

С.С.Бочкарева¹, А.В.Алешкин¹, О.Н.Ершова², Л.И.Новикова¹, С.С.Афанасьев¹,
И.А.Киселева¹, Э.Р.Зулкарнеев¹, Е.О.Рубальский¹, О.Ю.Борисова¹, А.В.Караулов³

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФАГОТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, В ОТДЕЛЕНИИ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского; ²НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко, Москва; ³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Оценить влияние антифагового гуморального иммунного ответа на эффективность фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). *Материалы и методы.* 42 пациента, находящиеся на продленной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) в отделении нейрореанимации, один раз в 2014 г., 4 раза в 2015 г. и один раз в 2016 г. получали коктейль бактериофагов per os по 20 мл, в том числе 6 пациентов — повторно от 3 до 5 раз. Эффективность фаготерапии оценивали по высеву штаммов-возбудителей ИСМП из проб эндотрахеального аспирата, крови, мочи и кала пациентов до и после окончания курса. *Результаты.* Исходно из 87,5% проб пациентов были выделены грамотрицательные патогены (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). В первых эпизодах фаготерапии эффективная санация была подтверждена в 54 — 62,5% случаев. Фармакокинетические исследования указывали на системный механизм действия энтеральных форм бактериофагов. Повторные курсы фаготерапии не привели к существенной эрадикации патогенов. Антифаговый иммунитет после однократного применения коктейля бактериофагов конкретного штаммового состава детектировали с помощью ИФА по наличию титра специфических IgG в диапазоне от 1/16 до 1/4096 (у пациентов, не принимавших коктейль бактериофагов, антитела отсутствовали). *Заключение.* Снижение санирующего эффекта бактериофага может возникать при проведении повторного курса у одного и того же пациента из-за образования антифаговых антител. Для сохранения результативности фаготерапии необходимо изменение штаммового состава коктейля бактериофагов.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 42—48

Ключевые слова: бактериофаги, ИСМП, антибиотикорезистентность, гуморальный иммунный ответ, антифаговые антитела

S.S.Bochkareva¹, A.V.Aleshkin¹, O.N.Ershova², L.I.Novikova¹, S.S.Afanasiev¹,
I.A.Kiseleva¹, E.R.Zulkarnееv¹, E.O.Rubalsky¹, O.Yu.Borisova¹, A.V.Karaulov³

IMMUNOLOGIC ASPECTS OF PHAGE THERAPY OF INFECTIONS RELATED TO MEDICAL CARE IN NEUROREANIMATION

¹Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology; ²Burdenko Research Institute of Neurosurgery, Moscow; ³Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Evaluate the effect of anti-phage humoral immune response on effectiveness of phage therapy of infections related to medical care (IRMC). *Materials and methods.* 42 patients on extended mechanical ventilation (MV) in neuroreanimation, 1 time in 2014, 4 times in 2015 and 1 time in 2016 had received bacteriophage cocktail per os — 20 ml including 6 patients — additionally 3-5 times. Effectiveness of phage therapy was evaluated by seeding of IRMC strains from samples of endotracheal aspirate, blood, urine and feces of patients before and after treatment. *Results.* 87.5% of samples from the patients initially had gram-negative pathogens (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Effective sanitation for the first episodes of phage therapy was confirmed in 54 — 62.5% of cases. Pharmacokinetic studies have indicated a systemic mechanism of action for enteral forms of bacteriophages. Repeated courses of phage therapy did not result in significant eradication of pathogens. Antiphage immunity after a single

administration of the cocktail of bacteriophages with a certain strain composition was detected using ELISA by the presence of specific IgG titers in a range from 1/16 to 1/4096 (in patients not receiving the cocktail antibodies were not detected). *Conclusion.* Reduction of sanitation effect of bacteriophage could be due to formation of anti-phage antibodies after a repeated course in the same patient. Changes of strain composition of phage cocktail of bacteriophages is necessary to preserve results of phage therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 42—48

Key words: bacteriophage, IRMC, antibiotics resistance, humoral immune response, anti-phage antibodies

