

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა

ბიოლოგია

ხათუნა მაკალათია

მულტირეზისტენტული *Salmonella* spp. - ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგების
გამოყოფა, მათი შესწავლა და თერაპიული პოტენციალის შეფასება

მისანიჭებელი კვალიფიკაცია - ბიოლოგიის დოქტორის

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნინა ჭანიშვილი
ბიოლოგიის მეცნიერებათა
დოქტორი

თბილისი
2020 წელი

Title of the dissertation thesis

**Isolation and Study of Bacteriophages Specific Against Multidrug Resistant
Salmonella spp. and Assessment of their Therapeutic Potential**

Khatuna Makalatia

The thesis work is performed to obtain a PhD academic degree in Biology

Scientific Supervisor: Nina Chanishvili
Ph.D

Tbilisi
2020 Year

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University
Faculty of Exact and Natural Sciences

Doctoral Program: Biology

ანოტაცია

Salmonella წარმოადგენს ყველგან გავრცელებულ (უბიკვიტარულ) ზრდადი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის მქონე ბაქტერიას, რომელსაც შეუძლია იცოცხლოს მშრალ გარემოში რამდენიმე კვირა, ხოლო წყალში რამდენიმე თვეც კი. სალმონელას სხვადასხვა სეროვარების მიერ გამოწვეული ინფექციები სერიოზულ საფრთხეს წარმოადგენს, როგორც ადამიანის, ისე ცხოველების ჯანმრთელობისათვის. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით ყოველწლიურად 550 მილიონი ადამიანი ავადდება თანდართული დიარეით მიმდინარე ინფექციებით, მათ შორის 220 მილიონი 5 წლამდე ბავშვია. არატიფოიდური *Salmonella enterica* კვებითი ინფექციების მთავარი გამომწვევაა როგორც განვითარებად, ასევე განვითარებულ ქვეყნებში. მზარდი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის ფონზე, სალმონელოზის მკურნალობის და პროფილაქტიკის ალტერნატიული გზების ძიება მსოფლიოსთვის ერთ-ერთი უმთავრესი გამოწვევაა. ასეთ ალტერნატიულ საშუალებად კი სულ უფრო ხშირად გამოიყენება ბაქტერიის ვირუსი ანუ ბაქტერიოფაგი. ჩვენი კვლევის მთავარი მიზანი *Salmonella*-ს კლინიკური და ვეტერინარული იზოლატების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია, მათი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის პროფილისა და ასევე ფაგო მგრძნობელობის შესწავლა, მათ მიმართ ახალი აქტიური ფაგების გამოყოფა და აღნიშნული ფაგების თერაპიული და პროფილაქტიკური პოტენციალის შეფასებაა.

მოცემული სამუშაოს ფარგლებში მოხდა *Salmonella* -ს შტამების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია, ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განსაზღვრა. 345 *Salmonella* spp. სავარაუდო იზოლატიდან საბოლოოდ კვლევისთვის გადაირჩა 239 შტამი, საქართველოდან, სომხეთიდან, ირლანდიიდან და 1 შტამი კონგოს დემოკრატიული რესპუბლიკიდან (ESBL- ფართო სპექტრის β -ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი შტამი - CTX-M-15.). შტამების იდენტიფიკაცია ჩატარდა მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიისა (MALDI-TOF MS) და სეროტიპირების მეთოდების გამოყენებით. ბაქტერიული იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობის განსაზღვრა მოხდა კირბი-ბაუერის იგივე დისკო-დიფუზური

მეთოდის გამოყენებით. სულ გამოვლინდა 40 ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილი, საიდანაც 35 კლინიკური შტამებისთვის იყო დამახასიათებელი.

აღნიშნული კოლექციის შტამების გამოყენებით მოხდა 13 ახალი ბაქტერიოფაგის გამოყოფა, მათი შესწავლა ბიოლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლების მიხედვით. ჩატარდა 12 ფაგის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრა და ანალიზი, რომლის საფუძველზეც მოხდა მათი კლასიფიკაცია და სასიცოცხლო ციკლის თავისებურების დადგენა (ვირულენტური, ზომიერი). ფაგების გენომის სექვენსისათვის გამოყენებულ იქნა ე.წ. „მომდევნო“ თაობის სექვენირების მეთოდი (Next generation sequencing technologies) (Klumpp, Fouts, & Sozhamannan, 2012). ფაგების ნაწილის სექვენსი განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით (Next generation sequencing technologies), ხოლო ფაგების მეორე ნაწილი დასექვენირდა - ნანოპორული სექვენირების (nanopore sequencing) ტექნოლოგიის, MinION მოწყობილობის გამოყენებით (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell); პირველი ტექნიკის გამოყენებით შესწავლილ იქნა Myoviridae-ს ოჯახის წარმომადგენელი შემდეგი ფაგები: - **vB_GEC_Mg**, **vB_GEC_Bs**, **vB_GEC_B3**, **vB_GEC_B1**, და **vB_GEC_NS7**, და ასევე Siphovoridae -ს ოჯახში გაერთიანებული ერთი ფაგი - **vB_GEC_N5**. ხოლო მეორე ტექნოლოგიის გამოყენებით შესწავლილ იქნა- Siphovoridae -ს მორფოლოგიური ტიპის 4 ფაგი: **vB_GEC_N8**, **vB_GEC_M4**, **vB_GEC_M5**, **vB_GEC_Hi**; Myoviridae ოჯახის 1 წარმომადგენელი: **vB_GEC_7A** და Podoviridae ოჯახის ერთი წარმომადგენელი - **vB_GEC_TR**. ერთი ფაგის (**vB_GEC_N3**) სექვენირება ტექნიკური მიზეზების გამო ვერ მოხერხდა. მიღებული შედეგების ანალიზმა აჩვენა, რომ 12 ფაგიდან მხოლოდ ერთი ფაგია ე.წ. ზომიერი ფაგი - **vB_GEC_TR**, იგი განეკუთვნება ოჯახს **Podoviridae**; გვარი - **Lederbergvirus**. ხოლო დანარჩენი 11 ფაგი ვირულენტურია, მათ გენომში არ იქნა ნანახი ლიზოგენობის განმაპირობებელი გენები. ისინი ენათესავებიან უკვე კარგად ცნობილ, შესწავლილ და სხვადასხვა ფაგურ პრეპარატებში შემავალ ვირულენტურ ფაგებს. ვირულენტურ ფაგებს შორის 6 Myoviridae -ს ოჯახის წარმომადგენელია - **vB_GEC_B1**, **vB_GEC_B3**, **vB_GEC_Mg**, **vB_GEC_Bs**, **vB_GEC_NS7**, **vB_GEC_7A**, ხოლო 5 Siphoviridae -ს ოჯახის -

vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_Hi, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5. მრავალრიცხოვანი *in vitro* ტესტების საფუძველზე დადგინდა, რომ **vB-GEC-B1, vB-GEC -Bs, vB-GEC-B3, vB-GEC-N3, vB-GEC-NS7, vB-GEC- N8** მაღალაქტიურ ფაგებს განეკუთვნებიან და მათი მოქმედების სპექტრი განისაზღვრა 60% დან 80 % მდე. აღნიშნული ფაგები უფრო ეფექტური აღმოჩნდნენ კლინიკური შტამების მიმართ (~90%), ვიდრე ვეტერინარული წარმოშობის შტამების მიმართ (~70%). შტამები, რომლებიც მგრძობელობას ავლენდნენ აღნიშნული ფაგების მიმართ, ძირითადად, *S. Typhimurium* და *S. Enteritidis* სეროვარებს მიეკუთვნებოდნენ და მეტწილად კლინიკური წარმომავლობის გახლდათ.

ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევაზე დაყრდნობით, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ფაგების, როგორც დამატებითი/დამხმარე ან ანტიბიოტიკის ალტერნატიული საშუალების გამოყენება მრავლობით რეზისტენტული *Salmonella* ინფექციების მიმართ მიზანშეწონილია და იმედის მომცემი. ფაგები ბუნებრივი, მაღალსპეციფიკური ანტიბაქტერიული აგენტებია, რომელთაც აქვთ უნარი მოახდინონ ბაქტერიული უჯრედის ლიზისი, მისი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის სტატუსის მიუხედავად. ამავდროულად, ანტიბიოტიკებისაგან განსხვავებით, ფაგები არავითარ ზიანს არ აყენებენ კომენსალურ მიკროფლორას. ჩვენი კვლევის ფარგლებში შესწავლილმა ფაგებმა აჩვენეს ძლიერი პოტენციალი მულტირეზისტენტული *Salmonella* ინფექციების წინააღმდეგ საბრძოლველად.

Abstract

Salmonella is a ubiquitous, increasingly resistant bacterium which can survive several weeks in a dry environment and even several months in water. Infections caused by various salmonella pose a serious threat to both human and animal health. According to the World Health Organization's report (WHO), 550 million people are infected with diarrhoea each year, including 220 million children under the age of five. Non-Typhoidal *Salmonella enterica* is a major cause of foodborne infections in both developing and developed countries. Antibiotic resistance is a major challenge for the whole world, and therefore the search for alternatives for the treatment and prevention of salmonellosis is very important.

Bacteriophages (phages) – viruses of bacteria - are increasingly considered as additional or complementary tools in the fight against multi drug resistant (MDR) bacteria.

The main goal of our study is to isolate and identify *Salmonella* clinical and veterinary isolates, study their antibiotic profiles as well as phage susceptibility, isolate new active phages specific to them, and assess their therapeutic potential.

Within the scope of the study, clinical non-typhoidal *Salmonella* were isolated in Armenia and Georgia and identified based on conventional microbiological methods and MALDI-TOF MS. These isolates were further analysed by serotyping (White-Kauffmann-Le Minor scheme) and their antimicrobial susceptibility profiles were defined. A total of 40 antibiotic resistance profiles were identified, of which 35 were characteristic of clinical strains. Out of a total of 345 isolates, 239 strains from Georgia, Armenia, Ireland and 1 strain from the Democratic Republic of Congo (ESBL-broad-spectrum β -lactamase-producing strain CTX-M-15) were eventually selected for our study.

Using the strains of this collection, 13 new bacteriophages were isolated, characterized by biological and genetic features. 12 phages were sequenced using two different methodologies – Next Generation Sequencing technologies and Nanopore sequencing. Based on the data

obtained, phages were classified and the peculiarities of their life cycle were determined (virulent-lytic, moderate-lysogenic).

Sequencing of the following phages – representatives of Myoviridae family (vB_GEC_MG, vB_GEC_BS, vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, and vB_GEC_NS7) and 1 member of Siphoviridae family - vB_GEC_N5, was performed by Next Generation Sequencing technologies. The second group of phages made of 4 members of Siphoviridae family (vB_GEC_N8, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5, vB_GEC_Hi) as well as 1 phage of the Myoviridae family (vB_GEC_7A) and one of podoviridae family (vB_GEC_TR) were sequenced using Nanopore sequencing technology. One phage (vB_GEC_N3) could not be sequenced due to technical reasons. Analysis of the results showed that only one of the 12 phages identified as temperate phage (vB_GEC_TR), it belongs to the family Podoviridae, genus-Laderbergvirus. While the other 11 phages are virulent, they are related to well-known and characterized phages, which are used in various phage preparations. Analysis of their genomes did not show any lysogeny associated genes. Among the virulent phages, 6 are members of Myoviridae family (vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, vB_GEC_MG, vB_GEC_BS, vB_GEC_NS7, vB_GEC_7A) and 5 of the Siphoviridae family (vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5, vB_GEC_Hi). *In vitro* tests revealed that the phages - vB_GEC_B1, vB_GEC_BS, vB_GEC_B3, vB_GEC_NS7, vB-GEC-N8 showed high activity (60% to 80%) against the examined strains. The phages have been shown to be more effective against clinical strains ($\approx 90\%$) than against veterinary strains ($\approx 70\%$). The strains susceptible to these phages were mainly *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* serovars and are largely of clinical origin. Based on our research we can conclude that the application of phages as an additional tool for the treatment of MDR *Salmonella* infections seems to be plausible. Phages are natural and specific antibacterial agents, which can lyse bacteria irrespective of their AMR status, whilst leaving the commensal microflora unharmed. This is one of the main advantages of phages in comparison to antibiotics. The phages tested in this study showed potential for application in phage therapy against MDR *Salmonella* infections.

| | |
|---|-----------|
| სარჩევი | |
| შესავალი..... | 11 |
| კვლევის მიზანი და ამოცანები | 13 |
| ლიტერატურული მიმოხილვა..... | 14 |
| თავი 1. <i>Salmonella</i> spp. დახასიათება | 14 |
| 1.1. აღმოჩენა, ტაქსონომია, მახასიათებლები, გავრცელება | 14 |
| 1.2. კლასიფიკაცია | 16 |
| 1.3. <i>Salmonella</i> spp. მოკლე მიმოხილვა..... | 17 |
| თავი 2. ტიფოიდური და არატიფოიდური სალმონელები..... | 18 |
| 2.1. ტიფოიდური სალმონელები (Typhoidal <i>Salmonella</i>)..... | 18 |
| 2.2. არატიფოიდური სალმონელები -Nontyphoidal <i>Salmonella</i> | 21 |
| 2.3. სალმონელას რეზისტენტობა ანტიბიოტიკების მიმართ | 23 |
| თავი 3. ბაქტერიოფაგები..... | 25 |
| 3.1. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და ფაგოთერაპიის ისტორია | 25 |
| 3.2. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია..... | 26 |
| 3.3. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია - ლიტიური და ლიზოგენური სასიცოცხლო ციკლი | 29 |
| 3.4. <i>Salmonella</i> - სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები | 31 |
| 3.5. <i>Salmonella</i> სპეციფიკური ფაგების გამოყენება ვეტერინარიისთვის, თერაპიისა და ბიოკონტროლისათვის | 38 |
| კვლევის მეთოდოლოგია | 47 |
| თავი 4. ბაქტერიული შტამების შესწავლისათვის გამოყენებული მეთოდები..... | 47 |
| 4.1. შტამების იდენტიფიკაციის მეთოდები..... | 47 |
| 4.1.1. კულტურალური მეთოდი..... | 47 |
| 4.1.2. ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის მეთოდი | 48 |
| 4.1.3. მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიის მეთოდი (MALDI-TOF MS) | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.4. სეროტიპირება..... | 49 |
| 4.1.5. ანტიბიოტიკო-მგრძნობელობის განსაზღვრა..... | 50 |
| 4.2. ბაქტერიოფაგების შესწავლისთვის გამოყენებული მეთოდები | 51 |
| 4.2.1. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა | 51 |
| 4.2.2. ბაქტერიოფაგების გამოვლენა ლაქების მეთოდით (Spot-test)..... | 52 |
| 4.2.3. ბაქტერიოფაგების გამოვლენა შტრიხების მეთოდით (Streak method)..... | 53 |
| 4.2.4. სუფთა ფაგური კლონის მიღება - ნეგატიური კოლონიების გაწმენდის მეთოდი | 54 |
| 4.2.5. ბაქტერიოფაგის აქტივობისა და მოქმედების სპექტრის განსაზღვრა..... | 55 |
| 4.2.6. ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა აპელმანის მეთოდის გამოყენებით | 55 |
| 4.2.7. ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრის ორშრიანი აგარის მეთოდი (გრაციას მეთოდი) | 56 |
| 4.3. ბაქტერიოფაგებისთვის პატრონი შტამის შერჩევა..... | 57 |
| 4.4. შტამის შემოწმება პროფაგების არსებობაზე მოდიფიცირებული „ფისკას“ მეთოდის გამოყენებით..... | 58 |
| 4.5. დათესვის ეფექტურობა..... | 59 |
| 4.6. კონცენტრირებული ბაქტერიოფაგის მომზადება..... | 61 |
| 4.7. ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია..... | 62 |
| 4.8. ბაქტერიოფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი | 62 |
| 4.8.1. ბაქტერიოფაგების პატრონი უჯრედზე ადსორბცია | 62 |
| 4.8.2. ბაქტერიოფაგის ლატენტური პერიოდისა და გამოსავლიანობის განსაზღვრა | 64 |
| 4.9. ბაქტერიოფაგების გამძლეობის (მდგრადობის) შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში..... | 65 |
| 4.10. ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა 4°C - ზე შენახვის პირობებში | 65 |
| 4.11. ბაქტერიოფაგის დნმ - ის გამოყოფა | 65 |
| 4.12. ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი | 66 |
| 4.13. ბაქტერიოფაგების პატრონი შტამების სექვენირება და ანალიზი..... | 68 |
| შედეგები..... | 68 |

| | |
|---|-------------------------------------|
| თავი 5. ბაქტერიული შტამების დახასიათება | 68 |
| 5.1. კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიული შტამები | 68 |
| 5.2. შტამების იდენტიფიკაცია და სეროტიპირება | 72 |
| 5.2.1 . <i>Salmonella</i> -ს საქართველოსა და სომხეთში გამოყოფილი შტამების ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობა | 75 |
| 5.3. „პატრონი შტამების“ შერჩევა და დახასიათება | 78 |
| 5.3.1. კვლევაში გამოყენებული ე.წ. პატრონი შტამების (host strains) პროფაგური პროფილები | 80 |
| 5.4. კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიოფაგები | 84 |
| 5.5. ფაგების შედარებითი დახასიათება | 135 |
| 5.6. ფაგების აქტივობა CTX-M-15 ფართო სპექტრის β- ლაქტამაზა წარმომქმნელი <i>Salmonella enterica</i> სეროვარ Typhi -ის მიმართ კონგოს დემოკრატიული რესპუბლიკიდან | 142 |
| 5.8. ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ ინფექციურ მოდელზე | 144 |
| 5.8.1. ცხოველური მოდელის შექმნა | 148 |
| დისკუსია/ინტერპრეტაცია | 156 |
| დასკვნები | Error! Bookmark not defined. |
| გამოყენებული ლიტერატურის სია | 172 |

შესავალი

ადამიანისათვის მაღალი რისკის შემცველი ინფექციები, მათ შორის არატიფოიდური სალმონელათი გამოწვეული ინფექციები, მეტწილად სხვადასხვა სახის საკვები პროდუქტების და წყლის მეშვეობით ვრცელდებიან. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით ყოველწლიურად 550 მილიონი ადამიანი ავადდება დიარეით მიმდინარე ინფექციებით, მათ შორის 220 მილიონი 5 წლამდე ბავშვია. ([https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)),2018).

Salmonella კვებისმიერი ინფექციების ერთერთი ძირითადი გამომწვევია. ანტიბიოტიკორეზისტენტობა არატიფოიდურ სალმონელაში ზრდადი პროცესია და მასზე დაკვირვება 1996 წლიდან მიმდინარეობს (States, 2013). 2017 წლიდან კი ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ (WHO) ფლუოროქვინოლონ-რეზისტენტული (Fluoroquinolone) *Salmonella spp.* შეტანილ იქნა მაღალ-პრიორიტეტულ პათოგენთა სიაში (Shrivastava, Shrivastava, & Ramasamy, 2018). ანტიბიოტიკების არაგონივრულად გამოყენებამ ვეტერინარიასა და სოფლის მეურნეობაში, მიგვიყვანა ზოონოზური *Salmonella* - ების მრავლობით რეზისტენტულობამდე. რეზისტენტული შტამების მიერ გამოწვეული ინფექციები კი ბევრად რთულად სამკურნალოა და შემთხვევათა უმეტესობა ჰოსპიტალიზაციას საჭიროებს (States, 2013). არატიფოიდული სალმონელათი გამოწვეული ინვაზიური ინფექციები გლობალურად არის გავრცელებული, მაგრამ შემთხვევათა რაოდენობა განსხვავდება გეოგრაფიული ადგილმდებარეობის მიხედვით, განსაკუთრებით გავრცელებულია იგი განვითარებად ქვეყნებში, მაგალითად, აფრიკის ქვეყნებში მისი მაჩვენებელი 79% აღწევს. (Pegues, Ohl, & Miller, 2006) არატიფოიდური სალმონელათი გამოწვეული ენტერიული ინფექციების დაახლოებით 1% რთულდება ბაქტერიემიის სახით, თუმცა ბაქტერიემიის ჭეშმარიტი მაჩვენებელი უცნობია, რადგან ბევრი ძირითადი ენტერალური ინფექცია მიკრობიოლოგიურად დიაგნოზირებულ არ არის. მამაკაცები, ახალშობილები და 65 წელს გადაცილებული ადამიანები უფრო ხშირად ავადდებიან ბაქტერიემიით.

თანხლები დაავადებები ზრდიან ბაქტერიემიით გართულების რისკს. (Shannon Katiyo, a Berit Muller-Pebody, Mehdi Minaji, b David Powell, c Alan P. Johnson, b Elizabeth De Pinna, c Martin Day, Ross Harris, & Gauri Godbolea, 2019) ცალკეული სეროვარები სხვებთან შედარებით უფრო ხშირად გვევლინებიან მსგავსი ინვაზიური ინფექციების გამომწვევებად. ამერიკის დაავადების კონტროლისა და პრევენციის ცენტრის (CDC) მიერ გაანალიზებულ იქნა 2004 – 2012 წლებში, სისხლისა და ფეკალური სინჯებიდან გამოყოფილი ნიმუშები, შემდგომ კი შეფასდა სხვადასხვა სეროტიპების ანტიბიოტიკორეზისტენტობა. აღმოჩნდა, რომ კლინიკურად მნიშვნელოვან, ანტიბიოტიკო რეზისტენტობის შემთხვევათა უმეტესობა (73%) უკავშირდება *Salmonella* -ს ოთხ ძირითად სეროვარს - Enteritidis, Newport, Typhimurium, and Heidelberg (Medalla et al., 2017). 2004-2015 წწ ინგლისში ჩატარებულმა კვლევამ, რომლის მიზანი იყო არატიფოიდული სალმონელათი გამოწვეული ინფექციების ეპიდემიოლოგიური მონაცემების შეფასება გამოავლინა სეროვარების: *S. Typhimurium* DT104, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Virchow, და *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar, მზარდი მნიშვნელობა ინვაზიური ინფექციების გამოწვევის თვალსაზრისით. ამავდროულად გამოვლინდა, რომ ამ პათოგენებისთვის დამახასიათებელია ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობა ქუინოლონების მიმართ (Shannon Katiyo et al., 2019).

არატიფოიდური *Salmonella enterica* კვებითი ინფექციების მთავარი გამომწვევია როგორც განვითარებად, ისე განვითარებულ ქვეყნებში, ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობაც უდიდესი გამოწვევაა მთელი მსოფლიოსათვის და, რასაკვირველია, ალტერნატიული საშუალებების ძიებაც სალმონელოზების მკურნალობისა და პროფილაქტიკისათვის უმნიშვნელოვანესია.

ბაქტერიოფაგებს ანუ ფაგებს დასავლეთში სულ უფრო ინტენსიურად განიხილავენ როგორც ძირითად ან დამხმარე/დამატებით საშუალებას მრავლობითად რეზისტენტული ბაქტერიების წინააღმდეგ ბრძოლისათვის. მიუხედავდ იმისა, რომ თითქმის საუკუნეა საქართველოში, პოლონეთსა და რუსეთში ფაგები გამოიყენება თერაპიული მიზნებისათვის (Anna et al., 2017) და შესაბამისად დიდი გამოცდილებაა

დაგროვილი ამ მიმართულებით, არსებული კომერციული პრეპარატების გლობალურად გამოყენება შეუძლებელია, რადგან ისინი არ აკმაყოფილებენ დასავლურ რეგულაციებს და სტანდარტებს ფარმაკოლოგიური პრეპარატების მიმართ. შესაბამისად, შეიქმნა აუცილებლობა, რომ ბაქტერიოფაგების საფუძველზე შექმნილი პრეპარატები უფრო ღრმად იქნეს შესწავლილი, მათი გენეტიკური, ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური თავისებურებების გათვალისწინებით.

ვინაიდან, ბაქტერიოფაგები მაღალსპეციფიკური, მაგრამ ადაპტირებადი ანტიმიკრობული აგენტები არიან, სამიზნე ინფექციების გამომწვევების კვლევა/მონიტორინგი, ეპიდემიოლოგიურად მართებული, კარგად დახასიათებული ბაქტერიებისა და კლინიკური იზოლატების კოლექციების შექმნას გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება, პოტენციური თერაპიული ფაგური პრეპარატების შექმნისა და წარმოებისათვის.

ჩვენი კვლევის მთავარი მიზანიც სწორედ *Salmonella* კლინიკური იზოლატების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია, მათი ანტიბიოტიკური პროფილის შესწავლა და ასევე ფაგო მგრძობელობის შესწავლა, მათ მიმართ ახალი აქტიური ფაგების გამოყოფა და მათი თერაპიული და პროფილაქტიკური პოტენციალის შეფასება არის.

კვლევის მიზანი და ამოცანები

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *Salmonella* - ს მრავლობით რეზისტენტული შტამების შეგროვება, შესწავლა და მათ მიმართ სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, მათი დახასიათება და თერაპიული პოტენციალის შესწავლა.

აღნიშნული მიზნის მისაღწევად სამუშაო რამდენიმე ეტაპად განხორციელდა:

1. კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი, ინფექციის გამომწვევი იზოლატების გასუთავება, იდენტიფიკაცია, ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილების შესწავლა და გენეტიკური დახასიათება.
2. იდენტიფიცირებული ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გარემოს ნიმუშებიდან.

- ინფექციის გამომწვევი იზოლატების ფაგო-მრგმნობელობის შესწავლა ჩვენს კოლექციაში არსებული და ახალგამოყოფილი ბაქტერიოფაგების გამოყენებით.
- გამოყოფილი ფაგების ბიოლოგიური დახასიათება და მათი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრა (სექვენსი).
- ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესწავლა *in vitro* პირობებში და *in vivo* ექსპერიმენტში.

ლიტერატურული მიმოხილვა

თავი 1. *Salmonella* spp. დახასიათება

1.1. აღმოჩენა, ტაქსონომია, მახასიათებლები, გავრცელება

Salmonella პირველად აღმოჩენილ იქნა 1880 წელს კარლ ებერტის მიერ პეიერის ფოლაქებში (Peyer's patches), ხოლო პათოგენის კულტივაცია სუფთა კულტურის სახით ტიფოიდური პაციენტების ელენტიდან პირველად მოახერხა ჯორჯ თეოდორ გაფკიმ. ერთი წლის შემდეგ მედიცინის მკვლევარმა, მეცნიერმა თეობალდ სმიტმა გამოყო ბაქტერია, რომელსაც მოგვიანებით ეწოდა *Salmonella enterica* (var. Choleraesuis). ამ დროისათვის სმიტი მუშაობდა აშშ სოფლის მეურნეობის დეპარტამენტის ვეტერინარულ დივიზიონში, რომლის ხელმძღვანელიც ვეტერინარი დანიელ ელმერ სალმონი იყო. თავდაპირველად, ითვლებოდა რომ *Salmonella Choleraesuis* იყო ღორის ქოლერის გამომწვევი აგენტი და სალმონმა და სმიტმა ამ აგენტს „Hog-cholera bacillus“- ი უწოდეს. სახელი *Salmonella* შემოთავაზებულ იქნა ჯოზეფ ლეონ ლინიერესის მიერ (Joseph Leon Lignières) 1900 წელს, პათოგენის აღმოჩენების, სალმონისა და მისი ჯგუფის საპატივსაცემოდ (Eberth et al. 2013);(Trüper et al., 2005).

გვარი *Salmonella* გაერთიანებულია *Enterobacteriaceae* - ების ოჯახში.

Enterobacteriaceae - გრამ-უარყოფითი ჩხირების ფართო, ჰეტეროგენული ჯგუფია, რომელთა ბუნებრივ საცხოვრებელ გარემოს ადამიანისა და ცხოველთა ნაწლავური ტრაქტი წარმოადგენს. *Enterobacteriaceae* - ების ოჯახი მოიცავს მრავალ გვარს (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, და სხვა). ზოგიერთი მათგანი, მაგალითად, *Escherichia coli*, ნორმული მიკროფლორის ნაწილს წარმოადგენს, თუმცა არსებობენ ამ სახეობის პათოგენური შტამებიც, რომლებიც გარკვეულ მძიმე დაავადებებს იწვევენმაშინ, როცა სხვა გვარების წარმომადგენლები როგორცაა *Salmonellae* და *Shigellae*, ადამიანის და ცხოველების პათოგენებს წარმოადგენენ. *Enterobacteriaceae* - ები ფაკულტატური ანაერობები ან აერობებია, ნახშირწყლების ფართო სპექტრის ფერმენტაციას ახდენენ, ფლობენ, კომპლექსურ ანტიგენურ სტრუქტურებს, წარმოქმნიან მრავალფეროვან ტოქსინებსა და გააჩნიათ სხვადასხვა ვირულენტობის ფაქტორები. შესაძლოა, იყვნენ როგორც მოძრავი, პერიტრიქული ფლაგელების მქონე, ისე უძრავი ფორმები; იზრდებიან პეპტონსა და ხორცის ექსტრაქტებზე; ახასიათებთ კარგი ზრდა მაკკონკის აგარზე (MacConkey agar); გლუკოზას გარდაქმნიან მჟავად, რასაც ხშირად აირის წარმოქმნაც თან ახლავს, არიან კატალაზა დადებითი, ოქსიდაზა უარყოფითი (გამონაკლისს წარმოადგენენ *Plesiomonas* -ები), აღადგენენ ნიტრატებს ნიტრიტებად. G+C (გუანინ ციტოზინის) შემცველობა დნმ ში - 39-59% - ია (Crump at al., 2015). მათი დიფერენცირებისთვის არსებობს ბიოქიმიური ტესტების ფართო სპექტრი. თუმცა, აღსანიშნავია, რომ მატრიცაში ლაზერის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს-სპექტროსკოპიის მეთოდი (matrix- assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy MALDI-TOF MS) თანდათანობით ანაცვლებს იდენტიფიკაციის ტრადიციულ მეთოდებს, შესაბამისად, აღნიშნული მეთოდი სულ უფრო ხშირად გამოიყენება კლინიკურ მიკრობიოლოგიურ ლაბორატორიებში. (Richardson & Smaill, 1998)

Enterobacteriaceae - ების ტაქსონომია კომპლექსური და ხშირად ცვალებადია. სულ აღწერილია 63 გვარი, თუმცა კლინიკურად მნიშვნელოვანი *Enterobacteriaceae* - ები მოიცავს 20-25 სახეობას.

Enterobacteriaceae-ებს აქვთ კომპლექსური ანტიგენური სტრუქტურა. მათი კლასიფიკაცია თერმო-სტაბილური სომატური O (ლიპოპოლისაქარიდების) ანტიგენების, თერმო-ლაბილური K (კაფსულის) ანტიგენებისა და H (ფლაგელის) ანტიგენების არსებობაზეა დამყარებული. ასევე ცნობილია Vi ანტიგენები, რომლებიც *Salmonella* -ს სეროტიპში Typhi, კაფსულის ანტიგენებს წარმოადგენენ.

1.2. კლასიფიკაცია

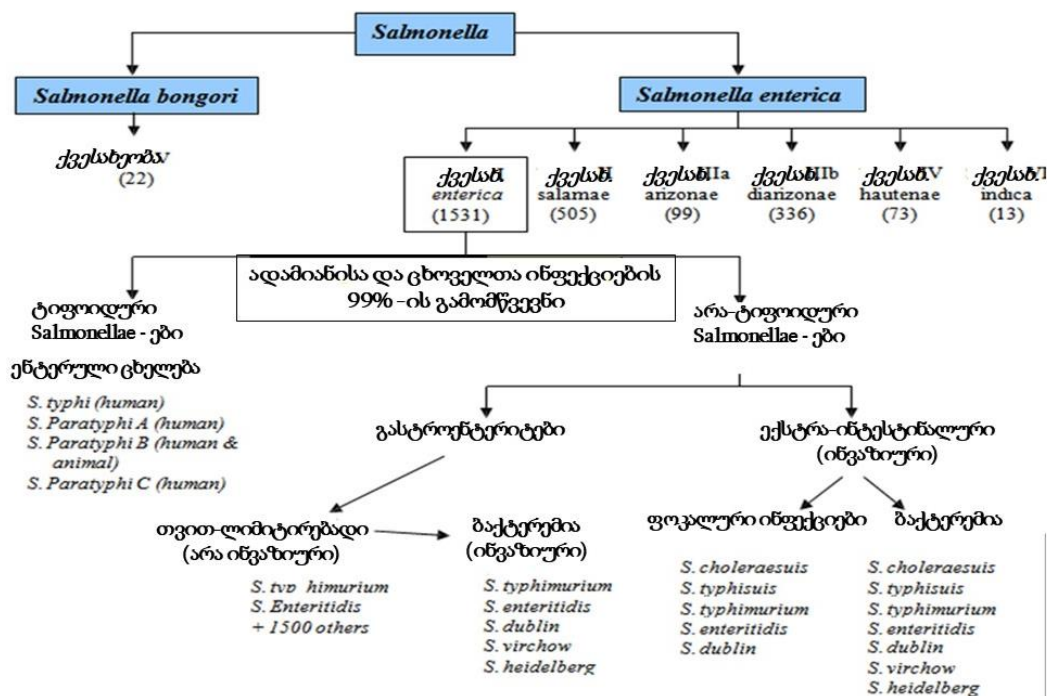
დღესდღეობით გვარი *Salmonella* იყოფა ორ სახეობად, ხოლო თითოეული სახეობა იყოფა ქვესახეობებად და სეროვარებად. სახეობებია: *Salmonella enterica* და *Salmonella bongori*.

Salmonella enterica მოიცავს ხუთ ქვესახეობას, რომლებიცაა: enterica (ქვესახეობა I), salamae (ქვესახეობა II), arizonae (ქვესახეობა IIIa), diarizonae (ქვესახეობა IIIb), houtenae (ქვესახეობა IV) და indica (ქვესახეობა VI) (იხ. სქემა #1). ადამიანის დაავადებათა უმეტესი წილი გამოწვეულია ქვესახეობა I - ის- *S. enterica* - ს შტამებით (*S. Enterica* subspecies *enterica*). იშვიათ შემთხვევაში ადამიანის ინფექციები შესაძლოა გამოიწვიოს IIIa და IIIb ან სხვა ქვესახეობების წარმომადგენლებმაც, რომლებიც უფრო ხშირად ცივისსხლიან ორგანიზმებში გვხვდება. *S. enterica* - ს ქვესახეობები ხშირად გვხვდება თბილსისხლიან ორგანიზმებსა და გარემოში. *S. bongori* - ის ქვესახეობები კი მეტწილად ცივისსხლიან ცხოველებში, კერძოდ კი რეპტილიებში გვხვდება.

Salmonellae წარმოდგენილია 2500 ზე მეტი სეროვარით, მათგან 1400 გაერთიანებულია დნმ ჰიბრიდიზაციის ჯგუფში I და იწვევს ადამიანის ინფექციებს. *Salmonellae*-ს 4 სეროტიპი, რომელიც იწვევს ნაწლავურ ინფექციას, შესაძლოა დადგენილ იქნეს კლინიკურ ლაბორატორიებში ბიოქიმიური და სეროლოგიური ტესტების გამოყენებით. ეს სეროვარებია: *Salmonella paratyphi* A (სეროჯგუფი A), *S. paratyphi* B (სეროჯგუფი B), *Salmonella choleraesuis* (სეროჯგუფი C1) და *S. typhi* (სეროჯგუფი D) (Achtman et al, 2012).

სქემა # 1.

გვარი *Salmonella* -ს კლასიფიკაცია



ფრჩხილებში მოცემულია თითოეულ ქვესახეობაში შემავალი სეროტიპების საერთო რიცხვი.

ჩამოთვლილია მხოლოდ ყველაზე გავრცელებული სეროტიპები, თუმცა სხვა სეროტიპებმაც შესაძლოა გამოიწვიონ ბაქტერემია და ფოკალური ინფექციები (Achtman et al., 2012).

1.3. *Salmonella* spp. მოკლე მიმოხილვა

Salmonella spp, წარმოადგენენ ფაკულტატურ ანაერობებს, უჯრედშიდა პათოგენებს. სალმონელას გვარის ბაქტერიები ფართოდ არიან გავრცელებული ბუნებაში. ისინი შესაძლოა შეგვხვდეს როგორც თბილსისხლიან, ისე ცივსისხლიან ცხოველებში. მრავალ ქვეყანაში ისინი წარმოადგენენ ადამიანში ბაქტერიული დიარეის გამომწვევ ყველაზე მნიშვნელოვან ბაქტერიას.

Salmonella enterica-ს სეროტიპები იყოფა ორ მთავარ ჯგუფად - ტიფოიდურ (Typhoidal) და არატიფოიდურ (Nontyphoidal) სალმონელებად. *Salmonella enterica*-ს სეროვარებს - *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, და Paratyphi C მოიხსენიებენ საერთო სახელწოდებით - ტიფოიდური სალმონელები (typhoidal *Salmonella*), მაშინ როცა სხვა დანარჩენი სეროვარები ჯგუფდებიან არატიფოიდური სალმონელების (ატს) (nontyphoidal *Salmonella* (NTS)) სახელწოდების ქვეშ. ტიფოიდური სალმონელები, რომლებიც ე. წ. პატრონ-სპეციფიკურ ბაქტერიებს წარმოადგენენ (host-restricted, specialist) და მათ ერთადერთ პატრონად ადამიანი ითვლება, სადაც ისინი იწვევენ ტიფოიდურ და პარატიფოიდურ ცხელებას ანუ ე. წ. ენტერალურ (ნაწლავურ) ცხელებას. სალმონელას არატიფოიდური შტამები კი - ე.წ. გენერალისტებს წარმოადგენენ (host generalists), რადგან შეუძლიათ ხერხემლიან ცხოველთა ფართო სპექტრის ინფიცირება და კოლონიზაცია (Feasey at al., 2012). არატიფოიდური სეროტიპები უფრო ხშირად გვხვდება და ჩვეულებრივ იწვევენ თვით-ლიმიტირებად, გასტროინტესტინალულ დაავადებებს. მათ შეუძლიათ ინფექციების გამოწვევა ცხოველთა ფართო დიაპაზონში. აღსანიშნავია, რომ ეს ინფექციები ხასიათდება ზოონოზურობით ანუ შესაძლებელია მათი გადაცემა ცხოველიდან ადამიანზე და პირიქით. ტიფოიდურ სეროვარები კი, როგორც ზემოთ ავლნიშნეთ, ადაპტირებულნი არიან ადამიანთა მიმართ და არ გვხვდებიან სხვა ცხოველებში.

თავი 2. ტიფოიდური და არატიფოიდური სალმონელები

2.1. ტიფოიდური სალმონელები (Typhoidal *Salmonella*)

ტიფოიდურ ინფექციებს (typhoid-like diseases) იწვევენ სალმონელას სეროვარები - *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B და C. დაავადების გავრცელება მეტწილად წყლისა და დაბინძურებული საკვების მეშვეობით ხდება. დაბალი და საშუალო შემოსავლის მქონე ქვეყნებში დაავადების გავრცელების რისკი ბევრად მაღალია, რადგან ხშირ შემთხვევაში ამ ქვეყნებისთვის სალმონელა ენდემურია, ვინაიდან არასაკმარისად არის დაცული სანიტარული და ასევე წყლისა და საკვების უსაფრთხოების ნორმები. მაღალ-

განვითარებულ ქვეყნებში ტიფოიდური ცხელებით მიმდინარე დაავადებები, ძირითადად, უკავშირდება მოგზაურობასა და კვების მრეწველობას (Crump et al., 2015). პათოგენის გადაცემა შესაძლებელია მოხდეს ადამიანიდან ადამიანზე. პათოგენი ორგანიზმში პერორალურად ხვდება და ვრცელდება სისხლის მეშვეობით. ინფიცირების დოზა დაბალია (10^2 - 10^3 -კწე/მლ). ხანმოკლე ინკუბაციის პერიოდის შემდეგ (რამდენიმე დღიდან 3 კვირამდე) თავს იჩენს მძიმე, ციკლური, გენერალიზებული ინფექცია, რომლისთვისაც დამახასიათებელია დიარეა, მაღალი ტემპერატურა. შესაძლოა თავი იჩინოს ნაწლავების, გულის, ღვიძლის, თირკმლების, ნაღვლის ბუშტის დაზიანებამაც. ტიფოიდური ინფექცია არ მიმდინარეობს ციებით/კანკალით, რაც აადვილებს მის იდენტიფიკაციას და განსხვავებას მალარიისაგან (Cunha et al., 2013). მნიშვნელოვნად განსხვავდება დაავადების მიმდინარეობა ბავშვებში. ზრდასრულებთან შედარებით გახშირებულია დიარეა და პირღებინება, აღინიშნება სიყვითლე, ფებრილური კონვულსიები, ნეფრიტები და ტიფოიდური მენინგიტები (Rawashdeh, 2014). ენტერალურმა (Enteric) ცხელებამ შესაძლოა გამოიწვიოს გართულებები ორსულებში და იშვიათ შემთხვევებში ნეონატალური ინფექციები (Touchan et al., 2009). აღსანიშნავია, რომ პარატიფოიდური ცხელება ტიფოიდურთან შედარებით ნაკლებად მძიმედ მიიჩნევა, თუმცა, ახალი კვლევების მიხედვით *Salmonella* Paratyphi A სულ უფრო მძიმე ფორმებით ვლინდება აზიის ქვეყნებში და შესაძლოა გამოიწვიოს დაავადებები, რომლებიც სიმძიმით უთანაბრდება *Salmonella* Typhi - ის მიერ გამოწვეულ დაავადებებს (Ochiai et al., 2005).

ქრონიკული მტარებლობა. *Salmonella* სეროვარი Typhi-ით ან Paratyphi A-თი გამოწვეული მწვავე ენეტერული ცხელების მქონე პაციენტების უმრავლესობა აგრძელებს აღნიშნული ბაქტერიების გამოყოფას შარდსა და განავალში ანტიმიკრობული თერაპიის დაწყებიდან რამდენიმე დღის განმავლობაში, პაციენტების დაახლოებით 10%-ში ეს დრო, შესაძლოა, 3 თვემდეც გაგრძელდეს. პაციენტების დაახლოებით 1-4 % 3 თვის შემდეგაც განაგრძობენ ბაქტერიის გამოყოფას. მათ, ვისაც ეს პროცესი 1 წლის მანძილზე უგრძელდებათ, „ქრონიკულ მტარებლებს“ უწოდებენ

("chronic carrier"). თუმცა, „ქრონიკული მტარებლების“ კვლევამ აჩვენა, რომ მათ ერთ მეოთხედს არ ქონდა გადატანილი მწვავე ენტერული ცხელება. ფეკალური მტარებლობა, ძირითადად, დამახასიათებელია ნაღვლის ბუშტის დაავადებების მქონე პაციენტებისათვის და უფრო ხშირად გვხვდება 40 წელს გადაცილებულ ქალებში. ქრონიკულ მტარებელთა უმრავლესობაში მდგომარეობა უსიმპტომოდ მიმდინარეობს, თუმცა, შემთხვევათა ნაწილში შესაძლებელია იგი მწვავე ინფექციურ დაავადებაში გადაიზარდოს. ქრონიკული მტარებლობა შეიძლება გამოწვეული იყოს როგორც *Salmonella* სეროვარი Typhi-ით ისე Paratyphi A-ით. აღსანიშნავია, რომ *Salmonella* სეროვარი Typhi-ის ქრონიკულ მტარებლებში მაღალია ნაღვლის ბუშტის კარცინომის განვითარების რისკი (Nath et al., 2008). ენტერალური ცხელების პრევენციის სტრატეგიებია: სანიტარული ნორმების დაცვა, წყლისა და საკვების მიკრობიოლოგიური სისუფთავის კონტროლი, *Salmonella* სეროვარი Typhi - ს ქრონიკული მტარებლების მკურნალობა და პატონი ორგანიზმის (ადამიანის) ინფექციისადმი მგრძობელობის შესამცირებლად ტიფოიდური ვაქცინების გამოყენება. დღესდღეობით ორი ტიფოიდური ვაქცინაა ხელმისაწვდომი შეერთებულ შტატებში - პერორალური (ორალური) ვაქცინა Ty21a და პარენტერალური ვაქცინა Vi. Ty21a წარმოადგენს ცოცხალ, ატენუირებულ (შესუსტებულ) ვაქცინას, რომელიც შეიცავს ქიმიურად დამუშავებულ, შესუსტებულ (chemically attenuated) *Salmonella* სეროვარი Typhi -ს შტამს - Ty21a, ხოლო პარენტერალური ვაქცინა Vi-ს საფუძველს წარმოადგენს *Salmonella* სეროვარი Typhi -ს სომატური ანტიგენი -Vi. Ty21a ხელმისაწვდომია პერორალურად მისაღები კაფსულების სახით, ლიცენზირებულია აშშ - ში და მიღება დასაშვებია 6 და მეტი ასაკის მქონე პირებისათვის. Vi ვაქცინა ასევე ლიცენზირებულია აშშ - ში და მისი მიღება შესაძლებელია ბავშვებში 2 წლიდან. ვაქცინების კუმულაციური დამცავი ეფექტი 3 წლის მონაცემებით, Ty21a - ისათვის, წარმოადგენს 48% -ს, ხოლო Vi ვაქცინისათვის - 55% - ს (Anwar et al., 2014). პარენტერალური Vi ვაქცინის ეფექტურობა დადასტურდა 2 დან 5 წლამდე ბავშვებში, ინდოეთსა და ვიეტნამში (Smith, Cowan, Brasset, Herbison, & Taylor, 2005) (England and

England, 1996). ამჟამად მიმდინარეობს Vi ვაქცინის სხვადასხვა კონიუგატებზე მუშაობა. თუმცა, უნდა ითქვას, რომ Vi ანტიგენზე დაფუძნებული მონოვალენტური ვაქცინები ვერ უზრუნველყოფენ დაცვას მრავალი პარატიფოიდური ცხელების მიმართ, რადგან მხოლოდ *Salmonella* -ს სეროვარები Typhi, Paratyphi C, და Dublin ატარებენ Vi ანტიგენს. *Salmonella* სეროვარი Typhi Ty21a - არ ახდენს Vi ანტიგენის ექსპრესიას, შესაბამისად, ვაქცინა Ty21a გვთავაზობს ძალიან ლიმიტირებულ დაცვას *Salmonella* სეროვარი Paratyphi B- ს მიმართ და არ იძლევა ე.წ. ჯვარედინ ეფექტს *Salmonella* სეროვარი Paratyphi A-ს მიმართ (Levine et al., 2007). ამრიგად, პარატიფოიდური ცხელებების მიმართ ეფექტური ვაქცინის შექმნა მნიშვნელოვან გამოწვევას წარმოადგენს მსოფლიოს ბევრი ქვეყნისათვის.

2.2. არატიფოიდური სალმონელები -Nontyphoidal *Salmonella*

ინდუსტრიულ ქვეყნებში არატიფოიდური სალმონელების გავრცელება მეტწილად ცხოველის ფეკალური მასებით დაბინძურებული საკვების მეშვეობით ხდება და, როგორც წესი, ისინი ადამიანში იწვევენ დიარეით მიმდინარე, თვითლიმიტირებად ენტეროკოლიტებს. სისხლისმიერი ინფექციები დიარეით მიმდინარე ენტეროკოლიტის მქონე პაციენტთა დაახლოებით 6% -ში გვხვდება; ახალშობილები, მცირეწლოვანი ბავშვები, მოხუცები და დაქვეითებული იმუნიტეტის და თანმხლები დაავადებების მქონე ადამიანები ბაქტერიემიის განვითარებისათვის რისკ ჯგუფებს წარმოადგენენ (Vugia et al., 2004) (Parry et al., 2013). არატიფოიდური სალმონელები ძალიან მრავალფეროვანნი არიან თავიანთი ე.წ. პატრონი ორგანიზმების სპექტრისა და ეპიდემიოლოგიის მიხედვით, ასევე განსხვავებულია მათი უნარები გამოიწვიონ სისხლისმიერი ინფექციები და ადამიანის სხვა მძიმე დაავადებები. *Salmonella* სეროვარი Typhimurium ითვლება ტიპიურ უნივერსალურ პათოგენად, რომელიც პატრონი ორგანიზმების ფართო სპექტრის ინვაზიურ დაზიანებას იწვევს (host generalist),თუმცა ინვაზიური დაავადებების გამოწვევის საშუალო ალბათობით

ხასიათდება. სხვა არატიფოიდური სალმონელას სეროვარები, ისეთები, როგორებიცაა: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Dublin და *Salmonella* Choleraesuis, უფრო მაღალი ალბათობით იწვევენ ინვაზიურ ინფექციებს, დაავადებებს, რომლებიც ჰოსპიტალიზაციას საჭიროებენ მათ მიერ გამოწვეული ინფექციები *Salmonella* სეროვარი Typhimurium - თან შედარებით, სიკვდილიანობის უფრო მაღალი მაჩვენებლით ხასიათდებიან. თუმცა, ზოგიერთი სეროვარი, მაგალითად, *Salmonella* სეროვარი Newport, ხასიათდება ფატალურობის უფრო დაბალი მაჩვენებლით (0,3%), ვიდრე *Salmonella* სეროვარი Typhimurium. მიზეზები, რომელთა გამოც სალმონელას სეროვარები ასე განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან პატრონ-სპეციფიურობის მიხედვით, კომპლექსურია და არასაკმარისად არის შესწავლილი (Ao et al., 2015).

S. enterica - ს (NTS, ატს- არატიფოიდური სალმონელები) არატიფოიდური სეროვარები იწვევენ გასტროენტერიტებს, თემოს ნაწლავისა და კოლინჯის ლოკალურ ინფექციებს, რომელთა გამოვლინება ხდება დიარეის, პირღებინების, ინტესტინალური სპაზმების სახით, ამ ინფექციებით გამოწვეული სიკვდილიანობის მაჩვენებელი ყოველწლიურად ~ 155 000 უტოლდება (Majowicz et al., 2010), იმუნოკომპრემეტირებულ ინდივიდებში კი, მათ შორის პაციენტებში, რომლებიც გადიან სიმსივნის საწინააღმდეგო ქიმიოთერაპიებს ან აქვს თანდაყოლილი თუ შეძენილი იმუნოდეფიციტი, ატს (არატიფოიდური სალმონელოზი) ბაქტერიემიასთან და ექსტრაინტესტინალურ ინფექციებთან ასოცირდება, რომელთა სიკვდილიანობის მაჩვენებელი ყოველწლიურად ~681 000 - ის ტოლია. (Ao et al., 2015).

ცუდი გამოსავლიანობითა და ფატალურობის მაღალი მაჩვენებლით გამოირჩევა არატიფოიდური სალმონელებით გამოწვეული მენინგიტები ბავშვებში (Gordon, 2011). აღსანიშნავია, რომ სხვა პათოგენების მიერ გამოწვეული ქვედა სასუნთქი სისტემის ინფექციებთან დაკავშირებული სიმპტომები და ნიშნები საერთოა ასევე ინვაზიური არატიფოიდური სალმონელა ინფექციებისთვისაც (Nath et al., 2008) (Malawian & Malawian, n.d.). აღწერილია ასევე არატიფოიდური სალმონელას მიერ გამოწვეული წილობრივი (ლობარული) პნევმონიის შემთხვევა ბავშვში (Crump et al., 2015).

2.3. სალმონელას რეზისტენტობა ანტიბიოტიკების მიმართ

სალმონელას მიერ გამოწვეულ დაავადებებთან გამკლავებას ართულებს მზარდი ანტიბიოტიკო რეზისტენტობა. ბოლო მონაცემებით კლინიკურად მნიშვნელოვანი ანტიბიოტიკორეზისტენტობის 73 % დაკავშირებულია *Salmonella* -ს ოთხ ძირითად სეროტიპთან, ესენი არიან: Enteritidis, Newport, Typhimurium და Heidelberg (Medalla et al., 2017).

ანტიბიოტიკების მიმართ მდგრადობამ (ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობამ), თავდაპირველად თავი იჩინა ტრადიციული ე.წ. პირველი ხაზის ანტიბიოტიკების: ქლორამფენიკოლის (chloramphenicol), ამპიცილინისა (ampicillin) და ტრიმეტოპრინ-სულფამეტოქსაზოლის (trimethoprim-sulfamethoxazole) მიმართ (Olarde & Galindo, 1973). ფლუოროქუინოლონების მიმართ (fluoroquinolone) დაქვეითებული მგრძნობელობისა და შემდგომში ფლუოროქუინოლონ-რეზისტენტობის განვითარება უკავშირდება ქინოლონ-რეზისტენტობის განმსაზღვრელ უბანში მდებარე დნმ გირაზასა და ტოპოიზომერაზა IV - ის მაკოდირებელი გენების ქრომოსომულ მუტაციებსა და პლაზმიდის მეშვეობით მიმდინარე რეზისტენტობის მექანიზმებს. ფართო სპექტრის ცეფალოსპორინების მიმართ რეზისტენტობა არატიფოიდურ *Salmonella* შტამებში უფრო ხშირად ვლინდება, ვიდრე ტიფოიდურებში. (Olarde & Galindo, 1973). როგორც უკვე აღინიშნა, ატს-ები ხასიათდებიან მზარდი ანტიბიოტიკორეზისტენტობით ან შემცირებული მგრძნობელობით სხვადასხვა, მედიცინისათვის კრიტიკულად მნიშვნელოვანი ანტიბიოტიკების მიმართ. რეზისტენტობა და შემცირებული მგრძნობელობა ვლინდება ისეთი ანტიბიოტიკების მიმართ, როგორებიცაა: ფლუოროქუინოლონები (fluoroquinolones), ფართო სპექტრის ცეფალოსპორინები (cephalosporins), რომლებიც მოწოდებულია *S. enterica* -ს ინვაზიური ინფექციების მკურნალობისათვის (Hohmann, 2001) (Woodford, Wareham, Guerra, & Teale, 2014). ეს უკანასკნელი მოიაზრება, როგორც ყველაზე მნიშვნელოვანი ანტიმიკრობული იარაღი,

რომელიც კაცობრიობას დღესდღეობით გააჩნია, რადგანაც ის წარმოადგენენ ე.წ. “last resort” (გამოუვალი მდგომარეობის ბოლო იმედის) ანტიბიოტიკს, რომელიც ჰოსპიტალებში მულტირეზისტენტული (MDR) გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების წინააღმდეგ საბრძოლველად გამოიყენება (Nordmann & Poirel, 2014). ასევე აუცილებელია ხაზი გაესვას იმ გარემოებას, რომ მიუხედავად იმისა, რომ კარბაპენემი არ არის პირველი რიგის (first-choice) პრეპარატი სალმონელას მიერ გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ, მის მიმართ რეზისტენტობის გაჩენა ზოონოზურ პათოგენებში დიდ საფრთხეს უქმნის საზოგადოებრივ ჯანდაცვას, ვინაიდან ეს პათოგენები შესაძლოა ადამიანს კვებითი ჯაჭვის მეშვეობით გადაეცეს. ადამიანებში დაავადებათა გამოწვევის გარდა, არატიფოიდურმა სალმონელებმა შესაძლოა შეასრულონ ერთგვარი სატრანსპორტო როლი, მოახდინონ რა რეზისტენტობის მაკოდირებელი გენების გადაცემა სხვა პათოგენურ ბაქტერიებზე და ბაქტერიებიდან ენდოგენურ მიკრობიომზე (Vo, Van Duijkeren, Gaastra, & Fluit, 2010). ინვაზიური არატიფოიდური სალმონელების წინააღმდეგ საბრძოლველად მესაქონლეობასა და მეფრინველეობაში უკვე ხელმისაწვდომია არატიფოიდური სალმონელას ვაქცინები, თუმცა, მსგავსი ვაქცინები ადამიანებისათვის დღესდღეობით ხელმისაწვდომი არ არის. არატიფოიდური ვაქცინის შექმნა ისევ მნიშვნელოვან გამოწვევად რჩება, განსაკუთრებით, იმუნოკომპრომეტირებულ პაციენტებში ინვაზიური არატიფოიდური სალმონელოზის შემთხვევათა სიხშირისა და ფატალურობის მაღალი მაჩვენებლის გამო (Maclennan, Gilchrist, Gordon, & Adam, 2013). ამგვარად, სალმონელას სხვადასხვა სეროვარების მიერ გამოწვეული ინფექციები საკმაოდ სერიოზულ საფრთხეს წარმოადგენს, როგორც ადამიანის, ისე ცხოველების ჯანმრთელობისათვის. მკურნალობის მეთოდები კი, განსაკუთრებით ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ინფექციების შემთხვევაში, საკმაოდ შეზღუდულია და კვლავ მწვავედ დგას ანტიბიოტიკის შემცვლელი, ეფექტური საშუალების აღმოჩენის საკითხი. ამ კუთხით ძალიან საინტერესო ობიექტს წარმოადგენენ ბაქტერიის ვირუსები - ბაქტერიოფაგები, ან უფრო მარტივად - ფაგები, რომელთაც დიდი პოტენციალი გააჩნიათ, როგორც

თერაპიულ, ისე პროფილაქტიკურ აგენტებს ანტიბიოტიკორეზისტენტულ ინფექციებთან და, მათ შორის, ტიფოიდურ და არატიფოიდურ სალმონელებთან ბრძოლის მიმართულებით.

თავი 3. ბაქტერიოფაგები

3.1. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და ფაგოთერაპიის ისტორია

„An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses.“ Lancet, 2, 1241-43, London, 1915. (Terms, 2011) - ეს გახლავთ სტატია, რომლითაც ინგლისელმა მეცნიერმა, ფრედერიკ უილიამ ტუორტმა (1877 - 1950) სამყაროს იმ ვირუსების შესახებ უამბო, რომლებიც პატრონ უჯრედებად მხოლოდ ბაქტერიებს იყენებდნენ. მან შენიშნა აგარზე გათესილი ბაქტერიის, კერძოდ, სტაფილოკოკის ტრანსფორმაცია გამჭვირვალე ლაქებად. 1917 წელს, ტუორტისაგან დამოუკიდებლად, ფრანგმა მეცნიერმა ფელიქს დერელმაც აღწერა მსგავსი მოვლენა და ნაწილაკებს, რომლებიც ბაქტერიებს შთანთქავდნენ ბაქტერიოფაგები ანუ ბაქტერიის მჭამელები უწოდა (Raton London New York Washington, BACTERIOPHAGES Biology, & EDITED Elizabeth Kutter Alexander Sulakvelidze, 2005) (Duckworth, 1976). 1919 წელს ქართველმა მეცნიერმა გიორგი ელიავამ აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი თუმცა, ვერ ახსნა იგი (F. D'herelle, 1926).

მე-20 საუკუნის დასაწყისში, სწორედ ფელიქს დერელმა გამოიყენა ბაქტერიოფაგი ადამიანისა და ცხოველთა ინფექციების მკურნალობისათვის, საიდანაც სათავეს იღებს ფაგოთერაპია, თუმცა უნდა ითქვას, რომ ამ მიდგომამ ფართო გავრცელება დასავლეთში ვერ ჰპოვა (Gelman et al., 2018) (Eric C. Keen, 2015). 1940-იან წლებში კი, ანტიბიოტიკების აღმოჩენის შემდეგ, ბაქტერიოფაგების კვლევებმა უფრო ფუნდამენტური ხასიათი მიიღო. ამავდროულად, ფაგოთერაპია ფართოდ გამოიყენებოდა საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში, ვინაიდან, ფელიქს დერელი მჭიდროდ თანამშრომლობდა ქართველ მეცნიერებთან, საქართველო კი მაშინდელი საბჭოთა კავშირის შემადგენლობაში შედიოდა. საბჭოთა სამეცნიერო ლიტერატურის თანახმად ბაქტერიოფაგები ფართოდ

გამოიყენებოდა ქირურგიაში, დერმატოლოგიაში, ოფთალმოლოგიაში, უროლოგიაში, სტომატოლოგიაში, პედიატრიაში, გინეკოლოგიაში, და ოტო-ლარინგოლოგიაში (N.Kiladze, N.Chanishvili, T.Shulaia, Z.Bendeliani, 2017) (Chanishvili, 2012). მსოფლიოში ფაგების მიმართ საყოველთაო ინტერესის განახლება ანტიბიოტიკო რეზისტენტობამ და ამ პრობლემის გადასაჭრელად ალტერნატიული საშუალების მოძიების აუცილებლობამ განაპირობა. ამჟამად ანტიბიოტიკორეზისტენტული ფორმების ყველაზე უსაფრთხო, ეფექტურ სამკურნალო საშუალებად სწორედ ფაგოთერაპია მოიაზრება.

3.2. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერიოფაგები სიცოცხლის ყველაზე გავრცელებული ფორმები არიან ჩვენს პლანეტაზე (Moreno Switt et al., 2014), სხვადასხვა გამოთვლებით მათი რიცხვი 10^{31} უახლოვდება და სწორედ მათი ნაირსახეობის გამო, ისინი გენების ერთგვარ ფონდს (რეზერვს) წარმოადგენენ, შესაბამისად, უზარმაზარია მათი წვლილი პატრონი ორგანიზმების - ბაქტერიების ევოლუციაში. 1940 წელს ელექტრონული მიკროსკოპიის საშუალებით დადგინდა ფაგების ვირუსული ბუნება. დროთა განმავლობაში, მრავალი ახალი ფაგის აღმოჩენის კვალდაკვალ აუცილებელი გახდა მათი აღნუსხვა და კლასიფიკაცია.

ვირუსების და მათ შორის ფაგების კლასიფიკაციის პირველი მცდელობა 1948 წელს Holmes-ს ქონდა. მის სქემაში ვირუსები იყოფოდა 3 ჯგუფად: ბაქტერიების, მცენარეებისა და ცხოველების ვირუსებად. ბაქტერიების ვირუსები (ფაგები) მან 46 ჯგუფად დაჰყო, მათი პატრონი ბაქტერიული სახეობებისა და მათ მიერ გამოწვეული დაავადების სიმპტომების მიხედვით. აღნიშნული სქემა არ იქნა აღიარებული სამეცნიერო საზოგადოების მიერ, რადგან კლასიფიკაცია არ ეყრდნობოდა ფაგების ფიზიკო-ქიმიურ მახასიათებლებს (Kropinski, n.d.-b).

1962 წელს Lwoff, Horne და Tounier-მა ფაგების კლასიფიცირება, ნუკლეინის მჟავას ტიპის, კაფსიდის ფორმისა და ზოგადად ვირიონის მორფოლოგიის მიხედვით მოახდინეს.

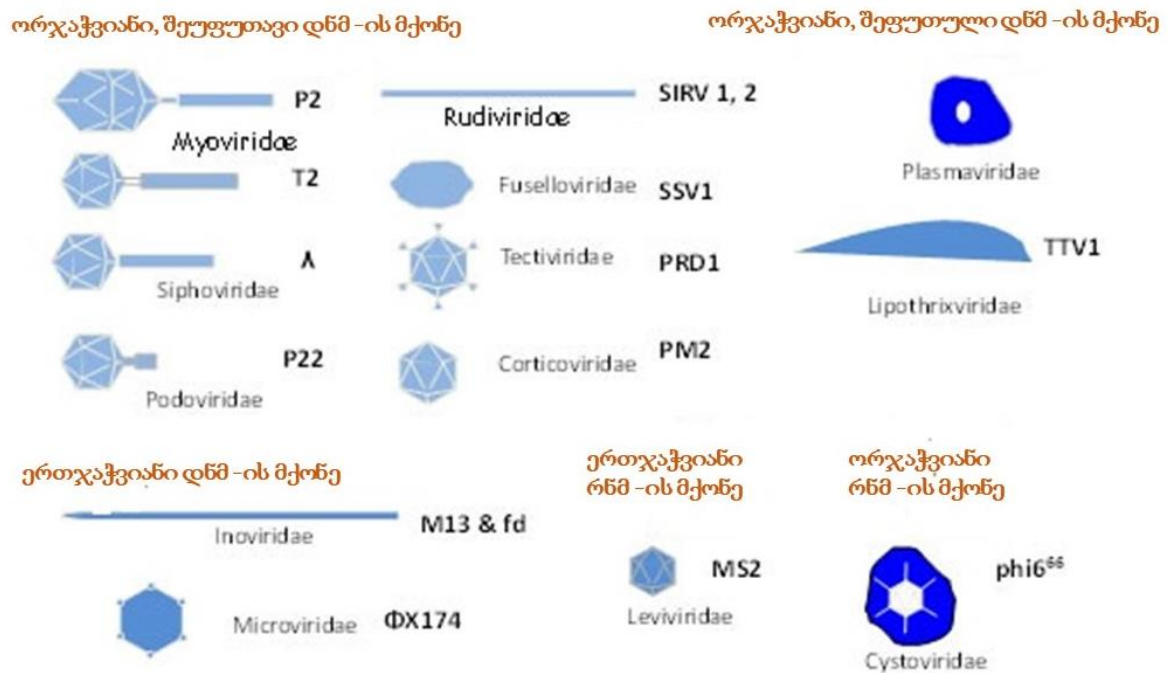
1967 წელს Bredley-მ ფაგები დაყო 6 ჯგუფად, სადაც შევიდა: კუმშვადი წანაზარდის ანუ კუდის მქონე ფაგები, მოკლე წანაზარდიანი ფაგები, კუბური ფორმის ფაგები, ერთძაფიანი დნმ-ის შემცველი ფაგები, რნმ-ის შემცველი და ძაფისებრი ე.წ. ფილამენტური ფაგები. სწორედ ეს კლასიფიკაცია უდევს საფუძვლად ფაგების თანამდეროვე კლასიფიკაციას.

