



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра клинической лабораторной
диагностики и патологической анатомии с
курсом лабораторной микробиологии

Бактериофаги

Миронов Андрей Юрьевич, профессор, д.м.н.

Версия 2024г.,
г.Москва

Бактериофаги («пожиратель» бактерий - от лат. *phagos* – пожирающий) – вирусы, использующие в качестве хозяев только бактерии и обладающие специфичностью действия в отношении своих хозяев – бактериальных клеток

Бактериофаги

- Номенклатура основана на видовом наименовании хозяина, например, фаги, лизирующие возбудителя дизентерии (шигелл), получили название дизентерийных бактериофагов.
- Способствуют изучению молекулярной генетики и общей вирусологии: простота культивирования, короткий период генерации, высокий выход фагового потомства, возможность количественного учёта.
- Структура: имеют сперматозоидную форму, состоят из головки, которая содержит нуклеиновую кислоту и отростка. Размеры фаговой частицы 20-200 нм.
- Химический состав: нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) и белок; большинство содержат двунитевую ДНК в виде кольца, реже - одонитевые фаги.



Фредерик Творт Frederick William Twort (1877-1950)

Впервые наблюдал феномен бактериофагии в культуре стафилококков (1913); феномен назвал «стекловидное перерождение» бактерий; позднее это явление названо феноменом бактериофагии. В 1915 году сообщил об агенте, проходившем через бактериальный фильтр и вызывающем разрушение стафилококков

Феликс Хьюберт Д'Эрель (d'Herelle F. H.)

1873-1949

В 1917 г. наблюдал лизис культуры шигелл вирусами бактерий - фагами. Впервые выделил вирус бактерий, названный им бактериофагом; широко применял бактериофаги в клинике, в 1910-х – 1920-х годах применял бактериофаги для лечения бубонной чумы в Южной Африке и дизентерии во Франции, результаты исследований изложил в монографии «Le phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses».



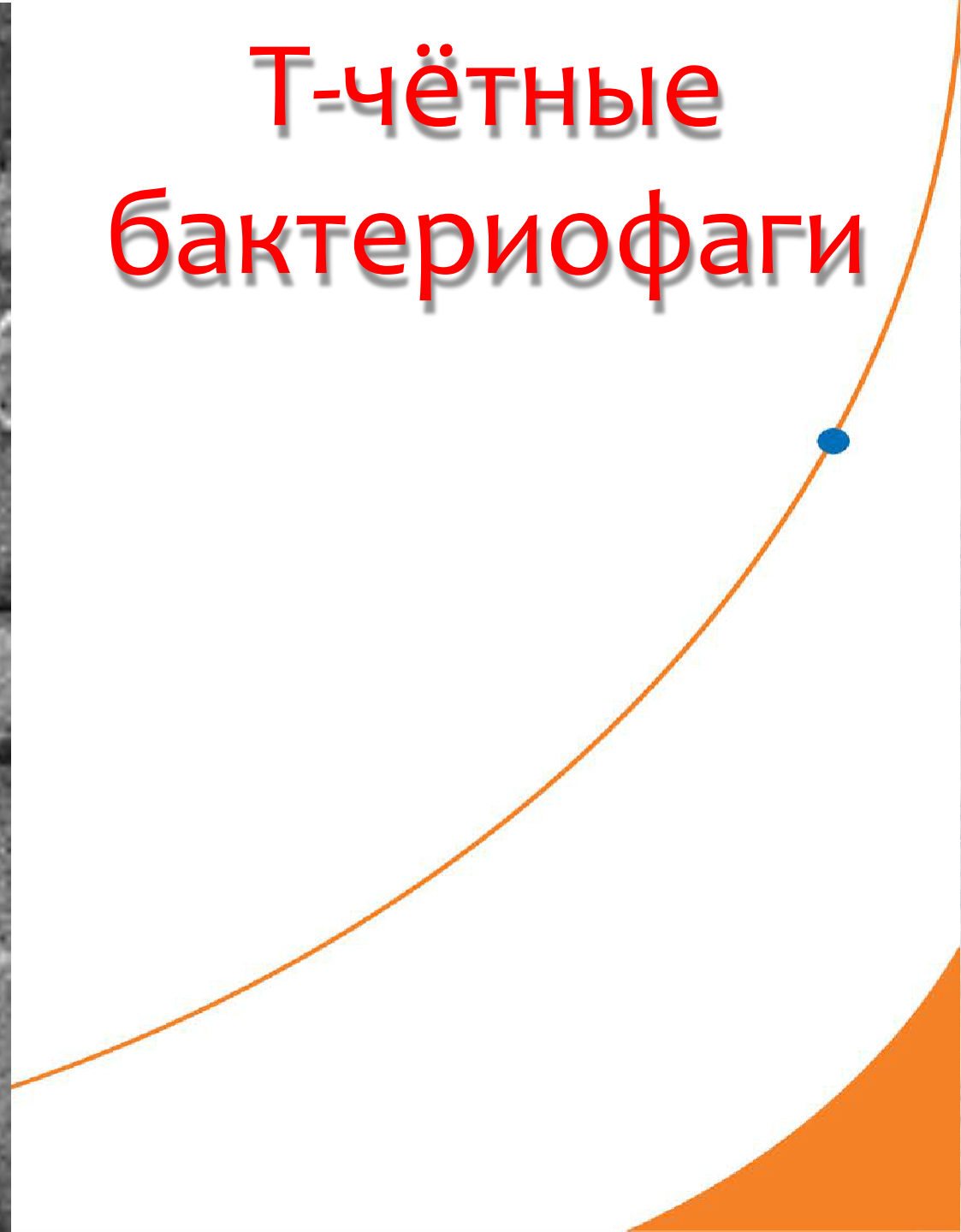
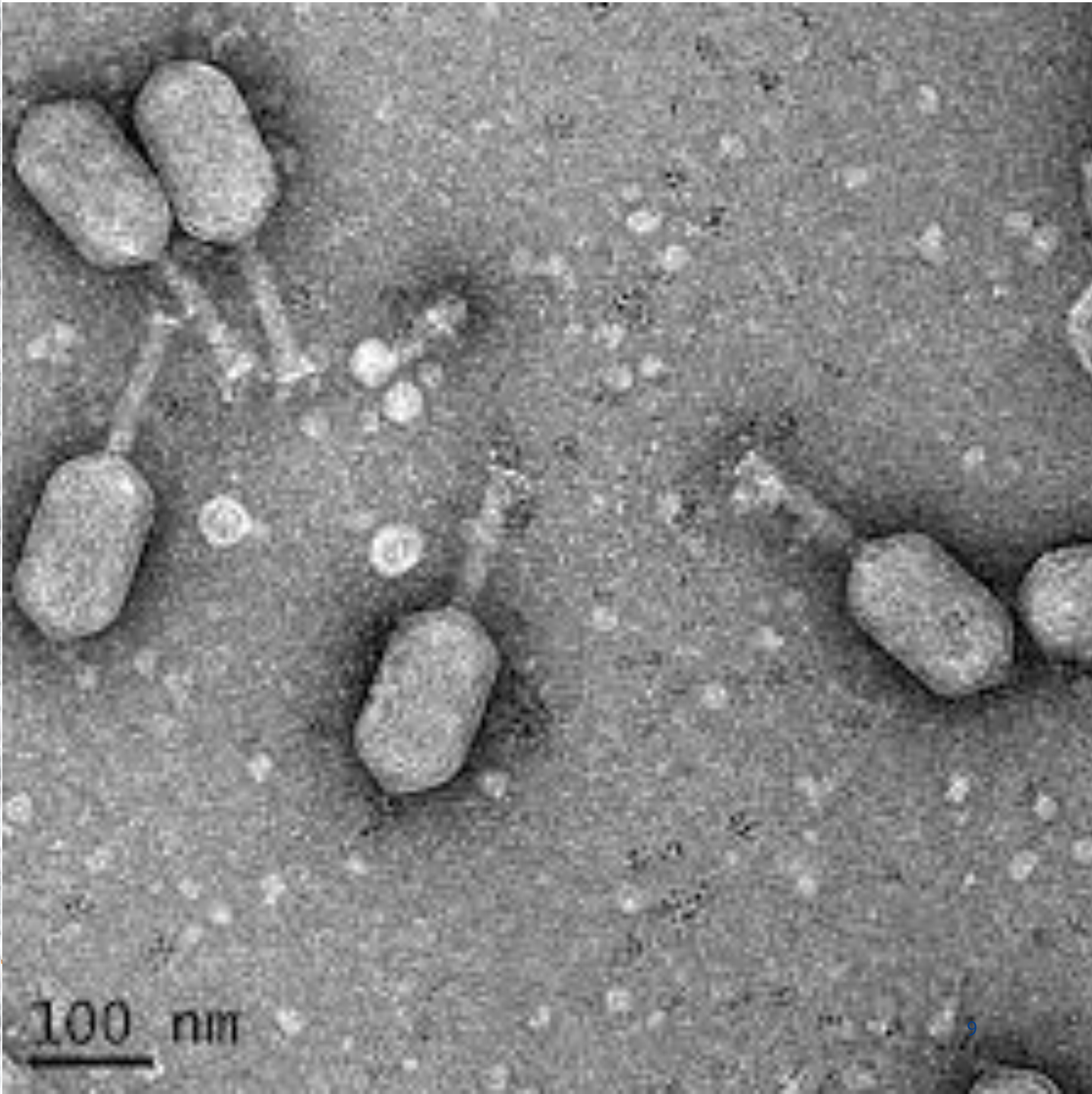
Строение бактериофагов