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что современная фаготерапия базируется на вековом опыте использования бактериофагов в клинической практике, до сих пор не существует единого алгоритма проведения такой терапии при тяжелых, длительно протекающих нозокомиальных инфекциях. Результаты лечения с помощью фаговых препаратов, полученные на этой категории пациентов, противоречивы, а клиническая картина не всегда соответствует микробиологическим данным. Оценивая эффективность клинического применения ведущей на сегодняшний день энтеральной лекарственной формы фагов с точки зрения доказательной медицины, необходимо учитывать различные аспекты взаимодействия бактериофага с макроорганизмом (организмом больного) и штаммом-возбудителем ИСМП, в том числе фармакокинетику, биодоступность и возможный ответ иммунной системы человека на бактериофаги, что, в конечном итоге, определяет безопасность и результативность антибактериальной фаготерапии. Цель нашей работы заключалась в оценке влияния антифагового гуморального иммунного ответа на эффективность фаготерапии и фагопрофилактики ИСМП у пациентов отделения нейрореанимации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились совместно с коллегами из отделения нейрореанимации и интенсивной терапии НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко. Были обследованы пациенты, находящиеся в постоперационном периоде, отягощенном инфекцией ИСМП и вызванной возбудителями множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). 42 пациента, находящиеся на продленной искусственной вентиляции легких в отделении нейрореанимации, получали лечебно-профилактический продукт (ЛПП) на основе коктейля бактериофагов per os по 20 мл в 2014 г. (1 эпизод), 2015 г. (4 эпизода) и 2016 г. (один эпизод), в том числе 6 пациентов — повторно от 3 до 5 раз. В состав ЛПП были включены по два штамма фага на каждый из видов бактерий: *A.baumannii* (фаги — AP22, AM24), *K.pneumoniae* (фаги — KPV15, KPV811), *P.aeruginosa* (фаги — PA5, PA10) и *Staphylococcus aureus* (фаги — SCH1, SCH111), обладающих суммарным спектром литической активности (73%) в отношении антибиотикорезистентных штаммов, выделенных от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Подбор бактериофагов осуществляли в сотрудничестве с коллегами из Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии. Нарработку стерильных фильтратов фаголизатов с высоким титром фаговых частиц, очищенных от токсинов, проводили по собственной оригинальной технологии. Титр каждого фага в ЛПП составлял 10^8 БОЕ/мл. Размер ДНК фагов, включенных в

ЛПП, колебался от 18 до 167 тпн. Уникальность, вирулентная природа и отсутствие нежелательных генов в ДНК фагов были подтверждены биоинформационным анализом [6].

Доклинические испытания, проводившиеся в соответствии с [4] и включавшие оценку острой и хронической токсичности, фармакокинетические исследования и определение эффективности коктейля бактериофагов на модели экспериментальной острой летальной клебсиеллезной инфекции, вызванной у беспородных мышей, продемонстрировали безопасность и высокую профилактическую и терапевтическую эффективность лечебно-профилактического продукта [1].

В процессе клинического исследования проводили бактериальный посев проб эндотрахеального аспирата (ЭТА), крови, мочи и кала пациентов с целью идентификации и оценки исходного титра штамма-возбудителя ИСМП до курса фаготерапии и оценки результативности ЛПП через сутки после окончания приема коктейля бактериофагов. Фармакокинетические исследования включали определение бактериофагов, входящих в разработанный коктейль, в крови пациентов и привлекаемых для этих исследований здоровых добровольцев через сутки после окончания приема фагосодержащего продукта с использованием метода ПЦР со специфическими праймерами [2], а также в кале, моче и ЭТА — с помощью спот-теста на штамме-хозяине и метода Грация [5].

Антифаговый иммунитет после применения коктейля бактериофагов конкретного штаммового состава детектировали методом ИФА с помощью сконструированной тест-системы по наличию титра специфических IgG в сыворотке крови обследованной группы больных из отделения нейро-реанимации, а также у лиц, работа которых связана с производством бактериофагов, условно здоровых детей до 3 лет и в отечественных препаратах, полученных из крови человека — внутривенном иммуноглобулине «Габриглобин» (ООО «Иммуно-Гем») и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате» (ООО «Иммуно-Гем»), предназначенном для перорального применения. Иммуноферментная тест-система для обнаружения антифаговых IgG была построена следующим образом: антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, а связавшиеся с антигеном IgG выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma) по ферментной реакции с добавленным затем субстратом. Положительным контролем служила кроличья антисыворотка к бактериофагу, заведомо содержащая соответствующие антитела, а отрицательным контролем — физиологический раствор.

