

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-109

**КОМБИНИРОВАННАЯ СТРАТЕГИЯ: БАКТЕРИОФАГИ
И ПРОБИОТИКИ ПРОТИВ ЭНТЕРОПАТОГЕНОВ****PROBIOTIC-PHAGE COMBINATION THERAPY:
TOWARD NEXT-GENERATION GUT INFECTION PREVENTION**М. А. Пасивкина¹, Е. С. Зубкова¹, М. Н. Анурова^{1,2}, А. И. Лаишевцев^{1,3}¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова³Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, МоскваM. A. Pasivkina¹, E. S. Zubkova¹, M. N. Anurova^{1,2}, A. I. Laishevtsev^{1,3}¹G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University³Federal Research Center — All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Y. R. Kovalenko RAS, Moscow

✉ pasivkina@gabrich.ru

Аннотация

Выделено и охарактеризовано по два новых вирулентных бактериофага к диареогенной *E. coli* (также активны в отношении *Shigella flexneri* и *Shigella sonnei*) и *Salmonella enterica*. Выделено и охарактеризовано 3 новых пробиотических штамма-антагониста энтеропатогенов *Lactobacillus spp.* Проверена биосовместимость активных компонентов, охарактеризована *in vitro* эффективность прототипа профилактического продукта.

Abstract

2 new virulent bacteriophages to diarrheagenic *E. coli* and *Salmonella enterica* were isolated and characterized. 3 new probiotic *Lactobacillus* strains-antagonists to enteropathogens were isolated and characterized. The biocompatibility of active components was tested, and the *in vitro* efficacy of the prototype prophylactic product was characterized.

Целью исследования является разработка лечебно-профилактического продукта на основе вирулентных бактериофагов и пробиотических штаммов *Lactobacillus spp.*, эффективных при дисбиотических нарушениях и острых кишечных инфекциях. Выбор *E. coli*, *Shigella spp.* и *Salmonella enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*) в качестве целевых бактерий обусловлен статистически значимой высокой распространенностью среди высеваемых энтеропатогенов.

Обозначенная ВОЗ в мировом масштабе проблема антимикробной резистентности представляет собой серьезный вызов для систем здравоохранения, в связи с чем актуальны поиск и внедрение новых альтернативных антибиотикотерапии методов противодействия патогенным бактериям. Среди таких решений значимую роль играют вирусы бактерий и пробиотические микроорганизмы.

В ходе работ из биологического материала (сточные воды, почва, навоз) было выделено 5 эшерихиозных бактериофагов и 6 сальмонеллезных бактериофагов. По мере изучения морфологических, молекулярно-генетических свойств, параметров взаимодействия фаг — клетка, чувствительности к инактивирующему действию физических и химических агентов (температура, буферные растворы с различными значениями pH, хлороформ) было выделено 4 наиболее производственно-перспективных фага (см. таблицу).

Пробиотические штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* были выделены из биологического материала, полученного от здоровых людей. Идентификация до вида была проведена при помощи 16S-рРНК-секвенирования. Фено- и генотипические характеристики лактобацилл, а также безопасность (токсигенность, токсичность, безвредность, вирулентность и наличие дерматонекротических свойств) были изучены согласно МУК 4.2.2602-10 [1].

Биосовместимость выделенных и описанных агентов изучали при смешивании в жидком и лиофилизированном состоянии. При смешивании консорциума лактобацилл и их метаболитов с суспензией бактериофагов в 0,9 % NaCl, активность пробиотических микроорганизмов не падала, в то время как титр вирусных частиц

снижался до 0 в течение 24 ч. Соединение лиофилизированных компонентов позволило получить стабильную во времени (6 месяцев) комбинацию, сохраняющую антибактериальную активность.

Характеристики выделенных бактериофагов

Характеристики		vB_SenM-G1m	vB_SenM-P5nasl26	vB_EcoM-Ec13-52	vB_EcoP-Huge
Целевые бактерии		<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Infantis</i>	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Infantis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> , <i>Sh. flexneri</i> , <i>Sh. sonnei</i>
Спектр литической активности, %		80	80	70	65
		95		85	
Морфология колоний		1,5–2 мм с ореолом 1 мм с ровными краями	1 мм с ореолом 3–4 мм с ровными краями	1 мм с небольшим мутным ореолом	3,0 мм с ореолом 5–6 мм с ровными краями
Параметры взаимодействия фаг — клетка		Адсорбция: 5 min 98 % Латентный период: 20 min Выход на 1 клетку: 157	Адсорбция: 3 min 97,6 % Латентный период: 20 min Выход на 1 клетку: 110	Адсорбция: 12 min 99,49 % Латентный период: 40 min Выход на 1 клетку: 79	Адсорбция: 1,5 min 98 % Латентный период: 30 min Выход на 1 клетку: 90
Стабильность, 30 дней	T, °C	–80...+25	–80...+25	–80...+25	–80...+25
	pH	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0	6,0–8,0
	CHCl ₃	+	+	+	+

In vitro эффективность полученного прототипа профилактического продукта была изучена путем совместного культивирования бактериофагов, лактобацилл и патогенов (*E. coli*, *S. enterica*) в течение 6 ч с последующим высевом на селективные среды. Результаты эксперимента показали, что противомикробное действие разработанной комбинации было выше, чем отдельные эффекты фагов и пробиотиков.

Полученные результаты подтверждают потенциал применения фаго-пробиотической комбинации в качестве инновационного средства профилактики энтеропатогенных инфекций. В ходе проведенных исследований сконструированный продукт показал свою *in vitro* эффективность. На следующем этапе планируется проведение *in vivo* исследований на мышинных моделях сальмонеллеза и колибактериоза для комплексной оценки профилактической эффективности, безопасности и влияния на состав кишечной микробиоты.

Литература

1. МУК 4.2.2602-10. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические указания. Утв. Роспотребнадзором 21.04.2010. М.: Роспотребнадзор, 2011. С. 80.