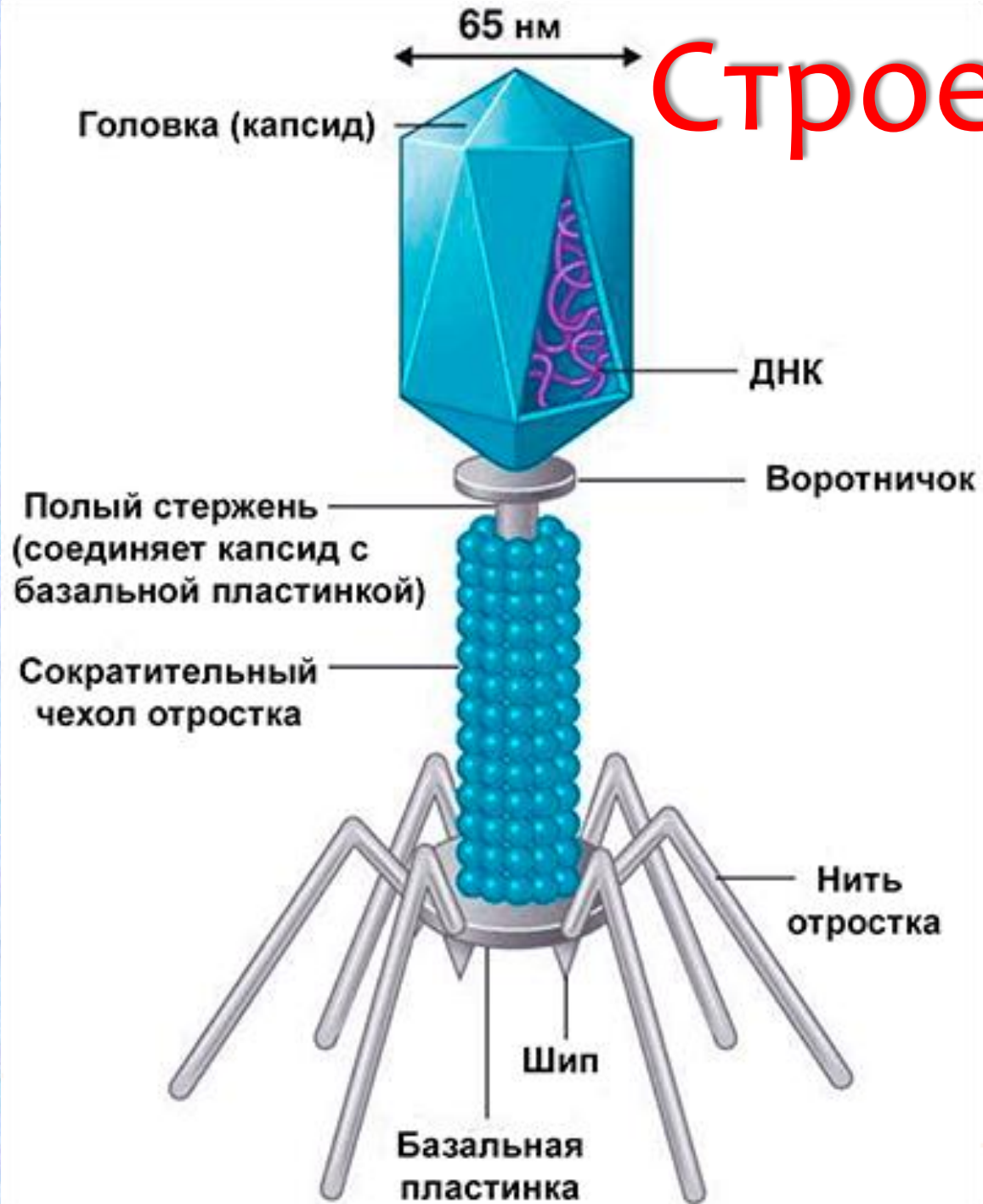
1. **Геном** (чаще –
двуцепочечная ДНК или
одноцепочечная РНК).
Ферменты: репликации,
транскрипции,
участвующие в
проникновении НК в
клетку и выходе
бактериофагов из клетки
хозяина (**нейраминидаза**,
лизоцим, **АТФ-аза**)

2. **Капсид** (**белковая
оболочка**) состоит из
капсомеров. Спиральный
и кубический тип
упаковки капсомеров.
Икосаэдры.



Т-чётные бактериофаги





Строение бактериофагов

Наиболее сложная структура Т-чётных фагов (Т₂), состоящих из головки гексагональной формы и отростка, который образован полым стержнем. Снаружи стержень окружен чехлом, способным к сокращению. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка, в углах которой располагаются короткие зубцы. От каждого зубца отходит по одной нити длиной 150 нм. Базальная пластинка и нити осуществляют процесс адсорбции фага на бактериальной клетке. Капсид головки фага и чехол отростка построены из полипептидных субъединиц по кубическому (головка) и спиральному (отросток) типу симметрии. Под чехлом дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Химический состав бактериофагов

- Белки – 50-60%
- Нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) – 40-50%
- Липиды (в следовом количестве)
- Гликопротеины (в следовом количестве)
- Низкомолекулярные сахара (в следовом количестве)
- Полисахариды (в следовом количестве)
- Полиамины (в следовом количестве)

Экология бактериофагов

Мир бактериофагов весьма разнообразен: описано более 500 различных типов фагов различной формы и строения.

