

Бактериофаги - пробиотические средства регуляции микробиоценозов и деконтаминации микроорганизмами продуктов питания, животных и растений

А.В. Алешкин¹, А.В. Караулов⁴, Э.А. Светоч², Н.В. Воложанцев², В.А. Алёшкин¹, С.С. Афанасьев¹, О.В. Рубальский⁵, Д.А. Васильев³, С.Н. Золотухин³, М.С. Афанасьев⁴, В.М. Лахтин¹, М.О. Рубальский⁵

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского¹, Москва

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии², п. Оболенск Серпуховского района Московской области

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия³, Ульяновск

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова⁴, Москва

Астраханская государственная медицинская академия⁵, Астрахань

Bacteriophages as probiotic tools to regulate microbiocenosis and decontaminate food products, animals and plants with microorganisms

A.V. Aleshkin¹, A.V. Karaulov⁴, E.A. Svetoch², N.V. Volozhantsev², V.A. Aleshkin¹, S.S. Afanasiev¹, O.V. Rubalskiy⁵, D.A. Vasil'ev³, S.N. Zolotuhin³, M.S. Afanasiev⁴, V.M. Lakhtin¹, M.O. Rubalskiy⁵

Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology¹, Moscow

State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology², Obolensk, Moscow region

Ulyanovsk State Agricultural Academy³, Ul'yanovsk

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University⁴, Moscow

Astrakhan state medical academy⁵, Astrakhan

Аннотация

Бактериофаги - пробиотические средства регуляции микробиоценозов и

деконтаминации микроорганизмами продуктов питания, животных и растений

В обзоре рассматриваются вопросы безопасного и эффективного применения бактериофагов в качестве пищевых добавок - средств деконтаминации пищевых продуктов (на всех стадиях производства), животных, растений и пробиотических биологически активных добавок к пище, служащих дополнительным источником бактериофагов для организма человека, присутствие которых в нормофлоре позволяет снизить риск развития у индивидуума таких высококонтагиозных пищевых инфекций как эшерихиоз, сальмонеллез, дизентерия и т.д.

Summary

The survey examines the problems related to the safe and effective use of bacteriophages as food additives, that is, agents to decontaminate the food products (during all manufacturing stages), animals, plants and probiotic dietary supplement which are the additional source of bacteriophages for the human organism which presence in the normoflora allows to reduce risks of such highly contagious foodborne infections in humans as escherichiosis, salmonellosis, dysentery, etc.

Ключевые слова

Бактериофаги, пробиотики, биологически активные добавки к пище (БАД), бактериофаг-опосредованный биоконтроль, фаговый биопроцессинг, профилактический прием бактериофагов.

Keywords

Bacteriophages, probiotic, dietary supplement, bacteriophage biocontrol, bacteriophage bioprocessing, bacteriophage in prophylaxis.

Бактериофаги – это вирусы, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода [1]. Установлено присутствие фагов в нормальной микрофлоре людей и животных [1, 2]. Более поздние многочисленные исследования подтверждают присутствие и выделение фагов из организма человека и животных с калом, мочой, слюной и мокротой в норме и при патологии в концентрациях достигающих 10^6 БОЕ/мл [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Бактериофаги присутствуют повсеместно на объектах окружающей среды в воде, почве, на растениях и т.д. в количествах превышающих миллионы частиц на единицу субстрата (например, в капле морской воды) [13]. Вопрос использования бактериофагов как части пищевого рациона может носить скорее количественный (исходя из содержания вирусных частиц в продукте), а не качественный характер, как это рассматривается в случае с химическими антибактериальными средствами. Ряд авторов относят бактериофаги к разряду пробиотиков, подчеркивая, что по своей биологической природе они полностью подходят под определение ВОЗ: «Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах полезны для организма хозяина» [14, 15, 16]. Специфичность характера взаимодействия фаговой частицы с индикаторной бактериальной культурой в принципе ограничивает возможность прямого отрицательного воздействия бактериофагов на организм (клетки) человека, что и является основой их безопасного применения для деконтаминации продуктов и предотвращения бактерионосительства. Однако теоретически при использовании бактериофагов можно предположить возникновение ряда побочных эффектов, которые могут реализовываться пятью путями:

1. Путем инфицирования бактерий нормальной флоры человека с развитием ятрогенного дисбактериоза как это происходит в случае применения других антимикробных агентов. Селекция производственных штам-

мов бактериофагов, используемых в целях фагопрофилактики, позволяет отобрать вирусные частицы с максимально узкими диапазонами специфической литической активности, ограниченной в рамках вида или даже штамма бактериального хозяина [17, 18]. Включение в фаговый коктейль, используемый в целях снижения риска развития пищевых инфекций, известных, по данным литературы, вирусов поражающих бифидобактерии и лактобациллы исключено [13]. Более чем 50-летний опыт применения моно и поливалентных фаговых рецептур как лекарственных средств в терапии ОКИ и декомпенсированных форм дисбактериоза в России (Советском Союзе) и Польше также подтверждает невозможность реализации неспецифической литической фаговой активности в отношении нормальной микрофлоры человека [19, 20, 21, 22];

