова/ Вестник ветеринарии // 2013. № 1 (64). С. 68-70.

20. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактебактериофагов энтеробактерий // С.Н.Золотухин /диссертация/Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия» 03,00.23 -биотехнология 03.00.07 – микробиология Ульяновск - 2007

21. Игнатова Надежда Ивановна, Александрова Н. А., Заславская М. И., Абрамычева Д. В. Влияние условий культивирования на интенсивность биоплёнкообразования штаммами *Klebsiella pneumoniae* // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. №8. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-usloviy-kultivirovaniya-na-intensivnost-bioplionokoobrazovaniya-shtammami-klebsiella-pneumoniae> (дата обращения: 05.04.2025).

22. Исакова М.Н., Соколова О.В., Безбородова Н.А., Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Зубарева В.Д. Антибиотикорезистентность клинических

изолятов *Escherichia coli*, выделенных от животных. Ветеринария сегодня. 2022;11(1):14-19. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-1-14-19>

23. Киянчук, М. В. Анализ биохимических, культуральных и морфологических свойств *mannheimia haemolytica*, выделенной из носоглоточной слизи телят / М. В. Киянчук // Ветеринарная лабораторная практика : Сборник статей и докладов на международной научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 17–21 апреля 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, ВВМ, 2023. – С. 29-31. – EDN QMFZUC.

24. Киянчук, М. В. Особенности выделения бактериофагов, специфичных к *Klebsiella pneumoniae*, из сточных вод животноводческих комплексов / М. В. Киянчук, А. А. Сухинин // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2025. – № 1. – С. 37-40. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2025.1.37. – EDN KGPLCK.

25. Киянчук, М. В. Оценка литической активности коммерческих препаратов бактериофагов в отношении *Klebsiella pneumoniae*, ассоциированной с бронхопневмонией крупного рогатого скота / М. В. Киянчук, А. А. Сухинин // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 4. – С. 20-25. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2024.4.20. – EDN ZLSIJL.

26. Киянчук, М. В. Оценка эффективности ингаляционного применения препаратов бактериофагов при бронхопневмонии, ассоциированной с *Klebsiella pneumoniae* / М. В. Киянчук, А. А. Сухинин // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2024. – № 3. – С. 31-33. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2024.3.31. – EDN VZHEML.

27. Кольберг, Н. А. Анализ эпизоотической ситуации при респираторных заболеваниях крупного рогатого скота инфекционной этиологии в предприятиях Уральского региона / Н. А. Кольберг, О. Г. Петрова, С. А. Марковская // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2013. – № 6(37). – С. 46-51.

28. Кострова, Е. С. Основные характеристики методики определения антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотке крови крупного рогатого скота иммуноферментным методом / Е. С. Кострова, О. П. Бьядовская, О. В. Прунтова // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику : материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, 06 декабря 2016 года. – Владимир: Федеральное государственное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных", 2016. – С. 159-164.

29. Коцюмбас, И. Я. Состояние антибиотикорезистентности микроорганизмов, возбудителей бактериальных заболеваний молодняка крупного рогатого скота и свиней / И. Я. Коцюмбас, В. П. Музыка, Т. И. Стецько // . – 2014. – № 13. – С. 117-120. – EDN TRVHKZ.

30. Красочко П.А., Борисовец Д.С., Станкуть А.Э. Эффективность нано- и коллоидных частиц серебра при респираторных болезнях телят. Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. 2023;(2):19-23.

31. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Чеботарь В. И., Маянский Н. А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // КМАХ. 2015. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/pseudomonas-aeruginosa-patogennost-patogenez-i-patologiya> (дата обращения: 16.03.2025).

32. Лаишевцев А. И., Капустин А. В., Якимова Э. А., Лучко М. А., Пименов Н. В. Антибиотикорезистентность эпизоотических изолятов *Mannheimia haemolytica*, выделенных на территории Российской Федерации // RJOAS. 2017. №10. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnost-epizooticheskikh-izolyatov-mannheimia-haemolytica-vydelennyh-na-territorii-rossiyskoj-federatsii> (дата обращения: 03.05.2025).

33. Лаишевцев, А. И. Новый вакцинный штамм *Mannheimia haemolytica* для производства препаратов против манхеймиоза / А. И. Лаишевцев, Э. А.

Якимова, А. В. Капустин // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 6. – С. 117-121.

34. Лаишевцев, А. И. Результаты подбора нового производственного штамма бактерий *Mannheimia haemolytica* «Кл – ВИЭВ» для изготовления средств специфической профилактики манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота // RJOAS. 2017. №7. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rezultaty-podbora-novogo-proizvodstvennogo-shtamma-bakteriy-mannheimia-haemolytica-kl-viev-dlya-izgotovleniya-sredstv-spetsificheskoy> (дата обращения: 18.01.2022).

35. Лаишевцев, А.И. Клинико-эпизоотологическое обоснование вакцинопрофилактики и разработка вакцины против манхеймиоза крупного и мелкого рогатого скота: диссертация ... кандидата биологических наук : 06.02.02, 03.01.06/ Лаишевцев Алексей Иванович; [Место защиты: Всерос. науч.-исслед. ин-т эксперим. ветеринарии им. Я.Р. Коваленко и К.И. Скрябина РАН]. - Москва, 2018. - 155 с.

36. Лукьянов Р. Ю., Лукьянов М. Р. Диагностические показатели носовой слизи овец при ассоциированной бронхопневмонии // Известия сельскохозяйственной науки Тавриды. 2023. №34 (197). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/diagnosticheskie-pokaza-teli-nosovoy-slizi-ovets-pri-assotsiirovannoy-bronhopnevmonii> (дата обращения: 16.03.2025).

37. Мазур Т. В., Ткаченко В. В., Чумак Р. М., Мартиненко Д. Л., Рибальченко Д. Ю. Використання ІФА для виявлення специфічних антитіл до пастерельозу, викликаного р. *haemolytica* // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького . 2008. №3-1 (38). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vikoristannya-ifa-dlya-viyavlennya-spetsifichnih-antitil-do-pasterelozu-viklikanogo-p-haemolytica> (дата обращения: 05.05.2025).

38. Мазур, Т. В. Вплив токсинів *Pasteurella haemolytica*, виділених від свиней, на організм теплокровних / Т. В. Мазур, Н. Г. Сорокіна // Ветеринарна медицина. – 2011. – № 95. – С. 113-114.
39. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», утверждённые Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 4 марта 2004 года.
40. Митрохин С. Д. Азитромицин: обоснованность применения в терапии различной инфекционной патологии // Трудный пациент. 2009. №4-5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/azitromitsin-obosnovannost-primeneniya-v-terapii-razlichnoy-infektsionnoy-patologii> (дата обращения: 19.04.2025).
41. Особенности проявления легочного пастереллеза молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах по производству молока / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, К. В. Войтова [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2012. – № 2(225). – С. 55-61.
42. Патент № 2334792 С2 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 39/102, А61К 39/108. Новые бактерии, вызывающие заболевание домашней птицы, и полученная из них вакцина : № 2004116134/13 : заявл. 24.10.2002 : опубл. 27.09.2008 / М. Э. Васкес, Р. Кампогарридо, К. Гонсалес-Эрнандес, В. Сиванандан ; заявитель Бёрингер Ингельхайм Ветмедика С.А. де С.В.
43. Патент № 2430967 С2 Российская Федерация, МПК С12N 1/02, G01N 33/50. Способ обнаружения бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* у домашней птицы (варианты) : № 2007148219/15 : заявл. 24.10.2002 : опубл. 10.10.2011 / М. Э. Васкес, Р. Кампогарридо, К. Гонсалес-Эрнандес, В. Сиванандан ; заявитель БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА С.А. ДЕ С.В.
44. Патент № 2744744 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/102, А61Р 31/04. Вакцина против манхеймиоза, биберштейниоза и пастереллёза

крупного и мелкого рогатого скота ассоциированная инактивированная, способ её получения : № 2020114562 : заявл. 17.04.2020 : опубл. 15.03.2021 / А. И. Лаишевцев, А. В. Капустин, Э. А. Якимова [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р.Коваленко Российской академии наук».

45. Перепанова Тамара Сергеевна, Казаченко А. В., Хазан П. Л., Малова Ю. А. Терапевтическое применение бактериофагов: назад в будущее // КМАХ. 2021. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/terapevticheskoe-primeneniye-bakteriofagov-nazad-v-budushee> (дата обращения: 01.01.2025).

46. Плешакова В. И., Ермакова Т. В., Егорова А. С. Микробиоценоз верхних дыхательных путей у телят с клиническими признаками бронхопневмонии и микрофлора воздуха животноводческих помещений // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2012. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiotsenoz-verhnih-dyhatelnyh-putey-u-telyat-s-klinicheskimi-priznakami-bronhopnevmonii-i-mikroflora-vozduha-zhivotnovodcheskih> (дата обращения: 30.07.2025).