1983 წელს Akermman-მა ბაქტერიოფაგები განალაგა 190 ტაქსონომიურ ერთეულში (ტაქსონში), რომლებიც მოიცავდა 2000 ფაგს.

1959 წლიდან 2011 წლამდე დაახლოებით 5360 კუდიანი ფაგი, 179 კუბური, ფილამენტური და პლეომორფული ფაგი იქნა შესწავლილი (Hans-W Ackermann 2011). Ackermann at al. - ის მიხედვით რიგში - Caudovirales, 13 ოჯახი და 34 გვარი ერთიანდება (Maniloff at al., 2004). სურ.1

სურათი 1.

ბაქტერიოფაგების 13 ოჯახი



<https://images.app.goo.gl/Bn73TK9qwV8CMuuY8>

ეს კლასიფიკაცია გენომურ და პროტეომულ ანალიზს ეყრდნობა. ზოგადად, ვირუსების კლასიფიკაცია ეყრდნობა შემდეგ მახასიათებლებს:

1. ვირიონის ულტრასტრუქტურა: ბინალური სიმეტრიის (წანაზრდიანი), კუბური, ჰელიკალური (სპირალური), ფილამენტური ან პლეიომორფული;

2. ნუკლეინის მჟავას ტიპი: ორჯაჭვიანი დნმ (dsDNA), ერთჯაჭვიანი დნმ (ssDNA) ერთჯაჭვიანი რნმ (ssRNA);

3. ქიმიური შემადგენლობა და ანტიგენური თვისებები;

4. მოლეკულური მასა;

5. პატრონი ბაქტერიული უჯრედების სპექტრი.

2018-2019 წლებში ტაქსონომიაში შევიდა ცვლილებები, რომელთა თანახამადაც პროკარიოტების ვირუსებს დაემატა ერთი ახალი რიგი - (*Tubulavirales*), 10 ახალი ოჯახი - *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*, *Drexlerviridae*, *Finnlakeviridae*, *Halspiviridae*, *Herelleviridae*, *Ovaliviridae*, *Plectroviridae*, *Thaspiviridae*, 22 ქვეოჯახი, 424 ახალი გვარი და 964 ახალი სახეობა. (Adriaenssens et al., 2020).

არსებული კლასიფიკაცია მუდმივად იხვეწება და იცვლება ახალი მეთოდების შემოღების კვალდაკვალ, რომლებიც აქამდე არაკლასიფიცირებული ფაგების ახალ ტაქსონომიურ ჯგუფებში განთავსების საშუალებას იძლევა (Adriaenssens et al., 2020).

დღეისათვის შესწავლილი ფაგების 96 % -ს ბინალური სიმეტრიის მქონე, ე.წ. კუდიანი ფაგები წარმოადგენენ.

ოჯახში - **Myoviridae** ერთიანდებიან ფაგები, რომლებსაც აქვს გრძელი კომპლექსური, კუმშვადი კუდი. იგი შედგება ცენტრალური ღერძისაგან (არხისაგან) და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისაგან. Myoviridae-ს განეკუთვნება კუდიანი ფაგების 25%. მათი ტიპიური წარმომადგენლები არიან: T2, T4, P1, P2, Mu და სხვა ფაგები. სულ ოჯახში გაერთიანებულია სულ ოჯახში გაერთიანებულია 5 ქვეოჯახი, 168 გვარი და 434 სახეობა გვარი (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/talk.ictvonline.org>. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

Siphoviridae - ს ოჯახს მიეკუთვნებიან ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდიით, რომლის შალითასაც არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ამ ოჯახში ერთიანდება კუდიანი ფაგების 62%(Summary, 2012). ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, L5, λ ფაგები და სხვა. ოჯახი მოიცავს 13 ქვეოჯახს, 265 გვარს და 783 სახეობისგან. (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/talk.ictvonline.org>. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

Podoviridae -ს ოჯახს კუდიანი ფაგების 14% მიეკუთვნება, მათთვის დამახასიათებელია მოკლე კუდი. ტიპური წარმომადგენლებია: P22, T7 და სხვა ფაგები. ამ ოჯახში გაერთიანებულია 3 ქვეოჯახი, 45 გვარი და 132 სახეობა (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/talk.ictvonline.org>. International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020).

Inoviridae – ს მიეკუთვნებიან შალითის არმქონე, ჩხირისებური და ფილამენტური ფაგები. ამ ოჯახში შედის 42 სახეობა, რომლებიც ერთიანდებიან 2 გვარში. (ICTV. "[Virus Taxonomy: 2014 Release](#)". Retrieved 15 June 2015).

ამ ოჯახებიდან Myoviridae -ს წარმომადგენლები გამოირჩევიან დიდი ზომის კაფსიდითა და დნმ-ის მაღალი შემცველობით, ოჯახები: Podoviridae და Siphoviridae კი ამ ნიშან-თვისების მიხედვით მეტნაკლებად მსგავსნი არიან. კუდიანი ფაგები შეიძლება იყოს როგორც ვირულენტური, ისე ზომიერი. ზომიერი ფაგები კუდიანი ფაგების 50%-ს წარმოადგენენ (Kropinski, n.d.-a).

3.3. ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია - ლიტიური და ლიზოგენური სასიცოცხლო ციკლი

ბაქტერიოფაგები (ფაგები) ბაქტერიის პარაზიტებია, ბაქტერიის ვირუსები, რომელთაც არ შესწევთ სიცოცხლისა და გამრავლების უნარი ბაქტერიული უჯრედის გარეშე. ამ ვირუსებს ახასიათებს სიცოცხლის ორგვარი ციკლი: ლიტიური და ლიზოგენური .

ლიტიური ციკლის მიმდინარეობისას ბაქტერიოფაგი ბაქტერიის უჯრედს ერთგვარ ფაბრიკად აქცევს, რომელიც ვირუსთა ახალ შთამომავლობას იძლევა. ფაგი

ადსორბირდება ბაქტერიის ზედაპირის სპეციფიურ რეცეპტორებზე (ფლაგელა, პილი, გარე მემბრანის პროტეინები, კაფსულები, ლიპოპოლისაქარიდები, ლიპოთეიხოს მჟავა, პროტეინები და ა.შ.) (Kropinski, n.d.-b) (Moreno Switt et al., 2014). კუდიანი ფაგების შემთხვევაში, ისინი ბაქტერიის უჯრედის კედლის გავლით ახდენენ თავისი დნმ - ს ინექციას მასში. უჯრედში შეღწევის შემდეგ ფაგის გენომი აღკვეთს ბაქტერიის რეპლიკაციასა და ტრანსკრიპციას და გადააწყობს უჯრედის გენეტიკურ აპარატს ვირუსული ნუკლეინის მჟავებისა და პროტეინების სინთეზირებისთვის. საბოლოოდ ახალი ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლება ხდება პატრონი უჯრედის ლიზისის შედეგად, რაც, თავის მხრივ, მემბრანული ფორების მაფორმირებელი პროტეინების - ჰოლინებისა და პეპტიდოგლიკანის დამშლელი ლიზინების კომბინირებული მოქმედების შედეგად მიიღწევა. ფაგს, რომელსაც ახასიათებს სიცოცხლის მხოლოდ ლიტიური ციკლი, **ლიტიური ანუ ვირულენტური** ფაგი ეწოდება (Alberts et al., 2004).

ფაგებს, რომელთაც შეუძლიათ წარმართონ სიცოცხლის როგორც ლიტიური, ისე ლიზოგენური ციკლი **ზომიერი ფაგები** ეწოდებათ. ლიზოგენური ციკლის მიმდინარეობისას ფაგი ხშირად ახდენს ინტეგრაციული ენზიმის (ინტეგრაზას) სინთეზს, თიშავს შემდგომ ვირუსულ ტრანსკრიპციას (რეპრესორი) და, როგორც წესი, ჯდება ბაქტერიულ დნმ-ში, რის შემდეგაც უჯრედი ჩვეულებრივ განაგრძობს ზრდასა და გამრავლებას. ფაგური გენები რეპლიცირდებიან, როგორც ბაქტერიული ქრომოსომის შემადგენელი ნაწილები. ბაქტერიას, რომელიც შეიცავს ფაგური გენების სრულ კომპლექტს ლიზოგენი ეწოდება, ხოლო ინტეგრირებულ ვირუსულ დნმ - ს პროფაგი ქვია. ლიზოგენის რეინფიცირება (სუპერინფექცია) იმ ტიპის ფაგით, რომელმაც პირველად მოახდინა ბაქტერიული უჯრედის ლიზოგენიზაცია, როგორც წესი, არ ხდება. ლიზოგენი პროფაგთან ერთად განაგრძობს რეპლიკაციას. თუმცა ისეთი მაინდუცირებელი ფაქტორების ზემოქმედებით, როგორებიცაა ულტრაიისფერი დასხივება და ქიმიური აგენტი, პრეპარატი მიტომიცინ C, შესაძლოა მოხდეს დნმ -ის დაზიანება, ფაგის უკურეპრესია და მის მიერ ლიტიური ციკლის ინიცირება. ამ პროცესს პროფაგის ინდუქცია ეწოდება. ზომიერი ფაგების უმეტესობა ლიზოგენების

ფორმირებას ახდენს მასპინძლის ქრომოსომის უნიკალურ მიმაგრების ადგილზე (საიტზე) ინტეგრირების გზით. ლიზოგენიზაციამ შესაძლოა გამოიწვიოს მასპინძელი უჯრედის ფენოტიპური ცვლილებები - ლიზოგენური კონვერსია (lysogenic conversion), ისეთების, როგორცაა ტოქსიურობის შექმნა და ანტიგენური სპექტრის ცვლილებები (Broudy & Fischetti, 2003).

ვირულენტურ ფაგებთან მიმართებაში უნდა აღინიშნოს მოვლენა, რომელსაც **ფსევდოლიზოგენიას** უწოდებენ. ვირულენტური ფაგი შესაძლოა აღმოჩნდეს ე.წ. ფსევდოლიზოგენურ ანუ ე.წ. მტარებლობის მდგომარეობაში. ფსევდოლიზოგენია შეიძლება განისაზღვროს როგორც ბაქტერიოფაგის გენომის შენელებული განვითარება მასპინძელი ბაქტერიის უჯრედის შიგნით, რომელსაც არ მოსდევს ფაგის რეპროდუქცია (როგორც ლიტური ციკლის დროს) და არც უჯრედის გამრავლების ციკლთან სინქრონიზირებული ფაგის გენომის რეპლიკაცია (როგორც ეს ლიზოგენურ ციკლს ახასიათებს). ითვლებოდა, რომ **ფსევდოლიზოგენიის** ამუშავების მიზეზი შესაძლოა იყოს ე.წ. შიმშილობა ანუ საკვების ნაკლებობა. ასეთ დროს საკმარისი ენერჯის არარსებობის გამო ფაგი ვერ ახორციელებს თავის სასიცოცხლო ციკლს და მისი გენომი მასპინძელი უჯრედის შიგნით არააქტიურ მდგომარეობაში გადადის (Rippt & Miller, 1995) (Cenens at al., 2013).

3.4. *Salmonella* - სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები

ბაქტერიოფაგების მნიშვნელოვან ჯგუფს *Salmonella* - სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ. გარდა იმისა, რომ *Salmonella* ფაგებს უდიდესი როლი ენიჭებათ მოლეკულურ ბიოლოგიაში, საინტერესოა მათი სხვა, პრაქტიკული თვალსაზრისით საინტერესო თვისებებიც. ასე მაგალითად, ისინი გამოიყენებიან ისეთი პროცედურებისათვის, როგორებიცაა: შტამის კონსტრუირება ტრანსდუქციის მეშვეობით (strain construction through transduction;) ფაგოტიპირება ეპიდემიოლოგიური მიზნებისათვის და ფაგების თერაპიული გამოყენებისათვის (Moreno Switt et al., 2014), და ბოლოს ფაგების გენებსა და მათ პროდუქტებს უდიდესი წვლილი შეაქვთ ვექტორების

წარმოებაში (კოსმიდები, ინტეგრირებადი ვექტორები, პრომოტორები და ა.შ), ისინი მოლეკულურ ბიოლოგიური აგენტების (დნმ და რნმ პოლიმერაზები, ლიგაზები, ნუკლეაზები, რეკომბინაზები, რესტრიქციული ენდონუკლეაზები და ა.შ) წარმოებისათვის ერთგვარ რესურსს წარმოადგენენ.

თუ დავყვრდნობით *Salmonella* ფაგების კლასიფიკაციას, რომელიც შედგენილია ჰანს-ვოლფგანგ აკერმანის მიერ (H. W. Ackermann, 2007), დღესდღეობით, ელექტრონული მიკროსკოპირებით შესწავლილი, მორფოლოგიურად განსხვავებული 250 ვირუსი არსებობს. კუდიანი ვირუსები, რომლებიც გაერთიანებულნი არიან რიგში *Caudovirales*, შემდეგნაირად ნაწილდებიან: *Myoviridae* - 64 (კუმშვადი კუდის მქონე ფაგები); *Siphoviridae* - 94 (გრძელი, არაკუმშვადი კუდის მქონე ვირუსები); და *Podoviridae* - 71 (მოკლე, არაკუმშვადი კუდის მქონე ვირუსები). ეს სია საბოლოო არ არის, რადგან ფაგების მიმართ გაზრდილი ინტერესის გამო სულ უფრო მატულობს შესწავლილ ვირუსთა რიცხვი და მათ შორის მორფოლოგიური განსხვავებებიც.

3.4.1. *Salmonella* სპეციფიკური ლიტური ფაგების მრავალფეროვნება

3.4.1.1. *Myoviridae* - ს ოჯახის მნიშვნელოვანი წარმომადგენლები

ამ თავში განვიხილავთ იმ გვარის წარმომადგენლებს, რომელთა მსგავსი ფაგებიც გამოყენებულია ჩვენს მიერ შესრულებულ ნაშრომში.

ვიუნას-მსგავსი ვირუსები - *Viunalikevirus*

Salmonella სპეციფიკური ლიტური ფაგების კლასტერიზაციისთვის გამოყენებულ იქნა სექვენირებული ფაგების ორთოკლასტერული ანალიზის მეთოდი (Moreno Switt et al., 2013). ფაგების ახალი გვარი - ვიუნას-მსგავსი ვირუსთა გვარი (*Viunalikevirus*) შემოთავაზებულ იქნა 2012 წელს, რომლის შემადგენლობაშიც შედის *Enterobacteriaceae* - ს წარმომადგენელი რამდენიმე ბაქტერიის მიმართ სპეციფიკური ფაგები (Adriaenssens et

al., 2012). დღესდღეობით ამ გვარში შედის სამი *Salmonella* სპეციფიური ფაგი - Vi1, SFP10, და ΦSH19, ორი *E. coli* - ის ფაგი - CBA120, Phax1, ერთი *Shigella*-ს სპეციფიური ფაგი - ΦSboM-AG3 და ერთი *Dickeya*-ს სპეციფიური ბაქტერიოფაგი - LIMEstone1 (Adriaenssens et al., 2012) (Hooton et al., 2011). 2013 წლის ივნისში ჩრდილოეთ ნიუ იორკის შტატში კიდევ ოთხი *Salmonella* სპეციფიური ფაგის გამოყოფა მოხდა. მათმა შესწავლამ ცხადჰყო, რომ ისინიც ვიუნას მსგავსი ფაგების გვარს მიეკუთვნებიან (*Viunalikevirus*).

ამ გვარში გაერთიანებული ფაგების დამახასიათებელი ნიშნებია: გენომის ზომა (დაახლოებით 157 kb), GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 44.5%. განმსახვავებელი მორფოლოგიური ნიშნებია იკოსაედრული თავი (≈ 90 nm) და კუმშვადი კუდი ($\approx 110 \times 18$ nm.). ამას გარდა, მნიშვნელოვანია ითქვას, რომ ვიუნას მსგავს ვირუსებში უნიკალური საადსორბციო ორგანელაა აღწერილი, კერძოდ კი ამ რიგის ფაგებს გააჩნიათ ექვსი პროტეინი, რომელთაც კუდის წვეტიან წანაზარდებს-კბილანებს (tailspikes, tail spike proteins) უწოდებენ. მათ შესწევთ სტრუქტურული ცვლილებების უნარი, გახსნილ კონფორმაციაში (სტრუქტურულ მდგომარეობაში) ისინი ქოლგის მსგავს სტრუქტურას წარმონაქმნიან (Adriaenssens et al., 2012). კუდის წანაზარდებს ბაქტერიული რეცეპტორის ამოცნობის უნარს უკავშირებენ (Adriaenssens et al., 2012) (Pickard et al., 2010) (Park et al., 2012). როგორც აღმოჩნდა, გარკვეული გადაჯგუფებები, რომლებიც ახასიათებთ ე.წ. კუდის წანაზარდებს, ამარტივებს Vi1 მსგავსი ფაგების მიერ სხვადასხვა *Enterobacteriaceae* - ების ინფიცირების პროცესს, რაც დასტურდება კიდევ აღნიშნული ფაგების მიმართ მგრძობიარე პატრონი ბაქტერიების ფართო სპექტრის არსებობით (wide range of hosts).

ფელიქსოუნას მსგავსი ვირუსები - *Felixounalikevirus*

ამ ტიპის ფაგი თავდაპირველად გამოყოფილ იქნა ფელიქსისა და კალოუს მიერ (A. Felix, D.Sc., F.R.S. and Bessie R. Callow, 1943) და ის მოიხსენიებოდა, როგორც ფაგი O1. ვინაიდან ეს ფაგი აქტიურია თითქმის ყველა *Salmonella*-ს იზოლატის მიმართ, ის

გამოიყენებოდა *Salmonella* -ს სადიაგნოსტიკო რეაგენტად (Hirsh & Martin, 1983). ამასთანავე საკვების ნიმუშებში *Salmonella* -ს დეტექციისათვის Felix O1 - ის დერივატი შეიქმნა, რომელიც *luxAB* გენებს ატარებს (Thouand at al., 2016). ამას გარდა მისი მოქმედების ფართო სპექტრის გამო, *Salmonella* - ს მიერ დაბინძურებული საკვები პროდუქტების გაუვნებლობის მიზნით შესწავლილ იქნა აღნიშნული ფაგის დეკონტამინაციის პოტენციალი (Whichard at al., 2016).

დღესდღეობით აღნიშნულ რიგში გაერთიანებულია სრულად სექვენირებული ათი ფაგი, მათ შორისაა შვიდი *Salmonella* სპეციფური ფაგი (FelixO1, FO1a, FSL SP-010, FSL SP-012, FSL SP107, SPT-1, და SBA-171 (Moreno Switt et al., 2014) (Whichard et al., 2016) (Hans-W. Ackermann at al., 2010), ორი *E. coli* სპეციფური ფაგი (wV8 and EC6) (Villegas et al., 2009)(Tiwari & Kim, 2013) და *Erwinia* -ს სპეციფური ერთი ფაგი (ΦEa21-4) (Lehman at al., 2009). ფელიქსოუნას მსგავსი ვირუსების გენომის მახასიათებლები შემდეგნაირია: გენომის სიგრძე დაახლოებით 84 - 88 kb - ის ფარგლებში ვარიირებს, G + C შემცველობა - 39 %, ტ-რნმ-ების რაოდენობა > 20 ზე, ფლობენ მრავალ თვითმართვად ენდონუკლეაზას (homing endonucleases), მაგალითად, ფაგი - FelixO1 ფლობს 6 ასეთ ენდონუკლეაზას (Whichard et al., 2016) (Villegas et al., 2009) (Lehman et al., 2009).

მორფოლოგიური მახასიათებლები შემდეგნაირია: - ფაგს - FelixO1 აქვს იკოსაედრული თავი, რომლის ზომაა დაახლოებით 73 ნმ და დაახლოებით 17×113 ნმ ზომის, კუმშვადი კუდი, რომელიც შეიცავს 6 ე.წ. კუდის ძაფისებრ წანაზარდს (tail fibers) (H. W. Ackermann, 2007) (Whichard et al., 2016). მცირედი მორფოლოგიური ვარიაციები შეინიშნება ამ რიგის სხვა ფაგების შემთხვევაში, მაგალითად: wV8 ფაგის თავის ზომა 70.4 ნმ ია, ხოლო კუდისა - 112.8×16.8 და იგი 6 - ის ნაცვლად, კუდის 4 წანაზარდს ფლობს (Villegas et al., 2009). FelixO1 - ის ყველაზე მკაფიო ფენოტიპური მახასიათებელი, მისი ანტიბაქტერიული მოქმედების ძალიან ფართო სპექტრია. ერთერთი კვლევის თანახმად FelixO1 ფაგის მიმართ მგრძობიარე აღმოჩნდა საკვლევი *Salmonella*- ს შტამების 98.2% (კვლევა ტარდებოდა 600-ზე მეტ შტამზე) და სხვა *Enterobacteriaceae* - ების მხოლოდ 1.4 % (Welkos & Schreiber, 1974). თუმცა, ეს იმის თქმის საშუალებას არ

გვამლევს, რომ ამ რიგის ყველა *Salmonella* სპეციფიკური ფაგი ასეთივე ფართო მოქმედების სპექტრით გამოირჩევა. ფაგები - FSL SP-010, FSL SP-012, და FSL SP-107 საკვლევი შტამების მხოლოდ 17%, 30%, და 13 %-ს ინფიცირებას იწვევენ (კვლევა ჩატარდა 17 სხვადასხვა სეროვარის 23 შტამზე), მაშინ როცა ფაგი - FelixO1 - ით ინფიცირების მაჩვენებელი შეადგენდა 100% -ს (Moreno Switt et al., 2014). ფაგი - FelixO1 -ს ანტიბაქტერიული მოქმედების ასეთი ფართო სპექტრის უნარის განმაპირობებელი მექანიზმები ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე შესწავლილი.

T4 მსგავსი ვირუსები - T4likevirus -Tequatrovirus

კოლიფაგ **T4** - ის მონათესავე ფაგები ვირუსების ყველაზე მრავალფეროვანი ჯგუფია მათი ეკოლოგიური, მორფოლოგიური, გენომური და პროტეომული მახასიათებლების მიხედვით. მათ შორისაა ისეთი ფაგები, რომლებიც აინფიცირებენ გამაპროტეობაქტერიებსა (*Aeromonas, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella, Vibrio*) და ეპსილონ-პროტეობაქტერიებსაც (*Campylobacter*) (Edgell et al., 2010)(Petrov et al., 2010). ეს ვირუსები ისეთივე მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან, როგორც რიგი - *Herpesvirales* -ი.

ჩვენ ყურადღებას გავამახვილებთ *Salmonella* სპეციფიურ ორი ფაგზე - STML-198 (Woolston et al., 2013b) და vB_SenM-S16 (Marti et al., 2013), რომლებიც ავლენენ 57.6% - 60.0% -იან მსგავსებას **T4** - ფაგის პროტეინებთან, რაც ადასტურებს, რომ ისინი **T4 ტიპის ვირუსების** გვარს განეკუთვებიან (ICTV; <http://ictvonline.org/>). ამ ორი ფაგიდან მხოლოდ ერთის - SenM- S16 - ის შედარებითი ანალიზი მოიპოვება. SenM- S16 ფაგს აქვს ორჯაჭვიანი დნმ - ის შემცველი გენომი, ზომით 160 kb, GC შემცველობა 36.9%, 3 ტ-რნმ და 269 ცილის მაკოდირებელი ნუკლეტიდური თანმიმდევრობა (protein coding sequences CDSs) ახასიათებს (Marti et al., 2013). SenM- S16 ფაგს აქვს \approx 117 ნმ სიგრძისა და 91 ნმ სიგანის, ცოტათი წაგრძელებული თავი და \approx 120 ნმ ის სიგრძის კუდი, რომელიც ბოლოვდება გრძელი წანაზარდებით (Marti et al., 2013). 150 ზე მეტი *Salmonella*-ს შტამის მიმართ აღნიშნული ფაგის აქტივობის შესწავლისას გამოვლინდა, რომ SenM- S16 ფაგი

ყველა იზოლატის 76% -ის ინფიცირებას იწვევს (Marti et al., 2013), მაგრამ ამავდროულად არ ავლენს ლიზისურ აქტივობას ბაქტერიების სხვა სახეობების მიმართ. მისი რეცეპტორია სალმონელას გარე მემბრანის პროტეინი OmpC, რომელიც პირველად ანუ ძირითად რეცეპტორად მიიჩნევა (Marti et al., 2013).

3.4.1.2. ოჯახი -*Siphoviridae*

T5 ტიპის ვირუსები - Tequintavirus

T5 ტიპის ვირუსების გვარში ერთიანდებიან *E. coli* -ს სპეციფიური ფაგები (მაგ: T5 და AKFV33), ერთი *Vibrio* ფაგი (ფაგი 149), და ორი *Salmonella* ფაგი (SPC35 და EPS7) (ICTV). T5 ამ გვარის ყველაზე კარგად შესწავლილი ფაგია, ის წარმოადგენს სიფოვირუსს, რომელიც ენტერობაქტერიების ინფიცირებას იწვევს (Wang et al., 2005). ამ გვარის წარმომადგენელთა გენომის ზომა ვარიირებს 108 kb -დან (AKFV33) 118 kb- მდე (SPC35), GC შემცველობა -39% და 20 ზე მეტ ტ-რნმ-ს ფლობენ (Niu et al., 2012). მორფოლოგიური მახასიათებლები შემდეგნაირია: \approx 70ნმ ზომის, იკოსაედრული თავი და გრძელი - 185ნმ ზომის, არაკუმშვადი კუდი, რომელიც შეიცავს ტერმინალურ ძაფისებრ წანაზარდებს (fibers)(Kim & Ryu, 2011) მრავალი ნაშრომი მიემდგინა იმ რეცეპტორების შესწავლას, რომლებსაც ამ გვარის ფაგები „ამოიცნობენ“. საინტერესოა, რომ T5 ტიპის ვირუსებს უნარი შესწევთ შექცევითად დაუკავშირდნენ ლიპოპოლისაქარიდებს (LPS) მაშინ, როცა ამ გვარის სხვა წევრებს გარე მემბრანის სხვა პროტეინებთან (მაგ: FepA, FluA, BtuB) შეუქცევადად დაკავშირება შეუძლიათ (Kim & Ryu, 2011). შესაძლოა სხვადასხვა პროტეინებთან დაკავშირების ეს უნარი განაპირობებს მათი მოქმედების სხვადასხვაგვარ სპექტრს; ასე მაგალითად, ზოგიერთი ფაგი იწვევს როგორც *E. coli* - ს ისე *Salmonella* -ს (SPC35, EPS7) ინფიცირებას მაშინ, როცა ფაგი AKFV33 სპეციფიკურია მხოლოდ *E. coli* O157:H7 - ის მიმართ (Niu et al., 2012).

ჯერსივირინე - Jerseyvirinae

ფაგების მორფოლოგიურ თავისებურებებზე, ასევე ნუკლეოტიდი და ცილოვანი თანმიმდევრობების შედარებითი ანალიზების საფუძველზე, შემოთავაზებულ იქნა *Siphoviridae* - ს ოჯახში შემავალი ახალი ქვეოჯახი - ჯერსივირინე - *Jerseyvirinae*, რომელიც თავის მხრივ იყოფა სამ გვარად Jerseylikevirus, Sp3unalikevirus და K1glikevirus. დღესდღეობით ეს ქვეოჯახი შეიცავს 18 ბაქტერიოფაგს, რომელთა ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობები გაშიფრული და დახასიათებულია. მათგან 11 ფაგი Salmonella სპეციფიური ფაგებია, რომლებიც Salmonella Jersey ფაგებად იწოდებიან- vB_SenS_AG11, vB_SenS-Ent1, vB_SenS-Ent2, vB_SenS-Ent3, FSL SP-101, SETP3, SETP7, SETP13, SE2, SS3e და wks13. სწორედ ეს ფაგები ერთიანდებიან გვარში - Jerseylikevirus. გვარი - K1glikevirus აერთიანებს Escherichia სპეციფიურ ფაგებს - K1G, K1H, K1ind1, K1ind2 და K1ind3. გვარი Sp3unalikevirus კი მხოლოდ ერთი Salmonella სპეციფიური ფაგისგან შედგება: - Salmonella phage - FSLSP-031. ჯერსი ფაგები საკმაოდ ფართოდ გავრცელებული ფაგებია, ზემოთ ხსენებული ფაგები გამოყოფილია სრულიად განსხვავებული ადგილმდებარეობებიდან (დიდი ბრიტანეთი, კანადა, აშშ, სამხრეთ კორეა). ჯერსივირუსები წარმოადგენენ მკვეთრად გამოხატულ სიფოვირუს მორფოტიპს, გენომის ზომით - 40.7-43.6 kb, G+C შემცველობა - 49,6 – 51,4%. შემოთავაზებული ქვეოჯახის ყველა ცნობილი წარმომადგენელი მკაცრად ლიტიური ფაგია (Anany et al., 2015).

3.4.1.3. ოჯახი - Podoviridae

კიდევ ერთი ოჯახი, რომლის წარმომადგენელთა მიმართაც ჩვენს მიერ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგები ავლენენ მსგავსებას, გახლავთ ოჯახი - *Podoviridae*, გვარი - Lederbergvirus. აღნიშნული ოჯახის წევრებს ახასიათებთ მოკლე, კუმშვადი კუდი, ზომით დაახლოებით 20×8 ნმ. ოჯახი აერთიანებს ისეთ ცნობილ ზომიერ ფაგებს, როგორებიცაა - Salmonella virus BTP1, Salmonella phage epsilon34 და ფაგი P22 (E. Kutter, 2012).

3.5. *Salmonella* სპეციფიკური ფაგების გამოყენება ვეტერინარიისთვის, თერაპიისა და ბიოკონტროლისათვის

ანტიბიოტიკორეზისტენტობის გავრცელების პარალელურად, სულ უფრო აქტუალური ხდება *Salmonella* სპეციფიკური ფაგების მიმართ ინტერესი, ვინაიდან ისინი შესაძლოა გამოყენებულ იქნენ, როგორც მულტირეზისტენტული ინფექციების სამკურნალო, ისე მათი ბიოკონტროლის საშუალებებად.

სწორედ *Salmonella* სპეციფიკური ფაგები წარმოადგენენ იმ პირველ ფაგებს, რომელთა გამოცდაც მოხდა ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობასა და პრევენციაში. პირველი კვლევები ჩატარებულ იქნა ფაგის აღმოჩენიდან რამდენიმე წლის შემდეგ ფელიქს დ'ერელის მიერ 1919 წელს (Duckworth, 1976). თავდაპირველი საპილოტო ექსპერიმენტებისას, დ'ერელმა *Salmonella* სპეციფიკური ფაგები ქათმებიდან გამოყო, რომლებსაც იყენებდა *Salmonella gallinarum* - ით წინასწარ დაინფიცირებული ფრინველების მკურნალობისათვის. ეს გახლდათ ძალიან მცირე მასშტაბიანი კვლევა, რომელშიც ჩართული იყო მხოლოდ 6 ფრინველი, რომელთაგანაც 4 - ფაგით სამკურნალო ჯგუფში, ხოლო 2 უარყოფითი კონტროლის ჯგუფში იყო გაერთიანებული. ფაგით ნამკურნალები ოთხივე ფრინველი გადარჩა, ხოლო დანარჩენი ორი დაიხოცა *Salmonella gallinarum* - ის მიერ გამოწვეული ინფექციით. დ'ერელმა მალევე გააფართოვა მისი კვლევა ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესახებ და განახორციელა ე.წ. სავლე ექსპერიმენტები 1919–1920 - ში. ის ამზადებდა ე.წ. ფაგო-პრეპარატებს, რომლებიც შეცავდა *Salmonella gallinarum* - ს მიმართ ლიტიური აქტივობის მქონე ფაგებს. საბოლოო ფაგო-ლიზატები ისხმებოდა 0.5მლ მოცულობის მქონე, ჰერმეტიკულად დალუქულ ამპულაებში და იგზავნებოდა ვეტერინარებთან საფრანგეთის სხვადასხვა რეგიონებში, ქათმებში სალმონელათი გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ. მკურნალობას შედეგად მოჰყვა ეპიდემიების შეჩერება და დაინფიცირებული ქათმების უმეტესობის გამოჯანმრთელება (Moreno Switt et al., 2014) (Summers, 2001a) მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით, დ'ერელმა განავრცო თავისი კვლევები ცხოველებისა და ადამიანის

ინფექციებთან საბრძოლველად, სხვადასხვა ბაქტერიების მიმართ სპეციფიური ფაგების გამოყენებით.

დ'ერელის ადრეულმა კვლევებმა ფაგოთერაპიაში და მისმა წარმატებამ სხვა ბევრ მეცნიერსაც ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესწავლისაკენ უბიძგა. ასე მაგალითად: ტოპლეისა და კოლეგების მიერ (Topley at al., 1925) (Topley & Wilson, 2019) ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტი თაგვებზე, რომლებსაც *S. Typhimurium* - ით აინფიცირებდნენ და შემდგომში შესაბამისი ფაგებით მკურნალობდნენ, რომელთაც აწვდიდნენ პერორალური გზით. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ფაგით მკურნალობამ თაგვებში ინფექციით გამოწვეული სიკვდილიანობა არ შეამცირა. აღნიშნული შედეგის შესაძლო ახსნაა ის, რომ ტოპლეი იყენებდა სუსტი ლიტიური აქტივობის მქონე ფაგებს, ხოლო დ'ერელის ექსპერიმენტებში გამოიყენებოდა მხოლოდ ის ფაგები, რომელთაც სამიზნე ბაქტერიების მიმართ ძლიერი ლიტიური აქტივობით გამოირჩეოდნენ. ეს მიდგომა შემდგომშიც არაერთი მეცნიერის მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტებში დადასტურდა (Crump & Wain, 2016). დ'ერელის მიერ მიღებული შედეგების კონფირმაცია მოხდა ჰოლანდიაშიც, კრამერის მიერ (F. D'herelle, 1926) ზემოთ აღწერილი შედეგი იმედის მომცემი აღმოჩნდა და, შესაბამისად, ფაგების კვლევა აქტიურად მიმდინარეობდა ამა თუ იმ ნიშაში მათი გამოყენების შესაძლებლობების დასადგენად. თუმცა თავდაპირველი დიდი ინტერესი დასავლეთში განელდა, ვინაიდან ხელმისაწვდომი გახდა ანტიბიოტიკები, შესაბამისად 1950-1980 წლებში, *Salmonella* სპეციფიკური ფაგების პოტენციალის შესწავლა ცხოველებში სალმონელოზების სამკურნალოდ და პრევენციისათვის შენეულა. აღნიშნული მდგომარეობა შეიცვალა 1990 წლებში, როცა ინტერესი ფაგოთერაპიისა და ზოგადად ფაგების მიმართ კვლავ განახლდა. მეცნიერთა გარკვეული ჯგუფები ისევ დაუბრუნდნენ ფაგებით სალმონელოზების მკურნალობისა და პრევენციის იდეას. აღსანიშნავია ბერჩიერისა და მისი კოლეგების კვლევა (Berchieri at al., 1991), რომელშიც *Salmonella* სპეციფიური ფაგები გამოყენებულ იქნა *S. Typhimurium* - ით ექსპერიმენტულად ინფიცირებული ქათმების სამკურნალოდ. ექსპერიმენტმა აჩვენა ინფექციით გამოწვეული სიკვდილიანობის მნიშვნელოვნად შემცირება, ფაგებით

არანამკურნალები ფრინველების ჯგუფთან შედარებით. ფაგით მკურნალობის ეფექტურობისათვის გამოიყენებოდა ფაგური კონცენტრატები ტიტრით 10^{10} ნკწე/მლ.

ადამიანის სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციის სამკურნალოდ ფაგების გამოყენების ისტორია 1919 წლიდან იწყება. პირველი კლინიკური კვლევები ჩატარდა პარიზის ჰოსპიტალში -Hôpital des Enfants-Malades, დ'ერელისა და ცნობილი პედიატრის, პროფესორ ვიქტორ-ჰენრი ჰუტინელის ხელმძღვანელობით (Summers, 2001b). აღსანიშნავია, რომ კლინიკური კვლევების დაწყებამდე დ'ერელმა, მისი ოჯახის წევრებმა, ჰუნტელმა და ჰოსპიტალის რამდენიმე თანამშრომელმა საცდელი ანტი-დიზენტერიული ფაგური პრეპარატის თერაპიულ დოზაზე 100 ჯერ დიდი რაოდენობა მიიღეს. ეს ფაგის კლინიკური კვლევის წინაპირობად იქნა მიიჩნეული, ვინაიდან არც ერთი მოხალისის შემთხვევაში არავითარი გვერდითი ეფექტი არ გამოვლენილა. შესაბამისად, პროფესორმა ჰუნტელმა ფაგის კლინიკური კვლევისათვის გამოყენებას ოფიციალური ნებართვა მიიღო (Alberts et al., 2004).

პირველი პაციენტი, რომელსაც ფაგებით თერაპია 1919 წლის 2 აგვისტოს ჩატარდა 12 წლის ბიჭი იყო, რომელიც ჰოსპიტალში მწვავე დიზენტერიის დიაგნოზით იქნა მოთავსებული (ფიქსირდებოდა სისხლიანი დეფეკაცია დღეში 10 -12 ჯერ). პაციენტის მასალიდან მიკრობიოლოგიური ანალიზისათვის ნიმუშების აღების შემდეგ, დ'ერელმა პაციენტის მკურნალობა დაიწყო მისი ყველაზე ეფექტური ანტი -დიზენტერიული ფაგური პრეპარატის გამოყენებით, პრეპარატის მიღება ორალურად ხორციელდებოდა, დოზა 2 მლ-ს შეადგენდა. ფაგის მიღების შემდეგ პაციენტის მდგომარეობა სწრაფად გაუმჯობესდა. კიდევ 3, კრიტიკულ მდგომარეობაში მყოფი ბავშვის გადარჩენა მოხერხდა ფაგოთერაპიის შედეგად. ფაგით მკურნალობის დაწყებიდან 24 სთ - ის შემდეგ მათი მდგომარეობა საგრძნობლად გაუმჯობესდა (Summers, 2001b).

პარიზის ჰოსპიტალში -Hôpital des Enfants-Malades დ'ერელის მიერ ჩატარებული კლინიკური ექსპერიმენტის შესახებ პუბლიკაცია დაგვიანებით გამოქვეყნდა, ამიტომაც პირველი პუბლიკაცია, რომელიც მიემდვნა ფაგების ადამიანის მკურნალობისათვის გამოყენებას, რიჩარდ ბრუნგესა და ჯოზეფ მაიზინის ავტორობით საინფორმაციო

წერილის სახით 1921 წელს გამოქვეყნდა (Alberts et al., 2004). აღნიშნულ პუბლიკაციაში მოცემულია ინფორმაცია ფაგების გამოყენების შესახებ კანის სტაფილოკოკური ინფექციის სამკურნალოდ. კვლევაში მონაწილეობდა 6 პაციენტი. ფაგების დატანა ხდებოდა უშუალოდ დაზიანებულ ადგილზე, ღია წყლულებზე. დადებითი ეფექტი ვლინდებოდა 24 – 48 სთ -ის განმავლობაში. შემდგომშიც არაერთი შრომის შესახებ გახდა ცნობილი, რომლებიც მოწმობდნენ ფაგის ანტიბაქტერიული თერაპიული პოტენციალის შესახებ, თუმცა ფაგების მოქმედების მექანიზმის შესახებ ბევრი რამ არ იყო ცნობილი. ზოგიერთი მეცნიერი, მაგალითად დ'ერელის ყველაზე გულმხურვალე კრიტიკოსი ანდრე გრაცია ფაგების თერაპიულ ეფექტს ენზიმებს მიაწერდა და არა მათ ვირუსულ ბუნებას მანამ, სანამ ელექტრონული მიკროსკოპირების ფოტომასალა არ გახდა ხელმისაწვდომი (H.-W. Ackermann, 2011). უნდა აღინიშნოს, რომ ფაგების დადებით თერაპიულ ეფექტთან ერთად ქვეყნდებოდა სტატიები ფაგების არაეფექტურობის შესახებაც, რამაც, ფაგების, როგორც ანტიბაქტერიული თერაპიული საშუალებების მიმართ, არაერთგვაროვანი და წინააღმდეგობრივი დამოკიდებულება ჩამოაყალიბა. (Summers, 2001b) (Alberts et al., 2004).

ყოფილ საბჭოთა კავშირში *Salmonella* სპეციფიური ფაგები ეფექტურად გამოიყენებოდა სალმონელოზების სამკურნალოდ ბავშვებში და ასევე პროფილაქტიკური მიზნით სსრკ ჯარში (Sulakvelidze at al., 2011). პოლონეთის ჰირზფელდის იმუნოლოგიისა და ექსპერიმენტული თერაპიის ინსტიტუტის მკვლევართა ჩანაწერებში მოცემულია ანგარიშები *Salmonella* სპეციფიური ფაგების კლინიკური გამოყენების შესახებ, რომლებიც მოწმობენ, რომ 1952 წლიდან ინსტიტუტი საკუთარ კოლექციაში დაცულ სხვადასხვა ბაქტერიების მიმართ სპეციფიურ ბაქტერიოფაგებს აქტიურად იყენებდა პოლონეთის რამდენიმე ჰოსპიტალში. ყველაზე ხშირად გამოიყენებოდა *Staphylococcus aureus* - ის, *Pseudomonas aeruginosa* -ისა და *E. coli* - ის მიმართ სპეციფიური ფაგები იყო, თუმცა საკმაოდ დიდი წარმატებით გამოიყენებოდა *Salmonella* სპეციფიური ფაგებიც (Weber-Dąbrowska at al., 2001). სსრკ ჯარში ყოველ ახალწვეული 2-3 დღის ინტერვალებით პროფილაქტიკურად იღებდა თბილისის სსგ

„ბაქტერიოფაგი“-ს (დღევანდელი გ.ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის ინსტიტუტი) მიერ წარმოებული სალმონელას ფაგის (ტაბლეტირებული ფორმით) 2 დოზას 15-20 დღის განმავლობაში, რამაც მნიშვნელოვნად შეამცირა ეპიდაფეთქებებისა და ეპიდემიური გავრცელების შესაძლებლობა (Chanishvili, 2012). ეს პრაქტიკა 1990 წლებამდე გაგრძელდა (Chanishvili, 2012).

სსრკ ჰოსპიტლებში 1930-იანი წლებიდან ცდილობდნენ ტიფოიდური ცხელების მკურნალობას სალმონელას ფაგის ინტრავენული ადმინისტრირების გზით. ფაგი მზადდებოდა ფიზიოლოგიურ ხსნარზე, მასში მინიმალური რაოდენობით ორგანული ნივთიერებების დამატებით. მიუხედავად იმისა, რომ ამ ცდებს გვერდითი შედეგები მოყვებოდა, რაც შემცივნებით, ტემპერატურის 38^o-39^oC-მდე აწევით, თავის ტკივილით გამოიხატებოდა, ამ ტიპის მკურნალობას არც ერთი სასიკვდილო შედეგი არ მოყოლია (Chanishvili, 2012). *Salmonella* სპეციფიური ფაგების თერაპიაში წარმატებით გამოყენების მაგალითია ასევე 1946 წელს, ლოს ანჯელესში ჩატარებული კვლევა, რომლის დროსაც ლოს ანჯელესის ჰოსპიტალში განთავსებული ტიფოიდური ცხელებით დაავადებული 56 პაციენტი (ინფექციის გამომწვევი გახლდათ *S. Typhi* (რომელსაც იმ დროისათვის ეწოდებოდა *S. typhosa* და *Eberthella typhosa*) მკურნალობა ჩატარდა *Salmonella*-ს ინტრავენული ფაგებით (ფაგური პრეპარატი დამზადებული იყო გლუკოზის იზოტინური ხსნარის ბაზაზე) (Abedon at al., 2011). აღნიშნულ კვლევაში გამოყებული ფაგების ეფექტურობა წინასწარ იქნა დადგენილი ცხოველური ექსპერიმენტების მეშვეობით (Berchieri et al., 1991). ცხოველური ექსპერიმენტი ჩატარდა *S. Typhi* იმ შტამების გამოყენებით, რომლებიც გამოყოფილ იქნა ინფიცირებული პაციენტებისგან. სწორედ ამ შტამების მიმართ in vitro ტესტით გამოვლენილი ძლიერი ლიზისური აქტივობის მქონე ფაგები შეირჩა, ექსპერიმენტულად ინფიცირებული ცხოველების სამკურნალოდ. ცხოველური ექსპერიმენტის დადებით შედეგებზე დაყრდნობით, მოხდა იგივე ფაგური პრეპარატის გამოყენება ჰოსპიტალიზებული პაციენტების სამკურნალოდ. ფაგებით მკურნალობის შედეგად პაციენტების სიკვდილიანობის მაჩვენებელმა იკლო 20% დან 5%-მდე, შესაბამისად, ავტორებმა დაასკვნეს, რომ

ბაქტერიოფაგები შესაძლოა წარმატებით იქნენ გამოყენებული ტიფოიდური ცხელების მკურნალობისთვის (Abedon et al., 2011). აღნიშნული ექსპერიმენტიდან მცირე ხნის შემდეგ დესრანლომ წარმატებით გამოიყენა Vi ანტიტიფოიდური ფაგი ტიფოიდური ცხელების მქონე 20 პაციენტის მკურნალობისთვის (J.M, 1948) მან გამოიყენა სულ მცირე ოთხი განსხვავებული *Salmonella* სპეციფიური ფაგი. შემდგომში მან განავრცო თავის კლინიკური კვლევა, რისთვისაც შექმნა ე.წ ფაგური კოკტეილი, რომელიც შეიცავდა *Salmonella* სპეციფიურ 6 ფაგურ კლონს. კვლევაში მონაწილეობდა ტიფოიდური ცხელებით დაავადებული 100 პაციენტი კვებეკის (კანადა) პროვინციიდან. ფაგი ინტრავენული გამოყენებისთვის იყო მომზადებული, პრეპარატის საფუძველს გლუკოზის იზოტონური ხსნარი წარმოადგენდა. მკურნალობა აქაც ეფექტური აღმოჩნდა, რადგან პაციენტების სიკვდილიანობის მაჩვენებელი 20% დან 2 % მდე შემცირდა (J.M, 1948).

დღესდღეობით თერაპიული *Salmonella* ფაგები კომერციულად იწარმოება საქართველოში, რუსეთსა და პოლონეთში. საქართველოში გაყიდვაშია რამდენიმე ფაგური პრეპარატი - ინტესტი-ბაქტერიოფაგი (ბაქტერიოფაგის ბიო-პრეპარატები), ენკო-ბაქტერიოფაგი (ბაქტერიოფაგის ბიო-პრეპარატები), სეპტაფაგი (ბიოქიმიფარმი), ტრეველფაგი (ბიოქიმიფარმი), ყოველი მათგანი შეიცავს სხვადასხვა ბაქტერიების მიმართ სპეციფიურ რამდენიმე ფაგურ კლონს და მათ შორის *Salmonella* სპეციფიკურ ფაგებსაც. აღნიშნული ფაგები აქტიურად ინიშნება ექიმების მიერ და გამოიყენება, როგორც გასტროინტესტინალური დაავადებების სამკურნალოდ პედიატრიასა და თერაპიაში, თუმცა მათი გამოყენებისა და ეფექტურობის შესახებ ოფიციალური, სტატისტიკური ინფორმაცია არ მოგვეპოვება.

ბოლო პერიოდში დიდ ინტერესს იწვევს *Salmonella* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყენების კიდევ ერთი სფერო - საკვების უსაფრთხოების კონტროლი. პირველი ანგარიში ამ მიდგომის შესახებ გამოქვეყნებულ იქნა ლევერენტისა და კოლეგების მიერ 2001 წელს (Leverentz et al., 2001). კვლევის ფარგლებში ავტორებმა შეისწავლეს ფაგების პოტენციალი *Salmonella* -თი ექსპერიმენტულად კონტამინირებული, ახლად დაჭრილი

ნესვისა და ვაშლის დეკონტამინაციის შემცირებაში. ფაგური პრეპარატები აღნიშნული პროდუქტის დეკონტამინაციისათვის არ აღმოჩნდა ისეთი ეფექტური, როგორც მოსალოდნელი იყო, განსაკუთრებით დაბალი ეფექტი გამოვლინდა ახლადდაჭრილი ვაშლის შემთხვევაში, რაც ალბათ უკავშირდება ვაშლის წვენის მჟავიანობას (ვაშლის წვენის pH 4.2, ხოლო ნესვის - pH 5.8). აღნიშნულ კვლევაში გამოყენებულ იქნა ფართო სპექტრის მქონე *Salmonella* სპეციფიკური ფაგი SPT-1 (Hans-W. Ackermann et al., 2010).

Salmonella სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ბიოკონტროლისთვის გამოყენების კარგ მაგალითს წარმოადგენს მათი გამოყენება ქათმის ხორცის დასამუშავებლად. პროცედურა ტარდება შეფუთვამდე და ის მკვეთრად ამცირებს უმი ხორცის სალმონელათი კონტამინაციის ხარისხს (Goode et al., 2003). ასევე საინტერესო კვლევაა ჩატარებული ბაქტერიოფაგი **Felix O1** - ის ან მისი მუტანტების გამოყენებით, რომლებიც გაძლიერებულ აქტივობას *S. Typhimurium* DT104 - ის მიმართ ავლენენ. ფაგის პოტენციალის განსაზღვრის მიზნით კვლევა ჩატარდა ამ შტამით ექსპერიმენტულად კონტამინირებული ფრანკფურტერის ქათმების დეკონტამინაციისათვის. შედეგებმა აჩვენა, რომ ფაგით მკურნალობის შემდეგ ბაქტერიების რიცხვმა, ფაგით არანამკურნალებ ნიმუშებთან შედარებით 1.8 – 2.1 log - ით იკლო (Whichard et al., 2016).

Salmonella სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების კვების უსაფრთხოების კუთხით გამოყენების უამრავი მაგალითი არსებობს. აღსანიშნავია მოდისა და მისი კოლეგების კვლევა (MODI et al., 2001), რომლის დროსაც *Salmonella* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დამატება მოხდა ცოცხალ და პასტერიზებულ რძეში, ყველის წარმოების პროცესში, მასში *S. Enteritidis* -ის კონტამინაციის შესამცირებლად. ფაგის დამატება ეფექტური აღმოჩნდა, სამიზნე ბაქტერიის კონცენტრაცია შემცირდა 1-2 log - ით მაშინ, როცა უარყოფით კონტროლში - რძეში, სადაც ფაგები არ იქნა დამატებული, აღნიშნული ბაქტერიის კონცენტრაცია 1 log - ით გაიზარდა (Modi et al., 2001). ასევე მნიშვნელოვანია ავღნიშნოთ *Salmonella* სპეციფიკური ფაგის ბიოკონტროლისთვის გამოყენების შემდეგი მაგალითი: ფაგებს იყენებდნენ ისეთი მცენარეების ბიოკონტროლისათვის, როგორებიცაა ბარდა და იონჯა, პროცედურა ტარდებოდა მოსავლის აღების წინ.

მნიშვნელოვანია, რომ ფაგებს იყენებდნენ *S. Enteritidis* -ს ანტაგონისტი ბაქტერია - *Enterobacter asburiae* -სთან ერთად კომბინაციაში. აღნიშნული ბაქტერიის გამოყენებამ ფაგთან კომბინაციაში, შესამჩნევად გაზარდა პრეპარატის მოქმედების ეფექტურობა და შეამცირა *Salmonella* -თი კონტამინაციის დონე ბარდის ღივებსა და იონჯას თესლებში (YE et al., 2009).

ყველა ზემოთ აღწერილი კვლევა ადასტურებს ფაგების დიდ პოტენციალს, როგორც თერაპიაში, ისე ბიოკონტროლის კუთხით, თუმცა ფაგების პრაქტიკული გამოყენების მასიურად დანერგვისათვის არსებობს გარკვეული შეზღუდვებიც, მაგალითად, ისეთები, როგორცაა ფაგების მოქმედების ვიწრო არეალი. აღნიშნული ფაქტორი განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ისეთი ჰეტეროგენული გვარის შემთხვევაში, როგორც *Salmonella*, რომელიც >2,600 სეროვარს მოიცავს (Eberth et al., 2013). შექმნილი ვითარებიდან გამომდინარე ძალიან იმედის მომცემია, რომ პირველი ფაგური პრეპარატი, რომელიც მხოლოდ *Salmonella* სპეციფიკურ ფაგებს შეიცავს - SalmoFresh, რომელიც შეიქმნა კომპანია Intralytix - ში და, რომლის გამოყენებაც ნებადართულია კვების უსაფრთხოების მიზნებისათვის ამერიკის სურსათისა და წამლის ფედერალური სააგენტოს მიერ (Woolston et al., 2013b), ეფექტური აღმოჩნდა *Salmonella* -ს ყველაზე გავრცელებული და ძლიერ პათოგენური სეროვარების წარმომადგენელთა მიმართ, მათ შორისაა: Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, Agona, Grampian, Senftenberg, Alachua, Infantis, Reading, და Schwarzengrund. პრეპარატს მინიჭებული აქვს სტატუსი - საზოგადოდ აღიარებული როგორც უსაფრთხო (GRAS – Generally Recognized As Safe - საზოგადოდ აღიარებული როგორც უსაფრთხო).

საინტერესო კვლევები არსებობს *Salmonella* სპეციფიური ფაგების, როგორც ბუნებრივი, გარემოსთვის არამავნე, „მიკრობული ბიოპესტიციდის“ შესახებ, რომელსაც შესწევს უნარი საგრძნობლად შეამციროს ან სრულად აღკვეთოს *Salmonella* - თი კონტამინაცია სხვადასხვა მყარი ზედაპირებიდან, ეს იქნება სამზარეულოს სხვადასხვა ინვენტარი, თუ კვების საწარმოო აღჭურვილობები (Woolston et al., 2013a).

ამგვარად, ფაგოთერაპიის ისტორიულ გამოცდილებაზე დაყრდნობით შეგვიძლია თამამად ვთქვათ, რომ ფაგები უსაფრთოა ადამიანისათვის. ფაგების გამოყენების ბევრი ნიშა შეიძლება მოიძებნოს, თუმცა უნდა აღინიშნოს გარემოება, რომელიც გარკვეულ სკეპსის იწვევს როგორც ფაგოთერაპიაში, ისე ფაგობიოკონტროლში არის ე.წ. არასასურველი, პოტენციურად საზიანო გენების არსებობა. მიუხედავად იმისა, რომ ძალიან მცირეა ამ გენების მიერ კონკრეტული პაციენტისადმი რაიმე სახის ზიანის მიყენების შანსი, მიზანშეწონილია, რომ მსგავსი გენების შემცველი ფაგები, აღნიშნული გენების გარემოში გავრცელების თავიდან ასაცილებლად, ამოღებულ იქნეს თერაპიისა, თუ ბიოკონტროლისათვის განკუთვნილი კომერციული პრეპარატებიდან. მაშასადამე, მნიშვნელოვანია დარწმუნებული ვიყოთ, რომ ესა თუ ის *Salmonella* სპეციფიკური ფაგური პრეპარატი არ შეიცავს ბაქტერიულ ტოქსინის მწარმოებელი, ბაქტერიული ვირულენტურობის ან ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განსმსაზღვრელ გენებს. გარდა ამისა, დარწმუნებული უნდა ვიყოთ, რომ პრეპარატში შემავალი ფაგები ნამდვილ ლიტიურ ფაგებს წარმოადგენენ, რაც სრულიად გამორიცხავს მათ მონაწილეობას არასასურველი გენების ჰორიზონტალურ გავრცელებაში.

ანტიბიოტიკებთან შედარებით ფაგების ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს უპირატესობას მათი მუდმივი განახლების შესაძლებლობა (ადაპტაცია) წარმოადგენს, რომელიც საწარმოო პროცესში ხორცილედება. ადაპტაცია საწარმოო პროცესში ახალი შტამების ჩართვას გულსხმობს, რომელზედაც ფაგების გამრავლება ხდება. შესაბამისად აუცილებელია როგორც ფაგების ასევე ასეთი საწარმოო შტამების დეტალური დახასიათება, მათში არასასურველი გენების გამოვლენის მიზნით. დღესდღეობით, თანამედროვე ტექნოლოგიები და კვლევის ისეთი მეთოდები, როგორცაა მაღალი წარმადობის სექვენირება (high-throughput sequencing), აღნიშნული მოთხოვნების დაკმაყოფილება შესაძლებელია, რითაც ფაგური პრეპარატების ახალ თანამედროვე დონეზე აყვანა და დასავლური სტანდარტების დაკმაყოფილება გახდება შესაძლებელი. ეს კი თავის მხრივ გზას გაუხსნის ფაგური პრეპარატების უფრო ფართე გამოყენებას კაცობრიობის ჯანმრთელობის დაცვის სასიკეთოდ.

კვლევის მეთოდოლოგია

თავი 4. ბაქტერიული შტამების შესწავლისათვის გამოყენებული მეთოდები

4.1. შტამების იდენტიფიკაციის მეთოდები

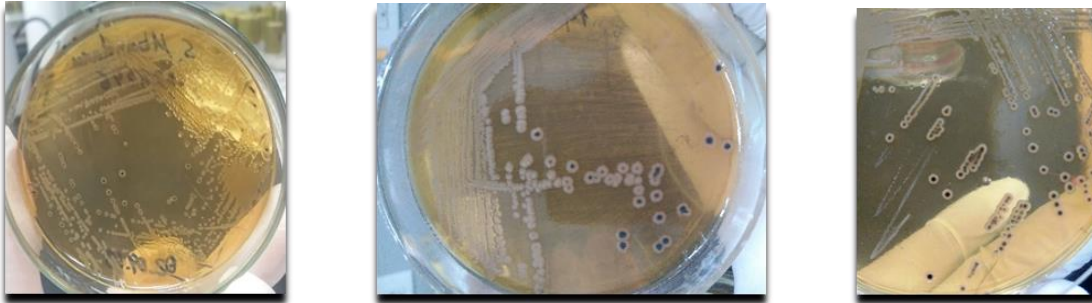
4.1.1. კულტურალური მეთოდი

სავარაუდო *Salmonella* spp იზოლატების გამოსავლენად მიმდინარეობდა ფეკალური ნიმუშების რუტინული ანალიზი. ნიმუშები თავსდება სტერილურ სინჯარებში. ფეკალური მასალის დაახლოებით 0.9 გ 1:10 თანაფარდობით, ზავდება 0.9% NaCl - ში. ნიმუშების სერიული განზავებების ინოკულაციისათვის გამოიყენებოდა შესაბამისი, საკვები ნივთიერებებით გამდიდრებული ბაქტერიული საკვები არეები და სელექტიური ნიადაგები. საინკუბაციო პირობები: 24-48 სთ 37°C -ზე. სავარაუდო იზოლატების ვერიფიკაცია ხდებოდა გრამის წესით შეღებვისა და მიკროსკოპული ანალიზის საფუძველზე.

Salmonella spp.- ის ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაციისათვის ვიყენებით სელექციურ საკვებ არეს - SS აგარს, (85640 SS-Agar - *Salmonella Shigella* Agar, Sigma-Aldrich, Inc.). რომლის შემადგენლობაში შემავალი ნაღვლის მარილები, ნატრიუმის ციტრატი და ბრილიანტის მწვანე (**Brilliant Green**) ემსახურება გრამ დადებითი ორგანიზმების, კოლიფორმებისა და *Proteus* spp. ს ზრდის დათრგუნვას, რითიც ხელს უწყობს *Salmonella* spp. -ს ზრდას. საქონლის ხორცის ექსტრაქტი, ენზიმებით დაშლილი კაზეინი და ცხოველური ქსოვილების ენზიმური დაშლის პროდუქტები წარმოადგენს აზოტის, ნახშირბადისა და ორგანიზმის ზრდისათვის საჭირო ვიტამინების წყაროს. აგარი ასევე შეიცავს ნახშირწყალს ლაქტოზას სახით, რომლის ფერმენტაციასაც *Salmonella* spp. ვერ განახორციელებს, მაგრამ წარმოქმნის გოგირდწყალბადს (H₂S), რაც

განაპირობებს უფერული, შავი ცენტრის მქონე ბაქტერიული კოლონიების წარმოქმნას (Harper & Shortridge, 1969) (M L Mikoleit & Diseases, 2010).

სურათი 2. *Salmonella* spp. - თვის დამახასიათებელი ნაზარდი SS აგარზე.



4.1.2. ბიოქიმიური იდენტიფიკაციის მეთოდი

იზოლატების შემდგომი შესწავლა მიმდინარეობდა სტანდარტული ბიოქიმიური ტესტების გამოყენებით, როგორებიცაა: გლუკოზის ფერმენტაცია, ურეაზული აქტივობა, ინდოლის ტესტი, ლიზინ დეკარბოქსილაზა ტესტი, H₂S - ის წარმოქმნა და გალაქტიტოლის (დულციტოლის) ფერმენტაცია (Matthew Louis Mikoleit, 2014).

4.1.3. მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიის მეთოდი (MALDI-TOF MS)

ბაქტერიული იზოლატების სახეობის დონეზე იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა Bruker MicroFlex™ მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიის მეთოდი (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonik, MA, US) (Singhal at al., 2015). მიუხედავად იმისა, რომ მასს სპექტროსკოპიის მეთოდი აღმოჩენილ იქნა 1900 იან წლებში, მისი გამოყენების ნიშა დღევანდლამდე საკმაოდ ვიწრო იყო და მხოლოდ ქიმიურ მეცნიერებებში გამოიყენებოდა. ელექტრონების გაბნევით იონიზაციისა (ESI- electron spray ionization) და მატრიცაში

ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციის მეთოდების განვითარებამ 1980 იან წლებში საგრძნობლად გაზარდა მას-სპექტრომეტრიის გამოყენების არეალი და დღესდღეობით **MALDI-TOF MS** ფართოდ გამოიყენება, როგორც მიკრობთა იდენტიფიკაციისა და დიაგნოსტიკის საშუალება (Singhal et al., 2015).

მოცემული ძვირადღირებული მეთოდოლოგია ეფუძნება, მიკროორგანიზმებისთვის დამახასიათებელი, 2000-20000 დალტონის სიდიდის რიბოსომული ცილების ანალიზს. მას-სპექტრომეტრიის მეშვეობით უცნობი მიკროორგანიზმის მასის სპექტრის დადგენის შემდეგ ხდება მათი პროტეომიკური ანაბეჭდების შედარება რეფერენტულ მონაცემთა ბაზასთან. რის საფუძველზეც ხდება უცნობი მიკროორგანიზმის სავარაუდო გვარის და სახეობის დადგენა (Wattal et al. 2017).

Bruker MicroFlex™ MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, MA, US) გამოყენებით სახეობის დონის იდენტიფიკაცია შემდეგნაირად მიმდინარეობს: 1მკლ სტერილური მარყუჟის მეშვეობით, მყარ საკვებ არეზე ნაზარდი ადრეული სტაციონალური ფაზის ბაქტერიული კოლონიები გადაიტანება MALDI-ს ფოლადის სასაგნე ფირფიტებზე. ნაცხების შეშრობის შემდეგ მათი დამუშავება ხდება 1მკლ 2-ციანო-3- (4-ჰიდროქსიფენილ) აკრილის მჟავით (Bruker IVD Matrix HCCA) და ყოვნდება ოთახის ტემპერატურაზე 5 წუთის განმავლობაში. ინსტრუმენტის პირველადი კალიბრაცია ბაქტერიული ტესტ სტანდარტის გამოყენებით ხორციელდება (BTS, Bruker Daltonik), ამის შემდეგ ფოლადის სასაგნე ფირფიტებს ათავსებენ აპარატში. Bruker MicroFle აპარატის მართვა FlexControl 3.0-ს (Bruker Daltonik) პროგრამული უზრუნველყოფის მეშვეობით მიმდინარეობს, სადაც მიღებული სპექტრული ანაბეჭდები დარდება Bruker MicroFlex™ მონაცემთა ბაზას და ხდება შტამის სახეობრივი იდენტიფიკაცია (Wattal et al. 2017).

4.1.4. სეროტიპირება

იზოლატების სეროტიპირება ტარდებოდა ე.წ. ვაიტ-კაუფმანის სქემის (White-Kauffmann-Le Minor scheme) მიხედვით. *Salmonella* -ს იზოლატების სეროტიპების

განსაზღვრა ფლაგელის (H) ანტიგენისა და ლიპოპოლისაქარიდული (O) ანტიგენის მიხედვით, მოხდა პოლივალენტური შრატის გამოყენებით (Grimont, PAD. Weill, 2007).

