

УДК: 579.843.1: 616.932-092.9: 578.1: 616-018

## ОТБОР БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХОЛЕРЫ, ВЫЗВАННОЙ КЛАССИЧЕСКИМИ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ

Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Алиева А.А.,  
Саямов С.Р.

*НИ противочумный институт, Ростов-на-Дону*

**Изучены некоторые свойства 64 музейных штаммов классических холерных вибрионов после длительного хранения в музее живых культур в лиофилизированном состоянии. Установлено изменение лизабельности диагностическими холерными фагами (1-4 Мукерджи, С, Эльтор, К1 Вир, ФБ) музейных штаммов. Из лизогенных холерных штаммов были изолированы фаги, идентичные по антигенной структуре фагам – «Каппа» или «СУФ». Отмечена активность фага МЗ в лечении экспериментальной холеры на модели белых мышей.**

Сохранение в некоторых регионах мира холерных вибрионов О1 серогруппы классического биовара может служить причиной вспышек холеры, аналогичных прошедшим в предыдущие 6 пандемий. В ряде эндемичных районов Бангладеш в 1980-х годах отмечалось присутствие двух биоваров возбудителя, а в 1991-1994 гг. от больных острой диареей были изолированы штаммы вибрионов с признаками классического и эльтор биоваров [24].

Признак чувствительности холерных вибрионов к специфическим фагам используют при идентификации указанных микроорганизмов [3,4,5,13,14,16,22,23]. Среди фагов есть серотипы, действие которых ограничивается не только видом, но биотипом холерного вибриона, например фаг «С».

В последнее время вновь обратились к проблеме применения бактериофагов в качестве лечебного средства [7,8,19,20,21]. У бактерий с устойчивостью к самым активным антибиотикам отмечается сохранение чувствительности к бактериофагам. Необходимость лечения больных холерой, зараженных антибиотикоустойчивыми штаммами, стимулирует разработку методов, основанных на знании взаимоотношений определенных бактериофагов с такими бактериями, и с отбором фагов, обладающих высокой активностью *in vitro* и *in vivo* [6,16]. Однако, если технология производства лечебных фагов для многих видов микроорганизмов достаточно известна, то в отношении холерных бактериофагов сведений мало, так как исследования по этой проблеме были прекращены в 70-х годах прошлого столетия.

Целью нашей работы явился отбор активного холерного бактериофага для испытания его

эффективности в терапии экспериментальной холеры, обусловленной *V.cholerae cholerae*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 64 штамма *V.cholerae cholerae*, которые хранились в МЖК РПЧИ более 30 лет. В экспериментах в качестве индикаторных применяли штаммы: *V.cholerae cholerae* 145; *V.cholerae eltor* 75М,КМ199(13169); *V.cholerae* О139-КМ152(16373). Материалом для исследования служили холерные фаги различных морфологических групп и серотипов – М1-М4, С, Эльтор, К1 Вир, ФБ. Выделение фагов и изучение их биологических свойств проводили по общепринятым методам [1]. Биологические свойства холерных вибрионов изучали согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике холеры [9]. В опытах по лечению животных холерным бактериофагом использовали беспородных белых мышей массой 18-20 г., которых заражали штаммами *V.cholerae cholerae* 1082 и 1084. Лечение проводили холерным фагом МЗ, по схеме Петруниной О.М. [15]. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (рН=7,6-7,8).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 приведены результаты изучения некоторых свойств 64 музейных штаммов классических холерных вибрионов, которые хранились в МЖК в лиофилизированном состоянии в течение многих лет. Была определена фаголизабельность этих штаммов холерными монофагами.

Взаимодействие фагов М1-М4, С, Эльтор, К1 Вир, ФБ со штаммами *V.cholerae cholerae* представлено в таблице 1. Было обнаружено, что только 55% штаммов не изменили, в соответствии с их паспортными данными своей чувстви-

тельности к фагам Мукерджи, а 8,4% штаммов полностью ее утратили.

