

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-193-195

УДК 616.932:579.61

А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова,
М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Ю.В. Сизова, Н.И. Пасюкова

Оценка эффективности использования холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Возможность завоза холеры на территорию нашей страны и увеличение числа штаммов холерных вибрионов, обладающих устойчивостью к антибактериальным средствам, обуславливают необходимость разработки альтернативных лечебно-профилактических биопрепаратов на основе бактериофагов. **Цель работы** – изучение эффективности применения холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры. **Материалы и методы.** В работе использовали холерные бактериофаги Rostov-M3, Rostov-13, активные в отношении холерных вибрионов серогруппы O1, и ФБ1, обладающий литической активностью в отношении серогруппы O139. Оценка эффективности профилактики холеры проводили на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика. **Результаты и обсуждение.** Применение Rostov-M3 и Rostov-13 в течение пяти и, особенно, семи дней перед заражением вирулентными штаммами *Vibrio cholerae* серогруппы O1 предотвращает развитие инфекции в тонком кишечнике экспериментальных животных. Бактериофаг ФБ1 в отношении *V. cholerae* O139 такой способностью не обладал. Данные исследования свидетельствуют об эффективности использования фагов Rostov-M3 и Rostov-13 для профилактики экспериментальной холеры, вызванной холерными вибрионами серогруппы O1.

Ключевые слова: бактериофаги, профилактика холеры, эффективность.

Корреспондирующий автор: Тюрина Анна Владимировна, e-mail: turina_av@antiplague.ru.

Для цитирования: Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Сизова Ю.В., Пасюкова Н.И. Оценка эффективности использования холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 2:193–195. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-193-195

Поступила 09.01.2024. Отправлена на доработку 17.01.2024. Принята к публ. 26.01.2024.

A.V. Tyurina, N.E. Gaevskaya, I.A. Ivanova, A.V. Filippenko, N.D. Omel'chenko, A.A. Trufanova,
M.P. Pogozhova, A.O. Anoprienko, Yu.V. Sizova, N.I. Pasyukova

Assessment of the Effectiveness of Cholera Bacteriophages for Prevention of Experimental Cholera

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The possibility of cholera importation into our country and the increase in the number of *Vibrio cholerae* strains that are resistant to antibacterial agents necessitate the development of alternative therapeutic and prophylactic biological products based on bacteriophages. **The aim** of the work was to study the effectiveness of application of cholera bacteriophages for the prevention of experimental cholera. **Materials and methods.** The work involved cholera bacteriophages Rostov-M3, Rostov-13, active against cholera vibrios of the O1 serogroup; and FB1, which has lytic activity against the O139 serogroup. The effectiveness of cholera prevention was assessed using a model of an isolated loop of the small intestine in an adult rabbit. **Results and discussion.** The use of Rostov-M3 and Rostov-13 for five and especially seven days before infection with virulent strains of *V. cholerae* O1 serogroup prevents the development of infection in the small intestine of experimental animals. Bacteriophage FB1 did not have that ability against *V. cholerae* O139. These studies indicate the effectiveness of using phages Rostov-M3 and Rostov-13 for the prevention of experimental cholera caused by *V. cholerae* O1 serogroup.

Key words: bacteriophages, cholera prevention, effectiveness.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All stages of the research complied with the legislation of the Russian Federation, international ethical standards and regulatory documents of the institution, and were also approved by the Bioethics Commission of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor (minutes of the meeting of the Bioethics Commission dated May 13, 2022 No. 6).

Corresponding author: Anna V. Tyurina, e-mail: turina_av@antiplague.ru.

Citation: Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Sizova Yu.V., Pasyukova N.I. Assessment of the Effectiveness of Cholera Bacteriophages for Prevention of Experimental Cholera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 2:193–195. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-193-195

Received 09.01.2024. Revised 17.01.2024. Accepted 26.01.2024.

Tyurina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>
Ivanova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>
Filippenko A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>
Omel'chenko N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>

Trufanova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>
Pogozhova M.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>
Anoprienko A.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8466-9315>
Pasyukova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>

Холера представляет серьезную проблему для современного здравоохранения в результате сезонного роста заболеваемости на эндемичных территориях с возможным формированием вторичных очагов [1]. Длительное действие факторов, стимулирующих эпидемический процесс, завозы инфекции в результате миграции населения и бесконтрольное использование антибактериальных препаратов приводят к увеличению количества штаммов антибиотикорезистентных микроорганизмов [2].