4.1.5. ანტიბიოტიკო-მგრძნობელობის განსაზღვრა

ბაქტერიული იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძნობელობის განსაზღვრა მოხდა კირბი-ბაუერის იგივე დისკო-დიფუზური მეთოდის გამოყენებით. აღნიშნული მეთოდი ეყრდნობა სტანდარტულ პირობებში ბაქტერიული ზრდის ინჰიბიციის გაზომვა/გამოთვლას. მეთოდში გამოიყენება მიულერ-ჰილტონის აგარი (Mueller-Hinton agar). მოცემულ აგარში, ასეპტიკურად ხდება სატესტო ორგანიზმის (ბაქტერიის) ინოკულაცია, შემდგომ კი აგარზე თავსდება ე.წ. ქაღალდის დისკები, რომლებიც გაჟღენთილია ამა თუ იმ კონკრეტული ანტიბიოტიკის განსაზღვრული კონცენტრაციით. ბაქტერიულ ნაზარდთან ერთად აგარზე ხილული ხდება ბაქტერიული ზრდის ინჰიბიციაც. აღნიშნული „ინჰიბიციის ზონების“ გაზომვა საშუალებას იძლევა განისაზღვროს მოცემული ანტიბიოტიკის აქტივობა/შესაბამისობა სატესტო ბაქტერიის მიმართ. მიღებული შედეგების წაკითხვა ხდება კლინიკური და ლაბორატორიული სტანდარტების ინსტიტუტის (CLSI) კრიტერიუმებზე დაყრდნობით (Clinical Laboratory Standard Institute, 2018). მოცემული კრიტერიუმების მიხედვით ორგანიზმი შესაძლოა კლასიფიცირდეს როგორც რეზისტენტული (R), შუალედური (Intermediate (I)) ან მგრძნობიარე/სენსიტიური (Susceptible (S)).(Hudzicki, 2016).

ანტიბიოტიკო მგრძნობელობა შესწავლილ იქნა სულ 11 ანტიბიოტიკის მიმართ, ესენია Ampicillin (A, 10 µg), Amoxicillin + Clavulanic acid (Au, 20 µg/10 µg), Azithromycin (Az, 15µg), Ceftriaxone (Cx, 30 µg), Chloramphenicol (C, 30 µg), Ciprofloxacin (Cip, 5 µg), Nalidixic acid (N, 30 µg), Streptomycin (Sm, 10 µg), Tetracycline (Tc, 30 µg), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (Tm/Su, 1.25 µg/23.75 µg), Sulfamethoxazole (Su, 50 µg).

შედეგების ინტერპრეტირება მოხდა კლინიკური და ლაბორატორიული სტანდარტების ინსტიტუტის (CLSI) კრიტერიუმებზე დაყრდნობით (Clinical Laboratory Standard Institute, 2018).

4.2. ბაქტერიოფაგების შესწავლისთვის გამოყენებული მეთოდები

4.2.1. ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

ახალი ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად გამოიყენებოდა ე.წ. “გამდიდრებული საკვები არის“ მეთოდი (Adams, 1961). ამ მეთოდის პრინციპი დამყარებულია ფაგების სპეციფიკურობაზე, რაც ფაგისა და მასპინძელი ბაქტერიის უნიკალური ურთიერთობით განისაზღვრება. ცნობილია, რომ ფაგების მიერ მასპინძელი უჯრედების ინფიცირებისთვის, რომელიც ბაქტერიის ლიზისით უნდა დასრულდეს, პირველ ეტაპზე ფაგისათვის აუცილებელია პატრონი უჯრედის ზედაპირზე დამაგრება/მიმაგრება (attachment). ეს პროცესი ვერ განხორციელდება, თუ ფაგი სავარაუდო მასპინძელი ბაქტერიის ზედაპირზე შესაბამის რეცეპტორს ვერ მიემაგრება. ამიტომ გამდიდრების მეთოდი გულისხმობს სასურველი მოქმედების სპექტრის მქონე ფაგებისათვის სავარაუდო/პოტენციური მასპინძელი შტამების ნარევის „შეთავაზებას“, რომელიც ასეთი რეცეპტორებით იქნება აღჭურვილი. ჩვენს შემთხვევაში გამოსაყოფი ფაგების მასპინძელ ბაქტერებად იხმარებოდა *Salmonella*-ს როგორც კლინიკური, ისე ვეტერინარული ბაქტერიული შტამები. მეთოდის მიხედვით 10-ჯერადად კონცენტრირებული LB ბულიონის 10 მლ ვათავსებდით 125 მლ მოცულობის ერლენ-მეიერის კოლბაში, ვამატებდით 90 მლ ჩამდინარე, მდინარის ან ზღვის წყლის ნიმუშს, ამ ნარევი ხდებოდა სასურველი შტამის ან შტამების ნარევის 1 მლ-ის ინოკულაცია. ინკუბაციისთვის კოლბა თავსდებოდა 37°C-ზე 18 სთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ ხდებოდა ნარევის ცენტრიფუგირება 6000g - ზე 30 წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტი იფილტრებოდა Ø 45 µm ან Ø 22 µm ზომის ფილტრებში, რის შემდეგაც ხდებოდა ფილტრატის შემოწმება ფაგის არსებობაზე, რისთვისაც გამოიყენებოდა ქვემოთ აღწერილი ლაქების მეთოდი ანუ “Spot-Test“(Garbe et al., 2010) (Kakabadze et al., 2018).

4.2.2. ბაქტერიოფაგების გამოვლენა ლაქების მეთოდით (SPOT-TEST)

ფაგების მიმართ ბაქტერიული შტამების მგრძობელობის (ანუ ფაგების ბაქტერიების მიმართ აქტივობის) განსაზღვრა მოხდა ე. წ. ლაქების მეთოდის, იგივე “Spot Test“ - ის გამოყენებით, რისთვისაც ბაქტერიის 18 სთ- იანი ბულიონური კულტურა ზავდება 10^7 კწე/მლ ტიტრის მიღწევამდე, ხოლო საკვლევი ფაგის ტიტრი კი 10^6 ნკწე/მლ უნდა იყოს, ინფექციის მრავლობითობა (Multiflicity of infection – MOI) ანუ ამ შემთხვევაში ბაქტერიოფაგის როგორც ინფექციური ერთეულის და მასპინძელი უჯრედის რაოდენობრივი შეფარდება 0.1 ტოლია, რაც თითოეულ ფაგს საშუალებას აძლევს შეძლოს მასპინძელ უჯრედზე დამაგრება/მიმაგრება და შემდგომი განვითარება.

საკვლევ ფაგსა და ბაქტერიულ შტამს შორის ინტერაქციის დადგენის მიზნით თითოეული ბაქტერიული კულტურის 300 μ ლ გადააქვთ 5 მლ ნახევრად თხიერ 0.6%-იან აგარში, კარგად ურევენ და გადააქვთ პეტრის ფინჯანზე, რომელიც 2% აგარს შეიცავს და მის ზედაპირზე თანაბრად ანაწილებენ. ფინჯნებს ტოვებენ გასაშრობად ოთახის ტემპერატურაზე. ამის შემდეგ პასტერს პიპეტით ან ავტომატური პიპეტით საკვლევი ფაგის ლიზატის 5-10 μ ლ ფრთხილად გადააქვთ ფინჯნის ზედაპირზე. ფინჯანს აშრობენ ოთახის ტემპერატურაზე, რის შემდეგაც ხდება მისი ინკუბაცია 37°C -ზე 18 სთ განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ ხდება ფაგის ბაქტერიის მიმართ მოქმედების შეფასება. იმისთვის, რომ გამოირიცხოს ცრუ დადებითი შედეგი, ხდება არა მხოლოდ საწყისი ლიზატის გამოყენება, არამედ მისი მინიმუმ სამი ათჯერადი სერიული განზავებისაც. ფაგის მიერ წარმოქმნილი ლიზისური ზონების დახასიათება შემდეგი აღნიშვნებით ტარდება:

CL - სრული ლიზისი, მიკრობზე ფაგის მოქმედების ადგილი გამჭვირვალეა.

SCL - არასრული ლიზისი, ბაქტერიული ნაზარდი ბუნდოვნად შეინიშნება.

OL - აღინიშნება ლიზისური უბნები, რომელიც გადაფარულია ბაქტერიის მეორადი ზრდით, რომელიც უფრო ბუნდოვანია, ვიდრე SCL-ის შემთხვევაში

IPO / IPC (Tv) - ბაქტერიულ ნაზარდზე ცალკეული ლიზისური უბნები წვრილი წერტილების სახითაა წარმოდგენილი. IPO - აღნიშნავს წვრილი ბუნდოვანი კოლონიების არსებობას, ხოლო IPC - გამჭვირვალე კოლონიების არსებობას.

R - შტამი რეზისტენტულია ფაგისადმი. (M. R. Clokie & Kropinski, 2009).

4.2.3. ბაქტერიოფაგების გამოვლენა შტრიხების მეთოდი (STREAK METHOD)

მრავალი საკვლევი ლიზატისა და მრავალრიცხოვანი ტესტ კულტურების არსებობის შემთხვევაში იყენებენ ე.წ. შტრიხების მეთოდს, რომელიც პარაგრაფ 4.2.2 აღწერილი მეთოდის მსგავსია, თუმცა გაცილებით უფრო ეკონომიურია, ვინაიდან ერთ ფინჯანზე რამდენიმე ფაგი და შტამი შეიძლება განთავსდეს. ამისათვის პეტრის ფინჯნების ქვედა (მცირედიამეტრიან) ნაწილს წინასწარ კვადრატებად ხაზავენ. ე.წ. 18 სთ- იანი ტესტ კულტურების წვეთები მარყუჟით გადაიტანება 2% LB აგარიან პეტრის ფინჯანზე დახაზული ზოლის გასწვრივ ხაზების/შტრიხების სახით. პეტრის ფინჯნების 10-15 წთ ოთახის ტემპერატურაზე გაშრობის შემდეგ, თითოეულ შტრიხზე ხდება საკვლევი ფაგების თითო წვეთის ($\approx 5\mu\text{l}$) დატანა. ინკუბაცია - 37°C- ზე 18 სთ-ის განმავლობაში. ბაქტერიულ ნაზარდზე (შტრიხებზე) ლიზისური უბნების არსებობა/არარსებობისა და მათი ხარისხის მიხედვით ხდებოდა შტამის ფაგო - მგრძნობელობის შეფასება ხდება იმავე კრიტერიუმებით, რომელიც აღწერილია პარაგრაფ 4.2.2.-ში (Garbe et al., 2010).

ბაქტერიოფაგების ბაქტერიულ შტრიხებზე ლიზისური უბნების არსებობა სავარაუდოდ ფაგის მოქმედებაზე მიუთითებს, თუმცა იმისათვის, რომ შედეგი სარწმუნოდ ჩაითვალოს, საჭიროა მოხდეს მგრძნობიარე ბაქტერიული კულტურის მიმართ სპეციფიკური ფაგის ტიტრის დადგენა და ცალკეული ფაგური კოლონიების - ე.წ. ნეგატიური კოლონიების გამოყოფა (Klieve, 2005)(Alberts et al., 2004).

4.2.4. სუფთა ფაგური კლონის მიღება - ნეგატიური კოლონიების გაწმენდის მეთოდი

გენეტიკურად სუფთა ფაგური კლონის მისაღებად იყენებენ ე. წ. ნეგატიური კოლონიის გაწმენდის მეთოდს (Plaque Purification assay), ზოგიერთ წყაროში ამ მეთოდს ბაქტერიოფაგის კლონირებასაც უწოდებენ (Azeredo et al., 2018)(M. R. Clokie & Kropinski, 2009), რომლის მიხედვითაც სასურველი შედეგის მისაღებად ნეგატიური კოლონიის გაწმენდის მინიმუმ 3 ციკლის ჩატარებაა საჭირო. პროცედურა გულისხმობს შემდეგს: მზადდება სავარაუდო ფაგის შემცველი ფილტრატის სერიული განზავებები 10^{-1} დან 10^{-5} -მდე ფაგის ბუფერში ან თხევად საკვებ არეში (LB). თითოეული განზავებიდან ფაგის 1 მლ გადააქვთ სტერილურ სინჯარაში, სადაც მას ემატება 10^8 კწე /მლ ტიტრის მქონე სატეტსო ბაქტერიული კულტურის 0.1მლ და დაახლოებით 45°C მდე გამთბარი, 5მლ 0,6 % იანი, ე.წ. ნახევრად თხევადი აგარი. სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნაზავი გადაიტანება 2% აგარიან პეტრის ფინჯანზე. ფინჯნების გაშრობის შემდეგ (≈ 30 წთ) ისინი თავსდება თერმოსტატში 37°C -ზე, შედეგების ანალიზი 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ხორციელდება. მიღებული ნეგატიური კოლონიებიდან არჩევენ ერთ, ცალკეულ კოლონიას, რომელსაც იღებენ პასტერის პიპეტის წვერით ან ავტომატური პიპეტის სტერილური ბუნიკის წვერით, დაუყოვნებლივ შეაქვთ 1მლ თხევად საკვებ არეში და ახდენენ მის ინკუბაციას 30 წთ - 1 სთ ის განმავლობაში 37°C -ზე. ინკუბაციის შემდეგ ფაგური კოლონიის შემცველი ნარევი იფილტრება $\varnothing 45 \mu\text{m}$ ზომის ფილტრში. ისევ ხდება ფილტრატის სერიული განზავებების მომზადება და ზუსტად იგივენაირი პროცედურის გამეორება მინიმუმ 3 ჯერ. აღნიშნული ციკლების გატარების შემდეგ პეტრის ფინჯნებზე უნდა მივიღოთ ერთნაირი ზომისა და გამჭვირვალობის მქონე ფაგური კოლონიები, რაც იმის მანიშნებელია, რომ ფაგების ნარევიდან გამოვაცალკევეთ ერთი ფაგური კლონი. თუმცა ზოგ შემთხვევაში შესაძლოა ფაგს ნეგატიური კოლონიების პოლიმორფიზმი ახასიათებდეს და გასუფთავების ციკლების სიმრავლის მიუხედავად, ვერ შევძლოთ ერთნაირი კოლონიების მიღება.

4.2.5. ბაქტერიოფაგის აქტივობისა და მოქმედების სპექტრის განსაზღვრა

ბაქტერიოფაგის აქტივობის სპექტრს უწოდებენ იმ ბაქტერიული შტამების რიცხვსა და მრავალფეროვნებას, რომლებიც მგრძობელობას ავლენენ აღნიშნული ფაგის მიმართ და, შესაბამისად, ხელს უწყობენ მის გამრავლებას. ფაგის მოქმედების სრული სპექტრის დადგენა პრაქტიკულად შეუძლებელია, რადგან არც ერთი ექსპერიმენტი არ იძლევა შესაძლებლობას შემომწმდეს ფაგის მოქმედება ყველა არსებული ბაქტერიული შტამის მიმართ. ამიტომ ლაბორატორიულ პირობებში, როგორც წესი, ყოველი მოცემული ფაგის აქტივობის შესწავლა ხდება ბაქტერიული შტამების ე.წ. ტესტ-კულტურების წინასწარ შერჩეული ნაკრების მიმართ (Azeredo et al., 2018).

ფაგის აქტივობისა და მოქმედების სპექტრის შესწავლისათვის შემუშავებული მეთოდებიდან ჩვენს მიერ გამოყენებულ იქნა ორი :

1. შტრიხების მეთოდი - Streak method
2. ლაქების მეთოდი - Spot test
3. ორივე მეთოდი აღწერილია პარაგრაფებში 4.2.2 და 4.2.3.

4.2.6. ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა აპელმანის მეთოდის გამოყენებით (APPELMANS, 1921)

აპელმანის მეთოდი გულისხმობს საკვლევი ფაგის ლიზისური აქტივობის განსაზღვრას შესასწავლი ბაქტერიის მიმართ თხევად არეში. ამ ექსპერიმენტის ჩატარებისას ისაზღვრება ფაგის ის უმაღლესი განზავება, რომელსაც ჯერ კიდევ შეუძლია სამიზნე ბაქტერიის ზრდის დათრგუნვა. ეს ტესტი ანტიბიოტიკების მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაციის განსაზღვრის მსგავსია. ექსპერიმენტი მოიცავს შემდეგ საფეხურებს: ხდება საკვლევი ფაგის ათჯერადად განზავება 10^6 -დან 10^{10} მდე ნკწე/მლ 5მლ თხევად საკვებ არეში (LB) და შემდეგ ხდება მისი ინოკულაცია $150 \mu\text{L}$ 10^9 კწე/მლ ტიტრის მქონე სამიზნე ბაქტერიული კულტურით. ნარევის ინკუბაცია

ხდება 37 °C -ზე და შემდეგში ხდება დაკვირვება ნიმუშების გამჭვირვალობაზე 6, 18 და 24 სთ-ის შემდეგ და შედეგების შედარება კონტროლის ჯგუფის ნიმუშებთან (კონტროლი #1 - თხევად საკვებ არეში ინოკულირებული ბაქტერიული კულტურა ფაგის გარეშე (პოზიტიური კონტროლი);, კონტროლი #2 - იმავე საკვებ არეში ინოკულირებული ბაქტეროფაგი ბაქტერიული კულტურის გარეშე (ნეგატიური კონტროლი) (Burrowes at al., 2019). ამ მეთოდით დადგენილი ტიტრი გამოიხატება უარყოფითი ხარისხით, რომელიც იმ განზავებას შეესაბამება, რომელშიც გამჭვირვალობა ჯერ კიდევ შეინიშნებოდა (მაგ. ტიტრი 10^{-4} აღნიშნავს, რომ გამჭვირვალობა აღინიშნებოდა 10000 ჯერად განზავებაში).

ვინაიდან შედეგებზე დაკვირვება რამდენჯერმე, დროის სხვადასხვა ინტერვალში ხდება, ინფორმაციას ვიღებთ არა მხოლოდ ფაგის ლიზისური აქტივობის შესახებ, არამედ მის სტაბილურობაზეც.

ამ მეთოდის ნაკლი იმაში მდგომარეობს, რომ მისი გამოყენებით შეუძლებელია ფაგების ნაწილაკების გამოთვლა. ამის საშუალებას გვაძლევს გრაციას მიერ მოწოდებული ორშრიანი აგარის მეთოდი, რომელიც ქვემოთ არის აღწერილი.

4.2.7. ბაქტეროფაგის ტიტრის განსაზღვრის ორშრიანი აგარის მეთოდი გრაციას მეთოდი (GRATIA, 1936ა.ბ)

ფაგის ნაწილაკების რაოდენობის ანუ ტიტრის განსაზღვრა 1 მლ საკვლევ ლიზატში ხდება გრაციას მეთოდით (Gratia, 1936), (Gratia, 2000) რომელსაც ასევე ორშრიანი აგარის მეთოდს უწოდებენ. ამ მეთოდის გამოყენებით ისაზღვრება ფაგური ნაწილაკების - ნეგატიური (ფაგური)კოლონიის წარმომქნელი ერთეულების რაოდენობა 1მლ-ში. რისთვისაც საკვლევ ფაგის ლიზატი ზავდება 10 ჯერადად (10^{-1} დან 10^{-10} მდე), თითოეული განზავებიდან ფაგის 1 მლ გადააქვთ სტერილურ სინჯარაში, სადაც მას ემატება 10^8 კწე /მლ ტიტრის მქონე სატეტსო ბაქტერიული კულტურის 0.1მლ და 45 °C მდე გამთბარი 5მლ 0,6 % იანი, ე.წ. ნახევრად თხრვადი აგარი. სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნაზავი დაიტანება 2% აგარიან პეტრის ფინჯანზე. ფინჯნების

გამრობის შემდეგ (≈ 30 წთ) ისინი თავსდება თერმოსტატში 37°C - ზე, შედეგების ანალიზი 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ხდება. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება აქტიური ფაგური ნაწილაკების ანუ ნეგატიური კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების რაოდენობით მოცემულ განზავებაში. მისი გამოთვლა 1 მლ საკვლევ ლიზატში ხდება შემდეგი ფორმულის მეშვეობით:

ნეგატიური კოლონიების რიცხვი X 10 X განზავების მაჩვენებელი = ნკწე/მლ

(ნეგატიური კოლონიის წარმომქმნელი ერთეული/მლ)

(Johnson, n.d.) (Alberts et al., 2004)

4.3. ბაქტერიოფაგებისთვის ე.წ. მასპინძელი შტამის შერჩევა

თერაპიული მიზნებისათვის გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგისთვის პატრონი შტამის შერჩევისას რამდენიმე მნიშვნელოვანი საკითხია გასათვალისწინებელი. კერძოდ, ბაქტერია უნდა იყოს იდენტიფიცირებული სახეობის დონეზე. იდენტიფიკაცია უნდა ეყრდნობოდეს თანამედროვე, სანდო მეთოდოლოგიას (მაგ.მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიის მეთოდი (MALDI-TOF MS). სასურველია მოხდეს შტამის სექვენირება, რათა თავიდან იქნეს აცილებული ისეთი არასასურველი ფაქტორების არსებობა, როგორებიცაა ტოქსინები, ჰორიზონტალური გენეტიკური გადასაცვლებები, ვირულენტობა და სხვ. (Merabishvili et al., 2012) ასევე სასურველია, პატრონი შტამები არ იყოს ლიზოგენური, თუ ასეთი შტამები არ არის ხელმისაწვდომი, უნდა შეირჩეს ისეთები, რომელთა მიერ პროფაგების სპონტანური ინდუცირების სიხშირე დაბალი იქნება. აღნიშნულის გათვალისწინებით, მინიმუმადე დაიყვანება საბოლოო ფაგურ პრეპარატში ზომიერი ფაგებისა და შემთხვევითი ჰორიზონტალური გენეტიკური მიმოცვლების არსებობის შესაძლებლობა. შტამის ამ თვისებებზე დაკვირვება შესაძლებელია მისი გენომის სრული სექვენსისა და პროფაგის ინდუცირების მეთოდების გამოყენებით (MARK H. ADAMS, n.d.).

4.4. შტამის შემოწმება პროფაგების არსებობაზე მოდიფიცირებული „ფისკას“ მეთოდის გამოყენებით

პროფაგები და ფაგური ელემენტები წარმოადგენენ ყველაზე დიდ წყაროს ბაქტერიების მრავალფეროვნებასა და ბაქტერიული ევოლუციის პროცესისათვის (Bru, Canchaya, & Hardt, 2004). ისინი უზრუნველყოფენ ინფიცირებულ ბაქტერიას იმუნიტეტით სხვა მონათსავე ფაგებით გამოქვეყნებული სუპერინფექციის წინააღმდეგ, შეუძლიათ გენომის სტრუქტურის მოდიფიკაცია, შესაძლოა იყონ პასიური ვექტორები ვირულენტური გენების გადატანისთვის (ტრანსდუქციის ან ლიზოგენური კონვერსიის მეშვეობით), ისინი შესაძლოა წარმოადგენდნენ აქტიურ კომპონენტებს ბაქტერიის პათოგენეზის რეგულაციისათვის (Bru et al., 2004) (Alberts et al., 2004).

იმ შემთხვევაში, როცა ახალი ბაქტერიოფაგის გამოსაყოფად ვერ ხერხდება კარგად შესაწავლილი და დახასიათებული ბაქტერიული შტამის გამოყენება, მიზანშეწონილია ისინი შემოწმდეს სპონტანურად ინდუცირებადი პროფაგების არსებობაზე (Kumar et al., 2012). ამ ტესტის განხორციელება შესაძლებელია ბაქტერიის დნმ -ის დამაზიანებელი ისეთი აგენტების ზემოქმედებით, როგორებიცაა მაგალითად, ულტრაიისფერი დასხივება და ძლიერი მუტაგენი - მიტომიცინ C (MARK H. ADAMS, n.d.) (Alberts et al., 2004). ვინაიდან, მიიჩნევა, რომ ფაგოთერაპიაში ზომიერი ფაგების გამოყენება არასასურველია, მნიშვნელოვანია ფაგის საიზოლაციო და პატრონ შტამად გამოყენებულ იქნეს ისეთი შტამი, რომელთაგანაც პროფაგების ინდუცირების სიხშირე მაღალი არ იქნება (Kropinski, n.d.-a) (Hyman, 2019).

ჩვენს მიერ აღნიშნული ტესტის ჩასატარებლად გამოყენებულ იქნა მეთოდი, რომელიც წარმოადგენს „ფისკას“ მეთოდის მოდიფიკაციას (Roy T. Fisk, 1942) და გულისხმობს ე.წ. დამველებული შტამის ფილტრატის „დაწვეთებას“ საცდელ ან ინდიკატორ შტამზე, რომლის შედეგადაც შესაძლოა მოხდეს პროფაგების ე. წ. სპონტანური ინდუქცია.

მეთოდი მოიცავს შემდეგ ეტაპებს:

- ხდება საკვლევი კულტურის ინკუბაცია თხევად საკვებ არეში, 37°C -ზე 24 სთ განმავლობაში.
- შემდგომში ხდება ე.წ. ბულიონური კულტურის დაძველება, მისი შენახვა 4 °C -ზე 10 – 14 დღის მანძილზე.
- დაძველებული კულტურების სუპერნატანტი იფილტრება 0,45 მკმ ზომის მემბრანულ ფილტრებში.
- ფილტრატის დაწვეთება ხდება წინასწარ მომზადებული, 1,8% აგარიან პეტრის ფინჯნებზე დატანილი ინდიკატორული შტამების ე.წ. შტრიხებზე, სკრინინგის მეთოდის - „spot test“-ის პრინციპით.
- პეტრის ფინჯნების ინკუბაცია ხდება 37°C -ზე 18-24 სთ - ის მანძილზე.
- პროფაგის გამოვლენის შემთხვევაში ინდიკატორული შტამის შტრიხებზე ხილული გახდება ე.წ. ლიზისური ზონები.

ის შტამი, რომელზედაც ფაგის გამოვლენა მოხერხდება, ითვლება ამ ფაგის პატრონ-შტამად, რომელზედაც უნდა განხორცილედეს მისი შემდგომი გამრავლება; ხოლო ის დაძველებული შტამი, რომლიდანაც ამ ფაგის ინდუცირება მოხდა, ჩაითვლება ლიზოგენურ შტამად.

4.5. დათესვის ეფექტურობა

ფაგისათვის საუკეთესო პატრონი ბაქტერიის შერჩევითვის მნიშვნელოვანია მოხდეს მისი გამრავლების უნარის განსაზღვრა რამდენიმე შტამის მიმართ. პატრონი შტამის შერჩევის ამ მეთოდს დათესვის ეფექტურობის განსაზღვრას უწოდებენ. ძალიან ბევრი ფაგისთვის, მაგ. T4 ტიპის ფაგებისთვის დამახასიათებელია 100 % დათესვის ეფექტურობა ოპტიმალურ პირობებში, რაც იმას გულისხმობს, რომ ყოველ ფაგურ ნაწილაკს, რომელიც ჯდება ბაქტერიულ უჯრედზე, უჯრედში შეღწევისა და შთამომავლობის მოცემის უნარი შესწევს. (Azeredo et al., 2018) (M. R. . Clokie & Kropinski, 2009).

მეთოდი მოიცავს შემდეგ ეტაპებს:

1. ხდება საკვლევი ფაგის მიმართ მგრძობიარე სხვადასხვა ბაქტერიული კულტურების კულტივაცია.
2. კეთდება საკვლევი ფაგის სერიული განზავებები (10^1 დან 10^7 მდე)
3. შემდეგი განზავებებიდან - 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , იღებენ 100 μ l ოდენობით ფაგს, ათავსებენ სტერილურ სინჯარებში, სადაც უმატებენ ასევე 100 μ l ოდენობით ბაქტერიის ე.წ ბულიონურ კულტურას და 3 მლ ოდენობით ნახევრად თხიერ აგარს, შენჯღრევის შემდეგ აღნიშნული ნარევი დაიტანება 1,5% აგარიან პეტრის ფინჯნებზე ინკუბაცია 37°C - ზე 18 – 24 სთ -ის განმავლობაში.
4. ინკუბაციის შემდგომ ხდება ფაგური კოლონიების აღრიცხვა. დათესვის ეფექტურობა განისაზღვრება საკვლევი ბაქტერიის მიმართ მიღებული ფაგის ტიტრისა და პატრონი ბაქტერიის მიმართ არსებული ფაგის ტიტრის ურთიერთშედარებით.
5. ეფექტურობა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$E=T/T_0$$

სადაც **E** - დათესვის ეფექტურობა, **T** – ფაგის ტიტრი საკვლევი ბაქტერიული შტამის მიმართ, **T₀**- ფაგის ტიტრი პატრონი ბაქტერიული შტამის მიმართ(MARK H. ADAMS, n.d.).

იმ შემთხვევაში, თუ **E** მაჩვენებელი 1-ის ტოლია, ეს იმას ნიშნავს, რომ საკვლევი (ტესტ) შტამი ფაგის ისეთივე გამოსავალს იძლევა, როგორც მისი საწყისი პატრონი შტამი. თუ **E>1** და რაც უფრო დიდი იქნება ეს მაჩვენებელი, ტესტ შტამი უკეთეს პატრონად უნდა ჩაითვალოს, ვიდრე საწყისი პატრონი კულტურა, რომელზედაც ეს ფაგი იყო გამოყოფილი(Kropinski, n.d.-b).

4.6. კონცენტრირებული ბაქტერიოფაგის მომზადება

კონცენტრირებული ფაგური ლიზატის მოსამზადებლად პირველ ეტაპზე გამოიყენება პარაგრაფ 4.2.6-ში აღწერილი ორშრიანი აგარის მეთოდი. კონცენტრატის მისაღებად უნდა შეირჩეს ფაგის ის განზავება, რომელიც ამ მეთოდით ე.წ. „ბადეს“ წარმოქმნის, რომელიც ერთმანეთზე გარდამავალი ნეგატიური კოლონიების ქსელისაგან შედგება. ითვლება, რომ ასეთი ქსელი წარმოიქმნება $\approx 10^5$ რაოდენობის ნეგატიური კოლონიებით. ასევე ცნობილია, რომ თითოეული ნეგატიური კოლონია $\approx 10^5$ - 10^5 რაოდენობის ფაგურ ნაწილაკებს (ვირიონებს) შეიცავს. შესაბამისად, პეტრის ფინჯანზე, სადაც „ბადე“ წარმოიქმნა ფაგური ნაწილაკების სავარაუდო რაოდენობა $\approx 10^{10}$ - 10^{11} უნდა შეადგენდეს. იმისდა მიხედვით თუ რა მოცულობის კონცენტრირებული ლიზატის მიღება გვსურს, ორშრიანი აგარის მეთოდით ვამზადებთ რამდენიმე „ბადიან“ პეტრის ფინჯანს. თუ მინის ფინჯნებს ვხმარობთ, ინკუბაციის შემდეგ ფინჯნებს თავდაყირა ვათავსებთ და ფინჯნის სახურავზე ვაწვეთებთ $\approx 0,5$ მლ ქლოროფორმს. ვინაიდან ქლოროფორმს ბაქტერიოციდული ეფექტი აქვს და იგი ხელს უწყობს ბაქტერიული კედლის დაშლას, ყველა ბაქტერიული უჯრედი, რომელშიც ფაგების ახალი თაობაა მომწიფებული, დაიშლება და შესაბამისად ფაგის ტიტრი კონცენტრატში გაიზრდება. ერთჯერადი პლასტმასის ფინჯნების შემთხვევაში ამ პროცედურას გამოვტოვებთ. ამის შემდეგ ორშრიანი აგარის ზედა შრეზე დავიტანთ 1 მლ სტერილურ ბულიონს, ვტოვებთ 1 სთ მაცივარში $0-4^{\circ}\text{C}$ -ზე და შემდეგ შპატელის დახმარებით ვხსნით ბულიონიან ზედა შრეს და გადაგვაქვს ის საცენტრიფუგო სინჯარაში. ცენტრიფუგირება ხდება 5000g 30 წთ განმავლობაში. შემდგომში ხდება სუპერნატანტის ფილტრაცია $0,45\mu\text{m}$ მემბრანული ფილტრის გამოყენებით. ლიზატის ტიტრის განსაზღვრა ხდება გრაციას მეთოდით. კონცენტრირებულ ლიზატს ვამატებთ ქლოროფორმს ისე, რომ მოცულობის $0,05\%$ შეადგინოს. ქლოროფორმი ამ შემთხვევაში კონსერვანტის როლს ასრულებს, რადგან იგი მომაკვდინებლად მოქმედებს ბაქტერიებზე. ამის შემდეგ სუპერნატანტი გადაგვაქვს სტერილურ სინჯარაში და ვინახავთ მაცივარში $0-4^{\circ}\text{C}$ -ზე შემდგომ

გამოყენებამდე (Azeredo et al., 2018). გამოყენების წინ კონცენტრირებული ლიზატი აუცილებლად უნდა გაიტიტროს 4.2.6-ში მითითებული მეთოდით.

4.7. ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია

ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგიის შესასწავლად და ფაგის ტაქსონომიური კუთვნილების დასადგენად, გამოიყენება ელექტრონული მიკროსკოპირების მეთოდი. კვლევისთვის საჭიროა საკვლევი ფაგის სუფთა (სხვა ფაგური კლონებისაგან გაწმენდილი), მაღალი ტიტრის მქონე (არანაკლებ $1 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ) კონცენტრატი. 5მკლ მასალა დაიტანება პიოლოფორმით დაფარულ ბადეზე, ირეცხება ბიდისტილირებული წყლით, ემატება 1% იანი ურანილის აცეტატის 2 წვეთი და შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება ელექტრონული მიკროსკოპით JEOL JEM 1400 TEM ში 80kV-ზე (M. R. Clokie & Kropinski, 2009).

4.8. ბაქტერიოფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი

ბაქტერიოფაგების ლიტიური ბუნების დადგენა, რამდენიმე პარამეტრით ხდება, რომელთა შორის მნიშვნელოვანია მონაცემები მათი გამრავლების შესახებ ერთი პატრონი უჯრედის შიგნით.

4.8.1. ბაქტერიოფაგების პატრონი უჯრედზე ადსორბცია

ფაგის სასიცოცხლო ციკლი, კერძოდ კი ლიტიური ფაგების სასიცოცხლო ციკლი შეიძლება შემდეგ პერიოდებად დაიყოს: ფაგის ადსორბცია ბაქტერიის უჯრედზე, ვირიონის მიერ ნუკლეინის მჟავის უჯრედში შეშვება/ინექცია, ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა, რომლის დროსაც ხდება ფაგის დნმ-ის რეპლიკაცია და ფაგური ნაწილაკების აწყობა და ლიზირებული უჯრედიდან ვირიონების ახალი თაობის გამოსვლა. (F. D'herelle, 1926) (Mark H. Adams, N.D.). როგორც ვხედავთ, ფაგის სასიცოცხლო ციკლის პირველ საფეხურს ბაქტერიის უჯრედის კედელზე მისი ადსორბცია წარმოადგენს. პატრონი ბაქტერიის უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარე

ფაგისა და ბაქტერიის კონცენტრაციის პროპორციულია და იგი დამოკიდებულია ტემპერატურაზე, საკვები არის სიბლანტეზე და ბაქტერიების ტიტრსა და სიცოცხლისუნარიანობაზე. მნიშვნელოვანია ფაგის კონცენტრაცია, ინფექციის მრავლობითობა, როგორც წესი, უმჯობესია იყოს ერთზე ნაკლები, ეს იცავს პროცესს მრავლობითი ადსორბციებისაგან და ამცირებს „უჯრედში შეღწევის გარეშე ლიზის“ (“lysis from without”) (Delbrueck, 1940) (Abedon, 2011).

ბაქტერიოფაგის პატრონ უჯრედზე ადსორბციის პროცესის შესასწავლად უნდა დადგინდეს არაადსორბირებული ფაგებისა ან ინფიცირებული ბაქტერიული უჯრედების რაოდენობა ან ორივე ერთად.

არაადსორბირებული ფაგების რაოდენობის განსაზღვრისათვის საჭიროა შემდეგი ცდის ჩატარება:

იღებენ ბაქტერიულ სუსპენზიასა და ფაგს ისეთი თანაფარდობით, რომ ინფექციის მრავლობითობა შეადგენდეს 1:1. სინჯარას აღნიშნული ნარევით ათავსებენ 37°C-ზე, წყლის აბაზანაში და დროის სხვადასხვა ინტერვალში - 0წთ, 5წთ, 10წთ, 15წთ, და 20წთ - ახდენენ სინჯების აღებას (0.1მლ) და გადატანას 9.9 მლ ბულიონისა 0.4 ქლოროფორმის ნარევიში, სინჯარას შენჯღრევის შემდეგ 10 წთ აყოვნებენ ყინულის აბაზანაში. შემდეგ ხდება თითოეული სინჯის 100 ჯერადი და 1000 ჯერადი განზავება და პეტრის ფინჯნებზე გადატანა გრაციას ორშრიანი მეთოდის გამოყენებით. პარალელურად უნდა მოხდეს კონტროლის მომზადება, იდგმება როგორც ფაგის, ისე ბაქტერიის კონტროლები. ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში 37°C-ზე, შედეგების აღრიცხვა და ანალიზი ხდება 18-24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ (MARK H. ADAMS, n.d.) (Delbrueck, 1940).

ერთი ფაგის ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბცია გამოითვლება შემდეგი ტოლობით:

$$k = 2.3/Bt \times \log P_0/P$$

სადაც k ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტაა (მლ/წთ),

B - ბაქტერიების კონცენტრაცია, t - დრო, რომლის განმავლობაშიც ფაგის საწყისი ტიტრი P_0 ეცემა ფაგის საბოლოო P ტიტრამდე.

რაც უფრო სწრაფია ფაგის ადსორბცია ბაქტერიულ კულტურაზე, მით უფრო სავარაუდოა, რომ იგი ლიტიური ფაგების კლასს განეკუთვნება.

4.8.2. ბაქტერიოფაგის ლატენტური პერიოდისა და გამოსავლიანობის განსაზღვრა

ბაქტერიოფაგის უჯრედშიდა ლატენტური პერიოდისა და თითოეული ინფიცირებული უჯრედიდან საშუალო გამოსავლიანობის განსაზღვრისთვის აუცილებელია წინასწარ ვიცოდეთ t დროის განმავლობაში ბაქტერიოფაგის რაოდენობის ადსორბცია ხდება ბაქტერიულ უჯრედზე, რაც პარაგრაფ 4.8.1-ია აღწერილი.

შემდგომი ცდის მიმდინარეობა შემდეგნაირია: თხევად საკვებ არეში ასჯერადად განზავებული ე.წ. 18 სთ-იანი კულტურა თავსდება 37°C -ზე წყლის აბაზანაში, ბაქტერიის ზრდის ექსპონენციალურ ფაზის ($5 \cdot 10^8$ კწე/მლ) მიღწევამდე. შემდეგ ხდება საკვლევი ფაგის დამატება ($1 \cdot 10^7$ ნკწე/მლ) იმ რაოდენობით, რომ ინფექციის მრავლობითობა შეადგენდეს 0,1. ნარევი კვლავ თავსდება 37°C -ზე წყლის აბაზანაში, შემდეგ მზადდება ე.წ. „განზავებული კულტურა“, საწყისი ნარევიდან 0.1 მლ გადაიტანება 9.9 მლ თხევად საკვებ არეში, ხოლო ამ ნარევიდან ისევ 0.1 მლ გადაიტანება 2.5 მლ თხევად საკვებ არეში ე.წ. ბულიონში. „განზავებული კულტურა“ იდგმება წყლის აბაზანაში და იწყება სინჯების აღება დროის 10 წუთიანი ინტერვალებით, 2 საათის განმავლობაში. ფაგის ტიტრის განსაზღვრა ხორციელდება გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით, რისთვისაც თითოეული სინჯი ზავდება 1:4, 1:10, 1:100 და 1:1000. 37°C -ზე 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ხდება შედეგების აღრიცხვა. ნეგატიური კოლონიების რაოდენობის მიხედვით დგინდება ლატენტური პერიოდი და ფაგის გამოსავლიანობა (Azeredo et al., 2018) (M. R. Clokie & Kropinski, 2009)

4.9. ბაქტერიოფაგების გამძლეობის (მდგრადობის) შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში

1. ფაგის სტაბილურობა ტემპერატურის სხვადასხვა ინტერვალებში განისაზღვრება შემდეგნაირად: შერჩეულ იქნა სამი ტემპერატურული ნიშნული - 45°C, 65°C, 75°C. საკვლევი ფაგის ლიზატი ტიტრით 10^8 ნკწე/მლ თავსდება ზემოთ აღნიშნულ ტემპერატურულ პირობებში და დროის გარკვეულ ინტერვალებში (0', 5სთ, 24სთ) ხდება სინჯების აღება და ფაგის აქტივობის განსაზღვრა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით.

2. ფაგის აქტივობის სხვადასხვა pH-ის პირობებში განსასაზღვრად 9,9მლ სხვადასხვა pH-ის (pH 3', 5', 7', 9', 11') მქონე საკვებ ბულიონში შეგვქონდა იქნა 0,1მლ საკვლევი ფაგის ლიზატი ტიტრით 10^8 ნკწე/მლ. დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 30წთ, 5სთ, 24სთ) ხდებოდა სინჯების აღება და ფაგის აქტივობის ცვლილების განსაზღვრა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით. თითოეული ექსპერიმენტის შედეგების შედარება ხდებოდა ფაგის დადებით კონტროლთან.

4.10. ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა 4°C - ზე შენახვის პირობებში

ფაგის სტაბილურობის განსასაზღვრად საკვლევი ფაგის ლიზატს ტიტრით 10^9 ნკწე/მლ თავსებენ 4°C - ზე 96 ან მეტი დღის განმავლობაში. ფაგის ტიტრის შემოწმებას იწყებენ 7, 14, 21, 28, 56, 96 დღის შემდეგ. ტიტრის განსაზღვრისათვის გამოყენება გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდი.

4.11. ბაქტერიოფაგის დნმ - ის გამოყოფა

ფაგიდან დნმ - ის გამოსაყოფად აუცილებელია გვქონდეს ფაგის კონცენტრატი მაღალ ტიტრში 10^{10} - 10^{12} ნკწე/მლ. მაღალი ტიტრის მქონე ლიზატის მისაღებად უმჯობესია გამოყენებულ იქნეს ფაგის კონცენტრირების ე.წ. ორშრიანი აგარის მეთოდი.

ექსპერიმენტი მოიცავს შემდეგ ეტაპებს:

- 1 მლ ფაგის კონცენტრატი თავსდება 2 მლ-იან სინჯარაში, რასაც შემდგომში ემატება დნმ - აზა (DNaseI) და რნმ - აზა (RNase A), თითოეული 1 μ l - ის ოდენობით. ინკუბაცია ხდება 37°C-ზე, 30 წთ -ის განმავლობაში.
- ემატება 40 μ l 0,5 M EDTA, 25 μ l 20% SDS და 5 μ l პროტეინაზა K 10მგ/მლ, ურევენ ნაზად და აინკუბირებენ 55 °C-ზე 1 სთ - ის განმავლობაში.
- ინკუბაციის შემდეგ ნარევეს ემატება 1 მლ ფენოლ:ქლოფორმ:იზოამილის სპირტის ნარევი (25:24:1). ხდება მისი შენჯღრევა და ცენტრიფუგირება 5 წთ 10000 xg -ზე.
- სუპერნატანტი ფრთხილად გადააქვთ 2 მლ იან სინჯარაში.
- სუპერნატანტს ემატება 1 მოცულობა იზოპროპანოლი და 0.1 მოცულობა 3 M ნატრიუმის აცეტატი (pH 5.2). სინჯარის ნაზად შენჯღრევის შემდეგ უნდა გამოჩნდეს ე.წ. „ბამბის ქულა“, დნმ-ის ნალექი. სინჯარის ოთახის ტემპერატურაზე 15 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ ხდება მისი ცენტრიფუგირება 13000 xg -ზე 10 წთ.
- ცენტრიფუგირების შემდეგ უნდა მოშორდეს სუპერნატანტი, ნალექი გამოშრეს ოთახის ტემპერატურაზე, რამდენიმე საათის განმავლობაში და შემდეგ გაირეცხოს 75 % -იანი ეთანოლით.
- ჰაერზე კარგად გამოშრობის შემდეგ, მიღებული ნალექი იხსნება 50 μ l სტერილურ გამოხდილ წყალში ან EB ბუფერში (10mM Tris HCl, pH 8.5).
- დნმ-ის კონცენტრაციას საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრ Nanodrop ND1000 - ით (Phagehunting Program, 2017).

4.12. ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი

ფაგების გენომის სექვენსისათვის გამოყენებულ იქნა ე.წ. „მომდევნო“ თაობის სექვენირების მეთოდი (Next generation sequencing technologies) (Klumpp, Fouts, & Sozhamannan, 2012). ფაგების ნაწილის სექვენსი განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით, ხოლო ფაგების მეორე ნაწილი დასექვენირდა -

ნანოპორული სეკვენირების (nanopore sequencing) ტექნოლოგიის, MinION მოწყობილობის გამოყენებით (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell); ნანოპორის სეკვენირება უნიკალური, მასშტაბური ტექნოლოგიაა, რომელიც დნმ-ის ან რნმ-ის გრძელი ფრაგმენტების პირდაპირი, რეალურ დროში ანალიზის საშუალებას იძლევა. იგი მუშაობს ელექტრული დენის ცვლილებების მონიტორინგის საფუძველზე, რომელიც წარმოიშვება ნუკლეინის მჟავების ცილოვან ნანოპორში გასვლის დროს. შედეგად მიღებული სიგნალის გაშიფვრა ხდება დნმ-ის ან რნმ-ის სპეციფიკური თანმიმდევრობის უზრუნველსაყოფად. ამ მეთოდისთვის გამოიყენება ე.წ. MinION მოწყობილობა (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell). მონაცემთა ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა Albacore v2.1 (<https://github.com/rrwick/Porechop>). გენომების de novo აწყობის პროცესი (assembly) განხორციელდა Canu v1.6 -ს (<https://github.com/marbl/canu>) გამოყენებით (Koren et al., 2017). გენომის ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ORFs) იდენტიფიცირებისათვის, ორივე მეთოდით დამუშავებული გენომების შემთხვევაში, გამოყენებულ იქნა შემდეგი პროგრამები:

Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>);

Genemarks (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi>);

Glimmer (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi)

ხოლო ფუნქციური ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა შემდეგი პროგრამები:

- pfam <http://pfam.sanger.ac.uk/search>

- InterProScan <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>

გენომების რუკებისა და ე.წ. თანაგანლაგებების/ურთიერთშეთანწყობის (Alignment) შესაქმნელად გამოყენებულ იქნა პროგრამა - Geneious (<https://www.geneious.com/>).

გენომში ტ-რნმ ების არსებობის დადგენა და მათი რაოდენობის განსაზღვრა მოხდა პროგრამების - **ARAGORN, tRNA (and tmRNA) detection** (<http://130.235.244.92/ARAGORN/>) და tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) მეშვეობით.

გენომის რუკის შესაქმნელად და ფაგების გენომების ერთმანეთთან შესადარებლად, გამოყენებულ იქნა Geneious (<https://www.geneious.com/>).

საკვლევი ფაგების ჰომოლოგიური ბაქტერიოფაგების აღმოსაჩენად გამოყენებულ იქნა NCBI მონაცემთა ბაზა (Coordinators, 2016).

4.13. ბაქტერიოფაგების მასპინძელი შტამების სექვენირება და ანალიზი

ბაქტერიული შტამების გენომის სექვენსისთვისაც გამოყენებულ იქნა ე.წ. „მომდევნო“ თაობის სექვენირების მეთოდი MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით. ანოტაციისათვის გამოყენებულ იქნა RAST annotation პროგრამა (https://kbase.us/applist/apps/RAST_SDK/reannotate_microbial_genome/release?gclid=EAlaIQobChMIuIP1qOmA5wIVysqyCh3Y2gSaEAAYASAAEgl1JPD_BwE). ბაქტერიულ გენომში პროფაგების აღმოსაჩენად კი გამოყენებულ იქნა პროგრამები - PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) და PHASTER (<https://phaster.ca/>) (Zhou at al., 2011).

შედეგები

თავი 5. ბაქტერიული შტამების დახასიათება

5.1. კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიული შტამები

ჩვენი სამუშაოს პირველ ეტაპზე მოხდა არატიფოიდური *Salmonella enterica* subsp. *enterica* შტამების შეგროვება სხვადასხვა ქვეყნებიდან და პათოგენის ბინადრობის სხვადასხვა კერიდან. შტამების ნაწილი მიღებული იყო სხვადასხვა ქვეყნებიდან, რომლებიც გამოიყო როგორც ცხოველებიდან, ისე სალმონელოზით დაავადებული ადამიანების საკვლევი ნიმუშებიდან (განავალი, სისხლი) და ასევე *Salmonella*-თი კონტამინირებული საკვები პროდუქტებიდან. სულ შეგროვდა 345 შტამი, რომლებიც გამოგზავნილ იქნა ჩვენს ინსტიტუტში შემდგომი სამუშაოების განსახორციელებლად.

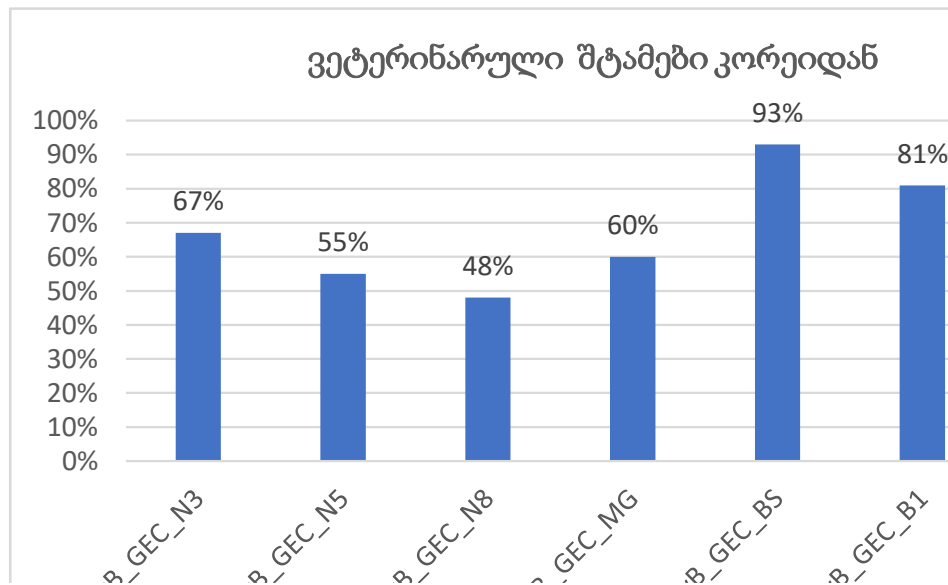
ჩვენს კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიული შტამები იყოფა ოთხ ჯგუფად:

1. ვეტერინარული ბაქტერიული შტამები კომპანიიდან EasyBIO, კორეა (გამოყოფის ადგილი- ღორების ფერმა) (სულ 81 იზოლატი).
2. ბაქტერიული შტამები ირლანდიიდან (ვეტერინარული, კლინიკური, საკვები პროდუქტებიდან გამოყოფილი კულტურები) (სულ 148 იზოლატი)
3. კლინიკური შტამები საქართველოდან (25), სომხეთიდან (77) და ტაჯიკეთიდან (14).

გარდა ამისა ჩვენს კვლევაში გამოყენებულ იქნა კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში *S.Typhi* აფეთქების დროს გამოყოფილი, ESBL- (extended spectrum beta-lactamase - ფართო სპექტრის β -ლაქტამაზა) მაპროდუცირებელი შტამი- CTX-M-15, რომელიც მოგვაწოდა ტროპიკული მედიცინის ინსტიტუტმა, ანტვერპენიდან, ბელგია (Institute of Tropical Medicine (Antwerp, Belgium)).

პირველ ჯგუფში შემავალი *Salmonella* -ს 81 იზოლატის გამოყოფა მოხდა ISTC-საერთაშორისო პროექტის ფარგლებში 1219p, 2010 – 2012 წლებში, სამხრეთ კორეაში, ღორების ფერმაში, ინფიცირებული ცხოველებისგან (კომპანია EasyBio). იზოლატების მიკუთვნება *Salmonella*-ს გვარისათვის მოხდა საყოველთაოდ მიღებული მიკრობიოლოგიური და ბიოქიმიური მეთოდების გამოყენებით. მიკრობიოლოგიური იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა *Salmonella*-ს საიდენტიფიკაციო საკვები არეები (SS, XLD). საბოლოო იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებულ იქნა API 20-E სისტემა. იდენტიფიკაციის შემდგომ იზოლატების გადანაწილება მოხდა შემდეგ სეროტიპებად: *S. Tphimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Galinarum*, *S. Pulorum*. აღსანიშნავია, რომ მოცემული შტამები გამოყენებულ იქნა მხოლოდ ე.წ. მოსამზადებელი სამუშაოებისათვის. ჩვენს მიერ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგებიდან 7 ფაგის (**vB_GEC_N3**, **vB_GEC_N5**, **vB_GEC_N8**, **vB_GEC_MG**, **vB_GEC_BS**, **vB_GEC_B1**, **vB_GEC_B3**.) გამოყოფა სწორედ ამ კოლექციაზე მუშაობის პროცესში მოხდა. ვინაიდან აღნიშნული შტამების შესახებ ჩვენს შემდგომ კვლევაში არ გვექნება საუბარი, მათ მიმართ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების ეფექტურობის აღმნიშვნელი დიაგრამა აქვე იქნება დართული. იხ. სურ. 3

სურათი 3. ვეტერინარული შტამების მიმართ ახლად გამოყოფილი ფაგების ლიტიური აქტივობა

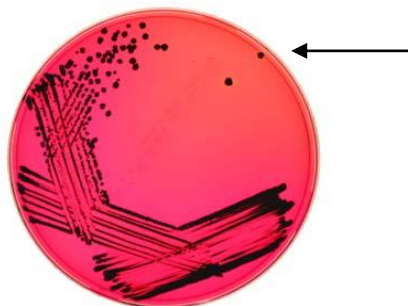


როგორც შედეგებიდან ჩანს, ახლადგამოყოფილმა ფაგებმა მოცემული 81 შტამის მიმართ საკმაოდ მაღალი აქტივობა აჩვენეს, თუმცა სამი ფაგის: vB_GEC_B3, vB_GEC_B1 და vB_GEC_BS აქტივობის მაჩვენებელი განსაკუთრებით მაღალი იყო და შესაბამისად 74%, 81% და 91%-ის უტოლდებოდა. აღნიშნული 7 ფაგი ჩართულ იქნა შემდგომ, ფართომასშტაბიან კვლევებში (პროექტი ISTC A- 2140).

კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიული კულტურების მეორე ჯგუფში ერთიანდებიან ბაქტერიული შტამები ირლანდიიდან - *Salmonella*-ს 141 იზოლატი, რომელთა მოპოვება მოხდა ირლანდიაში არსებული სხვადასხვა ლაბორატორიებიდან, მათ შორის ვეტერინარული, კლინიკური და კვების უსაფრთხოების ლაბორატორიებიდან (Food Pathogen Laboratory at Teagas, Moorepark, Food Microbiology Laboratory at St. Finbarr’s Hospital, Bacteriology Unit at Cork University Hospital, Veterinary Laboratory of Cork, the Center for Food Safety at University College Dublin). იზოლატების *Salmonella*-ს გვარისათვის მიკუთვნება მოხდა სხვადასხვა ბაქტერიოლოგიური და

ბიოქიმიური ტესტების გამოყენებით. კერძოდ, კულტივაცია ხდებოდა XLD აგარზე, რომელზეც *Salmonella* -ს იზოლატები იძლევიან ვარდისფერ, შავი ცენტრის მქონე ან არ მქონე კოლონიებს.

სურათი 4.



Salmonella -სთვის
დამახასიათებელი ტიპიური
ზრდა XLD აგარზე

XLD აგარზე ტიპიური ზრდის მქონე ყველა იზოლატის რეკულტივაცია ხდებოდა საკვებ ნიადაგზე (LB).

ჩატარდა ტესტი თითოეული იზოლატის ურეაზული აქტივობის დასადგენად. *Salmonella enterica* - ს წარმომადგენლები, როგორც მოსალოდნელი იყო, ურეაზ-ნეგატიური აღმოჩნდნენ.

იდენტიფიკაციის შემდეგ ყველა იზოლატის ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის პროფილის დასადგენად, NCCLS სტანდარტების მიხედვით, ჩატარდა ანტიბიოტიკომგრძობელობის ტესტი, 16 ანტიბიოტიკის (Lomefloxacin, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin, Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Spectinomycin, Sulfonamides, Tetracycline, Cefotaxime, Gentamycin, Amikacin, Trimethoprim, Teicoplanin) გამოყენებით (Wayne, 2009) (Clinical Laboratory Standard Institute, 2018). ტესტმა აჩვენა, რომ იზოლატთა უმრავლესობა ავლენს რეზისტენტობას მინიმუმ 1 ანტიბიოტიკის მიმართ. მულტირეზისტენტობა (რეზისტენტობა ორი ან მეტი ანტიბიოტიკის ჯგუფის მიმართ) საკმაოდ ხშირია. ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის ყველაზე ხშირად გამოვლენილი პროფილი შემდეგნაირია - ACSSuTSh და იგი

მეტწილად *Salmonella* Typhimurium - ის იზოლატებისთვისაა დამახასიათებელი, ბევრი მათგანი ასევე ავლენს დამატებით რეზისტენტობას Trimethoprim-ის მიმართ. ქინოლონების (Lomefloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Norfloxacin) მიმართ რეზისტენტობის შემთხვევები შედარებით იშვიათია. თერთმეტმა იზოლატმა გამოავლინა რეზისტენტობა Nalidixic acid (ნალიდიქსის მჟავის) მიმართ. მხოლოდ სამმა იზოლატმა გამოავლინა რეზისტენტობა მესამე თაობის ცეფალოსპორინის Cefotaxime - ის მიმართ. სამივე ეს იზოლატი სეროვარ *Salmonella* Newport - ს მიეკუთვნება.

ჩვენი კვლევის მესამე და ყველაზე მნიშვნელოვან ეტაპზე *Salmonella* - ს შტამების შეგროვება ხდებოდა საქართველოს, სომხეთისა და ტაჯიკეთის კლინიკებიდან. სულ შეგროვდა 126 იზოლატი, ანტიბიოტიკებით არანამკურნალები, სალმონელოზით დაავადებული პაციენტებისაგან. 77 იზოლატი შეგროვდა **სომხეთის ინფექციურ დაავადებათა კლინიკური ცენტრიდან** (“Nork” Clinical Hospital of Infectious Diseases) (ერევანი, სომხეთი), 25 იზოლატი მოპოვებულ იქნა **ინფექციური პათოლოგიის, შიდასა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრიდან** და 14 იზოლატი **დუმანბეს მუნიციპალური ინფექციურ დაავადებათა ჰოსპიტალიდან**.

5.2. შტამების იდენტიფიკაცია და სეროტიპირება

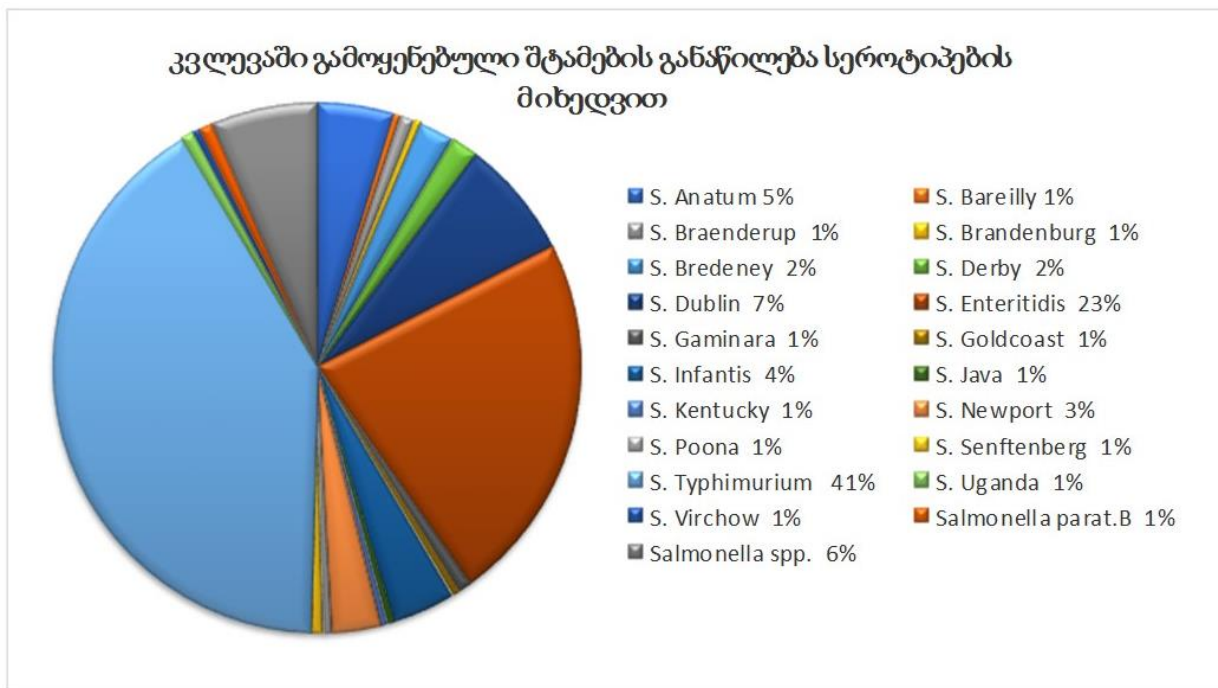
პირველადი, მიკრობიოლოგიური და ბიოქიმიური მეთოდების გამოყენებით იდენტიფიკაციის შემდეგ, ყველა იზოლატი მიეკუთვნა სახეობას *Salmonella enterica*.

საქართველოდან, სომხეთიდან და ტაჯიკეთიდან მიღებული 116 კლინიკური იზოლატის სახეობის დონეზე სარწმუნო იდენტიფიკაციისათვის, ჩატარდა მათი ანალიზი მატრიცაში ლაზერის სხივის დესორბცია იონიზაციაზე დაფუძნებული მასს სპექტროსკოპიის მეთოდის (MALDI-TOF MS) გამოყენებით. ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ 25 იზოლატი (14 ტაჯიკეთიდან, 5 საქართველოდან და 6 სომხეთიდან) არ მიეკუთვნებოდა *Salmonella* - ს გვარს. ისინი მიეკუთვნებოდნენ სახეობებს: *Escherichia coli* (9), *Hafnia alvey* (5), *Morganella morganii* (4), *Enterobacter cobay* (1),

Enterobacter ludwigi (1), *Comamonas kerstersii* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Citrobacter braakii* (2), *Proteus vulgaris* (1). შესაბამისად, აღნიშნული იზოლატები არ იქნა გამოყენებული შემდგომი სამუშაოებისათვის.

სეროტიპირება ჩატარდა ვაიტ-კაუფმანის სქემის მიხედვით. 91 ქართული და სომხური იზოლატიდან 54% მიეკუთვნა სეროტიპს *S. Typhimurium*, 32% - *S. Enteritidis* და 5% დაზუსტებული იდენტიფიცირება ვერ მოხერხდა, ამიტომ ისინი აღინიშნებიან როგორც - *Salmonella* spp. (Grimont, PAD. Weill, 2007). ასევე კაუფმან -ვაიტის სქემის მიხედვით სეროტიპირებული იყო შტამები, რომლებიც ჩვენმა ლაბორატორიამ მიიღო ირლანდიიდან. აღნიშნულ იზოლატებს შორის ყველაზე დიდი რაოდენობით *Salmonella* Typhimurium გვხვდება, მომდევნო ორ, ყველაზე ხშირად გამოყოფილ იზოლატებს შორისაა *Salmonella* Dublin და *Salmonella* Enteritidis წარმომადგენლები. კოლექციაში მოხვდნენ ისეთი იშვიათი სეროტიპებიც, როგორებიცაა *Salmonella* Uganda და *Salmonella* Goldcoast.

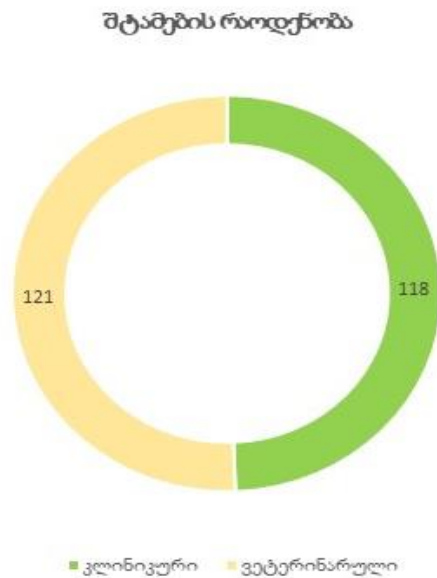
სურათი 5.



როგორც სურათიდან ჩანს, შტამების უმეტესობას (41%) *S. Typhimurium* სეროტიპს მიეკუთვნება, მას მოსდევს სეროტიპი *S. Enteritidis* -23 %, სეროტიპი *S. Dublin* - 7% -ით არის წარმოდგენილი, *S. Anatum* 5%- ით, ხოლო სხვა სეროტიპები თითო-თითო პროცენტითაა წარმოდგენილი. ხოლო არაიდენტიფიცირებული სეროტიპები, *Salmonella* spp. 6%- ით, *S. Anatum* 5%- ით, ხოლო სხვა სეროტიპები 1 ან 2 შტამითაა წარმოდგენილი.

საერთო ჯამში ჩვენს კვლევაში გამოყენებულია 240 შტამი, რომელთაგან 118 კლინიკური შტამია, ზოლო 121 კი - ვეტერინარული, მათ შორის შტამები საქართველოდან, სომხეთიდან და ირლანდიიდან. 148 შტამი ირლანდიიდან, 20 შტამი საქართველოდან, 71 - სომხეთიდან და 1 შტამი კონგოდან - ESBL- (extended spectrum beta-lactamase - ფართო სპექტრის β-ლაქტამაზა) მაპროდუცირებელი შტამი - CTX-M-15. ამ რაოდენობაში არ იგულისხმება ვეტერინარული შტამები კორეიდან, რომლებიც გამოყენებულ იქნა მხოლოდ ე.წ. მოსამზადებელი სამუშაოებისათვის.