- почва 1 гр – 10^8 фагов;
- морская вода 1 мл – 10^6 фагов;
- желудочно-кишечный тракт человека – 10^{12} фагов

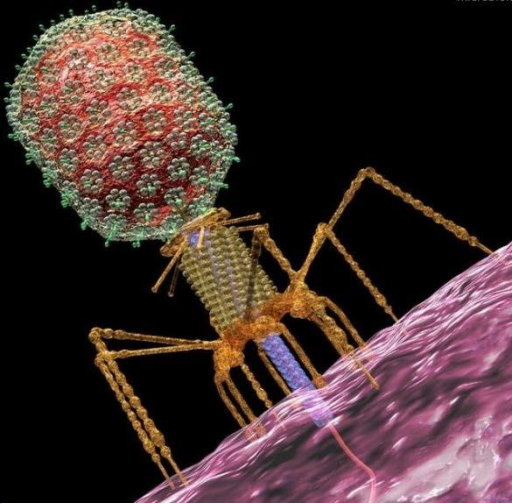
Общая численность фагов на планете – 10^{31} (10^9 т вещества)

Устойчивость в окружающей среде

Чувствительность	Устойчивость
Температура 60° С (30-60 мин)	pH 3-9
	Давление (тысячи атмосфер)
	Протеолитические ферменты
	Ферментные яды (азид натрия, фторид, динитрофенол)
	Хлороформ (фаги не содержащие липидов)

Морфологические типы бактериофагов

- I тип - нитевидные ДНК-фаги, лизируют клетки бактерий, несущих F-плазмиду.
- II тип - с аналогом отростка: мелкие РНК-содержащие фаги и однонитевой ДНК-фаг 174.
- III тип - фаги T_3 , T_7 с коротким отростком.
- IV тип - фаги с несокращающимся чехлом отростка и двунитевой ДНК (T_1 , T_5).
- V тип - ДНК-фаги с сокращающимся чехлом отростка, заканчивающимся базальной пластинкой (T_2 , T_4 , T_6).

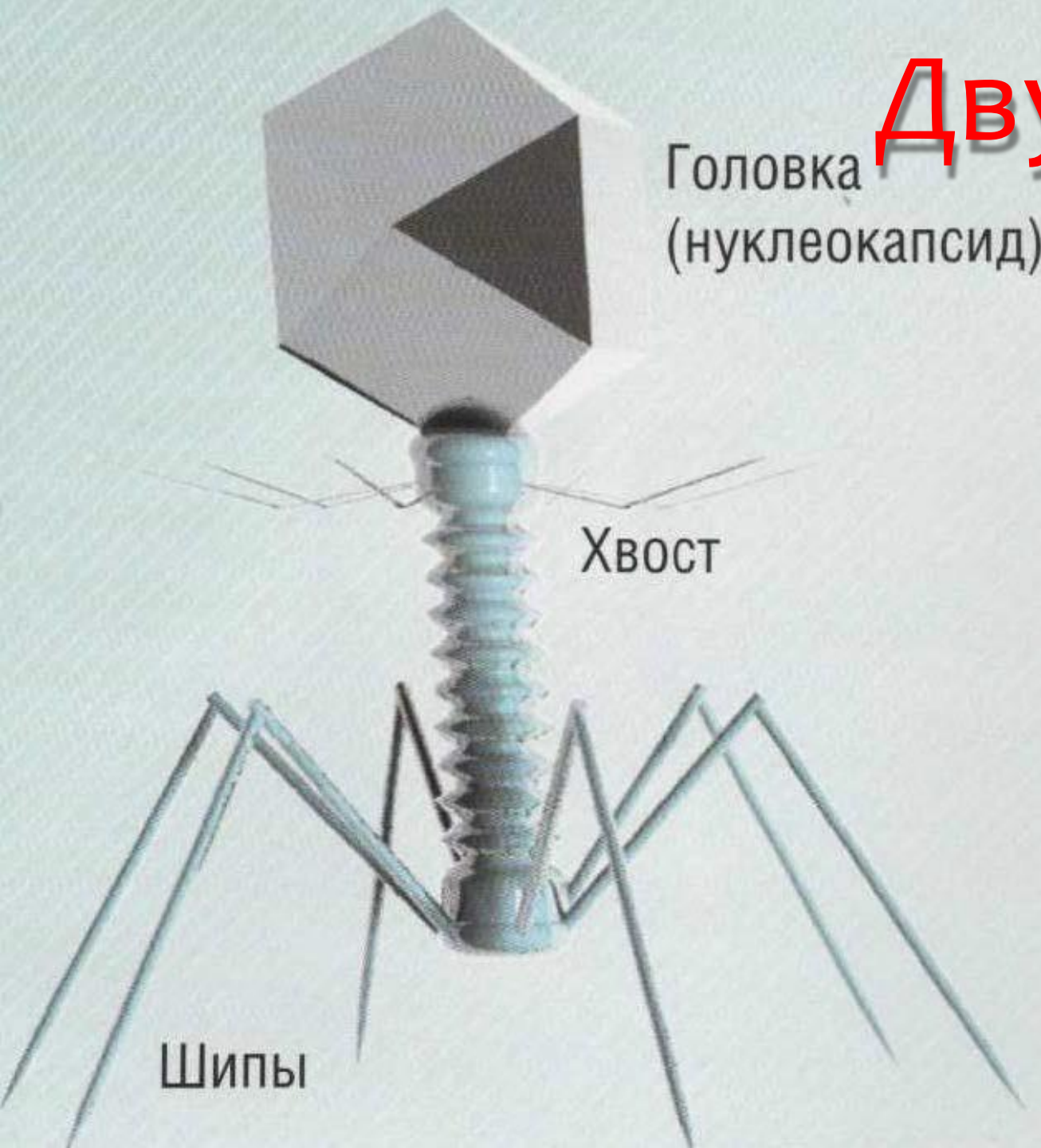


Классификация бактериофагов

Классификация бактериофагов

Семейство	Морфотип	Нуклеиновая кислота	Структура
Myoviridae	A1; A2; A3	ДНК 2 цепи	Частицы с сокращающимися хвостовыми отростками и головками различной формы
Siphoviridae	B1; B2; B3	ДНК 2 цепи	Частицы с длинными несокращающимися хвостовыми отростками
Podoviridae	C1; C2; C3	ДНК 2 цепи	Частицы с короткими несокращающимися хвостовыми отростками
Microviridae	D1	ДНК 1 цепь	Икосаэдрические частицы диаметром 27 нм с однослойной оболочкой
	D2	ДНК 1 цепь	Частицы диаметром 60-70 нм с однослойной оболочкой
Corticoviridae	D3	ДНК 2 цепи	Частицы с многослойной оболочкой, содержащей липиды
Tectiviridae	D4	ДНК 2 цепи	Частицы с двуслойной оболочкой, внутренний слой которой состоит из липидов
Leviviridae	E1	РНК 1 цепь	Икосаэдрические частицы диаметром 20-30 нм
Cystoviridae	E2	РНК 2 цепи	Икосаэдрические частицы с двуслойной оболочкой
Inoviridae	F1	ДНК 1 цепь	Длинные гибкие нити
	F2	неизвестно	Ригидные палочки
Plasmaviridae	G	ДНК 2 цепи	Плеоморфные частицы

