

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].

Чувствительность к бактериофагам бактерий, выделенных из стационаров различного профиля несколько варьирует. Так, литическая активность стафилококкового бактериофага и пиобактериофага к стафилококкам, выделенным из очагов гнойной инфекции, составляет 72 – 88 %, стрептококковый фаг лизировал 60 – 82 % штаммов стрептококков [5, 3]. Вместе с тем, результаты исследований чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных гастроэнтерологического отделения показали, что стафилококковый фаг лизировал 37,1 % штаммов, стрептококковый фаг – 12 – 21 % стрептококков [6]. Клебсиеллы сохраняли чувствительность как к клебсиеллезному, так и к пиобактериофагу в 87 % случаев. При сравнении литической активности монофагов и ассоциированных подчеркивают, что у монофагов она более выражена [6, 3].

Таким образом, существенное различие данных о литической активности бактериофагов условно-патогенных микроорганизмов, тем более, если речь идет о применении фагов в лечебных целях, свидетельствует о том, что в каждом конкретном случае необходимо предварительное определение чувствительности конкретных микроорганизмов к бактериофагам определенных производителей [7].

Целью исследования явилось сравнение литической активности монофагов и ассоциированных фагов к штаммам *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Klebsiella pneumoniae*, а также характеристика эффективности методов определения чувствительности к фагам на плотной и в жидкой питательных средах.

Материалы и методы исследований.

Чувствительность исследуемых штаммов определялась к следующим бактериофагам: стафилококковый бактериофаг, пиобактериофаг поливалентный очищенный и бактериофаг клебсиелл поливалентный (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Уфа), интестибактериофаг (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Нижний Новгород), пиокомбинированный, фаг клебсиелл пневмонии очищенный (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Пермь).

Действие монофагов и комбинированных бактериофагов было изучено на 159 культурах *Staphylococcus aureus* и 62 штаммах бактерий *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных с дисбиозами и здоровых новорожденных детей при еженедельном мониторинге родильного дома № 2 г. Тюмени. Фаголитическую активность стафилококкового, пиобактериофага поливалентного, интестибактериофага и пиокомбинированного фага исследовали со штаммами *Staphylococcus aureus* на плотной (1,5 % мясопептонный агар - МПА) и в жидкой (мясопептонный бульон - МПБ) питательных средах.

Фаголитическую активность бактериофага клебсиелл пневмонии, клебсиеллезного поливалентного бактериофага и пиобактериофага поливалентного исследовали со штаммами *Klebsiella pneumoniae*.

Бактериальную суспензию суточной агаровой культуры (5 ед по СО 42-28-85-01 п) исследуемого штамма равномерно наносили на поверхность чашки Петри с хорошо подсушенной питательной средой. На поверхность агара с впитавшейся культурой наносили одну каплю бактериофага. После подсыхания капли фага, чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 18-20 ч. Степень лизиса культуры оценивали по схеме: полный лизис – «++++»/«+++», свидетельствует о чувствительности изучаемого штамма к бактериофагу; не полный лизис и отсутствие лизиса – «-», указывает на устойчивость штамма.

Применяли также вариант метода, при котором бактериофаги (5 капель) добавляли пастеровской пипеткой в 5 мл МПБ, в который вносили петлю суточной агаровой исследуемой культуры. Термостатировали 18-24 часа при 37°C.

Статистическая обработка выполнена лицензионным программным обеспечением SPSS версия 14.0, предназначенным для научных исследований, отвечающих требованиям

клинической эпидемиологии.

В исследовании использовались дискретные данные (типа Да/Нет – устойчивые/чувствительные). Дискретные данные анализировались таблицами сопряженности, которые применялись для расчета отношения шансов встречаемости исследуемых явлений в анализируемых группах. Гипотеза о равенстве шансов встречаемости отвергалась, когда величина соответствующего критерия не равна 1, а его 95% доверительные интервалы не включали в себя 1.

Результаты исследований и их обсуждение.

Итоги изучения сравнительных характеристик методов определения фаголитической активности монофагов и ассоциированных бактериофагов на плотной и в жидкой питательной среде показали следующие результаты. Литическая активность фагов: стафилококкового, интестибактериофага и пиокомбинированного к бактериям *S. aureus* на МПА, практически не отличаются, различия статистически не значимы. Исключение составляет пиобактериофаг поливалентный, устойчивость к которому оказалась выше, чем у стафилококкового и интестибактериофага, разница статистически достоверна, о чем свидетельствует критерий оценки статистической значимости, таблица 1.

Аналогичные исследования фаголитической активности в МПБ показали, что более высокая устойчивость стафилококков выявлена к стафилококковому и пиокомбинированному фагам, по сравнению с интестифагом и пиобактериофагом поливалентным, разница статистически достоверна, что подтверждают показатели таблицы 2.