სურათი 6.



5.2.1 . *SALMONELLA*-ს საქართველოსა და სომხეთში გამოყოფილი შტამების ანტიბიოტიკორეზისტენტობა

ამ ჯგუფის შტამების ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობის დასადგენად გამოყენებულ იქნა 11 ანტიბიოტიკი ampicillin (A), amoxicillin+clavulanic acid (Au), azithromycin (Az), ceftriaxone (Cx), chloramphenicol (Cm), ciprofloxacin (Cip), nalidixic acid (N), sulfonamide (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), trimethoprim-sulfamethoxazole (T/S).

როგორც კვლევამ აჩვენა, საქართველოში მოპოვებული შტამებიდან მხოლოდ 3 კლინიკურ შტამს აღმოაჩნდა მრავლობითად ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენოტიპი, ამ შტამებიდან 2 მიეკუთვნება *S. Typhimurium*, ერთი - *S. Enteritidis*. მათ შორის იყო *S. enteritidis* 104, რომელიც შემდგომში გამოყენებულ იქნაცხოველური ინფექციური მოდელის შესაქმნელად.

სომხეთში გამოყოფილი კლინიკური იზოლატების 74.64% მულტირეზისტენტული აღმოჩნდა ანტიბიოტიკების მიმართ, აქედან 44 მიეკუთვნებოდა *S. Typhimurium*, 5 - *S. Enteritidis*, 2 - *S. Derby*, 1 - *S. Kentucky*, და 1 *S. Newport*. მულტირეზისტენტულად ითვლება შტამი, თუ ის 3-ზე მეტი ანტიბიოტიკის კლასის მიმართ არის რეზისტენტული. შედეგების ანალიზმა აჩვენა, რომ რეზისტენტობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი ფიქსირდება Nalidixic acid (სინთეტური ქუინოლონის) მიმართ - 68.13%, სხვა ანტიბიოტიკებზე რეზისტენტობის მაჩვენებელი შემდეგნაირად ნაწილდება: sulfonamide- 61.54%, ampicillin (a Penicillin) - 52.75%, amoxicillin + clavulanic acid - 47.25%, ceftriaxone (a cephalosporin) - 41.76% და ciprofloxacin (a fluoroquinolone) - 14.29%. იზოლატების საგულისხმო რაოდენობამ (13 შტამი) გამოავლინა რეზისტენტობა ფლოროქუინოლონებისა და მესამე თაობის ცეფალოსპორინების (11 შტამი) მიმართ, ეს ის ანტიბიოტიკებია, რომლებიც ყველაზე ხშირად გამოიყენებიან *Salmonella* -თი გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ. მხოლოდ 9 იზოლატი საქართველოში გამოყოფილი შტამებიდან და 5 იზოლატი სომხეთში გამოყოფილი შტამებიდან

აღმოჩნდა მგრძობიარე ყველა ანტიბიოტიკის მიმართ. არცერთი იზოლატი არ აღმოჩნდა რეზისტენტული ყველა გამოყენებული ანტიბიოტიკის მიმართ. მაქსიმალური რიცხვი ანტიბიოტიკებისა, რომელთა მიმართაც რეზისტენტული აღმოჩნდა ცალკეული იზოლატი გახლდათ - 9 და მხოლოდ სომხეთში გამოყოფილი *S. Typhimurium* - ის ოთხმა იზოლატმა აჩვენა ასეთი მაღალი რეზისტენტობა. ყველაზე ეფექტური ანტიბიოტიკი აღმოჩნდა Azithromycin ეფექტურობის 94.51% - იანი მაჩვენებლით. ყველაზე ნაკლებ ეფექტური ანტიმიკრობული აგენტი აღმოჩნდა Nalidixic acid, შტამების მხოლოდ 31, 87% ავლენს მის მიმართ სენსიტიურობას.

ცხრილი N 1

არატიფოიდური Salmonella სეროტიპების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილები

| პროფილის No. | ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილი | MDR ^a | იზოლატების რაოდენობა | იზოლატის საიდენტიფიკაციო ნომერი † | სეროტიპი | გამოყოფის წელი | ESBL ^b |
|---|----------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------|----------------|-------------------|
| A) სომხეთში გამოყოფილი კლინიკური ანტიბიოტიკორეზისტენტული იზოლატები n=53 | | | | | | | |
| 1 | AAu*CxN | 4 | 12 | 105 [†] | Typhimurium | 2011 | + |
| | | | | 645 [†] | Typhimurium | 2006 | + |
| | | | | 678 [†] | Typhimurium | 2011 | + |
| | | | | 1214 | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 1349 | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 2324 | Typhimurium | 2012 | + |
| | | | | 2503 | Typhimurium | 2016 | + |
| | | | | 2730 | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 3128 | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 4216 | Typhimurium | 2011 | + |
| | | | | 8019 | Typhimurium | 2012 | + |
| 8130 | Typhimurium | 2014 | + | | | | |
| 2 | AAu*CxCip*N | 4 | 6 | 3017 [†] | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 3109 | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 3175 [†] | Typhimurium | 2016 | + |
| | | | | 5084 | Typhimurium | 2011 | + |

| | | | | | | | |
|----|------------------------|---|---|-------------------|-------------|------|---|
| | | | | 5703 | Typhimurium | 2012 | + |
| | | | | 5730 | Typhimurium | 2012 | + |
| 3 | ACxN | 3 | 5 | 60 [†] | Typhimurium | 1996 | + |
| | | | | 69 [†] | Typhimurium | 2006 | + |
| | | | | 684 [†] | Typhimurium | 1996 | + |
| | | | | 1051 | Typhimurium | 2012 | + |
| | | | | 1726 | Typhimurium | 2013 | - |
| 4 | AAu*CxAz*Cip*N | 5 | 3 | 115 [†] | Typhimurium | 2011 | + |
| | | | | 3194 [†] | Typhimurium | 2012 | + |
| | | | | 3406 [†] | Typhimurium | 2012 | + |
| 5 | AAuCx Cip*N | 4 | 2 | 1328 [†] | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 5943 | Typhimurium | 2013 | + |
| 6 | AAu*CxCip*NT/S | 5 | 2 | 6004 [†] | Typhimurium | 2013 | + |
| | | | | 8011 [†] | Typhimurium | 2014 | + |
| 7 | CipNSmTcSu | 4 | 2 | 4649 [†] | Derby | 2016 | - |
| | | | | 4970 [†] | Derby | 2016 | - |
| 8 | SmTcSu | 3 | 2 | 5064 [†] | Typhimurium | 2016 | - |
| | | | | 8239 [†] | Typhimurium | 2016 | - |
| 9 | AAuCxAzNSmTc*CmT/S | 9 | 1 | 3040 [†] | Typhimurium | 2016 | + |
| 10 | AAuCxAzNSm*Tc*CmT/S | 9 | 1 | 3725 [†] | Typhimurium | 2016 | + |
| 11 | AAuCxAzCip*NSmTc*CmT/S | 9 | 1 | 3246 [†] | Typhimurium | 2016 | + |
| 12 | AAuCxAz*Cip*NSm*TcCmSu | 9 | 1 | 3889 [†] | Typhimurium | 2013 | - |
| 13 | AAuCip*NTcCmT/S | 6 | 1 | 1722 [†] | Typhimurium | 2013 | - |
| 14 | AAuCxCip*NCmSu | 6 | 1 | 3854 | Typhimurium | 2013 | - |
| 15 | AAuCip*NSmCmT/S | 6 | 1 | 5923 [†] | Typhimurium | 2011 | - |
| 16 | A*CxNCmTcSu | 6 | 1 | 5962 [†] | Typhimurium | 2012 | + |
| 17 | AAu*CxNSu | 5 | 1 | 1320 | Typhimurium | 2016 | + |
| 18 | AAu*NTc* | 4 | 1 | 2017 | Typhimurium | 2013 | + |
| 19 | ACxCip*N | 4 | 1 | 5048 | Typhimurium | 2011 | + |
| 20 | NTcCm | 3 | 1 | 2330 | Typhimurium | 2012 | - |
| 21 | AAu*CxNT/S | 5 | 1 | 126 [†] | Enteritidis | 2011 | + |
| 22 | ACip*NT/S | 3 | 1 | 588 [†] | Enteritidis | 2016 | - |

| | | | | | | | |
|---|-----------|---|---|-------------------|-------------|------|---|
| 23 | ANSm*Cm | 4 | 1 | 6059 [†] | Enteritidis | 2016 | - |
| 24 | A*TcCm | 3 | 1 | 6187 [†] | Enteritidis | 2016 | - |
| 25 | ACx*CipN | 3 | 1 | 7201 [†] | Enteritidis | 2016 | - |
| 26 | AAu*Cip*N | 3 | 1 | 478 [†] | Kentucky | 2016 | - |
| 27 | A*NTm/Su | 3 | 1 | 7187 [†] | Newport | 2013 | - |
| B) საქართველოში გამოყოფილი ანტიბიოტიკორეზისტენტული იზოლატები , n=3 | | | | | | | |
| 28 | AAu*CxSu | 4 | 1 | 104 [†] | Enteritidis | 2016 | - |
| 29 | AAu*NCmSu | 5 | 1 | 311 [†] | Typhimurium | 2016 | - |
| 30 | AAu*SmT/S | 4 | 1 | 1150 [†] | Typhimurium | 2016 | - |

აღნიშვნები: ampicillin (A), amoxicillin+clavulanic acid (Au), azithromycin (Az), ceftriaxone (Cx), chloramphenicol (Cm), ciprofloxacin (Cip), nalidixic acid (N), sulfonamide (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), trimethoprim-sulfamethoxazole (T/S).

^a ანტიბიოტიკორეზისტენტობის კლასები

^b ESBL-მწარმოებელის ფენოტიპი: დადებითი (+), უარყოფითი (-);

* შუალედური ფენოტიპი.

5.3. „მასპინძელი შტამების“ შერჩევა და დახასიათება

კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიოფაგების მასპინძელ შტამებად შერჩევა განხორციელდა დათესვის ეფექტურობის ტესტის (Azeredo et al., 2018) შედეგების საფუძველზე. სულ შერჩეულ იქნა 8 შტამი, მათგან 3 შტამი ე.წ. ვეტერინარული შტამების კოლექციიდანაა (*Salmonella enterica* Enteritidis 3, *Salmonella enterica* Typhimurium 4, *Salmonella enterica* Typhimurium 6), ხოლო დანარჩენი 6 შტამი კლინიკურ შტამებს განეკუთვნება (*Salmonella enterica* Enteritidis 232, *Salmonella enterica* Enteritidis 407, *Salmonella enterica* Typhimurium 641, *Salmonella enterica* Enteritidis 765, *Salmonella enterica* Typhimurium 1328).

ცხრილი N 2 მასპინძელი შტამების დახასიათება

| შტამის დასახელება | სახეობა/სეროტიპი | გამოყოფის წყარო | გამოყოფის ადგილი | გამოყოფის წელი | პროფაგების რაოდენობა (intact/incomplete/pr esumable) | ფაგები, რომლებიც მრავლდებიან აღნიშნულ შტამებზე |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|--|----------------|--|--|
| SeE.3 | <i>S. enterica</i> Enteritidis | ლორის ექსკრემენტი | ლორების ფერმა, სამხ. კორეა (EasyBIO) | 2011 | 4 (1/3/0) | vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_MG |
| SeT.4 | <i>S. enterica</i> Typhimurium | ლორის ექსკრემენტი | ლორების ფერმა, სამხ. კორეა (EasyBIO) | 2011 | 10 (6/3/1) | vB_GEC_BS |
| SeT.6 | <i>S. enterica</i> Typhimurium | ლორის ექსკრემენტი | ლორების ფერმა, სამხ. კორეა (EasyBIO) | 2011 | 0 | vB_GEC_NS7, vB_GEC_B3, vB_GEC_B1 |
| 232 | <i>S. Enteritidis</i> 232 | დიარეის მქონე პაციენტი | ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი | 2015 | 5 (2/3/0) | vB_GEC_M4 |
| 407 | <i>S. Enteritidis</i> 407 | დიარეის მქონე პაციენტი | ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი | 2016 | 4 (1/3/0) | vB_GEC_M5 |
| 641 | <i>S. Typhimurium</i> 641 | დიარეის მქონე პაციენტი (სეფსისი) | ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი | 2016 | 3 (1/1/1) | vB_GEC_TR |
| 765 | <i>S. Enteritidis</i> 765 | დიარეის მქონე პაციენტი | ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი | 2016 | 5 (2/3/0) | vB_GEC_Hi |
| S.t 7A | <i>S. Typhimurium</i> 1328 | კლინიკური | სომხეთის ინფექციურ დაავადებათა | 2016 | 2 (1/1/0) | vB_GEC_7A |

| | | | | | | |
|--|--|--|---------------------|--|--|--|
| | | | კლინიკური ცენტრი | | | |
|--|--|--|---------------------|--|--|--|

ცხრილში N 2 ჩამოთვლილი შტამები გამოყენებული იქნა ახალი ფაგების გამოყოფისა და გამრავლებისათვის. გამოკვეთილი სავარაუდო მასპინძელი შტამების შემოწმება მოხდა მათში პროფაგების არსებობაზე, მოდიფიცირებული „ფისკას“ მეთოდის გამოყენებით (Roy T. Fisk, 1942). ვინაიდან პროფაგების სპონტანური ინდუქცია არც ერთი შტამის შემთხვევაში არ დაფიქსირებულა, აღნიშნული შტამები შეირჩა მოცემული ფაგების მასპინძელ შტამებად.

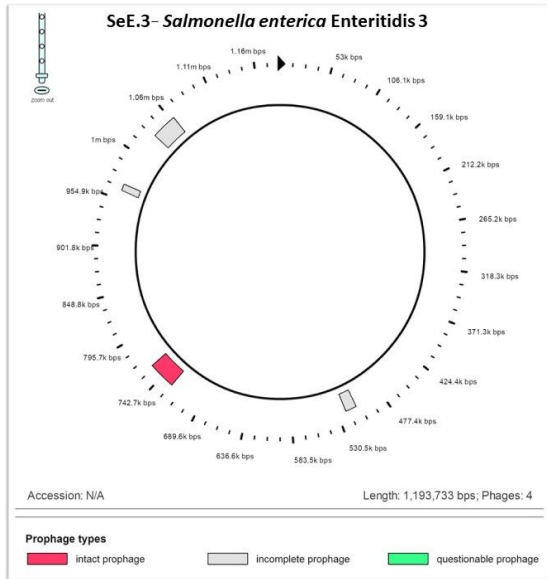
ჩვენი კვლევის ფარგლებში, მოხდა მასპინძელი შტამების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შესწავლა (სექვენსი). ასევე მოხდა შტამების გენომების შესწავლა მათში პროფაგების არსებობაზე PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) და PHASTER (<https://phaster.ca/>)(Zhou et al., 2011) პროგრამების გამოყენებით.

5.3.1. კვლევაში გამოყენებული ე.წ. მასპინძელი შტამების (HOST STRAINS) პროფაგური პროფილები

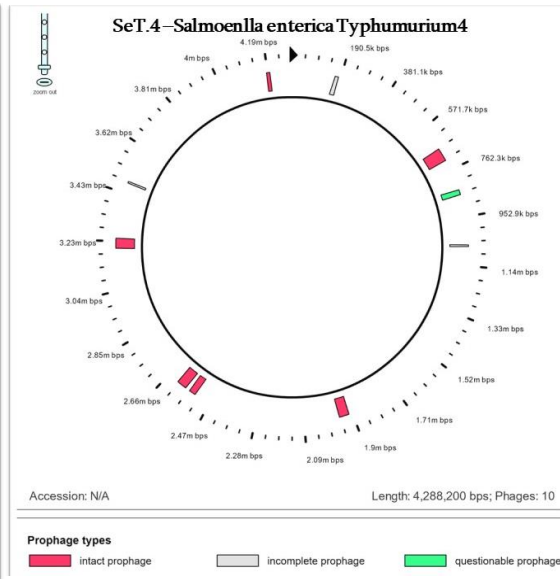
შტამი - **SeE.3**-(*Salmonella enterica* Enteritidis 3), რომელიც ვეტერინარული შტამია და წარმოადგენს 4 ბაქტერიოფაგის (vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_Mg) მასპინძელ შტამს, შეიცავს 4 პროფაგს. ოთხიდან მხოლოდ ერთი წარმოადგენს ინტაქტურ პროფაგს (intact prophage), ხოლო დანარჩენი სამი არასრულყოფილ პროფაგს (incomplete prophage). **იხ. სურათი 7.**

შტამი **SeT.4** -*Salmonella enterica* Typhimurium 4, რომელიც ასევე ვეტერინარული შტამია და წარმოადგენს ფაგის vB_GEC_Bs მასპინძელ შტამს, შეიცავს 10 პროფაგს, რომელთაგან 6 ინტაქტური პროფაგია, 3 - არასრულყოფილ პროფაგია, ხოლო 1 სავარაუდო პროფაგია (presumable). **იხ. სურათი 8.**

სურათი 7.



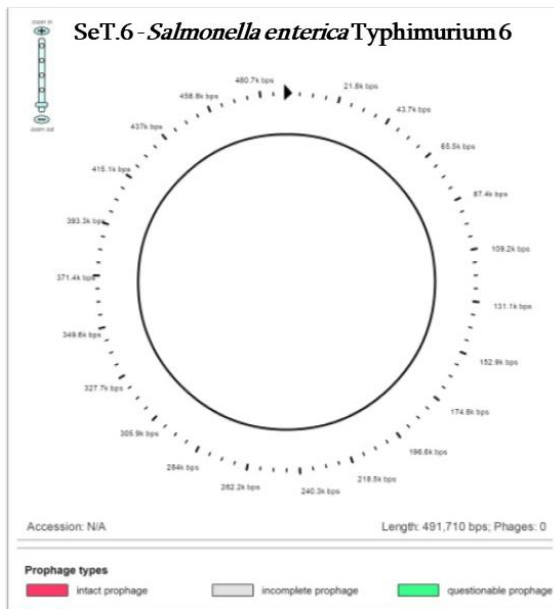
სურათი 8.



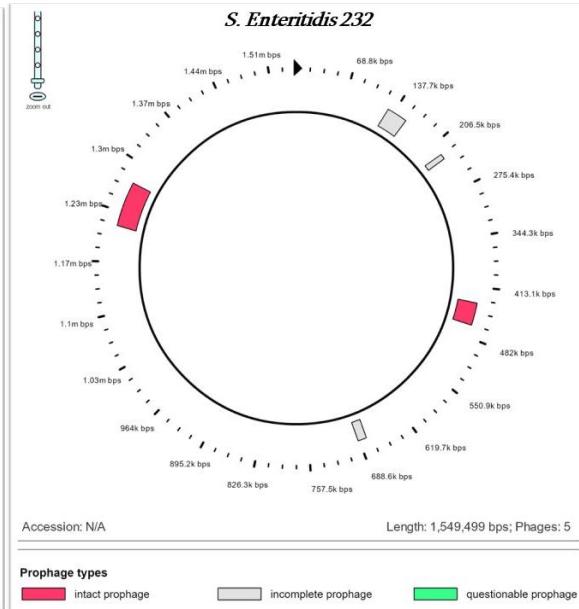
რაც შეეხება შტამს **SeT.6 - *Salmonella enterica* Typhimurium 6**, რომელიც ასევე ვეტერინარული წარმოშობისაა და ფაგების - vB_GEC_NS7, vB_GEC_B3, vB_GEC_B1 მასპინძელი შტამია, ზემო აღნიშნული პროგრამების გამოყენებით გენომის შესწავლის შედეგად პროფაგური ჩანართები გენომში არ აღმოაჩნდა. იხ. სურათი 9.

შტამი ***S. Enteritidis* 232** - ის (vB_GEC_M4 -ის მასპინძელი შტამი). კლინიკური შტამია და გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტისგან, 2015 წელს (თბილისის ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი). მისი პროფაგური პროფილის შესწავლამ აჩვენა, რომ ამ შტამის გენომში იძებნება სულ 5 პროფაგი - 2 ინტაქტური პროფაგი (intact prophage) და 3 არასრულყოფილი პროფაგი (incomplete prophage). იხ. სურათი 10.

სურათი 9.



სურათი 10.

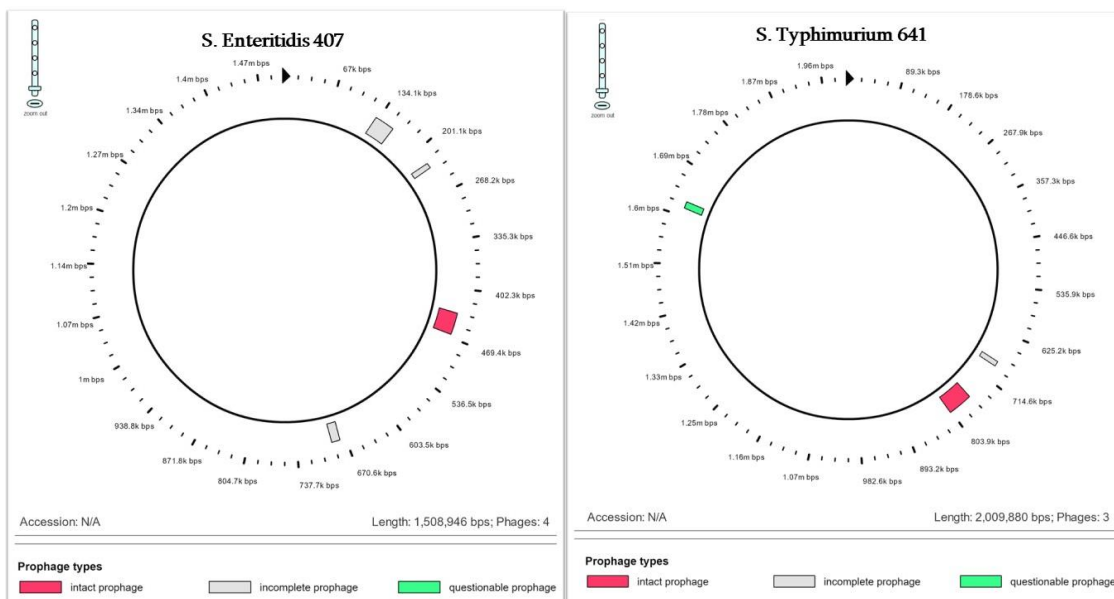


შტამი *S. Enteritidis* 407 (vB_GEC_M5 - ის მასპინძელი შტამი), კლინიკური შტამია, რომელიც გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტისგან (თბილისის ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი). მისი გენომის პროფაგური პროფილის შესწავლამ აჩვენა, რომ იგი შეიცავს 4 პროფაგს, რომელთაგან მხოლოდ ერთი პროფაგია ე.წ. ინტაქტური პროფაგი, ხოლო დანარჩენი სამი ე.წ არასრულყოფილი პროფაგს წარმოადგენს. **იხ. სურათი 11.**

შტამი *S. Typhimurium* 641 (vB_GEC_TR - ის მასპინძელი შტამი), ასევე კლინიკური შტამია, რომელიც გამოყოფილია დიარეის მქონე, თანდართული სეფსისის მქონე პაციენტისაგან (თბილისის ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი). მისი გენომის პროფაგური პროფილის შესწავლამ გამოავლინა, რომ იგი შეიცავს სამ პროფაგს, რომელთაგან მხოლოდ ერთია ინტაქტური პროფაგი, ერთი ე.წ. არასრული პროფაგია, ხოლო მესამე სავარაუდო პროფაგებს განეკუთვნება. **იხ სურათი 12.**

სურათი 11.

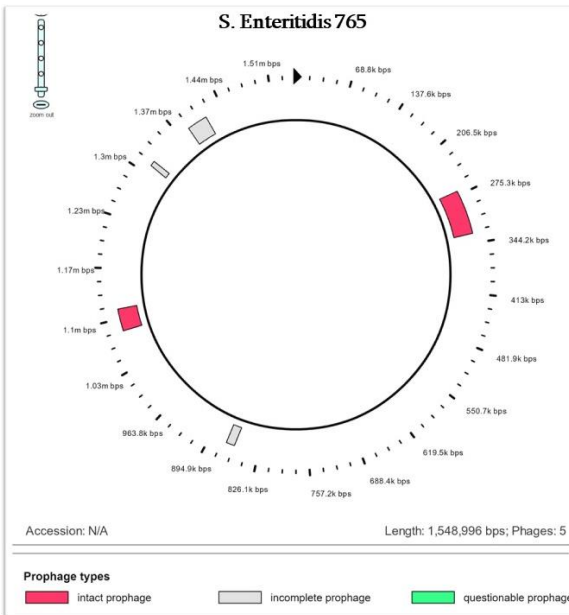
სურათი 12



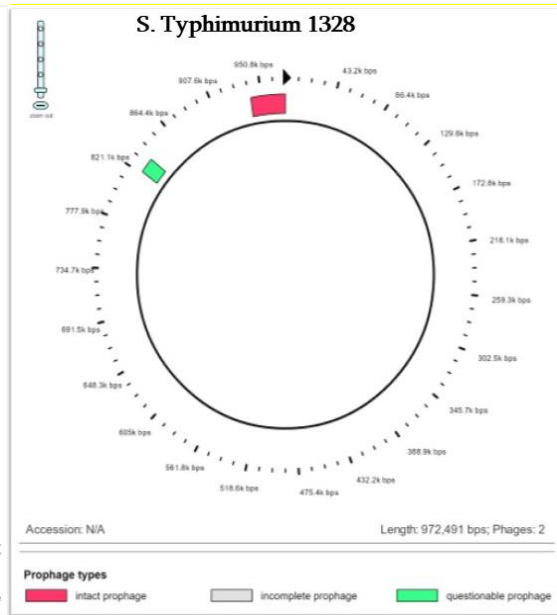
შტამი *S. Enteritidis* 765 (vB_GEC_Hi - ის მასპინძელი შტამი), კლინიკური ბაქტერიული შტამია, გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტისგან (თბილისის ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი). მის გენომში აღმოჩენილ იქნა 5 პროფაგი, რომელთაგან ორი ე.წ. ინტაქტური პროფაგია, ხოლო სამი ე.წ. არასრული პროფაგი. **იხ. სურათი 13.**

შტამი *S. Typhimurium* 1328 (vB_GEC_7A - ის მასპინძელი შტამი). ასევე კლინიკური შტამია (სომხეთის ინფექციურ დაავადებათა კლინიკური ცენტრი). მისი გენომის ანალიზმა მხოლოდ ორი პროფაგი გამოავლინა, რომელთაგან ერთი ინტაქტური პროფაგია, ხოლო მეორე ე.წ. არასრული პროფაგი. **იხ. სურათი 14.**

სურათი 13.



სურათი 14.



5.4. კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიოფაგები

ჩვენს მიერ სამუშაოს განმავლობაში გამოყოფილი და შესწავლილი იყო 13 ბაქტერიოფაგი, რომელთაგანაც Siphoviridae ოჯახს მიეკუთვნება 6 ფაგური კლონი: - **vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5** და **vB_GEC_Hi**; Myoviridae ოჯახს მიეკუთვნება 6 კლონი: **vB_GEC_Mg, vB_GEC_Bs, vB_GEC_NS7, vB_GEC_7A, vB_GEC_B1** და **vB_GEC_B3**; ხოლო Podoviridae-ს ოჯახს მხოლოდ ერთი ფაგი - **vB_GEC_TR**.

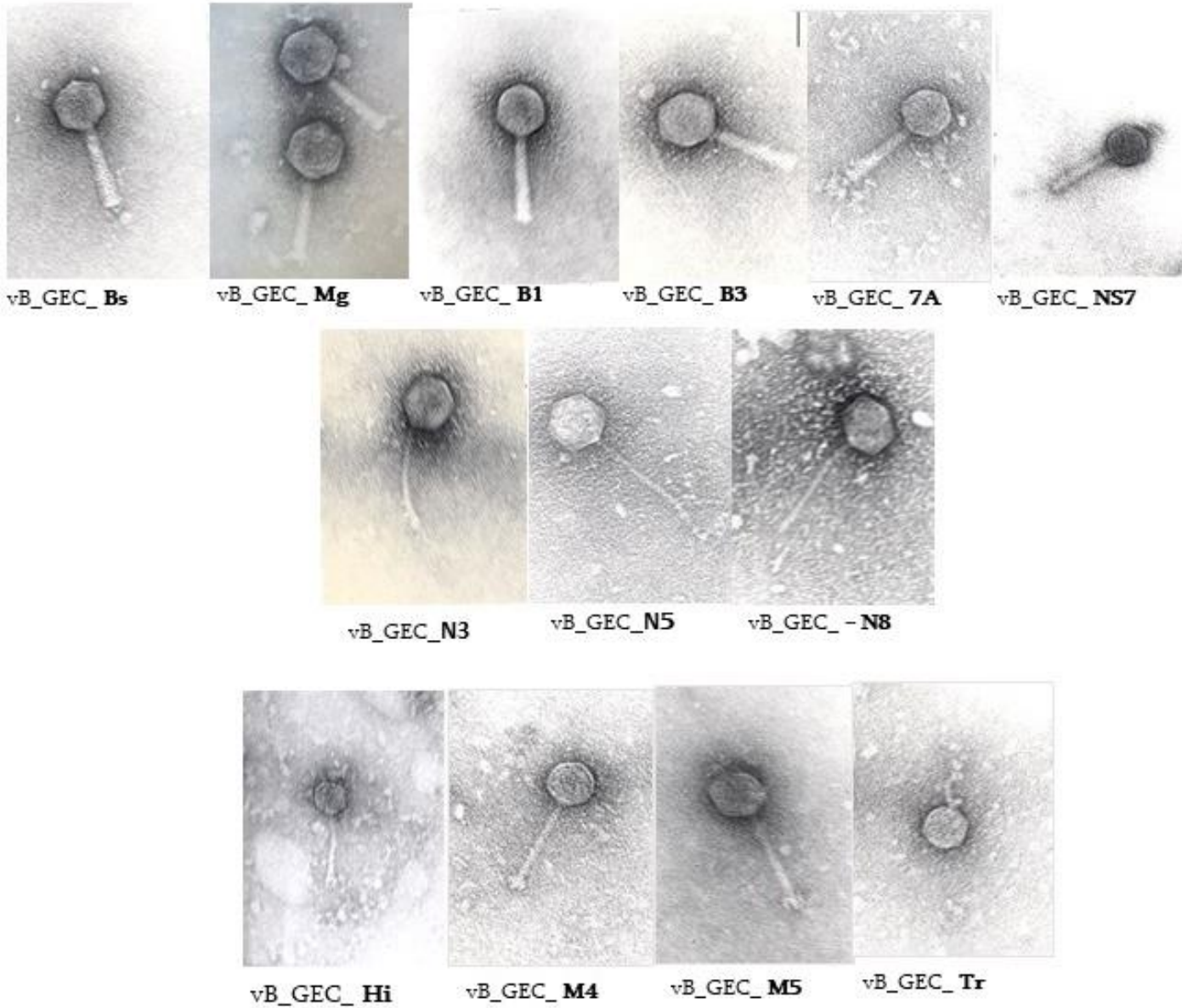
თითოეული ფაგი შესწავლილ იქნა მორფოლოგიური (ნეგატიური კოლონიის და ვირიონის სტრუქტურა), ბიოლოგიური (პატრონი ბაქტერიების სპექტრის, ტემპერატურისა და pH-ის მიმართ მდგრადობის მიხედვით) და გენეტიკური ნიშნების მიხედვით. ფაგების გენომების ანოტირებისას განსაკუთრებული ყურადღება დაეთმო იმ გენების გამოვლენას, რომლებიც ფაგების ლიზოგენურ ბუნებაზე მიუთითებდნენ. როგორც მეთოდოლოგიურ ნაწილში აღინიშნა, ფაგების გენომის სექვენსისათვის

გამოყენებულ იქნა ე.წ. „მომდევნო“ თაობის სეკვენირების მეთოდი (Next generation sequencing technologies) (Klumpp, Fouts, & Sozhamannan, 2012). ფაგების ნაწილის სეკვენსი განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით (Next generation sequencing technologies), ხოლო ფაგების მეორე ნაწილი დასეკვენირდა - ნანოპორული სეკვენირების (nanopore sequencing) ტექნოლოგიის, MinION მოწყობილობის გამოყენებით (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell); ნანოპორული სეკვენირების მეთოდი ჯერ კიდევ ექსპერიმენტულია და დახვეწას მოითხოვს, ხოლო მეორე მეთოდი უკვე მრავალჯერ გამოცდილი მეთოდია და საფუძვლიან ინფორმაციას იძლევა.

ერთი ფაგის **vB_GEC_N3** გაშიფვრა ვერ მოხერხდა. ფაგების შესახებ მონაცემები დალაგებულია იმის მიხედვით თუ რომელი ტექნიკის გამოყენებით მოხდა მათი გენეტიკური შესწავლა. ექვსი ფაგური კლონის **vB_GEC_B3**, **vB-GEC-Mg**, **vB-GEC -Bs**, **vB_GEC_NS7**, **vB-GEC-B1** და **vB_GEC_N5** - ის შესწავლა მოხდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით, ხოლო ექვსი ფაგის: **vB_GEC_N8**, **vB_GEC_M4**, **vB_GEC_M5**, **vB_GEC_7A** **vB_GEC_Hi**, და **vB_GEC_TR**-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრა მოხდა MinION მოწყობილობის, ე.წ. ნანოპორული სეკვენსის გამოყენებით.

სურათი 15.

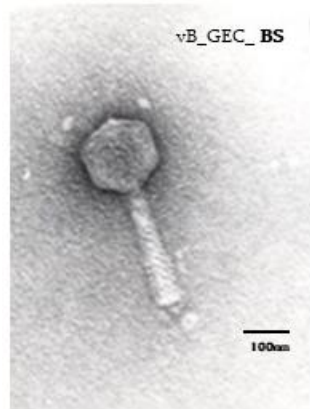
კვლევაში გამოყენებული ბაქტერიოფაგების მიკროსკოპული ფოტოები



ფაგი - vB_GEC_Bs

ფაგი - vB_GEC_Bs მიეკუთვნება Myoviridae -ს ოჯახს, გვარი - Viunavirus. მასპინძელი შტამი - SeT.4 -*Salmonella enterica* Typhimurium 4, ვეტერინარული შტამი. მისი გამოყოფა მოხდა 2013 წელს, გამოყოფის წყარო - შავი ზღვა, ლოკაცია -ბათუმი.

სურათი 16.



ფაგის ვირიონის ზომაა $77/118 \pm 5$ ნმ (თავი/კუდი). გენომის ზომაა 158 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 45%. გენომის სექვენსი განხორციელდა ე.წ. „მომღევნო“ თაობის სეკვენირების მეთოდით, MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით (Klumpp et al., 2012). გენომის ღია წაკითხვის ჩარჩოების (ORFs) იდენტიფიცირებისათვის გამოყენებულ იქნა პროგრამები:

Artemis(<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>);

Genemarks(<http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi>);

Geneious (<https://www.geneious.com/>).

ღია წაკითხვის ჩარჩოების პირველადი ანოტაცია განხორციელდა blastp- ის საშუალებით (Coordinators, 2016). გენომების რუკებისა და ე.წ. თანაგანლაგებების/ურთიერთშეთანწყობის (Alignment) შესაქმნელად გამოყენებულ იქნა პროგრამა - Geneious (<https://www.geneious.com/>).

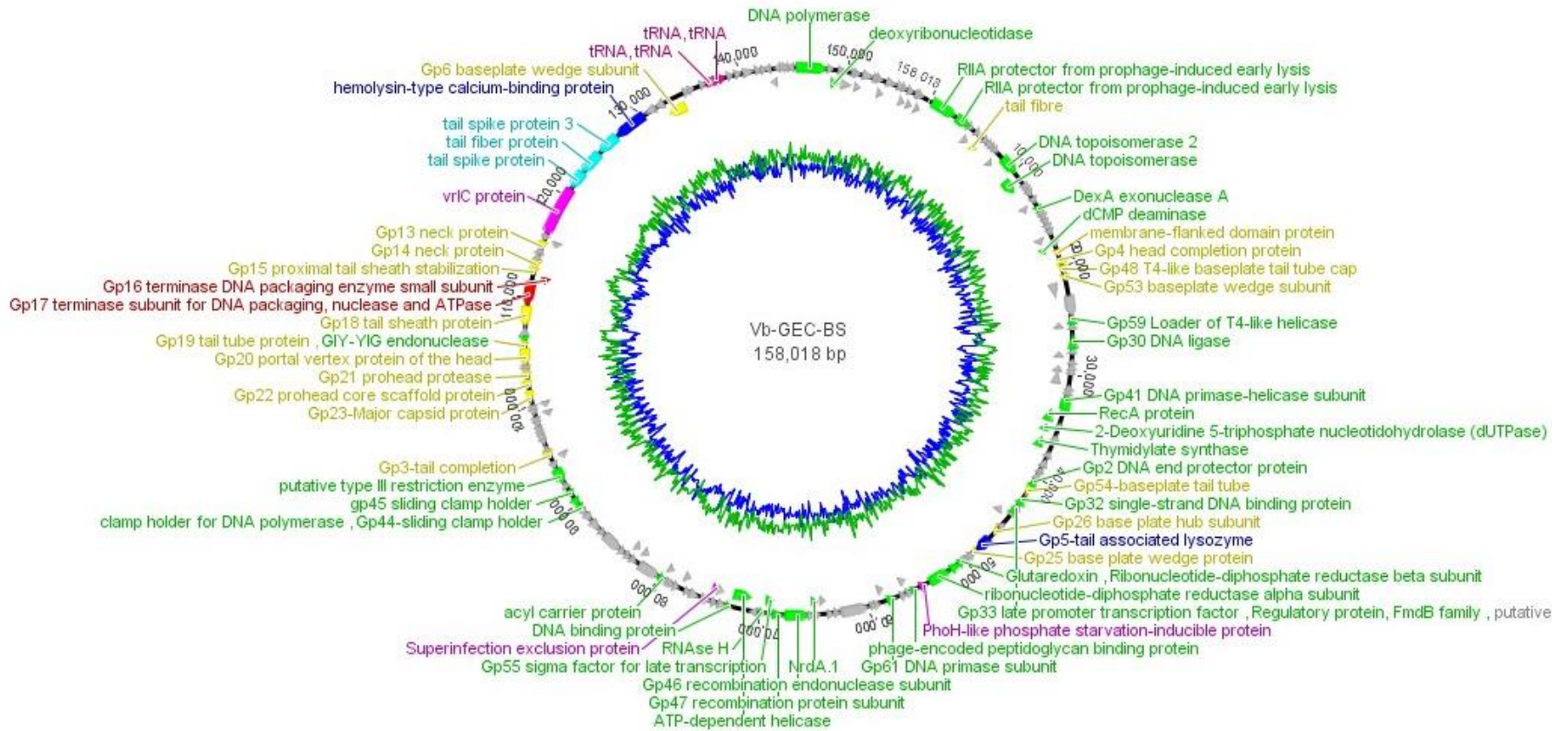
ფაგის გენომის ანოტაციამ გამოავლინა, რომ იგი ვირულენტური ფაგია. vB_GEC_BS- ის გენომში გამოვლინდა 208 ღია წაკითხვის ჩარჩო (open reading frame -ORF). 208 გენიდან 141 ე.წ. ჰიპოთეტური პროტეინია (Hypothetical proteins), 21 სტრუქტურული და

მორფოგენეზში ჩართული ცილაა. სტრუქტურული ცილებიდან აღნიშვნის ღირსია 3 ე.წ. კუდის წვეტიანი წანაზარდის პროტეინი (tail spike protein), რომელთა ქონაც, გვარი - Viunavirus - ის წარმომადგენელი თითქმის ყველა ფაგისთვის არის დამახასიათებელი (Hooton et al., 2011). **vB_GEC_Bs** ფლობს საკუთარ ე.წ. რეპლიკაციურ აპარატს, ვინაიდან მისი გენომი აკოდირებს დნმ პოლიმერაზას, დნმ პრაიმაზას, ჰელიკაზას, ლიგაზას, პრაიმაზა-ჰელიკაზას, ჰელიკაზა - ჩამტვირთველის (loader of helicase), დნმ - მაკავშირებელ პროტეინებსა და ტოპოიზომერაზას. გენომი შეიცავს ტერმინაზას ორ სუბერთეულს (ORF 155, 156), მასპინძელი ბაქტერიის უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელ ორ გენს (ORF 070, 168). მის გენომში არ აღმოჩნდა ტოქსიკურობის ან ლიზოგენობის გამომწვევი გენები. იხ. **სურათი 18**. ამ ფაგთან ყველაზე მაღალ მსგავსებას ავლენენ ისეთი ცნობილი ფაგები, როგორებიცაა *Salmonella* სპეციფიკური ფაგები - **STML-13-1** (იდენტ: 98.83%), **Vi01** (იდენტ: 96.18%), **Escherichia phage PhaxI** (რომელიც ენტეროჰემორაგიული *E. coli* - ის - *Escherichia coli* O157 : H7-ის სპეციფიკური ფაგია(Shahrbabak et al., 2013))(იდენტ: 92,67%) და **PhiSH19** (იდენტ: 91.69%). **vB_GEC_Bs** - ის გენომი შეიცავს 4 ტ-რნმ გენს. ნიშანდობლივია, რომ სამივე ზემოთხსენებული ფაგი, **Bs** - ის ჰომოლოგები, შეიცავს ტ-რნმ გენების იგივე რაოდენობას, რასაც ჩვენს მიერ გამოყოფილი - **vB_GEC_Bs**. ფაგი **STML-13-1** ცნობილია მისი მოქმედების ფართო სპექტრით, რის გამოც იგი ჩართულია ისეთ ფაგურ პრეპარატში, როგორიცაა SalmoFresh(Woolston et al., 2013b). ფაგები **Vi01** და **PhiSH19** საინტერესო გახლავთ თავიანთი კუდის ე.წ. წვეტიანი წანაზარდების პროტეინებით (tail spike protein)(Hooton et al., 2011). ჰუტონისა და მისი თანაავტორების თანახმად (Hooton et al 2011) კუდის წვეტიანი წანაზარდების სტრუქტურული ვარიაციების მრავალფეროვნება განაპირობებს **Vi01** სახეობის ფაგების მოქმედების სპექტრის სპეციფიკურობას, კერძოდ კი მათი მოქმედების ფართო არეალს. ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგის **vB_GEC_Bs** -ის გენომშიც მოხდა სამი წვეტიან წანაზარდიანი პროტეინის იდენტიფიცირება. ერთ-ერთი მათგანი კი, (ORF165) ავლენს მაღალ მსგავსებას **Vi01** - ის Tsp1 თან. აღსანიშნავია, რომ **Vi01** სახეობის არც ერთ ფაგში არ არის ნანახი ტოქსიკურობის ან ლიზოგენობის

განმაპირობებელი არც ერთი გენი (Hooton et al., 2011). **vB_GEC_Bs** - ის **Salmonella phage Vi01** - სა და **PhiSH19** - თან მსგავსების ამსახველი თანაგანლაგება მოცემულია სურათზე 18.

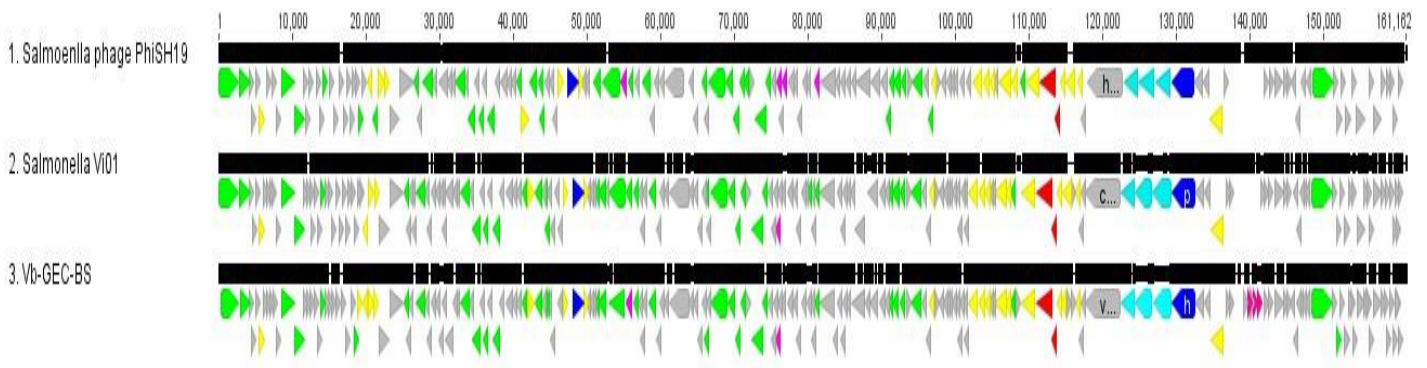
სურათი 17.

vB_GEC_Bs - ის გენომის რუკა



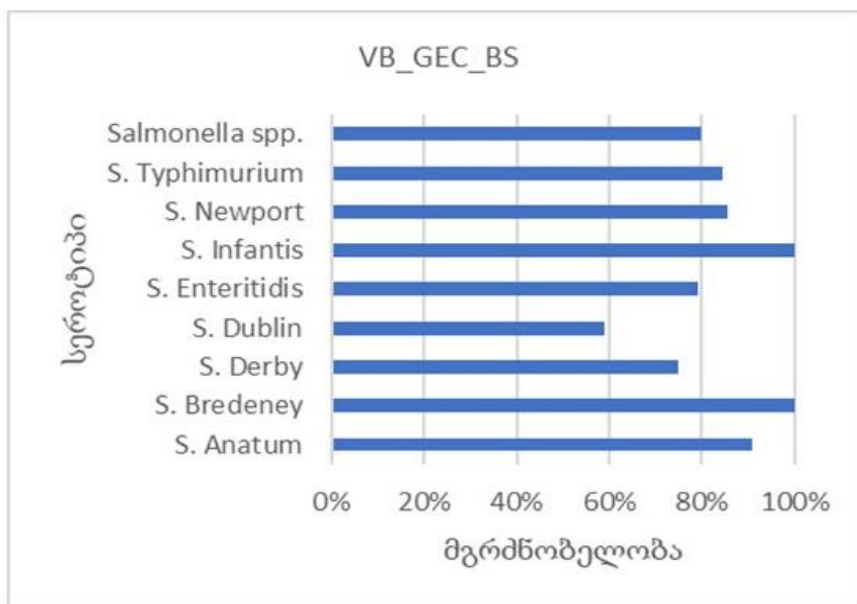
- ➡ - დნმ - ის რეპლიკაცი, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - ლიზინი
- ➡ - დნმ - ის შევსება
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰაბიტუალური პროტეინი

სურათი 18. vB_GEC_Bs - ის თანაგანლაგება Salmonella phage Vi01 - თან და PhiSH19 - თან



vB_GEC_Bs - ის მოქმედების სპექტრის შესწავლა ასევე 239 შტამის მიმართ ჩატარდა. ეს ფაგიც განეკუთვნება მაღალაქტიური ფაგების რიცხვს და მისი მოქმედების სპექტრი შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ განისაზღვრა 81% ით. (იხ. სურათი 63.). ფაგის აქტივობა სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ მოცემულია სურათზე 20.

სურათი 19. vB_GEC_Bs -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

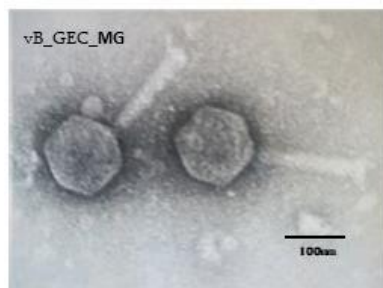


ფაგი **vB_GEC_Bs** ხასიათდება $\approx 2-3,5$ მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს - $2 \cdot 10^{11}$ ნკწ/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას - 10^8 ნაწ/მლ-ს. **vB_GEC_Bs** -ის სტაბილურობა სხვადასხვა პირობების მიმართ შემდეგნაირია: ტემპერატურულ ცვლილებებზე, 45°C -ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე ტიტრი 2 რიგით ნაკლებია, ხოლო 75°C -ზე ფაგის ტიტრი 10^1 ია, ანუ თეთქმის ინაქტივირებულია. მაღალია მისი გამძლეობა დაბალი ტემპერატურის მიმართ, კერძოდ 4°C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას $\text{pH} = 5-10$ - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო $\text{pH} \leq 3$ ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი - **vB_GEC_Mg**

ფაგი - **vB_GEC_Mg** მიეკუთვნება Myoviridae ოჯახს, გვარი - Tequatrovirus. მასპინძელი შტამი - **SeE.3**-(*Salmonella enterica* Enteritidis 3), რომელიც ვეტერინარული შტამია. ფაგის გამოყოფა მოხდა 2013 წელს. გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, მდებარეობა - თბილისი. ფაგის ვირიონის ზომაა $95/104 \pm 5$ ნმ (თავი/კუდი).

სურათი 20.



მისი გენომის ზომაა 171 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 35%. ფაგი - **vB_GEC_MG** გენომის სექვენსი განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით (Klumpp et al., 2012).

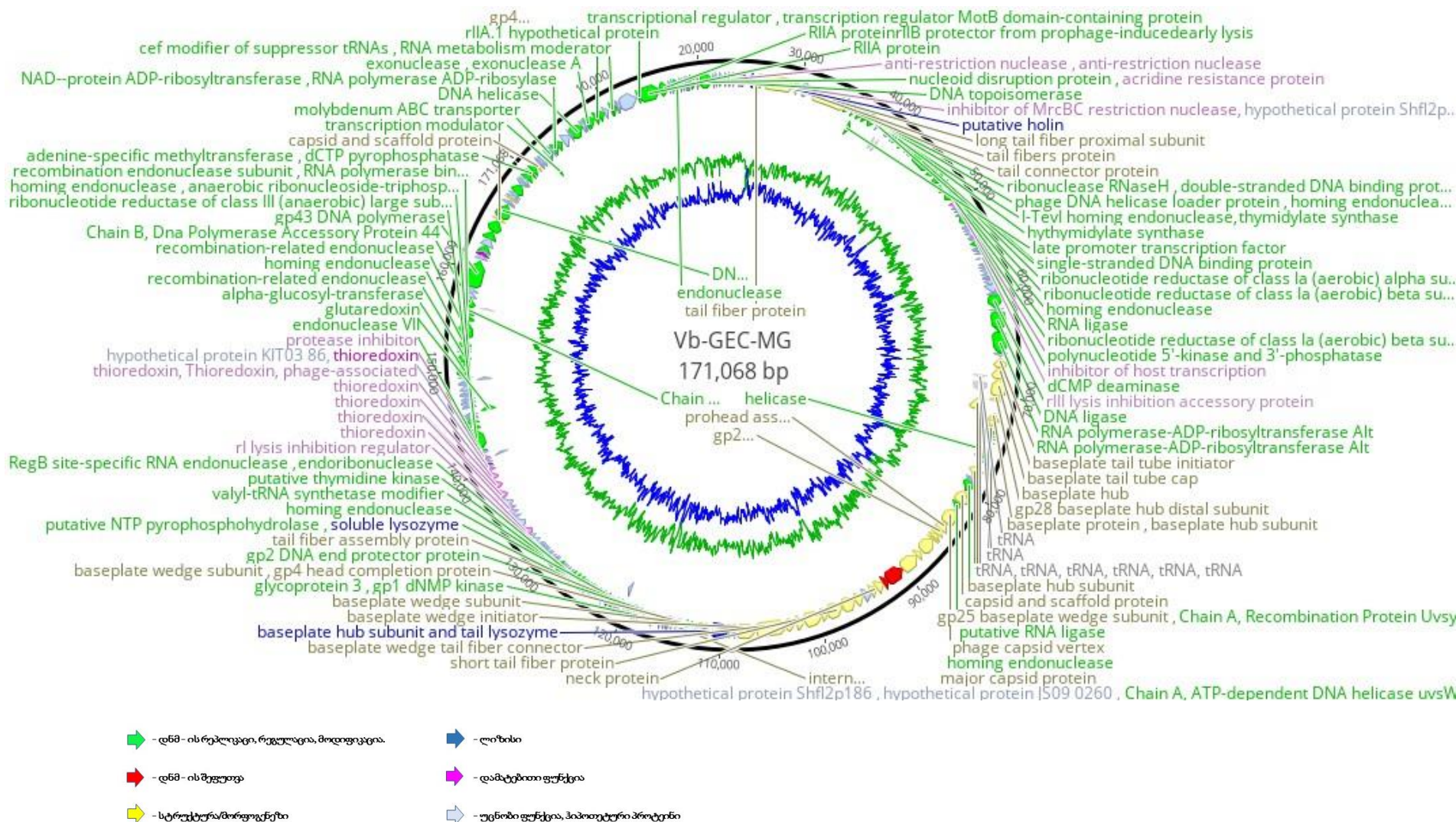
მონაცემთა ანალიზმა აჩვენა, რომ ფაგი - **vB_GEC_Mg** ვირულენტური ფაგია. **vB_GEC_Mg** - ის გენომში სულ გამოვლინდა 276 ღია წაკითხვის ჩარჩო (open reading frame - ORF). 276 შესაძლო გენიდან 142 ე.წ. სავარაუდო პროტეინია (Hypothetical proteins), 41 სტრუქტურული ცილის მაკოდირებელი გენი, მათ შორის 3 კუდის წანაზარდის პროტეინია (tail fiber protein). გენომი ასევე შეიცავს გენებს, რომლებიც ჩართულნი არიან ნუკლეოტიდების მეტაბოლიზმსა და დნმ - ის რეპლიკაციაში. მათ შორის არიან ეგზო (ORF 018-019) და ენდონუკლეაზები (ORF -033, 187,188), ანაერობული (ORF 076, 077, 079) და აერობული რიბონუკლეოტიდ რედუქტაზა სუბერთეულები (ribonucleotide reductase subunits)(ORF - 227, 229) და თიმიდილატ სინთაზები (thymidylate synthase) (ORF - 071, 073). ენზიმების ეს ჯგუფი, როგორც აღმოჩნდა, საკმაოდ დამახასიათებელია Myoviridae - ს წარმომადგენელთათვის და ისინი პასუხს აგებენ დეოქსირიბონუკლეოტიდების დნმ -ის სინთეზისათვის გენერირების პროცესზე(Villegas et al., 2009). ენზიმებიდან, რომლებიც უშუალოდ არიან ჩართულნი დნმ - ის რეპლიკაციაში, აღნიშნული ფაგის გენომში ნანახია - დნმ ლიგაზა (ORF -108), დნმ პოლიმერაზა (ORF - 255, 258), დნმ ჰელიკაზა (ORF - 015), დნმ ჰელიკაზა - პრიმაზა სუბერთეული (DNA primase-helicase subunit) (ORF - 267). გენომი ასევე შეიცავს ტერმინაზას ორ სუბერთეულს (ORF - 141, 142), პატრონი უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელ სამ გენს (putative holin, baseplate hub subunit and tail lysozyme, soluble lysozyme).

მის გენომში არ იქნა ნანახი ისეთი ცილების მაკოდირებელი გენები, რომლებიც განაპირობებენ ფაგის ლიზოგენურობას **იხ. სურათი 22**. **vB_GEC_Mg** - ის ცნობილი ჰომოლოგებიდან აღსანიშნავია **Shigella phage SHFML-11**(იდენტ: 98,94%), რომელიც ასევე ლიტიური ფაგია და რომელიც მისი ფართო სპექტრისა და მაღალი აქტივობის გამო შეტანილ იქნა ისეთი ფაგური პრეპარატის შემადგენლობაში, როგორიცაა ShigaShield™ (Soffer at al., 2017). **vB_GEC_Mg** -სა და **Shigella phage SHFML-11** - ის გენომების მსგავსება ასახულია 23 - ე სურათზე. ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგის ჰომოლოგი ფაგებიდან აღნიშვნის ღირსია **Escherichia phage vB_EcoM_G2540-3** (იდენტ: 97,56%) და **Escherichia**

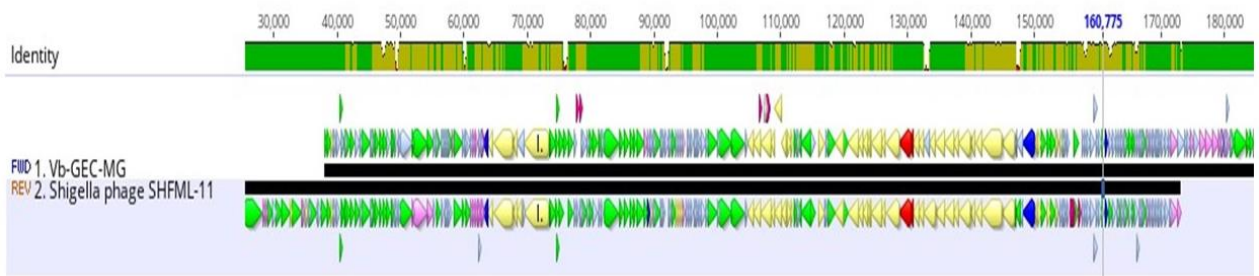
virus T4 (იდენტ: 95,69%), რომლებიც ასევე თერაპიულ ფაგებს წარმოადგენენ(Korf et al., 2019). მიუხედავად იმისა, რომ **vB_GEC_Mg** სალმონელა სპეციფიკური ფაგია (პატრონი შტამი **SeE.3-(*Salmonella enterica* Enteritidis 3)**), იგი ლიტირ აქტივობას ავლენს, როგორც *Salmonella*, ისე *Shigella*- გვარებისა და *E.coli* სახეობის სხვადასხვა შტამების მიმართ (მონაცემები აღნიშნული ექსპერიმენტის შესახებ ამ ნაშრომში არ არის მოცემული).

სურათი 21 .

vB_GEC_Mg ის გენომის რუკა.

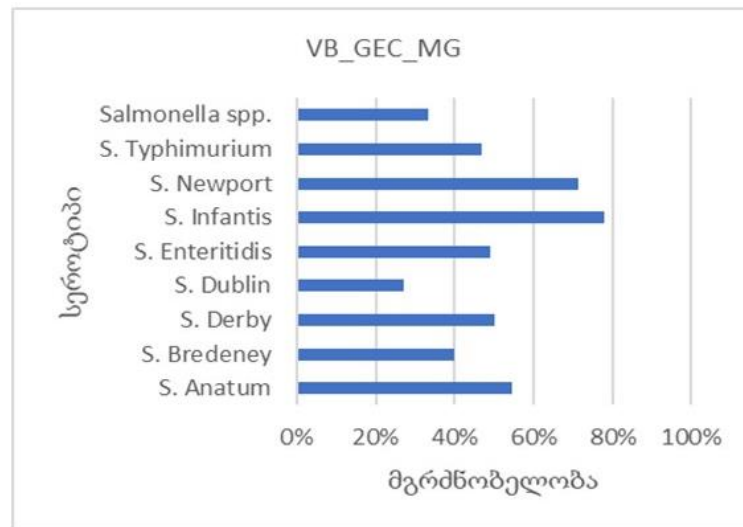


სურათი 22. vB_GEC_Mg ის თანაგანლაგება Shigella phage SHFML-11- თან



vB_GEC_Mg -ის მოქმედების სპექტრის განსაზღვრა მოხდა შტამების იგივე კოლექციის მიმართ (239 შტამი - 121 ვეტერინარული, 118 კლინიკური). აღნიშნული ფაგის აქტივობა შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ 46 %- ია. (იხ სურათი 63). მისი აქტივობის პროცენტული მაჩვენებლები სეროტიპების მიხედვით მოცემულია **სურათზე 23**.

სურათი 23. vB_GEC_Mg -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



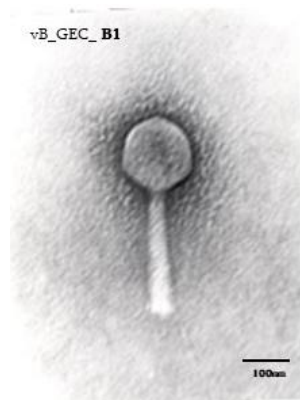
ფაგი vB_GEC_Mg ხასიათდება \approx 2-4 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს - $2 \cdot 10^8$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას - 10^6 ნაწ/მლ-ს. vB_GEC_Mg -ის სტაბილურობა სხვადასხვა პირობების მიმართ შემდეგნაირია: იგი საკმაოდ სტაბილურია ტემპერატურული ცვლილებებისადმი. 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის

ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე ტიტრი 2 რიგით ნაკლებია, ხოლო ფაგის ინაქტივაცია ფიქსირდება 75°C-ზე. მაღალი სტაბილურობით ხასიათდება შენახვის პირობების მიმართაც, კერძოდ 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი უცვლელია 1 წლის შემდეგაც. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-10 - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა pH ≤3- ია, ფაგი 24 სთ ში კარგავს აქტივობას.

ფაგი -vB_GEC_B1

მიეკუთვნება Myoviridae -ს ოჯახს, გვარი- Felixounavirus. მასპინძელი შტამი - **SeT.6 - *Salmonella enterica* Typhimurium 6**. გამოყოფის წელი - 2013, გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია თბილისი.

სურათი 24.

