

25. Анпилов Л.И., Прокудин А.А. Профилактическая эффективность сухого поливалентного дизентерийного бактериофага в организованных коллективах// Военно-медицинский журнал, 1984, №5, С. 39-40.

## **BACTERIOPHAGES IN RUSSIA: PAST, PRESENT AND FUTURE**

*Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanas'ev S.S.*

**Key words:** *bacteriophages, phage therapy, phage prophylaxis.*

*The more prevalent bacterial strains increasing in numbers are those with high thermostability, resistant to many present-day antibiotics and disinfectants, those which are capable to cause hospital infective episodes with high mortality incidence among patients. In this situation using the accumulated Russian experience it is logical to propose the development in a world of a renewed class of antibacterial agents based on bacteriophages. Since 1930s in different part of the Soviet Union a lot of doctors began to use phages in human prophylaxis and therapy. Later In the 1940s four Institutes for Vaccines and Sera (in Ufa, Tbilisi, Nizhnii Novgorod, and Perm') began to produce a dozen medicinal compounds based on several individual species of bacteriophages or their combinations which are used to treat and prevent acute intestinal infections and to control causative agents of certain pyoinflammatory infections. In recent years in the Russian Federation phages are used not only as natural antimicrobial agents to fight against bacterial infections in humans, animals and agricultural plants, but also they are used in conjunction with sanitary and hygienic activities in food industry, public catering, children's collectives, military units and hospitals. Therefore, world scientists should not neglect these clinical results when designing any future studies.*

УДК. 576.858.9+616.936.49:598.2/9

### **ВЫДЕЛЕНИЕ НОВЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПТИЦЕФАБРИКАХ**

*Андреева И.С., к.б.н., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
тел. 8(383) 363-47-79, andreeva\_IS@vector.nsc.ru;*

*Афонюшкин В.Н., к.б.н., ИХБФМ СО РАН,  
тел. 8 923 117 64 61, lisocim@mail.ru;*

*Соловьянова Н.А., Селиванова М.А., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
тел. 8(383) 363-47-79;*

*Зайцев Б.Н., к.ф.-м.н., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», тел. (383) 336-71-53;*

*Закабунин А.И., ИХБФМ СО РАН, тел. 89231723193;*

*Емельянова Е.К., к.б.н., ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ГБОУ ВПО НГМУ  
Минздравсоцразвития, тел. 89139048741*

**Ключевые слова:** *Бактериофаги, кишечные инфекции птиц, сальмонеллез, резистентность к антибиотикам*

*Работа посвящена выделению новых бактериофагов, проявляющих активность против патогенных энтеробактерий, выделяемых из проб патологического материала, продукции животноводства и птицеводства, образцов кишечного содержимого птиц. Показано, что обнаруженные бактериофаги проявляют специфическую активность по отношению к штаммам рода *Salmonella* из разных источников выделения, что дает возможность рекомендовать их для разработки комплексного поливалентного сальмонеллезного фагового препарата.*

