

References

1. Klumpp J., Lavigne R., Loessner M.J., Ackermann H.W. The SPO1-related bacteriophages. // Arch. Virol. – Vol. 155. – 2010. – P. 1547–1561.
2. Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. // J. Clin. Microbiol. – Vol. 38. – 2000. – P. 1008–1015.
3. Shopsis B., Gomez M., Montgomery S.O., Smith D.H., Waddington M., Dodge D.E., Bost D.A., Riehman M., Naidich S., Kreiswirth B.N. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. // J. Clin. Microbiol. – Vol. 37. – 1999. – P. 3559–3563.
4. Milheiriço C., Oliveira D.C., de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. // Antimicrob. Agents Chemother. – Vol. 51. – 2007. – P. 3374–7337.
5. O’Flaherty S., Coffey A., Edwards R., Meaney W., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of *Myoviridae* infecting gram-positive bacteria with a low G+C content. // J. Bacteriol. – Vol. 186. – 2004. – P. 2862–2871.
6. Pantucek R., Rosypalova A., Doskar J., Kailerova J., Ruzickova V., Borecka P., Snopkova S., Horvath R., Götz F., Rosypal S. The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host-range mutants and related phages. // Virology – Vol. 246. – 1998. – P. 241–252.
7. Pulverer G., Pillich J., Kocur M. Two new bacteriophages active against pathogenic staphylococci. // Zentralbl. Bakteriол. Parasit. Infekt. Hyg. I. Orig. – Vol. 201–1966. – P. 321–325.
8. Schumacher-Perdreau F., Pulverer G., Schleifer K.H. The phage adsorption test: a simple method for differentiation between staphylococci and micrococci. // J. Infect. Dis. – Vol. 138. – 1978. – P. 392–395.
9. Götz F., Popp F., Schleifer K.H. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage from *Staphylococcus carnosus*. // FEMS Microbiol. Lett. – Vol. 23. – 1984. – P. 303–307.

УДК 578.81:579.67

**СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ПРОДУКТ ПИТАНИЯ «ФУДФАГ»
В ПРОФИЛАКТИКЕ ПИЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

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

*Воложанцев Н.В. ***, кандидат биологических наук, nikvol@obolensk.org

*Светоч Э.А. ***, доктор ветеринарных наук, профессор,

*Афанасьев С.С. **, доктор медицинских наук, профессор, info@gabrich.com

*Веревкин В.В. ***, кандидат биологических наук, info@obolensk.org

*Васильев Д.А. ****, доктор биологических наук, профессор, dav_ul@mail.ru

*Золотухин С.Н. ****, доктор биологических наук, профессор,

*Киселева И.А. **, irina6804@mail.ru

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

**ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора,

*** ФГБОУ ВПО «УГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: бактериофаги, пищевые инфекции, фагосодержащие пробиотические пищевые добавки.

Опасность инфицирования людей пищевой продукцией, контаминированной сальмонеллами, шигеллами, эшерихиями, листериями, стафилококками и другими патогенными микроорганизмами, остается чрезвычайно высокой, особенно при употреблении продуктов быстрого приготовления. Осуществлен поиск и выделение бактериофагов, активных против данных бактерий, изучены их фенотипические и молекулярно-генетические свойства, проведена оценка безопасности и эффективности применения у лабораторных животных и человека.

Введение. Микробиологическая безопасность пищи в XXI веке остается ведущей проблемой гигиены питания. Появление новых технологий хранения на холоду, упаковки в пленку, минимальной переработки охлажденного сырья, длительная транспортировка, а также не соблюдение элементарной гигиены работниками пищеблоков, увеличивают возможность накопления в пище возбудителей пищевых инфекций из ряда сальмонелл, эшерихий, шигелл, кампилобактера, листерий, стафилококка и т.д. Применение антибиотиков в пищевой отрасли не решает эту проблему, снижая уровень экологической чистоты продукции и провоцируя появление новой категории патогенов – штаммов условно-патогенных бактерий, резистентных к антибиотикам.