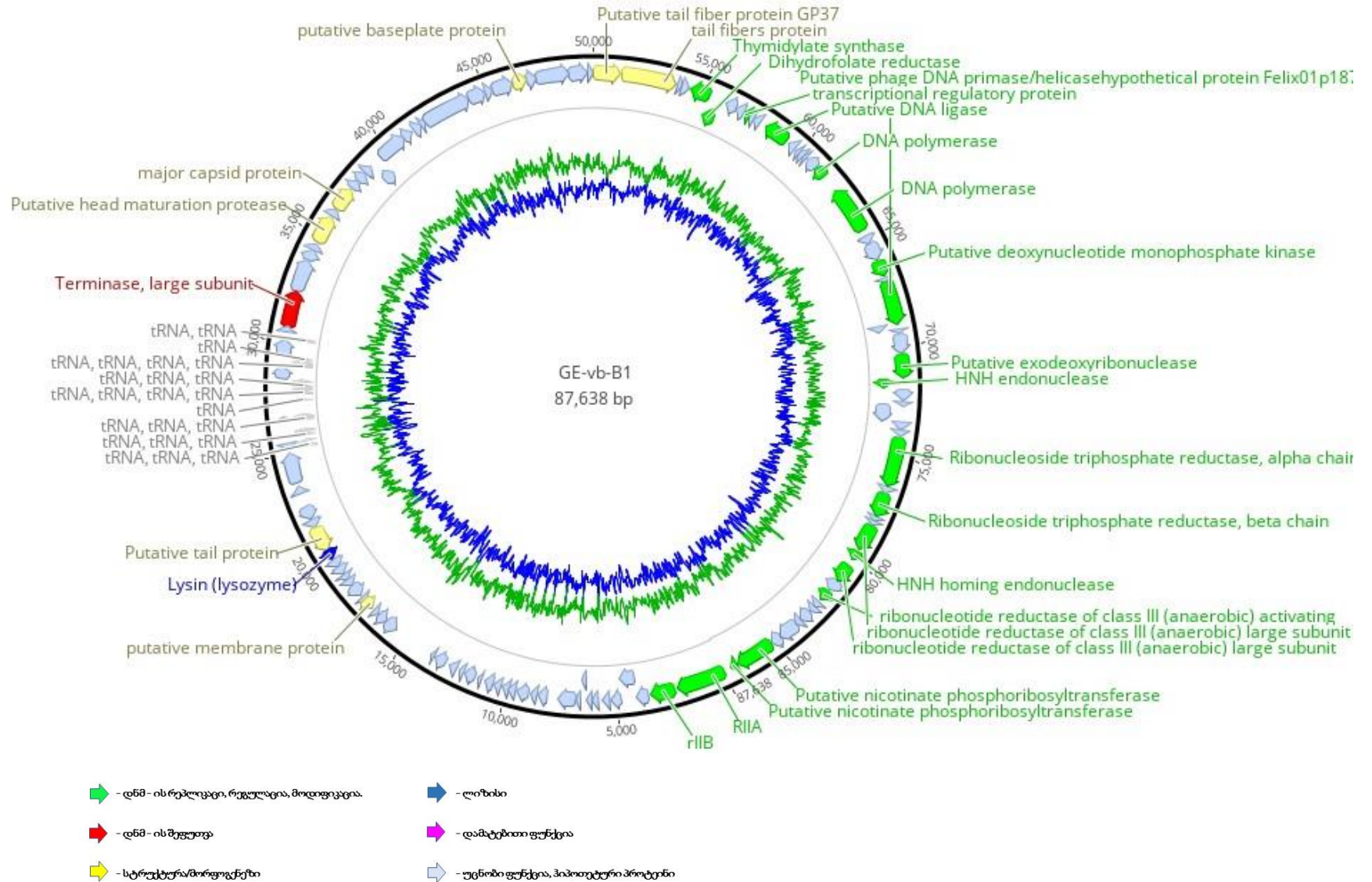


ფაგის ვირიონის ზომაა 81/122 ±5ნმ (თავი/კუდი). გენომის ზომაა 87kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39%. ფაგის გენომის შესწავლამ გამოავლინა, რომ იგი შეიცავს 121 ღია წაკითხვის ჩარჩოს, რომელთაგან ORF92 ე.წ. ჰიპოთეტური პროტეინია, რომელთა ფუნქცია არ არის შესწავლილი, 7 სტრუქტურული და მორფოგენეზში მონაწილე ცილაა, 21 დნმ - ის რეპლიკაცია, მოდიფიკაციასა და რეგულაციებში მონაწილე ცილებია, ლიზისის განმაპირობებელი 1 ცილა (ORF 035), და

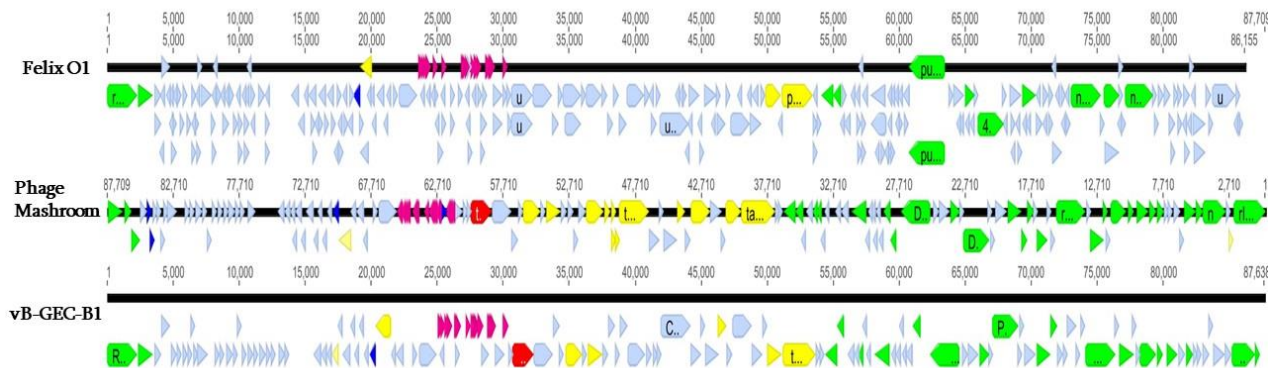
ტერმინაზას მხოლოდ ერთი - ე.წ. დიდი სუბერთეული (ORF 046). ფაგი არ შეიცავს ლიზოგენობის განმაპირობებელ გენებს, არ შეიცავს სხვადასხვა ტოქსინის მაცოდირებელ გენებს (იხ. სურათი 25.), რაც საშუალებას გვაძლევს განვიხილოთ იგი, როგორც ვირულენტური, თერაპიული პოტენციალის მქონე ფაგი. NCBI - ის მონაცემთა ბაზაში ფაგის გენომის შედარებამ სხვა ცნობილ ფაგებთან, გამოავლინა, რომ ის მაღალ მსგავსებას იჩენს ისეთი ვირულენტური ფაგების მიმართ, როგორებიცაა **Bacteriophage Felix 01** (იდენტ: 98,21%) და **Salmonella phage Mushroom** (იდენტ: 98,36%). ხაზგასასმელია, რომ გვარი- *Felixovirus* - ის წარმომადგენლები ცნობილი ვირულენტური ფაგებია, რომლებიც გამოირჩევიან თავიანთი აქტიურობით *enterobacteria* - ების სხვადასხვა ჯგუფების, მათ შორის *E. coli* -სა და *Salmonella* spp. - ის მიმართ. აღსანიშნავია, რომ **Salmonella phage Mushroom** გ. ელიავას სახელობის ინსტიტუტის მიერ წარმოებული თერაპიული ფაგური პრეპარატის - ინტესტი ფაგის ერთერთ კომპონენტს წარმოადგენს (Tolen et al., 2016). ფაგი **vB_GEC_B1** ის გენომი შეიცავს 24 ტ-რნმ გენს, ისევე, როგორც **Salmonella phage Mushroom** - ი, ხოლო **Bacteriophage Felix 01** - ის გენომში 25 ტ-რნმ - ია. **vB_GEC_B1**-ის **Bacteriophage Felix 01** - თან და **Salmonella phage Mushroom**-თან მსგავსების ამსახველი თანაგანლაგება მოცემულია 26 -ე სურათზე.

სურათი 25.

vB_GEC_B1 - ის გენომის რუკა

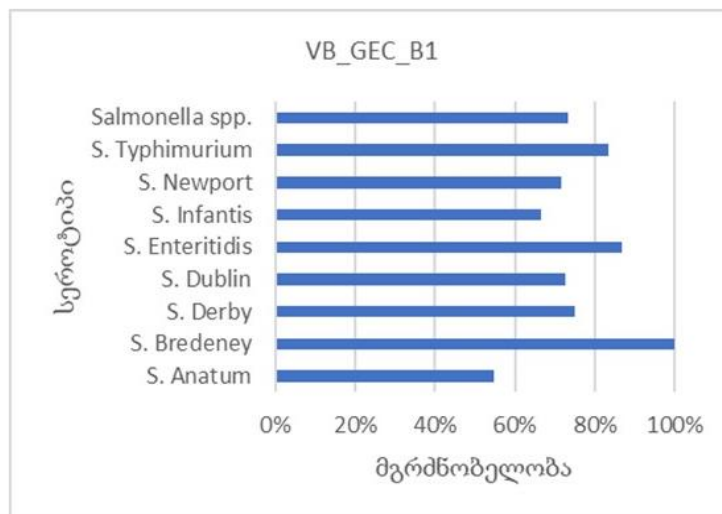


სურათი 26. vB_GEC_B1 - ის თანაგანლაგება Bacteriophage Felix 01-თან და Salmonella phage Mashroom -თან



vB_GEC_B1-ის მოქმედების სპექტრის შესწავლამ აჩვენა, რომ ის მაღალაქტიური ფაგია და მისი აქტივობა შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ (239) 80% ია. (იხ. სურათი 63.) სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ მისი აქტივობა მოცემულია სურათზე 28.

სურათი 27. vB_GEC_B1 -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



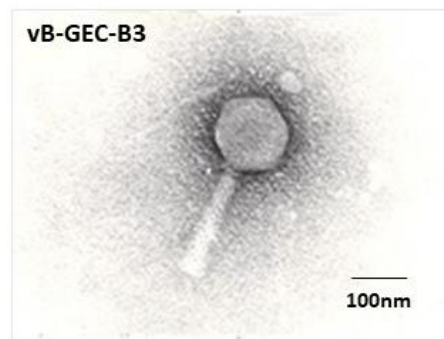
ფაგი vB_GEC_B1 ხასიათდება ≈ 2-3,5 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს -

2·10¹¹ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას - 10⁸ნაწ/მლ-ს. ფაგი vB_GEC_B1 ტემპერატურულ ცვლილებებზე შემდეგნაირად რეაგირებს: 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე ტიტრი 2 რიგით ნაკლებია, ხოლო 75°C-ზე ფაგის ინაქტივირებულია. მაღალია მისი გამძლეობა დაბალი ტემპერატურის მიმართ, კერძოდ 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-10 - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, pH ≤3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი - vB_GEC_B3

vB_GEC_B3 მიეკუთვნება Myoviridae -ს ოჯახს, გვარი- Felixounavirus. მასპინძელი შტამი - SeT.6 -*Salmonella enterica* Typhimurium 6. გამოყოფის წელი - 2013, გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია-თბილისი.

სურათი 28.



ვირიონის ზომაა 72/113±56მ (თავი/კუდი). მისი შესწავლა მოხდა Illumina (next generation sequencing მეთოდის გამოყენებით. მისი გენომის ზომაა 87kb, GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39.1%. გენომის ანოტაციამ აჩვენა, რომ ფაგი 129 ღია წაკითხვის ჩარჩოდან 74 ე.წ ჰიპოთეტურ პროტეინს შეესაბამება, იგი ასევე შეიცავს პროტეინებს, რომლებიც უზრუნველყოფენ მასპინძელი შტამის ლიზისს, დნმ - ის რეპლიკაცია/რეკომბინაციას, რეგულაციას, ბიოსინთეზს და მორფოგენეზს. მათ შორის 21 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილაა, 27 ე. წ. რეპლიკაციური აპარატის

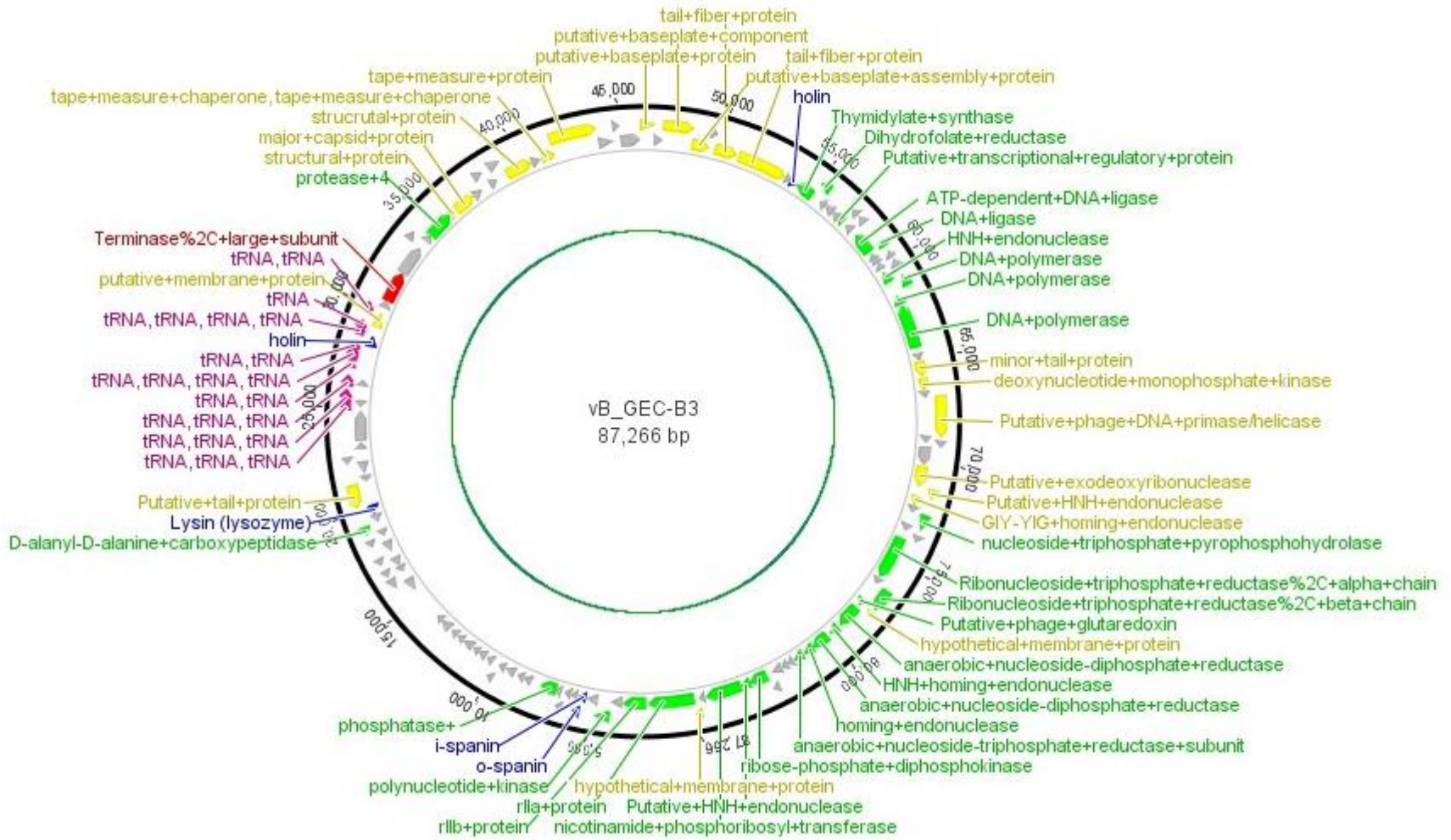
ცილა. მასპინძელი უჯრედის ლიზისისათვის **vB_GEC_B3** იყენებს ჰოლინს (holin - ღწჩ 046), ლიზინს (Lysin (lysozyme)- ORF – 037) და მემბრანის გარე და შიდა სპანინებს (o-spanin, i-spanin - ORF -006, 007), რაც განასხვავებს მას ჩვენს მიერ გამოყოფილი ამავე ოჯახში განთავსებული ფაგის **vB_GEC_B1**- საგან, რომელიც ლიზისის ცილებიდან მხოლოდ ლიზინს შეიცავს (ღწჩ - 035).

vB_GEC_B3 - ის გენომი შეიცავს 24 ტ-რნმ გენს, ისევე როგორც ჩვენს მიერ გამოყოფილი და მისივე ფაგის მსგავსი ფაგი - **vB_GEC_B1**, ასევე როგორც **Salmonella phage Mushroom** - ი, ხოლო **Bacteriophage Felix 01** - ის გენომში 25 ტ-რნმ - ია ანოტირებული. **vB_GEC_B3** - ის გენომის ანოტაციით დადასტურდა მისი ვირულენტური ბუნება. მის გენომში არ იქნა აღმოჩენილი ლიზოგენიის განმაპირობებელი გენები. **იხ. სურათი 29**. მისი მაღალი მსგავსება სხვა ცნობილ ვირულენტურ ფაგებთან ასევე მოწმობს, **vB_GEC_B3** -ის ვირულენტურობაზე. მისი მსგავსება - **Salmonella phage Mushroom** - თან და **Bacteriophage Felix 01** განისაზღვრება 98% - ით, ხოლო მისი მსგავსება **vB_GEC_B1** - თან 99% - ია.

ხაზგასასმელია, რომ **vB_GEC_B3**, ისევე როგორც **vB_GEC_MG**, **vB_GEC_B1** და **vB_GEC_BS** ლიტიურ აქტივობას ავლენს, როგორც *Salmonella* -ს, ისე *Shigella*- სა და *E.coli* - ს სხვადასხვა შტამების მიმართ (მონაცემები აღნიშნული ექსპერიმენტის შესახებ ამ ნაშრომში მოცემული არ არის). მათი ეს უნარი დასტურდება მათი გენომების, *Salmonella*-ს, *Shigella*- სა და *E.coli* - ს სპეციფიკურ ფაგებთან მაღალი მსგავსებითაც.

სურათი 29.

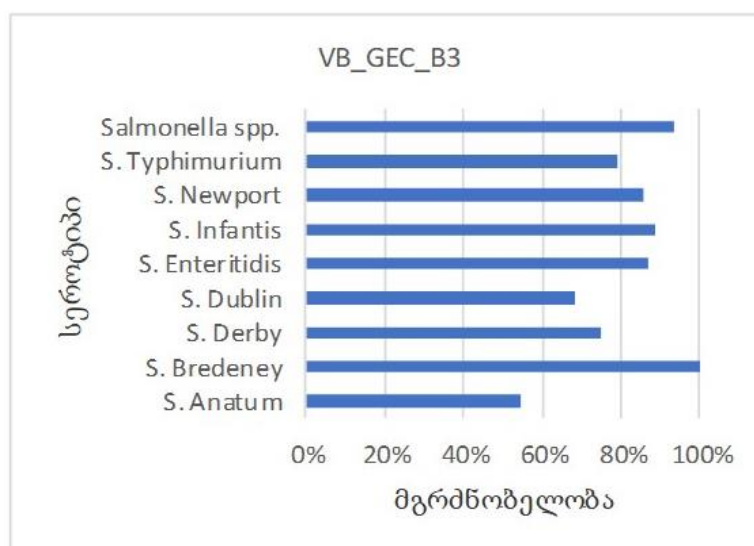
vB_GEC_B3 - ის გენომის რუკა



- ➡ - დნმ - ის რეპლიკაცია, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - დნმ - ის შეფუთვა
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ➡ - ლიზისი
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი

vB_GEC_B3 - ის მოქმედების სპექტრის განსაზღვრამ 239 შტამის მიმართ, აჩვენა, რომ ის მაღალაქტიური ფაგია და მისი აქტივობა შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ 80% -ია.(იხ. სურათი 63.) ხოლო მისი აქტივობა სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ მოცემულია სურათზე 31.

სურათი 30. **vB_GEC_B3** -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

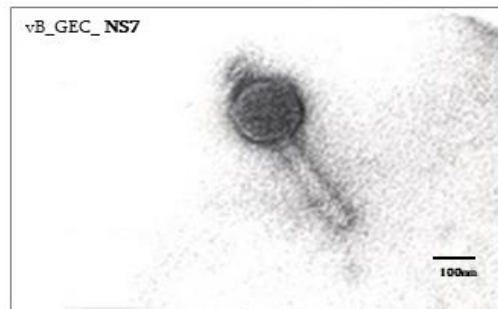


ფაგი **vB_GEC_B3** ხასიათდება $\approx 1-2,5$ მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $2 \cdot 10^{10}$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^8 ნაწ/მლ-ს. **vB_GEC_B3** ტემპერატურულ ცვლილებებზე შემდეგნაირად რეაგირებს: 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე ტიტრი 2 რიგით ნაკლებია, ხოლო 75°C-ზე ფაგის ტიტრი 10^1 ია, ანუ თითქმის ინაქტივირებულია. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-10 - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა pH ≤ 3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი - vB_GEC_NS7

მიეკუთვნება Myoviridae -ს ოჯახს, გვარი - Felixounavirus. მასპინძელი შტამი - **SeT.6 - Salmonella enterica Typhimurium 6**. გამოყოფის წელი - 2015, გამოყოფის წყარო - ცოცხალი რძე.

სურათი 31.



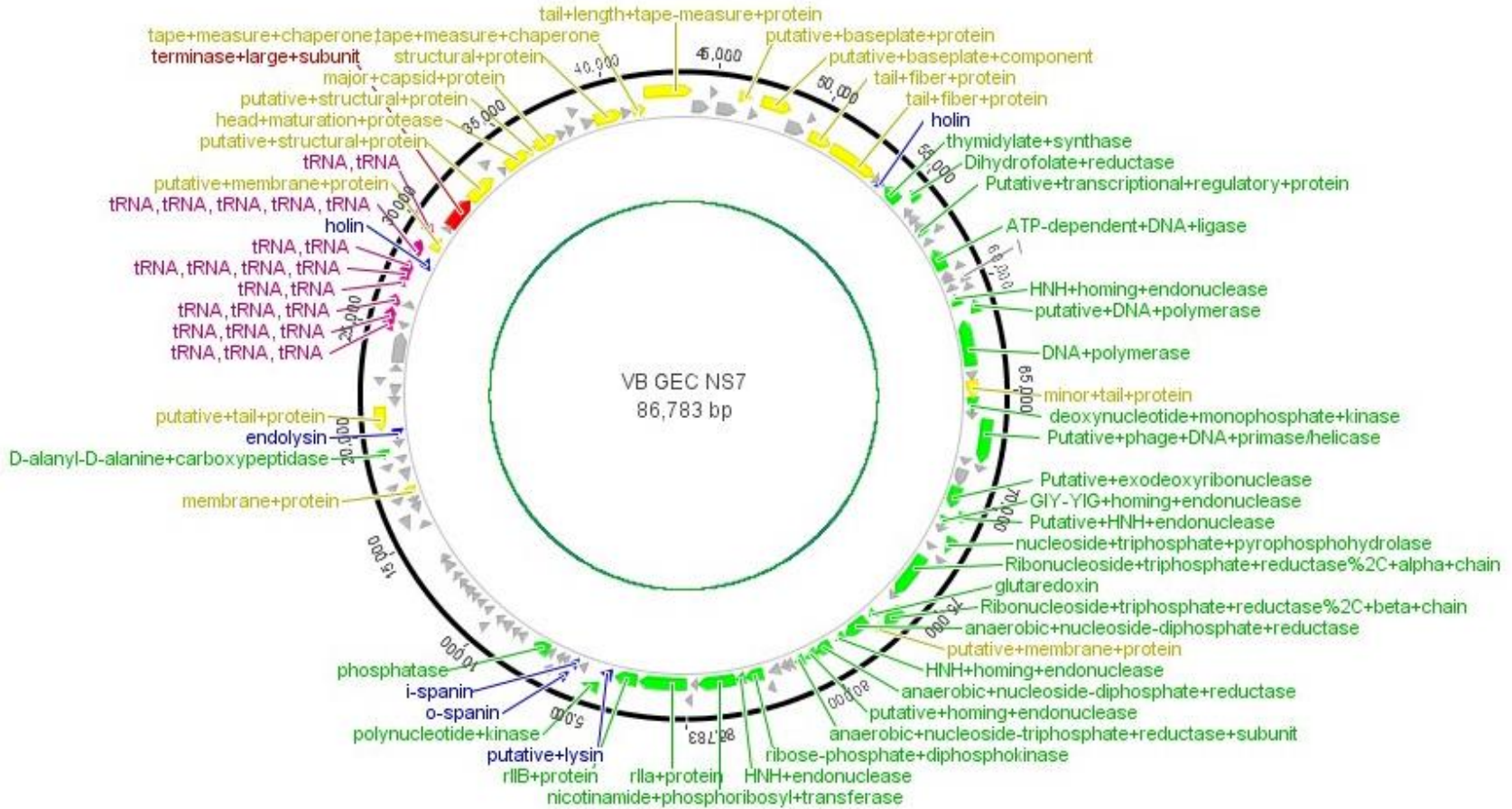
ვირიონის ზომა $86/113 \pm 5$ ნმ (თავი/კუდი). მისი გენომის ზომაა 86 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39%.

vB_GEC_NS7 - ის გენომში გამოვლინდა 129 ღწჩ, რომელთაგან 77 ჰიპოთეტური პროტეინების შეხამების გენებია, 29 ე.წ. რეპლიკაციური აპარატის ცილაა, მათ შორისაა 5 თვითმართვადი ენდონუკლეაზა, დნმ პოლიმერაზა, დნმ პრიმაზა/ჰელიკაზა, დნმ ლიგაზა, ენდო და ეგზონუკლეაზები და ა.შ. 17 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილების მაკოდირებელი გენებია. ფაგის გენომში გამოვლინდა ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელი 6 ცილა, 1 ლიზინის, 1 ენდოლიზინის, 2 ჰოლინისა და მემბრანის გარე და შიდა სპანინების (o-spanin, i-spanin) სახით. მის გენომში ნანახია 24 ტ-რნმ გენი. არ გამოვლენილა ლიზოგენობის განმაპირობებელი გენები. ამ ფაგის ცნობილი ჰომოლოგი ფაგების სიაც ადასტურებს, რომ იგი ვირულენტური ფაგია. **იხ. სურათი 32.** ამ ფაგთან მაღალი მსგავსების მქონე ფაგებიდან აღსანიშნავია, პრეპარატ „ინტესტის“ შემადგენლობაში შემავალი სალმონელა სპეციფიკური ფაგი - **Salmonella**

phage Mushroom, რომელთანაც ჩვენი საკვლევი ფაგი - **vB_GEC_NS7** 98% იან მსგავსებას ავლენს. ასევე მაღალია მისი მსგავსება **Bacteriophage Felix 01** -თან (98%).

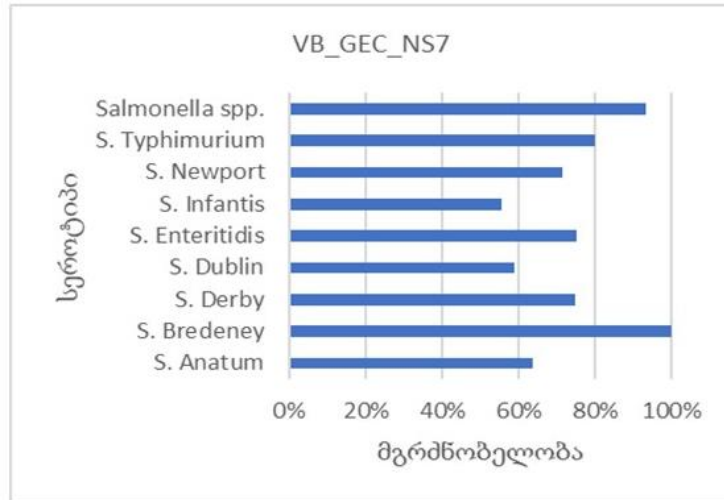
vB_GEC_NS7 - ის ლიზისური აქტივობა შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ (239 შტამი) 75% -ა (იხ.სურათი 63.), ხოლო მისი მოქმედების სპექტრი სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ, მოცემულია სურათზე 33.

ფაგი **vB_GEC_NS7** ხასიათდება $\approx 1-2,5$ მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $2 \cdot 10^{10}$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, **vB_GEC_NS7** ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე - 2 რიგით, ხოლო 75°C-ზე ფაგი ინაქტივირებულია. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-10 - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა pH ≤ 3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ-ში ეცემა.



- ▶ - დნმ- ის რეპლიკაცია, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ▶ - დნმ- ის შეფუთვა
- ▶ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ▶ - ლიზისი
- ▶ - დამატებითი ფუნქცია
- ▶ - უცნობი ფუნქცია, კომპიუტერული პროტეინი

სურათი 33. vB_GEC_NS7 მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



ფაგი vB_GEC_7A

ფაგი vB_GEC_7A მიეკუთვნება Myoviridae -ს ოჯახს, გვარი- Felixounavirus. პატრონი შტამი - S. Typhimurium1328, რომელიც კლინიკური შტამია, მიღებულია სომხეთის ინფექციურ დაავადებათა კლინიკური ცენტრისგან (2016წ). ფაგის გამოყოფის დრო - 2017 წელი, გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია - თბილისი.

სურათი 34.



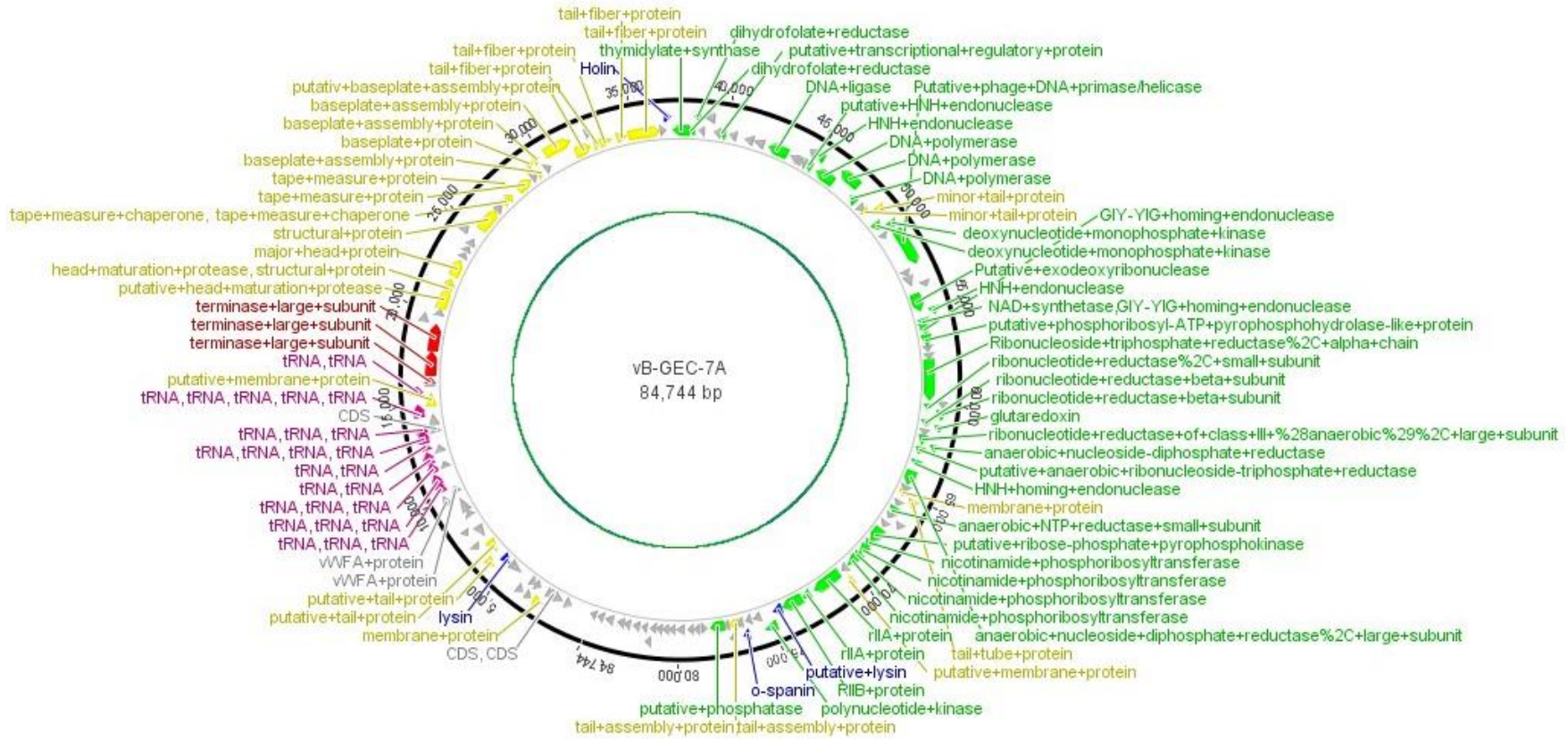
vB_GEC_7A- ის ვირიონის ზომა-82/109±5ნმ (თავი/კუდი). მისი გენომის ზომაა 85kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39%. ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შესწავლის (სექვენსის) მეთოდი - nanopore sequencing. **vB_GEC_7A**- ის გენომში 154 ღწჩ გამოვლინდა, რომელთაგან 76 ჰიპოთეტური პროტეინია, 27 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილა, 34 რეპლიკაციური აპარატის ცილა, ფაგი შეიცავს ტერმინაზას 3 სუბერთეულს, ბაქტერიის ლიზისის განმაპირობებელ 4 ცილას - 2 ლიზინის, 1 ჰოლინის და 1 ო-სპანინის სახით. არნიშნული ფაგის გენომში არ იქნა ნანახი ინტეგრაზები. **იხ. სურათი 35.**

მისი გენომი შეიცავს 27 ტ-რნმ გენს. გვარი - *Felixounavirus* -ს წარმომადგენელთათვის დამახასიათებელია მრავალი ტ-რნმ გენის ქონა, რაც ზოგიერთი მკვლევარის აზრით, შესაძლოა კავშირში იყოს ფაგების ვირულენტობასთანაც (Albers & Czech, 2016). **vB_GEC_7A**- ის NCBI - ის მონაცემთა ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომ ის ავლენს მაღალ მსგავსებას, როგორც *Salmonella* სპეციფიური ფაგების, ისე *E.coli* - ის სპეციფიური ფაგების მიმართ. მათ შორისაა *Escherichia phage pinkbiff* (იდენტ: 95,41%), *Salmonella phage Mushroom* (იდენტ: 97,12%) და *Bacteriophage Felix 01* (იდენტ: 97,12%). ფაგის ჰომოლოგების მიხედვით შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რომ აღნიშნული ფაგი ვირულენტური ანუ ლიტიური ფაგების რიცხვს მიეკუთვნება.

vB_GEC_7A - ის მოქმედების სპექტრის შესწავლა მოხდა მხოლოდ 141 შტამის მიმართ, (27-კლინიკური იზოლატი, 114 - ვეტერინარული). ფაგის აქტივობა შტამების აღნიშნული რაოდენობის მიმართ 37% - ით განისაზღვრა (იხ. სურათი 63.). ხოლო მისი აქტივობა სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ, ნაჩვენებია სურათზე 36.

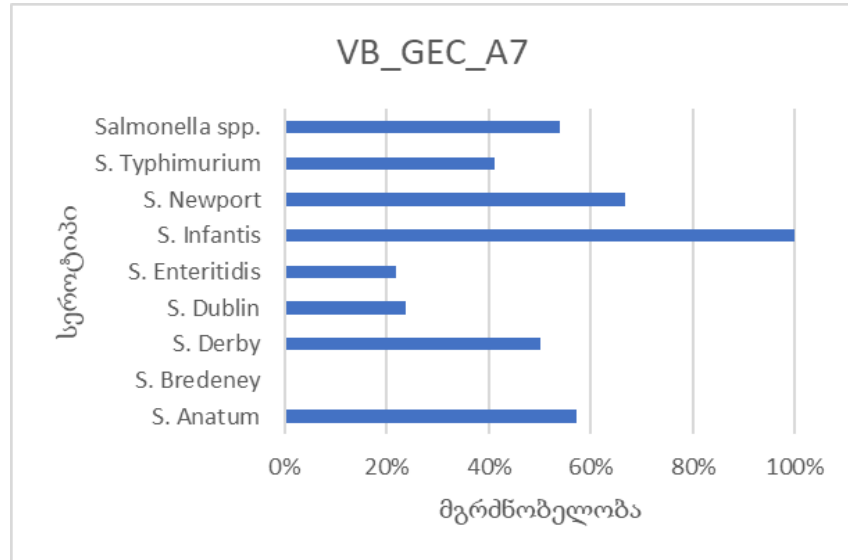
სურათი 35.

vB_GEC_A7- ის გენომის რუკა



- ➡ - დნმ-ის რეპლიკაცია, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - ლიზინი
- ➡ - დნმ-ის შეფუთვა
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი

სურათი 36. **vB_GEC_7A** - ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

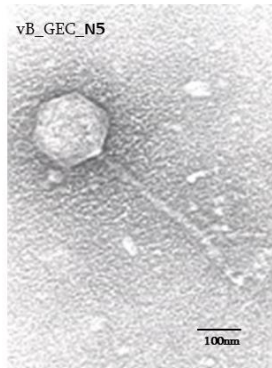


ფაგი **vB_GEC_A7** ხასიათდება $\approx 2-2,5$ მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $2 \cdot 10^{10}$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. **vB_GEC_A7** - ის ტიტრი 45°C -ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, იკლებს 2 რიგით, 65°C - ზე - 3 რიგით, ხოლო 75°C -ზე ფაგი სრულად ინაქტივირებულია. 4°C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგი 1 წლის შემდეგაც ინარჩუნებს ტიტრს. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას $\text{pH} = 5-10$ - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო $\text{pH} \leq 4$ ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი - vB_GEC_N5

vB_GEC_N5 მიეკუთვნება Siphoviridae – ს ოჯახს, გვარი - Tequintavirus. მისი მასპინძელი შტამია **SeE.3-(*Salmonella enterica* Enteritidis 3)**.

სურათი 37.



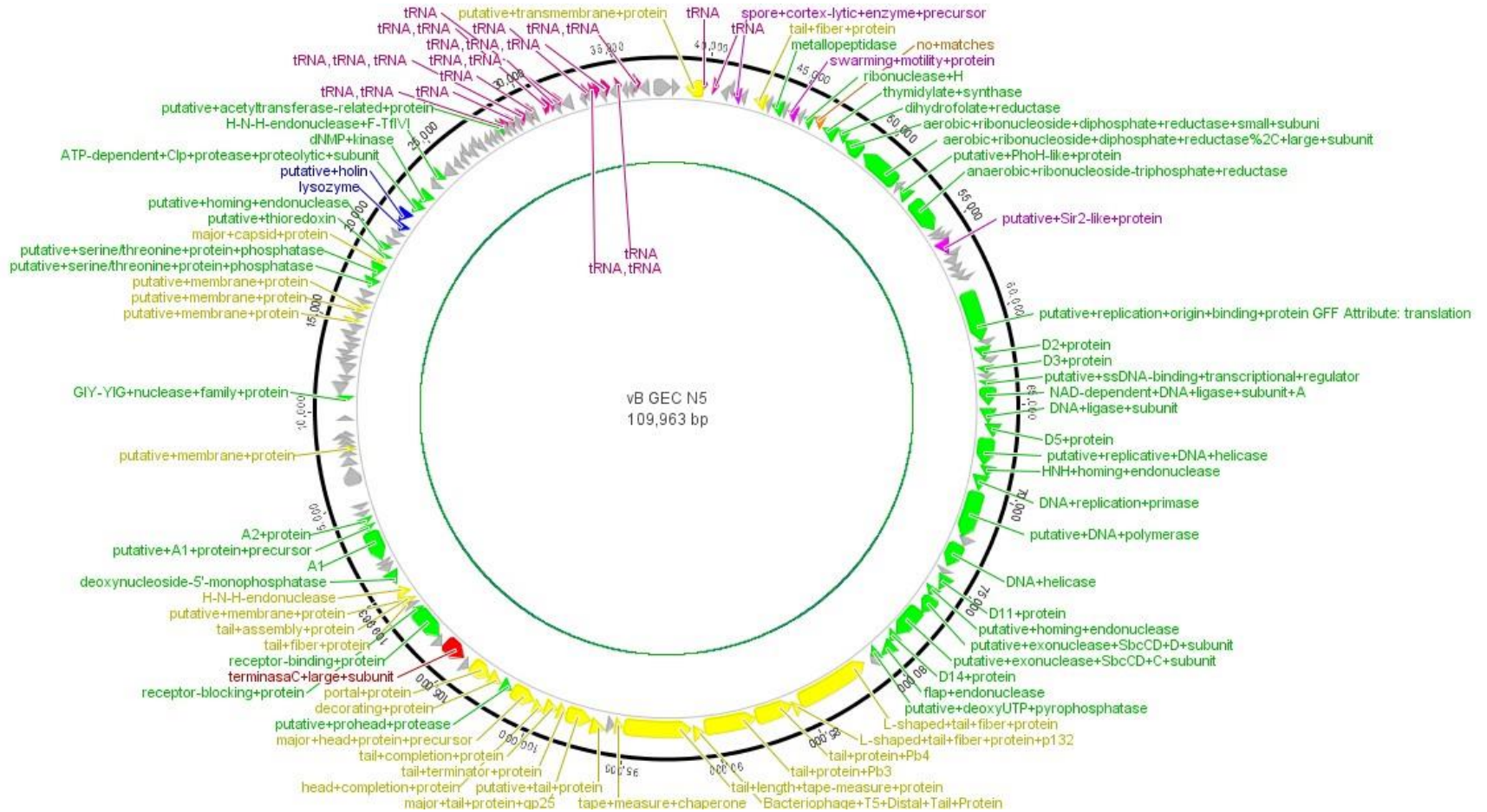
მისი გამოყოფა მოხდა 2013 წელს. გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცი-
თბილისი. ფაგის ვირიონის ზომაა $90/231 \pm 55$ მ (თავი/კუდი). ხოლო გენომის ზომაა 110
kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39% (GC content). გენომის ანოტაციამ
გამოავლინა 158 ღწზ (ღია წაკითხვის ჩარჩო), რომელთაგან 80 ე.წ. ჰიპოთეტურ
პროტეინს შეესაბამება, 26-სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილაა, 43 - ე.წ.
რეპლიკაციური აპარატის ცილა, ეგზო და ენდონუკლეაზები, რიბონუკლეოტიდ
რედუქტაზა სუბერთეულები, A1 და A2 პროტეინები, რომლებიც ჩართულნი არიან
მასპინძლის დნმ-ის დეგრადაციასა და უჯრედის სხვა გენების გათიშვაში, აღნიშნული
პროტეინები ასევე მონაწილეობენ ვირუსული დნმ-ის ბაქტერიულ უჯრედში შეღწევაში
(Paradiso et al., 2016) (Wang et al., 2005) (იხ. სურათი 38). ენზიმებიდან, რომლებიც
უშუალოდ არიან ჩართულნი დნმ - ის რეპლიკაციაში, აღნიშნული ფაგის გენომში
ნანახია - დნმ ლიგაზა, დნმ პოლიმერაზა, დნმ ჰელიკაზა, დნმ ჰელიკაზა - პრაიმაზა
სუბერთეული (DNA primase-helicase subunit). ასევე ნანახია D2, D3, D5, D11 და D14
ცილები, რომლებიც ჩართულნი არიან დნმ - ის რეპლიკაციის სხვადასხვა ეტაპების
განხორციელებაში. გენომი ასევე შეიცავს ტერმინაზას სუბერთეულს, პატრონი
უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელ ორ გენს (lysozyme, putative holin). vB_GEC_N5
შეიცავს 5 ე.წ. თვითმართვად ენდონუკლეაზას (HNH homing endonuclease), რაც

განასხვავებს მას როგორც Echerishia phage T5 ისგან, რომელიც 8 HNH homing endonuclease - ს ფლობს, ისე Salmonella phage Shivani - გან, რომელშიც 18 HNH homing endonuclease არის ნაწილი(Denish Piya at al., 2015). ფაგის გენომის შედარებამ NCBI ბაზაში არსებულ ფაგებთან, აჩვენა რომ ის ავლენს ძლიერ მსგავსებას ისეთ ცნობილ ლიტურ ფაგებთან, როგორებიცაა *E. coli T5* (იდენტ: 94,69%), *Salmonella phage Shivani* (იდენტ: 87,62%), *Salmonella phage Stitch* (იდენტ: 87,75%). აღსანიშნავია, რომ *Salmonella phage Shivani* წარმოადგენს თერაპიული ფაგური პრეპარატის - ინტესტი ფაგის შემადგენლობაში შემავალ ერთ-ერთ ფაგს (Denish Piya at al., 2015). **vB_GEC_N5** -ის გენომში გამოვლინდა 23 ტ- რნმ გენი. აღნიშნული ფაგის გენომის ანოტაციამ გამოავლინა, რომ იგი არ შეიცავს ინტეგრაზებს, მაშასადამე, ამ ნიშნით და ასევე მისი მაღალი მსგავსებით სხვა ვირულენტურ ფაგებთან, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ **vB_GEC_N5** ვირულენტური ფაგების რიცხვს განეკუთვნება.

ფაგი ხასიათდება $\approx 2-3$ მმ მდე ზომის, გამჭვირვალე, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს - $1 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას 10^{-7} -ს. ფაგი - **vB_GEC_N5** -ის ლიზისური აქტივობა შესწავლილ იქნა 239 შტამის მიმართ - 121 ვეტერინარული, ხოლო 118 კლინიკური შტამი (იხ. სურათი 63.). შედეგების ანალიზმა აჩვენა, რომ აღნიშნული ფაგი აქტიურია საკვლევ შტამების საერთო რაოდენობის 44% ის მიმართ. ხოლო სხვადასვა სეროტიპების მიმართ მისი აქტივობა მოცემულია 39 - ე სურათზე.

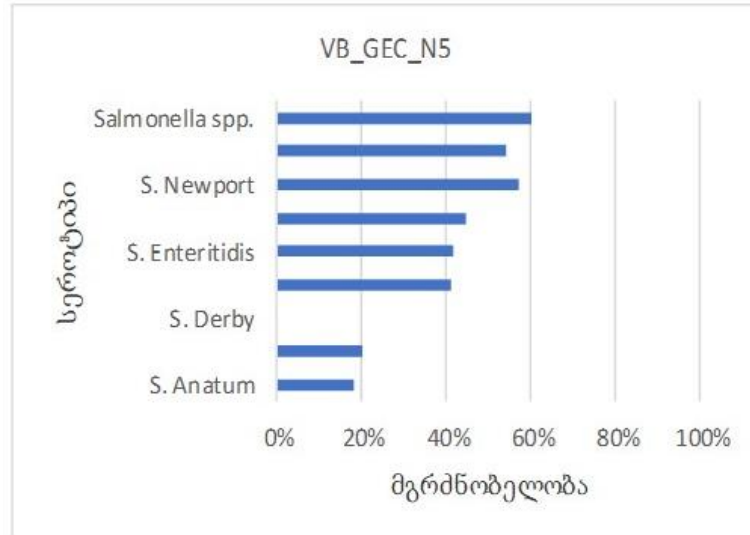
სურათი 38.

vB_GEC_N5 - ის გენომის რუკა



- | | |
|--|--|
| ➡ - დნმ - ის რეპლუკაცი, რეგულაცია, მოდიფიკაცია. | ➡ - ლიზისი |
| ➡ - დნმ - ის შეფუთვა | ➡ - დამატებითი ფუნქცია |
| ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი | ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი |

სურათი 39. ფაგი - vB_GEC_N5 -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

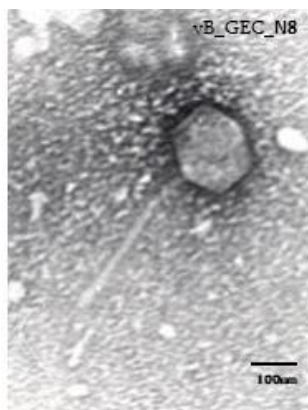


მაღალი ტემპერატურის თანაობისას, კერძოდ, 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, vB_GEC_N5 - ის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, ხოლო 60°C - ზე ტიტრის 4 რიგით კლება ფიქსირდება, 70°C - ზე კი ფაგი ფაქტობრივად ინაქტივირებულია. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-10 - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა pH - ის ნიშნულია - 3, ფაგი 24 სთ ში კარგავს აქტივობას. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურ ტიტრს 4 °C - ზე 1 წლის განმავლობაში.

ფაგი - vB_GEC_N8

ფაგი - vB_GEC_N8 ისევე, როგორც vB_GEC_N5 მიეკუთვნება Siphoviridae – ს ოჯახს, გვარი - Tequintavirus. მისი მასპინძელი შტამია SeE.3-(*Salmonella enterica* Enteritidis 3). გამოყოფილია 2013 წელს. გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია - თბილისი.

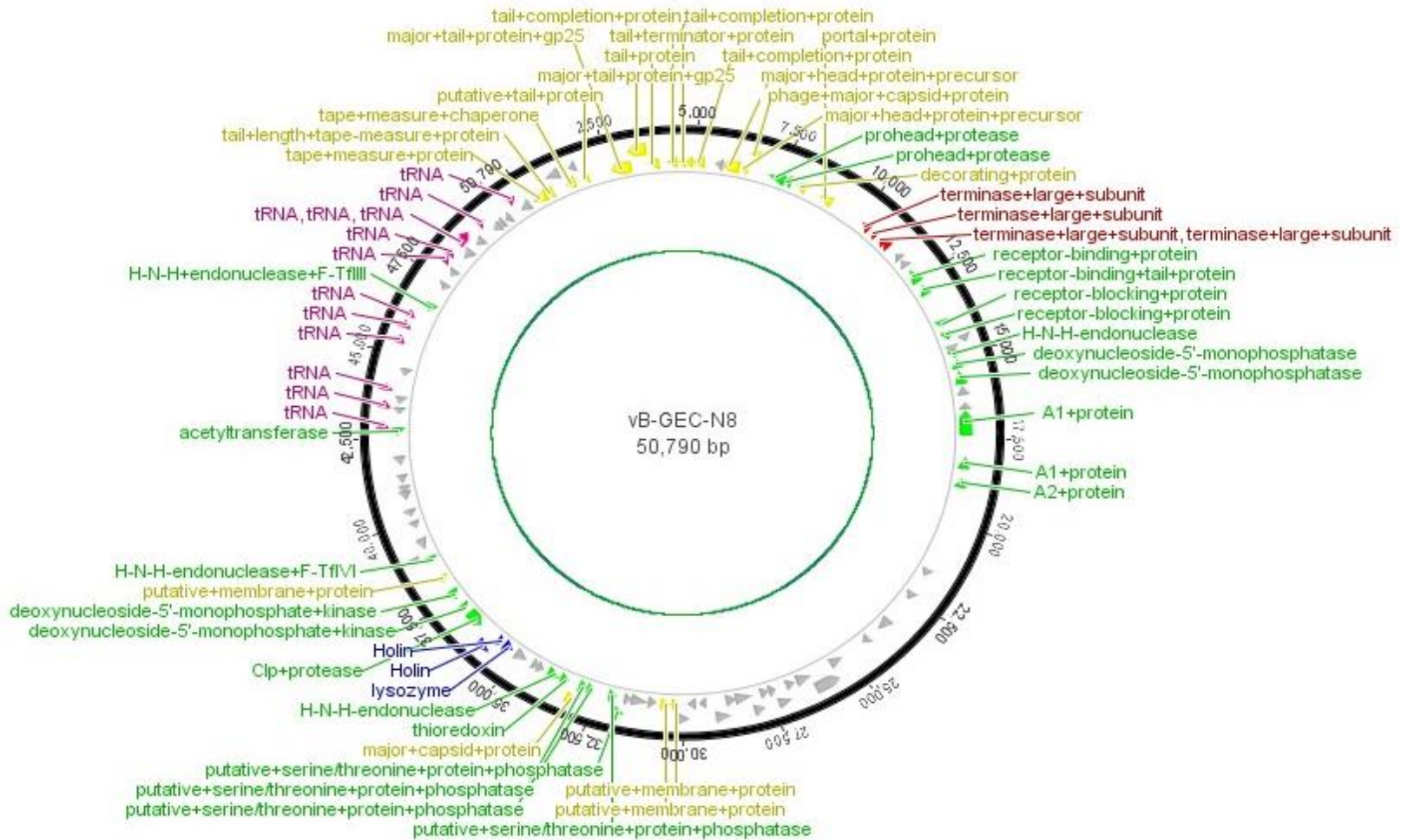
სურათი 40.



ფაგის ვირიონის ზომაა $77/168 \pm 5$ ნმ (თავი/კუდი). ხოლო გენომის ზომაა 51 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 39% (GC content). ამ ფაგის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრისთვისაც გამოყენებულ იქნა ე.წ. MinION მოწყობილობა (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell), მონაცემთა ანალიზისთვის კი - Albacore v2.1 (<https://github.com/rrwick/Porechop>). თუმცა აღსანიშნავია, რომ მისი გენომის ზომა შესაძლოა არ იყოს სრული და ადგილი გვქონდეს სექვენსის ე.წ. შეცდომასთან. გენომის ანოტაციის მიხედვით, აღნიშნული ფაგიც ვირულენტური ფაგია, მის გენომში არ გამოვლინდა ინტეგრატები. სულ ფაგის გენომი შეიცავს 103 ლწმ -ს, რომელთაგან 51 ე.წ. ჰიპოტეტური პროტეინების მაკოდირებელ გენებს შეესაბამება, 13 რეპლიკაციური აპარატის ცილაა, ხოლო 20 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილაა. გენომი ასევე შეიცავს ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელი ცილების შესაბამის სამ გენს - ორ ჰოლინს და ერთ ლიზოციმს (Holin, lysozim). ფაგის გენომში არ ინახა ისეთი მნიშვნელოვანი ცილების მაკოდირებელი გენები, როგორებიცაა: დნმ- ლიგაზა, დნმ- პოლიმერაზა, დნმ- ჰელიკაზა, რაც გვაფიქრებინებს, რომ აღნიშნული ფაგის გენომის გაშიფვრისას მოხდა ტექნიკური შეცდომა და მონაცემი არ არის სრული, ან შესაძლოა აღნიშნული ფაგი, საკუთარი დნმ- ის სინთეზისათვის ბაქტერიის რეპლიკაციური აპარატის ცილებს იყენებდეს. აღნიშნული საჭიროებს შემდგომ კვლევას.

სურათი 41.

vB_GEC_N8 - ის გენომის რუკა



➡ - დნმ - ის რეპლიკაცია, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.

➡ - დნმ - ის შეფუთვა

➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი

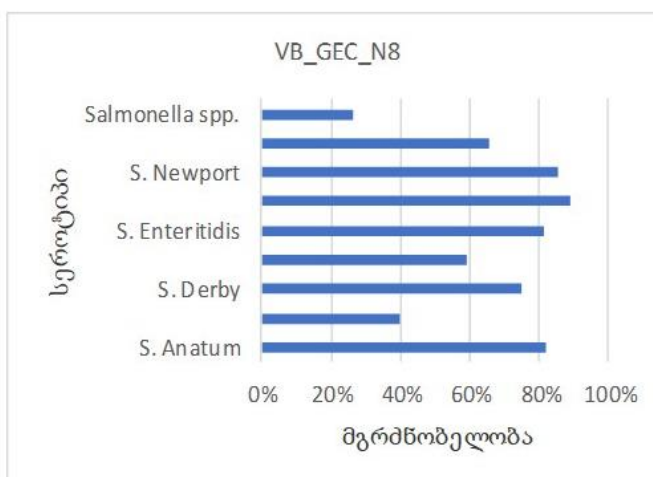
➡ - ლიზისი

➡ - დამატებითი ფუნქცია

➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი

შტამების საერთო რაოდენობის 65% მგრძობიარეა აღნიშნული ფაგის მიმართ. (იხ სურათი 63.). **vB_GEC_N8** - ის აქტივობა სეროტიპების მიხედვით მოცემულია სურათზე 42.

სურათი 42. ფაგი - **vB_GEC_N8** -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

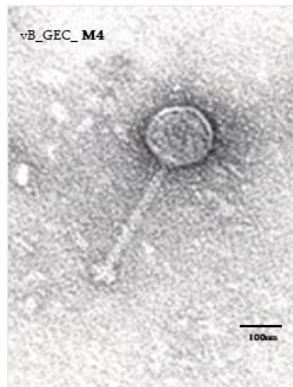


რაც შეეხება ე.წ ფენოტიპურ და ბიოლოგიურ მახასიათებლებს, ფაგი ხასიათდება \approx 1-2 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით. ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს - $4 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას 10^7 -ს. **vB_GEC_N8** ხასიათდება საკმაოდ მაღალი გამძლეობით ტემპერატურული ცვლილებების მიმართ, კერძოდ, 45°C -ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, ხოლო 60°C - ზე ტიტრი 3 რიგით ნაკლებია, ხოლო 75°C -ზე ფაგი ფაქტიურად ინაქტივირებულია. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას $\text{pH} = 5-10$ - ის ფარგლებში 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა $\text{pH} \leq 4$ ზე, ფაგი 24 სთ ში კარგავს აქტივობას. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურ ტიტრს 4°C - ზე, თხევად საკვებ არეში (LB medium) 1 წლის განმავლობაში შენახვის პირობებში.

ფაგი - vB_GEC_M4

vB_GEC_M4 მიეკუთვნება ოჯახს Siphoviridae, გვარი - Jerseyvirus. მასპინძელი შტამი - **S. Enteritidis 232**. აღსანიშნავია, რომ **S. Enteritidis 232** კლინიკური შტამია და გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტის სინჯიდან (ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი 2016წ.). ფაგის გამოყოფის წელი - 2016, გამოყოფის წყარო - შავი ზღვა.

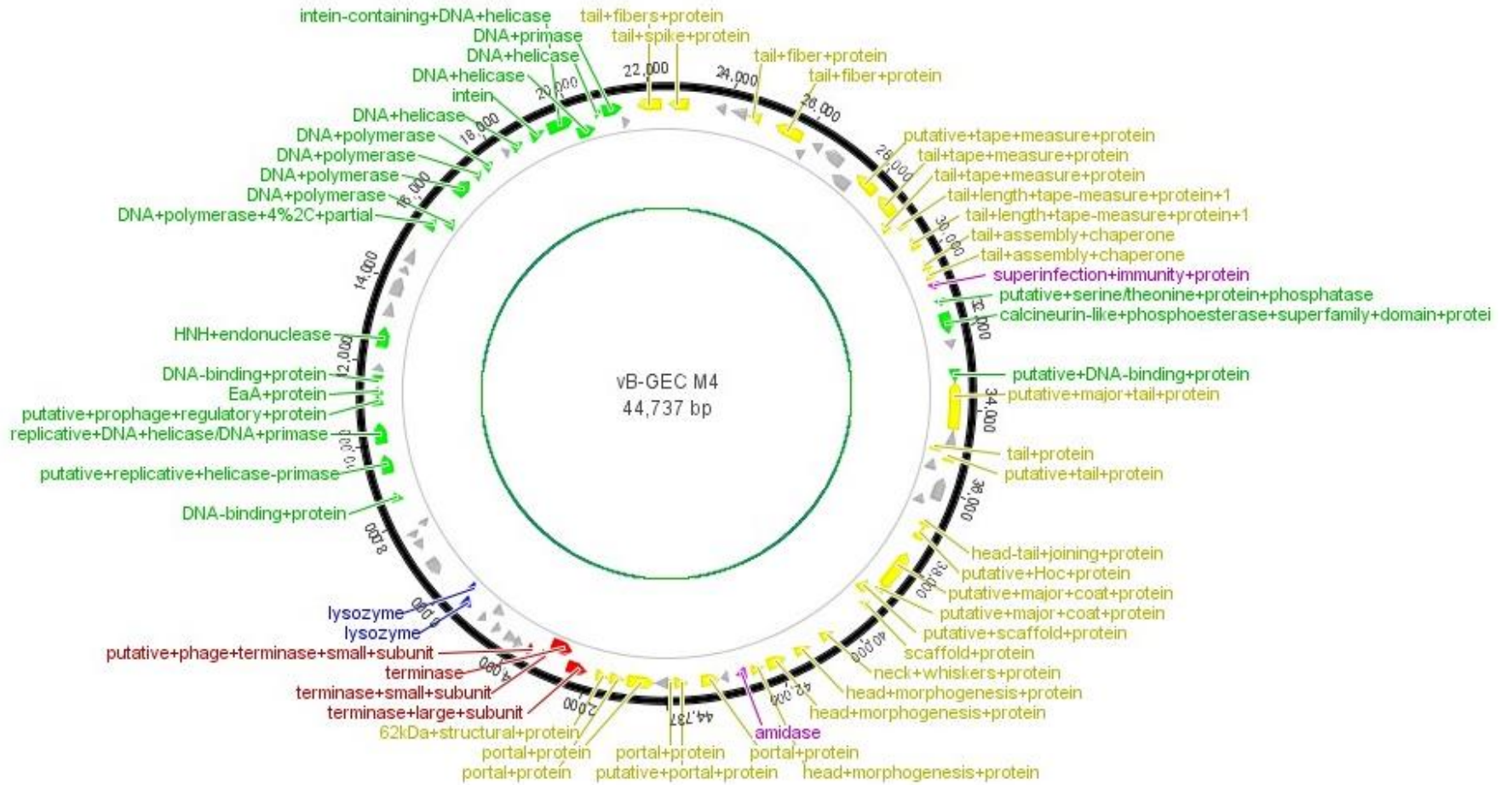
სურათი 43.



vB_GEC_M4 ვირიონის ზომა-72/136±55მ (თავი/კუდი). მისი გენომის ზომაა 45 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 50%. გენომის ანოტაციამ გამოავლინა 88 ღია წაკითხვის ჩარჩო (ლწჩ), რომელთაგან 29 ე.წ. ჰიპოთეტური პროტეინების მაკოდირებელ ცილებს შეესაბამება, 21 რეპლიკაციური აპარატის პროტეინებია, 30 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილებია. ფაგი შეიცავს ბაქტერიის ლიზისის განმაპირობებელ ორ პროტეინს, ლიზოციმის სახით. გენომში გამოვლინდა ტერმინაზას ოთხი სუბერთეული. (იხ.სურათი 44.). ტ-რნმ გენების გამოსავლენი პროგრამის ARAGORN -ის (<http://130.235.244.92/ARAGORN/>) მონაცემებით, აღნიშნული ფაგის გენომში ტ-რნმ გენები არ გამოვლინდა. vB_GEC_M4 მაღალ მსგავსებას ავლენს სხვა ცნობილი ვირულენტური ფაგების მიმართ, როგორებიცაა **Salmonella phage vB_SenS-Ent1**, **Salmonella phage vB_SenS-Ent2**, **Salmonella phage vB_SenS-Ent3**.

სურათი 44.

vB_GEC_M4 - ის გენომის რუკა

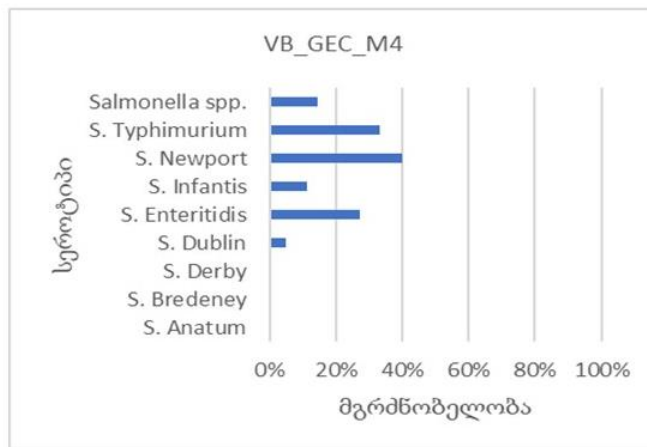


- ➡ - დნმ - ის რეპლიკაცია, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - დნმ - ის შეფუთვა.
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ➡ - ლიზისი
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი

ეს ფაქტი და ასევე ის, რომ ფაგის გენომში არ იქნა ნანახი ლიზოგენობის განმაპირობებელი გენები, მაგალითად ინტეგრაზები, ადასტურებს, რომ **vB_GEC_M4** ვირულენტურ ფაგად უნდა იქნეს განხილული.

vB_GEC_M4 - ის ლიტიური აქტივობა ტექნიკური მიზეზების გამო შესწავლილ იქნა 218 იზოლატის მიმართ (104 კლინიკური, 114 ვეტერინარული). ფაგის აქტივობის პროცენტული მაჩვენებელია - 23%. (იხ. სურათი 63.) გარკვეული სეროტიპები რეზისტენტულნი აღმოჩნდნენ აღნიშნული ფაგის მიმართ. იხ. სურათი 45.

სურათი 45. vB_GEC_M4 - ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



ფაგი **vB_GEC_M4** ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია: \approx 1-2,5 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიები. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $3 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, **vB_GEC_M4** ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე - 2 რიგით, ხოლო 75°C-ზე ხდება ფაგის სრული ინაქტივაცია. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. pH= 5-9 - ის ფარგლებში ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას, ხოლო როცა pH \leq 3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი -vB_GEC_M5

ფაგი -vB_GEC_M5-ც ასევე მიეკუთვნება ოჯახს Siphoviridae, გვარი - Jerseyvirus. მასპინძელი შტამი - **S. Enteritidis 407**, რომელიც ასევე კლინიკური შტამია და გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტის სინჯიდან (ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი 2016წ.) ფაგის გამოყოფის წელი - 2016, გამოყოფის წყარო - შავი ზღვა.

სურათი 46.



vB_GEC_M5 ვირიონის ზომა-64/136±5ნმ (თავი/კუდი). მისი გენომის ზომაა 44 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 50%. სექვენსის მეთოდი - მომდევნო თაობის სექვენირება - nanopore sequencing. უნდა აღინიშნოს, რომ ფაგები - **vB_GEC_M4** და **vB_GEC_M5** მაღალ 98,70%- იან მსგავსებას ავლენენ ერთმანეთის მიმართ. იდენტურია მათი ჰომოლოგი ფაგების სიაც - **Salmonella phage vB_SenS-Ent1**, **Salmonella phage vB_SenS-Ent2**, **Salmonella phage vB_SenS-Ent3**. ფაგების იგივე გვარში - Jerseyvirus - ში ერთიანდება ჩვენს მიერ გამოყოფილი და ამ კვლევაში გამოყენებული კიდევ ერთი ფაგი - **vB-GEC-Hi**. აღნიშნული სამი ფაგისა და მათი ჰომოლოგი ცნობილი ფაგების ფილოგენეტიკური ხე გვიჩვენებს, რომ **vB-GEC-Hi** უფრო მაღალ მსგავსებას ავლენს ფაგების **Salmonella phage vB_SenS-Ent1**, **Salmonella phage vB_SenS-Ent2** სა და **Salmonella**

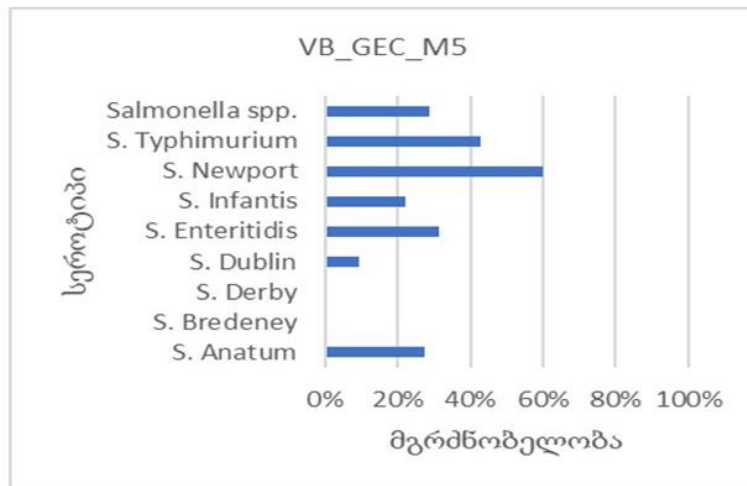
phage vB_SenS-Ent3 - ის მიმართ, ხოლო vB_GEC_ M4 და vB_GEC_M5 - ერთმანეთის მიმართ.

vB_GEC_M5 - ის გენომის ანოტაციისას გამოვლინდა, რომ იგი შეიცავს 92 ღწჩ - ს, რომელთაგან 35 ჰიპოთეტური პროტეინის მაკოდირებელი გენის შესაბამისია, 27 სტრუქტურული/მორფოგენეზის ცილაა, ხოლო 19 - რეპლიკაციური აპარატის ცილა. ფაგი შეიცავს ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის განმაპირობებელ 3 ცილას - ლიზინის, ლიზოციმის და სპანინის სახით. ასევე იგი შეიცავს ტერმინაზას 4 სუბერთეულს. **იხ. სურათი 47**

გენომის შემოწმებამ ტ-რნმ გენების არსებობაზე, აჩვენა, რომ vB_GEC_M5 - ის გენომი, განსხვავებით vB_GEC_ M4 სგან, რომელიც საერთოდ არ შეიცავს ტ-რნმ გენებს, შეიცავს 1 ტ-რნმ გენს. გენომის ანოტაციამ დაადასტურა ფაგის ლიტური ბუნება - არ იქნა ნანახი ლიზოგენიის გენები. მაშასადამე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ეს ორი ფაგიც (vB_GEC_ M4, vB_GEC_M5) ვირულენტურია, მით უფრო, რომ ორივე ფაგის უახლოესი ჰომოლოგები მკაცრად ლიტური ფაგების რიცხვს განეკუთვნებიან (Anany et al., 2015).