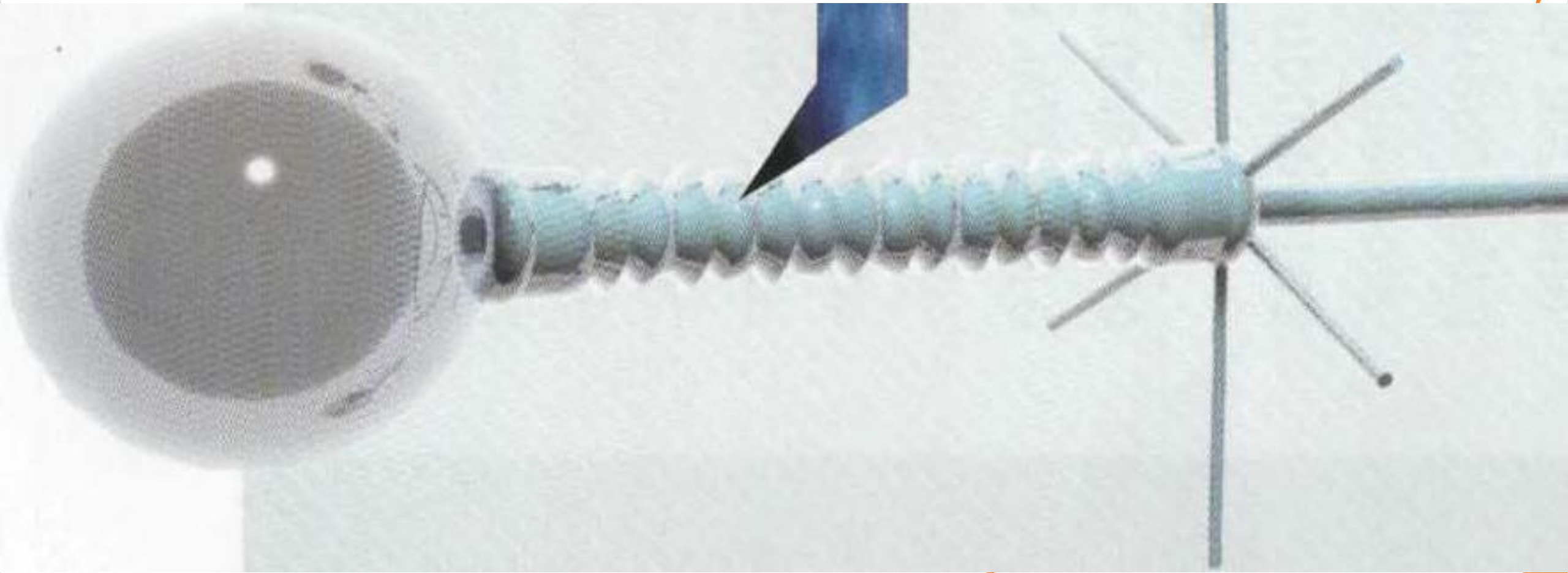
Двуцепочечная ДНК



Семейство *Myoviridae*

Частицы с сокращающимися
хвостовыми отростками и
головками различной формы

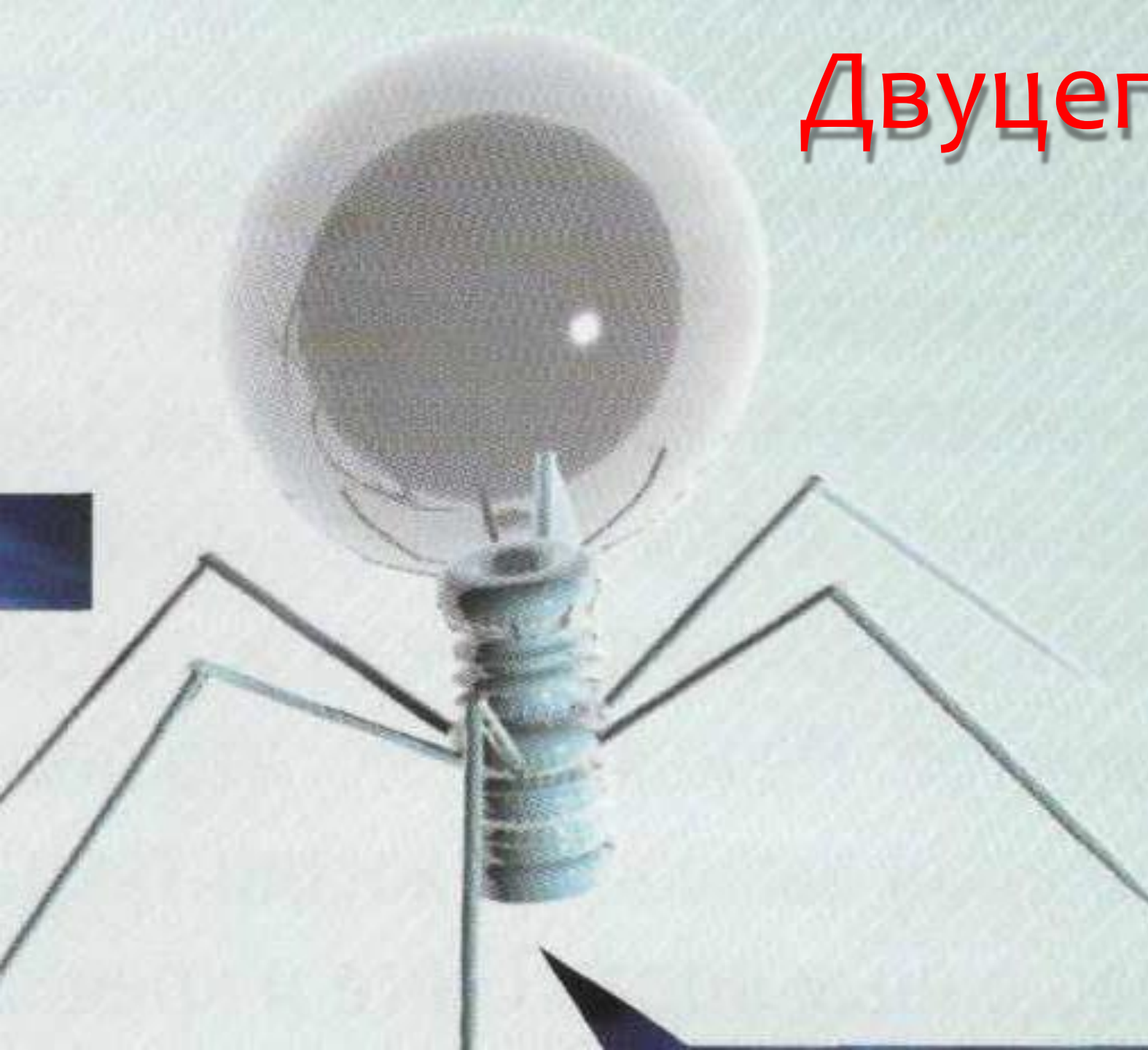
Двуцепочечная ДНК



Семейство Siphoviridae