47. Попонина, М. В. Опыт бактериологической диагностики случая генерализованной инфекции (геморрагическая септицемия, гнойный менингоэнцефалит), вызванной *Pasteurella haemolytica*, у ребенка 1,5 месяцев / М. В. Попонина, Д. М. Попонин // Вятский медицинский вестник. – 2004. – № 2-4. – С. 70-72.

48. Производственные испытания эффективности вакцины "Респивак" для профилактики пастереллёза крупного рогатого скота / А. С. Андрусевич, М. М. Мистейко, Е. Г. Финогенова, И. И. Стрельченя // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2018. – № 2. – С. 14-19.

49. Разработка метода идентификации и генотипирования бактерий *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* на основе полимеразной цепной реакции и филогенетический анализ культур бактерий, выделенных от

крупного рогатого скота / А. В. Нефедченко, А. Н. Шиков, А. Г. Глотов [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – Т. 34. – № 2. – С. 62-66. – DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-2-62-66.

50. Резистентность к антибиотикам изолятов *Klebsiella pneumoniae* в Республике Саха (Якутия) / О. М. Егорова, Е. П. Игнатьева, И. Ю. Исаева [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Т. 38. – № 6. – С. 124-129. – DOI 10.15372/SSMJ20180618. – EDN YPPDYT.

51. Решедько Галина Константиновна, Щебников А. Г., Морозов М. В., Решедько Л. А. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ // КМАХ. 2011. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/escherichia-coli-kak-vozbuditel-nozokomialnyh-infektsiy-v-orit> (дата обращения: 09.12.2025).

52. Ручко Е. Н., Плешакова В. И. Антибиотикорезистентность грамотрицательных микроорганизмов, циркулирующих у животных омской области // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2022. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnost-gramotritsatelnyh-mikroorganizmov-tsirkuliruyuschih-u-zhivotnyh-omskoy-oblasti> (дата обращения: 30.07.2025).

53. Савинков А. В., Ермаков В. В., Лямин А. В., Исмагуллин Д.Д., Жёстков А. В., Садов К. М. Сравнительный анализ микрофлоры верхних дыхательных путей поросят-отъемышей и подсвинков при неспецифической бронхопневмонии // Известия ОГАУ. 2020. №4 (84). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyy-analiz-mikroflory-verhnih-dyhatelnyh-putey-porosyat-otyomyshey-i-podsvinkov-pri-nespetsificheskoy-bronhopnevmonii> (дата обращения: 17.03.2025).

54. Свойства бактериофагов *Citrobacter* // *Universum: химия и биология* : электрон. научн. журн. Васильев Д.А. [и др.]. 2017. № 7 (37). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/4937> (дата обращения: 15.03.2022).

55. Свойства бактериофагов *Citrobacter* // *Universum: химия и биология* : электрон. научн. журн. Васильев Д.А. [и др.]. 2017. № 7 (37). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/4937> (дата обращения: 15.03.2022).
56. Стегний, Б. Т. Этиологическая структура пульмональной формы пастереллеза у телят / Б. Т. Стегний, А. И. Сосницкий // *Ветеринарна медицина*. – 2013. – № 97. – С. 239-240. – EDN STHPQJ.
57. Терентьев А. А., Молдогазиева Н. Т., Шайтан К. В. Динамическая протеомика в моделировании живой клетки // *Успехи биологической химии*, ит. 49, 2009, С. 429–42809
58. Терентьева, Т. Е. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий семейства *Pasteurellaceae* и частота их выявления при респираторных болезнях крупного рогатого скота : специальность 06.02.02 "Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Терентьева Татьяна Евгеньевна. – Новосибирск, 2014. С. 18
59. Тикунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). 2009. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fagovyuy-displey-na-osnove-nitchatyh-bakteriofagov-primenenie-dlya-otbora-rekombinantnyh-antitel> (дата обращения: 28.02.2022).
60. Токарев А. Р., А. В. Ермак, С. Ю. Хаткин, С. В. Токарева Перспективы применения ингаляций коллоидного раствора наносеребра «аква вита» в комплексном лечении внебольничной пневмонии: серия клинических наблюдений и краткий обзор литературы // *Вестник новых медицинских технологий*. Электронное издание. 2024. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/perspektivy-primeneniya-ingalyatsiy-kolloidnogo->

rastvora-nanoserebra-akva-vita-aqua-vitae-v-kompleksnom-lechenii-vnebolnichnoy (дата обращения: 05.01.2026).

61. Тулева, Н. П. Респираторные болезни телят инфекционного генеза / Н. П. Тулева, Ю. В. Тулев // Международный вестник ветеринарии. – 2009. – № 2. – С. 31-37. – EDN LLZGSX.

62. Феоктистова Наталья Александровна, Васильев Дмитрий Аркадьевич, Золотухин Сергей Николаевич Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств // Вестник Ульяновской ГСХА. 2017. №4 (40). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/proteynnye-bakteriofagi-izuchenie-nekotoryh-biologicheskikh-svoystv> (дата обращения: 16.11.2025).

63. Фесенко, О. В. Пневмонии, вызванные *Klebsiella pneumoniae* (фридлендеровские пневмонии) / О. В. Фесенко, С. Н. Швайко // Практическая пульмонология. – 2019. – № 1. – С. 22-31. – EDN ISLUXX.

64. Хрянин А. А. Биоплёнки микроорганизмов: современные представления// Антибиотики и химиотерапия. 2020. №5-6. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/biopolyonki-mikroorganizmov-sovremennyye-predstavleniya> (дата обращения: 16.05.2025).

65. Циганова С.В. Выделение бактериофагов против возбудителей бактериальных болезней птиц и изучение их биологических свойств // С.В. Циганова/Автореферат 16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология Санкт-Петербург 2009 г.

66. Чеботарь Игорь Викторович, Бочарова Ю. А., Подопригора И. В., Шагин Д. А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном// КМАХ. 2020. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/pochemu-klebsiella-pneumoniae-stanovitsya-lidiruyuschim-opportunisticheskim-patogenom> (дата обращения: 05.04.2025).

67. Чеботарь Игорь Викторович, Маянский А. Н., Кончакова Е. Д., Лазарева А. В., Чистякова В. П. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий //

КМАХ. 2012. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antibiotikorezistentnost-bioplyonochnyh-bakteriy> (дата обращения: 28.05.2025).

68. Шамина О. В., Самойлова Е. А., Новикова И. Е., Лазарева А. В. *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность // Российский педиатрический журнал. 2020. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/klebsiella-pneumoniae-mikrobiologicheskaya-harakteristika-antibiotikorezistentnost-i-virulentnost> (дата обращения: 08.10.2022).

69. Шиббаев, М. А. Разработка метода выявления *Mannheimia haemolytica* с помощью полимеразной цепной реакции и нуклеотидного секвенирования / М. А. Шиббаев // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4(23). – С. 95-99.

70. Шульга Н.Н., Шульга И.С., Дикунина С.С., Плавшак Л.П. Распространение респираторных болезней телят в Амурской области // Дальневосточный аграрный вестник. 2016. №3 (39). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-respiratornyh-bolezney-telyat-v-amurskoj-oblasti> (дата обращения: 07.10.2022).

71. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, О. В. Семенова, К. В. Войтова // Ветеринария. – 2014. – № 4. – С. 7-11. – EDN QEZVPV.

72. Яцентюк С. П., Поболелова Ю. И., Рудняев Д. А., Лаишевцев А. И., Капустин А. В. Выявление устойчивости к антибиотикам у возбудителя гистофилёза крупного рогатого скота выявление устойчивости к антибиотикам у возбудителя гистофилёза крупного рогатого скота *Histophilus somni* // С.-х. биол., Сельхозбиология, S-h biol, Sel-hoz biol, Sel'skokhozyaistvennaya biologiya, Agricultural Biology. 2021. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vyyavlenie-ustoychivosti-k-antibiotikam-u-vozbuditelya-gistofileza-krupnogo-rogatogo-skota-histophilus-somni> (дата обращения: 03.05.2025).