აღსანიშნავია, რომ მიუხედავად **vB_GEC_M4** - სა და **vB_GEC_M5** - ის ძალიან მაღალი მსგავსებისა, მათი მოქმედების დიაპაზონი საკმაოდ განსხვავებულია, კერძოდ, **vB_GEC_M5** - ის ლიტიური აქტივობა, რომელიც შესწავლილ იქნა 218 იზოლატის მიმართ (104 კლინიკური, 114 ვეტერინარული), ისევე, როგორც ეს განხორციელდა **vB_GEC_M4** - ის შემთხვევაში, **vB_GEC_M5** - ის ლიტიური აქტივობის მაჩვენებელი 37 % ია, **vB_GEC_M4** - ისა კი - 23%. (იხ. სურათი 63.) განსხვავებულია მათი მგრძობელობა სეროტიპების მიხედვითაც. **სურათი 48.**

სურათი 48. vB_GEC_M5 -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



ფაგი **vB_GEC_M5** ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია **vB_GEC_M4** ის მსგავსია: \approx 1-2,5 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიები. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $3 \cdot 10^9$ ნკწ/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. **vB_GEC_M5** - ის ტიტრი 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე - 2 რიგით, ხოლო 75°C-ზე ფაგის აქტივობა სრულად ითრგუნება. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. pH= 5-9 - ის ფარგლებში ფაგი სტაბილურია, ხოლო pH \leq 3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი -vB_GEC_Hi

ფაგი -vB_GEC_Hi მიეკუთვნება ოჯახს Siphoviridae, გვარი - Jerseyvirus. მასპინძელი შტამი - **S. Enteritidis 765**, რომელიც კლინიკური შტამია და გამოყოფილია დიარეის მქონე პაციენტის სინჯიდან (ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი 2016წ.) ფაგის გამოყოფის დრო - 2017 წელი, გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია - თბილისი.

სურათი 49.



ფაგის ვირიონის ზომაა $62/130 \pm 5$ ნმ (თავი/კუდი). გენომის ზომაა - 45kb. GC შემცველობა- 50%. პროგრამა genemarks- ში გენომის ანალიზმა გამოავლინა 86 ღია წაკითხვის ჩარჩო. 86 სავარაუდო გენი აკოდირებს 43 ე.წ. ჰიპოთეტურ პროტეინს (Hypothetical protein), 18 გენს, რომლებიც პასუხს აგებენ დნმ -ის რეპლიკაცია, რეგულაციის პროცესებზე, 16 გენს, რომლებიც აკოდირებენ სტრუქტურულ და მორფოგენეზის ცილებს, ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის გამომწვევ 3 ცილას ლიზოციმის სახით (lysozyme -ORF - 04, 05, 086) და ტერმინაზას ორ სუბერთეულს (ORF - 011, 012). შეიცავს 1 ტ-რნმ გენს. ფაგის გენომის ანოტაციამ დაადასტურა მისი ვირულენტური ბუნება. მის გენომში არ იქნა ნანახი ლიზოგენობის განმაპირობებელი გენები (სურათი 50). NCBI -ის ბაზაში მისი გენომის ანალიზმა გამოავლინა, რომ ის მაღალ მსგავსებას იჩენს ისეთი ფაგების მიმართ, როგორებიცაა **Salmonella phage vB_SenS-Ent1** (იდენტ:91,79%), **Salmonella phage vB_SenS-Ent2** (იდენტ: 91,43%), **Salmonella phage**

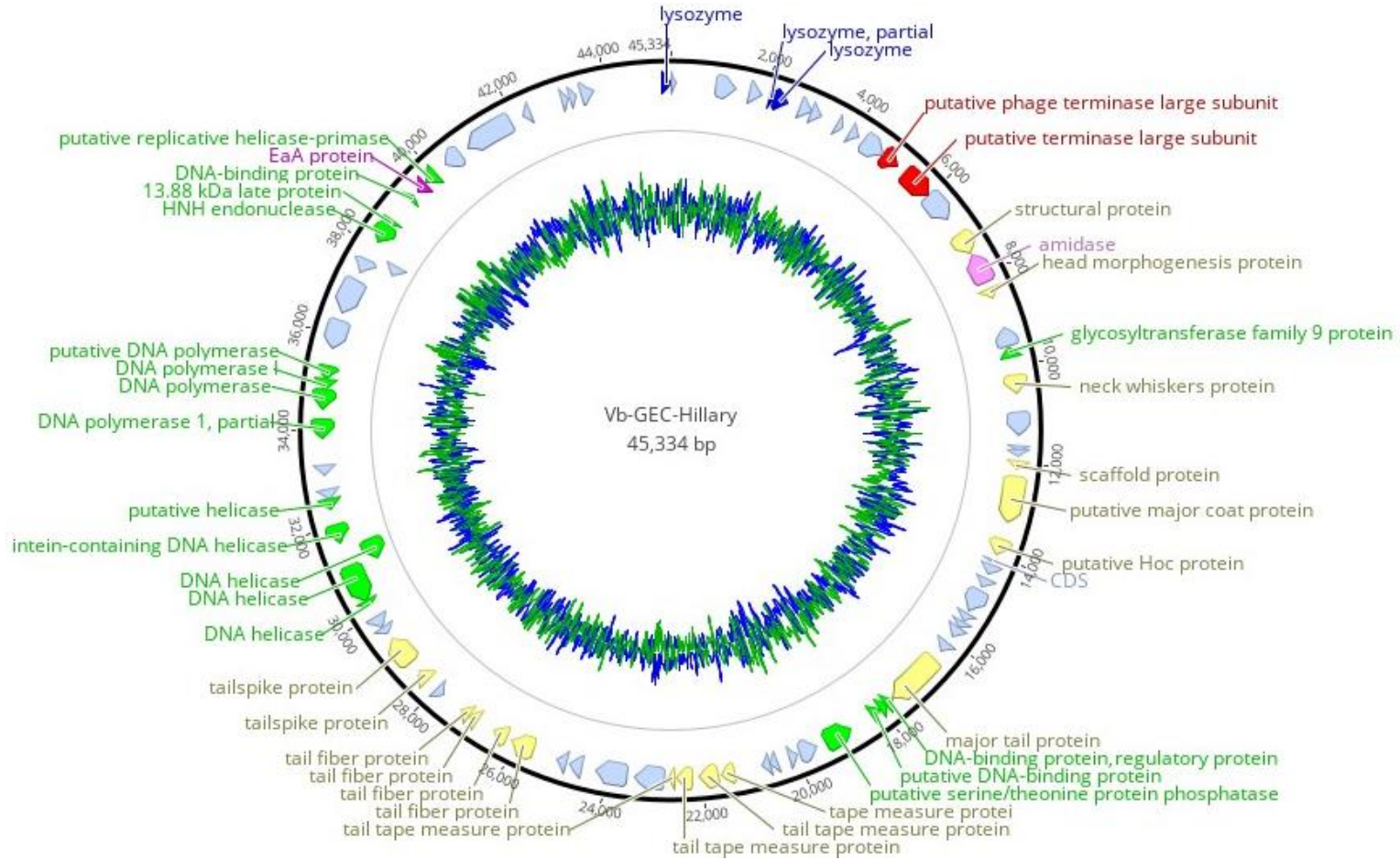
vB_SenS-Ent3 (იდენტ: 91,82%), რომლებიც განიხილება, როგორც მოქმედების ფართო სპექტრის მქონე, ვირულენტური ფაგები (Turner at al., 2012).

ფაგი-**vB_GEC_Hi** ის მოქმედების სპექტრის შესწავლაც მხოლოდ 141 შტამის მიმართ ჩატარდა, (27 - კლინიკური, 114 - ვეტერინარული). აღნიშნული შტამების მიმართ მისი აქტივობა 58% -ით განისაზღვრა (იხ.სურათი 63.). 52 -ე სურათზე მოცემულია მისი აქტივობა *Salmonella* -ს სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ.

ფაგი **vB_GEC_HI** ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია \approx 2-2,5 მმ მდე ზომის, ნათელი, უცენტრო ნეგატიური კოლონიები. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $3 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. **vB_GEC_HI** - ის ტიტრი 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე - 2 რიგით, ხოლო 75°C-ზე ფაგის აქტივობა სრულად ითრგუნება. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. pH= 5-10 - ის ფარგლებში ფაგი სტაბილურია, pH \leq 3 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

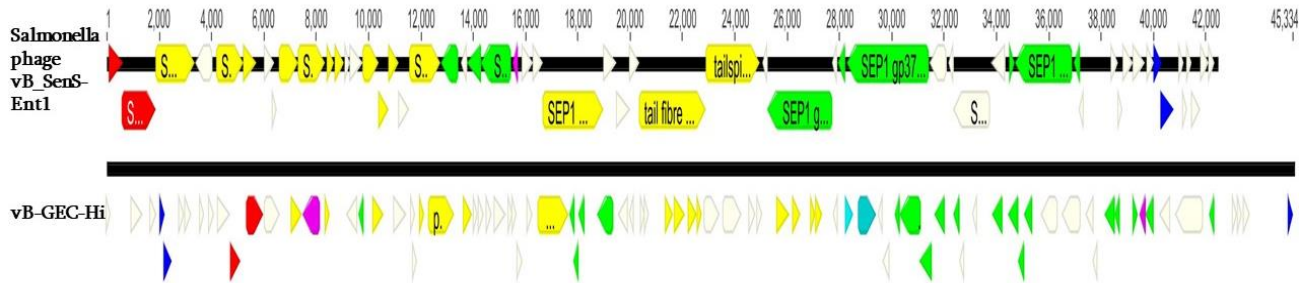
სურათი 50.

ფაგი -vB_GEC_Hi -ის გენომის რუკა

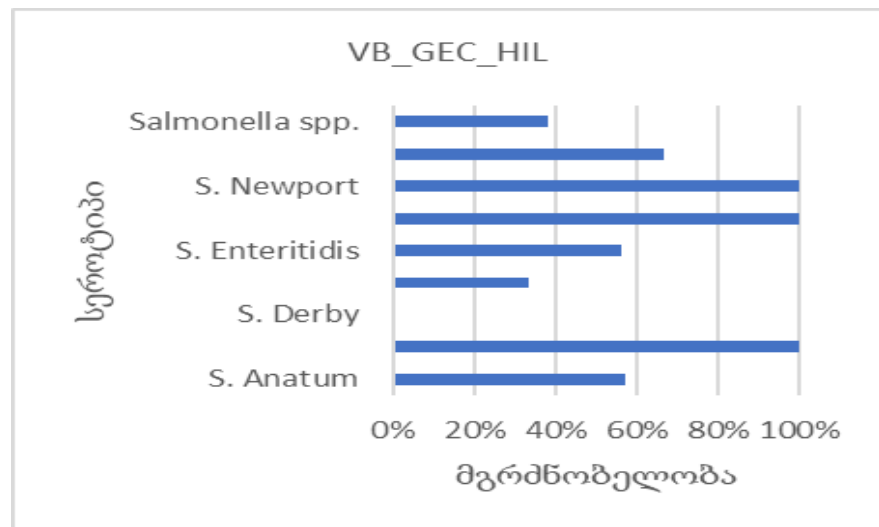


- ➡ - დნმ - ის რეპლიკატი, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - დნმ - ის შეფუთვა
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენეზი
- ➡ - ლიზისი
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, ჰიპოთეტური პროტეინი

სურათი 51. vB_GEC_Hi -ის თანაგანლაგება Salmonella phage vB_SenS-Ent1 თან



სურათი 52. vB_GEC_Hi - ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



ფაგი - vB_GEC_TR

ფაგი - vB_GEC_TR მიეკუთვნება ოჯახს **Podoviridae**; გვარი - **Lederbergvirus**. მასპინძელი შტამი - *S. Typhimurium* 641, რომელიც ასევე კლინიკური შტამია და გამოყოფილია დიარეისა და სეფსისით გართულებული მდგომარეობის მქონე პაციენტის სინჯიდან (ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური

იმუნოლოგიის სამეცნიერო-პრაქტიკული ცენტრი 2016წ.). ფაგის გამოყოფის წელი - 2017, გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია - თბილისი.

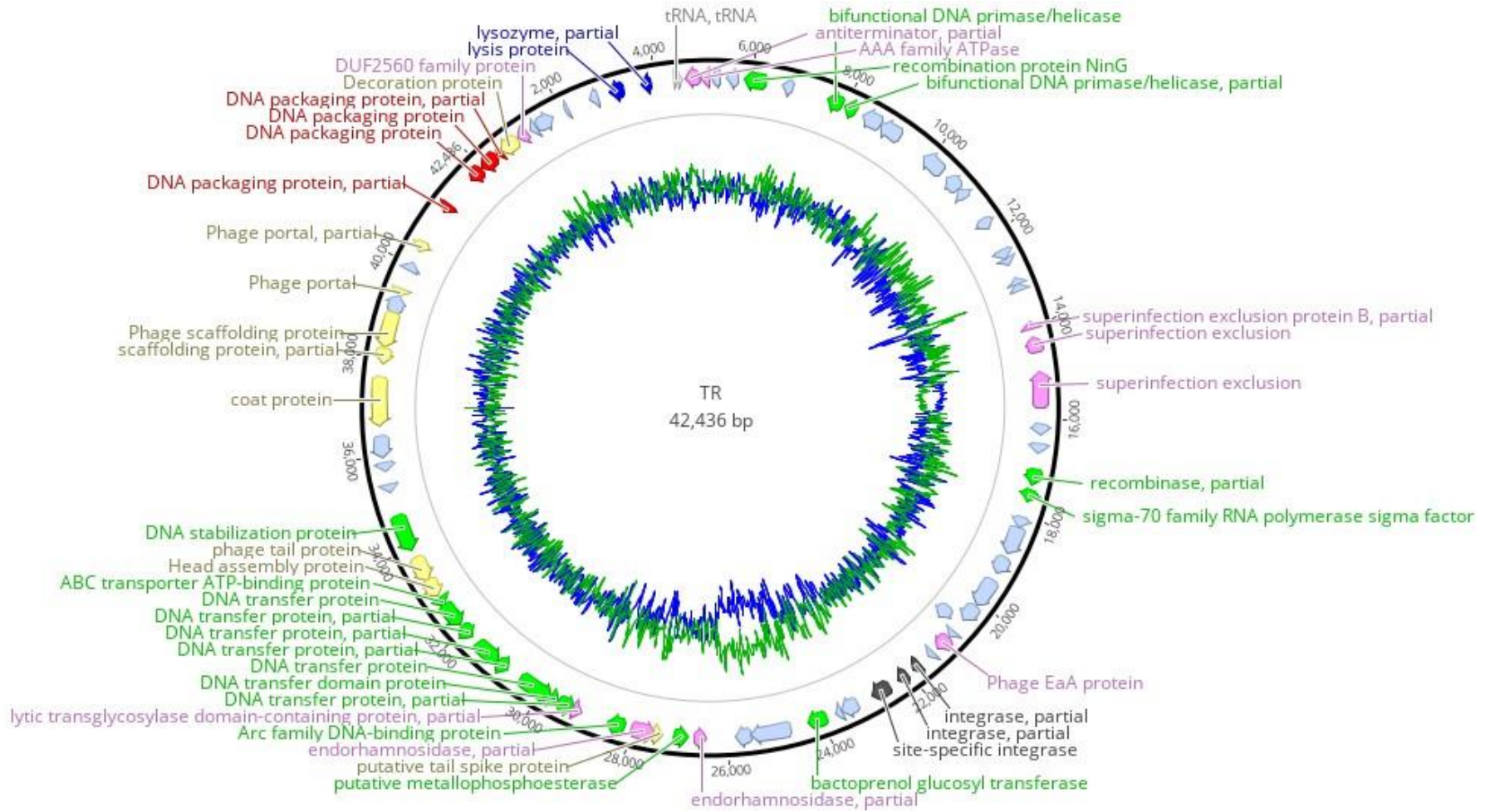
სურათი 53.



vB_GEC_TR- ის ვირიონის ზომა- 64 ± 5 ნმ (თავი). მისი გენომის ზომაა 42 kb. GC შემცველობის პროცენტული მაჩვენებელი - 50%. სექვენსის მეთოდი - nanopore sequencing. შეიცავს ორ ტ-რნმ გენს. აღნიშნული ფაგის ანოტაციით დადასტურდა, რომ ის ზომიერი ფაგია, კერძოდ, მის გენომში აღმოჩენილ იქნა ლიზოგენობის განმაპირობებელი ცილების- ინტეგრაზების, მაკოდირებელი 3 გენი. **იხ. სურათი 54.** NCBI -ის ბაზაში მისი გენომის ანალიზმა აჩვენა, რომ იგი მსგავსებას მეტწილად ბაქტერიების მიმართ ავლენს, სულ რამდენიმე ფაგი ავლენს მსგავსებას მის მიმართ, მათ შორის ყველაზე მაღალ მსგავსებას ავლენენ ცნობილი ზომიერი ფაგები - **Salmonella virus BTP1**(იდენტ: 97,54%) და **Salmonella phage epsilon34** (იდენტ: 95,10%)(Owen et al., 2017)(Villafane at al., 2008).

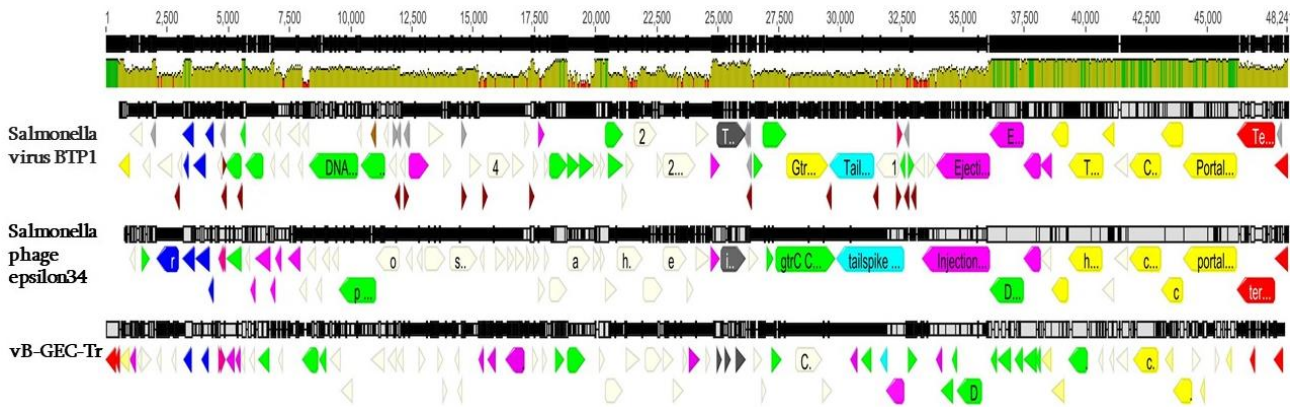
სურათი 54.

vB_GEC_TR - ის გენომის რუკა



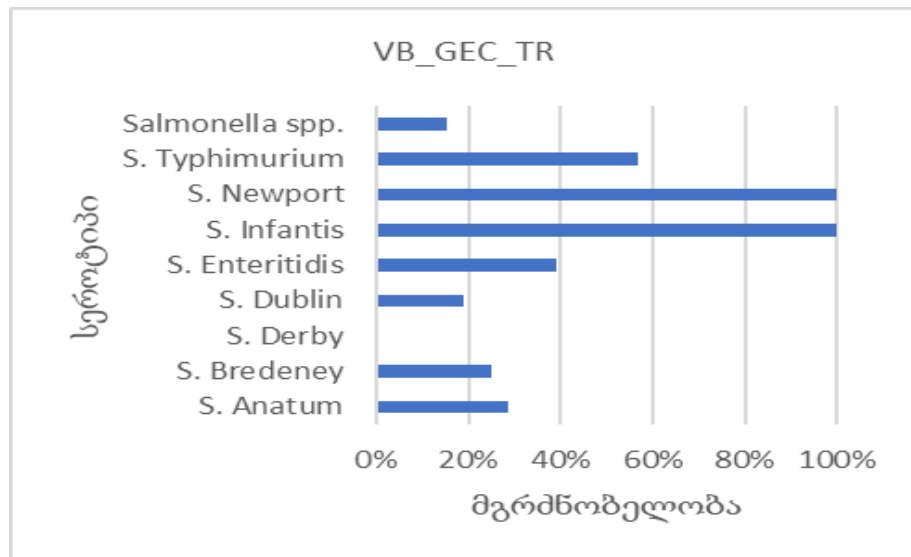
- ➡ - დნმ - ის რეპლიკაცი, რეგულაცია, მოდიფიკაცია.
- ➡ - ლიზისი
- ➡ - დნმ - ის შეფუთვა
- ➡ - დამატებითი ფუნქცია
- ➡ - სტრუქტურა/მორფოგენები
- ➡ - უცნობი ფუნქცია, კიპოთეტური პროტეინი

სურათი 55. *vB_GEC_TR*- ის თანაგანლაგება *Salmonella virus BTP1* სა და *Salmonella phage epsilon34* თან



ტექნიკური მიზეზების გამო *vB_GEC_TR* - ის მოქმედების სპექტრის შესწავლა მოხდა მხოლოდ 141 შტამის მიმართ, რომელთაგან 27 გახლდათ კლინიკური იზოლატი, ხოლო 114 - ვეტერინარული. ფაგის აქტივობა შტამების აღნიშნული რაოდენობის მიმართ 40% - ით განისაზღვრა (იხ.სურათი 63.). რაც შეეხება მის აქტივობას სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ, ნაჩვენებია სურათზე 56.

სურათი 56. *vB_GEC_TR* - ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ



ფაგი vB_GEC_Tr ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია \approx 2-3,5 მმ მდე ზომის, გამჭვირვალე, უცენტრო ნეგატიური კოლონიები. ფაგის ტიტრი გრაციას მეთოდით - $3 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით - 10^7 ნაწ/მლ-ს. 45°C-ზე, 24 სთ-ის შემდეგ, ფაგის ტიტრი იკლებს 1 რიგით, 65°C - ზე - 2 რიგით, ხოლო 75°C-ზე ფაგის აქტივობა სრულად ითრგუნება. 4 °C - ზე, თხევად საკვებ არეში შენახვისას, ფაგის ტიტრი 1 წლის შემდეგაც უცვლელი რჩება. pH= 5-10 - ის ფარგლებში ფაგი სტაბილურია, ხოლო pH \leq 4 ზე, ფაგის აქტივობა 24 სთ ში ეცემა.

ფაგი - vB_GEC_N3

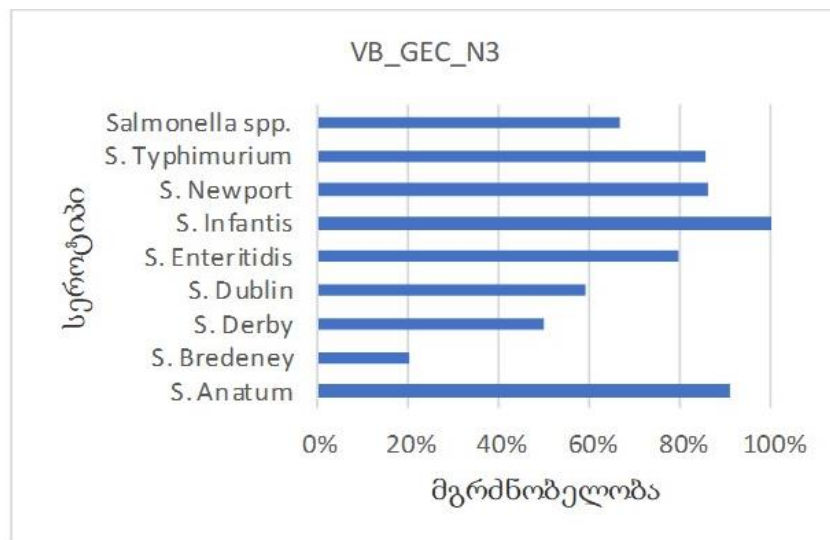
vB_GEC_N3 მიეკუთვნება Siphoviridae - ს ოჯახს. მისი მასპინძელი შტამია **SeE.3-** (*Salmonella enterica* Enteritidis 3), რომელიც ვეტერინარული შტამია. ფაგის გამოყოფა მოხდა 2013 წელს. გამოყოფის წყარო - მდინარე მტკვარი, ლოკაცია- თბილისი. აღნიშნული ფაგის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრა არ ჩატარებულა. შესწავლილ იქნა მისი ვირიონის მორფოლოგია, ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის გამოყენებით. ვირიონის ზომა $68/140 \pm 5$ ნმ-ია (თავი/კუდი). ფაგი ხასიათდება \approx 2-3 მმ მდე ზომის, გამჭვირვალე, უცენტრო ნეგატიური კოლონიებით.

სურათი 57.



ფაგის ტიტრი ორშრიანი აგარის მეთოდით განსაზღვრისას წარმოადგენს - $2 \cdot 10^9$ ნკწე/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით განსაზღვრისას 10^7 -ს. შესწავლილ იქნა მისი ლიზისური აქტივობა 239 შტამის მიმართ, რომელთაგან 121 ვეტერინარული წარმომავლობისაა, ხოლო 118 კლინიკური. ლიზისური აქტივობის შესასწავლად გამოყენებულ იქნა როგორც ე.წ. ლაქების მეთოდი (spot test), ისე ე.წ. შტრიხების მეთოდი (streak method)(Klieve, 2005)(Azeredo et al., 2018). დადგინდა, რომ აღნიშნული ფაგის აქტივობა საკვლევი შტამების მიმართ საკმაოდ მაღალია. იგი აქტიური აღმოჩნდა შტამების საერთო რაოდენობის 77% ის მიმართ. ფაგის მოქმედება სეროტიპების მიხედვით მოცემულია **სურათზე 58**.

სურათი 58. ფაგი - vB_GEC_N3 -ის მგრძობელობა კვლევაში გამოყენებული შტამების მიმართ

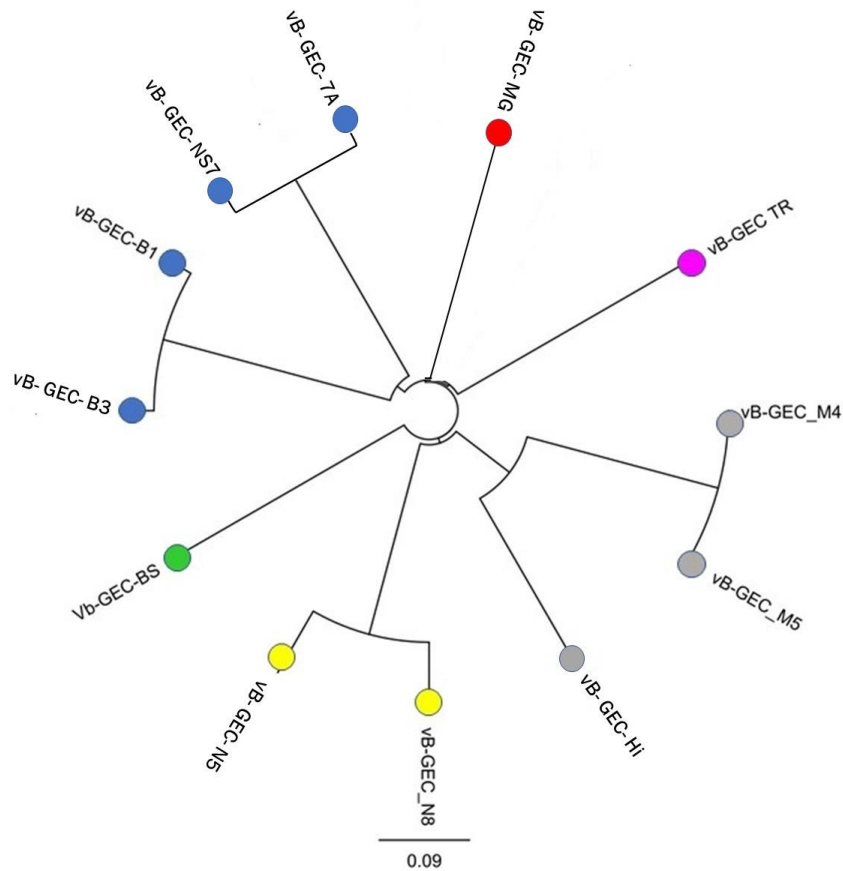


ტემპერატურული ცვლილებები vB_GEC_N3-ზე შემდეგნაირად მოქმედებს: ფაგის 45°C -ზე 24 საათი დაყოვნების შემდეგ, მისი ტიტრი იკლებს 2 რიგით, ხოლო 70°C - ზე ტიტრის 4 რიგით კლება ფიქსირდება. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურობას pH= 5-11 - ის ფარგლებში, 24 სთ ის მანძილზე, ხოლო როცა pH - ის ნიშნულია - 3, ფაგი 24 სთ ში კარგავს აქტივობას. ფაგი ინარჩუნებს სტაბილურ ტიტრს 4°C - ზე 1 წლის განმავლობაში.

5.5. ფაგების შედარებითი დახასიათება

კვლევაში გამოყენებული ფაგებს შორის ნათესაური კავშირის დასადგენად მოხდა მათი გენომების შედარება, რისთვისაც გამოვიყენეთ პროგრამა - Geneious (<https://www.geneious.com/>). გენეტიკურ ხეზე (სურათი 59.) ფაგების განლაგება შემდეგნაირია: მაღალ მსგავსებას ავლენენ ერთმანეთის მიმართ და გენეტიკურ ხეზე ახლოს განთავსდნენ ფაგები - **vB-GEC-B1**, **vB-GEC- B3**, **vB-GEC-NS7** და **vB-GEC-7A**, ოთხივე მათგანი ოჯახი -Myoviridae, გვარი -Felixounavirus - ების წარმომადგენელია; ახლოს განთავსდნენ ფაგები **vB-GEC- N8** და **vB-GEC-N5**, ორივე Siphoviridae -ა, გვარი - Tequintavirus. **vB-GEC- Hi** ასევე Siphoviridae - ს განეკუთვნება, ერთიანდება გვარში - Jerseyvirus, ამავე გვარში ერთიანდებიან **vB-GEC- M4** და **vB-GEC- M5**; კვლევაში გამოყენებული არც ერთი ფაგის და არც ერთმანეთის მიმართ განსაკუთრებულ მსგავსებას არ იჩენენ და შესაბამისად, ფილოგენეტიკურ ხეზეც განცალკევებით განთავსდნენ ფაგები - **vB-GEC- TR** ოჯახი - Podoviridae; გვარი - Lederbergvirus, **vB-GEC- MG** ოჯახი -Myoviridae, გვარი - Tequatrovirus და **vB-GEC-BS** ოჯახი -Myoviridae, გვარი - Viunavirus.

სურათი 59. კვლევაში გამოყენებულ ფაგებს შორის ნათესაური კავშირის ფილოგენეტიკური ხე



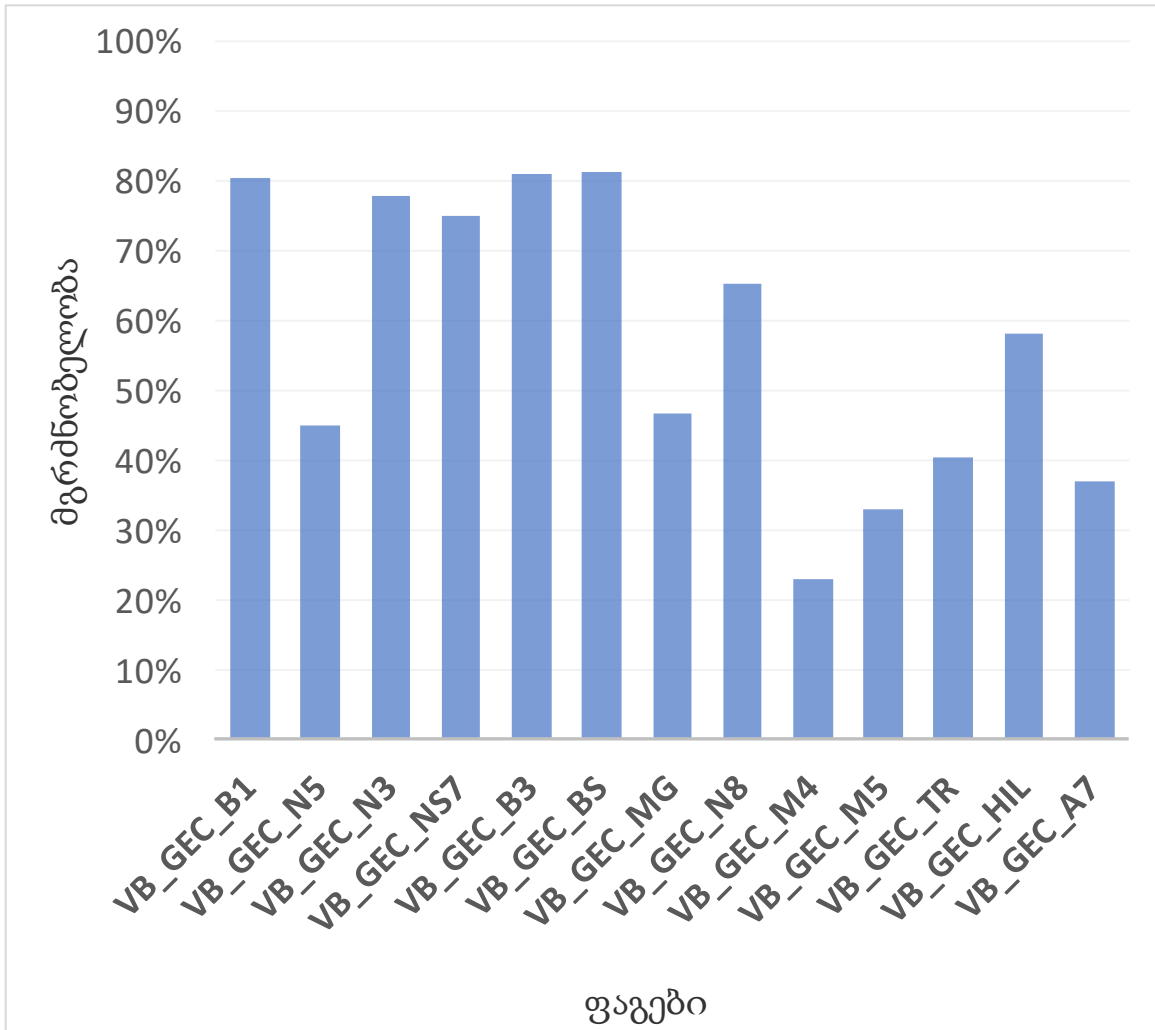
ამგვარად, ერთმანეთის მიმართ ნათესაობის კუთხით, ფაგები განლაგდნენ რამდენიმე ჯგუფში :

1. ე.წ. ფელიქსოუნა (Felixounavirus) ვირუსების ჯგუფი - **vB-GEC-B1, vB-GEC-7A, vB-GEC- B3, vB-GEC_NS7.**
2. ე.წ. ჯერსივირუსების (Jerseyvirus) ჯგუფი რომელშიც ერთიანდებიან Siphovoridae - ეს ოჯახის წარმომადგენლები - **vB-GEC- HI, vB-GEC- M4 და vB-GEC- M5.**
3. ე.წ. ტეკვინტა იგივე T5 (Tequintavirus) ვირუსები - **vB-GEC-N5 და vB-GEC-N8.**

4. გვარი - Tequatrovirus იგივე T4 ფაგების წარმომადგენელი აღმოჩნდა მხოლოდ ერთი ფაგი - **vB-GEC-Mg**.
5. გვარი - ვიუნავირუსების (Viunavirus) წარმომადგენელიც მხოლოდ ერთი ფაგი - **vB-GEC-Bs** - ია.
6. Podoviridae, გვარი - Lederbergvirus - ის ერთი წარმომადგენელი, ზომიერი ფაგი - **vB-GEC- TR**.

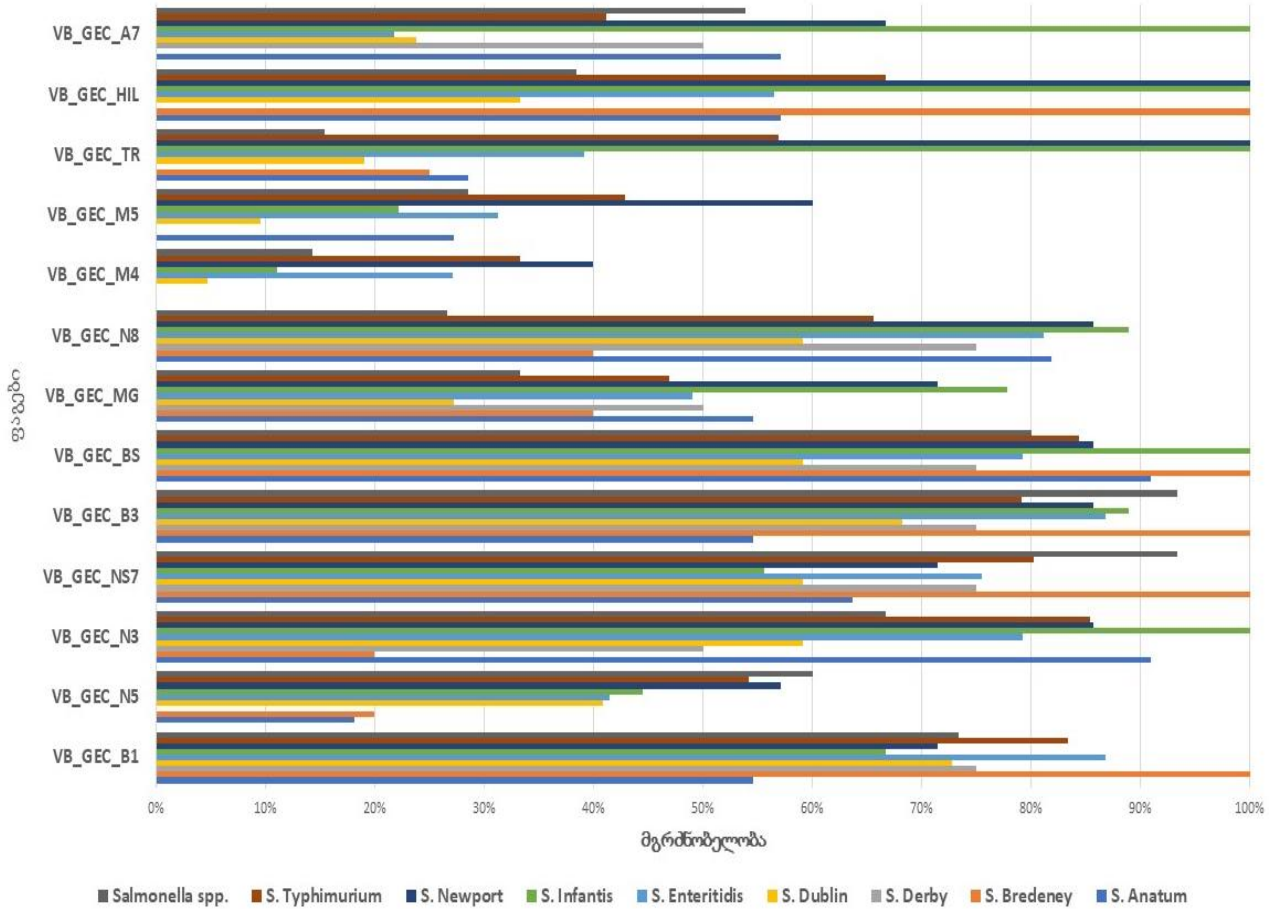
კვლევაში გამოყენებული ფაგების მოქმედების სპექტრის ერთმანეთთან შედარებისას გამოვლინდა, რომ ე.წ. მაღალაქტიურ ფაგებს განეკუთვნებიან ფაგები - **vB-GEC-B1**, **vB-GEC -Bs**, **vB-GEC-B3**, **vB-GEC-N3**, **vB-GEC-NS7**, **vB-GEC- N8**, რომელთა აქტივობა განისაზღვრა 60% დან 80 % მდე იხ. სურათი 60.

სურათი 60. კვლევაში გამოყენებული ფაგების აქტივობა საკვლევი შტამების საერთო რაოდენობის მიმართ (239 შტამი)



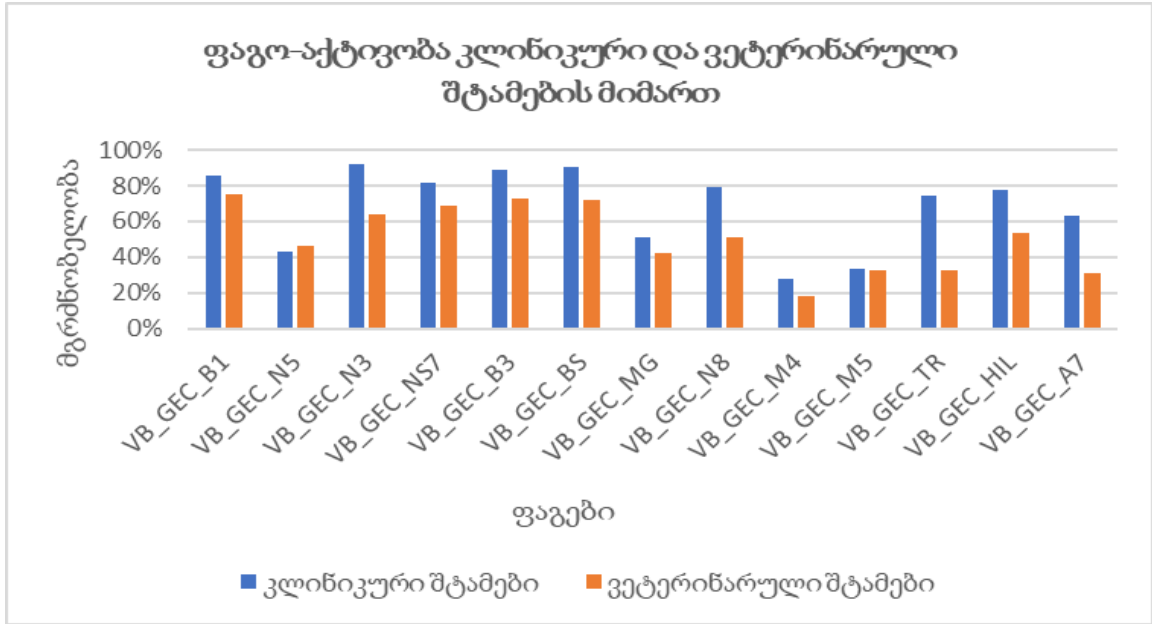
ფაგების აქტივობა კვლევაში გამოყენებული შტამების ცალკეული სეროტიპის მიმართ მოცემულია 62- ე სურათზე, საიდანაც ნათლად ჩანს, რომ ე.წ. მაღალაქტიური ფაგები თითქმის თანაბარ აქტივობას ავლენენ სხვადასხვა სეროტიპის მიმართ. ე.წ. დაბალი აქტივობის ფაგებიც მეტწილად მოიცავენ შტამების ყველა სეროტიპს. არ გამოვლენილა სეროტიპი, რომელიც ყველა ფაგის მიმართ რეზისტენტული აღმოჩნდებოდა. ანუ ფაგების მიერ მეტწილად აქტივობით მოცულია საკვლევი შტამების ყველა სეროტიპი.

სურათი 61. კვლევაში გამოყენებული ფაგების აქტივობა საკვლევი შტამების სხვადასხვა სეროტიპების მიმართ





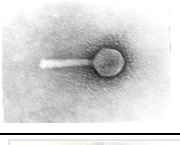
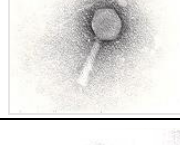


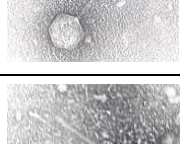
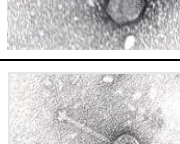
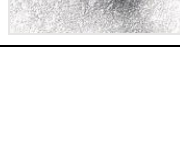
საინტერესოა, რომ აღნიშნული ფაგები უფრო ეფექტურნი აღმოჩნდნენ კლინიკური შტამების მიმართ (~ 90%), ვიდრე ვეტერინარული წარმოშობის შტამების მიმართ (~ 70%). აღსანიშნავია, რომ ამ შტამების უმრავლესობა მრავლობითად ანტიბიოტიკორეზისტენტული (MDR) პროფილებით ხასიათდებოდა.



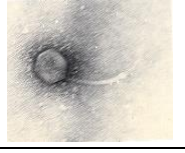
სურათი 62. ფაგების აქტივობა საკვლევი კლინიკური და ვეტერინარული შტამების მიმართ



ცხრილში N 3 დაჯამებული სახით მოცემულია ჩვენს მიერ შესწავლილი ფაგების დახასიათება, რომელშიც მითითებულია მათი მსგავსება მონაცემთა ბაზაში არსებულ ჰომოლოგებთან.

ცხრილი N 3. კვლევაში გამოყენებული ფაგების სია (შესაცვლელია B3, Ns7)

| N | ფაგის სახელწოდება | ოჯახი/გვარი | ვირიონის ზომა (თავი/კული. ნმ.) | პატრონი შტამი | მიკროსკოპული სურათი | გენომის ზომა (kb) | უახლოესი ჰომოლოგები NCBI - ის მონაცემთა ბაზაში | გამოყოფის წელი | გამოყოფის წყარო/ადგილმდებარეობა |
|---|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|--|-------------------|--|----------------|---------------------------------|
| 1 | vB-GEC-BS | Myoviridae, Viunavirus | 77/118 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium 4 |  | 158 | Salmonella phage Vi01(98%) | 2013 | შავი ზღვა/ბათუმი |
| 2 | vB-GEC -MG | Myoviridae, tequatrovirus | 95/104 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis 3 |  | 171 | Shigella phage-SHFML11 (98%) | 2013 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 3 | vB-GEC -B1 | Myoviridae, Felixounavirus | 81/122 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium 6 |  | 87 | Bacteriophage FelixO1 (98%) | 2013 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 4 | vB-GEC -B3 | Myoviridae, Felixounavirus | 81/122 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium 6 |  | 87 | Bacteriophage FelixO1 (98%) | 2013 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 5 | vB-GEC -NS7 | Myoviridae, Felixounavirus | 86/113 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium 6 |  | 86 | Salmonella phage Mushroom (98%) | 2015 | უმი რძე/თბილისი |
| 6 | vB-GEC -7A | Myoviridae, Felixounavirus | 82/109 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> 1328 |  | 85 | Salmonella phage Mushroom (97%) | 2017 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 7 | vB-GEC -N5 | Siphoviridae, Tequintavirus | 90/231 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis 3 |  | 110 | Bacteriophage T5 (97%) | 2013 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 8 | vB-GEC -N8 | Siphoviridae, Tequintavirus | 77/168 ±5 | <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis 3 |  | 51 | Bacteriophage T5 (95%) | 2013 | მდინარე მტკვარი/თბილისი |
| 9 | vB-GEC -M4 | Siphoviridae, Jerseyvoris | 72/136 ±5 | <i>S. enteritidis</i> 232 |  | 45 | Salmoenlla phage VB sens ent1 NA(91%) | 2016 | შავი ზღვა/ბათუმი |

| | | | | | | | | | |
|----|------------|--------------------------------|--------------|---|--|----|---|------|--------------------------------|
| 10 | vB-GEC -M5 | Siphoviridae, Jerseyvoris | 64/136 ±5 | <i>S. enteritidis</i> 407 |  | 44 | Salmoenlla phage VB sens ent1 NA(91%) | 2016 | შავი ზღვა/ბათუ მი |
| 11 | vB-GEC -Hi | Siphoviridae, Jerseyvoris | | <i>S. enteritidis</i> 765 | | 45 | Salmoenlla phage VB sens ent1 (91%) | 2017 | მდინარე მტკვარი/თ ბილისი |
| 12 | vB-GEC -Tr | Podoviridae, Laderbergvirus | 64±5 | <i>S.typhimuriu</i> m 641 |  | 42 | Salmonella virus BTP1(97%) | 2017 | მდინარე მტკვარი/თ ბილისი |
| 13 | vB-GEC -N3 | Siphoviridae | 68/140 ±5 | <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> Enteritidis 3 |  | | | 2013 | მდინარე მტკვარი/თ ბილისი |

5.6. ფაგების აქტივობა CTX-M-15 ფართო სპექტრის B- ლაქტამაზა წარმომქმნელი SALMONELLA ENTERICA სეროვარ TYPHI -ის მიმართ კონგოს დემოკრატიული რესპუბლიკიდან

ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესახებ ძალიან ინფორმატიულია ასევე ჩვენს მიერ ჩატარებული in vitro ექსპერიმენტი, რომელიც მიზნად ისახავდა CTX-M-15 ფართო სპექტრის β- ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი *S. Typhi* - ს მიმართ ჩვენი კოლექციის ბაქტერიოფაგების მოქმედების აქტივობის შესწავლას.

ენტარული ცხელება უფრო ხშირია ბავშვებში და მოზრდილებში, ვიდრე ხანდაზმულ პაციენტებში. მთელს მსოფლიოში, ენტერალური ცხელება ყველაზე მეტად არის გავრცელებული გადარიბებულ რაიონებში, რომლებშიც სანიტარული მდგომარეობა ძალიან ცუდია. *S. Typhi* შემთხვევების რაოდენობა სამხრეთ-ცენტრალური აზია, სამხრეთ-აღმოსავლეთ აზია და სამხრეთ აფრიკა რეგიონებში საკმაოდ მაღალია. (>100 შემთხვევა 100,000 ადამიანი წელიწადში) (Ryan & Andrews, 2019)

2017 წელს კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში აღწერილ იქნა კლინიკური შემთხვევა, ტიფოიდური ცხელება, რომელიც 7 წლის ვაჟს დაუდგინდა. დაავადების გამომწვევი CTX-M-15 (Cefotaximase-Munich (CTX-M) 15) მუტაციის მატარებელი ფართო სპექტრის β -ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი *S. Typhi* აღმოჩნდა, რომელიც ხასიათდებოდა ciprofloxacin - ის მიმართ დაქვეითებული მგრძობელობით (Phoba et al., 2017). აღნიშნული იზოლატი ცნობილი როგორც Typhi 10040_15, გამოიგზავნა ელიავას ინსტიტუტში კვლევისა და განვითარების განყოფილებაში მის მიმართ ფაგების მოქმედების პოტენციალის შესასწავლად. ჩვენს მიერ შესწავლილი 14 ბაქტერიოფაგისა და კომერციული პრეპარატის „ინტესტი ფაგი“ -ის 5 სხვადასხვა სერია, გამოცდილ იქნა აღნიშნული შტამის მიმართ აქტივობაზე. სკრინინგისათვის გამოყენებულ იქნა როგორც ე.წ. „ლაქების მეთოდი“ (spot test), ისე ე.წ. „შტრიხების მეთოდი“ (streak method). აღმოჩნდა, რომ 14 ფაგური კლონიდან 12- ის და „ინტესტის“ 5 სერიიდან 3 - ის მოქმედება აღნიშნულ შტამზე გამოვლინდა სუფთა ლიზისური ზონების წარმოქმნით (clear lysis zones). იგივე შედეგი დაფიქსირდა ე.წ. „ლაქების“ მეთოდის შემთხვევაშიც. მხოლოდ ორი ფაგური კლონი **vB_GEC_MG** და **vB_GEC_TR** (ეს უკანასკნელი ზომიერი ფაგია) აღმოჩნდა არააქტიური Typhi 10040_15 - ის მიმართ.

S. Typhi 10040_15 - ის მიმართ ფაგების ლისიზური აქტივობის სტაბილურობის შესასწავლად გამოყენებულ იქნა აპელმანის მეთოდი. მომზადდა 14 ვე ფაგური კლონის თანმიმდევრული განზავებები 10^6 დან 10^{10} ნკწე/მლ 5 მლ თხევად საკვებ არეში (LB), თითოეულ განზავებას დაემატა 150 μ L *S. Typhi* 10040_15 -ს ბულიონური კულტურა, ტიტრით - 10^9 კწე/მლ. ნარევების ინკუბაცია ხდებოდა 37°C -ზე, მათი სიმღვრივის ცვლილებებზე ვიზუალური დაკვირვება წარმოებდა 6, 18, 24 სთ იანი ინტერვალებში. საკონტროლო ნიმუშებს წარმოადგენდა მხოლოდ ბაქტერიით ინოკულირებული თხევადი საკვები არე და მხოლოდ ფაგით ინოკულირებული თხევადი არე. საკონტროლო და საკვლევი მასალა განთავსებული იყო ერთნაირ გარემო პირობებში (37°C -ზე)(Burrowes et al., 2019)(Kakabadze et al., 2018). თოთხმეტიდან ათმა ფაგმა გამოავლინა ლიზისური აქტივობა დროის სხვადასხვა ინტერვალებსა და სხვადასხვა

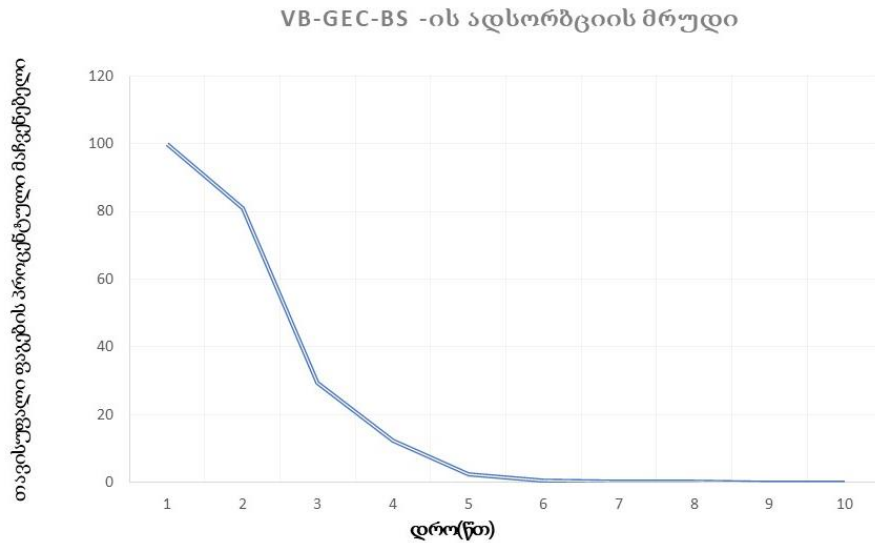
კონცენტრაციებში, მათგან ხუთმა კი აჩვენა ლიზისური აქტივობა ფაგო გამძლე მუტანტების წარმოქმნის გარეშე, 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგაც კი, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ისინი გამოირჩევიან ფაგოგამძლე მუტანტების ფორმირების ლიმიტირების უნარითაც. აღნიშნული თვისება ძალიან მნიშვნელოვანია ფაგოთერაპიის პროცესისათვის. აღნიშნული ხუთი ფაგია - vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_NS7 და vB_GEC_Hi.

მოცემული ექსპერიმენტის შედეგად დადასტურდა, რომ ჩვენი კოლექციის სულ მცირე 5 ფაგური კლონი, in vitro პირობებში ავლენს ძლიერ ლიზისურ აქტივობას კონგოს დემოკრატიული რესპუბლიკიდან მიღებული იზოლატის - ექსტრემალურად ანტიბიოტიკორეზისტენტული β - ლაქტამაზა მწარმოებელი *Salmonella enterica* სეროვარ **Typhi** - ის მიმართ.

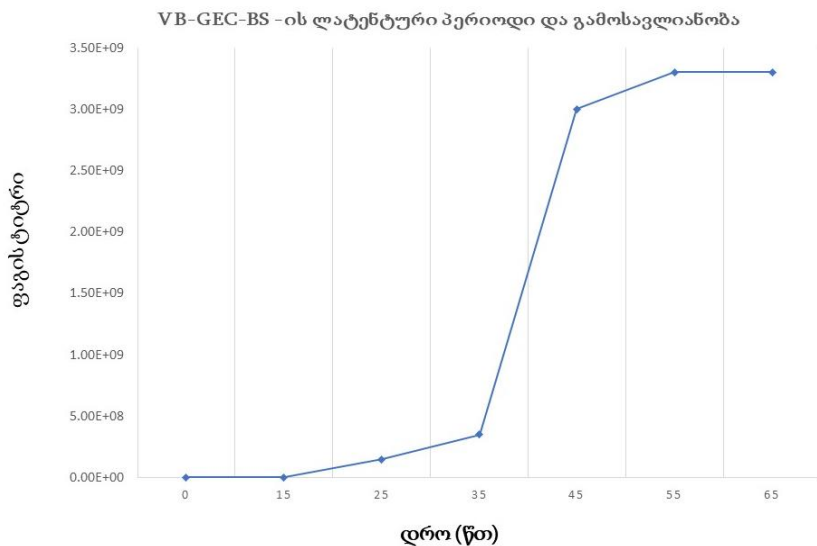
5.8. ფაგოთერაპიის ეფექტურობის შესწავლა ცხოველურ ინფექციურ მოდელებზე

ცხოველური ექსპერიმენტის ჩასატარებლად შერჩეული იყო შემდეგი ფაგები: vB-GEC-Bs (Myoviridae), vB-GEC-Hi (Siphoviridae) და vB-GEC-Tr (Podoviridae). ამ ფაგების შერჩევის ერთ-ერთი კრიტერიუმი იყო მორფოლოგიური თავისებურებები. სამივე ფაგი სხვადასხვა მორფოტიპს (Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae) წარმოადგენს. ცხოველური ექსპერიმენტის დაწყებამდე, მოხდა ცდისთვის შერჩეული ფაგების პატრონ უჯრედზე ერთჯერადი გამრავლების ციკლის - მასპინძელ უჯრედზე ადსორბციის პარამეტრების, ბაქტერიულ უჯრედში ფაგის გამრავლების ლატენტური პერიოდისა და გამოსავლიანობის განსაზღვრა. ადსორბციის მაჩვენებლის განსაზღვრა მოხდა კროპინსკის მიერ აღწერილი მეთოდით (M. Clokie & Kropinski, 2009).

გრაფიკი 1.



გრაფიკი 2.

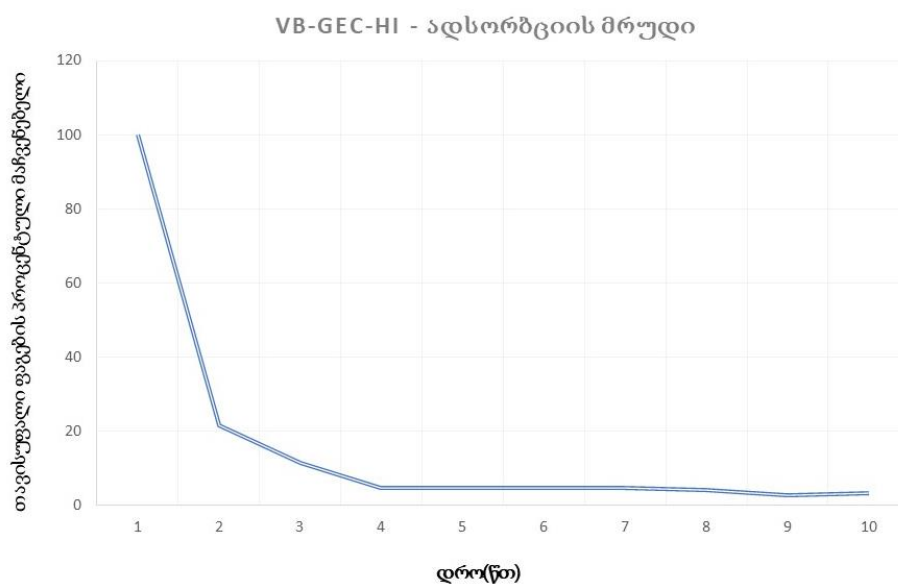


როგორც გრაფიკი 1 გვიჩვენებს, ფაგი vB-GEC-Bs - ის ფაგური ნაწილაკების 70 %-ის ადსორბირება პირველ 3 წუთში ხდება, ხოლო 5 წუთის შემდეგ ფაგების 97% უკვე ადსორბირებულია. ფაგის ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა 40 წუთია, რის შემდეგაც იწყება ე.წ. გამრავლების აღმასვლის ფაზა (Rise phase), რასაც მოსდევს პლატო. აღნიშნული ფაგი მაღალი გამოსავლიანობით ხასიათდება, რაც შეადგენს 220 ± 20 ფაგურ 145

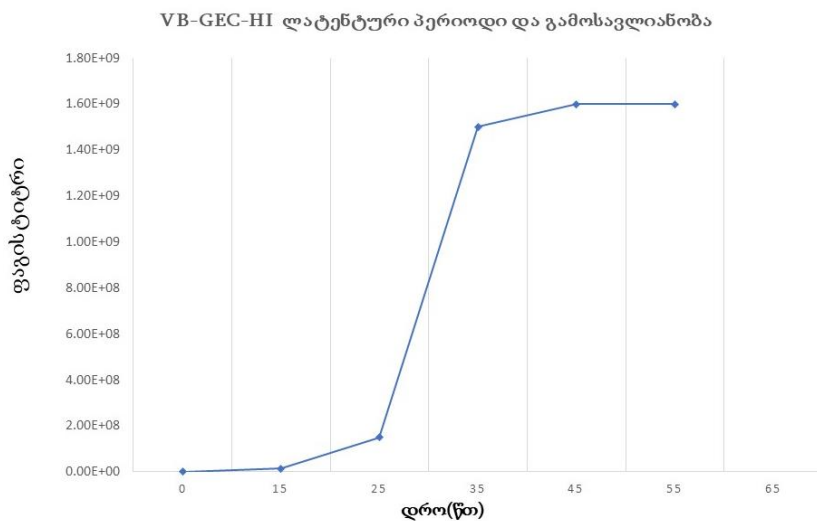
ნაწილაკს, ერთ ინფიცირებულ უჯრედზე. როგორც ცნობილია, ვირულენტური ფაგების ადსორბცია სწრაფად ხორციელდება, ხოლო გამოსავლიანობა ერთ უჯრედზე საშუალოდ 200-300-ს უდრის. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგი კიდევ ერთხელ ადასტურებს vB-GEC-BS ფაგის ვირლენტურ ბუნებას.

vB-GEC- HI - ის ფაგური ნაწილაკების 79% ადსორბირდა 2 წუთში განხორციელდა , 3 წუთში - 89 %, ხოლო 96% ადსორბირდება 4 წუთში მოხდა.

გრაფიკი 3.



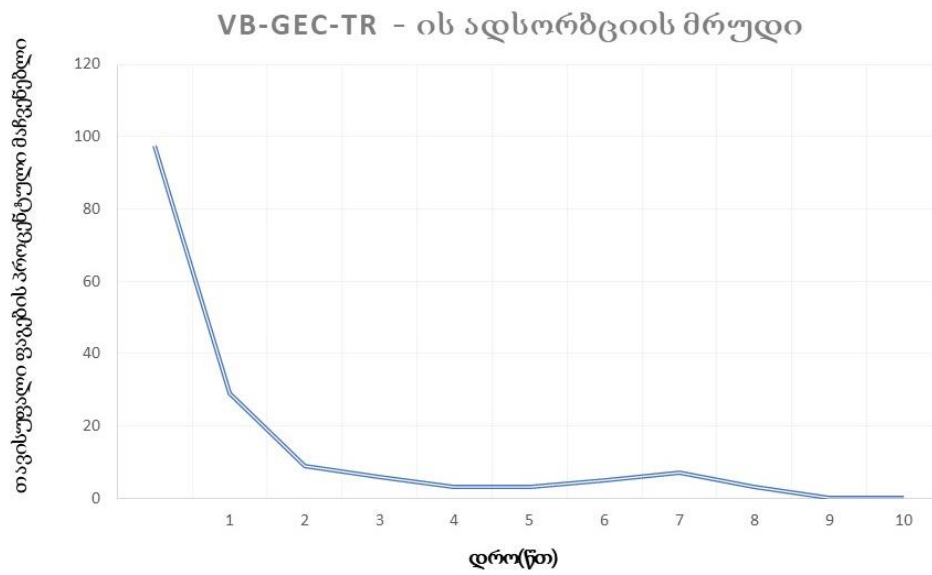
გრაფიკი 4.