Частицы с длинными несокращающимися хвостовыми отростками

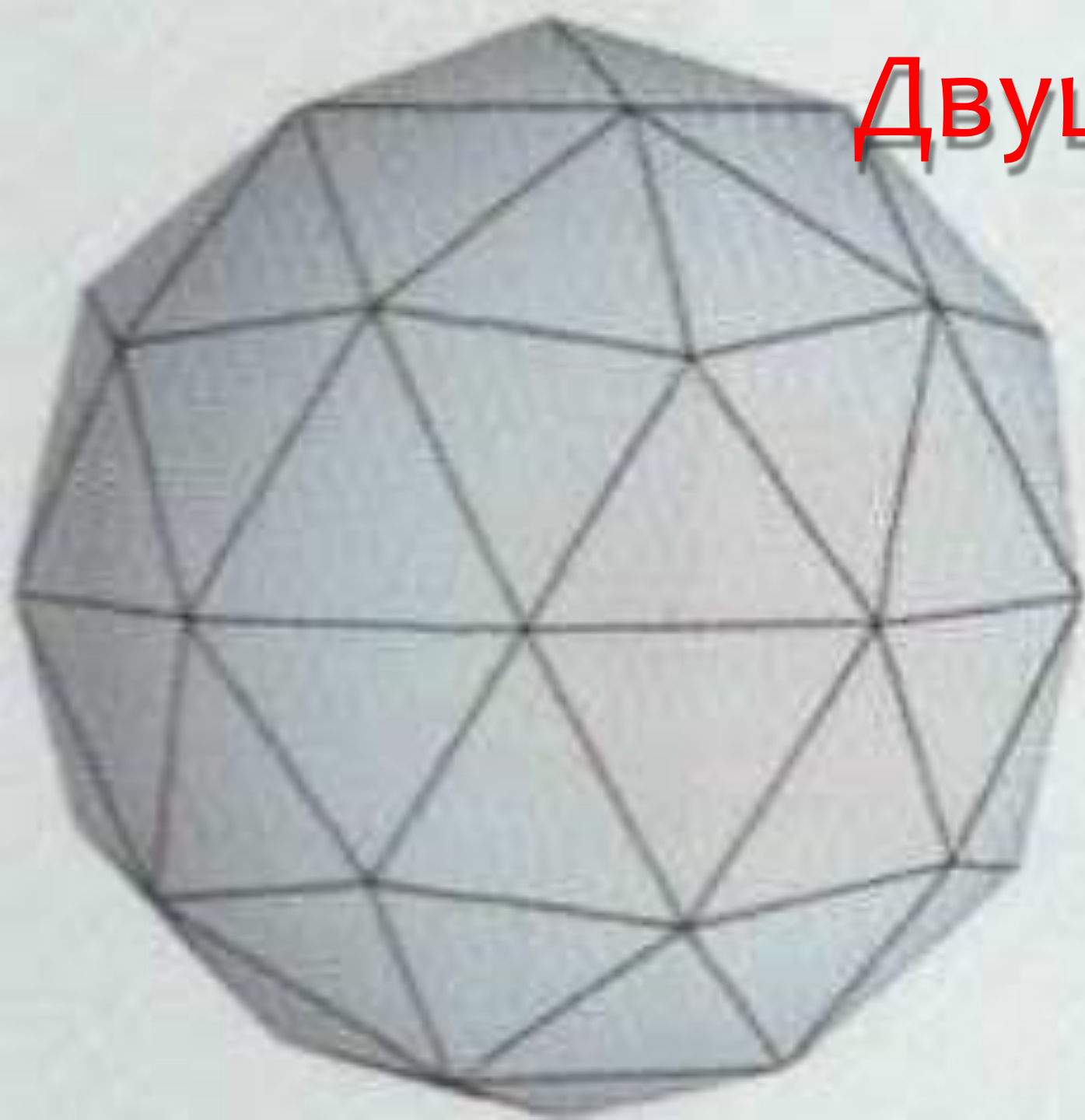
Двуцепочечная ДНК



Семейство Podoviridae

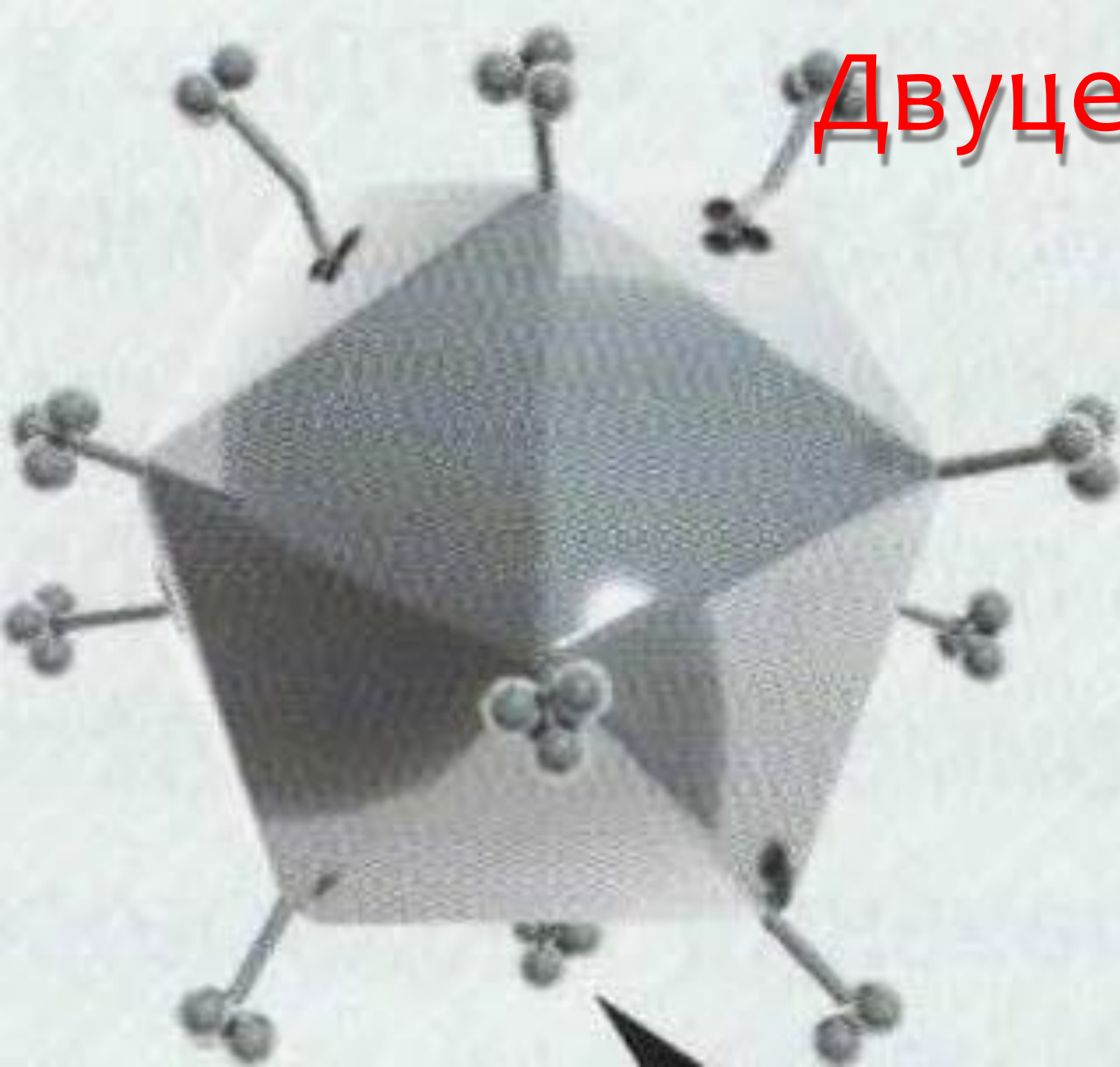
Частицы с короткими
несокращающимися
хвостовыми отростками