Используя накопленный мировой опыт, данные отечественных микробиологов, успешно трудившихся в направлении изучения бактериофагов, а также действуя в рамках решения Ученого Совета Роспотребнадзора от 21 июня 2011 года, логично предложить бактериофаги для создания нового для России класса специализированных пищевых продуктов диетического (профилактического) питания, использование которых позволит снизить риск возникновения спорадических случаев и эпидемических вспышек пищевых инфекций.

Материалы и методы исследований. Используя коллекцию патогенных микроорганизмов, а также штаммы бактерий, выделенные от пациентов КДЦ, отобраны 7 производственно-перспективных бактериофагов. С помощью микробиологических, биохимических, биотехнологических и молекулярно-генетических методов исследованы их биологические свойства, отработана технология культивирования, подтверждена безопасность и эффективность полученного специализированного продукта диетического (профилактического) питания (СП «ФУДФАГ») на лабораторных животных и в программе медицинской реабилитации лиц с хроническими заболеваниями органов пищеварения (Рис. 1).

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе исследований нами были выделены из разных источников, изучены и отобраны 7 бактериофагов, активных в отношении *S.aureus*, *E.coli* 0157:H7, *E.coli* O104:H4, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.infantis*, *L. monocytogenes*, которые и составили основу СП «ФУДФАГ». Вирулентные фаги отбирались на основании их биологических, биохимических и молекулярно-генетических свойств. Индикаторные штаммы бактерий, на которых культивировались бактериофаги, проверялись на отсутствие профага индукцией митомицином С. Штаммы бактериофагов в титре от 10^{10} до 10^{13} БОЭ/мл получали выращиванием на плотных питательных средах в матрасах с последующей стерилизующей фильтрацией и освобождением от эндотоксина на хроматографической колонке. В таблице 1 представлена полная характеристика отобранных штаммов.