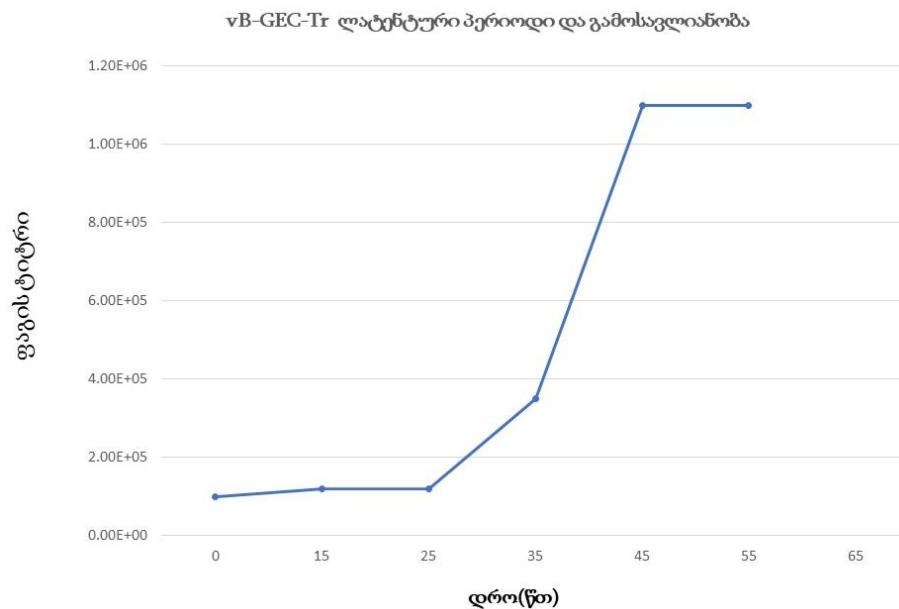
სწრაფ ადსორბციას მოსდევს დაახლოებით 30 წუთიანი ლატენტური პერიოდი, შემდეგ ხანმოკლე გამრავლების აღმასვლის ფაზა და აღნიშნული ფაგის გამოსავლიანობა პატრონი ბაქტერიული შტამის ერთ უჯრედზე, შეადგენს 155 ± 20 ფაგურ ნაწილაკს, რაც ასევე ვირულენტური ფაგებისათვის დამახასიათებელ ნიშნებს შეეფარდება.

vB-GEC-Tr- ის შემთხვევაში 2 წუთში ადსორბირდება ფაგური ნაწილაკების 71%, ხოლო 4 წუთში - 97 %.

გრაფიკი 5



გრაფიკი 6.



ამ ფაგის ლატენტური პერიოდი 25 წუთს გრძელდება. მისი გამოსავლიანობა კი შედარებით დაბალია შეადგენს 90 ფაგურ ნაწილაკს პატრონი შტამის ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე, რაც კიდევ ერთხელ მიუთითებს ამ ფაგის ზომიერ ბუნებაზე ანუ მის მიერ შტამის ლიზოგენიზაციის უნარზე.

ამის შემდგომ ჩვენ შევეცადეთ შეგვექმნა ცხოველური ინფექციური მოდელი.

5.8.1. ცხოველური მოდელის შექმნა

ცხოველური ექსპერიმენტისათვის გამოყენებულ იქნა ზრდასრული თაგვები (albino *Mus musculus*), წონით (18-20გრ). სულ გამოვიყენეთ 30 თაგვი, 10 - წინასწარი კვლევისათვის, რაც გულისხმობდა ინფიცირებისა და მკურნალობის დოზების შერჩევას, ხოლო 20 - უშუალოდ სამოდელო ცდისათვის.

ინფექციური მოდელისათვის ბაქტერიული შტამის შერჩევა მოხდა საქართველოში გამოყოფილი, სამი მულტირეზისტენტული შტამიდან ანუ მოდელის პოტენციურ აგენტებად განიხილებოდა შტამები - *S. Typhimurium 1150*, *S. Typhimurium 311* და *S. Enteritidis 104*. აღნიშნული შტამების მიმართ სკრინინგის მეთოდით, შემოწმდა კვლევაში გამოყენებული ყველა ბაქტერიოფაგი. 13 -დან მხოლოდ სამი ფაგი, კერძოდ კი

vB-GEC-BS, vB-GEC-Tr და vB-GEC-Hi წარმოქმნიდა სუფთა ლიზისურ ზონებს შტამზე *S. Enteritidis* 104 - ზე, შესაბამისად ინფექციური მოდელისათვის შეირჩა სწორედ ეს კომბინაცია- *S. Enteritidis* 104 და vB-GEC-BS, vB-GEC-Tr და vB-GEC-Hi.

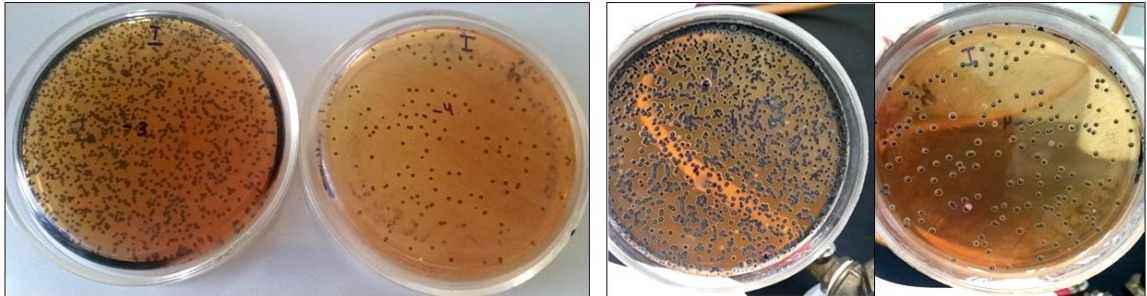
ინფიცირების მეთოდად შემუშავებულ იქნა ე.წ. საკვები ჟელატინის კუბების მეთოდი. აღნიშნული მეთოდი საშუალებას იძლევა უცვლელად იქნეს შენარჩუნებული როგორც პათოგენის, ისე ფაგის ტიტრი, ჟელატინის საკვებად მიწოდება თავგებისათვის არავითარ სირთულეს არ ქმნის, არ ვლინდება არავითარი მავნე გვერდითი ეფექტი.

რადგან ადამიანებში სალმონელოზის გამომწვევი ინფექციის დოზაა 10^6 კწე/მლ, ამ მონაცემიდან გამომდინარე, თავგებისათვის ინფექციის დოზის დასადგენად, ჩატარდა წინასწარი ექსპერიმენტები, რომლის მიზანი იყო საინფექციო და სამკურნალო დოზების შერჩევა. ამისთვის 10 *Albino Mus musculus* თავგი, წონით 18-20გ 2 ჯგუფად გავყავით, თითოეულში 5-5 ინდივიდი იყო გაერთიანებული. პირველი ჯგუფი ჟელატინის კონტროლს წარმოადგენდა და იღებდა ჟელატინის სხვადასხვა დოზას გახსნილ სტერილურ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და შემდგომ გამყარებულს კუბების სახით. მეორე ჯგუფის თავგები გამოყენებული იყვნენ ინფექციის და ბაქტერიოფაგის თერაპიული დოზის დადგენისათვის და იღებდნენ ფიზიოლოგიურ ხსნარში გახსნილ ჟელატინს, რომელსაც სხვადასხვა რაოდენობით ემატებოდა ინფექციის გამომწვევი - *S. Enteritidis* 104 ტიტრით 10^8 კწე/მლ და/ან ბაქტერიოფაგი ტიტრით 10^7 ნკწე/მლ - თერაპიული ტიტრი, რომელიც ჩვეულებრივად გამოიყენება ბაქტერიოფაგების კომერციულ პრეპარატებში.

თავგებს ეძლეოდათ ჟელატინის კუბების სხვადასხვა კომბინაციები (250 μ L ჟელატინი + 250 μ L ბაქტერია, 150 μ L ჟელატინი + 300 μ L ბაქტერია, 350 μ L ჟელატინს +500 μ L ბაქტერია; იგივე კომბინაციები იცადა ჟელატინი+ბაქტერიოფაგისა და ჟელატინი + სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარის ვარიანტებისთვისაც) დღეში ორჯერ ინტერვალით 6-12 სთ. განავლის სინჯების აღება იმავე სიხშირით ხორციელდებოდა, საკვების მიღების თანადროულად. განავლის სინჯებში სალმონელას ტიტრის დადგენა

ხდებოდა 1 გ მყარი მასის 9 მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში სუსპენდირებით და მიღებული სუსპენზიის შემდგომი განზავებით $1 \cdot 10^{-6}$ მდე. განზავებული სუსპენზიის 1 მლ გადაიტანებოდა SS აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნებზე და თანაბრად ნაწილდებოდა მის ზედაპირზე. შედეგების აღრიცხვა ხდებოდა 37°C -ზე 18 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ.

სურათი 63.

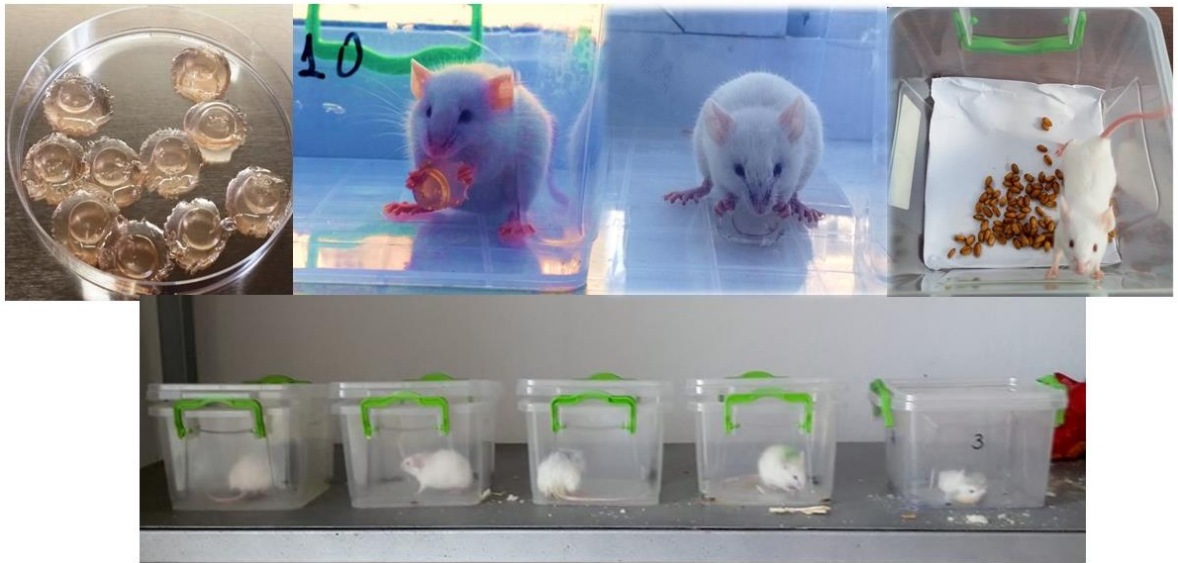


ჟელატინის სხვადასხვა მოცულობის კუბების მიღებისას თავგების სასიცოცხლო მაჩვენებლები უცვლელი რჩებოდა. შესაბამისად, დადგინდა, რომ ჟელატინის მიღება უვნებელი იყო თავგებისთვის, ხოლო $350 \mu\text{L}$ ჟელატინს $+500 \mu\text{L}$ ბაქტერიოფაგების ნარევის (ტიტრით 10^7 კწე/მლ) მიღება ასევე უვნებელი აღმოჩნდა ექსპერიმენტული ცხოველებისათვის. ბაქტერიოფაგის ტიტრი თავის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში გასვლის შემდეგაც უცვლელი რჩებოდა. არასასურველი გვერდითი მოვლენები არ დაფიქსირებულა.

სამოდელო ინფექციისთვის შემუშავდა შემდეგი დოზები: $350 \mu\text{L}$ ჟელატინს $+ 500 \mu\text{L}$ ბაქტერია *S. Enteritidis 104* (ტიტრით $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ); $350 \mu\text{L}$ ჟელატინს $+ 500 \mu\text{L}$ ბაქტერიოფაგების ნარევი - vB-GEC-BS, vB-GEC-Tr და vB-GEC-Hi, თანაფარდობით 1:1:1, ტიტრით $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ. და $350 \mu\text{L}$ ჟელატინს $+ 500 \mu\text{L}$ სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარი.

ჩვენს მიერ შემუშავებული ინფექციის გამომწვევი დოზის - $350 \mu\text{L}$ ჟელატინს $+500 \mu\text{L}$ *S. Enteritidis 104* ტიტრით $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ, მიღებიდან 2 დღის შემდეგ თავგებს უვლინდებოდათ დაავადების ნიშნები, როგორცაა უმადობა, წონაში კლება, აქტივობის დაქვეითება, ბეწვის ბზინვარების კარგვა.

სურათი 64.



უშუალოდ სამოდელო ცდის მსვლელობისას, როგორც ექსპერიმენტული, ისე საკონტროლო ჯგუფებისათვის, საჭირო ულუფების მიცემა ხდებოდა ყოველ 6-12 საათში ერთხელ, 2 დღის მანძილზე. სწორედ 2 დღის შემდეგ იწყებდა გამოვლენას ინფექციის გარეგნული ნიშნები - წონაში კლება, აქტივობის დაქვეითება. ექსპერიმენტის დაწყებიდან მის დასრულებამდე, ყოველდღიურად ხდებოდა ფეკალური მასალის აღება და მათში ბაქტერიის ტიტრის აღრიცხვა. ფეკალური მასალის ნიმუშების აღება ხდებოდა ფაგით თერაპიის დაწყების შემდეგაც.

ფაგის ტიტრის განსაზღვრა ხდებოდა თანმიმდევრული განზავებით და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. ინფექციის განვითარების შემდეგ, ექსპერიმენტული ჯგუფის თავგებს ეძლეოდათ ფაგის შემცველი ჟელატინის კუბები, ყოველ 6-12 საათში, 4 დღის მანძილზე. ფაგის პოზიტიური კონტროლის ჯგუფის თავგებს, პარალელურ რეჟიმში ეძლეოდათ მხოლოდ ფაგის შემცველი ჟელატინის კუბები. ბაქტერიის პოზიტიური კონტროლის ჯგუფის თავგებს ეძლეოდათ მხოლოდ ბაქტერიის შემცველი ჟელატინის კუბები, ხოლო უარყოფითი კონტროლის ჯგუფის ვირთავგებს ეძლეოდათ სტერილური ჟელატინის კუბები. ინფექციის განვითარებისა და მკურნალობის ეფექტის მონიტორინგი მიმდინარეობდა ფეკალური მასების ნიმუშების მოპოვებითა და სერიული განზავებების ანალიზით. სერიული განზავებისათვის, თითოეული ჯგუფის

თავგებისგან აღებული, 1გრ ფეკალური მასის ნიმუშის გატიტვრა მიმდინარეობდა ზემოთ აღწერილი მეთოდის მიხედვით.

სამოდელო ცდისთვის გამოყენებული იყო 20 თავვი წონით 18-20გ, რომელიც გადანაწილდა 4 ჯგუფში, თითოეულში 5-5- ინდივიდით.

ჯგუფი I - ინფექციური მოდელის ჯგუფი. (ექსპერიმენტული ჯგუფი) (500მკლ ბაქტერია, ტიტრით - $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ).

ჯგუფი II – ბაქტერიის დადებითი კონტროლი ანუ ინფექციის კონტროლი (500მკლ ბაქტერია, ტიტრით - $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ).

ჯგუფი III - ბაქტერიოფაგის დადებითი კონტროლი (ფაგების ნარევის ტიტრის სტაბილურობის კონტროლი)(ფაგების ნარევი თანაფარდობით 1:1:1, ტიტრით - $1 \cdot 10^8$ კწე/მლ.)

ჯგუფი IV - უარყოფითი კონტროლი ანუ პლაცებოს ჯგუფი (სტერილური, ფიზ. ხსნარში გახსნილი ქელატინის კუბები).

ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე-3 დღეს ანუ *Salmonella*-ს დოზების 4-ჯერადი ადმინისტრირების შემდეგ თავგებში ხდებოდა ინფექციის სიმპტომების გამოვლენა. ამის შემდეგ პირველი ჯგუფის თავგებს ეძლეოდათ ფაგების ნარევის (თანაფარდობით 1:1:1) შემცველი ქელატინის კუბები (350 მკლ ქელატინი+500 მკლ ფაგების ნარევი ტიტრით $1 \cdot 10^7$ კწე/მლ). მეორე ჯგუფის (II) თავგები, რომლებსაც ინფექციის იგივე გამოვლინებები ქონდათ, იგივე რეჟიმით და დოზით აგრძელებდნენ ინფექციის გამომწვევის მიღებას.

მესამე ჯგუფის (III) თავგები იგივე რეჟიმში იღებდნენ ბაქტერიოფაგის შემცველ ქელატინის კუბებს, ხოლო მეოთხე (IV) ჯგუფის თავგები, როგორც უკვე აღინიშნა უარყოფითი კონტროლისთვის იყვნენ გამოყენებული და მათაც იგივე რეჟიმში ეძლეოდათ პლაცებო ანუ სტერილური ქელატინის კუბები (350 მკლ ქელატინი + 500 მკლ სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარი).

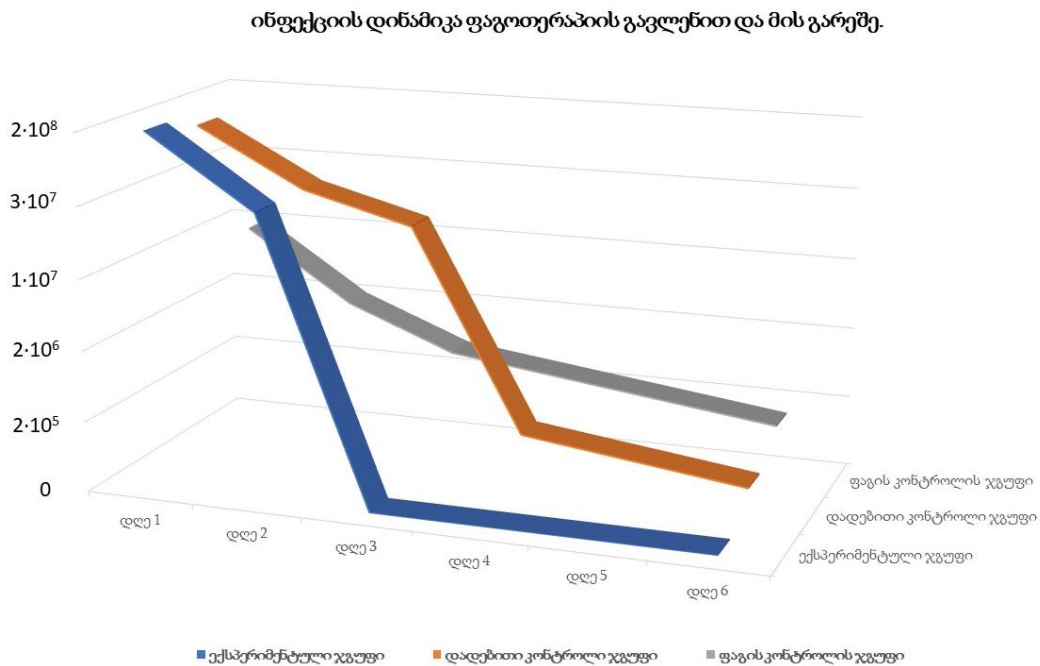
მიღებული შედეგები დაჯამებული სახით მოცემულია ცხრილში N4 და ინფექციის დინამიკა გამოხატულია გრაფიკზე 7.

ცხრილი N 4 ცხოველური ექსპერიმენტის შედეგები

| I – ექსპერიმენტული ჯგუფი | | II – დადებითი კონტროლის ჯგუფი (ინფექციის განვითარება ფაგოთერაპიის გარეშე) | | III - ბაქტერიოფაგის კონტროლის ჯგუფი | IV - პლაცებო - უარყოფითი კონტროლის ჯგუფი |
|--|--|---|--|---|--|
| შედეგები მიღებული Salmonella-თი ინფიცირების დაწყებიდან 2 დღის განმავლობაში (ინფექციის დოზის 4-ჯერადი აღმინისტრირების განმავლობაში) | | | | | |
| 350 მკლ ჟელატინი +500 მკლ <i>S. Enteritidis 104</i> ტიტრით 1×10^9 კწე/მლ | <i>S. Enteritidis 104</i> ტიტრი განავლის ნიმუშებში ინფიცირების დაწყებიდან მომდევნო პერიოდში | 350 მკლ ჟელატინი +500მკლ <i>S. Enteritidis</i> <i>104</i> 1×10^9 უკწე/მლ | <i>S. Enteritidis 104</i> საშუალო ტიტრი განავლის ნიმუშებში ინფიცირების დაწყებიდან მომდევნო პერიოდში | ფაგების ნარევის ტიტრის კონტროლი | სტერილური ჟელატინის კუბები |
| 1 | დღე 1, დილა, ინფექციის დოზა 1 | $2,5 \cdot 10^8$ კწე/მლ | 1 | დღე 1, დილა, ინფექციის დოზა 1 | $2,5 \cdot 10^7$ კწე/მლ |
| 2 | დღე 1, სალამო, ინფექციის დოზა 2 | $5 \cdot 10^8$ კწე/მლ | 2 | დღე 1, სალამო, ინფექციის დოზა 2 | $2,5 \cdot 10^7$ კწე/მლ |
| 3 | დღე 2, დილა, ინფექციის დოზა 3 | $2 \cdot 10^6$ კწე/მლ | 3 | დღე 2, დილა, ინფექციის დოზა 3 | $2,5 \cdot 10^7$ კწე/მლ |
| 4 | დღე 2, სალამო, ინფექციის დოზა 4 | $2 \cdot 10^7$ კწე/მლ | 4 | დღე 2, სალამო, ინფექციის დოზა 4 | $2,5 \cdot 10^7$ კწე/მლ |
| შედეგები ფაგოთერაპიის დაწყების შემდეგ | | | | | |
| ექსპერიმენტული ჯგუფი | | II – დადებითი კონტროლის ჯგუფი (ინფექციის განვითარება ფაგოთერაპიის გარეშე) | | $1 \cdot 10^7$ ნკწე/მლ - $1 \cdot 10^5$ ნკწე/მლ | ცვლილებები არ არის დაფიქსირებული |
| | | | | | |

| ადმინისტრირება | 350 მკლ ჟელატინი +500 მკლ ფაგების ნარევი ($1 \cdot 10^8$ კწე/მლ) | ბაქტერიის გასაშუალოებული ტიტრი ფაგოთერაპიის დაწყების შემდეგ | ფაგის გასაშუა ლოებული ო ტიტრი ფაგოთერ აპიის დაწყების შემდეგ | ადმინისტრირება | <i>S. Enteritidis</i> 104 საშუალო ტიტრი ნიმუშებში დაწყებიდან პერიოდში | განავლის ინფიცირების მომდევნო |
|----------------|--|---|--|----------------|---|-------------------------------------|
| 1 | დღე 3, დილა, ფაგის დოზა 1 | $2 \cdot 10^3$ კწე/მლ | $1 \cdot 10^7$ ნკწე/მლ | 5 | $1,6 \cdot 10^5$ კწე/მლ | |
| 2 | დღე 3, საღამო, ფაგის დოზა 2 | $2 \cdot 10^3$ კწე/მლ | $2,1 \cdot 10^7$ ნკწე/მლ | 6 | $1 \cdot 10^3$ კწე/მლ | |
| 3 | დღე 4, დილა, ფაგის დოზა 3 | 0 | $2,4 \cdot 10^5$ ნკწე/მლ | 7 | $1 \cdot 10^4$ კწე/მლ | |
| 4 | დღე 4, საღამო, ფაგის დოზა 4 | 0 | $1 \cdot 10^5$ ნკწე/მლ | 8 | $1 \cdot 10^3$ კწე/მლ | |
| 5 | დღე 5, დილა, ფაგის დოზა 5 | 0 | $4,5 \cdot 10^6$ ნკწე/მლ | 9 | $1 \cdot 10^4$ კწე/მლ | |
| 6 | დღე 5, საღამო, ფაგის დოზა 6 | 0 | $1 \cdot 10^6$ ნკწე/მლ | 10 | $1 \cdot 10^4$ კწე/მლ | |
| 7 | დღე 6, დილა, ფაგის დოზა 7 | 0 | $6 \cdot 10^6$ ნკწე/მლ | 11 | $1 \cdot 10^3$ კწე/მლ | |

გრაფიკი 7.



შენიშვნა: ამ გრაფიკზე გამოსახულია ბაქტერიისა და ფაგის ტიტრების ცვლილებები ფაგოთერაპიის დაწყების დღიდან.

როგორც ცხრილიდან N4 და მე 7 -გრაფიკიდან ჩანს, საექსპერიმენტო ჯგუფში (I) ფაგების ნარევის პირველივე ულუფის მიღების შემდეგ დაფიქსირდა *S. Enteritidis* 104 - ის მკვეთრი კლება ანუ ბაქტერიის ტიტრმა 6 ლოგარითმით იკლო და ეს კლება ექსპერიმენტის ბოლომდე სტაბილურად შენარჩუნდა. (იხ.გრაფიკი 7.). ინფექციის სიმპტომები ფაგებით თერაპიის დაწყებიდან მეორე დღეს უკვე არ შეინიშნებოდა. ამავდროულად ნარჩუნდებოდა ფაგების ნარევის ტიტრი როგორც ექსპერიმენტულ, ისე ფაგის კონტროლის ჯგუფებში და იგი უტოლდებოდა $-1 \cdot 10^7 - 10^5$ ნკწე/მლ-ს.

მეორე (II) ჯგუფის ანუ ინფექციის დადებითი კონტროლის თავგებზე დაკვირვება სულ 10 დღე გაგრძელდა, მათში შენარჩუნდა ინფექციის სიმპტომები და ამავ ე ინფექციით ისინი თანდათან კვდებოდნენ. პირველი (I) ჯგუფის თავგები კი პირველი 2 დღე ინფექციის დოზებს იღებდნენ, შემდეგ 4 დღის განმავლობაში კი ფაგების თერაპიულ დოზებს და ყველა ცოცხალი გადარჩა.

შესაბამისად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ აღნიშნულ *in vivo* ექსპერიმენტში გამოყენებულმა ფაგების ნარევი სერიოზული პოტენციური აჩვენა მრავლობითად-რეზისტენტული *Salmonella* - თი გამოწვეული ინფექციების მკურნალობისათვის.

დისკუსია/ინტერპრეტაცია

ფართო სპექტრის მქონე, ეფექტური ფაგების მისაღებად აუცილებელი პირობაა შტამების მრავალფეროვანი კოლექციის ქონა, რომელთა გამოყენებითაც უნდა განხორციელდეს ფაგების გამოყოფა, მათი აქტივობის დადასტურება, გამრავლება და საჭიროებისამებრ მოქმედების ეფექტის გაძლიერება.

სამუშაოს პირველ ეტაპზე ჩვენს მიერ შეგროვილი და შესწავლილი იყო 345 *Salmonella* spp შტამი, რომელიც გამოყოფილი იყო საქართველოში (25) და სომხეთში (77). და ტაჯიკეთში (14), შტამების ნაწილი მიღებულ იქნა სხვადასხვა ქვეყნიდან: ირლანდია (147), სამხრეთ კორეა (81), და კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში *S.Typhi* აფეთქების დროს გამოყოფილი, ESBL- (extended spectrum beta-lactamase - ფართო სპექტრის β -ლაქტამაზა) მაპროდუცირებელი 1 შტამი- CTX-M-15, რომელიც მოგვაწოდა ტროპიკული მედიცინის ინსტიტუტმა, ანტვერპენიდან, ბელგია (Institute of Tropical Medicine (Antwerp, Belgium)).

შემდეგ ეტაპზე შტამების დაზუსტებული იდენტიფიცირებისათვის გამოყენებული იქნა როგორც ტრადიციული ბაქტერიოლოგიური მეთოდები, ისე თანამედროვე ტექნოლოგიები, როგორცაა MALDI-TOF მას-სპექტრომეტრია, რომლის საშუალებითაც მიღებული უნიკალური სპექტრალური ანაბეჭდებით განხორციელდა შტამების პროფილირება. საინტერესოა ის ფაქტი, რომ ბაქტერიოლოგიური მეთოდით განხორციელებული იდენტიფიკაციის შედეგები მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა მაღალი ტექნოლოგიების გამოყენებით მიღებული შედეგებისაგან. ასე, მაგალითად, ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ MALDI-TOF -ით შესწავლილი 150-ზე მეტი შტამიდან მხოლოდ 25 იზოლატი (14 ტაჯიკეთიდან, 5 საქართველოდან და 6 სომხეთიდან) არ მიეკუთვნებოდა *Salmonella* - ს გვარს. ისინი მიეკუთვნებოდნენ

სახეობებს: *Escherichia coli* (9), *Hafnia alvey* (5), *Morganella morganii* (4), *Enterobacter cobay* (1), *Enterobacter ludwigi* (1), *Comamonas kerstersii* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Citrobacter braakii* (2), *Proteus vulgaris* (1). შესაბამისად, აღნიშნული იზოლატები აღარ იქნა გამოყენებული შემდგომი სამუშაოებისათვის.

Salmonella –ს იზოლატების სეროტიპირება ტარდებოდა ე.წ. ვაიტ-კაუფმანის სქემის (White-Kauffmann-Le Minor scheme) მიხედვით. *Salmonella* -ს იზოლატების სეროტიპების განსაზღვრა ფლაგელის (H) ანტიგენისა და ლიპოპოლისაქარიდული (O) ანტიგენის მიხედვით, მოხდა პოლივალენტური შრატის გამოყენებით (Grimont, PAD. Weill, 2007). .

განხორციელდა საქართველოსა (20) და სომხეთში (71) გამოყოფილი შტამების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის შესწავლა. კვლევამ აჩვენა, რომ საქართველოში მოპოვებული 20 შტამიდან მხოლოდ 3 კლინიკურ კულტურას აღმოაჩნდა მრავლობითად ანტიბიოტიკორეზისტენტული გენოტიპი, ამ შტამებიდან 2 მიეკუთვნება *S. Typhimurium* (ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილით AAu*NcmSu და AAu*SmT/S), ერთი - *S. Enteritidis* (AAu*CxSu) და ერთი *S. Agona* (AAzCip*NTc) სეროტიპებს.

სომხეთში გამოყოფილი კლინიკური იზოლატების 74.64% მულტირეზისტენტული აღმოჩნდა ანტიბიოტიკების მიმართ, აქედან 49 მიეკუთვნებოდა *S. Typhimurium*, 5 - *S. Enteritidis*, 2 - *S. Derby*, 1 - *S. Kentucky*, და 1 *S. Newport*. მულტირეზისტენტულად ითვლება შტამი, თუ ის 3-ზე მეტი ანტიბიოტიკის კლასის მიმართ არის რეზისტენტული. სულ გამოვლინდა 40 ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილი, საიდანაც 35 კლინიკური შტამებისთვის იყო დამახასიათებელი.

ანტიბიოტიკორეზისტენტობის განსხვავებული პროფილების არსებობა საქართველოსა და სომხეთში შესაძლებელია განპირობებული იყოს ამ ქვეყნებში მოქმედი რეგულაციებით და კლინიკური სტანდარტებით, რომლის მიხედვითაც ინფექციური დაავადების სამკურნალოდ ინიშნება ანტიბიოტიკების ესა თუ ის კომბინაცია, რომელიც სელექტიურ ფონს ქმნის შესაბამისი პლაზმიდებისა თუ ქრომოსომული გენების პოპულაციაში გავრცელებისა და დომინირებისათვის.

ამ ვრცელი და მრავალფეროვანი კოლექციიდან ბაქტერიოფაგების პატრონი შტამების შერჩევა განხორციელდა დათესვის ეფექტურობის ტესტის (Azeredo et al., 2018) შედეგების საფუძველზე. გარდა ამისა, კანდიდატი პატრონი შტამები შემოწმდა მათში პროფაგების არსებობაზე. ზომიერი ფაგების ე.წ. სპონტანური ინდუცირებისთვის გამოყენებული იყო მოდიფიცირებული „ფისკას“ მეთოდი (Roy T. Fisk, 1942). ვინაიდან პროფაგების სპონტანური ინდუქცია არც ერთი შტამის შემთხვევაში არ დაფიქსირებულა, აღნიშნული შტამები შეირჩა მოცემული ფაგების პატრონი ანუ მასპინძელ შტამებად. შემდგომში მოხდა პატრონი შტამების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შესწავლა (სექვენსი) და მათ გენომებში პროფაგების არსებობის დადგენა PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) და PHASTER (<https://phaster.ca/>)(Zhou et al., 2011) პროგრამების გამოყენებით.

სულ შერჩეულ იქნა 8 შტამი, მათგან 3 შტამი ე.წ. ვეტერინარული შტამების კოლექციიდანაა (*Salmonella enterica* Enteritidis 3, *Salmonella enterica* Typhimurium 4, *Salmonella enterica* Typhimurium 6), ხოლო დანარჩენი 5 შტამი კლინიკურ შტამებს განეკუთვნება (*Salmonella enterica* Enteritidis 232, *Salmonella enterica* 407, *Salmonella enterica* 641, *Salmonella enterica* Enteritidis 765, *Salmonella enterica* 1328). ყველა შერჩეულ შტამში დადგენილ იქნა ინტაქტური (intact prophage), არასრული (incomplete) და ან სავარაუდო (presumable) პროფაგების სხვადასხვა კომბინაციების არსებობა. ზოგადად, შტამები შეიცავდნენ 2-დან 10 პროფაგამდე. გამონაკლისს წარმოადგენდა მხოლოდ ერთი შტამი *Salmonella enterica* Typhimurium 6, რომელშიც არც ერთი პროფაგი არ იქნა ნანახი.

ბაქტერიოფაგების გამოყოფა განხორციელდა ე.წ. გამდიდრების მეთოდით, გარემოს ნიმუშებიდან, რომლებიც მოპოვებული იყო თბილისში (ჩამდინარე და მტკვრის წყლები), ბათუმში (შავი ზღვის წყალი) და უმი რძიდან. ჩვენს მიერ სამუშაოს განმავლობაში გამოყოფილი და შესწავლილი იყო 13 ბაქტერიოფაგი, რომელთაგანაც Siphoviridae ოჯახს მიეკუთვნება 6 ფაგური კლონი: - vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5 და vB_GEC_Hi; Myoviridae ოჯახს მიეკუთვნება 6

კლონი: **vB_GEC_BS**, **vB_GEC_MG**, **vB_GEC_B1**, **vB_GEC_B3**, **vB_GEC_NS7**, და **vB_GEC_7A**, ხოლო Podoviridae-ს ოჯახს მხოლოდ ერთი ფაგი - **vB_GEC_TR**.

თითოეული ფაგი შესწავლილი იყო მორფოლოგიური (ნეგატიური კოლონიის და ვირიონის სტრუქტურა), ბიოლოგიური (პატრონი ბაქტერიების სპექტრის, ტემპერატურისა და pH-ის მიმართ მდგრადობის მიხედვით) და გენეტიკური ნიშნების მიხედვით. გენეტიკური თვალსაზრისით განსაკუთრებული ყურადღება დაეთმო იმ გენების გამოვლენას, რომლებიც ფაგების ლიზოგენურ ბუნებაზე მიუთითებდნენ და რომელთა არ ქონა ადასტურებდა ფაგის ვირულენტურ ბუნებას. როგორც მეთოდოლოგიურ ნაწილში აღინიშნა, გენეტიკური შესწავლა განხორციელდა ფაგების გენომის სექვენსისათვის გამოყენებულ იქნა ე.წ. „მომდევნო“ თაობის სეკვენირების მეთოდი (Next generation sequencing technologies) (Klumpp, Fouts, & Sozhamannan, 2012). ფაგების ნაწილის სექვენსი განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით (Next generation sequencing technologies), ხოლო ფაგების მეორე ნაწილი დასექვენირდა - ნანოპორული სეკვენირების (nanopore sequencing) ტექნოლოგიის, MinION მოწყობილობის გამოყენებით (MinION device, equipped with an R9.4 flowcell);

ამგვარად, პირველ ჯგუფში შემავალი ფაგების შესწავლა განხორციელდა MiniSeq Illumina ტექნოლოგიის გამოყენებით, აღნიშნული ფაგებია: Myoviridae-ს 5 წარმომადგენელი - **vB_GEC_Mg**, **vB_GEC_Bs** და **vB_GEC_B1**, **vB_GEC_B3**, **vB_GEC_NS7** და Siphovoridae -ს ოჯახში გაერთიანებული ფაგი - **vB_GEC_N5**.

მეორე ჯგუფს წარმოადგენენ ფაგები, რომელთა გენეტიკური შესწავლა განხორციელდა ნანოპორული სეკვენირების (MinION-ის) გამოყენებით. ამ ჯგუფში შევიდა Siphovoridae მორფოლოგიური ტიპის 4 ფაგი: **vB_GEC_N8**, **vB_GEC_M4**, **vB_GEC_M5**, **vB_GEC_Hi**; Myoviridae ოჯახის 1 წარმომადგენელი: **vB_GEC_7A** და Podoviridae ოჯახის ერთი წარმომადგენელი - **vB_GEC_TR**. ერთი ფაგის (**vB_GEC_N3**) სეკვენირება ტექნიკური მიზეზების გამო ვერ მოხერხდა.

ყველა დასექვენირებული ფაგის გენომის ანოტაცია ჩატარდა პროგრამების: - Artemis(<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>); Genemarks(<http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi>); Geneious (<https://www.geneious.com/>). Pfam -<https://pfam.xfam.org/>; ARAGORN - <http://130.235.244.92/ARAGORN/>; Trna scan - <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> გამოყენებით.

დადგინდა, რომ ფაგები - **vB-GEC-B1**, **vB_GEC_B3**, **vB-GEC-7A** და **vB-GEC_NS7**, რომლებიც *Felixounavirus* - ების წარმომადგენლები გახლავთ, მსგავსებას ავლენს ერთმანეთის მიმართ;

ერთ გვარში - *Jerseyvirus* -ებში ერთიანდებიან *Siphovoridae* -ეს ოჯახის წარმომადგენლები - **vB-GEC- Hi**, **vB-GEC- M4** და **vB-GEC- M5**.

ფაგები - **vB-GEC-N5** და **vB-GEC-N8** ერთიანდებიან გვარში -*Tequintavirus*.

კვლევაში გამოყენებული არც ერთი ფაგისა და არც ერთმანეთის მიმართ განსაკუთრებულ მსგავსებას არ იჩენენ და, შესაბამისად, გენეტიკურ ხეზე განცალკევებით განთავსდნენ ფაგები - **vB-GEC- TR** (ოჯახი - *Podoviridae*; გვარი - *Lederbergvirus*), **vB-GEC-MG** ოჯახი -*Myoviridae*, გვარი - *Tequatrovirus*) და **vB-GEC-BS** (ოჯახი -*Myoviridae*, გვარი - *Viunavirus*).

საინტერესოა ამ ფაგების მსგავსება სხვა ცნობილ ფაგებთან.

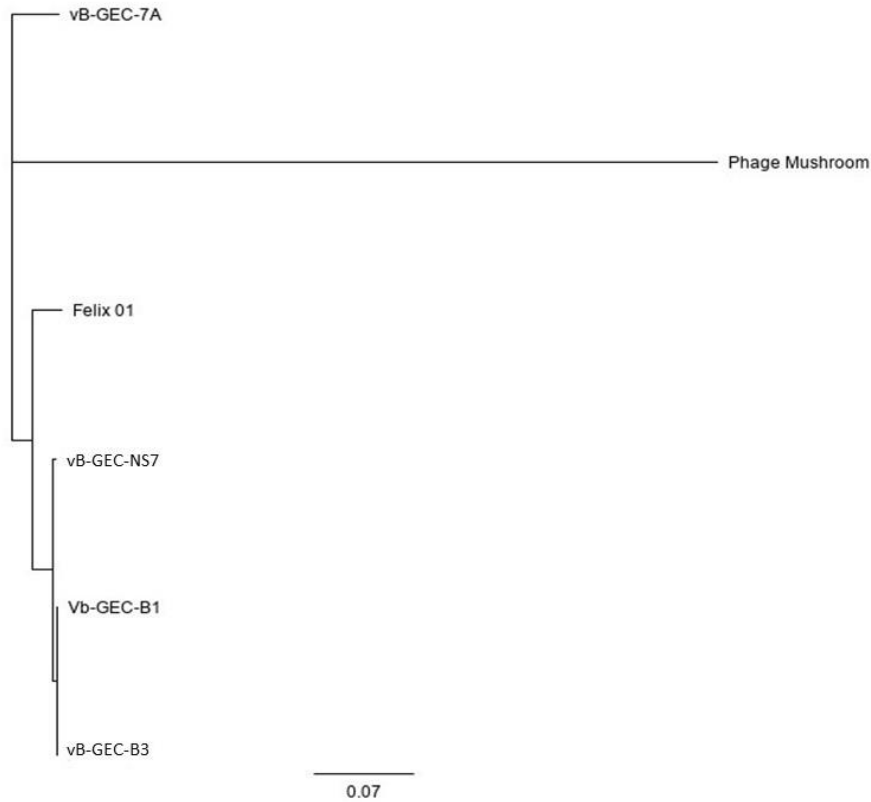
vB_GEC_Mg ვირულენტური ფაგია, მისი ცნობილი ჰომოლოგებიდან აღსანიშნავია **Shigella phage SHFML-11**(per ident: 98,94%), რომელიც ასევე ლიტიური ფაგია და რომელიც მისი ფართო სპექტრისა და მაღალი აქტივობის გამო შეტანილ იქნა ისეთი ფაგური პრეპარატის შემადგენლობაში, როგორცაა **ShigaShield™** (Soffer et al., 2017).

ფაგი **vB_GEC_Bs** ასევე ვირულენტურია, იგი ყველაზე მაღალ მსგავსებას ავლენს ისეთი ცნობილი ფაგების მიმართ, როგორებიცაა *Salmonella* სპეციფიკური ფაგები - **STML-13-1** (იდენტ: 98.83%), **Vi01** (იდენტ: 96.18%), *E.coli* სპეციფიკური ფაგები - **Escherichia phage PhaxI** (რომელიც ენტეროჰემორაგიული *E. coli* - ის - *Escherichia coli* O157 : H7-ის სპეციფიკური ფაგია (Shahrbabak et al., 2013))(იდენტ: 92,67%) და **PhiSH19** (იდენტ: 91.69%).

vB_GEC_B1 ვირულენტური ფაგია, მისი გენომის შედარებამ სხვა ცნობილ ფაგებთან, გამოავლინა, რომ ის მაღალ მსგავსებას იჩენს ისეთი ვირულენტური ფაგების მიმართ, როგორებიცაა **Bacteriophage Felix 01** (იდენტ: 98,21%) და **Salmonella phage Mushroom** (იდენტ: 98,36%). ხაზგასასმელია, რომ გვარი- *Felixounavirus* - ის წარმომადგენლები ცნობილი ვირულენტური ფაგებია, რომლებიც გამოირჩევიან თავიანთი აქტიურობით *enterobacteria* - ების სხვადასხვა ჯგუფების, მათ შორის *E. coli* - სა და *Salmonella spp.* - ის მიმართ. აღსანიშნავია, რომ **Salmonella phage Mushroom** - ი გ. ელიავას სახელობის ინსტიტუტის მიერ წარმოებული თერაპიული ფაგური პრეპარატის - ინტესტი ფაგის ერთერთ კომპონენტს წარმოადგენს (Tolen et al., 2016), რომლის მიმართაც მსგავსებას ავლენენ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგები **vB_GEC_B1**, **vB_GEC_B3**, **vB_GEC_NS7** და **vB_GEC_A7**, ოთხივე მათგანი ვირულენტური ფაგია და მაღალ მსგავსებას ავლენს ერთმანეთის მიმართ, თუმცა არცერთი მათგანი არ არის რომელიმე ჰომოლოგის იდენტური. უნდა აღინიშნოს ამ ფაგების მსგავსება *E.coli* - ის სპეციფიური ფაგების მიმართ, მათ შორის **Escherichia phage pinkbiff** (იდენტ: 95,41%), ასევე ხაზგასასმელია **Bacteriophage Felix 01** - ის (იდენტ: 97,12%) მიმართ მათი მაღალი მსგავსება. უნდა ითქვას, რომ **vB_GEC_B1**, ისევე როგორც **vB_GEC_MG**, **vB_GEC_B3** და **vB_GEC_BS** ლიტიურ აქტივობას ავლენს, როგორც *Salmonella* -ს, ისე *Shigella*- სა და *E.coli* - ს სხვადასხვა შტამების მიმართ.

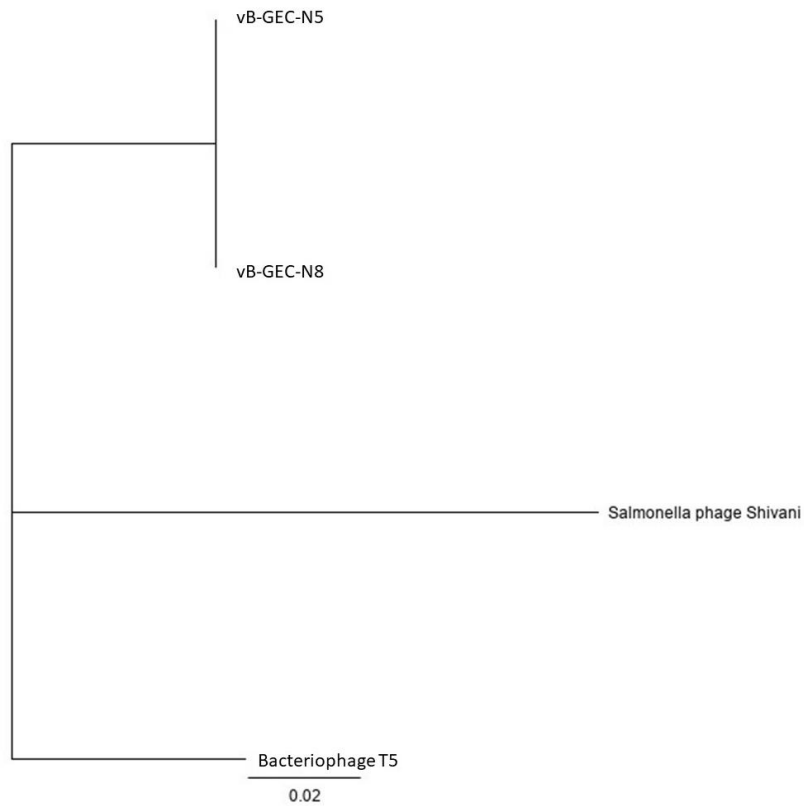
სურათი 65 გვიჩვენებს ზემოთ აღნიშნული, ჩვენს მიერ გამოყოფილ ოთხ ფაგსა და მათ ჰომოლოგიურ ფაგებს შორის არსებულ ნათესაურ კავშირს. აღნიშნული ფილოგენეტიკური ხეების ასაგებად გამოყენებულ იქნა ფაგების მთლიანი გენომები Fasta ფაილების სახით, პროცესი განხორციელდა პროგრამა Geneious (<https://www.geneious.com/>) -ის პროგრამული უზრუნველყოფით.

სურათი 65. vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, vB_GEC_NS7, vB_GEC_A7, Felix 01 - ს და Salmonella phage Mushroom - ს შორის ნათესაობის მაჩვენებელი ფილოგენეტიკური ხე.



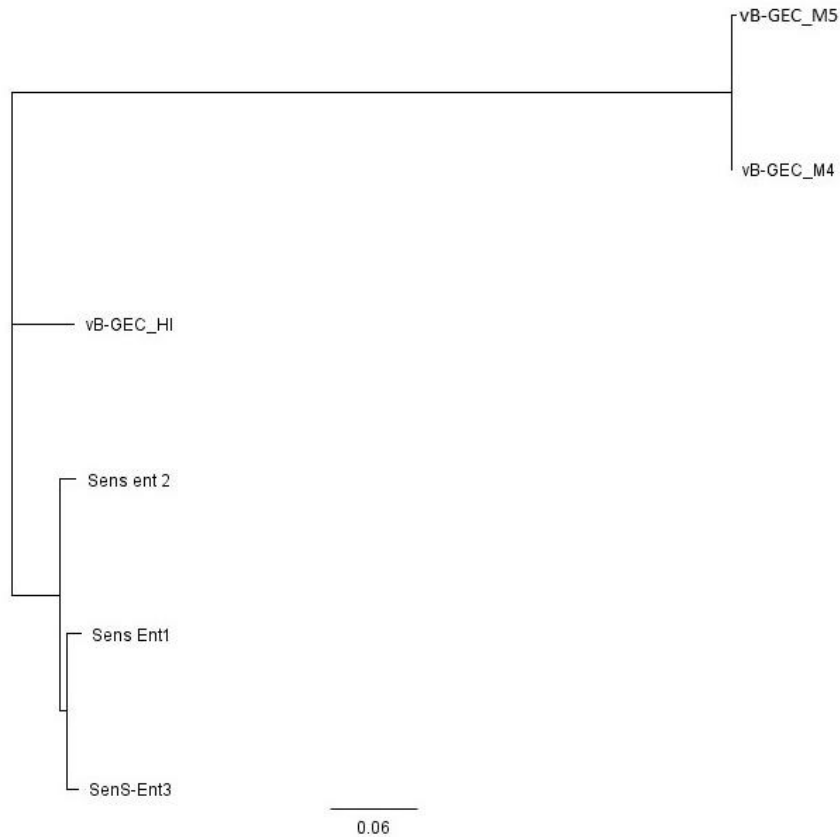
ვირულენტური ფაგებია vB_GEC_N8 და vB_GEC_N5, რომლებიც მაღალ მსგავსებას ავლენენ ერთმანეთის მიმართ (97,52%). ორივე მათგანი ე.წ. T5 ფაგია. აღსანიშნავია მათი მსგავსება *Salmonella phage Shivani* - თან (იდენტ: 99,64%), რომელიც „ინტესტი ფაგის“ შემადგენლობაში შემავალი ფაგია (Denish Piya at al., 2015). ასევე საინტერესოა მათი მსგავსება *Shigella phage SHSML-45* (99,63%). 66 - ე სურათზე ნაჩვენებია vB_GEC_N8-ს, vB_GEC_N5-ს, *E. coli* T5 - ს და *Salmonella phage Shivani* - ის შორის არსებული ნათესაური კავშირი.

სურათი 66. vB_GEC_N8-ს, vB_GEC_N5-ს, *E. coli* T5 - ს და *Salmonella phage Shivani* - ის შორის ნათესაური კავშირის მაჩვენებელი ფილოგენეტიკური ხე.



ერთმანეთის მსგავსი აღმოჩნდა ფაგები vB_GEC_Hi, vB_GEC_ M4 და vB_GEC_M5. სამივე ვირულენტური ფაგია, მსგავსებას იჩენენ ისეთი ფაგების მიმართ, როგორებიცაა *Salmonella phage vB_SenS-Ent1* , *Salmonella phage vB_SenS-Ent2*, *Salmonella phage vB_SenS-Ent3*. (იხ. სურათი 67)

სურათი 67. vB_GEC_M4, vB_GEC_M5, vB-GEC-Hi -სა და Salmonella phage vB_SenS-Ent1, Salmonella phage vB_SenS-Ent2 სა და Salmonella phage vB_SenS-Ent3 - ის ნათესაური კავშირის მაჩვენებელი ფილოგენეტიკური ხე.



vB_GEC_Tr ზომიერი ფაგია, რომელიც სულ რამდენიმე ფაგის მიმართ ავლენს მსგავსებას, მათ შორის ყველაზე მაღალი მსგავსებაა ცნობილ ზომიერ ფაგებთან - Salmonella virus BTP1(იდენტ: 97,54%) და Salmonella phage epsilon34 (იდენტ: 95,10%)(Owen et al., 2017)(Villafane et al., 2008).

ამრიგად, ჩატარებული გენომური ანალიზის შედეგად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ 12 ფაგს, შორის 11 ფაგი ლიტურია: vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, vB_GEC_Mg, vB_GEC Bs vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_NS7, vB_GEC_7A, vB_GEC_Hi, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5, ხოლო ზომიერი აღმოჩნდა მხოლოდ vB_GEC_Tr. ამ დასკვნის გაკეთების საშუალებას გვაძლევს NCBI - ს მონაცემთა ბაზის ფაგების მიმართ ჩატარებული

შედარებითი ანალიზის პასუხები და ასევე **vB_GEC_Tr** - ის გენომში ნანახი ლიზოგენობის განმაპირობებელი გენები - ინტეგრაციის სახით, რომელთა არსებობა სხვა ფაგების გენომში არ გამოვლინდა.

ფაგების აქტივობა და მასპინძელ ბაქტერიათა წრის შესწავლა სხვადასხვა გეოგრაფიული ზონიდან და წყაროდან მიღებულ 240 შტამზე განხორციელდა, რომელთა შორის იყო *Salmonella* ოჯახის როგორც კლინიკური, ასევე ვეტერინარული წარმოშობის მრავალფეროვანი სეროტიპები. აღსანიშნავია, რომ ამ შტამების უმრავლესობა მრავლობითად ანტიბიოტიკორეზისტენტული (MDR) პროფილებით ხასიათდებოდა. ამ შტამებზე ფაგების მოქმედების სპექტრის ერთმანეთთან შედარებისას გამოვლინდა, რომ ე.წ. მაღალაქტიურ ფაგებს განეკუთვნებიან ფაგები - **vB-GEC-B1, vB-GEC-BS, vB-GEC-B3, vB-GEC-N3, vB-GEC-NS7, vB-GEC-N8**, რომელთა აქტივობა განისაზღვრა 60% დან 80 % მდე. საინტერესოა, რომ აღნიშნული ფაგები უფრო ეფექტურნი აღმოჩნდნენ კლინიკური შტამების მიმართ (~ 90%), ვიდრე ვეტერინარული წარმოშობის შტამების მიმართ (~ 70%). შტამები, რომლებიც მგრძობელობას ავლენდნენ აღნიშნული ფაგების მიმართ ძირითადად *S. Typhimurium* და *S. Enteritidis* სეროვარებს მიეკუთვნებოდნენ.

აღნიშვნის ღირსია ფაგების აქტივობის განსაზღვრის ერთერთი მაგალითი. 2017 წელს კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში აღწერილ იქნა კლინიკური შემთხვევა, ტიფოიდური ცხელება, რომელიც 7 წლის ვაჟს დაუდგინდა. დაავადების გამომწვევი CTX-M-15 (Cefotaximase-Munich (CTX-M) 15) მუტაციის მატარებელი ფართო სპექტრის β- ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი *S. Typhi* აღმოჩნდა, რომელიც ხასიათდებოდა ciprofloxacin - ის მიმართ დაქვეითებული მგრძობელობით (Phoba et al., 2017). აღნიშნული იზოლატი ცნობილი როგორც Typhi 10040_15, გამოიგზავნა ელიავას ინსტიტუტში კვლევისა და განვითარების განყოფილებაში მის მიმართ ფაგების მოქმედების პოტენციალის შესასწავლად. ჩვენს მიერ შესწავლილი 14 ბაქტერიოფაგისა და კომერციული პრეპარატის „ინტესტი ფაგი“ -ის 5 სხვადასხვა სერია, გამოცდილ იქნა აღნიშნული შტამის მიმართ. მოცემული ექსპერიმენტის შედეგად დადასტურდა, რომ ჩვენი კოლექციის სულ მცირე 5 ფაგური კლონი: **vB_GEC_N3, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8**,

vB_GEC_NS7 და **vB_GEC_Hi**, in vitro პირობებში ავლენს ძლიერ ლიტიურ აქტივობას კონგოს დემოკრატიული რესპუბლიკიდან მიღებული იზოლატის - ექსტრემალურად ანტიბიოტიკორეზისტენტული β - ლაქტამაზა მწარმოებელი *Salmonella enterica* სეროვარ **Typhi** - ის მიმართ.

თერაპიული პოტენციალის in vivo დემონსტრირებისათვის ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტი თავგებზე. ცხოველური ექსპერიმენტის ჩასატარებლად შერჩეული იყო შემდეგი ფაგები: **vB-GEC-Bs** (Myoviridae), **vB-GEC-Hi** (Siphoviridae) და **vB-GEC-Tr** (Podoviridae). ამ ფაგების შერჩევის ერთ-ერთი კრიტერიუმი იყო მორფოლოგიური თავისებურებები, ვინაიდან ცნობილია, რომ სხვადასხვა მორფოლოგიის ფაგები ინფექციური პროცესის საწყის ეტაპზე (ადსორბციის დროს) უჯრედის კედელზე არსებულ სხვადასხვა რეცეპტორებს ემაგრებიან (Silva et al. (2016). ჩვენ გამოსაცდელ ფაგურ ნარევი ჩავრთეთ ყველა მორფოლოგიური ტიპის ფაგი, ერთის მხრივ იქედან გამომდინარე, რომ თითოეულ მათგანს საადსორბციო რეცეპტორების მიმართ განსხვავებული პრიორიტეტები შეიძლება ქონოდათ, რაც მათ სინერგიულ აქტივობას ხელს შეუწყობდა ანუ ნარევს თერაპიული თვალსაზრისით უფრო ეფექტურს გახდიდა და მეორეს მხრივ, ვინაიდან კომერციულ პრეპარატებში შემავალი ფაგების უმრავლესობის დეტალური დახასიათება მეტწილად უცნობია და ამ ნარევებში შესაძლებელია ზომიერი ფაგებიც არსებობდნენ, ამ შემთხვევაში ჩვენს მიერ კონსტრუირებული საექსპერიმენტო ნარევი ასეთი კომერციული პრეპარატის პროტოტიპად შეიძლება წარმოვიდგინოთ. ამასთან, მნიშვნელოვანია ისიც, რომ თითოეული შერჩეული ფაგი, მოცემულ ბაქტერიაზე წარმოქმნის განსხვავებული მორფოლოგიის მქონე ნეგატიურ კოლონიებს, რაც შედეგების აღწერა/აღრიცხვის პროცესს საგრძნობლად აადვილებს.

ამგვარად, სამივე ფაგი სხვადასხვა მორფოლოგიურ კლასს წარმოადგენს: ცხოველური ექსპერიმენტის დაწყებამდე, მოხდა ცდისთვის შერჩეული ფაგების პატრონ უჯრედზე ერთჯერადი გამრავლების ციკლის - პატრონ უჯრედზე ადსორბციის

პარამეტრების, ბაქტერიულ უჯრედში ფაგის გამრავლების ლატენტური პერიოდისა და გამოსავლიანობის განსაზღვრა.

ფაგი **vB-GEC-Bs** - ის ფაგური ნაწილაკების 97%-ის ადსორბირება 5 წუთის შემდეგ მოხდა, ფაგის ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა 40 წუთი იყო, ფაგის გამოსავლიანობა შეადგენს 220 ± 20 ფაგურ ნაწილაკს, ერთ ინფიცირებულ უჯრედზე.

vB-GEC- Hi - ის ფაგური ნაწილაკების 96% ადსორბირირება 4 წუთში მოხდა, ლატენტური პერიოდი 30 წუთი ფაგის გამოსავლიანობა პატრონი ბაქტერიული შტამის ერთ უჯრედზე, შეადგენს 155 ± 20 ფაგურ ნაწილაკს.

როგორც ცნობილია, ვირულენტური ფაგების ადსორბცია სწრაფად ხორციელდება, ხოლო გამოსავლიანობა ერთ უჯრედზე საშუალოდ 200-300-ს უდრის. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგი კიდევ ერთხელ ადასტურებს ამ მოსაზრებას.

vB-GEC- Tr 97% -ის ადსორბცია 4 წუთში განხორციელდა, ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობა 25 წუთი იყო, გამოსავლიანობა კი შედარებით დაბალი 90 ფაგურ ნაწილაკი პატრონი შტამის ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე, რაც კიდევ ერთხელ მიუთითებს ამ ფაგის ზომიერ ბუნებაზე ანუ მის მიერ შტამის ლიზოგენიზაციის უნარზე. თუმცა ჩვენ ეს ფაგი მაინც ჩავრთეთ გამოსაცდელ ინფექციურ მოდელში იმ მოსაზრებებიდან გამომდინარე, რომელიც ზემოთ იყო აღწერილი.

ამის შემდგომ ჩვენ შევეცადეთ შეგვექმნა ცხოველური ინფექციური მოდელი. ინფექციური მოდელისათვის შეირჩა საქართველოში გამოყოფილი კლინიკური შტამი *S. Enteritidis 104*, რომელიც ხასიათდებოდა მრავლობითი რეზისტენტობით ამპიცილინის, ამოქსაცილინისა და კლავულანის მქავის კომპლექსის, ცეფტრიაქსონისა და სულფამიდების მიმართ. ყველა შერჩეული ფაგი: **vB-GEC-Bs**, **vB-GEC-Tr** და **vB-GEC-Hi** ამ შტამზე წარმოქმნიდა გამჭვირვალე ლიზისის ზონებს, რაც იმის მანიშნებელია, რომ ფაგის მიმართ რეზისტენტობის განვითარება ნაკლებად სავარაუდოა, მით უფრო ერთდროულად სამივე ფაგის მიმართ.

თავგებისათვის ინფექციის დოზის დასადგენად, რომელიც გამომწვევის ორალური მიღებისას, დაავადების გამოვლინებას გამოიწვევდა, ჩატარდა წინასწარი ექსპერიმენტები, რომლის მიზანი იყო საინფექციო და სამკურნალო დოზების შერჩევა.

საბოლოოდ დადგინდა ინფექციის გამომწვევის - *S. Enteritidis* 10⁴ ტიტრი 10⁸ კწე/მლ და ბაქტერიოფაგის ტიტრი 10⁷ ნკწე/მლ - თერაპიული ტიტრი, რომელიც ჩვეულებრივ გამოიყენება ბაქტერიოფაგების კომერციულ პრეპარატებში. თავგები ინფექციის ან ფაგის თერაპიული დოზით დატვირთულ ჟელატინის კუბებს, ისევე როგორც პლაცებოს 6-12 საათის ინტერვალით იღებდნენ. ამავე პერიოდებში ხდებოდა განავლის ნიმუშების აღებაც, რომელშიც ისაზღვრებოდა ბაქტერიისა და ფაგის ტიტრები.

ამ ექსპერიმენტით დადგინდა ასევე, რომ ცალკე ჟელატინის მიცემა, ისევე როგორც ფაგის მიღება, არავითარ უარყოფით გავლენას არ ახდენს თავგების სასიცოცხლო მაჩვენებლებზე. ინფექციის გამოვლინებები თვალსაჩინო ხდებოდა ინფექციის 4 დოზის მიღების შემდეგ ანუ ადმინისტრირებიდან 2 დღის შემდეგ. ინფექციის ნიშნები ვლინდებოდა წონის კლებით, აქტიურობის დაქვეითებით, ბეწვის ბზინვარების დაკარგვით. ფაგის კონტროლის ჯგუფის ცხოველების განავალში ფაგის ტიტრი ასევე უცვლელი რჩებოდა, რაც იმის მანიშნებელი იყო, რომ ფაგზე კუჭის წვენისა და ნაღვლის ფერმენტების გავლენა მინიმალური იყო. შესაძლებელია ეს გარემოება ჟელატინის დამცველობით როლს უკავშირდებოდეს.

მომდევნო ეტაპზე ცხოველური ექსპერიმენტი 20 თავგზე წონით 18-20 გ ჩატარდა, რომლებიც 4 ჯგუფად დაიყო, თითოეულში 5-5 ინდივიდით. პირველი ჯგუფი ექსპერიმენტულ ჯგუფს წარმოადგენდა, მე-2 ჯგუფი ინფექციის კონტროლად იყო გამოყენებული, მე - 3 ფაგის კონტროლად, ხოლო მე-4 პლაცებოს ჯგუფს წარმოადგენდა.

პირველ და მეორე ჯგუფის თავგები ყოველდღე ინტერვალით 6-12 საათი იღებდნენ 350 მკლ ჟელატინს და 500მკლ *S. Enteritidis 104* (ტიტრით 1X10⁹ კწე/მლ). იგივე პერიოდულობით საკვლევად ვიღებდით განავლის ნიმუშებს, რომელშიც ვსაზღვრავდით ბაქტერიების რაოდენობას ერთ მლ მოცულობაში. ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე-3 დღეს, როდესაც თავგებში ხდებოდა ინფექციის გამოვლენა, პირველი

ჯგუფის თავგებს ეძლეოდათ ფაგების ნარევის (შეფარდებით 1:1:1) შემცველი ქელატინის კუბები (350 მკლ ქელატინი+500 მკლ ფაგების ნარევი ტიტრით $1 \cdot 10^7$ ნკწე/მლ). მეორე ჯგუფის (II) თავგები, რომლებსაც ინფექციის იგივენაირი გამოვლინებები ქონდათ, ესქპერიმენტული ჯგუფის თავგებისთვის ფაგით მკურნალობის დაწყების შემდეგ, შეუწყდათ ინფექციის გამომწვევის მიცემა.

მესამე ჯგუფის (III) თავგები იღებდნენ მხოლოდ ფაგის შემცველ ქელატინის კუბებს, რითიც კონტროლდებოდა ფაგის ტიტრის სტაბილურობა, საექპერიმენტო ჯგუფთან შედარებით.

მეოთხე ჯგუფის (IV) თავგები უარყოფითი კონტროლისთვის იყვნენ გამოყენებული. მათ ეძლეოდათ პლაცებო ანუ სტერილური ქელატინის კუბები (350 მკლ ქელატინი + 500 მკლ სტერილური ბაქტერიოლოგიური არე, რომელზედაც დამზადებული იყო ბაქტერიოფაგების ნარევი).

საექსპერიმენტო ჯგუფში (I) ფაგების ნარევის პირველივე ულუფის მიღების შემდეგ დაფიქსირდა *S. Enteritidis* 104 - ის ელიმინაცია ანუ ბაქტერიის ტიტრმა 6 ლოგარითმით იკლო. ინფექციის სიმპტომები ფაგებით თერაპიით დაწყებიდან მეორე დღეს უკვე არ შეინიშნებოდა, თავგები გამოცოცხლდნენ. შედეგი სტაბილურად შენარჩუნდა მთელი ექსპერიმენტის მიმდინარეობის პროცესში, ამავდროულად უცვლელი რჩებოდა ფაგების ნარევის ტიტრი და იგი უტოლდებოდა - $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^5$ ნკწე/მლ-ს.