2. Посредством стимуляции иммунных реакций человека. В результате проведенных клинических исследований было показано, что бактериофаги могут оказывать влияние на различные функции основных популяций клеток иммунной системы человека участвующих как в формировании врожденного, так и приобретенного иммунитета: продукцию цитокинов, пролиферацию Т-клеток, синтез антител, и, наконец, фагоцитоз и респираторные взрывы фагоцитов [22, 23]. В тоже время в процессе местной и системной фаготерапии (профилактики) не были выявлены существенные анафилактические реакции за исключением эндотоксической, связанной как с качеством используемой фаговой композиции (что будет рассмотрено ниже), так и с реакцией бактериолиза (реакция Яриша-Герксгеймера) *in situ* [24]. Минимизируя концентрацию фаговых частиц при профилактическом использовании бактериофагов до титра высеваемого из организма человека (10^3 - 10^6 БОЕ/мл) можно уменьшить количество эндотоксина одномоментно образующегося при бактериолизе [24]. Польские исследователи акцентируют внимание на модулирующем влиянии бактериофа-

- гов на некоторые иммунные реакции, вызванные патогенными бактериями и вирусами, что может положительно проявляться в синергетическом (антибактериальном и иммуномодулирующем) эффекте бактериофагов [22, 23];
3. Путем модуляции вирулентности бактерии-хозяина. Предотвращение данного воздействия бактериофагов на организм человека, также напрямую связано с направленной селекцией производственных штаммов, подразумевающей включение в композицию исключительно вирулентных фагов, не образующих ни при каких условиях устойчивых лизогенов на бактериальной культуре [25, 26, 27]. Таким образом, можно избежать как прямой модификации фенотипа бактерии за счет прикрепления к *DNA* хозяина профагового генома, так и трансдукции генов, кодирующих токсины, от лизогенных токсигенных бактериальных культур к непатогенным (т.н. горизонтальный перенос), а также снизить вероятность переноса между микроорганизмами генов антибиотикорезистентности и возникновения фагоустойчивых лизогенных бактериальных культур [14].
 4. Путем спонтанной трансдукции неумеренных (вирулентных) фагов. Опасность данного феномена заключается в переносе известных локусов патогенности, которые могут находиться в геноме бактериофага. Используя ПЦР-типирование на токсин-кодирующие штаммы или полное секвенирование фагового генома, можно максимально обезопасить применение бактериофагов у человека [28, 29].
 5. Посредством введения в организм человека токсинов бактерии-хозяина, содержащихся в стерильном фильтрате фаголизата. Качество готового фагового коктейля обязательно контролируется на содержание эндо- и экзотоксинов [30]. Концентрацию экзотоксинов можно свести к нулю используя непатогенные бактериальные культуры для наращивания биомассы бактериофагов (например, *E. coli* K-12 для эшерихиозного и *L. innocua* для листериозного фага) [31]. Содержание эндотоксина в композиции, определяемое после дополнительной очистки стерильного фильтрата фаголизата, нормируется в единицах эндотоксина на мл согласно регулирующих правил страны производителя (так, по документам EFSA- 50 ЕЭ/мл) [25]. Количество же эндотоксина, выделяющегося *in situ*, не подлежит контролю, однако может быть отрегулировано с помощью дозы и кратности приема

бактериофагового коктейля. Таким образом, после более чем восьмидесятилетнего изучения фагов и их взаимодействия с эукариотическими клетками (в т.ч. животных и человека) свидетельств негативного специфического воздействия бактериофагов на здоровье человека не выявлено [32].

Фаги могут быть использованы в качестве природных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями у людей, животных и сельскохозяйственных культур [33, 34, 35]. Возможно применение бактериофагов при проведении санитарно-гигиенических мероприятий в пищевой промышленности, сфере общественного питания, в детских и воинских коллективах, а также лечебно-профилактических учреждениях [36, 37, 38, 39, 40, 41]. Под термином биоконтроль подразумевается использование бактериофагов как непосредственно человеком в виде пероральных или иных форм бактериофагокомпозиций, так и для обработки сельскохозяйственных культур и животных (до сбора урожая и забоя), инструментария и оборудования больниц и предприятий пищевой промышленности, полуфабрикатов или готовых продуктов питания с целью сокращения количества присутствующих на этих объектах определенных штаммов патогенных бактерий, в том числе вызывающих пищевые инфекции, а также для фагоидентификации потенциально опасных микроорганизмов [28, 42]. Весь спектр лечебных мероприятий такого рода обозначается исследователями как фаготерапия [32].

Рассматривая вопрос «полезности для организма хозяина» или эффективности применения бактериофагов у человека необходимо отметить, что уже более сорока лет в Советском Союзе сначала на базе Тбилисского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. Г. Элиавы и Уфимского научно-исследовательский института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, а позднее и в Российской Федерации на филиалах предприятия ФГУП «Микроген» (Нижегородском, Пермском и Уфимском) производятся свыше десятка наименований лекарственных средств как на основе отдельных видов бактериофагов, так и их комбинаций для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и декомпенсированных форм дисбактериоза, а также против возбудителей ряда гнойно-воспалительных инфекций [19, 43]. Это жидкие и таблетированные формы лечебных моновалентных препаратов стафилококкового, стрептококкового, коли, клебсиеллезного, сальмонеллезного, дизентерийного, брюш-

нотифозного, протейного и синегнойного бактериофагов и комбинированные рецептуры содержащие несколько видов фагов: коли-протейный, пибактериофаг (против стафило-, стрептококков, клебсиелл, протеев, синегнойной и ки-шечной палочек), интести-фаг (против шигелл, сальмонелл, стафило-, энтерококков, протеев, кишечной и синегнойной палочек) и др. [45]. Лекарственные препараты представляют собой стерильные фильтраты бактериальных фаголизатов, их назначают внутрь и местно: орошение ран и слизистых оболочек, введение в полость матки, мочевого пузыря, уха, придаточных пазух носа, конъюнктиву глаза, а также в дренированные полости – брюшную, плевральную, в полости абсцессов после удаления гноя. В последние годы в России бактериофаги в качестве терапевтических средств нашли свое применение в стоматологической и дерматологической практике. На их основе выпускаются зубная паста и крем [46].