При сравнении показателей устойчивости золотистого стафилококка к исследуемым бактериофагам на плотной и жидкой питательной среде с помощью расчета отношения шансов различие установлено только по пиобактериофагу поливалентному (46,5 % и 24,3% соответственно).

Таблица 1 - Устойчивость бактерий *S. aureus* к бактериофагам при определении на МПА

Бактериофаг	Количество культур	Устойчивость штаммов к фагам (%)	95 % доверительный интервал		Т критерий оценки статистической значимости различий средних			
			Нижняя граница	Верхняя граница	1	2	3	4
1. Стафилококковый	159	27,7	20,60	34,80	-	3,06	0,16	1,41
2. Пиобактериофаг поливалентный	99	46,5	36,47	56,53	3,06	-	3,19	1,01
3. Интестибактериофаг	156	26,9	19,80	34,00	0,16	3,19	-	1,52
4. Пиокомбинированный	55	38,2	25,10	51,30	1,41	1,01	1,52	-

При использовании МПА для определения устойчивости к указанному фагу шансы литической способности оказались в 2,7 раза меньше, чем при использовании МПБ, а с учетом 95 % доверительного интервала величина этого показателя колебалась в пределах от 1,5 до 4,9 раз. Так как нижний доверительный интервал оказался более единицы, имеющееся различие шансов статистически значимо.

По результатам наших исследований не представляется возможным утверждать, что литическая активность монофага стафилококкового к штаммам *S. aureus* выше, чем у ассоци-

Таблица 2 - Устойчивость бактерий *S. aureus* к бактериофагам при определении на МПБ

Бактериофаг	Количество культур	Устойчивость штаммов к фагам (%)	95 % доверительный интервал		Т критерий оценки статистической значимости различий средних			
			Нижняя граница	Верхняя граница	1	2	3	4
1. Стафилококковый	165	37,6	30,66	45,14	-	2,35	1,76	0,37
2. Пиобактериофаг поливалентный	103	24,3	15,85	32,75	2,35	-	0,76	2,13
3. Интестибактериофаг	165	28,5	21,47	35,53	1,76	0,76	-	1,65
4. Пиокомбинированный	62	40,3	27,84	52,76	0,37	2,13	1,65	-

ированных фагов. Показатели свидетельствуют о значимых различиях при определении чувствительности бактерий к пиобактериофагу поливалентному на плотной и жидкой питательных средах. Аналогичные результаты получены и при сравнении литической активности моно и ассоциированных бактериофагов к штаммам *K. pneumoniae*.

Исследование литической активности фагов по отношению к штаммам *K. pneumoniae* при использовании МПА показало наиболее высокую устойчивость их к пиополивалентному фагу. Критерий оценки статистической значимости различий средних свидетельствует о достоверности различий, таблица 3.

Таблица 3 - Устойчивость бактерий *K. pneumoniae* к бактериофагам при определении на МПА

Бактериофаг	Количество культур	Устойчивость штаммов к фагам (%)	95 % доверительный интервал		Т критерий оценки статистической значимости различий средних		
			Нижняя граница	Верхняя граница	1	2	3
1. Клебсиелла пневмония	62	67,7	55,82	79,58	-	1,06	2,01
2. Клебсиелла поливалентный	59	76,3	65,23	87,37	1,06	-	0,97
3. Пиобактериофаг поливалентный	49	83,7	73,15	94,25	2,01	0,97	-

Устойчивость к фагам бактерий *K. pneumoniae* в жидкой питательной среде оказалась наиболее высокой у бактериофага клебсиелл пневмонии, таблица 4.

Расчет отношения шансов частоты обнаружения устойчивых штаммов *K. pneumoniae* к бактериофагу клебсиелл пневмонии на плотной питательной среде с учетом 95 % доверительного интервала был от 3,0 до 14,5 раз выше, чем в жидкой питательной среде. Вместе с тем, указанные показатели устойчивости этих штаммов к бактериофагу клебсиелл поливалентному и пиополивалентному составил от 7,0 до 45,0 и от 7,7 до 60,0 соответственно.

Таблица 4 - Устойчивость бактерий *K. pneumoniae* к бактериофагам при определении на МПБ

Бактериофаг	Количество культур	Устойчивость штаммов к фагам (%)	95 % доверительный интервал		Т критерий оценки статистической значимости различий средних		
			Нижняя граница	Верхняя граница	1	2	3
1. Клебсиелл пневмонии	62	24,2	13,32	35,08	-	2,01	0,65
2. Клебсиелл поливалентный	59	15,3	5,93	24,67	2,01	-	0,54
3. Пиобактериофаг поливалентный	52	19,2	8,28	30,12	0,65	0,54	-

Заключение. Сравнительная характеристика литической активности монофага стафилококкового и ассоциированных фагов (пиобактериофаг поливалентный, интестибактериофаг и пиокомбинированный), к золотистому стафилококку показала, что статистически достоверные отличия отмечены только с пиобактериофагом поливалентным при исследовании на плотной питательной среде. При аналогичном исследовании в жидкой питательной среде результаты получаются противоположными. Штаммы клебсиелл пневмонии также были более устойчивы к пиобактериофагу поливалентному при определении на плотной питательной среде и более чувствительны при исследовании в жидкой питательной среде, хотя различия статистически не достоверные. На наш взгляд, этот факт свидетельствует о несовершенстве существующих методик определения чувствительности бактерий к фагам.

