

## THE INFLUENCE OF BACTERIOPHAGE ON THE GUT MICROFLORA

*Zatevalov A.M., Kopanov J.A., Aleshkin A.V., Afanasiev S.S.*

**Key words:** *functional activity of intestinal microflora, volatile fatty acids, and fagochuvstvitelnost fagorezistentnost, preparations of bacteriophages.*

*Identification of evaluation criteria and effectiveness of bacteriophages for correction and normalization of the intestinal microbiota is the important aim which can be solved by comparing the parameters of functional activity and phenotypic properties of the intestinal microflora, as well as by determining selectivity of bacteriophage preparations for a normal and conditionally pathogenic intestinal microflora in vitro and in vivo.*

УДК 619:579.852.13

## ЗНАЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ФАГОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ BACILLUS ANTHRACIS

*Капустин А. В., кандидат ветеринарных наук, доцент,  
kapustin\_andrei@mail.ru*

*Моторыгин А. В. кандидат ветеринарных наук, motor.86@mail.ru*

*ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»*

**Ключевые слова:** *сельскохозяйственные животные, бациллы, сибирская язва, вакцинация, патологический материал, фагодиагностика.*

*В работе приведены данные по изучению диагностических свойств бактериофагов и их применение для идентификации возбудителя сибирской язвы. По результатам проведенных исследований установлено, что исследуемые культуры Bacillus anthracis обладали высокой чувствительностью к бактериофагу, что позволило дифференцировать возбудителя сибирской язвы от других видов Bacillus.*

**Введение.** Сибирская язва – острое инфекционное заболевание из группы зоонозов, отнесенное к списку наиболее опасных карантинных инфекций. Болезнь главным образом травоядных животных, при этом смертность может достигать 80%. В последние годы в РФ ежегодно регистрируется от 3 до 11 вспышек сибирской язвы [5]. Этиологическим агентом является спорообразующие, грамположительные, палочки Bacillus anthracis, единственный облигатный патоген из рода Bacillus. Большинство других видов Bacillus являются повсеместно распространенными обитающими в окружающей среде сапрофитами, некоторые из них, а именно Bacillus cereus, Bacillus licheniformis и Bacillus subtilis, могут ассоциироваться с пищевыми отравлениями у людей и с другими клиническими проявлениями, как у людей, так и у животных [1-3,8].

На встрече Экспертного комитета по биологической стандартизации в 1998 году были проанализированы имеющиеся международные стандарты и список используемых биологиче-

ских препаратов ветеринарного назначения для диагностики и профилактики сибирской язвы и в результате были предложены новые методики и составлен актуальный список препаратов. Однако эти меры не позволяют отказаться от используемых в настоящее время методов диагностики и профилактики, в частности, ветеринарных вакцин против сибирской язвы, разработанных ещё в 60-х и 70-х годах. В некоторых странах для диагностики сибирской язвы в разложившихся тушах или продуктах животного происхождения до сих пор используют термопреципитиновый тест, описанный А. Асколи в 1910 г.

Основные трудности лабораторной диагностики сибирской язвы заключаются в том, что при естественном разложении туши животного большинство вегетативных организмов уничтожается под действием гнилостных бактерий. В жарком климате это может происходить в течение одного или двух дней, если туша остается нетронутой. В мазках из образцов крови, отобранных после этого, капсулированные бациллы обнаружить достаточно сложно, хотя культура может сохраняться в крови более 1-2 суток [6,9]. В жидкостях, вытекающих из естественных отверстий, может наблюдаться споруляция, и множество спор контаминируют окружающую среду, особенно когда туша вскрыта животными-падальщиками. В случае сильного разложения туш, культивирование образцов почвы контаминированной выделениями, является основным способом подтверждения диагноза.

В качестве дополнительных лабораторных исследований помимо микроскопии мазков и термопреципитиновой кольцевой пробы, так же используют тесты: определение подвижности, чувствительность к пенициллину и специфическому диагностическому бактериофагу.

**Цель и задачи исследования.** В этой связи, из-за трудностей диагностики сибирской язвы, возникающих при проведении анализов почвы, шкур и разложившихся трупов животных, использование бактериофагов для идентификации возбудителя сибирской язвы является на сегодняшний день актуальной задачей.

#### **Материалы и методы исследований.**

Работа проведена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против бактериальных болезней животных ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». Для проведения исследований использовали вакцинные штаммы: *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ, *Bacillus anthracis* M71, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*. Исследования проводили в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике и обнаружению возбудителя сибирской язвы [4].

Чувствительность бактерий *Bacillus anthracis* к бактериофагам была впервые описана Brown и Cherry в 1955 [7]. Бактериофаги различных производителей находятся в национальных центральных ветеринарных лабораториях и других справочных лабораториях по сибирской язве («Гамма», «К», Fah-ВНИИВВиМ и др.). В связи с тем, что стандартизованных требований к диагностическим биологическим препаратам не существует – используемый нами в работе бактериофаг был получен по следующей схеме: аттенуированная культура *Bacillus anthracis* на чашках Петри с агаром Mueller-Hinton + 5% овечьей кровью → инкубация в течение 4-6 часов при 37°C → засеивание культуры фагом (при наличии интенсивного и видимого невооруженным глазом роста) → посев ≈ 2 мл исходного гамма бактериофага каплями наносят на всю поверхность культуры → 37 °C, 12-14 ч → помещают чашки в морозильник при -20°C на 12-14 ч → 18-20 °C, 2 ч → отбор и фильтрация жидкости через фильтровальную бумагу → повторное стерильное фильтрование (фильтр 0,22мк) проверка эффективности фага и проверка чувствительности к культуре *Bacillus anthracis* (в разведениях 1/1, 1/10 до 1/10 000). Полученный бактериофаг хранили при 2-8 °C.