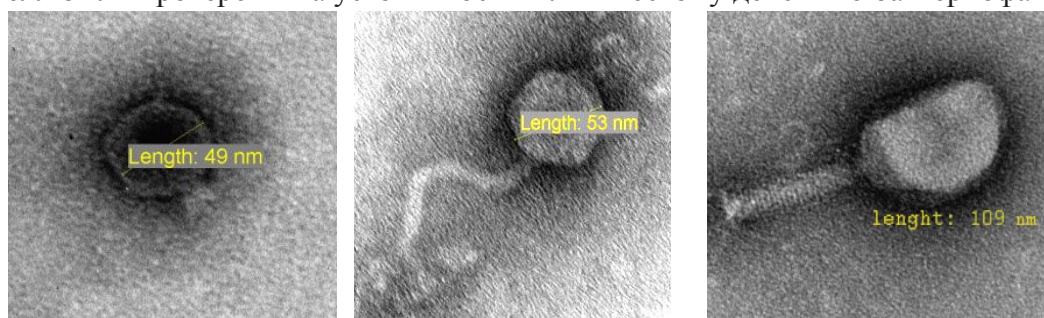
Введение. Сальмонеллез — одна из наиболее распространенных и опасных токсикоинфекций человека, сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Основным путем заражения при сальмонеллезе обусловлен употреблением в пищу продуктов, контаминированных сальмонеллами. В последние годы отмечается значительный рост заболеваемости сальмонеллезом, связанный с распространением возбудителя через мясо птицы и яйца. При попадании возбудителя в крупные птицеводческие хозяйства он быстро поражает большую часть поголовья. Возбудителями сальмонеллезом является группа бактерий семейства Enterobacteriaceae, рода *Salmonella*, насчитывающая в настоящее время более 2500 серотипов. Все серовары сальмонелл относятся к двум видам: *S. bongori* и *S. enterica*. Последний делят на 5 подвигов, обозначаемых собственными именами и цифрами: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) и *indica* (V). Для человека патогенны первые два подвида, причем подвид *enterica* (I) включает в себя большую часть известных в настоящее время сероваров сальмонелл (1400 из 2500). В этиологии внекишечного сальмонеллеза основную роль играют *S. typhimurium* (34%) и *S. enteritidis* (21%) [1, 2]. Смертность при внекишечных формах сальмонеллеза у человека варьирует от 7% для инфекций костно-суставной системы, до 60-80% для инфекций дыхательной системы и ЦНС [3]. В последние десятилетия во многих странах получили широкое распространение разновидности ряда сероваров (*S.wien*, *S.typhimurium*, *S.haifa*, *S.enteritidis* и др.), отличающиеся повышенной термоустойчивостью и устойчивостью к дезинфицирующим средствам, а также множественной устойчивостью к действию антибиотиков [4]. В сложившейся ситуации достойную альтернативу антибиотикам в терапии множества болезней бактериального происхождения способны составить бактериофаги [5]. Важно, что фаговые препараты высокоактивны в отношении патогенных бактерий, включая антибиотикорезистентные, не вызывают побочных токсических и аллергических реакций и не имеют противопоказаний. Лечебно-профилактическая эффективность бактериофага зависит от того, в какой мере его структура соответствует этиологической структуре заболеваний конкретной территории, на которой он применяется. Создание высокоэффективных препаратов бактериофагов достигается за счет систематического подбора штаммов фагов с широкой валентностью и высокой силой литического действия от больных и бактерионосителей, а также при постоянном обновлении производственных бактериальных культур за счет вновь выделенных. В настоящей работе приводятся данные по выделению из естественных источников штаммов сальмонелл и бактериофагов, обладающих по отношению к ним литической активностью. Особое внимание уделялось отбору образцов для исследования во время вспышек сальмонеллезом на птицефабриках.

Материалы и методы исследований. В качестве субстратов для выделения бактериофагов и штаммов сальмонелл были использованы образцы патологического материала, продукции животноводства и птицеводства, пробы кишечного содержимого птиц. Для изоляции микроорганизмов использовали селективные и элективные среды (среду Эндо, селенитовый бульон, висмут-сульфитагар). Идентификацию выделенных бактериальных штаммов проводили в соответствии с [6,7]. В процессе биохимической идентификации первоначально от-