73. A novel Erm monomethyltransferase in antibiotic-resistant isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* / B. Desmolaize, S. Rose, S. Douthwaite, R. Warrass // *Molecular Microbiology*. – 2011. – Vol. 80. – No 1. – P. 184-194. – DOI 10.1111/j.1365-2958.2011.07567.x.
74. Abedon ST. Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Feb;363(3):fnv246. doi: 10.1093/femsle/fnv246. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26738755.
75. Abedon ST. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015 Apr 18;5(1):e1020260. doi: 10.1080/21597081.2015.1020260. PMID: 26442188; PMCID: PMC4422798.
76. Abedon, Stephen T, and Cameron Thomas-Abedon. "Phage therapy pharmacology." *Current pharmaceutical biotechnology* vol. 11,1 (2010): 28-47. doi:10.2174/138920110790725410
77. Ahmadi, Koorosh et al. "Antibiotic Resistance Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Cases of Superficial Infections at the Emergency Unit." *Jundishapur journal of microbiology* vol. 9,1 e27646. 23 Jan. 2016, doi:10.5812/jjm.27646
78. Ahuatzin-Flores, Omar E et al. *Acinetobacter baumannii*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. *Microorganisms* vol. 12,4 644. 23 Mar. 2024, doi:10.3390/microorganisms12040644
79. Aldrovandi M, Banthiya S, Meckelmann S, Zhou Y, Heydeck D, O'Donnell VB, Kuhn H. Specific oxygenation of plasma membrane phospholipids by *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase induces structural and functional alterations in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Feb;1863(2):152-164. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.11.005. Epub 2017 Nov 14. Erratum in: *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 Aug;1865(8):158701. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158701. PMID: 29146531; PMCID: PMC5764228.

80. Alhamami T, Low WY, Ren Y, Taylor K, Khazandi M, Veltman T, Venter H, Carr M, Turni C, Abraham S, Trott DJ. Antimicrobial susceptibility and genomic analysis of *Histophilus somni* isolated from cases of bovine respiratory disease in Australian feedlot cattle. *Vet Microbiol.* 2022 Jul;270:109460. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109460. Epub 2022 May 13. PMID: 35640408.
81. Angen Ø. Taxonomy of *Histophilus somni*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;396:1-14. doi: 10.1007/82_2015_5007. PMID: 26847356.
82. Antimicrobial resistance in members of the bacterial bovine respiratory disease complex isolated from lung tissue of cattle mortalities managed with or without the use of antimicrobials / K. Stanford, R. Zaheer, C. Klima [et al.] // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8. – No 2. – P. 288. – DOI 10.3390/microorganisms8020288.
83. Arbatsky NP, Drzewiecka D, Palusiak A, Shashkov AS, Zabłotni A, Siwińska M, Knirel YA. Structure of a Kdo-containing O polysaccharide representing *Proteus* O79, a newly described serogroup for some clinical *Proteus* genomospecies isolates from Poland. *Carbohydr Res.* 2013 Sep 20;379:100-5. doi: 10.1016/j.carres.2013.07.001. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23896084.
84. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus.* 2018 Feb;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. PMID: 29424333; PMCID: PMC5880328.
85. Armijo, Leisha M et al. Antibacterial activity of iron oxide, iron nitride, and tobramycin conjugated nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of nanobiotechnology* vol. 18,1 35. 18 Feb. 2020, doi:10.1186/s12951-020-0588-6
86. Aulik NA, Hellenbrand KM, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect Immun.* 2012 May;80(5):1923-33. doi: 10.1128/IAI.06120-11. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22354029; PMCID: PMC3347434.

87. Bacteriophage isolated from bacterial genomes and extrachromosomal elements and methods of use thereof WO2000067784A1 2000
88. Bacteriophage-based vaccines and engineered bacteriophage WO2021188804A1 2021
89. Baquero, Diana & Prangishvili, David & Krupovic, Mart.. Virus–Host Interactions in Archaea. (2021)
90. Bassel LL, Kaufman EI, Alsop SNA, Stinson KJ, Hewson J, Sharif S, Vulikh K, Siracusa L, Clark ME, Caswell JL. Development of an aerosolized *Mannheimia haemolytica* experimental pneumonia model in clean-catch colostrum-deprived calves. *Vet Microbiol.* 2019 Jul;234:34-43. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.05.012. Epub 2019 May 19. PMID: 31213270.
91. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev.* 2019 Mar 1;43(2):123-144. doi: 10.1093/femsre/fuy043. PMID: 30452654; PMCID: PMC6435446.
92. Boe, J et al. “European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers.” *The European respiratory journal* vol. 18,1 (2001): 228-42. doi:10.1183/09031936.01.00220001
93. Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol.* 2002 Nov;10(11):521-9. doi: 10.1016/s0966-842x(02)02459-9. PMID: 12419617.
94. Brady A, Quiles-Puchalt N, Gallego Del Sol F, Zamora-Caballero S, Felipe-Ruíz A, Val-Calvo J, Meijer WJJ, Marina A, Penadés JR. The arbitrium system controls prophage induction. *Curr Biol.* 2021 Nov 22;31(22):5037-5045.e3. doi: 10.1016/j.cub.2021.08.072. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34562384; PMCID: PMC8612738.
95. Brief heat treatment increases cytotoxicity of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in an LFA-1 independent manner / D. N. Atapattu, N. A. Aulik, C. J. Czuprynski, D. R. Mccaslin // *Microbial Pathogenesis.* – 2009. – Vol. 46. – No 3. – P. 159-165. – DOI 10.1016/j.micpath.2008.12.002.

96. Buczinski, Sébastien & Vandeweerd, Jean-Michel. (2012). Evidence-based veterinary medicine: A natural development for bovine veterinary practitioners. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*. 165. 325-329.
97. Bull JJ, Gill JJ. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. *Front Microbiol*. 2014 Nov 18;5:618. doi: 10.3389/fmicb.2014.00618. PMID: 25477869; PMCID: PMC4235362.
98. Bull, J J et al. "In vivo growth rates are poorly correlated with phage therapy success in a mouse infection model." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 56,2 (2012): 949-54. doi:10.1128/AAC.05842-11
99. Buncek, Martin. (2002). Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R., Gelbart, W.M.: *An Introduction to Genetic Analysis*. *Biologia Plantarum - BIOL PLANT*. 45. 50-50. 10.1023/A:1015187026471.
100. Cao F, Wang X, Wang L, Li Z, Che J, Wang L, Li X, Cao Z, Zhang J, Jin L, Xu Y. Evaluation of the efficacy of a bacteriophage in the treatment of pneumonia induced by multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Biomed Res Int*. 2015;2015:752930. doi: 10.1155/2015/752930. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25879036; PMCID: PMC4387947.
101. Carmody, Lisa A et al. "Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection." *The Journal of infectious diseases* vol. 201,2 (2010): 264-71. doi:10.1086/649227
102. Catry B, Haesebrouck F, Vlieghe SD, Feyen B, Vanrobaeys M, Opsomer G, Schwarz S, Kruif AD. Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. *Microb Drug Resist*. 2005 Winter;11(4):387-94. doi: 10.1089/mdr.2005.11.387. PMID: 16359200.
103. Caverly Rae, J. M. The effect of *Mannheimia haemolytica* pneumonia on antimicrobial peptide expression in ruminant lung / J. M. Caverly Rae, 2002. – 1 p.

104. Chang, Rachel Yoon Kyung et al. "Proof-of-Principle Study in a Murine Lung Infection Model of Antipseudomonal Activity of Phage PEV20 in a Dry-Powder Formulation." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 62,2 e01714-17. 25 Jan. 2018, doi:10.1128/AAC.01714-17
105. Chen Y, Batra H, Dong J, Chen C, Rao VB, Tao P. Genetic Engineering of Bacteriophages Against Infectious Diseases. *Front Microbiol.* 2019 May 3;10:954. Doi: 10.3389/fmicb.2019.00954. PMID: 31130936; PMCID: PMC6509161.
106. Chhibber, Sanjay et al. "Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice." *Journal of medical microbiology* vol. 57,2000: 1508-1513. doi:10.1099/jmm.0.2008/002873-0
107. Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Jan;53(Pt 1):275-287. doi: 10.1099/ijms.0.02330-0. PMID: 12656185.
108. Clark, David & Pazdernik, Nanette & McGehee, Michelle. (2019). *Genome Defense*. 10.1016/B978-0-12-813288-3.00020-3.
109. *Clostridium perfringens* bacteriophage and uses thereof field of the invention 2017
110. Combinations of macrolide resistance determinants in field isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* / B. Desmolaize, S. Rose, S. Douthwaite [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55. – No 9. – P. 4128-4133. – DOI 10.1128/AAC.00450-11.
111. Confer AW, Ayalew S. *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Anim Health Res Rev.* 2018 Dec;19(2):79-99. doi: 10.1017/S1466252318000142. PMID: 30683173.