Указанные методы определения устойчивости к фагам, применяемые в настоящее время бактериологическими лабораториями в практическом здравоохранении не позволяют объективно оценить литические свойства бактериофагов, так как результаты оцениваются очень субъективно - в «крестах». Кроме того, широкое применение фаготерапии в лечении и профилактике бактериальных инфекций требует определения чувствительности к определенным бактериофагам конкретных производителей. Это выдвигает приоритетную задачу разработки методики, позволяющей количественно определять и оценивать чувствительность бактерий к бактериофагам.

Библиографический список

1. Майская Л. М., Дарбеева О. С., Парфенюк Р. Л. и др. Методика определения фагочувствительности штаммов, выделенных от больных, к препаратам бактериофагов. //Научно-практический журнал «БИО препараты». – 2003. - № 2. – С. 22-23.
2. Лазарева Е. Б. бактериофаги для лечения и профилактики инфекционных заболеваний. //Антибиотики и химиотерапия . – 2003. – 48. - № 1. –С.36-40.
3. Лазарева Е. Б., Спиридонова Т. Г., Киселевская-Бабина И. В. И др. Эффективность бактериофагов при лечении внутрибольничных инфекций у больных ожогами. //Стерилизация и госпитальные инфекции. – 2007. - № 2. – С. 48-50.
4. Дроздова О. М., Брусина Е. Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие. //Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. - № 5. – С. 20 – 24.
5. Меньшиков Д. Д., Янискер Г. Я., Савельева Г. Ф. и др. Чувствительность возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний к лечебным бактериофагам. //Антибиотики. – 1980.

6. Веселов А. Я., Карманова С. Ю. Литическая активность и специфичность коммерческих бактериофагов. //Клиническая лабораторная диагностика. -1992. - № 9. – С.55-57.

7. Зуева В. С., Дмитриенко О. А., Клицунова Н. В. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации. //Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – 41. - № 10. – С.35-42.

EVALUATION OF LYTIC ACTIVITY OF SOME BACTERIOPHAGES

Kataeva L. V., Vakarina A. A., Nizhegorodtseva N. F.

Key words: *bacteriophages, sensitivity, stability, strains of bacteria, the method definition.*

Sensitivity / resistance of some opportunistic bacteria to bacteriophages were investigated by various methods (for solid and liquid medium). It was found that bacterial strains sensitivity of to several bacteriophages are different, so you must assign phage therapy only after study fagolytic activity. Furthermore, the current method of determining and assessing the phage activity is subjective.

УДК 579.843:578.1:616-092:612.015.2

БАКТЕРИОФАГИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ

Кудрякова Т.А., доктор медицинских наук,

Тел.8(863) 240-27-03, e-mail: plague@aanet.ru

Македонова Л.Д., кандидат медицинских наук,

Гаевская Н.Е., Качкина Г.В.,

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Ключевые слова: *бактериофаги *Vibrio cholerae* O1, O139, не O1/не O139 серогрупп, *V.albensis*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V. mimicus*, *V.metschnikovii*, биологическая характеристика, применение.*

*Работа посвящена изучению свойств новых и имеющихся в коллекции фагов патогенных вибрионов. Показана принадлежность бактериофагов *Vibrio cholerae* O1 к пяти морфологическим типам, *V.albensis* и *V.parahaemolyticus* – к четырем, *V. mimicus* – к одному и *V.metschnikovii* – к одному. Охарактеризованы серологические свойства и установлены различия и сходства в антигенном строении. Специфичность литической активности бактериофагов использована в лабораторной диагностике патогенных вибрионов.*

Введение. Большой фактический материал, накопленный в последние три десятилетия, свидетельствует о широком распространении патогенных вибрионов, для большой группы которых бактериофаги неизвестны. Показано, что на территории России и некоторых зарубежных государств возможно обнаружение бактериофагов холерных и параземолитических вибрионов, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus* [1, 2, 3, 4]. В центре патогенных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института были идентифицированы представители десяти видов патогенных вибрионов, коллекция культур которых нуждается в дополнении соответствующими бактериофагами и разработке методов фагодиагностики. Детальное изучение взаимоотношения бактериофагов с клеткой хозяина имеет не только теоретическое, но и важ-