бирали колонии уреазонегативных бактерий, образующих сероводород и ферментирующих глюкозу, но не сахарозу. Бактериальные изоляты пересеивали на среду Гисса с маннитом и 1%-ю пептонную воду для выявления способности к образованию индола. Культуры, обладающие характерными для сальмонелл признаками, дополнительно типировали на питательной среде «Уриселект 4» (BioRad) для исключения бактерий родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, также растущих на висмут-сульфитагаре. Чувствительность к антибиотикам изучали методом определения антибиотикорезистентности в микропланшетном формате [8, 9] и с помощью дисков производства НИЦФ (Санкт-Петербург, Россия). Количество антибиотиков в 1 диске составляло: для рифампицина – 5 мкг, бензилпенициллина, оксациллина, ампициллина, импенема и гентамицина – 10 мкг, эритромицина, линкомицина – 15 мкг, канамицина, тетрациклина, левомицетина, ванкомицина – 30 мкг, карбенициллина – 100 мкг. Выделение бактериофагов, приготовление фаголизатов, титрование фаговых суспензий, определение чувствительности к выделенным фагам штаммов сальмонелл выполняли в соответствии с [6-8, 10]. Морфологию бактериофагов изучали с помощью электронной микроскопии методом негативного контраста. Исследование нуклеиновой кислоты фагов проводили согласно [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Недостатком традиционной схемы изоляции сальмонелл является тот факт, что и селенитовый бульон и висмут-сульфитагар селективны в отношении грам-отрицательных микроорганизмов, активно продуцирующих сероводород. Более эффективна была первичная изоляция бактерий на среде Эндо, при этом посевная доза сальмонелл может варьировать до единичных клеток, что не влияет на выживаемость сальмонелл в данной среде. Однако при исследовании желудочно-кишечного тракта птиц данный метод оставался недостаточно эффективным ввиду возможности ползущего роста *Proteus vulgaris* на среде Эндо, поскольку данный микроорганизм всегда встречается в кишечном содержимом птиц. Использование среды XLT4 позволило исключить негативное влияние микроорганизмов рода *Proteus* на рост сальмонелл при их первичной изоляции. Схема изоляции была следующей; посев образцов на среду Эндо, инкубирование в течение 16 ч, рассев выросших бледно-розовых колоний на среду XLT4, инкубация 24-48 ч, одновременно посев изолятов штрихом на среды висмут-сульфитагар и уриселект-4 для подтверждения продукции сероводорода и исключения триптофандезаминазной активности, соответственно. В дальнейшем изоляты, обладающие культуральными и тинкториальными характеристиками сальмонелл, типировали иммунохимически, биохимически или с помощью ПЦР. Первоначально, при высевах образцов на селективные среды, для дальнейшего исследования было отобрано около 200 бактериальных колоний, и только 62 изолята были идентифицированы, как относящиеся к роду *Salmonella*. Выделенные штаммы были проверены на устойчивость к антибиотикам. Выяснено, что все они являются полирезистентными штаммами, проявляющими устойчивость к 6-13 антибиотикам из 14-ти, примененных в настоящей работе. Гены устойчивости к антибиотикам у сальмонелл могут быть расположены как в хромосоме, так и в плазмидах и, как правило, образуют кассеты, локализующиеся внутри транспозонов, которые могут переноситься из хромосомы в плазмиду и обратно. Благодаря конъюгативности большинства таких плазмид, этот механизм обеспечивает широкое распространение генов антибиотикорезистентности среди сальмонелл [12]. В настоящей работе показано, что множественная устойчивость к антибиотикам была наиболее выражена у штаммов, выявленных в образцах птицефабрик, где для борьбы с сальмонеллезом особенно активно используют антибиотики. Штаммы, выделенные из этих образцов, были резистентны к таким антибиотикам, как эритромицин, ванкомицин, линкомицин, пенициллин, карбенициллин и рифампицин, в то же время, за исключением единичных штаммов, изоляты сальмонелл были высокочувствительны к имипенему. Следует отметить, что этот препарат является препаратом резерва и имеет некоторые ограничения в ис-

пользовании. При его применении могут развиваться аллергические реакции, дисбактериоз, гиповитаминоз и другие нежелательные реакции. Следующими по эффективности действия на выделенные сальмонеллы были оксациллин, левомицетин, канамицин и амикацин, более 50% штаммов были к ним чувствительны. К таким антибиотикам, как тетрациклин, ампициллин, гентамицин резистентность проявили около 70% исследуемых штаммов. В исследуемых образцах было обнаружено три морфологических типа бактериофагов (рис.1) с бинальным типом симметрии. Штаммы полученной коллекции полирезистентных к антибиотикам изолятов сальмонелл были проверены на устойчивость к литическому действию бактериофагов.