მეორე (II) ჯგუფის ანუ ინფექციის დადებითი კონტროლის თავგებზე დაკვირვება სულ 10დღის განმავლობაში გაგრძელდა, ამ დროის განმავლობაში, მათში ნარჩუნდებოდა ინფექციის სიმპტომები, რომლის გამოც ისინი თანდათან კვდებოდნენ. პირველი ანუ საექპერიმენტო (I) ჯგუფის თავგები პირველი 2 დღე ინფექციის დოზებს იღებდნენ, შემდეგ 4 დღის განმავლობაში ფაგების დოზებს და ყველა ცოცხალი გადარჩა, რაც ჩვენს მიერ შექმნილი ნარევის თერაპიულ ეფექტზე მეტყველებს.

შედეგები

- ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პროფილების უფრო დიდი მრავალფეროვნებით სომხურ იზოლატები გამოირჩეოდნენ. ეს განსხვავებები შესაძლოა უკავშირდებოდეს ამ ქვეყნებში მოქმედ განსხვავებულ რეგულაციებსა და კლინიკურ სტანდარტებს.
- ფაგების გენეტიკური ანალიზით დადგინდა, რომ 12 ფაგს შორის 11 ფაგი ლიტიურია: **vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, vB_GEC_Mg, vB_GEC_Bs, vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_NS7, vB_GEC_7A, vB_GEC_Hi, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5**, ხოლო 1 - **vB_GEC_Tr** (ოჯახი **Podoviridae**; გვარი - **Lederbergvirus.**), იდენტიფიცირდა, როგორც ზომიერი ფაგი, რასაც ცხადყოფს მის გენომში ნანახი, ლიზოგენობის განმაპირობებელი ცილები - ინტეგრაზები და ასევე მისი ჰომოლოგი ფაგების სია NCBI - ის მონაცემთა ბაზიდან.
- ვირულენტურ ფაგებს შორის 6 Myoviridae -ს ოჯახის წარმომადგენელია - **vB_GEC_B1, vB_GEC_B3, vB_GEC_Mg, vB_GEC_Bs, vB_GEC_NS7, vB_GEC_7A**, ხოლო 5 Siphoviridae -ს ოჯახის - **vB_GEC_N5, vB_GEC_N8, vB_GEC_Hi, vB_GEC_M4, vB_GEC_M5**.
- მრავალრიცხოვანი in vitro ტესტების საფუძველზე დადგინდა, რომ მაღალაქტიურ ფაგებს განეკუთვნებიან ფაგები - **vB-GEC-B1, vB-GEC -Bs, vB-GEC-B3, vB-GEC-N3, vB-GEC-NS7, vB-GEC- N8**, რომელთა აქტივობა განისაზღვრა 60% დან 80% მდე.
- აღნიშნული ფაგები უფრო ეფექტურნი აღმოჩნდნენ კლინიკური შტამების მიმართ (~ 90%), ვიდრე ვეტერინარული წარმოშობის შტამების მიმართ (~ 70%). შტამები, რომლებიც მგრძნობელობას ავლენდნენ ჩვენს მიერ გამოყოფილი და დახასიათებული ფაგების მიმართ, ძირითადად, *S. Typhimurium* და *S. Enteritidis*

სეროვარებს მიეკუთვნებოდნენ და მეტწილად კლინიკური წარმომავლობის შტამებს განეკუთვნებოდნენ.

დასკვნები

- ამრიგად, ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე შეგვიძლია თამამად დავასკვნათ, რომ ამ კვლევის შედეგად მიღებული ფაგების კოლექცია მრავალფეროვანია, ფაგები, რომლებიც მაღალი აქტივობით ხასიათდებიან ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების, მათ შორის ექსტრემალურად ანტიბიოტიკორეზისტენტული, β -ლაქტამაზა მაპროდუცირებელი *S. Typhi* მიმართ, შესაძლოა განხილულ იქნენ, როგორც ეფექტური ანტიბაქტერიული აგენტები.
- ამ ფაგების თერაპიული პოტენციალი ყურადღებას იმსახურებს, რასაც მოწმობს ჩატარებული *in vitro* და *in vivo* ექსპერიმენტების შედეგები. მათი პრაქტიკული აპლიკაციის სახით გამოყენებას გაადვილებს ისიც, რომ ფაგები საკმაოდ დეტალურადაა შესწავლილი გენეტიკური და ბიოლოგიური მახასიათებლების მიხედვით.

გამოყენებული ლიტერატურის სია

- A. FELIX, D.Sc., F.R.S. AND BESSIE R. CALLOW, M. A. (1943). *TYPING OF PARATYPHOID B BACILLI BY MEANS OF Vi BACTERIOPHAGE**. (6240), 571–572.
- Abedon, S. T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage*, *1*(1), 46–49.
<https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, *1*(2), 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F. X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., ... Brisse, S. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Ackermann, H.-W. (2011). Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. *Bacteriophage*, *1*(4), 183–187.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, *152*(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Adriaenssens, E. M., Ackermann, H. W., Anany, H., Blasdel, B., Connerton, I. F., Goulding, D., ... Lavigne, R. (2012). A suggested new bacteriophage genus: “Viunalikevirus.” *Archives of Virology*, *157*(10), 2035–2046. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1360-5>
- Adriaenssens, E. M., Sullivan, M. B., Knezevic, P., van Zyl, L. J., Sarkar, B. L., Dutilh, B. E., ... Krupovic, M. (2020). Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018–2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. *Archives of Virology*, *165*(5), 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>
- Albers, S., & Czech, A. (2016). Exploiting tRNAs to boost virulence. *Life*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/life6010004>
- Alberts, F. B., Kutter, E., Sulakvelidze, A., Summers, W. C., Guttman, B., Raya, R., & Carlson, K. (2004). *BACTERIOPHAGES: BIOLOGY AND APPLICATIONS* Elizabeth Kutter and Alexander Sulakvelidze *Table of Contents*. (January).
- ALEXANDER SULAKVELIDZE, 1 * ZEMPHIRA ALAVIDZE, 1, 2 AND J. GLENN MORRIS, J. . (2011). The challenges of bacteriophage therapy. *Industrial Pharmacy*, *45*(31), 14–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649>
- Anany, H., Moreno, A. I., Niall, S., Ackermann, D. L. H., Reynolds, D. M., Kropinski, A. M., ... Turner, D. (2015). *A proposed new bacteriophage subfamily: “Jerseyvirinae.”* <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2344-z>
- Anna, A., Iwona, C., & Gregorczyk, P. (2017). *Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment:*

One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. 277–283.

<https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>

- Anwar, E., Goldberg, E., Fraser, A., Cj, A., Paul, M., & Leibovici, L. (2014). Vaccines for preventing typhoid fever (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD001261.pub3>. www.cochranelibrary.com
- Ao, T. T., Feasey, N. A., Gordon, M. A., Keddy, K. H., Angulo, F. J., & Crump, J. A. (2015). Global Burden of Invasive Nontyphoidal. *Emerging Infectious Diseases*, 21(6), 941–949.
- Azeredo, J., Sillankorva, S., & Editors. (2018). Bacteriophage therapy (Springer Protocols). In *Jama* (Vol. 100).
- Berchieri, A., Lovell, M. A., & Barrow, P. A. (1991). The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 142(5), 541–549. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90187-F](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90187-F)
- Broudy, T. B., & Fischetti, V. A. (2003). In Vivo Lysogenic Conversion of Tox. *Society*, 71(7), 3782–3786. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3782>
- Bru, H., Canchaya, C., & Hardt, W. (2004). *Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion*. 68(3), 560–602.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560>
- Burrowes, B. H., Molineux, I. J., & Fralick, J. A. (2019). Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: The appelmans protocol. *Viruses*, 11(3).
<https://doi.org/10.3390/v11030241>
- Cenens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M. T., Lavigne, R., & Aertsen, A. (2013). Phage-host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the *Pid/dgo* interaction. *Bacteriophage*, 3(1), e25029. <https://doi.org/10.4161/bact.25029>
- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy-History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 83).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>
- Clinical Laboratory Standard Institute. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial*.
- Clokie, M., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophages: Methods and Protocols - Volume 2. In *Life Sciences* (Vol. 531). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1
- Clokie, M. R. ., & Kropinski, A. M. (2009). *Bacteriophages, Methods and Protocols Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*.
- Coordinators, N. R. (2016). *Database resources of the National Center for*. 44(November 2015), 7–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>

- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(4), 901–937. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Crump, J. A., & Wain, J. (2016). *Salmonella*. In *International Encyclopedia of Public Health* (Vol. 1225). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00394-5>
- Cunha, B. A., Gran, A., & Munoz-Gomez, S. (2013). Typhoid fever vs. malaria in a febrile returning traveler: Typhomalaria revisited—An Oslerian perspective. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *11*(1), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.09.003>
- Delbrueck, M. (1940). The growth of bacteriophage and lysis of the host. *The Journal Of General Physiology*, (3), 644–662.
- Denish Piya, Yicheng Xie, Adriana C. Hernandez Morales, G. F. K. E. C. (2015). Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Siphophage Shivani. *GenomA*, *3*(2), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00154-15>
- Duckworth, D. H. (1976). “Who discovered bacteriophage?”. *Bacteriological Reviews*, *40*(4), 793–802. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/795414> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC413985>
- E. Kutter. (2012). *Podoviridae Podoviridae*.
- Eberth, K., Gaffky, G. T., Smith, T., & Division, V. (2013). *Salmonella*.
- Edgell, D. R., Gibb, E. A., & Belfort, M. (2010). *Mobile DNA elements in T4 and related phages*. 1–15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-290>
- England, T. N., & England, T. N. (1996). Journal Medicine ©. *Heart*, *344*(17), 1253–1260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012295>
- Eric C. Keen. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, *37*(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152.A>
- F. D'HERELLE, M. D. (1926). *No Title: THE BACTERIOPHAGE AND ITS BEHAVIOR*.
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., & Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*, *379*(9835), 2489–2499. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2)
- Garbe, J., Wesche, A., Bunk, B., Kazmierczak, M., Selezska, K., Rohde, C., ... Schobert, M. (2010). Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiology*, *10*(1), 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-301>

- Gelman, D., Eisenkraft, A., Chanishvili, N., Dean, N., Glazer, S. C., & Hazan, R. (2018). The History and Promising Future of Phage Therapy in the Military Service. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, (January), 1. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000001809>
- Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5032–5036. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>
- Gordon, M. A. (2011). Invasive nontyphoidal Salmonella disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 484–489. <https://doi.org/10.1097/qco.0b013e32834a9980>
- Gratia, J. P. (2000). Andre Gratia: A forerunner in microbial and viral genetics. *Genetics*, 156(2), 471–476.
- Grimont, P.A.D. Weill, F. (2007). *Institut Pasteur - Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*.
- Hans-W Ackermann. (2011). *Bacteriophage taxonomy*. Retrieved from https://health.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages_Taxonomy_2011-Ackermann.pdf
- Hans-W. Ackermann, Mart Krupovic, Malcolm F. White, Patrick Forterre, and D. P. (2010). *Advances in Virus research* (Vol. 1). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60003-6)
- Harper, J., & Shortridge, K. F. (1969). A selective motility medium for routine isolation of Salmonella. *Journal of Hygiene*, 67(2), 181–186. <https://doi.org/10.1017/S0022172400041589>
- Hirsh, D. C., & Martin, L. D. (1983). Detection of Salmonella spp. in milk by using Felix-O1 bacteriophage and high-pressure liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(5), 1243–1245.
- Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 263–269. <https://doi.org/10.1086/318457>
- Hooton, S. P. T., Timms, A. R., Rowsell, J., Wilson, R., & Connerton, I. F. (2011). Salmonella Typhimurium-specific bacteriophage SH19 and the origins of species specificity in the Vi01-like phage family. *Virology Journal*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-498>
- [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). (2018). *Who Facts* (p. 4620869). p. 4620869. Retrieved from <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index.html> accessed on 19-06-13
- Hudzicki, J. (2016). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. (December 2009), 1–23.

- Hyman, P. (2019). *Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth*. <https://doi.org/10.3390/ph12010035>
- J.M, D. (1948). *Progress in the Treatment of Typhoid fever with Vi Bacteriophages*.
- Johnson, A. K. M. E. W. all 5 authors Roger J. (n.d.).
Determination of the Titer of Bacteriophage Preparations with Emphasis on the Soft Overlay Technique.
- Kakabadze, E., Makalatia, K., Grdzlishvili, N., Bakuradze, N., Goderdzishvili, M., Kusradze, I., ... Chanishvili, N. (2018). Selection of potential therapeutic bacteriophages that lyse a CTX-M-15 extended spectrum β -lactamase producing *Salmonella enterica* serovar typhi strain from the democratic republic of the Congo. *Viruses*, *10*(4).
<https://doi.org/10.3390/v10040172>
- Kim, M., & Ryu, S. (2011). Characterization of a T5-Like Coliphage, SPC35, and Differential Development of Resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(6), 2042–2050.
<https://doi.org/10.1128/aem.02504-10>
- Klieve, A. V. (2005). Bacteriophages. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*, *501*, 39–46. https://doi.org/10.1007/1-4020-3791-0_3
- Klumpp, J., Fouts, D. E., & Sozhamannan, S. (2012). Next generation sequencing technologies and the changing landscape of phage genomics. *Bacteriophage*, *2*(3), 190–199.
<https://doi.org/10.4161/bact.22111>
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). *Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation*. 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>. Freely
- Korf, I. H. E., Meier-Kolthoff, J. P., Adriaenssens, E. M., Kropinski, A. M., Nimtz, M., Rohde, M., ... Wittmann, J. (2019). Still something to discover: Novel insights into *Escherichia coli* phage diversity and taxonomy. *Viruses*, *11*(5), 1–29. <https://doi.org/10.3390/v11050454>
- Kropinski, A. M. (n.d.-a). *Bacteriophages Edited by* (Vol. 2).
- Kropinski, A. M. (n.d.-b). *Bacteriophages Methods and Protocols Volume III*.
- Kumar, G. P. N., Sundarajan, S., Paul, V. D., Nandini, S., Saravanan, R. S., Hariharan, S., ... Padmanabhan, S. (2012). Use of prophage free host for achieving homogenous population of bacteriophages: New findings. *Virus Research*, *169*(1), 182–187.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.026>
- Lehman, S. M., Kropinski, A. M., Castle, A. J., Svircev, A. M., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2009). *Complete Genome of the Broad-Host-Range Erwinia amylovora Phage ϕ Ea21-4 and Its Relationship to Salmonella Phage Felix O1 ϕ f. 75(7)*, 2139–2147.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02352-08>

- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., ... Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*, *64*(8), 1116–1121.
- Levine, M. M., Ferreccio, C., Black, R. E., Lagos, R., Martin, O. S., & Blackwelder, W. C. (2007). Ty21a Live Oral Typhoid Vaccine and Prevention of Paratyphoid Fever Caused by *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(Supplement_1), S24–S28. <https://doi.org/10.1086/518141>
- Maclennan, C. A., Gilchrist, J. J., Gordon, M. A., & Adam, F. (2013). *Europe PMC Funders Group Dysregulated humoral immunity to nontyphoidal Salmonella in HIV-infected African adults*. *328*(5977), 508–512. <https://doi.org/10.1126/science.1180346>. Dysregulated
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... Hoekstra, R. M. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Malawian, H., & Malawian, H. (n.d.). *RECBf { T PIJBLICATIONS ON HIV RESEARCH , IN*. 10–13.
- Maniloff, J., Ackermann, H.-W., & Jarvis, A. (2004). Phage Taxonomy and Classification. *Encyclopedia of Virology*, 1221–1228. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0024>
- MARK H. ADAMS. (n.d.). *Bacteriophages*.
- Marti, R., Zurfluh, K., Hagens, S., Pianezzi, J., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2013). *Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize Salmonella OmpC*. *87*(January), 818–834. <https://doi.org/10.1111/mmi.12134>
- Medalla, F., Gu, W., Mahon, B. E., Judd, M., Folster, J., Griffin, P. M., & Hoekstra, R. M. (2017). *Estimated Incidence of Antimicrobial Drug – Resistant Nontyphoidal Salmonella*. *23*(1), 2004–2012.
- Merabishvili, M., Vos, D. De, Verbeken, G., Kropinski, A. M., Vandenheuvel, D., Lavigne, R., ... Pirnay, J. (2012). *Selection and Characterization of a Candidate Therapeutic Bacteriophage That Lyses the Escherichia coli O104 : H4 Strain from the 2011 Outbreak in Germany*. *7*(12), 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052709>
- Mikoleit, M L, & Diseases, E. (2010). WHO Global Foodborne Infections Network " A WHO network building capacity to detect , control and prevent foodborne and other enteric infections from farm to table " Laboratory Protocol : " Isolation of Salmonella and Shigella from Faecal Specimens ." *World Health Organization*, 1–15.
- Mikoleit, Matthew Louis. (2014). " *Biochemical Identification of Salmonella and Shigella Using an Abbreviated Panel of Tests WHO Global Foodborne Infections Network Laboratory*

Protocol: (February). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1183.3443>

- MODI, R., HIRVI, Y., HILL, A., & GRIFFITHS, M. W. (2001). Effect of Phage on Survival of Salmonella Enteritidis during Manufacture and Storage of Cheddar Cheese Made from Raw and Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*, *64*(7), 927–933. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.927>
- Moreno Switt, A. I., Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Altier, C., & Wiedmann, M. (2013). Genomic characterization provides new insight into Salmonella phage diversity. *BMC Genomics*, *14*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-481>
- Moreno Switt, A. I., Sulakvelidze, A., Wiedmann, M., Kropinski, A. M., Wishart, D. S., Poppe, C., & Liang, Y. (2014). Salmonella Methods and Protocols. In *Salmonella: Methods and Protocols: Second Edition*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2_15
- N.Kiladze, N.Chanishvili, T.Shulaia, Z.Bendeliani, Y. Z. (2017). Phages in treatment of Some Deep Skin Purulent Infections. *Clinical Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/B0-7216-0423-4/50074-3>
- Nath, G., Singh, Y. K., Kumar, K., Gulati, A. K., Shukla, V. K., Khanna, A. K., ... Singh, T. B. (2008). Association of carcinoma of the gallbladder with typhoid carriage in a typhoid endemic area using nested PCR. *Journal of Infection in Developing Countries*, *2*(4), 302–307.
- Niu, Y. D., Stanford, K., Kropinski, A. M., Ackermann, H.-W., Johnson, R. P., She, Y.-M., ... McAllister, T. A. (2012). Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. *PloS One*, *7*(4), e34585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034585>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(9), 821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
- Oakley, B. B., Gonzalez-Escalona, N., & Molina, M. (2013). 12. Molecular Typing and Differentiation. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, (October). <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.017>
- Ochiai, R. L., Wang, X., Agtini, M., Deen, J. L., Wain, J., Kim, D. R., ... Clemens, J. D. (2005). *Salmonella Paratyphi A rates, Asia*. *11*, 2–5.
- Olarte, J., & Galindo, E. (1973). Salmonella typhi resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents: strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *4*(6), 597–601. <https://doi.org/10.1128/AAC.4.6.597>
- Owen, S. V., Wenner, N., Canals, R., Makumi, A., Hammarlöf, D. L., Gordon, M. A., ... Casjens,

- S. R. (2017). *Characterization of the Prophage Repertoire of African Salmonella Typhimurium ST313 Reveals High Levels of Spontaneous Induction of Novel Phage BTP1 Bacterial Strains and Culture Conditions*. 8(February), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00235>
- Paradiso, R., Lombardi, S., Iodice, M. G., Riccardi, M. G., Orsini, M., Censi, S. B., ... Borriello, G. (2016). Complete genome sequence of a lytic Siphoviridae bacteriophage infecting several serovars of *Salmonella enterica*. *Genome Announcements*, 4(5), 4–5.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00943-16>
- Park, M., Lee, J.-H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D.-H., ... Ryu, S. (2012). Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 58–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.06231-11>
- Parry, C. M., Thomas, S., Aspinall, E. J., Cooke, R. P. D., Rogerson, S. J., Harries, A. D., & Beeching, N. J. (2013). A retrospective study of secondary bacteraemia in hospitalised adults with community acquired non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-107>
- Pegues, D. A., Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2006). Nontyphoidal Salmonellosis. *Tropical Infectious Diseases*, 1, 241–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06668-9.50023-5>
- Petrov, V. M., Ratnayaka, S., Nolan, J. M., Miller, E. S., & Karam, J. D. (2010). Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution. *Virology Journal*, 7(1), 292. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-292>
- Phagehunting Program. (2017). PCI/SDS DNA Extraction. *Actinobacteriophage Database*, 3. Retrieved from http://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2.2013.pdf
- Phoba, M., Barbé, B., Lunguya, O., Masendu, L., Ceysens, J., Jacobs, J., ... Deborggraeve, S. (2017). *Salmonella enterica* serovar Typhi Producing CTX-M-15 Extended Spectrum β -Lactamase in the Democratic Republic of the Congo. 65, 1229–1231.
<https://doi.org/10.1093/cid/cix342>
- Pickard, D., Toribio, A. L., Petty, N. K., Van Tonder, A., Yu, L., Goulding, D., ... Dougan, G. (2010). A conserved acetyl esterase domain targets diverse bacteriophages to the Vi capsular receptor of *Salmonella enterica* serovar typhi. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5746–5754.
<https://doi.org/10.1128/JB.00659-10>
- Raton London New York Washington, B., BACTERIOPHAGES Biology, D., & EDITED Elizabeth Kutter Alexander Sulakvelidze, A. B. (2005). *BACTERIOPHAGES Biology and Applications CRC PR E S S*.
- Rawashdeh, M. (2014). *Salmonella typhi meningitis in Infants Salmonella typhi Meningitis in*.

(January 1997).

- Richardson, H., & Smaill, F. (1998). Medical microbiology. In *Bmj* (Vol. 317).
<https://doi.org/10.1136/bmj.317.7165.1060>
- Rippt, S., & Miller, R. V. (1995). Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of. *New York*, (1 998), 2225–2232.
- Roy T. Fisk. (1942). Studies on Staphylococci : I . Occurrence of Bacteriophage Carriers among Strains of Staphylococcus Aureus Author (s): Roy T . Fisk Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/30089655>. *The Journal of Infectious Diseases, Vol. 71, No. 2 (Sep. - Oct., 1942), Pp. 153-160, 71(2)*, 153–160.
- Ryan, E. T., & Andrews, J. (2019). Pathogenesis of enteric (typhoid and paratyphoid) fever - UpToDate. *UpToDate*, 1–10.
- Serrano, I., Oliveira, M., Santos, J. P., Bilocq, F., Leitão, A., Tavares, L., ... De Vos, D. (2017). Antimicrobial resistance and genomic rep-PCR fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains from animals on the background of the global population structure. *BMC Veterinary Research, 13*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0977-8>
- Shahrbabak, S. S., Khodabandehlou, Z., Shahverdi, A. R., Skurnik, M., Ackermann, H., Varjosalo, M., & Yazdi, M. T. (2013). *Isolation , characterization and complete genome sequence of PhaxI : a phage of Escherichia coli Printed in Great Britain*. 1629–1638.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.063776-0>
- Shannon Katiyo, a Berit Muller-Pebody, B., Mehdi Minaji, b David Powell, c Alan P. Johnson, b Elizabeth De Pinna, c Martin Day, C., Ross Harris, D., & Gauri Godbole, c a. (2019). Epidemiology and Outcomes of Nontyphoidal Salmonella Bacteremias from England, 2004 to 2015. *Journal of Clinical Microbiology, 57*(1), 1–10.
- Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of Medical Society, 32*(1), 76–77.
https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology, 6*(August), 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Smith, A. D., Cowan, J. O., Brassett, K. P., Herbison, G. P., & Taylor, D. R. (2005). New england journal. *New England Journal of Medicine, 352*, 2163–2173.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904327>
- Soffer, N., Woolston, J., Li, M., Das, C., & Sulakvelidze, A. (2017). Bacteriophage preparation lytic for *Shigella* significantly reduces *Shigella sonnei* contamination in various foods. *PLoS*

- ONE, 12(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175256>
- States, U. (2013). *Antibiotic Resistance Threats in US, 2013*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=13>
- Summary. (2012). *Siphoviridae Siphoviridae Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria*.
- Summers, W. C. (2001a). Bacteriophage Therapy. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 55). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437>
- Summers, W. C. (2001b). *Bacteriophage Therapy*.
- Terms, F. (2011). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses by Twort FW, L.R.C.P. Lond., M.R.C.S. (From the Laboratories of the Brown Institution, London) . *Bacteriophage*, 1(3), 127–129. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16737>
- THOUAND, G., VACHON, P., LIU, S., DAYRE, M., & GRIFFITHS, M. W. (2016). Optimization and Validation of a Simple Method Using P22:: luxAB Bacteriophage for Rapid Detection of Salmonella enterica Serotypes A, B, and D in Poultry Samples . *Journal of Food Protection*, 71(2), 380–385. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.2.380>
- Tiwari, B. R., & Kim, J. (2013). *Escherichia coli O157: H7*. 1(1), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-12>. Copyright
- Tolen, T. N., Xie, Y., Hernandez, A. C., & Everett, G. F. K. (2016). Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium myophage Mushroom. *Genome Announcements*, 3(2), 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00154-15>
- Topley, W. W. C., & Wilson, J. (2019). *TWORT-D ' HERELLE PHENOMENON IN THE EPI-Twort-d ' Herelle Phenomenon*. 295–300.
- Topley, W. W. C., Wilson, J., & Lewis, E. R. (1925). The rôle of the twort-d'herelle phenomenon in epidemics of mouse-typhoid. *Journal of Hygiene*, 24(1), 17–36. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031697>
- Touchan, F., Hall, J. D., & Lee, R. V. (2009). Typhoid fever during pregnancy: case report and review. *Obstetric Medicine*, 2(4), 161–163. <https://doi.org/10.1258/om.2009.090020>
- Trüper, H. G. (2005). The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet enterica in Salmonella enterica over all earlier epithets t. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 519–520. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63579-0>
- Turner, D., Hezwani, M., Nelson, S., Salisbury, V., & Reynolds, D. (2012). Characterization of the Salmonella bacteriophage vB_SenS-Ent1. *Journal of General Virology*, 93(PART 9),

2046–2056. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043331-0>

- Villafane, R., Zayas, M., Gilcrease, E. B., Kropinski, A. M., & Casjens, S. R. (2008). *Genomic analysis of bacteriophage ϵ 34 of Salmonella enterica serovar Anatum (15+)*. *13*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-227>
- Villegas, A., She, Y. M., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., Mazzocco, A., Ojha, S., ... Johnson, R. P. (2009). The genome and proteome of a virulent Escherichia coli O157:H7 bacteriophage closely resembling Salmonella phage Felix O1. *Virology Journal*, *6*, 5–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-41>
- Vo, A. T. T., Van Duijkeren, E., Gaastra, W., & Fluit, A. C. (2010). Antimicrobial resistance, class 1 integrons, and genomic island 1 in Salmonella isolates from Vietnam. *PLoS ONE*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009440>
- Vugia, D. J., Samuel, M., Farley, M. M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, S., ... Angulo, F. J. (2004). Invasive *Salmonella* Infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: Incidence, Serotype Distribution, and Outcome. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(s3), S149–S156. <https://doi.org/10.1086/381581>
- Wang, J., Jiang, Y., Vincent, M., Sun, Y., Yu, H., Wang, J., ... Hu, S. (2005). Complete genome sequence of bacteriophage T5. *Virology*, *332*(1), 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.049>
- Wayne, P. A. (2009). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *28*(July), 1–99.
- Weber-Dąbrowska, B., Mulczyk, M., & Górski, A. (2001). Bacteriophage Therapy of Bacterial Infections: An Update of our Institute's Experience. *Inflammation*, 201–209. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9702-9_15
- Welkos, S., & Schreiber, M. (1974). *Identification of Salmonella with the 0-1 Bacteriophage*. *28*(4), 618–622.
- WHICHARD, J. M., SRIRANGANATHAN, N., & PIERSON, F. W. (2016). Suppression of Salmonella Growth by Wild-Type and Large-Plaque Variants of Bacteriophage Felix O1 in Liquid Culture and on Chicken Frankfurters. *Journal of Food Protection*, *66*(2), 220–225. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.2.220>
- Woodford, N., Wareham, D. W., Guerra, B., & Teale, C. (2014). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae from animals and the environment: An emerging public health risk of our own making? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(2), 287–291. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt392>
- Woolston, J., Parks, A. R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., ... Sulakvelidze, A.

- (2013a). Bacteriophages lytic for Salmonella rapidly reduce Salmonella contamination on glass and stainless steel surfaces . *Bacteriophage*, 3(3), e25697.
<https://doi.org/10.4161/bact.25697>
- Woolston, J., Parks, A. R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., ... Sulakvelidze, A. (2013b). *Bacteriophages lytic for Salmonella rapidly reduce Salmonella contamination on glass and stainless steel surfaces*. (September), 1–6.
- YE, J., KOSTRZYNSKA, M., DUNFIELD, K., & WARRINER, K. (2009). Control of Salmonella on Sprouting Mung Bean and Alfalfa Seeds by Using a Biocontrol Preparation Based on Antagonistic Bacteria and Lytic Bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 73(1), 9–17.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.1.9>
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). *PHAST: A Fast Phage Search Tool*. 39(June), 347–352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

- A. FELIX, D.Sc., F.R.S. AND BESSIE R. CALLOW, M.A. 1943. "TYPING OF PARATYPHOID B BACILLI BY MEANS OF Vi BACTERIOPHAGE*," no. 6240: 571–72.
- Abedon, Stephen T. 2011. "Lysis from Without." *Bacteriophage* 1 (1): 46–49.
<https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>.
- Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, and Elizabeth Martin Kutter. 2011. "Phage Treatment of Human Infections." *Bacteriophage* 1 (2): 66–85.
<https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
- Achtman, Mark, John Wain, François Xavier Weill, Satheesh Nair, Zhemin Zhou, Vartul Sangal, Mary G. Krauland, et al. 2012. "Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in Salmonella Enterica." *PLoS Pathogens* 8 (6).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>.
- Ackermann, H. W. 2007. "5500 Phages Examined in the Electron Microscope." *Archives of Virology* 152 (2): 227–43. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>.
- Ackermann, Hans-Wolfgang. 2011. "Visualization of Bacteriophage Lysis in the

- Hypermicroscope.” *Bacteriophage* 1 (4): 183–87.
- Adriaenssens, Evelien M., Hans Wolfgang Ackermann, Hany Anany, Bob Blasdel, Ian F. Connerton, David Goulding, Mansel W. Griffiths, et al. 2012. “A Suggested New Bacteriophage Genus: ‘Viunaliikevirus.’” *Archives of Virology* 157 (10): 2035–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1360-5>.
- Adriaenssens, Evelien M., Matthew B. Sullivan, Petar Knezevic, Leonardo J. van Zyl, B. L. Sarkar, Bas E. Dutilh, Poliane Alfenas-Zerbini, et al. 2020. “Taxonomy of Prokaryotic Viruses: 2018-2019 Update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee.” *Archives of Virology* 165 (5): 1253–60. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04577-8>.
- Albers, Suki, and Andreas Czech. 2016. “Exploiting TRNAs to Boost Virulence.” *Life* 6 (1). <https://doi.org/10.3390/life6010004>.
- Alberts, Forward Bruce, Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze, William C Summers, Burton Guttman, Raul Raya, and Karin Carlson. 2004. “BACTERIOPHAGES : BIOLOGY AND APPLICATIONS Elizabeth Kutter and Alexander Sulakvelidze Table of Contents,” no. January.
- ALEXANDER SULAKVELIDZE, 1 * ZEMPHIRA ALAVIDZE, 1, 2 AND J. GLENN MORRIS, JR.1. 2011. “The Challenges of Bacteriophage Therapy.” *Industrial Pharmacy* 45 (31): 14–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649>.
- Anany, Hany, Andrea I Moreno, Switt Niall, De Lappe Hans-wolfgang Ackermann, Darren M Reynolds, Andrew M Kropinski, Martin Wiedmann, et al. 2015. “A Proposed New Bacteriophage Subfamily : ‘ Jerseyvirinae .’” <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2344-z>.
- Anna, Agata, Cisek Iwona, and Paulina Gregorczyk. 2017. “Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment : One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages,” 277–83. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>.
- Anwar, E, E Goldberg, A Fraser, Acosta Cj, M Paul, and L Leibovici. 2014. “Vaccines for Preventing Typhoid Fever (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON.” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001261.pub3.www.cochranelibrary.com>.
- Ao, Trong T, Nicholas A Feasey, Melita A Gordon, Karen H Keddy, Frederick J Angulo, and John A Crump. 2015. “Global Burden of Invasive Nontyphoidal.” *Emerging Infectious Diseases* 21 (6): 941–49.
- Azeredo, Joana, Sanna Sillankorva, and Editors. 2018. *Bacteriophage Therapy (Springer Protocols)*. *Jama*. Vol. 100.
- Berchieri, A., M. A. Lovell, and P. A. Barrow. 1991. “The Activity in the Chicken Alimentary Tract of Bacteriophages Lytic for Salmonella Typhimurium.” *Research in Microbiology* 142

- (5): 541–49. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90187-F](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90187-F).
- Broudy, Thomas B, and Vincent A Fischetti. 2003. “In Vivo Lysogenic Conversion of Tox.” *Society* 71 (7): 3782–86. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3782>.
- Bru, Harald, Carlos Canchaya, and Wolf-dietrich Hardt. 2004. “Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : From Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion” 68 (3): 560–602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560>.
- Burrowes, Ben H., Ian J. Molineux, and Joe A. Fraclick. 2019. “Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol.” *Viruses* 11 (3). <https://doi.org/10.3390/v11030241>.
- Cenens, William, Angella Makumi, Mehari Tesfazgi Mebrhatu, Rob Lavigne, and Abram Aertsen. 2013. “Phage-Host Interactions during Pseudolysogeny: Lessons from the Pid/Dgo Interaction.” *Bacteriophage* 3 (1): e25029. <https://doi.org/10.4161/bact.25029>.
- Chanishvili, Nina. 2012. *Phage Therapy-History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. Advances in Virus Research*. 1st ed. Vol. 83. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>.
- Clinical Laboratory Standard Institute. 2018. *Performance Standards for Antimicrobial*.
- Clokie, Martha R.J, and Andreq M. Kropinski. 2009. *Bacteriophages, Methods and Protocols Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*.
- Clokie, MRJ, and Andrew M Kropinski. 2009. *Bacteriophages: Methods and Protocols - Volume 2. Life Sciences*. Vol. 531. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1.
- Coordinators, Ncbi Resource. 2016. “Database Resources of the National Center For” 44 (November 2015): 7–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290>.
- Crump, John A., Maria Sjölund-Karlsson, Melita A. Gordon, and Christopher M. Parry. 2015. “Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections.” *Clinical Microbiology Reviews* 28 (4): 901–37. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>.
- Crump, John A., and John Wain. 2016. *Salmonella. International Encyclopedia of Public Health*. Vol. 1225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00394-5>.
- Cunha, Burke A., Arthur Gran, and Sigridh Munoz-Gomez. 2013. “Typhoid Fever vs. Malaria in a Febrile Returning Traveler: Typhomalaria Revisited-An Oslerian Perspective.” *Travel Medicine and Infectious Disease* 11 (1): 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.09.003>.
- Delbrueck, M. 1940. “The Growth of Bacteriophage and Lysis of the Host.” *The Journal Of General Physiology*, no. 3: 644–62.
- Denish Piya, Yicheng Xie, Adriana C. Hernandez Morales, Gabriel F. Kutyl Everett Center. 2015.

- “Complete Genome Sequence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Siphophage Shivani.” *GenomA* 3 (2): 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00154-15>.
- Duckworth, D H. 1976. “Who Discovered Bacteriophage?.” *Bacteriological Reviews* 40 (4): 793–802.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/795414><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC413985>.
- E. Kutter. 2012. “Podoviridae Podoviridae.”
- Eberth, Karl, Georg Theodor Gaffky, Theobald Smith, and Veterinary Division. 2013. “Salmonella.”
- Edgell, David R, Ewan A Gibb, and Marlene Belfort. 2010. “Mobile DNA Elements in T4 and Related Phages,” 1–15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-290>.
- England, The New, and The New England. 1996. “Journal Medicine ©.” *Heart* 344 (17): 1253–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012295>.
- Eric C. Keen. 2015. “A Century of Phage Research: Bacteriophages and the Shaping of Modern Biology.” *Bioessays* 37 (1): 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152.A>.
- F. D’HERELLE, M.D. 1926. “No Title: THE BACTERIOPHAGE AND ITS BEHAVIOR.”
- Feasey, Nicholas A., Gordon Dougan, Robert A. Kingsley, Robert S. Heyderman, and Melita A. Gordon. 2012. “Invasive Non-Typhoidal Salmonella Disease: An Emerging and Neglected Tropical Disease in Africa.” *The Lancet* 379 (9835): 2489–99. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2).
- Garbe, Julia, Andrea Wesche, Boyke Bunk, Marlon Kazmierczak, Katherina Selezska, Christine Rohde, Johannes Sikorski, Manfred Rohde, Dieter Jahn, and Max Schobert. 2010. “Characterization of JG024, a Pseudomonas Aeruginosa PB1-like Broad Host Range Phage under Simulated Infection Conditions.” *BMC Microbiology* 10 (1): 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-301>.
- Gelman, Daniel, Arik Eisenkraft, Nina Chanishvili, Nachman Dean, Shunit Copenhagen Glazer, and Ronen Hazan. 2018. “The History and Promising Future of Phage Therapy in the Military Service.” *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, no. January: 1. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000001809>.
- Goode, D., V. M. Allen, and P. A. Barrow. 2003. “Reduction of Experimental Salmonella and Campylobacter Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8): 5032–36. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>.
- Gordon, Melita A. 2011. “Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (5): 484–89. <https://doi.org/10.1097/qco.0b013e32834a9980>.

- Gratia, Jean Pierre. 2000. "Andre Gratia: A Forerunner in Microbial and Viral Genetics." *Genetics* 156 (2): 471–76.
- Grimont, PAD. Weill, FX. 2007. "Institut Pasteur - Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars."
- Hans-W Ackermann. 2011. "Bacteriophage Taxonomy." https://health.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/gesundheitswissenschaften/Downloads/Bacteriophages_Taxonomy_2011-Ackermann.pdf.
- Hans-W. Ackermann, Mart Krupovic, Malcolm F. White, Patrick Forterre, and David Prangishvili. 2010. *Advances in Virus Research*. Vol. 1. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60003-6).
- Harper, J., and K. F. Shortridge. 1969. "A Selective Motility Medium for Routine Isolation of Salmonella." *Journal of Hygiene* 67 (2): 181–86. <https://doi.org/10.1017/S0022172400041589>.
- Hirsh, D. C., and L. D. Martin. 1983. "Detection of Salmonella Spp. in Milk by Using Felix-O1 Bacteriophage and High-Pressure Liquid Chromatography." *Applied and Environmental Microbiology* 46 (5): 1243–45.
- Hohmann, Elizabeth L. 2001. "Nontyphoidal Salmonellosis." *Clinical Infectious Diseases* 32 (2): 263–69. <https://doi.org/10.1086/318457>.
- Hooton, Steven P.T., Andrew R. Timms, Joanna Rowsell, Ray Wilson, and Ian F. Connerton. 2011. "Salmonella Typhimurium-Specific Bacteriophage SH19 and the Origins of Species Specificity in the Vi01-like Phage Family." *Virology Journal* 8: 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-498>.
- [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). 2018. "Who Facts." <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index.html> accessed on 19-06-13.
- Hudzicki, Jan. 2016. "Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol," no. December 2009: 1–23.
- Hyman, Paul. 2019. "Phages for Phage Therapy : Isolation , Characterization , and Host Range Breadth." <https://doi.org/10.3390/ph12010035>.
- J.M, Desranleau. 1948. "Progress in the Treatment of Typhoid Fever with Vi Bacteriophages."
- Johnson, Andrew Kropinski Amanda Mazzocco Thomas E Waddell Show all 5 authors Roger Johnson Roger. n.d. "Determination of the Titer of Bacteriophage Preparations with Emphasis on the Soft Overlay Technique."

- Kakabadze, Elene, Khatuna Makalatia, Nino Grdzelishvili, Nata Bakuradze, Marina Goderdzishvili, Ia Kusradze, Marie France Phoba, et al. 2018. "Selection of Potential Therapeutic Bacteriophages That Lyse a CTX-M-15 Extended Spectrum β -Lactamase Producing Salmonella Enterica Serovar Typhi Strain from the Democratic Republic of the Congo." *Viruses* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/v10040172>.
- Kim, Minsik, and Sangryeol Ryu. 2011. "Characterization of a T5-Like Coliphage, SPC35, and Differential Development of Resistance to SPC35 in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium and Escherichia Coli ." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (6): 2042–50. <https://doi.org/10.1128/aem.02504-10>.
- Klieve, Athol V. 2005. "Bacteriophages." *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* 501: 39–46. https://doi.org/10.1007/1-4020-3791-0_3.
- Klumpp, Jochen, Derrick E. Fouts, and Shanmuga Sozhamannan. 2012. "Next Generation Sequencing Technologies and the Changing Landscape of Phage Genomics." *Bacteriophage* 2 (3): 190–99. <https://doi.org/10.4161/bact.22111>.
- Koren, Sergey, Brian P Walenz, Konstantin Berlin, Jason R Miller, Nicholas H Bergman, and Adam M Phillippy. 2017. "Canu : Scalable and Accurate Long-Read Assembly via Adaptive k -Mer Weighting and Repeat Separation," 722–36. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>. Freely.
- Korf, Imke H.E., Jan P. Meier-Kolthoff, Evelien M. Adriaenssens, Andrew M. Kropinski, Manfred Nimtz, Manfred Rohde, Mark J. van Raaij, and Johannes Wittmann. 2019. "Still Something to Discover: Novel Insights into Escherichia Coli Phage Diversity and Taxonomy." *Viruses* 11 (5): 1–29. <https://doi.org/10.3390/v11050454>.
- Kropinski, Andrew M. n.d. *Bacteriophages*. Vol. III.
- . n.d. *Bacteriophages Edited By*. Vol. 2.
- Kumar, G P Nirmal, Sudarson Sundarajan, Vivek Daniel Paul, S Nandini, R Sanjeev Saravanan, Sukumar Hariharan, Bharathi Sriram, and Sriram Padmanabhan. 2012. "Use of Prophage Free Host for Achieving Homogenous Population of Bacteriophages : New Findings." *Virus Research* 169 (1): 182–87. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.026>.
- Lehman, Susan M, Andrew M Kropinski, Alan J Castle, Antonet M Svircev, and A P P L E Nviron M Icrobiol. 2009. "Complete Genome of the Broad-Host-Range Erwinia Amylovora Phage Φ Ea21-4 and Its Relationship to Salmonella Phage Felix O1 Φ \dagger " 75 (7): 2139–47. <https://doi.org/10.1128/AEM.02352-08>.
- Leverentz, B, W S Conway, Z Alavidze, W J Janisiewicz, Y Fuchs, M J Camp, E Chighladze, and A Sulakvelidze. 2001. "Examination of Bacteriophage as a Biocontrol Method for Salmonella on Fresh-Cut Fruit: A Model Study." *Journal of Food Protection* 64 (8): 1116–21.

- Levine, Myron M., Catherine Ferreccio, Robert E. Black, Rosanna Lagos, Oriana San Martin, and William C. Blackwelder. 2007. "Ty21a Live Oral Typhoid Vaccine and Prevention of Paratyphoid Fever Caused by Salmonella Enterica Serovar Paratyphi B." *Clinical Infectious Diseases* 45 (Supplement_1): S24–28. <https://doi.org/10.1086/518141>.
- Maclennan, Calman A, James J Gilchrist, Melita A Gordon, and F Adam. 2013. "Europe PMC Funders Group Dysregulated Humoral Immunity to Nontyphoidal Salmonella in HIV-Infected African Adults" 328 (5977): 508–12. <https://doi.org/10.1126/science.1180346>.Dysregulated.
- Majowicz, Shannon E., Jennie Musto, Elaine Scallan, Frederick J. Angulo, Martyn Kirk, Sarah J. O'Brien, Timothy F. Jones, Aamir Fazil, and Robert M. Hoekstra. 2010. "The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis ." *Clinical Infectious Diseases* 50 (6): 882–89. <https://doi.org/10.1086/650733>.
- Malawian, Hlv-infected, and Hfv-infected Malawian. n.d. "RECBfl { T PIJBLICATIONS ON HIV RESEARCH , IN," 10–13.
- Maniloff, Jack, Hans-Wolfgang Ackermann, and Audrey Jarvis. 2004. "Phage Taxonomy and Classification." *Encyclopedia of Virology*, 1221–28. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0024>.
- MARK H. ADAMS. n.d. "Bacteriophages."
- Marti, Roger, Katrin Zurfluh, Steven Hagens, Jasmin Pianezzi, Jochen Klumpp, and Martin J Loessner. 2013. "Long Tail Fibres of the Novel Broad-Host-Range T-Even Bacteriophage S16 Specifically Recognize Salmonella OmpC" 87 (January): 818–34. <https://doi.org/10.1111/mmi.12134>.
- McNair, Katelyn, Barbara A. Bailey, and Robert A. Edwards. 2012. "PHACTS, a Computational Approach to Classifying the Lifestyle of Phages." *Bioinformatics* 28 (5): 614–18. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts014>.
- Medalla, Felicita, Weidong Gu, Barbara E Mahon, Michael Judd, Jason Folster, Patricia M Griffin, and Robert M Hoekstra. 2017. "Estimated Incidence of Antimicrobial Drug – Resistant Nontyphoidal Salmonella" 23 (1): 2004–12.
- Merabishvili, Maia, Daniel De Vos, Gilbert Verbeken, Andrew M Kropinski, Dieter Vandenhuevel, Rob Lavigne, Pierre Wattiau, et al. 2012. "Selection and Characterization of a Candidate Therapeutic Bacteriophage That Lyses the Escherichia Coli O104 : H4 Strain from the 2011 Outbreak in Germany" 7 (12): 8–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052709>.
- Mikoleit, M L, and Enteric Diseases. 2010. "WHO Global Foodborne Infections Network " A WHO Network Building Capacity to Detect , Control and Prevent Foodborne and Other Enteric Infections from Farm to Table " Laboratory Protocol : ' Isolation of Salmonella and Shigella from Faecal Specimens .'" *World Health Organization*, 1–15.

- Mikoleit, Matthew Louis. 2014. “” Biochemical Identification of Salmonella and Shigella Using an Abbreviated Panel of Tests WHO Global Foodborne Infections Network Laboratory Protocol :,” no. February. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1183.3443>.
- MODI, RAJESH, Y. HIRVI, A. HILL, and M. W. GRIFFITHS. 2001. “Effect of Phage on Survival of Salmonella Enteritidis during Manufacture and Storage of Cheddar Cheese Made from Raw and Pasteurized Milk.” *Journal of Food Protection* 64 (7): 927–33. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.927>.
- Moreno Switt, Andrea I., Renato H. Orsi, Henk C. den Bakker, Kitiya Vongkamjan, Craig Altier, and Martin Wiedmann. 2013. “Genomic Characterization Provides New Insight into Salmonella Phage Diversity.” *BMC Genomics* 14 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-481>.
- Moreno Switt, Andrea I., Alexander Sulakvelidze, Martin Wiedmann, Andrew M. Kropinski, David S. Wishart, Cornelis Poppe, and Yongjie Liang. 2014. *Salmonella Methods and Protocols. Salmonella: Methods and Protocols: Second Edition*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1625-2_15.
- N.Kiladze, N.Chanishvili, T.Shulaia, Z.Bendeliani, Y.Zaichenko. 2017. “Phages in Treatment of Some Deep Skin Purulent Infections.” *Clinical Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/B0-7216-0423-4/50074-3>.
- Nath, Gopal, Yogesh Kumar Singh, Kailash Kumar, Anil Kumar Gulati, Vijay Kumar Shukla, Ajay Kumar Khanna, Sunil Kumar Tripathi, Ashok Kumar Jain, Mohan Kumar, and Tej Bali Singh. 2008. “Association of Carcinoma of the Gallbladder with Typhoid Carriage in a Typhoid Endemic Area Using Nested PCR.” *Journal of Infection in Developing Countries* 2 (4): 302–7.
- Niu, Yan D, Kim Stanford, Andrew M Kropinski, Hans-Wolfgang Ackermann, Roger P Johnson, Yi-Min She, Rafiq Ahmed, Andre Villegas, and Tim A McAllister. 2012. “Genomic, Proteomic and Physiological Characterization of a T5-like Bacteriophage for Control of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O157:H7.” *PloS One* 7 (4): e34585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034585>.
- Nordmann, P., and L. Poirel. 2014. “The Difficult-to-Control Spread of Carbapenemase Producers among Enterobacteriaceae Worldwide.” *Clinical Microbiology and Infection* 20 (9): 821–30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>.
- Oakley, Brian B., Narjol Gonzalez-Escalona, and Marirosa Molina. 2013. “12. Molecular Typing and Differentiation.” *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, no. October. <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.017>.
- Ochiai, R Leon, Xuanyi Wang, Magdarina Agtini, Jacqueline L Deen, John Wain, Deok Ryun Kim, Mohammad Ali, and John D Clemens. 2005. “Salmonella Paratyphi A Rates, Asia” 11:

2–5.

- Olarte, J., and E. Galindo. 1973. “Salmonella Typhi Resistant to Chloramphenicol, Ampicillin, and Other Antimicrobial Agents: Strains Isolated during an Extensive Typhoid Fever Epidemic in Mexico.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4 (6): 597–601. <https://doi.org/10.1128/AAC.4.6.597>.
- Owen, Siân V, Nicolas Wenner, Rocío Canals, Angela Makumi, Disa L Hammarlöf, Melita A Gordon, Abram Aertsen, Nicholas A Feasey, Jay C D Hinton, and Sherwood Reid Casjens. 2017. “Characterization of the Prophage Repertoire of African Salmonella Typhimurium ST313 Reveals High Levels of Spontaneous Induction of Novel Phage BTP1 Bacterial Strains and Culture Conditions” 8 (February): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00235>.
- Paradiso, Rubina, Serena Lombardi, Maria Grazia Iodice, Marita Georgia Riccardi, Massimiliano Orsini, Sergio Bolletti Censi, Giorgio Galiero, and Giorgia Borriello. 2016. “Complete Genome Sequence of a Lytic Siphoviridae Bacteriophage Infecting Several Serovars of Salmonella Enterica.” *Genome Announcements* 4 (5): 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00943-16>.
- Park, Minjung, Ju-Hoon Lee, Hakdong Shin, Minsik Kim, Jeongjoon Choi, Dong-Hyun Kang, Sunggi Heu, and Sangryeol Ryu. 2012. “Characterization and Comparative Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage, SFP10, Simultaneously Inhibiting Both Salmonella Enterica and Escherichia Coli O157:H7.” *Applied and Environmental Microbiology* 78 (1): 58–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.06231-11>.
- Parry, Christopher M., Sherine Thomas, Esther J. Aspinall, Richard P.D. Cooke, Stephen J. Rogerson, Anthony D. Harries, and Nicholas J. Beeching. 2013. “A Retrospective Study of Secondary Bacteraemia in Hospitalised Adults with Community Acquired Non-Typhoidal Salmonella Gastroenteritis.” *BMC Infectious Diseases* 13 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-107>.
- Pegues, David A., Michael E. Ohl, and Samuel I. Miller. 2006. “Nontyphoidal Salmonellosis.” *Tropical Infectious Diseases* 1: 241–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06668-9.50023-5>.
- Petrov, Vasiliy M, Swarnamala Ratnayaka, James M Nolan, Eric S Miller, and Jim D Karam. 2010. “Genomes of the T4-Related Bacteriophages as Windows on Microbial Genome Evolution.” *Virology Journal* 7 (1): 292. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-292>.
- Phagehunting Program. 2017. “PCI/SDS DNA Extraction.” *Actinobacteriophage Database*, 3. http://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2.2013.pdf.
- Phoba, Marie-france, Barbara Barbé, Octavie Lunguya, Lysette Masendu, Jan Ceysens, Jan Jacobs, Sandra Van Puyvelde, and Stijn Deborggraeve. 2017. “Salmonella Enterica Serovar Typhi Producing CTX-M-15 Extended Spectrum β -Lactamase in the Democratic Republic

of the Congo” 65: 1229–31. <https://doi.org/10.1093/cid/cix342>.

- Pickard, Derek, Ana Luisa Toribio, Nicola K. Petty, Andries Van Tonder, Lu Yu, David Goulding, Bart Barrell, et al. 2010. “A Conserved Acetyl Esterase Domain Targets Diverse Bacteriophages to the Vi Capsular Receptor of Salmonella Enterica Serovar Typhi.” *Journal of Bacteriology* 192 (21): 5746–54. <https://doi.org/10.1128/JB.00659-10>.
- Raton London New York Washington, Boca, DC BACTERIOPHAGES Biology, and Applications BY EDITED Elizabeth Kutter Alexander Sulakvelidze. 2005. *BACTERIOPHAGES Biology and Applications CRC PRESS*.
- Rawashdeh, Mohammad. 2014. “Salmonella Typhi Meningitis in Infants Salmonella Typhi Meningitis In,” no. January 1997.
- Richardson, Harold, and Fiona Smail. 1998. *Medical Microbiology. Bmj*. Vol. 317. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7165.1060>.
- Rippt, Steven, and Robert V Miller. 1995. “Dynamics of the Pseudolysogenic Response in Slowly Growing Cells Of.” *New York*, no. 1 998: 2225–32.
- Roy T. Fisk. 1942. “Studies on Staphylococci : I . Occurrence of Bacteriophage Carriers among Strains of Staphylococcus Aureus Author (s): Roy T . Fisk Published by : Oxford University Press Stable URL : <Http://Www.Jstor.Org/Stable/30089655>.” *The Journal of Infectious Diseases, Vol. 71, No. 2 (Sep. - Oct., 1942), Pp. 153-160* 71 (2): 153–60.
- Ryan, Edwart T, and Jason Andrews. 2019. “Pathogenesis of Enteric (Typhoid and Paratyphoid) Fever - UpToDate.” *UpToDate*, 1–10.
- Serrano, Isa, Manuela Oliveira, José Pedro Santos, Florence Bilocq, Alexandre Leitão, Luis Tavares, Jean Paul Pirnay, and Daniel De Vos. 2017. “Antimicrobial Resistance and Genomic Rep-PCR Fingerprints of Pseudomonas Aeruginosa Strains from Animals on the Background of the Global Population Structure.” *BMC Veterinary Research* 13 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0977-8>.
- Shahrbabak, Salehe Sabouri, Zahra Khodabandehlou, Ahmad Reza Shahverdi, Mikael Skurnik, Hans-wolfgang Ackermann, Markku Varjosalo, and Mojtaba Tabatabaei Yazdi. 2013. “Isolation , Characterization and Complete Genome Sequence of PhaxI : A Phage of Escherichia Coli Printed in Great Britain,” 1629–38. <https://doi.org/10.1099/mic.0.063776-0>.
- Shannon Katiyo, a Berit Muller-Pebody, B, C Mehdi Minaji, b David Powell, c Alan P. Johnson, b Elizabeth De Pinna, c Martin Day, D Ross Harris, and c a Gauri Godbole. 2019. “Epidemiology and Outcomes of Nontyphoidal Salmonella Bacteremias from England, 2004 to 2015.” *Journal of Clinical Microbiology* 57 (1): 1–10.
- Shrivastava, Saurabh Rambiharilal, Prateek Saurabh Shrivastava, and Jegadeesh Ramasamy. 2018. “World Health Organization Releases Global Priority List of Antibiotic-Resistant

- Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.” *JMS - Journal of Medical Society* 32 (1): 76–77. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17.
- Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(4):fnw002. doi:10.1093/femsle/fnw002
- Singhal, Neelja, Manish Kumar, Pawan K Kanaujia, and Jugsharan S Viridi. 2015. “MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis.” *Frontiers in Microbiology* 6 (August): 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>.
- Smith, Andrew D., Jan O. Cowan, Karen P. Brassat, G. Peter Herbison, and D. Robin Taylor. 2005. “New England Journal.” *New England Journal of Medicine* 352: 2163–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904327>.
- Soffer, Nitzan, Joelle Woolston, Manrong Li, Chythanya Das, and Alexander Sulakvelidze. 2017. “Bacteriophage Preparation Lytic for Shigella Significantly Reduces Shigella Sonnei Contamination in Various Foods.” *PLoS ONE* 12 (3): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175256>.
- States, United. 2013. “Antibiotic Resistance Threats in US, 2013.” <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=13>.
- Summary. 2012. “Siphoviridae Siphoviridae Bacteriophages Infecting Lactic Acid Bacteria.”
- Summers, William C. 2001a. *Bacteriophage Therapy. Annual Review of Microbiology*. Vol. 55. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437>.
- . 2001b. “Bacteriophage Therapy.”
- Terms, Full. 2011. “An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses by Twort FW, L.R.C.P. Lond., M.R.C.S. (From the Laboratories of the Brown Institution, London).” *Bacteriophage* 1 (3): 127–29. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16737>.
- THOUAND, G., P. VACHON, S. LIU, M. DAYRE, and M. W. GRIFFITHS. 2016. “ Optimization and Validation of a Simple Method Using P22:: LuxAB Bacteriophage for Rapid Detection of Salmonella Enterica Serotypes A, B, and D in Poultry Samples .” *Journal of Food Protection* 71 (2): 380–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.2.380>.
- Tiwari, Birendra R, and Jungmin Kim. 2013. “Escherichia Coli O157 : H7” 1 (1): 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00085-12>.Copyright.
- Tolen, Tamra N., Yicheng Xie, Adriana C. Hernandez, and Gabriel F.Kuty Everett. 2016. “Complete Genome Sequence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Myophage Mushroom.” *Genome Announcements* 3 (2): 1–2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00154-15>.

- Topley, W. W.C., J. Wilson, and E. R. Lewis. 1925. "The Rôle of the Twort-d'herelle Phenomenon in Epidemics of Mouse-Typhoid." *Journal of Hygiene* 24 (1): 17–36. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031697>.
- Topley, W W C, and J Wilson. 2019. "TWORT-D ' HERELLE PHENOMENON IN THE EPI-Twort-d ' Herelle Phenomenon," 295–300.
- Touchan, Faraj, John D Hall, and Richard V Lee. 2009. "Typhoid Fever during Pregnancy: Case Report and Review." *Obstetric Medicine* 2 (4): 161–63. <https://doi.org/10.1258/om.2009.090020>.
- Trüper, Hans G. 2005. "The Type Species of the Genus Salmonella Lignieres 1900 Is Salmonella Enterica (Ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the Type Strain LT2T, and Conservation of the Epithet Enterica in Salmonella Enterica over All Earlier Epithets T." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (1): 519–20. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63579-0>.
- Turner, Dann, Mohammed Hezwani, Shona Nelson, Vyv Salisbury, and Darren Reynolds. 2012. "Characterization of the Salmonella Bacteriophage VB_SenS-Ent1." *Journal of General Virology* 93 (PART 9): 2046–56. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043331-0>.
- University of Pittsburgh. 2013. "Plaque Purification." *The Actinobacteriophage Database*, 4. <http://phagesdb.org/workflow/Purification/>.
- Villafane, Robert, Milka Zayas, Eddie B Gilcrease, Andrew M Kropinski, and Sherwood R Casjens. 2008. "Genomic Analysis of Bacteriophage E34 of Salmonella Enterica Serovar Anatum (15+)" 13: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-227>.
- Villegas, Andre, Yi Min She, Andrew M. Kropinski, Erika J. Lingohr, Amanda Mazzocco, Shivani Ojha, Thomas E. Waddell, et al. 2009. "The Genome and Proteome of a Virulent Escherichia Coli O157:H7 Bacteriophage Closely Resembling Salmonella Phage Felix O1." *Virology Journal* 6: 5–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-41>.
- Vo, An T.T., Engeline Van Duijkeren, Wim Gastra, and Ad C. Fluit. 2010. "Antimicrobial Resistance, Class 1 Integrons, and Genomic Island 1 in Salmonella Isolates from Vietnam." *PLoS ONE* 5 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009440>.
- Vugia, Duc J., Michael Samuel, Monica M. Farley, Ruthanne Marcus, Beletshachew Shiferaw, Sue Shallow, Kirk Smith, and Frederick J. Angulo. 2004. "Invasive *Salmonella* Infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: Incidence, Serotype Distribution, and Outcome." *Clinical Infectious Diseases* 38 (s3): S149–56. <https://doi.org/10.1086/381581>.
- Wang, Jianbin, Yan Jiang, Myriam Vincent, Yongqiao Sun, Hong Yu, Jing Wang, Qiyu Bao, Huimin Kong, and Songnian Hu. 2005. "Complete Genome Sequence of Bacteriophage T5." *Virology* 332 (1): 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.049>.

- Wayne, P.A. 2009. "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard." *Clinical and Laboratory Standards Institute* 28 (July): 1–99.
- Weber-Dąbrowska, Beata, Marian Mulczyk, and Andrzej Górski. 2001. "Bacteriophage Therapy of Bacterial Infections: An Update of Our Institute's Experience." *Inflammation*, 201–9. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9702-9_15.
- Welkos, Susan, and Minnie Schreiber. 1974. "Identification of Salmonella with the 0-1 Bacteriophage" 28 (4): 618–22.
- WHICHARD, JEAN M., NAMALWAR SRIRANGANATHAN, and F. WILLIAM PIERSON. 2016. "Suppression of Salmonella Growth by Wild-Type and Large-Plaque Variants of Bacteriophage Felix O1 in Liquid Culture and on Chicken Frankfurters." *Journal of Food Protection* 66 (2): 220–25. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.2.220>.
- Woodford, Neil, David W. Wareham, Beatriz Guerra, and Christopher Teale. 2014. "Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Non-Enterobacteriaceae from Animals and the Environment: An Emerging Public Health Risk of Our Own Making?" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (2): 287–91. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt392>.
- Woolston, Joelle, Adam R. Parks, Tamar Abuladze, Bradley Anderson, Manrong Li, Chandi Carter, Leigh Farris Hanna, Serena Heyse, Duane Charbonneau, and Alexander Sulakvelidze. 2013a. "Bacteriophages Lytic for Salmonella Rapidly Reduce Salmonella Contamination on Glass and Stainless Steel Surfaces ." *Bacteriophage* 3 (3): e25697. <https://doi.org/10.4161/bact.25697>.
- Woolston, Joelle, Adam R Parks, Tamar Abuladze, Bradley Anderson, Manrong Li, Chandi Carter, Leigh Farris Hanna, Serena Heyse, Duane Charbonneau, and Alexander Sulakvelidze. 2013b. "Bacteriophages Lytic for Salmonella Rapidly Reduce Salmonella Contamination on Glass and Stainless Steel Surfaces," no. September: 1–6.
- YE, JIANXIONG, MAGDALAENA KOSTRZYNSKA, KARI DUNFIELD, and KEITH WARRINER. 2009. "Control of Salmonella on Sprouting Mung Bean and Alfalfa Seeds by Using a Biocontrol Preparation Based on Antagonistic Bacteria and Lytic Bacteriophages." *Journal of Food Protection* 73 (1): 9–17. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.1.9>.
- Zhou, You, Yongjie Liang, Karlene H Lynch, Jonathan J Dennis, and David S Wishart. 2011. "PHAST : A Fast Phage Search Tool" 39 (June): 347–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>.

კვლევის ფარგლებში გამოქვეყნებული შრომების სია

1. Kakabadze, E., **Makalatia, K.**, Grdzlishvili, N., Bakuradze, N., Goderdzishvili, M., Kusradze, I., ... & Jacobs, J. (2018). **Selection of Potential Therapeutic Bacteriophages that Lyse a CTX- M-15 Extended Spectrum β -Lactamase Producing Salmonella enterica Serovar Typhi Strain from the Democratic Republic of the Congo.** *Viruses*, 10(4), 172.
2. **Makalatia K.**, Kakabadze E., Bakuradze N., Grdzlishvili N., Natroshvili G., Kustaradze I., Goderdzishvili M., Sedrakyan A, Arakelova A., Mkrtychyan M., Macharashvili N., Papiashvili, E., Lavigne R., Lee D., Coffey A., De Vos D., Pirnay J-P., Chanishvili N,
Activity of bacteriophages to multiply resistant strains of salmonella and their various serotypes, 2018, Ukrainian Journal of Biotechnology, 32(1): 500-506.
3. **Makalatia, K.**, Kakabadze, E., Bakuradze, N., Grdzlishvili, N., Natroshvili, G., & Chanishvili, N. (2018). Decontamination Effect of the Eggshells with the Mixture of Salmonella and E. Coli Specific Phages. *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci*, 12(1).
4. E Kakabadze, **K Makalatia**, M Merabishvili, N Grdzlishvili, N Bakuradze, M Mkrtychyan, M Goderdzishvili, J-P Pirnay, N Chanishvili, A Sedrykian, Phage typing, antibiotic resistance and genomic rep-PCR fingerprinting of clinical Salmonella isolates from the Caucasus region, *International Journal of Infectious Diseases*, 2018, 73:148