Мировая практика фаготерапии значительно уступает российской (за исключением, может быть, польской и грузинской). На фоне десятков тысяч пациентов, принимающих бактериофаги по назначению врачей в Российской Федерации (что количественно согласуется с объемом продаж лекарственных препаратов на основе бактериофагов по данным ежегодного розничного аудита, проводимого кампаниями IMS Health, DSM, RMBC и Фармэксперт), в рамках отраслевого стандарта медицинской помощи: «Дисбактериоз кишечника. Протокол ведения больных» [47], немногочисленные современные сообщения западных коллег (в сороковые годы прошлого столетия массовый выпуск бактериофагов осуществлялся компаниями L'Oreal во Франции – 5 наименований препаратов и Eli Lilly в США – 6 разновидностей моно и поливалентных лекарственных фагосодержащих средств) о проводимых начальных стадиях клинических испытаний в США, Великобритании и Бельгии выглядят более чем скромно [2]. Однако опыт применения фагов в комплексе санитарно-эпидемиологических мероприятий в странах ЕЭС, США и Канады представлен в научной литературе достаточно широко [28, 42, 39]. Эти мероприятия включают в себя четыре сферы деятельности: (1) бактериофаг-опосредованный биоконтроль – использование фагов для борьбы с бактериями поражающими сельскохозяйственные растения и животных на этапе предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты и т.д., до сбора урожая; мясной и молочный

скот, домашняя птица и т.д., до забоя); (2) фаговый биопроессинг – применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой к употреблению продукции; (3) профилактический прием бактериофагов людьми в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек пищевых инфекций; (4) фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов (не рассматривается в данном обзоре).

Примером фаг-опосредованного биоконтроля может служить зарегистрированный в декабре 2005 года Агентством охраны окружающей среды США (US EPA) биопестицид AgriPhage, содержащий коктейль вирулентных фагов лизирующих *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* и *Pseudomonas syringae pv. Tomato*, поражающих плоды томата и перца (т.н. «черная» бактериальная пятнистость) [26]. Первоначально бактериофаги, вошедшие в биопестицид, были выделены (изолированы) с плодов овощей, инфицированных этими бактериями. В литре фагового коктейля, производимого американской фирмой OmniLytics, содержится не менее $4,1 \cdot 10^{12}$ вирусных частиц (т.е. $4,1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл). Для опрыскивания 1 акра овощных плантаций используется 1 или 2 пинты AgriPhage, разведенного в 100 галлонах воды [48]. В 2006-2007 годах OmniLytics получила одобрение Департамента сельского хозяйства США (USDA) на использование композиции на основе бактериофагов против *E.coli* O157:H7 и сальмонелл (BacWash) для обработки перед забоем шкур домашнего скота, а также всех мест возможного инфицирования животных перед их умерщвлением (загонов, транспортных контейнер и т.д.). Установлена высокая эффективность бактериофагов в сфере биоконтроля растений и животных, в последствии употребляемых человеком в пищу [22].

В качестве примера фагового биопроессинга может быть представлена зарегистрированная в 2006 году Управлением по продовольствию и медикаментам США (US FDA) фагосодержащая пищевая добавка (вспомогательное техническое средство – processing aid) на основе поливалентного листериозного коктейля ListShield (LMP-102, производитель Intralytix, США) – «*Listeria monocytogenes* Specific Phage Preparation», включающего 6 различных фагов, к которому чувствительны 170 штаммов *L. monocytogenes*, позволяющая производить об-

работку готового к употреблению (т.н. RTE products) мяса домашних животных и птиц. Эта пищевая добавка применяется непосредственно перед упаковкой на мясокомбинатах и птицефабриках для деконтаминации полуфабрикатов, колбас, мясных нарезок путем аэрозольной обработки их поверхности в дозе не более 1 мл на 500 см² площади пищевых продуктов [27, 40]. Экспериментально доказана эффективность этого коктейля и при обработке фруктов [49-58, 50-59]. В том же году FDA признало, что пищевую добавку Listex (производитель Migeos, Нидерланды) на основе штамма листериозного бактериофага P100 можно отнести к классу пищевых добавок GRAS- Generally Recognised as Safe- как правило безопасных, т.е. не требующих дополнительных исследований подтверждающих безопасность их применения в пищевой промышленности, и использовать при производстве сыра, а позже (в 2007 году) и других продуктов питания (EFSA дало разрешение на деконтаминацию с помощью Listex сырой рыбы в 2012 году) [25, 28, 29, 51]. Показательно, что эффективные концентрации бактериофага различаются в зависимости от деконтаминируемого продукта. Так в жидких пищевых продуктах (молоко и сырный рассол), распространение фаговых частиц происходит равномерно и свободно. Иначе дело обстоит в случае продуктов с ровной твердой поверхностью (хот-доги, листья салата и т.д.), где общая площадь поверхности и ее способность впитывать жидкость из фаговой суспензии являются решающими параметрами. Самыми сложными с точки зрения фагового биопроцессинга являются продукты с неровной поверхностью обладающие большой площадью (рыба, мясо и морепродукты), что физически ограничивает доставку фаговых частиц ко всем бактериальным клеткам-мишеням. Подобрана универсальная (с точки зрения достижения максимального эффекта деконтаминации пищевых продуктов) концентрация суспензии листериозного бактериофага – не менее 10⁸ БОЕ/мл или см² [52]. В 2011 году Intralytics представила на рассмотрение в US FDA коктейль из 3 вирулентных бактериофагов (EcoShield или ECP-100) относящихся к семейству *Myoviridae*, первично выделенных из пресной и морской воды, активных в отношении 111 штаммов *E. coli* O157:H7, 76 штаммов *E. coli* других серотипов и 20 штаммов иных видов бактерий и получила разрешение (Food Contact Notification) на его использование в процессе переработки сырого мяса и фарша.