**Рис. 1 - Морфологические типы выделенных бактериофагов.**

Фаги Ph1 и Ph2 состояли из икосаэдрической головки 40-50 нм в диаметре, фаг Ph3 имел иную форму и более крупные размеры (40-50×100-110 нм). Структура и длина хвостовых участков фагов была различна, нуклеиновая кислота фагов была представлена ДНК, что было продемонстрировано по ее чувствительности к панкреатической ДНКазе. Исследование полученных бактериофагов на способность к лизису изолятов сальмонелл и ряда коллекционных бактерий рода *Escherichia* и *Shigella* показало, что из 45 изученных штаммов *Salmonella sp.* 17 штаммов, представленные в основном *S. enterica*, были резистентны по отношению ко всем трем тестируемым бактериофагам, остальные штаммы были избирательно чувствительны к фагам в разных сочетаниях, что позволило их разделить на следующие группы: штаммы сальмонелл, чувствительные ко всем трем бактериофагам; штаммы, чувствительные только к одному из них: фагу Ph1, Ph2 или к фагу Ph3; штаммы, чувствительные к фагам Ph2 и Ph3 и штаммы, чувствительные к фагам Ph1 и Ph2. Показано также, что бактериофаги не проявили литическую активность относительно патогенного тест-штамма *Shigella sonnei* 32, а коллекционный тест-штамм *Salmonella typhimurium* 2606 лизировался только фагом Ph1. По отношению к штаммам *E.coli* B и *E.coli* CR63 был активен только фаг Ph3, что дает возможность нарабатывать его на колийных, более безопасных штаммах. Дополнительно, на чувствительность к фагам Ph1, Ph2 и Ph3 были проверены 5 бактериальных изолятов также идентифицированных как *S. enterica*, выделенных из очагов сальмонеллезных вспышек на птицефабриках. Выяснено, что фаг Ph3 способен лизировать четыре из пяти штаммов и что все пять тестируемых штаммов *S. enterica* были резистентны к фагам Ph1 и Ph2. Важно подчеркнуть, что выделенные в данной работе изоляты сальмонелл, проявили полирезистентность к антибиотикам, широко используемым в практике ветеринарии и медицины, что затрудняет процесс лечения, вызванных ими заболеваний, с применением антибиотических препаратов.

**Заключение.** В результате проведенных исследований показано, что обнаруженные бактериофаги Ph1, Ph2 и Ph3 проявляют специфическую активность по отношению к патогенным штаммам рода *Salmonella* из разных источников выделения, что дает возможность рекомендовать их для разработки комплексного поливалентного фагового препарата, направленного для лечения сальмонеллезов, вызванных возбудителями, обладающими множественной устойчивостью к антибиотикам.



**Библиографический список**

1. Ф.Н. Шубин, Н.И. Ковальчук, Н.А. Кузнецов, Г.В. Ревина, А.В. Раков, Д.В. Маслов, Е.М. Нечухаева, Л.К. Гребенькова, Н.Г. Кошелева и Ю.Н. Хорошевская, Г.П. Горшунова, Н.А. Белоголовкина. «Кишечные инфекции. Предэпидемическая диагностика и профилактика госпитального сальмонеллеза. М.У. № 3.1.1.016-2000», Издание официальное. Центр госсанэпиднадзора в Приморском крае Владивосток, 2001, С.24.
2. А.В. Раков, Ф.Н. Шубин, В.А. Иванис. Кишечные инфекции. Внекишечные проявления сальмонеллезной инфекции. М.У. № 3.1.1.0-28-04. Издание официальное. Центр Госсанэпиднадзора в Приморском крае. Владивосток, 2004, С.23.
3. Aguado J.M., Ramos J.M., Garciacorbeira P., Ales J.M., Fernandez-Guerrero M.L., Soriano F. Clinical spectrum of focal infection by *Salmonella* no-typhi. // *Medicina Clinica*, 1994, Vol. 103, P. 293-298.
4. Милютин Л.Н., Гурьева О.В., Рожнова С.Ш., Головинова М.А. К вопросу об эволюции лекарственной резистентности сальмонелл enteritidis, выделенных от детей // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008, № 2, С. 44–47.
5. Красильников И.В., Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Лобастова А.К. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития. // *Сибирский медицинский журнал*. 2011, Т. 26, № 2, Выпуск 2, С. 33-37.
6. Руководство по медицинской микробиологии, кн. 1 / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной // М., «Бином», 2008, 1077 с.
7. Руководство по медицинской микробиологии, кн. 2. /Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой // М., «Бином», 2010, 1150 с.
8. Афонюшкин В.Н. Антибиотикорезистентность сальмонелл в Сибири. / Афонюшкин В.Н., Дударева Е.В., Малахеева Л.И., Филипенко М.Л. // *Ветеринария*. 2008, № 1, С. 7-9.
9. Hall and Collis, 1995 R.M. Hall and C.M. Collis, Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination, *Mol. Microbiol.* 15 (1995), pp. 593–600.
10. Основы бактериофагии / Под ред. И.М.Габриловича // Изд. «Высшая школа». Минск, 1973, 221 с.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, 480 с.
12. Tosini et al., F. Tosini, P. Visca, I. Luzzi, A.M. Dionisi, C. Pezzella, A. Petrucca and A. Carattoli, Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998), pp. 3053–3058.

