

Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: Материалы всероссийской конф. – Уфа.2000.-с.87-94.

3. Приворотский В.Ф., Лупова Н.Е., Шильникова О.В.// Логика построения корректирующих медикаментозных программ нарушенного микробиоценоза кишечника у детей. РМЖ.2007.№1.с.6-9.

4. Суворова М.А., Рябчук Ф.Н. Чувствительность микробиоты кишечника к бактериофагам и пробиотикам у детей с заболеваниями органов пищеварения // Педиатрия. № 6.2011.

5. Соболева С.В. Лактоглобулины – препараты нового поколения для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов у детей.// Актуальные вопросы инфекционной патологии. Материалы юбилейной н/п конференции, посвященной 100-летию РНИИМП, 23-24 сентября 2009г. Ростов-на-Дону. С.251-255.

6. Алексанина Н.В., Соболева С.В. Микробиоценоз толстого кишечника детей с диарейными заболеваниями в процессе лечения лактоглобулином против условно-патогенных бактерий и сальмонелл.// Там же. С.302-305.

THE STUDY OF INFLUENCE OF THE IMMUNE LACTOGLOBULIN ON THE SUSCEPTIBILITY TO BACTERIOPHAGES OF SALMONELLA ISOLATED FROM CHILDREN IN EXPERIMENTS IN VITRO

Alexsanina N.V.

Key words: *bacteriophages, Salmonella, immune lactoglobulin*

The susceptibility of the clinical strains of Salmonella, isolated from children with Salmonellosis in the first years of their, to bacteriophages, was investigated. There were received 46 strains of S.typhimurium and 20 strains S.enteritidis. All the cultures possessed high antibiotic resistance and different degrees of sensitivity to Salmonella bacteriophage. It has been shown that the influence of the immune lactoglobulin leads to the restoration of sensitivity of Salmonella to bacteriophage, in the experiments in vitro.

УДК 616.932:576.858.9

РАЗРАБОТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ВИБРИОНОВ

Аленкина Т.В., кандидат медицинских наук,

Коровкина Г.И., кандидат медицинских наук,

Никифоров А.К., кандидат медицинских наук, доцент

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт

«Микроб», Роспотребнадзора, г. Саратов тел. 8(8452) 51-69-65, microbe@san.ru

Ключевые слова: *бактериофаги, фаготипирование, лиофилизация, холера, энтеропатогенные вибрионы*

Работа посвящена разработке режимов лиофилизации, выбору стабилизирующей среды для получения сухих препаратов бактериофагов диагностических холерных ТЭПВ-1-7. Определены физико-химические свойства лиофилизированных бактериофагов, оценена их диагностическая значимость, установлен минимальный срок годности.

Опыт эпидемиологических исследований выявил существенную роль в этиологии кишечных заболеваний человека штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139 серогрупп, близких по многим таксономическим признакам к возбудителю холеры [3, 6]. Клинические заболевания, вызываемые холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп, так называемыми энтеропатогенными, протекают по типу острых гастроэнтеритов, энтероколитов, токсикоинфекций в ряде случаев по клинике и тяжести проявления подобных холере. Заболевания чаще носят спорадический характер, однако регистрируются и крупные вспышки с алгидными формами. В большинстве своем энтеропатогенные вибрионы способны продуцировать термолабильный токсин, сходный с холерным энтеротоксином, цитотоксин, гемолизин, термостабильные токсины, ответственные за развитие диареи. Описаны отдельные штаммы *V. cholerae* не O1/не O139, продуцирующие холерный токсин и содержащие в геноме *ctx*-ген, например штаммы относящиеся к O9, O13, O28, O37, O41 серогруппам [3, 5]. Все это свидетельствует об актуальности эпидмониторинга и правильной диагностики заболеваний вызванных энтеропатогенными вибрионами.

Большую роль в решении указанных задач играют препараты бактериофагов, строгая специфичность которых позволяет проводить индикацию, дифференциацию и фаготипирование бактериальных культур, выделенных из объектов внешней среды. Фаготипирование позволяет не только определить видовую принадлежность изучаемой культуры, но и ее фаготип (фаговар). Этот метод широко применяется в микробиологической практике для идентификации выделенных культур, а также имеет большое значение для эпидемиологического анализа инфекционных заболеваний: установление источника инфекции и путей ее передачи.