Установлена высокая эффективность (количество бактерий *E. coli* сократилось на 95% за 24 часа) разработанной пищевой добавки при деконтаминации разрешенного класса полуфабрикатов [53, 28]. В том же году Голландский медицинский экспертный совет выдал Migeos временное разрешение на использование пищевой добавки на основе сальмонеллезного бактериофага (*Salmonex*) с целью проведения полномасштабных испытаний на базе одной из крупнейших в Европе птицеперерабатывающих фабрик [51]. А уже в 2012 году Intralytics представила на рассмотрении FDA с целью последующего получения разрешение на пищевую добавку категории GRAS SalmoFresh- коктейль литических бактериофагов, специфически активных против высоко патогенных штаммов сальмонелл серотипов Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, специально разработанный для деконтаминации сырого мяса и птицы до разделки туш [54]. В экспериментальных работах при искусственном инфицировании *S. enteritidis* куриной кожи, *S. typhimurium* куриных ножек и сосисок из куриного мяса независимые исследователи показали эффективность фагового коктейля, позволившего на 2 lg снизить контаминацию полуфабрикатов [28, 42, 39]. Обработка коктейлем бактериофагов (PC1), содержащем в своем составе фаг Felix 01 с широким спектром литической активности, инфицированной *S. typhimurium* кожи свиньи, также позволила существенно снизить плотность бактериального обсеменения, а в случае использования концентрации фаговых частиц в 10 и более раз превышающих плотность искусственного бактериального инфицирования удалось добиться 99% деконтаминации её поверхности [55].

Третья сфера санитарно-эпидемиологического использования бактериофагов, позволяющая существенно снизить риск возникновения вспышечных и sporadических случаев пищевых инфекций, полностью отражена в разработанной компанией Intralytics пробиотической БАД на основе шигеллезного бактериофага («phage-based probiotic dietary supplement»- цитата по оригиналу) ShigActive. В настоящее время проходит 3 фаза проекта, предполагающего широкомасштабное использование данной БАД в армии США [54, 56]. Идея профилактического приема бактериофагов не нова и использовалась в Вооруженных Силах и других замкнутых коллективах еще в период Советского Союза. Применение поливалентного дизентерийного

бактериофага в эпидемических очагах позволяло снизить заболеваемость дизентерией в среднем в 3-12 раз. В периоды сезонного подъема заболеваемости обязательному фагированию подвергались работники пищеблоков, военнослужащие, дети в дошкольных учреждениях и лица, занятые обслуживанием водопроводных сооружений и хозяйственно-бытовых объектов [57]. В 1963-1964 гг. в программе клинических испытаний по профилактике бактериальной дизентерии в Тбилиси приняли участие 30 769 детей в возрасте от 6 месяцев до 7 лет. Дети, проживавшие на одной стороне улицы (17 044 человек) получали шигеллезный бактериофаг в таблетках (торговое название поливалентный дизентерийный) раз в неделю в течение 109 дней, в то время как дети, проживавшие на другой стороне улицы, получали плацебо. Применение бактериофага позволило в 3,8 раз уменьшить количество пациентов с клинически подтвержденной дизентерией (1,8 и 6,7 больных на 1000 детей в фагированной и контрольной группах соответственно), в том числе в 2,6 раза сократилось количество случаев подтвержденных микробиологически (0,7 и 1,8 соответственно). Воздействие бактериофагов снизило также выявление диареи другой этиологии (15 и 45 случаев на 1000 детей в возрасте от полугода до года в группах принимавших и не принимавших препарат соответственно), что предположительно послужило свидетельством защитного эффекта шигеллезного бактериофага против ряда серотипов *E. coli*. Наиболее выраженный профилактический эффект был зафиксирован у детей до 3 лет [58]. С июня по ноябрь 1965 года в Горьковской области в 58 ясельных коллективах было проведено сравнительное исследование эффективности фагопрофилактики двумя препаратами одновременно (дизентерийным и коли-протейным). Фагирование 3547 детей (30 яслей) осуществлялось 1 раз в неделю в течение 5 месяцев в дозе от 5 (дети младше полугода) до 25 мл (дети старше 3 лет) каждого бактериофага, группой сравнения послужили 1942 ребенка (23 ясельных коллектива) не получавших бактериофаги. Заболеваемость детей получавших бактериофаг (учитывались все желудочно-кишечные заболевания, в т.ч. неподтвержденные бактериологически) в период наблюдения составила 4,4%, а в группе сравнения 13,5%. Во столько же раз (3,3) была ниже заболеваемость микробиологически подтвержденными дизентерией и колиэнтеритами [17]. Летом 1982-1983 три тысячи военнослужащих из