Двуцепочечная ДНК



Семейство *Cortocoviridae*

Частицы с многослойной оболочкой, содержащей липиды



Двухцепочечная ДНК

Семейство Testiviridae

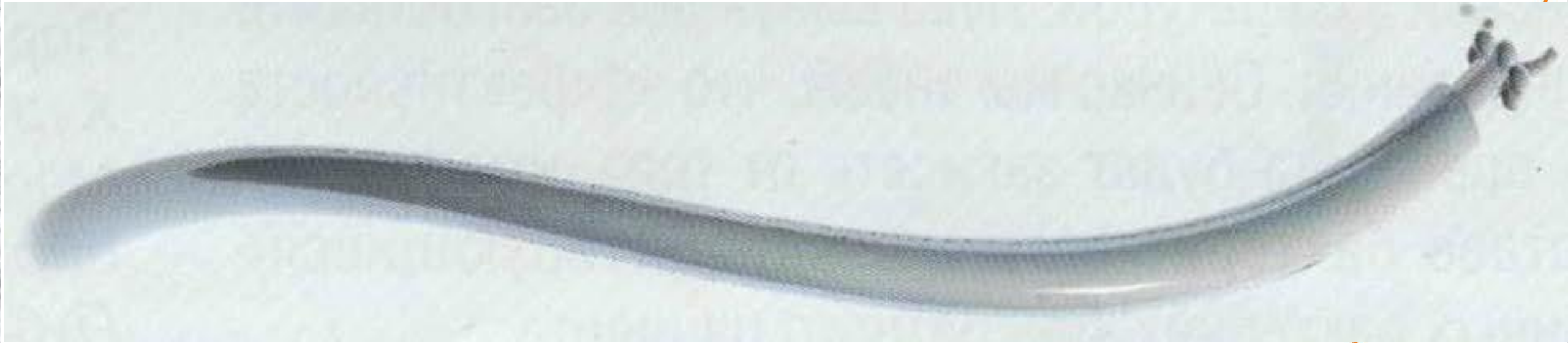
Частицы с двуслойной оболочкой, внутренний слой которой состоит из липидов

Одноцепочечная ДНК

Семейство Microviridae

Икосаэдрические частицы
диаметром 27 нм с однослойной
оболочкой и частицы диаметром
60-70 нм с однослойной
оболочкой

Одноцепочечная ДНК



Семейство Inoviridae

Длинные гибкие нити и ригидные палочки

Двухцепочечная РНК



Семейство Cystoviridae

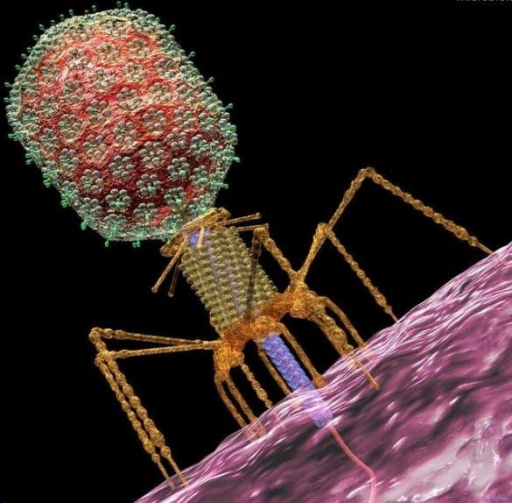
Икосаэдрические частицы с
двуслойной оболочкой

Одноцепочечная РНК



Семейство Leviviridae

Икосаэдрические частицы
диаметром 20-30 нм



Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

Типы взаимодействия фага с бактериальной клеткой

1. **Продуктивный:** лизис бактерий.
2. **Интегративный:** встраивание НК фага в геном бактерии, лизогения и фаговая конверсия бактериальной клетки.
3. **Абортивный.**

Основные свойства фагов

Различают **вирулентные** (продуктивный, литический процесс) и **умеренные** (интегративный процесс, лизогения) фаги.

Фаги, вызывающие интегративный тип инфекции, получили название умеренных. Они отличаются от вирулентных тем, что встраивают свою ДНК в бактериальный геном, с которым реплицируются. Фаговая ДНК, интегрированная с геномом хозяина, носит название **профага**.

Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются **лизогенными**, а само явление **лизогенией**. Название отражает потенциальную способность лизогенных бактерий к лизису при освобождении профага из состава бактериального генома и перехода в вирулентный фаг, способный репродуцироваться.

Лизогения лежит в основе **фаговой** или **лизогенной конверсии**, заключается в изменении свойств лизогенных бактерий, например, приобретении способности продуцировать токсин. Механизм этого явления связан с внесением новой генетической информации в бактериальную клетку (**трансдукцией**).

Стадии взаимодействия фагов и бактерий при продуктивной инфекции (вирулентные фаги)

Адсорбция фага на бактериальной клетке происходит при соответствии фаговых рецепторов с рецепторами клеточной стенки. Некоторые фаги адсорбируются на половых ворсинках (sex pili), контролируемых F- или R-плазмидами.

Внедрение фаговой НК (**инъекция фага**).

Репродукция фага - репликация фаговой нуклеиновой кислоты и синтез фагоспецифических ферментов транскрипции и репликации происходят как и при репродукции других вирусов, однако, время формирования фагового потомства короче.

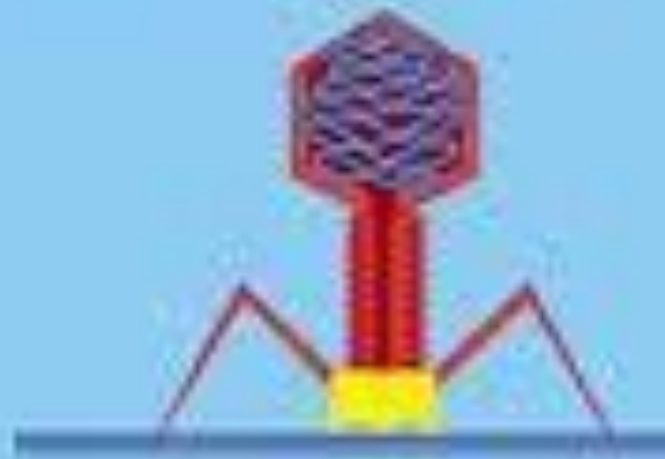
Сборка фаговых частиц - заполнение фаговой ДНК пустотелых капсид головки.

Выход зрелых фагов из бактериальной клетки происходит путём «взрыва», во время которого бактерии лизируются. Лизис происходит при участии фагового лизоцима либо без него.

