

ние. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – №5. – С. 8-9.

2. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.

3. Goldschmidt-Clermont, E., Wahli, T., Frey, J. & Burr, S. E. (2008). Identification of bacteria from the normal flora of perch, *Perca fluviatilis* L., and evaluation of their inhibitory potential towards *Aeromonas* species. *J Fish Dis* 31, 353–359.

OPTIMIZATION OF THE SCHEME OF ALLOCATION OF BACTERIOPHAGES *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

Grineva T.A., Viktorov D.A., Vasilev D.A.

Key words: *Pseudomonas*, *Pseudomonas chlororaphis*, pseudomonosis fish, bacteriophages, the circuit selection.

*As a result of the conducted research, the scheme of allocation of bacteriophages *Pseudomonas chlororaphis* has been optimized. Using the developed methodology, 2 isolates of bacteriophages active in respect of the above type of bacteria were allocated from water objects.*

УДК 619:616.98:579.842

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ НА МИКРОФЛОРУ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Затевалов А.М., кандидат химических наук, 4520896@mail.ru

Киселева И.А., (495)452-18-16, irina6804@mail.ru

Копанев Ю.А., кандидат медицинских наук, info@gabrich.com

Алешкин А.В., доктор биологических наук, ava@gabri.ru

Афанасьев С.С., доктор медицинских наук, профессор,

Селькова Е.П.

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

Ключевые слова: функциональная активность микрофлоры кишечника, летучие жирные кислоты, фагочувствительность и фагорезистентность, препараты бактериофагов.

Выявление критериев оценки и эффективности применения бактериофагов для коррекции и нормализации кишечного микробиоценоза остается важной задачей, которая может быть решена с помощью сравнения параметров функциональной активности и фенотипических свойств микрофлоры кишечника, а так же путем определения избирательности действия препаратов бактериофагов на нормальную и условно-патогенную микрофлору кишечника in vitro и in vivo.

Введение. В микробном сообществе нормальной микрофлоры человека эволюционно сформировались межклеточные сети, которые представляют собой систему трофических и энергетических взаимосвязей внутри кишечного микробиоценоза[1].

Представление о микробиоте кишечника, как об отдельном органе человеческого ор-

ганизма не противоречит исторически сложившемуся определению органа, как части организма, представляющей собой эволюционно сложившийся комплекс тканей, объединенный общей функцией, структурной организацией и развитием [2].

Методы клинической биохимии – определение концентраций ЛЖК газо-жидкостной хроматографией дают важные критерии функциональной активности микробиоты кишечника, а именно концентрацию масляной кислоты, соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот, суммарную концентрацию ЛЖК, структурный индекс и индекс изокилот. На основании этих критериев можно сделать вывод о типе и степени нарушения функциональной активности микробиоценоза кишечника [3].

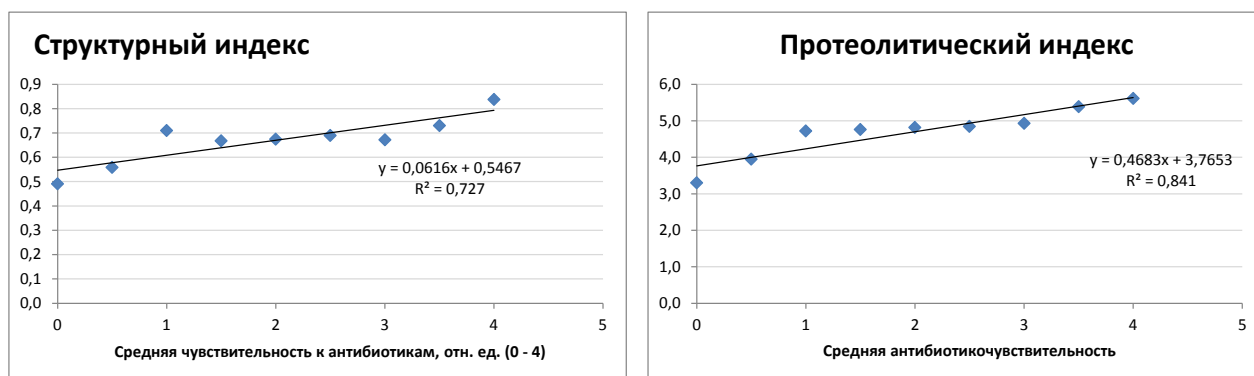
Не теряет своей актуальности микробиологический анализ кала, несмотря на небольшой процент высеваемости представителей нормобиоценоза и непропорциональное соотношение микроорганизмов в кишечнике и в кале. Такие свойства микроорганизмов, как чувствительность к антибиотикам, чувствительность к бактериофагам коррелируют с некоторыми показателями функциональной активности микрофлоры кишечника и могут характеризовать состояние микробиоценоза кишечника [3].