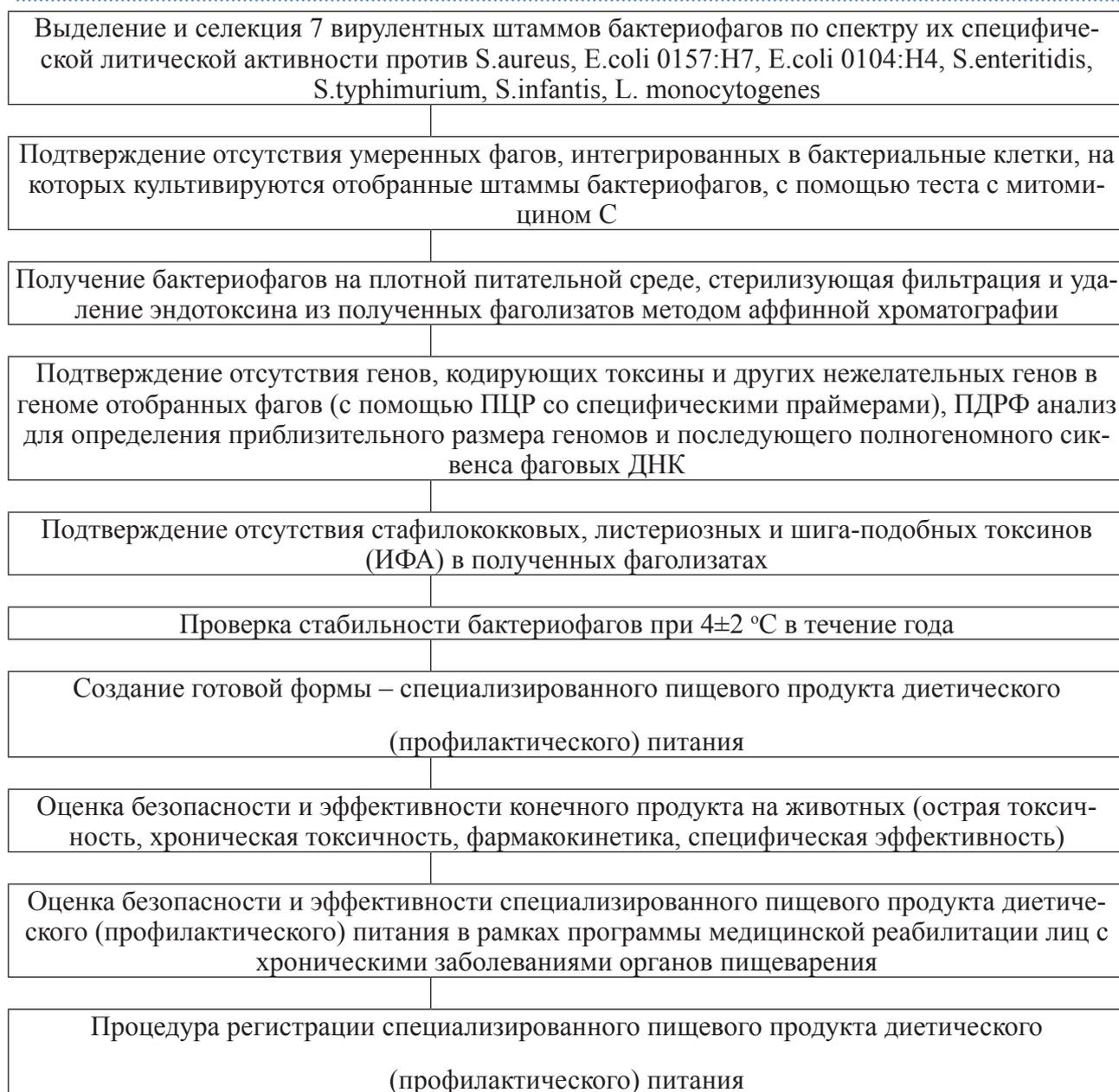


Рисунок 1. План исследований (создания фагового коктейля).

Все штаммы бактериофагов специфичны, т.е. лизируют исключительно культуры патогенных энтеробактерий, не подавляют рост производственных пробиотических штаммов бифидобактерий, лактобацилл, *E.coli* M-17 и нормальной микрофлоры, выделенной от 100 пациентов КДЦ ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского».

В ходе работы был проведен ПДРФ анализ всех 7 штаммов. Это позволило нам получить ориентировочный размер фагового генома каждого штамма и процентное содержание нуклеотидов в составе ДНК как подготовительный этап для дальнейшего полногеномного секвенирования (рис.2).

С помощью ИФА тест-систем подтверждено отсутствие экзотоксинов в коктейле стерильных фаголизатов. Соответствие нашего продукта стандартам Европейской комиссии, контролирующей безопасность пищевых продуктов (EFSA), по содержанию эндотоксина под-

Таблица 1 - Характеристика штаммов бактериофагов, входящих в СП «ФУД-ФАГ».

Наименование фага	CH1	ECD7	V32	SE40	ST11	SI3	Lm1
Бактериальный штамм-хозяин	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O104:H4	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. infantis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Источник выделения фага	Клинический материал, Челябинск	Фекалии кур, Московская область	Сточные воды коровника, Московская область	Окружающая среда, Московская область	Фекалии кур, Калужская область	Фекалии крупного рогатого скота, Московская область	Фекалии овец, Астраханская область
Спектр литической активности (% лизиса/штамм бактерий)	92/MRSA	100/ <i>E. coli</i> O104:H4 O104:H4 O157:H7 и др., 70/ <i>Sh. sonnei</i> и <i>flexneri</i>	<i>E. coli</i> O157:H7 O157:H-	85/ <i>S. enteritidis</i>	100/ <i>S. typhimurium</i>	64/ <i>S. infantis</i>	92/ <i>L. monocytogenes</i>
ПЦР-типирование известных токсин-кодирующих генов	Нет α -токсина	Нет <i>rfb</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> и <i>fliC</i>	Нет <i>rfb</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> и <i>fliC</i>	Нет <i>stxA</i>	Нет <i>stxA</i>	Нет <i>stxA</i>	Нет LLO-токсина
Максимальный титр на штамме-хозяине (БОЕ/мл)	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{13}	10^{10}	10^{12}	10^{10}

тверждено ЛАЛ-тестом.