разных регионов СССР (Украины, Средней Азии, Урала и Дальнего Востока) приняли участие в программе оценке профилактического фагирования поливалентными дизентерийными таблетками с кислотоустойчивым пектиновым покрытием по схеме по 2 таблетки одномоментно один раз в 3 или 5 дней (2 опытные группы равного количества) за 1,5-2 часа до еды. В контрольной группе солдаты получали таблетки с глюконатом кальция (плацебо). Опытные и контрольная группы формировались методом случайной выборки. Все военнослужащие находились в тождественных эпидемиологических условиях. Уровни заболеваемости в опытных и контрольной группе в период эпидемического подъема статистически достоверно различались ($p < 0,001$) достигая на Дальнем Востоке в ряде воинских коллективах отличий в 9,5 раз (заболеваемость в опытной группе на фоне возникшей в подразделении вспышки острой дизентерии, вызванной потреблением инфицированной *Sh. flexneri* воды, при фагировании 1 раз в 3 дня была ниже чем в контрольной в 9,5 раз, при фагировании по схеме 1 раз в 5 дней в 5,7 раза) [37]. Использование сальмонеллезного бактериофага в аналогичных целях привело к снижению заболеваемости сальмонеллезом по стране в 2-4 раза. Показателен опыт применения адаптированных к госпитальной микрофлоре бактериофагов в Нижегородской детской областной клинической больнице (отделение реанимации новорожденных) в период осложнения эпидемиологической ситуации, где наряду с обычными противоэпидемическими мероприятиями были использованы и бактериофаги. Фагирование внешней среды всех функциональных помещений отделения проводилось «Интести-бактериофагом» и «Бактериофагом синегнойным». В профилактических целях синегнойный бактериофаг применяли всем новорожденным через рот при поступлении в отделение, а также фагировали новорожденных, контактных по палате с больным синегнойной инфекцией; препарат применяли в увлажнительных камерах аппаратов искусственной вентиляции и путем распыления во внешней среде палаты, в которой находился больной. Снижение заболеваемости внутрибольничной инфекцией синегнойной этиологии в 11 раз, а также уменьшение в стационаре контаминированности объектов внешней среды показало высокую эффективность применения бактериофагов, адаптированных к госпитальной микрофлоре [57]. Впервые в отечественной

и мировой практике профилактика нозокомиального сальмонеллеза осуществлялась всем больным отделений ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, где были выявлены случаи данной инфекции. При этом бактериофаг назначали по следующей схеме: первые 5 дней по 40-50 мл жидкого или 2 таблетки сухого бактериофага 2-3 раза в день. Тяжелым больным, которые не могли принимать препарат перорально, его вводили через зонд 2-3 раза в день по 30-50 мл. В дальнейшем препарат продолжали применять в указанных дозах 1 раз в день в течение всего пребывания пациента в стационаре. Схема 40-50 мл (2 таблетки) 1 раз в день применялась и в отношении пациентов, вновь поступающих в пораженные отделения стационара, с первого дня их пребывания. Санация и динамическое наблюдение за переболевшими лицами из числа медицинского персонала с использованием антибиотиков, как показывает практический опыт, процесс организационно достаточно сложный, трудоемкий, малоэффективный и не безвредный в отношении общего воздействия на организм человека. Для санации медицинского персонала использовали сухой бактериофаг в дозе по 2-4 таблетки 3 раза в день в течение 5-7 дней. В последующем осуществляли переход на профилактическое использование препаратов, обеспечиваемое приемом 2 таблеток 3 раза в неделю в течение времени существования эпидемического очага в стационаре. Санировано более 2500 сотрудников. Динамическое наблюдение в течение последующих 12 месяцев после проведения данных мероприятий не позволило установить фактов бактериовыделения или заболевания манифестными формами сальмонеллеза среди медицинского персонала, что подтверждает эффективность его профилактического применения [36].

Таким образом, сама по себе процедура фагирования лекарственными препаратами бактериофагов условно здоровых детей и взрослых продолжавшаяся месяцами сопоставима со схемой приема пробиотических биологически активных добавок к пище, регистрационно узаконенная в Российской Федерации лишь в конце 1990-х годов [17, 37, 59]. Она может рассматриваться обоснованием идеи введения бактериофагов в пищевой рацион без назначения врача, принадлежащей американским ученым (Sulakvelidze и Kutter) [14, 15, 16]. Практическая реализация такого подхода наиболее полно отражена американскими коллегами на экспериментальной модели листериоза мышей на фоне приема бактериофагового коктейля ListShield.