Материалы и методы исследований. Исследование корреляции средней антибиотико- (САЧ) и фагочувствительности (СФЧ) выделенной микрофлоры со структурным индексом (СИ), индексом изокилот (ИИ), а так же других показателей ЛЖК [3], проведенное на 3000 пациентов консультативно-диагностического центра МНИИЭМ Габричевского, проводилось по результатам комплексного анализа микрофлоры кишечника, включающего биохимический, копрологический, и микробиологический анализ кала.

Влияние интести-бактериофага (производство ФГУП «НПО Микроген») *in vivo* на уровень бифидобактерий и лактобацилл в толстой кишке у 30-ти пациентов проводилось путем сравнения содержания этих бактерий до и спустя неделю после курсового приема препарата. Нормофлору определяли с помощью микробиологического исследования кала, используя жидкие селективные агаризованные среды MRS и Блаурокк.

Также проводили исследования влияния интести-бактериофага на нормальную микрофлору, полученную от 63 пациентов КДЦ ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского», *in vitro*. Сравнивали титры бифидобактерий и лактобацилл, исходно содержащиеся в кале пациентов, с их количеством, определяемым на тех же средах при добавлении бактериофага.

Влияние интести-бактериофага на нормальную *E.coli* и условно-патогенную микрофлору (гемолизирующую *E.coli* и *S.aureus*) определялось spot-тестом, заключающимся в оцен-



а)

б)

Рис. 1 - Зависимость структурного индекса а) и индекса изокилот б) от средней антибиотикочувствительности на большой выборке пациентов КДЦ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.



ке зоны лизиса на газоне исследуемых культур, посеянных на плотных селективных агаризованных средах, после нанесения на него капли интести-бактериофага.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе проведения 3000 комплексных исследований микрофлоры кишечника получена корреляция СИ и ИИ с САЧ. Результаты представлены на рисунке 1.

Известно, что продуцентами уксусной кислоты могут быть как аэробная, так и анаэробная микрофлора. Продуценты пропионовой, масляной и далее по гомологическому ряду кислот являются анаэробные бактерии. Снижение СИ – доли анаэробных кислот указывает на сокращение численности анаэробных бактерий, снижению толщины защитной биопленки и о большей уязвимости стенок кишечника.

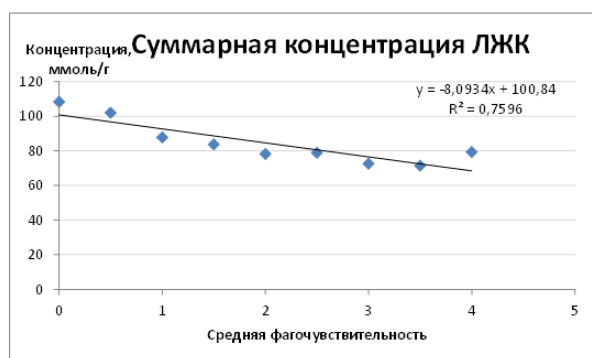
Известно, что при взаимоотношениях макроорганизма и микробиоты, макроорганизм управляет своей микробиотой, используя разные механизмы, в том числе и селективное подавление различных групп микроорганизмов секрецией антибактериальных агентов (лизозима и т.д.). Микрофлора, имеющая высокую антибиотикорезистентность, способна к самоорганизации микробного сообщества переориентированного на иные метаболические пути переработки субстрата и нарушению функциональной активности.