112. Contreras Ramón Qué son los bacteriófagos?. 18 de septiembre de 2014
URL: <https://biologia.laguia2000.com/virus/que-son-los-bacteriofagos> (дата обращения: 12.0.2022).
113. Corbeil, L. (2007). *Histophilus somni* host–parasite relationships. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), 151-160. doi:10.1017/S1466252307001417
114. Craddick M, Patel R, Lower A, Highlander S, Ackermann M, McClenahan D. Adenosine-5'-triphosphate release by *Mannheimia haemolytica*, lipopolysaccharide, and interleukin-1 stimulated bovine pulmonary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012 Sep 15;149(1-2):58-65. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.011. Epub 2012 Jun 15. PMID: 22771196.
115. Crosby S, Credille B, Giguère S, Berghaus R. Comparative efficacy of enrofloxacin to that of tulathromycin for the control of bovine respiratory disease and prevalence of antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* in calves at high risk of developing bovine respiratory disease. *J Anim Sci.* 2018 Apr 14;96(4):1259-1267. doi: 10.1093/jas/sky054. PMID: 29471391; PMCID: PMC6140942.
116. Cross, Trevor et al. “An optimized enrichment technique for the isolation of *Arthrobacter* bacteriophage species from soil sample isolates.” *Journal of visualized experiments : JoVE* ,98 52781. 9 Apr. 2015, doi:10.3791/52781
117. Cudd L, Clarke C, Clinkenbeard K. Contribution of intracellular calcium stores to an increase in cytosolic calcium concentration induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Aug 8;225(1):23-7. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00471-3. PMID: 12900016.
118. Cudd L, Clarke C, Clinkenbeard K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced increase in leukotriene B4 production by bovine neutrophils is mediated by a sustained and excessive increase in intracellular calcium concentration. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Jul 15;224(1):85-90. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00432-4. PMID: 12855172.

119. Dąbrowska, Krystyna, and Stephen T Abedon. "Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies." *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* vol. 83,4 e00012-19. 30 Oct. 2019, doi:10.1128/MMBR.00012-19

120. Daigneault MC, Lo RY. Analysis of a collagen-binding trimeric autotransporter adhesin from *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett.* 2009 Nov;300(2):242-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01786.x. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19796136.

121. Dassanayake RP, Call DR, Sawant AA, Casavant NC, Weiser GC, Knowles DP, Srikumaran S. *Bibersteinia trehalosi* inhibits the growth of *Mannheimia haemolytica* by a proximity-dependent mechanism. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Feb;76(4):1008-13. doi: 10.1128/AEM.02086-09. Epub 2009 Dec 28. PMID: 20038698; PMCID: PMC2820941.

122. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 2010 Apr 1;201(7):1096-104. doi: 10.1086/651135. PMID: 20196657.

123. Delbrück M. THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE AND LYSIS OF THE HOST. *J Gen Physiol.* 1940 May 20;23(5):643-60. doi: 10.1085/jgp.23.5.643. PMID: 19873180; PMCID: PMC2237944.

124. D'Herelle, M. F.. "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques." (1961).

125. Doekes HM, Mulder GA, Hermsen R. Repeated outbreaks drive the evolution of bacteriophage communication. *Elife.* 2021 Jan 18;10:e58410. doi: 10.7554/eLife.58410. PMID: 33459590; PMCID: PMC7935489.

126. Doorduyn, Dennis & Rooijackers, Suzan & Schaik, Willem & Bardoel, Bart. (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology.* 221. 10.1016/j.imbio.2016.06.014.

127. Dor-On, Eyal, and Beka Solomon. "Targeting glioblastoma via intranasal administration of Ff bacteriophages." *Frontiers in microbiology* vol. 6 530. 27 May. 2015, doi:10.3389/fmicb.2015.00530

128. Draft Genome Sequences of 12 *Histophilus somni* Strains Isolated from Feedlot Cattle in Alberta, Canada / M. M. Nazari, K. Bhatt, K. Liljebjelke [et al.] // *Microbiology Resource Announcements*. – 2019. – Vol. 8. – No 46. – P. e00864-19. – DOI 10.1128/MRA.00864-19. – EDN SNFMNC.

129. Drobiazko, Alena et al. "Molecular basis of foreign DNA recognition by BREX anti-phage immunity system." *Nature communications* vol. 16,1 1825. 20 Feb. 2025, doi:10.1038/s41467-025-57006-2

130. Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Bocer T, Empel J, Kropinski AM. Isolation and characterisation of KP34--a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 May;90(4):1333-45. doi: 10.1007/s00253-011-3149-y. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21327407; PMCID: PMC3082699.

131. Drzewiecka, Dominika. "Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments." *Microbial ecology* vol. 72,4 (2016): 741-758. doi:10.1007/s00248-015-0720-6

132. Dzuliashvili, M et al. "Study of therapeutic potential of the experimental *Pseudomonas* bacteriophage preparation." *Georgian medical news*, 147 (2007): 81-8

133. Edible vaccine development: stability of *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 during post-harvest processing and storage of field-grown transgenic white clover / R. W. H. Lee, A. N. Pool, A. Ziauddin [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2003. – Vol. 11. – No 4. – P. 259-266.

134. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) et al. "Safety and efficacy of a feed additive consisting of the bacteriophages PCM F/00069, PCM F/00070, PCM F/00071 and PCM F/00097

(Bafasal®) for all poultry (Proteon Pharmaceuticals S.A.).” EFSA journal. European Food Safety Authority vol. 22,12 e9132. 16 Dec. 2024, doi:10.2903/j.efsa.2024.9132

135. Einck, K H et al. “Isolation and characterization of a bacteriophage of *Arthrobacter globiformis*.” *Journal of virology* vol. 12,5 (1973): 1031-3. doi:10.1128/JVI.12.5.1031-1033.1973

136. Emikpe, B. O. et al. “Intranasal Inactivated Recombinant *Mannheimia hemolytica* Vaccine is not protective against naturally occurring Pneumonia in Nigerian Goats.” *African Journal of Biomedical Research* 16 (2013): 185-191.

137. Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G, Sorek R. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):488-493. doi: 10.1038/nature21049. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28099413; PMCID: PMC5378303.

138. Erol HB, Kaskatepe B, Ozturk S, Safi Oz Z. The comparison of lytic activity of isolated phage and commercial Intesti bacteriophage on ESBL producer *E. coli* and determination of Ec_P6 phage efficacy with in vivo *Galleria mellonella* larvae model. *Microb Pathog.* 2022 Jun;167:105563. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105563. Epub 2022 May 2. PMID: 35513294.

139. EUCAST Disk Diffusion Manual <https://www.eucast.org/>

140. Feizi S, Cooksley CM, Bouras GS, Prestidge CA, Coenye T, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. Colloidal silver combating pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA in chronic rhinosinusitis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2021 Jun;202:111675. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111675. Epub 2021 Mar 4. PMID: 33690064.

141. Feizi, Sholeh & Cooksley, Clare & Ramezanpour, Mahnaz & Nepal, Roshan & Psaltis, Alkis & Wormald, Peter-John & Vreugde, Sarah. (2023). Colloidal silver against macrophage infections and biofilms of atypical mycobacteria. *BioMetals*. 36. 1-13. 10.1007/s10534-023-00494-w.

142. Ferrer MD, Quiles-Puchalt N, Harwich MD, Tormo-Más MÁ, Campoy S, Barbé J, Lasa I, Novick RP, Christie GE, Penadés JR. RinA controls phage-mediated packaging and transfer of virulence genes in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2011 Aug;39(14):5866-78. doi: 10.1093/nar/gkr158. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21450808; PMCID: PMC3152322.

143. Figiel, Małgorzata et al. “Mechanism of protein-primed template-independent DNA synthesis by Abi polymerases.” *Nucleic acids research* vol. 50,17 (2022): 10026-10040. doi:10.1093/nar/gkac772

144. Figueroa-Valenzuela C, Montes-García JF, Vazquez-Cruz C, Zenteno E, Pereyra MA, Negrete-Abascal E. *Mannheimia haemolytica* OmpH binds fibrinogen and fibronectin and participates in biofilm formation. *Microb Pathog.* 2022 Nov;172:105788. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105788. Epub 2022 Sep 17. PMID: 36126788.

145. Fornelos, Nadine et al. “Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue.” *Nucleic acids research* vol. 46,18 (2018): 9432-9443. doi:10.1093/nar/gky646

146. Friedlaender, Dr. C.. “Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie.” *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 87 (2005): 319-324.

147. Fuller, D.N., Rickgauer, J.P., Jardine, P.J., Grimes, S.N., Anderson, D.L., & Smith, D. (2007). Ionic effects on viral DNA packaging and portal motor function in bacteriophage ϕ 29. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 11245 - 11250.

148. Giltner CL, van Schaik EJ, Audette GF, Kao D, Hodges RS, Hassett DJ, Irvin RT. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol.* 2006 Feb;59(4):1083-96. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05002.x. Erratum in: *Mol Microbiol.* 2006 May;60(3):813. PMID: 16430686.