Исследование включало 7- и 90-дневное воздействие листериозным фагом на животных. В первом опыте участвовали 3 группы животных: (1) контрольная группа – 15 мышей получавших фосфатный буфер 3 дня до и 3 дня после инфицирования через желудочный зонд штаммом *Listeria monocytogenes* Lm370 в количестве 10^5 КОЕ, (2) испытуемая группа – 20 мышей получавшая ListShield в титре 10^5 БОЕ через желудочный зонд ежедневно 3 дня до и 3 дня после заражения тождественного контрольной группе, (3) группа сравнения – 10 мышей пролеченных ампицилином (однократно, внутривентрикулярно, 25 мг/г) на следующий день после листериозного инфицирования. В 90-дневном опыте испытуемая группа из 15 мышей получала бактериофаг в концентрации 10^5 БОЕ/мл 2 раза в неделю с питьевой водой, 15 животным из контрольной группы добавляли в воду фосфатный буфер. Семидневный эксперимент показал равный антилистериозный эффект у мышей 2 и 3 групп на 7 сутки по количеству клеток Lm370, обнаруженных в печени, селезенке и кишечнике после вскрытия животных. В тоже время мыши, получавшие ампицилин, статистически достоверно потеряли в весе из-за диареи, вызванной ятрогенным дисбиозом. У мышей из 2 группы (принимавших ListShield) нарушений нормального разнообразия кишечной микробиоты выявлено не было. В процессе 90-дневного эксперимента существенных различий в динамике весовых показателей, лейкоцитарной формуле крови, тканевым срезам внутренних органов и профилям денатурирующего градиентно-гелевого электрофореза микробиоты толстой кишки у мышей контрольной и испытуемой групп не выявлено, что позволило авторам сделать вывод о возможности длительного применения фагового коктейля у млекопитающих без каких-либо побочных эффектов. Таким образом, в модельном эксперименте на мышах была подтверждена гипотеза о том, что регулярный длительный пероральный прием бактериофагов (в точности воспроизводящий потребление пробиотического БАД как части ежедневного пищевого рациона человека) безопасен и может использоваться для специфического предотвращения распространения патогенных бактерий через слизистую желудочно-кишечного тракта у млекопитающих [15].

В настоящее время в мире насчитывается немногим более 10 компаний-производителей лекарственных препаратов, ветеринарных средств и пищевых добавок на основе бактериофагов (таб.). Рост антибиотикоустойчивых

Таблица. Производители и разработчики фагосодержащих средств

Наименование фирмы	Страна	Ключевая компетенция	Адрес сайта
Biochimpharm или Biopharm Pharmaceuticals	Грузия	Производство на базе института Г. Элиавы (моно и поливалентные фаги: стафило-, стрепто-, колифаг, интести-, пиофаг и др.)	www.biochimpharm.ge, biopharm@got.ge
AmpliPhi Biosciences (ранее Biocontrol и Targeted Genetics)	США и Великобритания	Клинические испытания синегнойного фага BioPhage-PA (лечение отитов) и BioPhage-RA (кистозный фиброз)	www.ampliphbio.com
Biophage Pharma Inc.	Канада	Клинические испытания на свиньях и птицах E. coli и S. typhimurium	www.biophagepharma.net
GangaGen Bio-technologies	США, Индия	Разработка препаратов на основа фагов против MRSA штаммов S. aureus и P. aeruginosa	www.gangagen.com
ФГУП «НПО Микроген»	Россия	Серийное производство на базе 3-х заводов (моно и поливалентных фагов: стафило-, стрепто-, синегнойного, протейного, колифага, интести-, пиокомбинированного, секстафага и др.)	www.microgen.ru
Intralytix	США	пробиотический БАД на основе шигеллезного бактериофага – ShigActive, поливалентный листериозный коктейль – ListShield для обработки готовых к употреблению продуктов, EcoShield – поливалентный эшерихиозный коктейль для обработки сырого мяса и фарша, SalmoFresh – коктейль литических сальмонеллезных бактериофагов для обработки сырого мяса и птицы	www.intralytix.com
Micreos	Нидерланды	Listex - поливалентный листериозный фаг P100 для обработки любых полуфабрикатов, Salmonex - сальмонеллезный бактериофаг для обработки сырого мяса и птицы	www.micreos.com
OmniLytics	США	биопестицид AgriPhage, содержащий коктейль вирулентных фагов лизирующих <i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> и <i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i> , поражающих плоды томата и перца (т.н. «черная» бактериальная пятнистость)	www.omnilytics.com
Novolytics	Великобритания	Разработка фагов против MRSA штаммов S. aureus для местного применения и обработки катетеров и других вводимых в организм медицинских устройств на основе геля	www.novolytics.co.uk
Phage Biotech	Израиль	Клинические испытания глазных и ушных капель на основе синегнойного фага	www.phage-biotech.com
Special Phage Services	Австралия	Клинические испытания MediPhage – стафилококкового бактериофага (MRSA) штаммы, а также разработка коктейлей фагов против полирезистентной P. aeruginosa (VRPA) и ванкомицин-резистентного энтерококка (VRE)	www.specialphageservices.com.au
Viridax	США	Разработка фагов против S. aureus и других видов стафилококка	www.viridax.com

штаммов стафилококка, синегнойной палочки, кампилобактерий, клостридий, ацинетобактер и многих других служит непрерывным стимулом для создания этими фирмами новых фаговых препаратов активных в отношении данных патогенных микроорганизмов. Накопилось достаточное количество экспериментальных и

практических данных, обосновывающих необходимость дальнейшего совершенствования способов и средств доставки бактериофагов в организм, рассматривая бактериофаги как пробиотические штаммы и используя пищевую цепочку, через создание БАД на основе бактериофаговых комбинаций.