**Таблица 1.** Результаты изучения некоторых свойств музейных штаммов *Vibrio cholerae cholerae*

Место выделения	Годы выделения	Число штаммов	Серовар	Лизогения	Лизис фагами					Фаго-тип
					С	Эль-Тор	ФБ	К1 Ви р	Группы М1-М4	
Индия	1937, 1949, 1953-63, 1968-79	31	Инаба, Огава, Гикосшима	+	+	-	-	-	1, 2, 3, 5, 6, 7	1(20), н/т(6), ф/р(5)
Россия	1888, 1942	2	Инаба, Огава	+	+	-	-	-	7	ф/р
Иран	1965	1	Огава	+	+	-	-	+ <sup>4X</sup>	2	н/т
Афганистан	1960, 1965	5	Инаба, Огава	+	+	-	-	+ <sup>4X</sup>	1, 2	1(5), н/т(1)
Пакистан	1958, 1966	3	Огава	-	+	-	-	-	1, 7	1(2), ф/р(1)
Китай	1955	4	Инаба, Огава	+	+	-	-	-	1, 2, 7	1(1), н/т(1), ф/р(2)
Индокитай	1927, 1947	2	Инаба, Огава	-	+	-	-	+ <sup>3X</sup>	1	1
Камбоджа	1958	1	Инаба	-	+	-	-	-	7	ф/р
Происхождение неизвестно – получены из:										
СЭЛ	1943	1	Огава	-	+	-	-	-	2	н/т
ВНИПЧИ «Микроб»	1954, 1957	2	Инаба, Огава	+	+	-	-	-	1, 4	1, 5
ГИСК им. Тарасевича	1954	2	Огава	+	+	-	-	-	7	ф/р
Сан-Франциско	1963	1	Огава	-	+	-	-	-	1	1
Франции	1963, 1988	5	Инаба, Огава	+	+	-	-	-	1, 2, 7	1(3), н/т(1), ф/р(1)
Англии	1963	1	Огава	+	-	+	-	+ <sup>4X</sup>	2	н/т
Болгарии	1988	3	Инаба, Огава	+	-	-	-	+ <sup>4X</sup>	1, 7	1(2), ф/р(1)

*Примечание:* + и - - наличие или отсутствие признака

(6) – число штаммов

№ штамма: 1X – 1799, 10657, 13603

2X – 680, 1799, 11131, 11134, 13603

3X – 830, 1082, 1602, 1763, 13603

4X – 544, 680, 1799, 10657, 13603

н/т – не типизируется

ф/р – фагорезистентные

Штаммы *V.cholerae cholerae* по лизабельности фагами Мукерджи были разделены на 7 литических групп (таб.2).

В первую группу вошло наибольшее количество штаммов (36) в отношении которых были активны все холерные фаги. А остальные группы

были представлены единичными штаммами (от 1 до 7). И в последнюю, 7 группу, были включены все фагорезистентные штаммы (15). Как видно из таблицы 2, 7 штаммов холерных вибрионов остались чувствительными только к фагу М3, а 3 штамма только к фагу М4. Штаммы 1090 и 11131

приобрели резистентность к фагу М3, а штамм 830 к фагам М1 и М4, сохранив чувствительность к фагам М2 и М3. Четыре штамма (971,1123,1761 и 13569) попали в 1-ю группу лизиса, так как приобрели чувствительность к фагам М1, М2, М3, М4.

**Таблица 2.** Распределение штаммов *V.cholerae cholerae* по чувствительности к холерным фагам М1-М4

Группа штаммов, лизированных фагами	Холерные фаги	Количество штаммов <i>V.cholerae cholerae</i> , чувствительных к фагам	Номера штаммов
1	М1, М2, М3, М4	36	438, 567, 781, 788, 810, 813, 971, 973, 1029, 1077, 1082, 1084, 1089, 1123, 1125, 1381, 1382, 1390, 1391, 1392, 1399, 1400, 1401, 1408, 1601, 1602, 1662, 1761, 1763, 1772, 11130, 13569, 13571, 13572, 13600, 13602
2	М3	7	2, 27, 544, 680, 792, 1766, 1799
3	М4	3	1767, 10655, 11132
4	М1, М2, М4	1	1090
5	М2, М4	1	11131
6	М2, М3	1	830
7*	Фагорезистентные	15*	251, 437, 590, 591, 698, 794, 803, 995, 1765, 1774, 10353, 10657, 11134, 13570, 13603

*Примечание:* \* - в 7-ю группу вошли фагорезистентные штаммы

Фаготип был установлен у 36 штаммов *V.cholerae cholerae*, при этом преобладающим был первый. Некоторые результаты не укладывались в схему фаготипирования.