Наиболее распространенный подход фаготипирования базируется на выявлении спектра чувствительности выделенной культуры к набору стандартных типовых фагов. Так в РосНИПЧИ «Микроб» выпускается набор «Бактериофаги диагностические холерные ТЭПВ-1, ТЭПВ-2, ТЭПВ-3, ТЭПВ-4, ТЭПВ-5, ТЭПВ-6, ТЭПВ-7, раствор для диагностических целей» (далее ТЭПВ-1–7), предназначенный для фаготипирования и фагодиагностики вибрионов неагглютинирующихся холерной O1 сывороткой, выделяемых от людей и из объектов внешней среды. Бактериофаги в жидком виде имеют ограниченный срок годности (1–2 года), быстро реагируют на изменения температурного режима при транспортировании и хранении, как в сторону повышения, так и понижения (замораживание). Стабильными свойствами и длительным сроком годности характеризуются лиофилизированные бактериофаги [1, 2]. Исходя из этого, целью наших исследований была разработка технологии лиофилизации бактериофагов ТЭПВ-1–7 и определение физико-химических и биологических характеристик сухих препаратов.

Материалы и методы исследований. Бактериофаги ТЭПВ-1–7 выращивали на соответствующих штаммах-продуцентах в бульоне Мартена pH 7,6±0,1 при температуре (37±1) °C. Лيوфилизации подвергались бактериофаги ТЭПВ-1–7, содержащие от 2х10⁸ до 6х10⁹ БОЕ/мл.

Поскольку выживаемость фагов в процессе лиофилизации зависит от состава среды высушивания, которая должна обеспечивать равномерное обезвоживание материала при сушке [1, 2, 7], в качестве стабилизаторов выбраны 8 вариантов сред: 1 – пептон 10 %, желатин 1,5 %, натрия глутамат 5 %; 2 – пептон 10 %, желатин 2 %; 3 – натрия глутамат 10 %; 4 – лактоза 20 %; 5 – сахароза 25 %, крахмал 2 %; 6 – раствор бессолевого пептона 5 %; 7 – пептон 5 %, желатин 0,7 %; 8 – сахароза 10 %, желатин 1,5 %. Защитные среды перед лиофилизацией

соединяли с бактериофагами в соотношении 1:1.

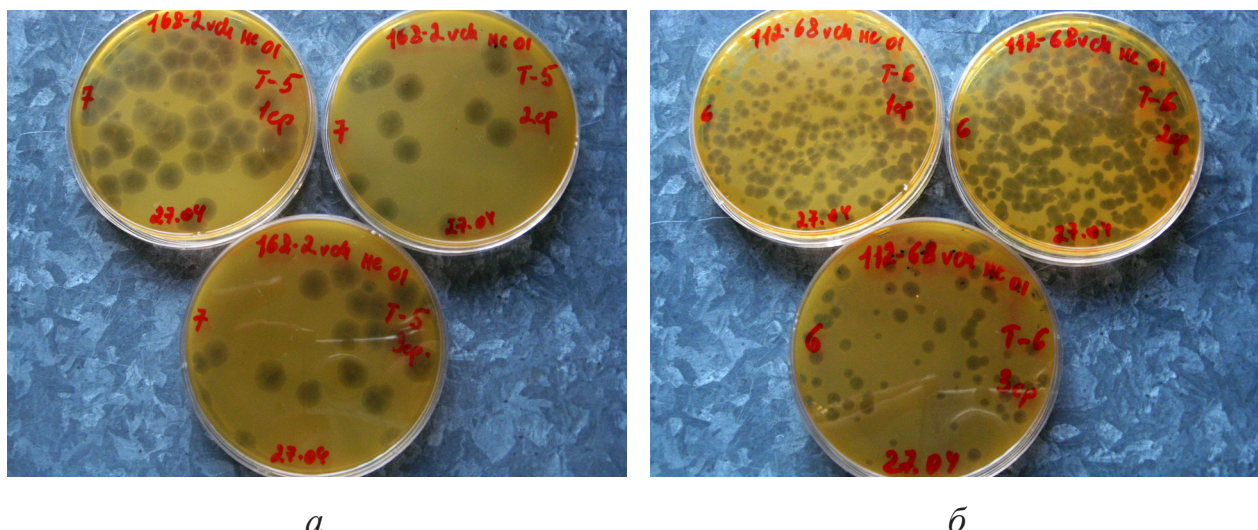
Результаты предварительных экспериментов по отработке режимов лиофилизации позволили установить в качестве оптимального 24-часовой режим, при этом продолжительность периода сублимации составляла (5 ± 1) ч, десорбции – (19 ± 1) ч.