Оценку безопасности продукта проводили в опытах по изучению острой и хронической токсичности на лабораторных животных. В результате проведенных экспериментов было показано, что при всех возможных способах введения исследуемого продукта признаков интоксикации у мышей и морских свинок не наблюдалось.

Также на модели лабораторных животных были проведены фармакокинетические исследования фагосодержащего продукта. Мы определяли количество вирусных частиц в фекалиях животных в различные промежутки времени после однократного внутрижелудочного введения

коктейля бактериофагов. Через 9 часов после введения продукта сальмонеллезные фаги обнаруживаются в экскрементах мышей в наибольшей концентрации. В меньшем количестве в мышинных экскрементах определялись листериозный, эшерихиозный (Ecd7) и стафилококковый фаги. В дальнейшем, количество специфических вирусных частиц снижалось и к 48 часам в мышинных фекалиях оставались только незначительные количества сальмонеллезных фагов (табл. 2).

Для исключения вероятности возникновения побочных эффектов по влиянию бактериофагов на нормальную микрофлору кишечника *in vivo* (на модели беспородных белых мышей) определяли изменение количества основных представителей микробиоценоза толстого

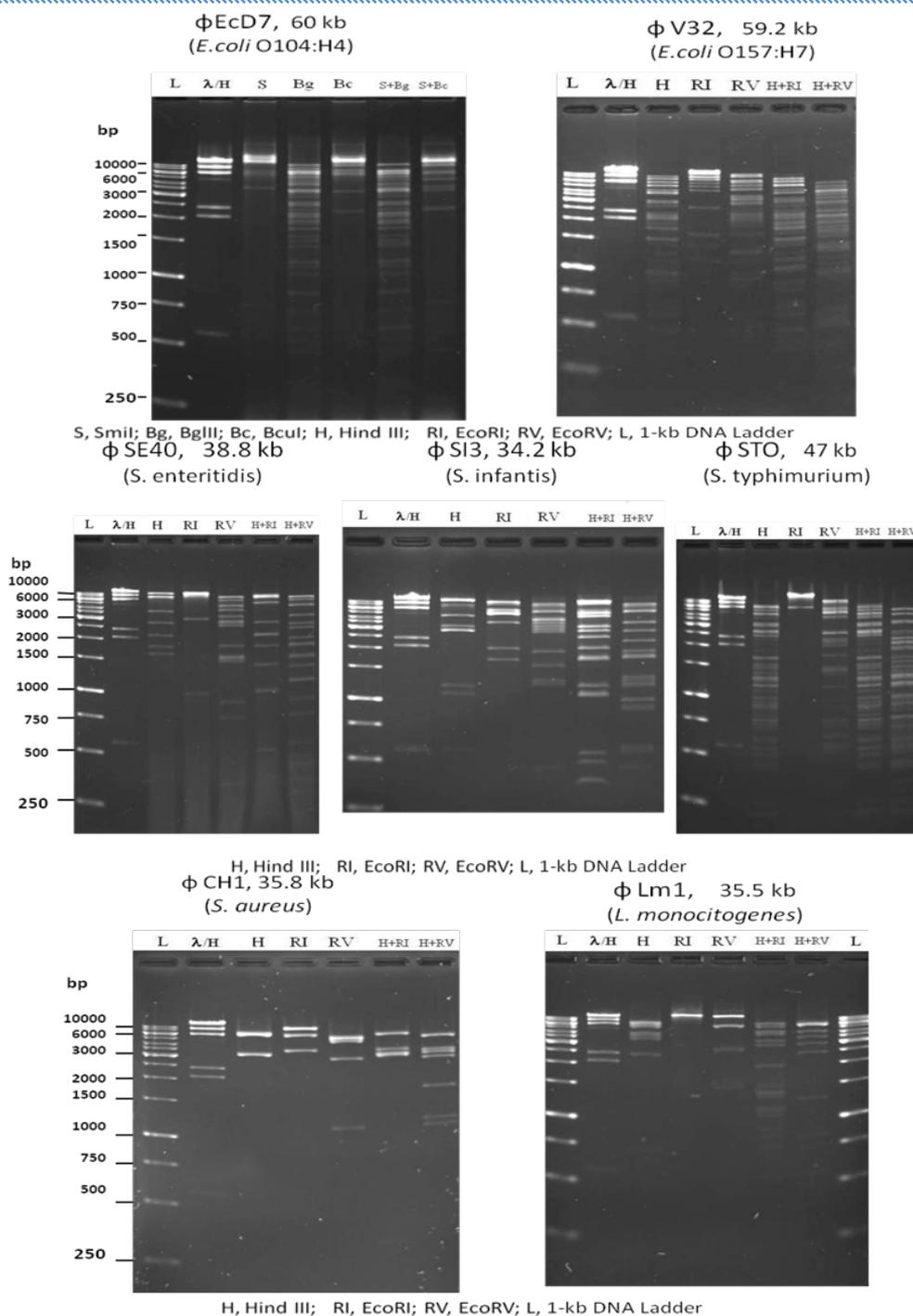


Рис. 2 - Рестрикционный анализ ДНК штаммов бактериофагов, входящих в СП «ФУДФАГ».

кишечника на фоне 10 дневного внутрижелудочного введения фагового коктейля. Разработанная рецептура не влияет на нормальную микрофлору кишечника мышей.

Изучение специфической антибактериальной эффективности фагового продукта проводили на модели экспериментальной сальмонеллезной инфекции у беспородных белых мышей, которых заражали штаммом *S. enteritidis* 92 Rif^r. Оценивали как профилактическую, так и лечебную схемы введения коктейля бактериофагов. Введение препарата через 48 часов после заражения животных в течение 5 дней в дозе 0,5 мл/сут. продливало их жизнь до 9,6 дня, против 8 в контрольной группе. При профилактическом режиме использования фагового коктейля (введение за 24 часа до заражения и далее в течение 5 дней в дозе 0,5 мл/сут.) выжило 30 %