### **Результаты исследований и обсуждение.**

Бактерии *Bacillus anthracis* без труда поддаются выделению из крови и тканей животных, недавно павших от сибирской язвы, и в чистой культуре на стандартных питательных средах, при 37°C, наиболее оптимальной средой является 10% кровяной агар. Но в то же время при разложении туши, особенно в теплом климате, бактерии, вызывающие гниение, оказываются вне конкуренции и, в конечном счете, они уничтожают инфицирующий организм в туше. Подтверждение наличия сибирской язвы в таких случаях может зависеть от результатов выделения возбудителя из почвы, контаминированной предсмертными выделениями.

Принцип реакции основан на свойствах бактерий *Bacillus anthracis* лизироваться сибиреязвенными фагами. Для проведения реакции чашки с агаром Mueller-Hinton перед постановкой пробы размечали на квадратные сектора со стороной 2 см. На каждый сектор наносили каплю 5—6-часовой бульонной культуры *Bacillus anthracis*. Чашку подсушивали в течение 30 мин в термостате, после чего в центр подсохшей капли наносят петлей каплю (10-15 мкл) сибиреязвенного бактериофага, в качестве дополнительного теста на другую сторону помещали диск с пенициллином (10 ед). Учет результатов проводили через 12—24 ч инкубации чашек при 37°C. В случае положительного результата на участке из-за лизиса наблюдали зоны просветления и отсутствие бактериального роста, вокруг пенициллинового диска наблюдалась чистая просветленная зона.

### **Заключение.**

В результате проведенных исследований было установлено, что штаммы *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ и *Bacillus anthracis* M71 были высокочувствительны к бактериофагу и пенициллину, и образовывали характерные зоны просветления диаметром от 30-50 мм; у штаммов *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* задержки роста на месте нанесения сибиреязвенного бактериофага не наблюдалось, культура *Bacillus subtilis* была резистентна к антибиотику. Согласно полученным результатам, использование бактериофагов является и легко выполнимым и высокочувствительным методом, позволяющим идентифицировать *Bacillus anthracis* от других видов *Bacillus*.

### **Библиографический список**

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс): новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. -Владимир: «Посад», 2001. 218 с.
2. Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А. и др. Сибирская язва. - М.: Колос, 1996.
3. Лобанова Т.П., Кихтенко Н. В. Сибирская язва. Монография. М., 2003. - 45 с.
4. МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания».
5. Онищенко Г.Г. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики /Г.Г. Онищенко и др, М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. - 448 с.
6. Рязанова, А.Г. Характеристика биологических свойств атипичных штаммов сибиреязвенного микроба, усовершенствование методов их индентификации и дифференцирования от близкородственных бацилл: Автореф. дис. . канд. мед. наук: (03.00.07)/ А.Г. Рязанова. Ростов-на-Дону, 2006. - 23 с.
7. Brown E.R. & Cherry W.B. Specific «Identification of *Bacillus anthracis* by meen of a variant bacteriophage. J. Infect. Dis., 96, - P. 34-39.
8. Dieter, C., Dagmar F. II *Bacillus* Ed. C. R. Harwood. New York, London. Plenum Press. 1989. - P. 5-26.
9. Fellows, P.F. A survey of worldwide strains of *Bacillus anthracis* / P.F. Fellows // Proc.

## VALUE OF DIAGNOSTIC PHAGES FOR BACILLUS ANTRACIS IDENTIFICATION

*Kapustin A. V., Motorygin A. V.*

**Keywords:** *agricultural animals, bacilli, malignant anthrax, bacterination, pathological material, phagediagnosis.*

*Data on studying of diagnostic properties of bacteriophages and their application are provided in work for identification of the originator of a malignant anthrax. By results of the conducted researches it is established that studied cultures of Bacillus anthracis possessed high sensitivity to scale to a bacteriophage that allowed to differentiate the originator of a malignant anthrax from other types of Bacillus.*

УДК 602.3:579.8

## ОЦЕНКА ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

*Катаева Л. В., кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,  
тел. 8(3452) 29-99-90, KataevaLV@tniikip.rosпотреbnadzor.ru  
Вакарина А. А., младший научный сотрудник  
Нижегородцева Н. Ф., младший научный сотрудник  
ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, чувствительность, устойчивость, штаммы бактерий, метод определения.*

*Работа посвящена определению чувствительности/устойчивости некоторых условно-патогенных бактерий к бактериофагам различными методами (на плотной и в жидкой питательной среде). При проведении исследования установлено, что чувствительность штаммов бактерий к различным бактериофагам не одинакова, поэтому необходимо назначать фаготерапию после исследования фаголитической активности. Кроме того, существующая методика определения и оценки активности фагов субъективна.*

**Введение.** Современная ситуация снижения эффективности антибиотикотерапии очень сложна вследствие повышения устойчивости патогенных и условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. Хорошие перспективы в качестве антимикробной терапии имеют бактериофаги, которые эффективны в отношении как чувствительных, так и устойчивых к антибиотикам бактерий. Бактериофаги обладают рядом преимуществ: специфичность действия, отсутствие угнетения нормальной микрофлоры и аллергической реакции, стимуляция факторов специфического и неспецифического иммунитета [1], применение бактериофагов вместе с антибиотиками и иммунопрепаратами [2, 3]. Кроме того, весомым аргументом в пользу целесообразности клинического применения бактериофагов является практически полное отсутствие побочных эффектов, а следовательно, и противопоказаний [4].