Специфическую активность (концентрацию фаговых частиц и спектр литической активности) до и после лиофилизации препаратов определяли методом агаровых слоев соответственно с индикаторными и контрольными штаммами *V. cholerae* не O1 фаготипов I–VII, а также *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *E. coli*. На агаровые слои с контрольными штаммами бактериофаги наносили репликатором.

Результаты исследований и их обсуждение. На первом этапе исследования показали, что максимальное количество выживших фаговых частиц наблюдалось при использовании сред высушивания 1, 2, 3 и, в зависимости от фага, находилось в пределах $1,0 \times 10^7$ – $2,8 \times 10^9$ БОЕ/мл. При лиофилизации со стабилизаторами 4–8 количество жизнеспособных частиц составляло от $1,0 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^7$ БОЕ/мл, что в среднем в 620 раз ниже исходных значений. Поскольку низкая концентрация фаговых частиц может привести к изменению спектра литической активности бактериофага, то есть к потере диагностической ценности препарата, среды 4–8 были исключены из дальнейших исследований.

На втором этапе нашей работы была проведена сравнительная оценка эффективности отобранных стабилизаторов в повторных экспериментах. Установлено, что все бактериофаги ТЭПВ, высушенные на средах 1, 2, 3, представляли собой аморфную массу светло-коричневого цвета, полностью растворялись в течение 1–2 минут независимо от защитной среды. Одним из важных показателей сухих препаратов является потеря в массе при высушивании, от которой зависит растворимость и стабильность свойств при хранении. Потеря в массе при высушивании у бактериофагов ТЭПВ-1–7, лиофилизированных со средой 1, составляла в среднем от 1,37 до 2,01 %, со средой 2 – от 1,08 до 1,48 %, со средой 3 – от 5,04 до 6,49 %. Оптимальные значения показателя потери в массе при высушивании для бактериофагов находятся в пределах 1–3 %. В наших экспериментах такие показатели характерны для образцов бактериофагов ТЭПВ-1–7, высушенных со средами 1 и 2.

Установлено, что при применении трехкомпонентной среды (среда 1) количество жизнеспособных частиц бактериофагов ТЭПВ составило в среднем от $2,9 \times 10^9$ до $4,0 \times 10^7$ БОЕ/мл, то есть уменьшилось в среднем в 2,1 раза по сравнению с жидкой формой (от $6,0 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^8$ БОЕ/мл). При лиофилизации на двухкомпонентной (среда 2) и однокомпонентной (среда 3) средах количество выживших фаговых частиц находилось в пределах $1,0 \times 10^9$ – $2,0 \times 10^6$ и $1,4 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^7$ БОЕ/мл соответственно, в среднем отмечалось снижение концентрации фаговых частиц в 6,2 и 41,3 раза. Полученные данные свидетельствовали о преимуществе защитной среды 1, обеспечивающей лучшую выживаемость бактериофагов ТЭПВ-1–7 в процессе лиофилизации (Рис. 1).



а

б

Рис. 1 - Изучение выживаемости бактериофагов ТЭПВ-5 (а) и ТЭПВ-6 (б) после лиофилизации со стабилизаторами 1, 2, 3.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение стабильности бактериофагов ТЭПВ-1–7 в процессе хранения в условиях, предусмотренных нормативной документацией [4]. Изучение физико-химических (внешний вид, растворимость, pH, потеря в массе при высушивании) и биологических (специфическая активность) свойств лиофилизированных препаратов, хранившихся при температуре $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$, проводили через 1, 2, 3 и 3,5 года, что необходимо для установления их срока годности.