149. Goggin R, Jardeleza C, Wormald PJ, Vreugde S. Colloidal silver: a novel treatment for *Staphylococcus aureus* biofilms? *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014 Mar;4(3):171-5. doi: 10.1002/alr.21259. Epub 2014 Jan 15. PMID: 24431107.
150. Goldfarb, Tamara et al. "BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes." *The EMBO journal* vol. 34,2 (2015): 169-83. doi:10.15252/embj.201489455
151. Gonzalez, Alejandro & Hernández-Pérez, Jesús & Iqbal, Hafiz & Rito-Palomares, Marco & Benavides Lozano, Jorge. Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery. *Vaccines*/ 2020. 8. 10.3390/vaccines8030504.
152. Guillon, Antoine et al. "Inhaled bacteriophage therapy in a porcine model of pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* during mechanical ventilation." *British journal of pharmacology* vol. 178,18 (2021): 3829-3842. doi:10.1111/bph.15526
153. Hadano, Yoshiro. (2013). String test. *BMJ case reports*. 2013. 10.1136/bcr-2012-008328.
154. Hagens, Steven, and Martin J Loessner. "Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol." *Frontiers in microbiology* vol. 5 159. 10 Apr. 2014, doi:10.3389/fmicb.2014.00159
155. HaqI.U., Chaudhry W.N., AkhtarM.N.,AndleebS., QadriI. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virology* 2012; 9: 9. doi: 10.1186/1743-422X-9-9.
156. Harada, Liliam K et al. "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art." *Microbiological research* vol. 212-213 2018: 38-58. doi:10.1016/j.micres.2018.04.007
157. Hobbs, Zack, and Stephen T Abedon. "Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'." *FEMS microbiology letters* vol. 363,7 (2016): fnw047. doi:10.1093/femsle/fnw047
158. Inamoto I, Lo RY. Identification of putative two-component regulatory systems in the bovine pathogen *Mannheimia haemolytica* A1, and preliminary

characterization of the NarQ/P system. FEMS Microbiol Lett. 2010 Oct;311(1):27-35. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02076.x. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20722734.

159. Inamoto, I. A proteomic analysis of the regulon of the NarP two-component regulatory system response regulator in the bovine pathogen *Mannheimia haemolytica* A1 / I. Inamoto, R. L. Y. C. Lo // BMC Research Notes. – 2011. – Vol. 4. – P. 510. – DOI 10.1186/1756-0500-4-510.

160. Isaev, Artem B et al. “Microbial Arsenal of Antiviral Defenses - Part I.” Biochemistry. Biokhimiia vol. 86. 2021: 319-337. doi:10.1134/S0006297921030081

161. Ishino, Yoshizumi et al. “History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology.” Journal of bacteriology vol. 200,7 e00580-17. 12 Mar. 2018, doi:10.1128/JB.00580-17

162. Jánosi K, Stipkovits L, Glávits R, Molnár T, Makrai L, Gyuranecz M, Varga J, Fodor L. Aerosol infection of calves with *Histophilus somni*. Acta Vet Hung. 2009 Sep;57(3):347-56. doi: 10.1556/AVet.57.2009.3.1. PMID: 19635707.

163. Jaworski MD, Hunter DL, Ward AC. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J Vet Diagn Invest. 1998 Jan;10(1):49-55. doi: 10.1177/104063879801000109. PMID: 9526860.

164. Jesse FFA, Amira NA, Isa KM, Maqbool A, Ali NM, Chung ELT, Lila MAM. Association between *Mannheimia haemolytica* infection with reproductive physiology and performance in small ruminants: A review. Vet World. 2019 Jul;12(7):978-983. doi: 10.14202/vetworld.2019.978-983. Epub 2019 Jul 6. PMID: 31528021; PMCID: PMC6702557.

165. Jeyaseelan, S. Molecular basis for cellular and species-specificity of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin / S. Jeyaseelan, 2002. – 1 p.

166. Jiang, Aoyu et al. “Prospects and Challenges of Bacteriophage Substitution for Antibiotics in Livestock and Poultry Production.” Biology vol. 13,1 28. 4 Jan. 2024, doi:10.3390/biology13010028

167. Kaoud, Hussein Abdelhay and A. Nasr. Occurrence of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi* Among Ruminants in Egypt 2010.
168. Kapustin, A. V. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia haemolytica* / A. V. Kapustin, A. I. Laishevtcev // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2016. – No 4(52). – P. 3-12. – DOI 10.18551/rjoas.2016-04.01.
169. Katalin, Janosi, Fodor, László *Histophilus somni* literature review Part 1. Magyar Allatorvosok Lapja. 132. 67-76, 2010.
170. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Tsuboi T, Eguchi M. Molecular typing of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotype A1 isolates from cattle in Japan. *Epidemiol Infect.* 2003 Oct;131(2):939-46. doi: 10.1017/s0950268803008951. PMID: 14596536; PMCID: PMC2870039.
171. Kazi TA, Biswas SR. CRISPR/dCas system as the modulator of gene expression. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2021;178:99-122. Doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.12.002. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33685602.
172. Khanal, Dipesh et al. “Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections.” *International journal of pharmaceutics* vol. 609 (2021): 121206. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121206
173. Kheybari S, Samadi N, Hosseini SV, Fazeli A, Fazeli MR. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. *Daru.* 2010;18(3):168-72. PMID: 22615613; PMCID: PMC3304363.
174. Kissling L, Monfort A, Swarts DC, Wutz A, Jinek M. Preparation and electroporation of Cas12a/Cpf1-guide RNA complexes for introducing large gene deletions in mouse embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 2019;616:241-263. Doi: 10.1016/bs.mie.2018.10.028. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30691645.
175. Kiyanchuk, M. V. Bacteriophage ISOLATION FOR THE TREATMENT OF PULMONARY DISEASES OF CATTLE / M. V. Kiyanchuk, A. A. Sukhinin // , 24–25 ноября 2022 года, 2022. – P. 491-492. – EDN IFEVZG.

176. Klima CL, Cook SR, Zaheer R, Laing C, Gannon VP, Xu Y, Rasmussen J, Potter A, Hendrick S, Alexander TW, McAllister TA. Comparative Genomic Analysis of *Mannheimia haemolytica* from Bovine Sources. *PLoS One*. 2016 Feb 29;11(2):e0149520. doi: 10.1371/journal.pone.0149520. PMID: 26926339; PMCID: PMC4771134.

177. Kumabe, Ayako & Kenzaka, Tsuneaki. (2014). String test of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 107. 10.1093/qjmed/hcu124.

178. Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010 May;55(3):221-7. doi: 10.1007/s12223-010-0032-7. Epub 2010 Jun 6. PMID: 20526833.

179. Kutter, Elizabeth & Sulakvelidze, Alexander & Summers, William & Guttman, Burton & Raya, Raul & Brüssow, Harald & Ecology, Phage & Carlson, Karin. (2004). *Bacteriophages: Biology and Applications*.

180. Laishevtcev, A. I. Features of biochemical identification and differentiation of *Mannheimia haemolytica* / A. I. Laishevtcev // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – 2016. – No 6(54). – P. 70-77. – DOI 10.18551/rjoas.2016-06.09.

181. Lawrence PK, Kittichotirat W, Bumgarner RE, McDermott JE, Herndon DR, Knowles DP, Srikumaran S. Genome sequences of *Mannheimia haemolytica* serotype A2: ovine and bovine isolates. *J Bacteriol*. 2010 Feb;192(4):1167-8. doi: 10.1128/JB.01527-09. Epub 2009 Dec 4. Erratum in: *J Bacteriol*. 2010 Oct;192(19):5272. PMID: 19966002; PMCID: PMC2812981.

182. Lawrence PK, Kittichotirat W, McDermott JE, Bumgarner RE. A three-way comparative genomic analysis of *Mannheimia haemolytica* isolates. *BMC Genomics*. 2010 Oct 4;11:535. doi: 10.1186/1471-2164-11-535. PMID: 20920355; PMCID: PMC3091684.

183. León M, Bastías R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front Microbiol.* 2015 Apr 23;6:343. doi: 10.3389/fmicb.2015.00343. PMID: 25954266; PMCID: PMC4407575.
184. Li J, Clinkenbeard KD. Lipopolysaccharide complexes with *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2920-7. doi: 10.1128/IAI.67.6.2920-2927.1999. PMID: 10338500; PMCID: PMC96601.
185. Liu H, Soyars CL, Li J, Fei Q, He G, Peterson BA, Meyers BC, Nimchuk ZL, Wang X. CRISPR/Cas9-mediated resistance to cauliflower mosaic virus. *Plant Direct.* 2018 Mar 7;2(3):e00047. Doi: 10.1002/pld3.47. PMID: 31245713; PMCID: PMC6508564.
186. Lo RY, Sorensen LS. The outer membrane protein OmpA of *Mannheimia haemolytica* A1 is involved in the binding of fibronectin. *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Sep;274(2):226-31. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00830.x. Epub 2007 Jun 30. PMID: 17608694.
187. Lo RY. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* A1. *Vet Microbiol.* 2001 Oct 22;83(1):23-35. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00374-1. PMID: 11524163.
188. Łoś M, Węgrzyn G. Pseudolysogeny. *Adv Virus Res.* 2012;82:339-49. doi: 10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4. PMID: 22420857.
189. Ludman, Márta et al. "Hierarchical contribution of Argonaute proteins to antiviral protection." *Journal of experimental botany* vol. 74,21 (2023): 6760-6772. doi:10.1093/jxb/erad327
190. Ma, Yanyan et al. "Isolation and molecular characterisation of *Achromobacter* phage phiAxp-3, an N4-like bacteriophage." *Scientific reports* vol. 6 24776. 20 Apr. 2016, doi:10.1038/srep24776
191. Makarova KS, Wolf YI, Snir S, Koonin EV. Defense islands in bacterial and archaeal genomes and prediction of novel defense systems. *J Bacteriol.* 2011 Nov;193(21):6039-56. doi: 10.1128/JB.05535-11. Epub 2011 Sep 9. PMID: 21908672; PMCID: PMC3194920.