Положительная корреляция СИ и САЧ (рис. 1) свидетельствует о взаимосвязи структуры функциональной активности микробиоты кишечника с ее управляемостью. При увеличении антибиотикорезистентности микробиоценоза увеличивается концентрация уксусной кислоты и снижается продукция анаэробных кислот.

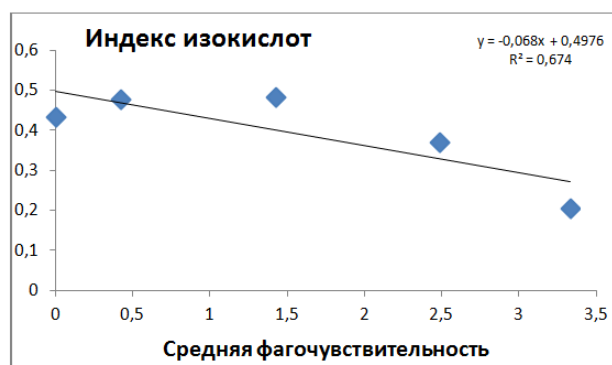
Выявлена так же корреляция САЧ с индексом изокилот (ИИ), который рассчитывается как отношение суммы изоформ к сумме линейных форм масляной, валериановой и капроновой кислот. ИИ характеризует протеолитическую активность микрофлоры, так как изоформы ЛЖК образуются при гидролизе белков. Увеличение индекса изокилот свидетельствует о повышении протеолитической активности микрофлоры.

Положительная корреляция ИИ и САЧ (рис. 1) указывает на взаимосвязь между увеличением доли сахаролитической микрофлоры в «неуправляемых микробных сообществах» и общей антибиотикорезистентностью микробного сообщества.

По аналогии с САЧ был предложен критерий средней фагочувствительности (СФЧ). Средняя чувствительность к фагам – это величина, полученная усреднением всех значений чувствительности к фагам (нормированных в баллы для унификации использования) по набору фагов (интести-бактериофаг, пиобактериофаг комплексный) и микроорганизмов, выделен-



а)



б)

Рис.2 - Зависимость а) суммарной концентрации ЛЖК и б) индекса изокилотот средней антибиотикочувствительности на большой выборке пациентов КДЦ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

ных из биоматериала пациента.

Предложенный критерий был исследован на предмет корреляции с показателями функциональной активности микрофлоры кишечника, в том числе со структурным индексом и индексом изокислот на 3000 пациентах КДЦ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Отрицательная корреляционная зависимость была найдена между СФЧ и суммарной концентрацией (СК) ЛЖК.

На рисунке 2 видно, что с увеличением устойчивости микробиоценоза к фагам увеличивается СК ЛЖК в кале и растет индекс изокислот. Снижение ИИ и СК при увеличении фагочувствительности можно объяснить спецификой подбора фагов для комплексного анализа микрофлоры кишечника. В связи с тем, что практикующих врачей интересует чувствительность к фагам условно-патогенной, протеолитической микрофлоры, был задействован соответствующий набор фагов (интести-бактериофаг, пиобактериофаг комплексный). Таким образом, можно отметить, что такие свойства микробиоценоза как фагочувствительность (резистентность) и функциональная активность связаны между собой.

Для определения влияния интести-бактериофага на симбиотическую микрофлору толстой кишки (бифидобактерии и лактобациллы) было обследовано 30 человек. Сравнивали частоту встречаемости бифидобактерий и лактобацилл в кале пациентов в титрах их средних (медианных) значений в пределах доверительного интервала ($p=95\%$) для бифидобактерий до 10^9 (10^7 - 10^9), после фаготерапии 10^8 (10^8 - 10^8); для лактобацилл до 10^6 (10^5 - 10^7), после фаготерапии 10^6 (10^5 - 10^6). Результат представлен на рисунке 3.

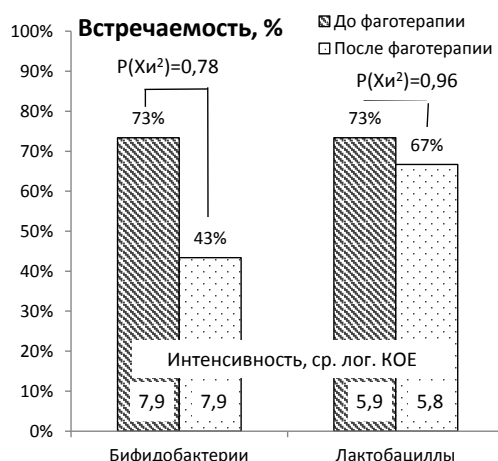


Рис.3 - Встречаемость бифидо- и лактофлоры до и после приема интести-бактериофага пациентами.