**ISOLATION OF NEW BACTERIOPHAGES SUITABLE FOR PREVENTION AND TREATMENT OF INTESTINAL INFECTIONS OF CURRENT INTEREST AT POULTRY FARMS**

*Andreeva I.S., Afonyushkin V.N., Solovyanova N.A., Selivanova M.A., Zaitsev B.N., Zakabunin A.I., Emelyanova E.K.,*

**Keywords:** *Bacteriophages, intestinal infections of birds, salmonellosis, antibiotic resistance*

*The work is devoted to isolation of new bacteriophages active against pathogenic enterobacteria from samples of pathological material, meat and poultry, samples of intestinal contents of birds. It is shown that the detected bacteriophages exhibit specific activity against Salmonella*

*strains isolated from various sources, which allows us to recommend them for the development of a complex polyvalent phage preparation against salmonellosis.*

УДК 579.871.9:615.281.9:616-07:616-08

## ПОЛУЧЕНИЕ ТОНКОДИСПЕРСНОЙ СУСПЕНЗИИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК – ПУТЬ К ПРОМЫШЛЕННОМУ ПРОИЗВОДСТВУ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ КАК ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЁЗА

*Болдырев А.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
boldyrev@vector.nsc.ru*

*Туманов Ю.В., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
тел. 8 (383) 363-47-51, tumanov@vector.nsc.ru*

*ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, микобактериофаг D29, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, МЛУ-туберкулёз, ШЛУ-туберкулёз, детергенты*

*Статья посвящена разработке метода получения тонкодисперсной культуры клеток Mycobacterium smegmatis, не патогенной для человека и животных. Используя культуру клеток M. smegmatis в таком виде, удалось осуществить культивирование литического микобактериофага D29, одновременно вирулентного и для патогенной микобактерии Mycobacterium tuberculosis, без потерь культуры. В статье сообщается подобранный состав ростовой питательной среды для культивирования M. smegmatis, компоненты для приготовления которой имеются в любой бактериологической и молекулярно-биологической лаборатории. Разработанная схема получения фаголизата литического микобактериофага D29 является прототипом для промышленного получения других литических микобактериофагов, поскольку условия для культивирования клеток микобактерий и микобактериофагов соответствуют национальным требованиям обеспечения биологической безопасности персонала при работе с этими объектами. Таким образом, микобактериофаги могут быть наработаны в необходимых количествах и в виде фаголизата, и в виде суспензии фага и использованы для лечения.*

**Введение.** Исследования по получению тонкодисперсной суспензии культуры клеток (КК) *M. smegmatis* были выполнены в 2005–2007 гг. в ГНЦ ВБ «Вектор» и направлены на разработку технологического регламента для промышленного производства литических микобактериофагов. Иммунобиологические препараты, включающие микобактериофаг(и), должны быть доступны государственным учреждениям различного профиля: медицинским, ветеринарным, научно-исследовательским для осуществления исследований, нацеленных на борьбу с туберкулёзом.

Около трети населения планеты инфицировано преимущественно микобактериями вида *M. tuberculosis*. В 2011 г. из 8,7 млн чел., заболевших туберкулёзом во всём мире, 1 млн 131 тыс. выявлены как ВИЧ-инфицированные; смертность в 2011 г. составила 1,4 млн чел., включая 990 тыс. ВИЧ-отрицательных и 430 тыс. ВИЧ-положительных.

В России инфицированность превышает 80 %. Она входит в число 22 неблагоприятных по туберкулёзу стран и находится на 18-м месте (заболеваемость в 2011 г. составила 73 случая на 100000 населения против 645 в Южной Африке, занимающей 1-е место) [1]. По