192. Mann N, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M. Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*. 2003;424:741. doi: 10.1038/424741a.
193. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease / J. A. Rice, L. Carrasco-Medina, D. C. Hodgins, P. E. Shewen // *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. – 2008. – Vol. 8. – No 2. – P. 117-128. – DOI 10.1017/S1466252307001375.
194. Manos, Jim & Belas, Robert. (2006). The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. 10.1007/0-387-30746-X_12.
195. Marintcheva, Borianna. (2018). Viral Tools for Genome Manipulations In Vivo. 10.1016/B978-0-12-810514-6.00003-9.
196. Mason C, Errington J, Foster G, Thacker J, Grace O, Baxter-Smith K. Mannheimia haemolytica serovars associated with respiratory disease in cattle in Great Britain. *BMC Vet Res*. 2022 Jan 3;18(1):5. doi: 10.1186/s12917-021-03121-3. PMID: 34980139; PMCID: PMC8722318.
197. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Apr;4(2):191-206. doi: 10.1128/CMR.4.2.191. PMID: 1906371; PMCID: PMC358191.
198. Mestre, Mario Rodríguez et al. “UG/Abi: a highly diverse family of prokaryotic reverse transcriptases associated with defense functions.” *Nucleic acids research* vol. 50,11 (2022): 6084-6101. doi:10.1093/nar/gkac467
199. Methodological comparisons for antimicrobial resistance surveillance in feedlot cattle / K. M. Benedict, P. S. Morley, S. P. Gow [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2013. – Vol. 9. – P. 216. – DOI 10.1186/1746-6148-9-216.
200. Mishra M, Byrd MS, Sergeant S, Azad AK, Parsek MR, McPhail L, Schlesinger LS, Wozniak DJ. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated

opsonization. *Cell Microbiol.* 2012 Jan;14(1):95-106. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x. Epub 2011 Nov 10. PMID: 21951860; PMCID: PMC4466118.

201. Mondigler, M et al. "Identification of the receptor-binding regions of pb5 proteins of bacteriophages T5 and BF23." *Virology* vol. 219,1 (1996): 19-28. doi:10.1006/viro.1996.0218

202. Moore SJ, O'Dea MA, Perkins N, O'Hara AJ. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2015 Jan;27(1):6-17. doi: 10.1177/1040638714559741. PMID: 25525134.

203. Morello E, Saussereau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One.* 2011 Feb 15;6(2):e16963. doi: 10.1371/journal.pone.0016963. PMID: 21347240; PMCID: PMC3039662. Abdulrahman, Rezheen F, and Robert L Davies. "Diversity and characterization of temperate bacteriophages induced in *Pasteurella multocida* from different host species." *BMC microbiology* vol. 21,1 97. 30 Mar. 2021, doi:10.1186/s12866-021-02155-9

204. Moyer ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses.* 2018 Apr 19;10(4):205. doi: 10.3390/v10040205. PMID: 29671810; PMCID: PMC5923499.

205. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* 2014 Jul;68(1):1-12. doi: 10.1007/s00248-013-0297-x. Epub 2013 Oct 6. PMID: 24096885; PMCID: PMC3977026.

206. Negri, Alessandro et al. "Regulator-dependent temporal dynamics of a restriction-modification system's gene expression upon entering new host cells: single-cell and population studies." *Nucleic acids research* vol. 49,7 (2021): 3826-3840. doi:10.1093/nar/gkab183

207. Neğu, Alina Cristina et al. "Experimental approach for bacteriophage susceptibility testing of planktonic and sessile bacterial populations - Study protocol." *Germs* vol. 4,4 92-6. 1 Dec. 2014, doi:10.11599/germs.2014.1062
208. Novel E. coli Bacteriophage and Uses Thereof 2007
209. Novel E. coli Bacteriophages and Uses Thereof 2009
210. Odegrip, Richard et al. "Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages." *Journal of bacteriology* vol. 188,4 (2006): 1643-7. doi:10.1128/JB.188.4.1643-1647.2006
211. Oechslin, Frank. "Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy." *Viruses* vol. 10,7 351. 30 Jun. 2018, doi:10.3390/v10070351
212. Ofir, Gal et al. "DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities." *Nature microbiology* vol. 3,1 (2018): 90-98. doi:10.1038/s41564-017-0051-0
213. O'Leary, Michael L, and Lindsey P Burbank. "Natural Recombination among Type I Restriction-Modification Systems Creates Diverse Genomic Methylation Patterns among *Xylella fastidiosa* Strains." *Applied and environmental microbiology* vol. 89,1 (2023): e0187322. doi:10.1128/aem.01873-22
214. Ooi ML, Richter K, Bennett C, Macias-Valle L, Vreugde S, Psaltis AJ, Wormald PJ. Topical Colloidal Silver for the Treatment of Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis. *Front Microbiol.* 2018 Apr 11;9:720. doi: 10.3389/fmicb.2018.00720. PMID: 29696011; PMCID: PMC5905234.
215. Ørskov, Ida and Frits Ørskov. "4 Serotyping of *Klebsiella*." *Methods in Microbiology* 14 (1984): 143-164.
216. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998 May;28(3):449-61. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x. PMID: 9632250.

217. Overhage, Joerg et al. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation/ *Infection and immunity* vol. 76,9, 2008: 4176-82. doi:10.1128/IAI.00318-08
218. Palacios, Michelle, Christopher A. Broberg, Kimberly A. Walker and Virginia L. Miller. "A Serendipitous Mutation Reveals the Severe Virulence Defect of a *Klebsiella pneumoniae* fepB Mutant." *mSphere*, 2017: n. pag.
219. Park KH, An Y, Woo EJ. In vitro assembly of thermostable Csm complex in CRISPR-Cas type III/A system. *Methods Enzymol.* 2019;616:173-189. Doi: 10.1016/bs.mie.2018.10.025. Epub 2019 Jan 12. PMID: 30691642.
220. Park KH, An Y, Woo EJ. In vitro assembly of thermostable Csm complex in CRISPR-Cas type III/A system. *Methods Enzymol.* 2019;616:173-189. Doi: 10.1016/bs.mie.2018.10.025. Epub 2019 Jan 12. PMID: 30691642.
221. Payne, Leighton & Todeschini, Thomas & Wu, Yi & Perry, Benjamin & Ronson, Clive & Fineran, Peter & Nobrega, Franklin & Jackson, Simon. (2021). Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic acids research.* 49. 10.1093/nar/gkab883.
222. Payne, Robert J H, and Vincent A A Jansen. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clinical pharmacokinetics* vol. 42,4 (2003): 315-25. doi:10.2165/00003088-200342040-00002
223. Perera, Meenu N et al. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food microbiology* vol. 52 (2015): 42-8. doi:10.1016/j.fm.2015.06.006
224. Pesca, C. Enzootic pneumonia in sheep: ewe and lamb immune response after *Mannheimia haemolytica* vaccine administration under field condition in Italy/ C. Pesca, K. Forti, A. Felici, E. Scoccia, C. Forte, P. Antenucci, S. Muntoni, A. Lucia, A. Di Paolo, S. Crotti//C. Pesca et al. *Large Animal Review* 2020; 26: 73-76.

225. Petruzzi B, Inzana TJ. Exopolysaccharide Production and Biofilm Formation by *Histophilus somni*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;396:149-60. doi: 10.1007/82_2015_5013. PMID: 26853691.

226. Protein profiles of bacteriophages of the family Myoviridae-like induced on *M. haemolytica* / R. Urban-Chmiel, A. Wernicki, A. Puchalski [et al.] // *AMB Express*. – 2018. – Vol. 8. – No 1. – P. 102. – DOI 10.1186/s13568-018-0630-3.

227. Qureshi S, Saxena HM. Efficacy of bacteriophage Lysed *Pasteurella* marker vaccine in laboratory animal models with a novel DIVA for haemorrhagic septicaemia. *Saudi J Biol Sci*. 2019 Jan;26(1):141-147. Doi: 10.1016/j.sjbs.2017.05.001. Epub 2017 May 5. PMID: 30622418; PMCID: PMC6319188.