Проанализировав полученные данные по диапазону лизиса холерных фагов, мы отобрали вирулентный фаг М3 в титре  $7 \cdot 10^9$  БОЕ/мл, для испытания его литической активности в организме животных, так как он лизировал наибольший процент штаммов по сравнению с другими фагами (~69%). В эксперименте использовали 30 белых мышей. Для внутрибрюшинного заражения применяли вирулентные фагочувствительные классические холерные штаммы 1082 – в дозе  $0,3 \cdot 10^9$  м.к./мл, и 1084 – в дозе  $0,5 \cdot 10^9$  м.к./мл. Лечение животных проводили однократно, сразу после введения патогенных бактерий, внутрибрюшинно. В содержимом брюшной полости определяли вибриотитр – количество жизнеспособных холерных вибрионов в 1 мл [11]. После введения культуры: для 1-й группы животных, зараженных *V.cholerae* 1082, вибриотитр составлял  $1,5 \cdot 10^8$  м.к., для 2-ой группы, зараженной *V.cholerae* 1084 –  $2,5 \cdot 10^8$  м.к. У 3-й группы животных после заражения *V.cholerae* 1082 и лечения фагом М3 вибриотитр составил  $5,5 \cdot 10^7$  м.к., а у 4-ой группы, зараженной *V.cholerae* 1084 и леченной фагом М3 –  $9,5 \cdot 10^7$  м.к. Лечение животных холерным бактериофагом приводило к падению вибриотитра в 2,6-2,7 раза.

Фаг М3, пропассированный через организм животных не только сохранял биологические свойства, но и обнаружил лизирующую активность в отношении 3 штаммов (11131, 13570, 13603), устойчивых к исходному фагу.

У 22 штаммов *V.cholerae cholerae* была выявлена спонтанная фагопродукция.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

При применении фага М3 установлено снижение вибриотитра (достоверность различий при сравнении с контрольными опытами составляла 95%). Выбранная система фаг и холерный вибрион пригодна для повышения литической активности фагов *in vivo*, разработки приемов введения фага и испытания двухкомпонентной системы, что позволит разработать схему лечения.

Сравнивая особенности свойств фага М3 после пассажа на животных установлено его преимущество перед исходным, так как спектр лизиса мутанта был шире, распространяясь на устойчивые штаммы. Эти данные свидетельствуют о целесообразности дополнительных пассажей фага *in vivo*. Наши результаты указывают на возможность конструирования препарата с включением равноценного по диапазону литического действия фага другого типа. Ранее по схеме [10] 33 штамма классических холерных вибрионов были дифференцированы на 3 фаготипа – 1,3,6. Анализ наших данных показывает преобладание первого фаготипа среди 64 штаммов, характеристика этого признака важна в практике

эпидобследования вспышек холеры. Исследованные на лизогению 64 штамма *V. cholerae cholerae* хранившиеся в музее живых культур РПЧИ, были представлены двумя группами, одна из которых включала лизогенные, а другая – нелизогенные, при этом предлагаемые нами фаги были активны в отношении обеих групп.

В результате исследований установлено изменение лизабельности диагностическими холерными фагами музейных штаммов холерных вибрионов ( $\approx 45\%$ ) в процессе хранения. При сравнительном анализе наибольшей литической активностью обладали фаги М3 и М4. Данные литературы [2] свидетельствуют о том, что фаги относящиеся к 4 серологической группе фагов, представителями которых являются фаги С и М4, быстро (через 12 ч) элиминируются из организма экспериментального животного. В то же время фаги 3 серологической группы, например фаг А, сохраняются в организме животного в течение 2 суток и более. Холерный фаг К1 Вир, также как и фаг ФБ избирательно лизировали только по 5 штаммов *V. cholerae cholerae*, в связи с чем в дальнейшем они не могут быть использованы в лечебных целях. Применение нового индикаторного штамма *V. cholerae* O139 – KM152 (P-16373) позволило выявить дополнительно 5 фагов. Из лизогенных холерных штаммов были изолированы фаги, идентичные по антигенной структуре фагам – «Каппа» или «СУФ» [13,25].