Результаты показали, что наибольшее снижение количества частиц у отдельных бактериофагов ТЭПВ-1–7 происходило в течение первого года. При этом у бактериофагов лиофилизированных со средой 1 количество фаговых частиц снизилось в 3 раза, со средой 2 – в 11 раз, со средой 3 – в 23 раза. В дальнейшем при хранении препаратов снижение концентрации фаговых частиц составило не более 3–5 %. Физико-химические характеристики сухих бактериофагов ТЭПВ-1–7 в процессе хранения практически не изменялись.

Анализ полученных данных показал преимущества трехкомпонентной защитной среды (среда 1), которая применялась впоследствии для изготовления 4 экспериментально-производственных серий бактериофагов диагностических холерных ТЭПВ-1–7, лиофилизатов для диагностических целей, представленных на расширенные межлабораторные испытания.

В результате проведенных испытаний установлено, что:

1. Лиюфилизаты представляют собой аморфную массу светло-коричневого цвета. После растворения – прозрачная жидкость светло-желтого цвета. Содержимое ампулы полностью растворяется в 1 мл воды очищенной при встряхивании в течение 1 мин, что соответствует предварительно установленному в проекте ТУ пределу растворимости – 2 мин.

2. pH препаратов находится в пределах от 6,8 до 7,06, что соответствует предварительно установленному в проекте ТУ пределу pH от 6,5 до 7,6.

3. Потеря в массе при высушивании находится в пределах 0,7–1,9 %, что соответствует предварительно установленному в проекте ТУ пределу данного показателя – не более 3 %.

4. Специфическая активность, определяемая по количеству фаговых частиц в 1 мл, у лиофилизированных бактериофагов ТЭПВ-1–7 находилась в пределах 9×10^6 – 9×10^8 . Количество фаговых частиц в 1 мл у жидких (коммерческих) препаратов – в пределах 5×10^7 – $2,8 \times 10^9$.

В процессе лиофилизации, как известно, происходит снижение количества фаговых частиц в 1 мл на 1–2 порядка. В соответствии с ТУ 8637-019-01898109-2008 для обеспечения

специфической активности жидкие бактериофаги ТЭПВ-1,2,4,5,6,7 должны содержать не менее 1×10^7 , а ТЭПВ-3 – не менее 1×10^6 фаговых частиц в 1 мл. Таким образом, для лиофилизированных препаратов количество фаговых частиц, обеспечивающих специфическую активность бактериофагов ТЭПВ-1,2,4,5,6,7 должно составлять не менее 1×10^6 , а ТЭПВ-3 – не менее 1×10^5 .

5. Спектр литической активности лиофилизированных препаратов бактериофагов ТЭПВ-1–7 экспериментально-производственных соответствовал аналогичным показателям коммерческого (жидкого) препарата. Каждый бактериофаг ТЭПВ проявлял литическую активность только в отношении штамма гомологичного фаготипа и не лизировал культуры *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Comamonas* и *E. Coli*.

6. На основании данных изучения стабильности лиофилизированных бактериофагов ТЭПВ-1–7 в процессе хранения был установлен срок годности – 3 года (срок наблюдения). Срок годности жидкого препарата – 2 года.

По результатам испытаний было рекомендовано продолжить изучение стабильности свойств лиофилизированных серий бактериофагов ТЭПВ-1–7 с целью увеличения срока годности до 4 лет, а также направить препарат на государственные испытания для дальнейшего его внедрения в практику здравоохранения.

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана лиофилизированная форма бактериофагов диагностических холерных ТЭПВ-1–7, определены их физико-химические и биологические характеристики, установлен срок годности.