Литература

1. Adams H.M. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, Interscience Publishers Ltd., London; 1959.
2. Stone R. Stalin's Forgotten Cure. *Science*. 2002; 298(25): 728-731.
3. Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С. и др. Разнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. *Микробиология*. 2007; 76(2): 271-278.
4. Breitbart M., Hewson I., Felts B. et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. of bacteriology*. 2003; 185(20): 6220-6223.
5. Breitbart M., Haynes M., Kelley S. et al. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Research in Microbiology*. 2008; 159: 367-373.
6. Cornax R., Morinigo M.A., Gonzalez-Jaen F. et al. Bacteriophages presence in human faeces of healthy subjects and patients with gastrointestinal disturbances. *Zentralbl Bakteriol*. 1994; 281(2): 214-224.
7. Finkbeiner S.R., Allred A.F., Tarr P.I. et al. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. *PLoS Pathogens*. 2008; 4, Iss. 2, e1000011.
8. Furuse K., Osawa S., Kawashiro J. et al. Bacteriophage Distribution in Human Faeces: Continuous Survey of Healthy Subjects and Patients with Internal and Leukaemic Diseases. *J. gen. Virol*. 1983; 64: 2039-2043.
9. Lepage P., Colombet J., Marteau P. et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut*. 2008; 57(3): 424-425.
10. Letarov A., Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J. of Applied Microbiology*. 2009; 107: 1-13.
11. Lusiak-Szelachowska M., Annabhani A., Weber-Dabrowska B. Escherichia coli bacteriophages in human stool of patients with gastrointestinal tract diseases. *Gastroenterologia Polska*. 2008; 15(2): 87-90.
12. Lusiak-Szelachowska M., Weber-Dabrowska B., Gorski A. The presence of bacteriophages in human faeces and their potential importance. *Pol. Merk. Lek*. 2006; XX(121): 381-383.
13. Bacteriophages. /Ed. Ipek Kurtboke. InTech; 2012.
14. Abedon T.S., Kuhl J.S., Blasdel G.B., Kutter M. E. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011; 1:2: 66-85.
15. Mai V., Ukhanova M., Visone L. et al. Bacteriophage administration reduces the concentration of Listeria monocytogenes in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice. *Intern. J. of Microbiology*. 2010; 2010: 1-6.
16. Sulakvelidze A. A new journal for the most ubiquitous organisms on Earth. *Bacteriophage*. 2011; 1: 1-2.
17. Погорельская С.А. Коли-протейный бактериофаг. Принципы его приготовления и применения для терапии и профилактики кишечных заболеваний детей ясельного возраста: Автореф. дисс... докт. мед. наук. -М., 1969. -42 с.
18. Merabishvili M., Pirnay J.P., Verbeken G. et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 2009; 4, e4944.
19. Бойцов А.Г., Порин А.А., Ластовка О.Н. и др. Бактериофаги. /Под. Ред. В.П. Иванова. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская медицинская академия; 2006.
20. Воробьев А.А., Пак С.Г., Савицкая К.И. и др. Дисбактериозы у детей. Учебн. Пособие. М., ММА им. И. М. Сеченова; 1998.
21. Крылов В.Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага. *Генетика*. 2001; 37(7): 869-887.
22. Fortuna W., Mi'dzybrodzki R., Weber-Dbrowska B., Gyrski A. Bacteriophage therapy in children: Facts and prospects. *Med Sci Monit*. 2008; 14(8): 126-132.
23. Borysowski J., Dbrowska K., Ohams M. et al. The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy Abstract book, conference: "Bacteriophages and Probiotics - Alternatives to Antibiotics" dedicated to the 120th birth anniversary of Professor George Eliava, July 1-4, 2012. Tbilisi, Georgia. 2012: 33.
24. Loc-Carrillo C., Abedon T. Stephen Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011; 1(2): 111-114.
25. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of Listeria monocytogenes surface contamination of raw fish. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal. 2012; 10(3):2615: 43.
26. US EPA. Biopesticides registration action document (Xanthomonas campestris pv. vesicatoria and Pseudomonas syringae pv. tomato specific Bacteriophages) (Chemical PC Codes 006449 and 006521). 2005: 25.
27. US FDA. Department of health and Human services Food and Drug Administration, 21 CFR Part 172 [Docket No. 2002F-0316 (formerly 02F-0316)], Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation. Agency: Food and Drug Administration, HHS. Action: Final rule. Federal Register Vol. 71, No. 160 (Friday, August 18, 2006) Rules and Regulations. 2006: 47729-47732.
28. Goodridge D.L., Bisha B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*. 2011; 1, Iss. 3: 130-137.
29. Klumpp J., Dorscht J., Lurz R. et al. The Terminally Redundant, Nonpermuted Genome of Listeria Bacteriophage A511: a Model for the SPO1-Like Myoviruses of Gram-Positive Bacteria. *J. of Bacteriology*. 2008; 190(17): 5753-5765.
30. Boratyński J., Syper D., Weber-Dabrowska B. et al. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cellular & molecular biology letters*. 2004; 9: 253-259.
31. Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B. et al. Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2005; 43: 301-312.