Кроличьи моноспецифические антисыворотки были получены с учетом иммуногенности конкретных бактериофагов. Основной цикл иммунизаций

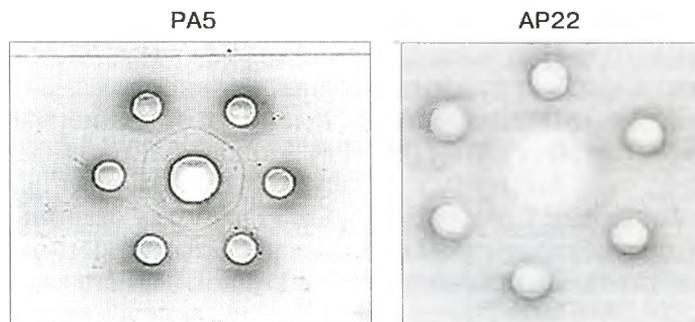


Рис. 1. Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки — фаг РА5 или фаг АР22 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки — соответствующая кроличья моноспецифическая антисыворотка).

состоял из четырех внутримышечных инъекций животных-продуцентов фаголизатам с титром 10^{10} БОЕ/мл с интервалом в 10 дней. На одну иммунизацию одного животного использовали соответственно 0,5; 0,25; 0,125 и 0,5 мл раствора антигена, смешанного с полным (первая и последняя иммунизации) или неполным (остальные иммунизации) адъювантом Фрейнда. При необходимости проводили дополнительную иммунизацию в той же дозе, как и четвертую иммунизацию основного цикла. Иммунохимическая характеристика полученных антисывороток была выполнена с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони [9] (рис. 1) и в реакции нейтрализации фагов [3] (рис. 2). Необходимо отметить, что перекрестной реактивности антисыворотки, полученной к фагу PA5, в отношении ацинетобактерного фага AP22 не выявлено ни одним из использованных методов. Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG как человека, так и разных видов животных, в частности, кроликов. Ввиду различий физико-химических и биологических свойств бактериофагов между собой необходимо было отработать условия сорбции конкретных бактериофагов как антигенов в лунках планшета. Также были подобраны условия проведения иммуноферментной реакции (температура и длительность инкубации, необходимость встряхивания содержимого планшета во время инкубации, концентрации компонентов реакции), причем особое внимание было уделено подбору концентрации конъюгата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исходных бактериологических посевах проб эндотрахеального аспирата, крови, мочи и кала, полученных от исследованного контингента пациентов отделения нейрореанимации, выделяли грамтрицательные патогены (*A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*) в доле до 87,5%. Назначение 3-дневного курса лечебно-профилактического продукта обследованным пациентам в 2014 г. и первом эпизоде 2015 г. привело к эффективной санации инфицированных локусов в 54 — 62,5% случаев, что подтверждалось результатами исследований аналогичного клинического материала, полученного у больных через сутки после окончания курса фаготерапии.

Фармакокинетические исследования ЛПП указывали на системный механизм действия фагов, проникавших у лиц, которые принимали коктейль бактериофагов (как у пациентов, так и у здоровых добровольцев) через ЖКТ в кровь, кал, мочу и ЭТА [7].

Повторные курсы ЛПП, назначение которых было вызвано как профилактической необходимостью снижения риска возникновения ИСМП, так и

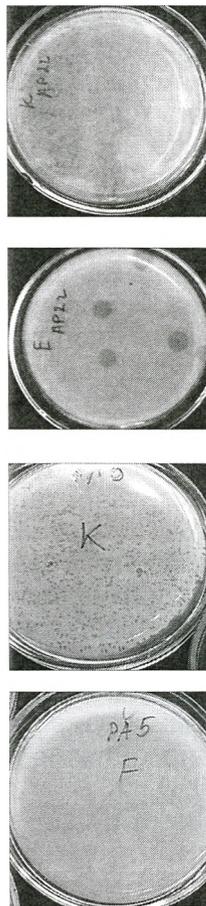


Рис. 2. Сравнение результатов реакции нейтрализации иммунизированных (ИМ) и интактных (контроль — К) животных, исходный титр фаголизатов PA5 и AP22 — 10^6 БОЕ/мл.

Сверху вниз: AP22, К, 10^2 ; AP22, ИМ, 5; PA5, К, 10^3 ; PA5, ИМ, 0.

регистрацией новых эпизодов эпидемиологического неблагополучия в отделении нейрореанимации, не привели к существенной эрадикации патогенов, относящихся к тем же видам, хотя *in vitro* была продемонстрирована чувствительность выделенных штаммов-возбудителей к бактериофагам, входящим в коктейль, что навело нас на предположение о формировании адаптивного антифагового иммунного ответа у пациентов, получавших лечебно-профилактический продукт исходного фагового состава повторно.