Библиографический список

1. Булыгина Е.М., Беликова В.А., Образцова Н.В. Изучение условий лиофилизации фагов. // Матер. Международн. науч. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия», Минск, 22-24 мая 2002 г. Минск, 2002, С. 15-16.
2. Македонова Л.Д., Кудрякова Т.А., Кадетов В.В., Наталич Л.А. Лيوфилизация фагов холерных вибрионов О1 и не О1 групп//Проблемы криобиологии, № 2, 1991, с. 34-39.
3. Онищенко Г.Г., Ганин В.С., Голубинский Е.П. Вибрионы не О1 серологической группы и их значение в патологии человека – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. 2001, 384 с.
4. Санитарные правила СП 3.3.2.1248-3 “Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов”. М. 2003 г.
5. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. Изд-во: Пенза: ПГУ. 2002, 232 с.
6. Хотько Н. И. Организационные и методические аспекты противоэпидемического обслуживания населения. Изд-во: М.: Военный институт ВВ МВД России, Пенза: Медицинский институт ПГУ. 2005, 379 с.
7. Фурик Н.Н., Кононович Е.М., Картель А.Н. Влияние состава защитных сред на выживаемость бактериофагов молочнокислых бактерий при лиофилизации//Пищевая промышленность: наука и технология, № 3(5), 2009, с. 36-39.

DEVELOPMENT OF THE LYOPHILIZED CHOLERA BACTERIOPHAGE PREPARATIONS FOR TYPING ENTEROPATHOGENIC VIBRIOS

Alenkina T.V., Korovkina G.I., Nikiforov A.K.

Key words: *bacteriophages, liophilization, cholera, enteropathogenic vibrios.*

The article contains information on the liophilisation modes - selection of stabilizing

(cell maintenance) media for the obtainment of diagnostic cholera TEPV-1-7 bacteriophage dry preparations. Determined are physical-chemical properties of lyophilized bacteriophages, estimated is their diagnostic value, established is the shelf life limit.

УДК 578.81

БАКТЕРИОФАГИ В РОССИИ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ

Алешкин В.А., доктор биологических наук, профессор, (495)452-18-16, info@gabrich.com

Алешкин А.В., доктор биологических наук, (495)452-18-16, ava@gabri.ru

С.С. Афанасьев, доктор медицинских наук, профессор, (495)452-18-16, info@gabrich.com

ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Ключевые слова: бактериофаги, фаготерапия, фагопрофилактика.

Все большее распространение получают штаммы патогенных бактерий, характеризующиеся высокой термостабильностью, устойчивостью ко многим современным антибиотикам и дезинфицирующим средствам, способные вызывать спорадические случаи и вспышки госпитальной инфекции с высоким уровнем смертности среди пациентов. В этой ситуации, пользуясь накопленным в России многолетним опытом, логично предложить открытый для всего мира заново класс антибактериальных средств на основе бактериофагов. С 1930-х годов на всей территории бывшего Советского Союза врачи начали применять бактериофаги для профилактики и лечения инфекционных заболеваний у людей. Позже, в сороковые годы двадцатого столетия на базе четырех институтов вакцин и сывороток (в Уфе, Тбилиси, Нижнем Новгороде и Перми) было организовано производство свыше десятка наименований лекарственных средств как на основе отдельных видов бактериофагов, так и их комбинаций для лечения и профилактики острых кишечных инфекций, а также против возбудителей ряда гнойно-воспалительных инфекций. В настоящее время в Российской Федерации бактериофаги используются не только в качестве природных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями у людей, животных и сельскохозяйственных культур, но и в составе санитарно-гигиенических мероприятий в пищевой промышленности, сфере общественного питания, в детских и воинских коллективах, а также лечебно-профилактических учреждениях. Ученые во всем мире могли бы использовать накопленный в России опыт при планировании будущих исследований по бактериофагам.

Во время Первой мировой войны среди ученых-микробиологов распространилась сенсационная новость, что Феликс д'Эрель открыл вирусы, «пожирающие бактерии», и что ему удалось разработать фаговые препараты для лечения солдат, заразившихся дизентерией [1]. Врачи во всем мире были воодушевлены этим известием, особенно потому, что сообщения, опубликованные в медицинских журналах, указывали, что вирусы-бактериофаги безвредны для людей и животных и могут успешно использоваться как терапевтические средства [2].

В действительности история бактериофагов началась задолго до этого сообщения. В 1896 английский бактериолог Эрнест Хэнбери Хэнкин попытался подсчитать число бактерий *Vibrio cholera* в 1 мл воды, взятой из реки Ганг. Забор образцов производился в 2-х местах: где река входила в город Агра и где выходила из него. К своему удивлению Хэнкин обнаружил, что