Посадка



Фиксация



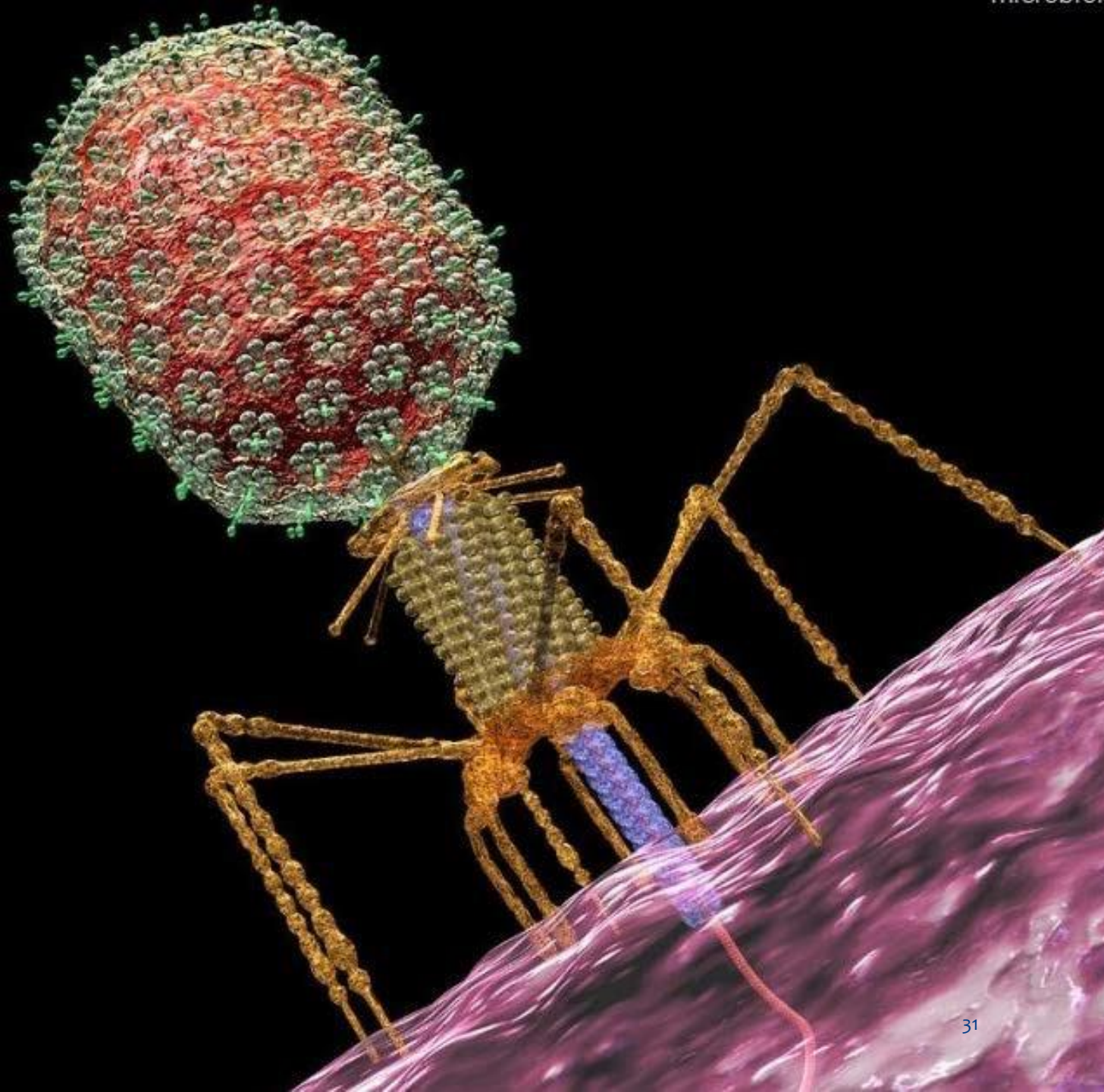
Прокол
клеточной
стенки



Инъекция ДНК



Взаимодействие
вирулентных
фагов и
бактерий при
продуктивной
инфекции



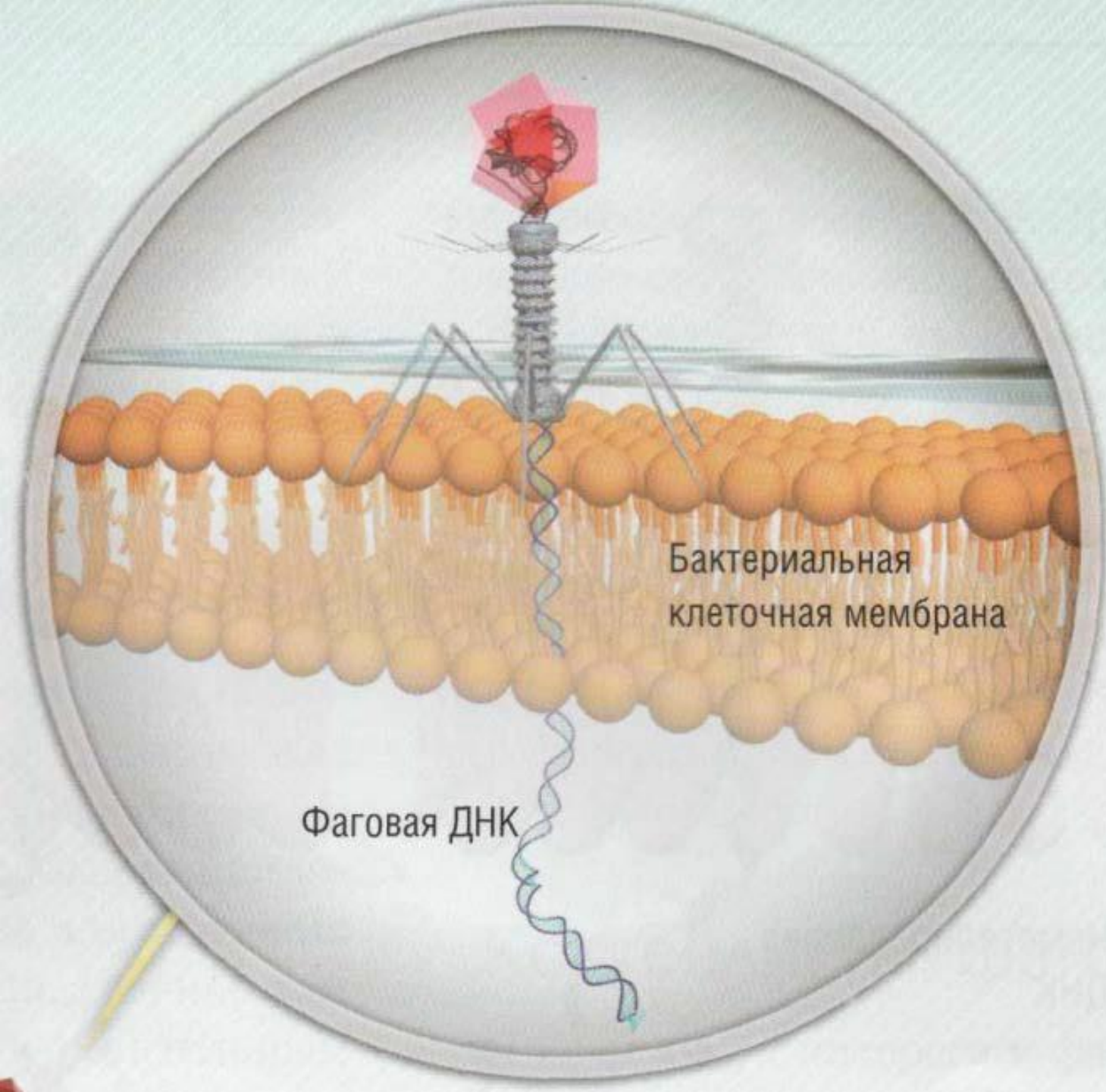
Адсорбция
бактериофага
на клеточной
стенке бактерии