Из рисунка 3 видно, что встречаемость лактобацилл и бифидобактерий достоверно не изменилась, интенсивность роста так же осталась прежней, а коэффициенты корреляции бифидобактерий ($r=-0,080$) и лактобацилл ($r=-0,070$) до и после принятия фагов показывают отсутствие тенденций к увеличению или снижению интенсивности роста определяемой микрофлоры. Таким образом, очевидно, что применение интести-бактериофага не влияет на рост симбиотической нормальной микрофлоры толстого кишечника.

Влияние интести-бактериофага на рост бифидобактерий, лактобациллы было исследовано методом серийных разведений *in vitro* на средах MRS и Блаурокк с добавлением и без добавления в среду этого фага. Проведенная работа показала, что большая часть штаммов нормофлоры является устойчивой к действию данного фага (таблица 1).

Таблица 1 - Частота выявления штаммов нормальной микрофлоры кишечника, чувствительных к интести-бактериофагу.

Микроорганизмы, (количество исследованных штаммов)	Частота выявления штаммов нормофлоры, чувствительных к исследуемому фагу, в % $\pm m$
Bifidobacterium, (63)	19,0 $\pm$ 5,1
Lactobacillus, (63)	23,2 $\pm$ 5,3
E.coli (hem-), (34)	29,4 $\pm$ 4,1

Однако, некоторые штаммы (20 - 30%) оказались лизированными, что на наш взгляд, может свидетельствовать о проявлении этим коктейлем фагов неспецифической литической активности. Но, вопрос остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Влияние этого бактериофага на рост E.coli (hem-) (табл. 1), E. coli (hem+) и S.aureus исследовали в spot-тесте. Определяли частоту выявления штаммов, устойчивых и чувствительных к этому бактериофагу. Результаты показаны в таблице 2:

Таблица 2 - Частота выявления фагорезистентных штаммов, % $\pm m$.

Микроорганизмы, (количество исследованных штаммов)	Частота выявления фагорезистентных штаммов в % $\pm m$
E.coli (hem+), (69)	20,3 $\pm$ 2,3
S.aureus, (48)	18,8 $\pm$ 3,7

Наши данные по нормальной микрофлоре совпадают с данными, представленными в литературе [4], но для условно-патогенных микроорганизмов значения частоты выявления фагорезистентных штаммов имеют большие значения. Это может быть связано как с изменчивостью представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры в составе микробиоценоза кишечника и особенностями данных микробиоценозов, отличающихся высокой степенью биоразнообразия системы в условиях дисбиотических изменений микрофлоры кишечника, так и с неспецифичной активностью штаммов бактериофагов в отношении бифидобактерий, лактобацилл и нормальной кишечной палочки.

Закключение. Избирательность действия бактериофагов зависит от индивидуальности микробиоценоза, от изменения фенотипических и эпигенетических свойств отдельных микроорганизмов. В связи с этим, необходим постоянный мониторинг чувствительности бактерий различных биотопов к существующим фаговым препаратам, с целью повышения их эффективности по отношению к патогенной микрофлоре и снижению побочного действия на нормофлору за счет обновления банка штаммов бактериофагов.

Библиографический список

1. Бондаренко В. Микрофлора человека: норма и патология. Наука в России, №1, 2007.
2. QinJ., LiR., RaesJ., ArumugamM. etal. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomicsequencing.MetaHITConsortium // Nature. 2010. Vol. 464 (7285). P. 59–65.
3. Затевалов А.М., Алешкин А.В., Селькова Е.П., Гусарова М.П., Затевалова Е.А. **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА** // Международная научная конференция «Достижения и перспективы развития биотехнологии», Сборник тезисов с. 137.
4. Бочков И.А., Лавренов Э.С., Юрко Л.П. Влияние лечебных бактериофагов на

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-