Поскольку не существует коммерчески доступных диагностических наборов, предназначенных для определения антифаговых антител, первый этап наших исследований был посвящен конструированию соответствующих тест-систем, позволяющих оценить уровень IgG к фагам иммуноферментным методом в сыворотке крови или любой биологической жидкости пациента. Тест-системы, сконструированные по принципу, описанному в разделе «Материалы и методы», были апробированы при анализе IgG к соответствующим бактериофагам в образцах сывороток крови, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов (табл. 1). При внесении в лунки с сорбированным бактериофагом кроличьих антифаговых сывороток развивалась интенсивная цветная реакция. Например, было показано, что разведение до 1:32 000 кроличьей антисыворотки, полученной путем иммунизации бактериофагом PA5, лизирующим *R.aeruginosa*, и до 1:8000 антисыворотки, полученной путем иммунизации бактериофагом AP22, лизирующим *A.baumannii*, давало оптическую плотность около 0,35. В то же время, сыворотка интактного (неиммунизированного) кролика не вызывала появления окрашивания содержимого лунки (оптическая плотность на уровне отрицательного контроля — 0,1).

Далее на наличие антифаговых антител к PA5 и AP22 были проанализированы сыворотки крови, полученные от разных контингентов испытуемых, как взрослых, так и детей. Выявлено, что в сыворотках крови лиц, работа которых связана с бактериофагами, обнаруживаются антитела к ним в титре 1:64 — 1:128, что можно было ожидать, исходя из данных литературы, свидетельствующих об обнаружении антител к бактериофагам даже у значительной части интактных людей [10]. В то же время, в сыворотках крови детей до 3 лет IgG к данным бактериофагам либо не были обнаружены, либо были обнаружены в невысоких титрах — 1:10. IgG к бактериофагам были обнаружены также в препаратах, полученных из крови человека — «Габригло-

Таблица 1. Определение IgG к бактериофагам PA5 и AP22 методом ИФА в сыворотках крови, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов

Разведения сыворотки	Оптическая плотность, Ед.			
	PA5		AP22	
	Иммунизированный кролик	Интактные кролики	Иммунизированный кролик	Интактные кролики
Без разведения	> максимально возможного значения	0,1	> максимально возможного значения	0,1
1:1000	3,40	—	1,10	—
1:2000	3,39	—	0,81	—
1:4000	2,36	—	0,49	—
1:8000	1,33	—	0,35	—
1:16000	0,30	—	0,18	—
1:32000	0,35	—	0,15	—

бин» и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате». Титр антител в них не превышал 1:64. Наличие антител такой специфичности в препаратах, полученных из донорской крови, свидетельствует об определенной напряженности антифагового иммунитета в популяции, что согласуется с данными [8].

Анализ антифагового гуморального иммунитета у обследованной категории пациентов отделения

нейрореанимации представлен в табл. 2. Было обнаружено, что пероральная фаготерапия уже на 2 — 3 неделе после приема препарата обязательно приводит к появлению антифаговых IgG, сохраняющихся в титрах 1:16 — 1:4096, по крайней мере, до года. Повторный курс приема фагов сопровождается более быстрым подъемом уровня соответствующих антител. Анализируя связь эффективности фаготерапии и интенсивности антифагового иммунного ответа, можно отметить, что

Таблица 2. Определение антифаговых IgG у пациентов отделения нейрореанимации до (14.04.2016) и после (10.05.2016) последнего курса фаготерапии

№ пациента	Первичный или повторный курс фаготерапии (дата первого курса)	Титр IgG к бактериофагу PA5
1	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/16 титр после приема (10.05.2016) 1/256
2	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/1024 титр после приема (10.05.2016) 1/1024
3	Повторная фаготерапия (07.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/16 титр после приема (10.05.2016) 1/256
4	Повторная фаготерапия (12.2015)	титр после приема (10.05.2016) 1/1024
5	Повторная фаготерапия (11.2015)	титр до приема (14.04.2016) 1/4096 титр после приема (10.05.2016) 1/4096
6	Первичная фаготерапия (7—9.05.2016)	АТ отсутствуют (10.05.2016)
7	Повторная фаготерапия (11.2015)	титр после приема (10.05.2016) 1/1024

первичная фаготерапия характеризовалась выраженным клиническим эффектом у обследуемого контингента больных, выразившимся, в том числе, и в санации исходно инфицированных возбудителями ИСМП локусов. Однако повторный курс терапии тем же штаммом фага уже не давал удовлетворительного эффекта. Отметим, что в этот период в крови больных обязательно находились соответствующие антитела.