32. Letarov A., Golomidova A.K., Tarasyan K.K. Ecological basis of rational phage therapy. *Acta Naturae*. 2010; 2: 60-71.
33. Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А. Некоторые аспекты современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов. *Биопрепараты*. 2010; 2 (38): 28-33.
34. Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J. Infect.* 1998; 36: 5-15.
35. Brussow H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology*. 2005; 151: 2133-2140.
36. Акимкин В.Г., Дарбеева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применение: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010; 4: 48-54.
37. Анпилов Л.И., Прокудин А.А. Профилактическая эффективность сухого поливалентного дизентерийного бактериофага в организованных коллективах. *Военно-медицинский журнал*. 1984; 5: 39-40.
38. Брусина Е.Б. Принципы профилактики внутрибольничных гнойно-септических инфекций в хирургических стационарах. *Главная медицинская сестра*. 2002; 11: 113-115.
39. Greer G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. of Food Protection*. 2005; 68(5): 1102-1111.
40. Peek R., Reddy K.R. FDA Approves Use of Bacteriophages to be Added to Meat and Poultry Products. *Gastroenterology*. 2006; 131: 1370-1372.
41. Walker K. Use of bacteriophages as novel food additives. FS06 ANR 490/811 Food Regulation in the United States, Michigan State University, October 29, 2006: 9.
42. Goodridge D.L., Abedon T.S. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry. *SIM News*. 2003; 53(6): 254-262.
43. Бондаренко В.М. Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике. Приложение к Журналу инфектология. 2011; 3(3): 15-19.
44. Желудева И.В., Жиленков Е.Л., Максимовская Л.Н. и др. Обоснование выбора бактериофагов для лечения воспалительных заболеваний пародонта. *Пародонтология*. 2002; 1-2: 46-50.
45. Отраслевой стандарт. Система стандартизации в здравоохранении российской федерации. Дисбактериоз кишечника. Протокол ведения больных. Утверждено приказом Минздрава России от «9» июня 2003 г. № 231.
46. <http://www.omnilytics.com>. Сайт компании OmniLytics.
47. Leverentz B., Conway W.S., Camp M.J. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin Applied and Environmental. *Microbiology*. 2003; 69(8): 4519-4526.
48. Leverentz B., Conway W.S., Janisiewicz W. et al. Optimizing Concentration and Timing of a Phage Spray Application To Reduce *Listeria monocytogenes* on Honeydew Melon Tissue. *J. of Food Protection*. 2004; 67(8): 1682-1686.
49. <http://www.micreos.com>. Сайт компании Micreos.
50. Guenther S., Huwyler D., Richard S., Loessner J.M. Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied And Environmental Microbiology*. 2009; 75(1): 93-100.
51. Abuladze T., Li M., Menetrez Y.M. et al. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(20): 6230-6238.
52. <http://www.intralytix.com>. Сайт компании Intralytix.
53. Hooton S.P., Atterbury R.J., Connerton I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; 151(2): 157-163.
54. Intralytix W.U.S. Army Contract to Develop Phage-Based Probiotic Against Shigella Infection. *GEN News Highlights*. Oct. 9, 2009, <http://www.genengnews.com>.
55. Акимкин В.Г., Покровский В.И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. М., Из-во РАМН; 2002 г.
56. Бабалова Г.Г., Кацитадзе К.Т., Сакварелидзе Л.А. и др. О профилактическом значении дизентерийного сухого бактериофага. *Журн. микробиол.* 1968; 2: 143-145.
57. Андреева Е.И. Эпидемиологические особенности и профилактика нозокомиального сальмонеллеза в детских инфекционных стационарах: Автореф. дисс. канд. мед. наук.- М., 2005. - 28 с.

Сведения об авторах:

Алешкин Андрей Владимирович, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, доктор биологических наук, МВА, руководитель лаборатории, тел.: +7(495)452-18-16, e-mail: ava@gabri.ru.

Караулов Александр Викторович, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, кафедра клинической аллергологии и иммунологии, член-корреспондент РАМН, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой, тел. 8-903-515-71-36, E-mail: drkaraulov@mail.ru;

Светоч Эдуард Арсеньевич, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, отдел молекулярной микробиологии, профессор, доктор ветеринарных наук, заведующий отделом, тел.: +7(4967)36-00-79, e-mail: svetoch@obolensk.org;

Воложанцев Николай Валентинович, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, тел.: +7(4967)36-00-79, e-mail: nikvoj@obolensk.org;

Афанасьев Станислав Степанович, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора, тел. 8-903-667-20-68, E-mail: afanasievss409.4@bk.ru;

Алешкин Владимир Андреевич, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор, тел. 8-985-998-01-22, E-mail: info@gabrich.com;

Рубальский Олег Васильевич, Астраханская государственная медицинская академия, кафедра микробиологии, профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой, тел. 8-903-348-13-37, e-mail: rubalsky6@mail.ru;

Васильев Дмитрий Аркадьевич, Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой, тел.: +7(84231)5-12-68, e-mail: dav_ul@mail.ru.

Золотухин Сергей Николаевич, Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, ветеринарный факультет экспертизы, доктор биологических наук, декан, тел.: +7(84231)5-12-68, e-mail: fvm.zol@yandex.ru.

Афанасьев Максим Станиславович, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, кафедра клинической аллергологии и иммунологии, доктор медицинских наук, доцент, тел. 8-916-685-52-38, E-mail: mafa78@inbox.ru;

Лактин Владимир Михайлович, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, тел.: +7(495)452-18-16, e-mail: LakhtinV@yandex.ru.

Рубальский Максим Олегович, Астраханская государственная медицинская академия, ООО НПП «ВИТАФАГ», директор, тел. 8-988-061-88-61, e-mail: doomblade@bk.ru.

Поступила 15.09.2013 г.