228. Rabbi, Fazle & Yasmin, Mahmuda & Nessa, Jamalun & Nabi, Ashikun & Chowdhury, Fatema & Otomo, Yoshimitsu & Ahsan, Chowdhury. Bovine Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 of Bangladesh: Is it capable of causing diseases similar to clinical strains?. *African journal of microbiology research*. 8. 147-154. 10.5897/AJMR2013.5964. 2014

229. Rahimi, Sara et al. Characterization of novel bacteriophage PSKP16 and its therapeutic potential against β -lactamase and biofilm producer strain of K2-Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* pneumonia infection in mice model. *BMC microbiology* vol. 23,1 233. 23 Aug. 2023, doi:10.1186/s12866-023-02979-7

230. Rajiv S, Drilling A, Bassiouni A, James C, Vreugde S, Wormald PJ. Topical colloidal silver as an anti-biofilm agent in a *Staphylococcus aureus* chronic rhinosinusitis sheep model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 Apr;5(4):283-8. doi: 10.1002/alr.21459. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25643830.

231. Ramakrishnan R, Singh AK, Singh S, Chakravorty D, Das D. Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. *J Biol Chem*. 2022 Sep;298(9):102352. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102352. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35940306; PMCID: PMC9478923.

232. Rao, Harinash et al. Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies/ Molecules (Basel, Switzerland) vol. 26,7 1870. 26 Mar. 2021, doi:10.3390/molecules26071870

233. Razazan A, Nicastro J, Slavcev R, Barati N, Arab A, Mosaffa F, Jaafari MR, Behravan J. Lambda bacteriophage nanoparticles displaying GP2, a HER2/neu derived peptide, induce prophylactic and therapeutic activities against TUBO tumor model in mice. *Sci Rep.* 2019 Feb 18;9(1):2221. Doi: 10.1038/s41598-018-38371-z. PMID: 30778090; PMCID: PMC6379380.

234. Recherches sur les organismes de la nitrification. Mémoire 4 / par m. S. Winogradsky. - Paris : Impr. Charaire et fils, - 9 p. - Отд. отт. из Annales de l'Institut Pasteur, v. 5, no. 2, 1891, p. 92-100.

235. Roy, Ranita et al. "Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action." *Virulence* vol. 9,1 (2018): 522-554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372

236. Rózalski, Antoni & Kwil, Iwona & Torzewska, Agnieszka & Baranowska, Magdalena & Stączek, Paweł. (2007). *Proteus bacilli: features and virulence factors*. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*. 61. 204-19.

237. Rozema, Erica A et al. "Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle." *Journal of food protection* vol. 72,2 (2009): 241-50. doi:10.4315/0362-028x-72.2.241

238. Rutkauskas M, Krivoy A, Szczelkun MD, Rouillon C, Seidel R. Single-Molecule Insight Into Target Recognition by CRISPR-Cas Complexes. *Methods Enzymol.* 2017;582:239-273. Doi: 10.1016/bs.mie.2016.10.001. Epub 2016 Dec 5. PMID: 28062037.

239. Ryan, Elizabeth M et al. "Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy." *The Journal of pharmacy and pharmacology* vol. 63,10 (2011): 1253-64. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x

240. Ryan, K. A. Characterization of a CACAG pentanucleotide repeat in *Pasteurella haemolytica* and its possible role in modulation of a novel type III restriction-modification system / K. A. Ryan, R. Y. C. Lo // *Nucleic Acids Research*. – 1999. – Vol. 27. – No 6. – P. 1505-1511. – DOI 10.1093/nar/27.6.1505.

241. Sandal I, Inzana TJ. A genomic window into the virulence of *Histophilus somni*. *Trends Microbiol.* 2010 Feb;18(2):90-9. doi: 10.1016/j.tim.2009.11.006. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20036125.

242. Scott JR, Krishnan R, Rotenberg BW, Sowerby LJ. The effectiveness of topical colloidal silver in recalcitrant chronic rhinosinusitis: a randomized crossover control trial. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017 Nov 25;46(1):64. doi: 10.1186/s40463-017-0241-z. PMID: 29178954; PMCID: PMC5702207.

243. Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Pattemore, P.K. *et al.* 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 10, 56 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-56>

244. Seal, Bruce & Volozhantsev, Nikolay & Oakley, Brian & Garrish, Johnna & Simmons, Mustafa & Svetoch, Edward & Siragusa, Gregory. (2012). Bacteriophages of *Clostridium perfringens*. 10.5772/33106.

245. Setta, Ahmed & Refaei, E & Salem, Heba. (2017). MANNHEIMIA (PASTEURELLA) HAEMOLYTICA INFECTION IN COMMERCIAL LAYERS; A CASE REPORT. 77. 241-246.

246. Shabbir, Muhammad A B et al. “Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenals.” *Frontiers in microbiology* vol. 7 1292. 17 Aug. 2016, doi:10.3389/fmicb.2016.01292

247. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine.* 2007 Jun;3(2):168-71. doi: 10.1016/j.nano.2007.02.001. Epub 2007 Apr 30. PMID: 17468052.

248. Sharma R, Pielstick BA, Bell KA, Nieman TB, Stubbs OA, Yeates EL, Baltrus DA, Grose JH. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front Microbiol.* 2019 Jul 23;10:1533. doi: 10.3389/fmicb.2019.01533. PMID: 31428059; PMCID: PMC6690015.

249. Shikh-Bardsiri H, Shakibaie MR. Antibiotic resistance pattern among biofilm producing and non producing *Proteus* strains isolated from hospitalized patients; matter of hospital hygiene and antimicrobial stewardship. *Pak J Biol Sci.* 2013 Nov 15;16(22):1496-502. doi: 10.3923/pjbs.2013.1496.1502. PMID: 24511691.

250. Shirbroun RM. *Histophilus somni*: Antigenic and Genomic Changes Relevant to Bovine Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2020 Jul;36(2):279-295. doi: 10.1016/j.cvfa.2020.02.003. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32327251.

251. Shishenko SF. To the issue of application of D'Herelle's bacteriophage in children surgery. *Select Art Azerbaijan Inst Micro Epidem* 1938; 6:107–14

252. Sisay T, Zerihun A. Diversity of *Mannheimia haemolytica* and *pasteurella trehalosi* serotypes from apparently healthy sheep and abattoir specimens in the highlands of Wollo, North East Ethiopia. *Vet Res Commun.* 2003 Jan;27(1):3-14. doi: 10.1023/a:1022088005887. PMID: 12625399.

253. SMITH GR. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. *Nature.* 1959 Apr 18;183(4668):1132-3. doi: 10.1038/1831132a0. PMID: 13657030.

254. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Apr;18:96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24657330.

255. Špakova A, Dalgėdienė I, Insodaitė R, Sasnauskienė A, Žvirblienė A, Petraitytė-Burneikienė R. vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated polytubes as a carrier for the presentation of foreign sequences. *Virus Res.* 2020 Dec;290:198194. Doi: 10.1016/j.virusres.2020.198194. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33058966.

256. Stern, Adi, and Rotem Sorek. "The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* vol. 33,1 (2011): 43-51. doi:10.1002/bies.201000071
257. Stewart PS. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015 Jun;3(3):10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014. PMID: 26185072; PMCID: PMC4507308.
258. Stoffels, Laura et al. "Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant biotechnology journal* vol. 15,9 (2017): 1130-1140. doi:10.1111/pbi.12703
259. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705. Epub 2002 Jan 30. PMID: 12142477.
260. Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, Gilmore WC, Briggs RE, Loan RW. Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3291-8. doi: 10.1128/JCM.38.9.3291-3298.2000. PMID: 10970373; PMCID: PMC87376.
261. Sui, Bingrui et al. Synergistic action of mucoactive drugs and phages against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology spectrum* vol. 13,3 (2025): e0160124. doi:10.1128/spectrum.01601-24
262. Takemura-Uchiyama, Iyo et al. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice/ *Microbes and infection* vol. 16,6 (2014): 512-7. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.011
263. Talavera-Gonzalez, Juan & Talavera-Rojas, Martín. Bacteriófagos, los virus come-bacterias: historia de dos mentes científicas. *Revista Digital Universitaria.* 22. 2021,10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.5.9.
264. Tang, Xiang et al. "Lysogenic bacteriophages encoding arsenic resistance determinants promote bacterial community adaptation to arsenic

toxicity.” The ISME journal vol. 17,7 (2023): 1104-1115. doi:10.1038/s41396-023-01425-w

265. Tefera, G. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella* sensu stricto as new genus *Mannheimia*: Changes in taxonomy/G. Tefera, J. Smola// January 2001 *Veterinárni Medicína* 46(4):119-124 DOI:10.17221/7864-VETMED

266. Thumbikat P, Dileepan T, Kannan MS, Maheswaran SK. Characterization of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* leukotoxin interaction with bovine alveolar macrophage beta2 integrins. *Vet Res.* 2005 Sep-Dec;36(5-6):771-86. doi: 10.1051/vetres:2005036. PMID: 16120252.