Таким образом, полученные нами результаты подтвердили необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для корректировки штаммового состава препаратов при проведении повторных курсов фаготерапии. Кроме того, очевидно, что применение препаратов бактериофагов у больных с ИСМП, находящихся на продленной ИВЛ, представляет отдельную проблему. Полученные в рамках проведенных исследований результаты подтвердили наши предположения, что при разработке энтеральных лекарственных форм бактериофагов для борьбы с ИСМП нельзя придерживаться классического пайп-лайна разработки лечебно-профилактических продуктов — стратегии фиксированного штаммового состава бактериофагового коктейля. Во-первых, влияние антибиотиков и дезинфектантов на патогенные микроорганизмы, особенно в замкнутой экологической нише больничных учреждений, ускоряет эволюционный процесс в направлении формирования штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Изменение штамма-возбудителя в ряде случаев влечет за собой внесение изменений и в штаммовый состав фагового коктейля для поддержания необходимого уровня спектра его литической активности. А во-вторых, снижение клинической эффективности используемого фагового коктейля может возникать при проведении повторного курса у одного и того же пациента при образовании специфических антифаговых антител к используемым в данном препарате штаммам бактериофагов. Выходом из создавшегося положения может быть закрепление видового состава коктейля бактериофагов в комбинации с услугой по подбору (или смене на новые в случае повторного применения у одного и того же пациента) фаговых штаммов, активных в отношении актуальных, персистирующих в данном ЛПУ в настоящий момент бактериальных патогенов из имеющейся фено- и генотипически охарактеризованной коллекции бактриофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин А.В., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В. и др. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. *Бактериология*. 2016, 1 (1): 22-31.
2. Борисова О.Ю., Рубальский Е.О., Алешкин А.В. и др. Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. *В: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности*. 2016, с. 60-61.
3. Иммунологические методы. Под ред. Г.Фримеля. М., Медицина, 1987.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2. Под ред. А.Н.Миронова. М., Гриф и К, 2013.
5. Adams MH. Methods of study of bacterial viruses. *In: Bacteriophages*. New York, Interscience, 1959b: p. 443-522.
6. Aleshkin A., Ershova O., Volozhantsev N. et al. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. *In: Bacteriophages: An overview and synthesis of a re-emerging field*. Ed. Harrington D. New York, Nova Science Publishers Inc., 2016, ISBN: 978-1-63485-455-9, p. 105-122.
7. Aleshkin A.V., Ershova O.N., Volozhantsev N.V. et al. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. *Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. Bacteriophage*. 2016, 6: e1251379.
8. Dąbrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicz A. et al. Immunogenicity studies of proteins forming the t4 phage head surface. *J. Virol*. 2014, 88 (21): 12551-12557.
9. Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B. et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral. Immunol*. 2014, 27 (6): 295-304. doi: 10.1089/vim.2013.0128.
10. Żaczek M., Łusiak-Szelachowska M., Jonczyk-Matysiak E. et al. Antibody production in response to staphylococcal ms-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy. *Front. Microbiol*. 2016, 7: 1681.

Поступила 15.01.17

Контактная информация: Бочкарева Светлана Сергеевна, к.б.н., 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (495)452-18-16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

С.А.Гуляев¹, И.А.Потемкин^{2,3}, В.С.Кичатова^{2,3}, А.А.Карлсен^{2,3}, О.В.Исаева^{2,3}, Т.В.Гуляева¹, М.А.Ваннус¹, И.В.Гордейчук¹, К.К.Кюрегян^{2,3}, М.И.Михайлов^{2,3}

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е НА КАРЛИКОВЫХ ДОМАШНИХ СВИНЬЯХ

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, ²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Экспериментальное воспроизведение ВГЕ-инфекции на домашних карликовых свиньях (минипигах) и сравнительный анализ вирусологических и иммунологических характеристик экспериментальной инфекции. *Материалы и методы.* Минипиги породы Визенау (2 самки и 4 самца возрастом 50 — 60 дней и весом 5 — 10 кг) были инфицированы штаммом ВГЕ генотипа 3, выделенным из фекалий свиней в Белгородской обл. в 2013 г. Вирус вводили в виде 10% осветленного фекального экстракта (800 мкл). В течение 49 дней эксперимента у животных брали кровь (еженедельно) и фекалии ежедневно. Анти-ВГЕ IgG определяли в образцах сыворотки крови с помощью тест-системы ДС-ИФА-ANTI-HEV-G (Диагностические системы), РНК ВГЕ в образцах фекальных экстрактов и в сыворотке крови — в ОТ-ПЦР. *Результаты.* Минипиги породы Визенау оказались вос-