Таким образом, перспективными для проведения фаготерапии экспериментальной холеры являются два – М3 и С. Эти бактериофаги при сравнении с остальными обладают высокой литической активностью и широким диапазоном действия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М.. Бактериофаги. - М.,1961 – 522 с.
2. Бессель М.М., Базунова Л.П., Наумшина М.С. и др. // Проблемы ООИ,1971 – Вып. 6 (22) – с.32-35
3. Быстрый Н.Ф. // Мат-лы 3-й Международн. конф. институтов вакцин и сывороток соц. стран – 1965 – с.120-122
4. Дрожевкина М.С. // Мат-лы юбилейного симпозиума посвященного 50-летию Тбилисского НИИВС – Тбилиси, 1974 – 340 с.
5. Кудрякова Т.А. Лизогения холерных и парагемолитических вибрионов и ее практическое значение // Автореферат дис-ции ..... доктора мед. наук – Ростов-на-Дону, 1996 – 42 с.
6. Кудрякова Т.А., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н. и др. // Мат-лы V111 Рос. науч.-практ. конференции по проблеме «Холера» – Ростов-на-Дону, 2003 – с.216-219
7. Лазарева Е.Б., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. // Антибиотики и химиотерапия – 2001 Т.46, №1 – с.10-14
8. Лазарева Е.Б. // Антибиотики и химиотерапия –2003 – Т.48,№1 – с.36-40.
9. Методические указания М.У. – 4.2.1097-02 Лабораторная диагностика холеры / Сост. Федоров Ю.М., Жилина Н.Я., Ломов Ю.М. и др./ - Москва, 2002 – 95 с.
10. Методические рекомендации по фаготипированию холерных вибрионов / Сост.: Дрожевкина М.С., Арутюнов Ю.И. – М., 1983 – 10 с.
11. Методические рекомендации по определению титра холерных вибрионов в содержимом кишечника и органах экспериментальных животных / Сост.: Шершенко Т.Е., Авроров В.П. / Мат-лы проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» - Ростов-на-Дону, 2001 – с.116-117.
12. Остроумова Н.М. // Проблемы ООИ – Саратов,1970 – Вып.6 (16) – с.5-10
13. Остроумова Н.М., Мельникова А.Ф., Царева С.П. // Проблемы ООИ – Саратов, 1971 – Вып.6 – с.4-10
14. Переседова Е.С., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. // Клинич. лаборат. диагностика – 2003 - №5 – с.39-41
15. Петрунина О.М. // Труды института «Микроб» - Саратов, 1960 – Вып.4 – с.328-331.
16. Сомова А.Г. Холерные вибрионы и их бактериофаги // Автореферат дис-ции ..... доктора мед. наук – Ростов-на-Дону,1968 – 595 с.
17. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий – М., 1968 – 170 с.
18. Ackerman H.B. // Microbiol. Sci. – 1987 – Vol.4, №7 – pp.210-214
19. Lederberg J. // PNAS USA – 1996 – Vol.93 – pp.3167-3168
20. Lorch A. // Biotechnology and Development Monitor –1999–No.39–pp.14-17
21. Merrill C.R., Biswajit B., Carlton P. et.al. // PNAS USA – 1996 – Vol.93 – pp.3188-3192
22. Mukerjee S. // Ann. Bioch. and exp. Med. – 1961 – V.XX1, №9 – pp.257-264
23. Mukerjee S. // WHO Scient. Group on Cholera Res. Inform. Doc.–1962–№10
24. Nair G.B., Faruque S.M. et.al. // J. Clin. Microbial. – 2002 – Vol.40, №9 – pp.3296-3299.
25. Takeya K., Shimodori S. // Trop. Dis. Bull. – 1963 – Vol.60, №10 – p.941.

**Selection of bakteriofags for treatment of an experimental cholera, caused classical cholera vibriions**

Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V., Alieva A.A., Sayamov S.R.

Some properties of 64 museum strings of classic cholera vibrioes after long storage in the live cultures museum in lyophilized condition were studied. The change of lysebility of the museum strings by diagnostic cholera phages (1-4 Mukerji, C, Eltor, K1 Vir, FB) is established. From the lysogenic cholera strains the phages identical on antigenic structure to phages – «Саппа» or «SUF» have been isolated. The activity of the phage M3 in the treatment of an experimental cholera on the model of white mice is marked.