Лечение холеры может быть патогенетическим и этиотропным. Однако применение антибактериальных средств может быть ограничено ростом лекарственной устойчивости возбудителя, наличием противопоказаний к применению и частотой побочных реакций со стороны макроорганизма [3].

В связи с этим разработка новых высокоэффективных препаратов антимикробного действия приобретает особую актуальность. Интерес исследователей вызывают бактериофаги, обладающие рядом достоинств: безопасны для клеток высших организмов, нетоксичны, высокоспецифичны [4]. Однако у бактерий существует множество механизмов защиты, блокирующих каждый из этапов инфицирования клеток бактериофагами [5]. Поэтому при конструировании препаратов на их основе необходимо оценить их эффективность и целесообразность дальнейшего использования.

Целью работы стало изучение эффективности холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры на модели взрослых кроликов.

Материалы и методы

В работе использовали полученные из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора вирулентные холерные бактериофаги: Rostov-M3, Rostov-13, активные в отношении холерных вибрионов O1-серогруппы, и ФБ1, обладающий литической активностью в отношении O139-серогруппы [6]. Свойства бактериофагов изучали согласно общепринятым методам [7].

Полученные фаги стерилизовали фильтрацией с помощью насадки Filtropur S 0,22 мкм. Далее производили очистку фаголизатов на хроматографической колонке Endo Trap HD (Германия) согласно инструкции производителя. Очищенные фаги соединяли в равных соотношениях (1:1:1). На основе данной композиции впоследствии планируется создание экспериментального фагового препарата для профилактики холеры.

Оценку эффективности фагопрофилактики проводили на взрослых кроликах массой 1,5 кг. Опытные и контрольные группы животных содержались в стандартных условиях вивария. Для статистической обработки все эксперименты проводили в трех повторях.

Кроликам (4 группы по 2 кролика) внутрижелудочно через зонд вводили по 3 мл бактериофагов (отдельно фаги Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1, а также их смесь в соотношении 1:1:1) в концентрации $n \cdot 10^8$ –

$n \cdot 10^9$ БОЕ/мл в течение 3, 5 и 7 дней. Контрольная группа животных получала перорально 0,9 % забуференный раствор натрия хлорида (ЗФР) в объемах, аналогичных получаемым в опытных группах.

Эффективность фагопрофилактики оценивали на модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика [8].

Для заражения животных использованы токсигенные штаммы: *Vibrio cholerae* O1 classical 145 (Индия, 1958 г.), *V. cholerae* O1 El Tor 18899 (больной, 2006 г.), *V. cholerae* O139 16066 (Индия, 1993 г.), – полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Свойства холерных штаммов изучали общепринятыми методами (МУК 4.2.3746-22).

Об энтеропатогенном эффекте судили по наличию/выраженности в опытной петле тонкого кишечника отека слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияния и некроза покровного эпителия ворсин. О холерогенном эффекте судили по присутствию жидкости в опытной петле [8].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. Определяли значения доверительных интервалов (L) среднеарифметического (M) для уровня достоверности (P) 95 %. Достоверности различий определяли по t-критерию Стьюдента. Уровень $p < 0,05$ оценивался как значимый.

Результаты и обсуждение

Исследование активности испытуемых препаратов бактериофагов показало, что их прием в течение трех дней недостаточен для предотвращения развития холеры в тонком кишечнике взрослых кроликов. При этом, оценивая влияние пятидневного введения фагов на развитие экспериментальной холеры, нами выявлены различия в патологоанатомической картине в перевязанных петлях тонкого кишечника у кроликов, получавших разные бактериофаги. Энтеропатогенный эффект, регистрируемый по патологоанатомической картине в перевязанной петле тонкого кишечника: наличию отека слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияний и некрозов [8], – наблюдали у животных, которым вводили фаг ФБ1 в течение пяти дней и затем заражали штаммом *V. cholerae* O139 16066. Опытные перевязанные петли тонкого кишечника этих животных были растянуты и заполнены полупрозрачным содержимым, что свидетельствовало о ярко выраженном холерогенном эффекте [8]. Такая же патогенетическая картина наблюдалась и после семидневного приема фага ФБ1. По-видимому, это обусловлено низкой (50 %) литической активностью данного фага в отношении холерных вибрионов серогруппы O139 [8], недостаточной для предотвращения развития холеры.