267. Urban-Chmiel, Renata et al. Isolation and Characterization of Lytic Properties of Bacteriophages Specific for *M. haemolytica* Strains. *PloS one* vol. 10,10 e0140140. 9 Oct. 2015, doi:10.1371/journal.pone.0140140

268. van der Vinne, Amanda N, Reggie Y. C. Lo and Patricia E. Shewen. “Construction and analysis of a *Mannheimia haemolytica* A1 luxS mutant.” *Veterinary microbiology* 110 1-2/ 2005: 53-66.

269. Van Driessche L, Vanneste K, Bogaerts B, De Keersmaecker SCJ, Roosens NH, Haesebrouck F, De Cremer L, Deprez P, Pardon B, Boyen F. Isolation of Drug-Resistant *Gallibacterium anatis* from Calves with Unresponsive Bronchopneumonia, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2020 Apr;26(4):721–30. doi: 10.3201/eid2604.190962. PMID: 32186507; PMCID: PMC7101127.

270. Vehring, Reinhard. “Pharmaceutical particle engineering via spray drying.” *Pharmaceutical research* vol. 25,5 (2008): 999-1022. doi:10.1007/s11095-007-9475-1

271. Verbeken G, Pirnay JP, Lavigne R, Jennes S, De Vos D, Casteels M, Huys I. Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014 Apr;62(2):117-29. doi: 10.1007/s00005-014-0269-y. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24500660; PMCID: PMC3950567.

272. Vila Domínguez A, Ayerbe Algaba R, Miró Canturri A, Rodríguez Villodres Á, Smani Y. Antibacterial Activity of Colloidal Silver against Gram-

Negative and Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics* (Basel). 2020 Jan 19;9(1):36. doi: 10.3390/antibiotics9010036. PMID: 31963769; PMCID: PMC7167925.

273. Vishwanath N, Whitaker C, Allu S, Clippert D, Jouffroy E, Hong J, Stone B, Connolly W, Barrett CC, Antoci V, Born CT, Garcia DR. Silver as an Antibiotic-Independent Antimicrobial: Review of Current Formulations and Clinical Relevance. *Surg Infect (Larchmt)*. 2022 Nov;23(9):769-780. doi: 10.1089/sur.2022.229. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36178480.

274. Xiong, Huizhong et al. Distinct Contributions of Neutrophils and CCR2+ Monocytes to Pulmonary Clearance of Different *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Infection and immunity* vol. 83,9 (2015): 3418-27. doi:10.1128/IAI.00678-15

275. Yukawa S, Tsuyuki Y, Sato T, Fukuda A, Usui M, Tamura Y. Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Dogs and Cats in Primary Veterinary Hospitals in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2017 Jul 24;70(4):461-463. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.536. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28367887.

276. Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turk J Med Sci*. 2018 Feb 23;48(1):162-167. doi: 10.3906/sag-1707-3. PMID: 29479978.

277. Zecchinon, L. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism / L. Zecchinon, T. Fett, D. Desmecht // *Veterinary Research*. – 2005. – Vol. 36. – No 2. – P. 133-156. – DOI 10.1051/vetres:2004065.

278. Zhang J, Hoedt EC, Liu Q, Berendsen E, Teh JJ, Hamilton A, O'Brien AW, Ching JYL, Wei H, Yang K, Xu Z, Wong SH, Mak JWY, Sung JJY, Morrison M, Yu J, Kamm MA, Ng SC. Elucidation of *Proteus mirabilis* as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. *Gastroenterology*. 2021 Jan;160(1):317-330.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2020.09.036. Epub 2020 Oct 2. PMID: 33011176.

279. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 13;17(9):1534. doi: 10.3390/ijms17091534. PMID: 27649147; PMCID: PMC5037809.

280. Zhou WY, Sun SF, Zhang YS, Hu Q, Zheng XF, Yang ZQ, Jiao XA. Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage for Controlling *Salmonella* Enteritidis Growth in Ready-to-Eat Mixed-Ingredient Salads. *J Food Prot.* 2021 Sep 1;84(9):1629-1639. doi: 10.4315/JFP-20-460. PMID: 33793776.

281. Žiemytė M, Carda-Diéguez M, Rodríguez-Díaz JC, Ventero MP, Mira A, Ferrer MD. Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth dynamics and persister cells' eradication. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):2062-2075. doi: 10.1080/22221751.2021.1994355. PMID: 34663186; PMCID: PMC8583918.

282. Zizzo, N. Bacteriological and anatomic-histopatologic investigations on sea turtles beached in Peninsula Salentina coast. / N. Zizzo, G. Normanno, A. Perillo A, G. Marzano // *Summa.* – 2003. – 20(4). – P. 29-34.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Справки о внедрении**СПРАВКА**

О внедрении результатов диссертационного исследования

Киянчук Маргариты Владимировны

СПК «БУДОГОЩЬ» подтверждает, что Киянчук М.В. успешно применила «Пиобактериофаг комплексный» (*Pyobacteriophage complex*, АО «НПО Микроген») на телятах путём интраназального введения.

Главный врач СПК «БУДОГОЩЬ»



Е.Г. Островских

«20» февраля 2025 г.

Компания Закрытое акционерное общество «Березовское» зарегистрирована по адресу обл. Ленинградская, м.р-н Киришский, д. Кусино, ул. Центральная, д. 18. Краткое наименование: ЗАО «Березовское». При регистрации организации присвоен ОГРН 1024701479868, ИНН 4708000051 и КПП 472701001. Юридический адрес: обл. Ленинградская, м.р-н Киришский, д. Кусино, ул. Центральная, д. 18.

СПРАВКА

О внедрении результатов диссертационного исследования

Киянчук Маргариты Владимировны

ЗАО «Березовское» подтверждает, что Киянчук М.В. успешно применила композицию на основе коллоидного серебра и Пиобактериофага поливалентного очищенного (*Pyobacteriophage polyvalent purified*, «НПО Микроген») на телятах путём интраназального введения.

Директор ЗАО



Ярахмедов М.Я.

« 12 » мая 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины"; 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5

СПРАВКА

О внедрении в учебный процесс результатов диссертационного исследования Киянчук М.В.

Настоящим подтверждается, что результаты диссертационного исследования Киянчук М.В. «Интраназальное применение бактериофагов при бронхопневмониях теля инфекционной этиологии» обладают высокой актуальностью, представляют большой практический интерес и были внедрены в образовательную программу Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины".

Проректор по научной работе
и международным связям
Никитин Георгий Сергеевич



Дата: 07.11.2025

Приложение Б. Базы данных

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации базы данных
№ 2025625499

**Морфология негативных колоний вирулентного
бактериофага *Klebsiella pneumoniae***

Правообладатель: ***Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины" (RU)***

Авторы: ***Киянчук Маргарита Владимировна (RU), Сухинин
Александр Александрович (RU)***

Заявка № **2025624787**
Дата поступления **31 октября 2025 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных **26 ноября 2025 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2026620103

Оценка тенденции к образованию биоплёнки *Klebsiella pneumoniae* спектрофотометрическим методом

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины" (RU)*

Авторы: *Киянчук Маргарита Владимировна (RU), Сухинин Александр Александрович (RU), Борисова Мария Сергеевна (RU), Абгарян Сусанна Рафиковна (RU)*



Заявка № 2025626388

Дата поступления 23 декабря 2025 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 14 января 2026 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 00a570a4d7ca28521b448818a75f29506
Владелец **Зубов Юрия Сергеевич**
Действителен с 04.07.2025 по 28.11.2026

Ю.С. Зубов

Приложение В. Методические рекомендации

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ
И ОБРАЗОВАНИЯ**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Киянчук М.В., Сухини А.А.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**по интраназальному применению бактериофагов при бронхопневмониях
телят в условиях животноводческих комплексов**

Санкт-Петербург

2025

Методические рекомендации

УДК 615.032:578.81:616.24-002-053.2:636.2

Авторы:

Княнчук М.В. – ассистент кафедры биохимии и физиологии СПбГУВМ

Сухинин А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии СПбГУВМ

Рецензенты:

Кузьмин В. А. – доктор ветеринарных наук, профессор СПбГУВМ

Княнчук М.В. Методические указания по интраназальному применению бактериофагов при бронхопневмониях телят / М.В. Княнчук, А.А. Сухинин; МСХ РФ, СПбГУВМ. – Санкт-Петербург : Издательство СПбГУВМ, 2025. –19с.

Настоящие методические рекомендации включают в себя подробную схему интраназальной фаготерапии, применимой к телятам в условиях животноводческого комплекса, так же содержат актуальную информацию о лечении и профилактики крупного рогатого скота при поражении респираторной системы с применением фаготерапии. Методические указания рекомендованы для студентов ветеринарных факультетов, ветеринарных специалистов и курсов повышения квалификации.

Рекомендовано для издания методическим советом ФГБОУ ВО СПбГУВМ
Протокол № 10 от 17.12.2025