мышей, средний срок гибели павших мышей составил 11,4 дня. Бактериологический анализ органов и фекалий выживших животных на 14 сутки после окончания терапии подтвердил 100 % санацию.

Оценку специфической антибактериальной эффективности специализированного пищевого продукта диетического (профилактического) питания на основе бактериофагов проводили также в рамках программы медицинской реабилитации у лиц с хроническими заболеваниями органов пищеварения. Типовая программа реабилитации включала: дието-, фито-, бальнео-, кинезотерапию, тренировки, гастроскопы и т.д. При бактериологическом исследовании фекалий у пациентов были выявлены *Staphylococcus aureus*, энтеропатогенная *Escherichia coli*, грибы рода *Candida* и другие представители условно-патогенной микрофлоры, типичные для дисбиотического состояния кишечника. 30 пациентам основной группы дополнительно к типовой программе реабилитации был назначен фаговый коктейль по 50 мл 3 раза в день во время еды, курсом 10 дней. 16 пациентам группы сравнения реабилитация осуществлялась в рамках типовой программы. Включение в программу медицинской реабилитации фагового коктейля позволило на 33% снизить количество пациентов с дисбактериозом кишечника второй и третьей степени, а у 37% пациентов основной группы добиться полной нормализации

Таблица 2 - Динамика персистенции фагов в кишечнике мышей после однократного внутриведения фагового коктейля (lg БОЭ/г).

Название фага	Титр фага в препарате, БОЭ/мл	Титр фагов в экскрементах, lg (БОЭ/г)							C _{max} , БОЭ/г	T _{max} , ч	T ₀ , ч
		0	3 ч	6 ч	9 ч	12 ч	24 ч	48 ч			
Lm1	0,5×10 ⁶	0	0	4,0	4,5	3,8	0	0	4,5	9	< 24
EcD7	1,1×10 ⁶	0	1,6	5,7	5,9	5,3	3,0	0	5,9	9	< 48
SI3	0,3×10 ⁶	0	2,9	7,7	8,1	6,2	4,1	2,3	8,1	9	> 48
STO	1,0×10 ⁶	0	2,9	7,2	8,0	6,4	5,3	2,8	8,0	9	> 48
SE40	9,6×10 ⁶	0	0	2,8	7,6	7,1	5,0	3,1	7,6	9	> 48
V32	1,0×10 ⁶	0	0	3,7	4,1	3,0	1,6	0	4,1	9	> 24
CH1	1,3×10 ⁶	0	н.д.	5,8	5,6	5,1	0	0	5,8	6	< 24