У кроликов, получавших фаги Rostov-M3 и Rostov-13 в течение пяти дней, зараженных в дальнейшем *V. cholerae* O1 classical 145 и *V. cholerae* O1

El Tor 18899 соответственно, в изолированных петлях тонкого кишечника отсутствовал холерогенный и регистрировался незначительный энтеропатогенный эффект. Введение этих фагов в течение семи дней препятствовало развитию холеры у всех взятых в эксперимент животных опытных групп: холерогенный и энтеропатогенный эффекты полностью отсутствовали.

У кроликов, получавших смесь бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 в течение трех, пяти и семи дней и впоследствии зараженных смесью (1:1:1) штаммов *V. cholerae* O1 classical 145, *V. cholerae* O1 El Tor 18899 и *V. cholerae* O139 16066, обнаружено наличие выраженного холерогенного и энтеропатогенного эффекта. Отсутствие профилактического эффекта связано с использованием в смеси фага ФБ1 и его недостаточной литической активностью в отношении штамма *V. cholerae* O139, что и обусловило проявление инфекционного процесса в эксперименте.

Учитывая полученные результаты, сделан вывод, что применение бактериофага ФБ1 для профилактики холеры, вызываемой вибрионами O139-серогруппы, неэффективно, поэтому включение данного фага в состав экспериментального препарата нецелесообразно. Введение фагов Rostov-M3 и Rostov-13 в течение пяти и, особенно, семи дней перед заражением животных вирулентными штаммами *V. cholerae* O1 классического биовара и биовара El Tor предотвращает развитие инфекции в тонком кишечнике экспериментальных животных, что свидетельствует о перспективности этих фагов в качестве компонентов экспериментального профилактического противохолерного препарата.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все этапы исследований соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол заседания Комиссии по биоэтике от 13.05.2022 № 6).

Список литературы

1. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Миронова Л.В., Монахова Е.В., Соболева Е.Г., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Меньшикова Е.А., Подойницына О.А., Ежова М.И., Евтеев А.В. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 1:56–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66.
2. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 38 Suppl. 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
3. Аленикина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитоксического холерного энтеросорбента. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2:66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-66-69.

4. Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. Phage therapy in the post-antibiotic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019; 32(2):e00066–18. DOI: 10.1128/cmr.00066-18.
5. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Швиденко И.Г., Савельев В.Н. Выявление фагоиндуцируемых мобильных генетических элементов в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 2:112–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.
6. Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О. Изучение биологических и генетических свойств холерных бактериофагов, входящих в состав экспериментального профилактического препарата. В кн.: Попова А.Ю., редактор. Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Екатеринбург; 2021. С. 317–8.
7. Адамс М. Бактериофаги. М.: Изд-во иностранной литературы; 1961. 527 с.
8. Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О. Эффективность использования экспериментального фагового коктейля для профилактики холеры в опытах *in vivo*. В кн.: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. М.; 2022. С. 290–3.

References

1. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Mironova L.V., Monakhova E.V., Soboлева E.G., Chemisova O.S., Vodopyanov A.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Men'shikova E.A., Podoynitsyna O.A., Ezhova M.I., Evteev A.V. [Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (1):56–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66.
2. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 38 Suppl. 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
3. Alenikina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Prospective sorption matrices for antitoxic cholera enterosorbent constructing]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (2):66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-66-69.
4. Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. Phage therapy in the post-antibiotic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019; 32(2):e00066–18. DOI: 10.1128/cmr.00066-18.
5. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Shvidenko I.G., Savel'ev V.N. [Detection of phage-induced mobile genetic elements in strains of *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (2):112–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.
6. Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O. [Study of the biological and genetic properties of cholera bacteriophages included in the experimental prophylactic drug]. In: Popova A.Yu., editor. [Current Issues of Epidemiology, Microbiology and Hygiene. Materials of the XIII All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of the Rospotrebnadzor]. Yekaterinburg; 2021. P. 317–8.
7. Adams M. [Bacteriophages]. Moscow: Foreign Literature Publishing House; 1961. 527 p.
8. Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O. [The effectiveness of using an experimental phage cocktail for the prevention of cholera in *in vivo* experiments]. In: [Current Issues of Epidemiology, Microbiology and Hygiene. Materials of the XIV All-Russian Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Specialists of the Rospotrebnadzor]. Moscow; 2022. P. 290–3.

Authors:

Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Sizova Yu.V., Pasyukova N.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

Об авторах:

Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Сизова Ю.В., Пасюкова Н.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.