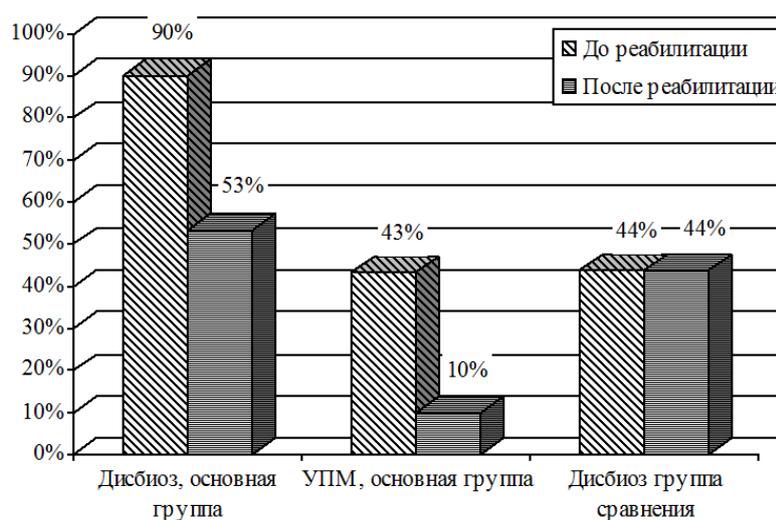


Рис. 3 - Динамика микробиологических показателей содержимого толстой кишки у пациентов с синдромом раздраженного кишечника и запором на фоне медицинской программы реабилитации.

показателей микробиоценоза за счет элиминации *Staphylococcus aureus* и энтеропатогенной *Escherichia coli* (рис. 3).

В настоящее время нормативно-техническая документация на разработанный коктейль бактериофагов в форме специализированного пищевого продукта диетического (профилактического) питания успешно прошла санитарно-эпидемиологическую экспертизу в НИИ питания РАМН. Федеральной службой Роспотребнадзора выдано свидетельство о государственной регистрации на СП «ФУДФАГ» № RU.77.77.19.004.E.001234.02.13 от 20.02.2013 года.

Заключение. Сконструированный специализированный пищевой продукт диетического (профилактического) питания на основе бактериофагов безопасен для человека и животных и может применяться в качестве средства профилактического фагирования декретированных контингентов работников предприятий различных отраслей с целью снижения риска развития спорадических случаев и вспышек пищевых инфекций.

PROBIOTIC DIETARY SUPPLEMENT «FOODPHAGE» IN PROPHYLAXIS AGAINST FOOD-BORNE INFECTION

Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Afanas'ev S.S., Verevkin V.V., Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N., Kiseleva I.A.

Key words: *bacteriophages, food-borne infections, phage-based probiotic dietary supplement.*

The risk of infection caused by the food products contaminated with Salmonella, Shigella, Escherichia, Listeria, Staphylococci is very high. Bacteriophages, active against the above mentioned bacteria, were sought and singled out. Their phenotypic and molecular genetic features were studied as well as safety and efficiency for lab animals and humans.

УДК 619:616 -07

ТЕХНОЛОГИЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

*Васильева Ю.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент, vet_yulua@mail.ru
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор, dav_ul@mail.ru
Семанина Е.Н., научный сотрудник НИИЦМиБ
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

Ключевые слова: *диагностика бордетеллёза, РНФ, Bordetella bronchiseptica, фаговые биопрепараты.*

В статье приводятся данные по разработке схемы индикации Bordetella bronchiseptica в объектах ветеринарного надзора при помощи реакции нарастания титра фага с использованием нового диагностического биопрепарата. Представлены результаты разработки технологических параметров изготовления активного и специфического биопрепарата на основе бордетеллёзных фагов.