Прикрепление фага

Адсорбция фага на бактериальной клетке

Инъекция ДНК





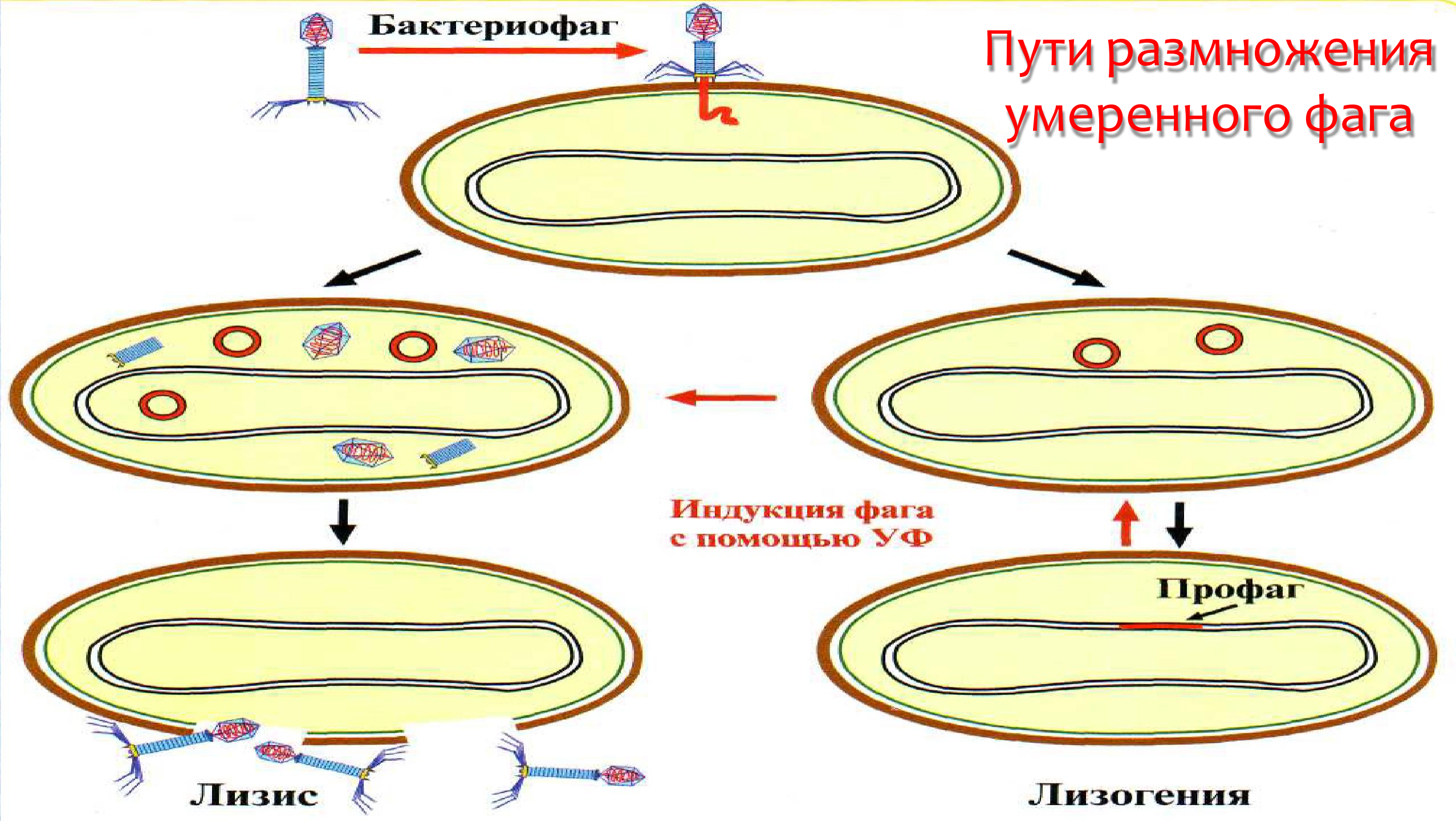
Инъекция ДНК
вирулентного
бактериофага в
бактериальную
клетку

Бактериофаги атакуют бактериальную клетку





Жизненный цикл вирулентного бактериофага



Бактериофаги и генетика

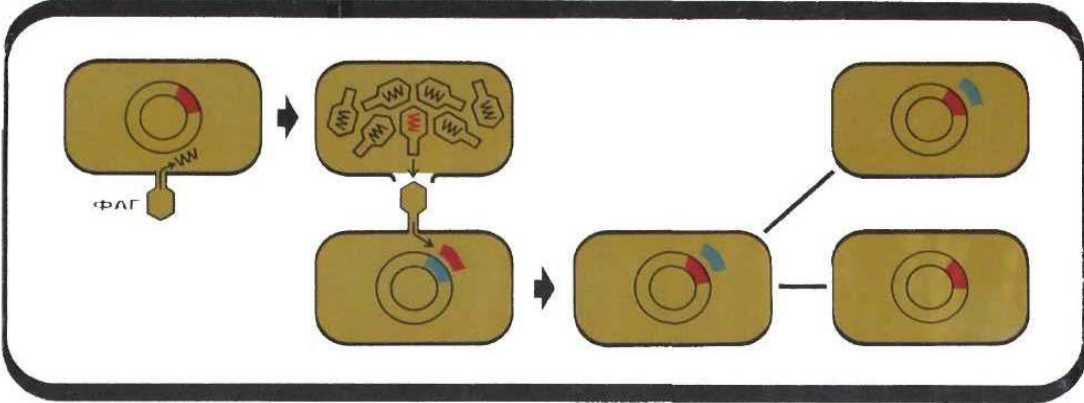
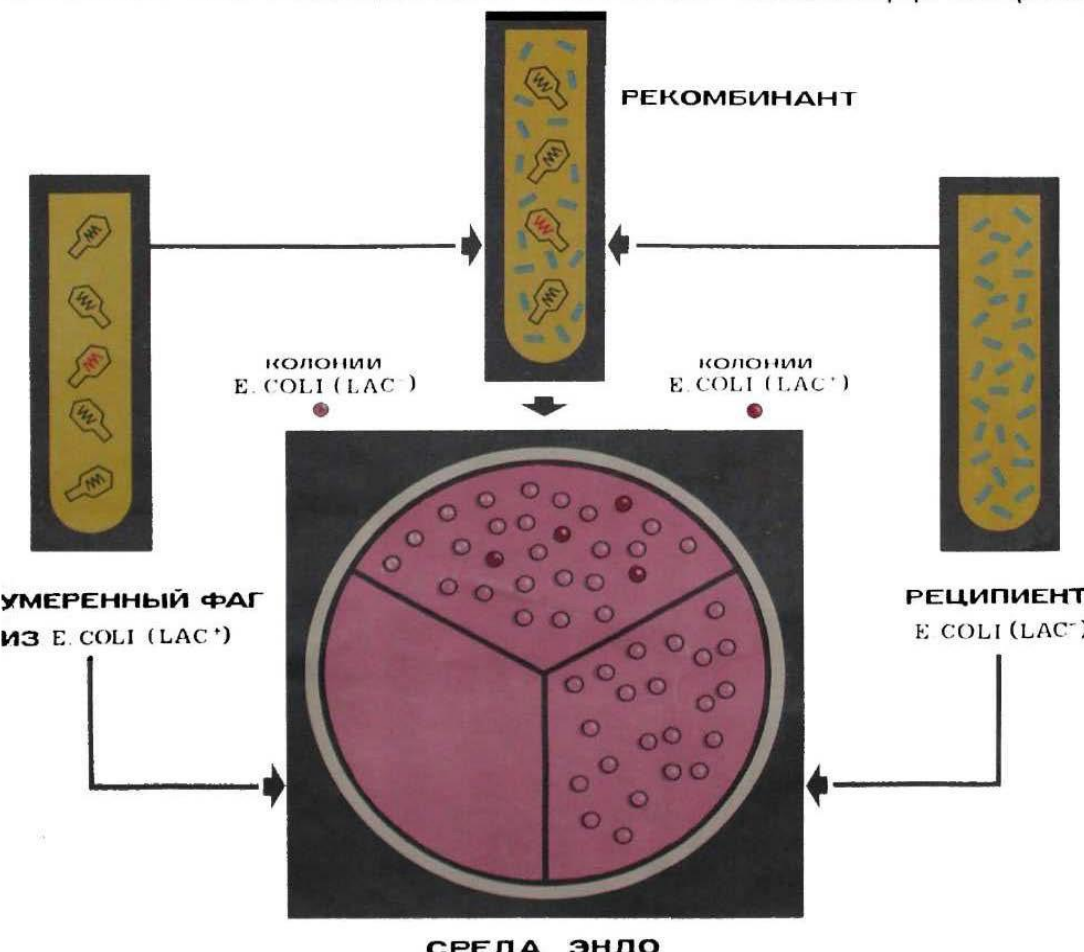


СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОПЫТА ТРАНСДУКЦИИ



Трансдукция – перенос генетического материала от клетки-донора клетке-реципиенту умеренным бактериофагом.

Неспецифическая – перенос случайного фрагмента ДНК.

Специфическая – перенос строго определённого фрагмента ДНК умеренным фагом.

Абортивная – фрагмент ДНК не встраивается в хромосому.

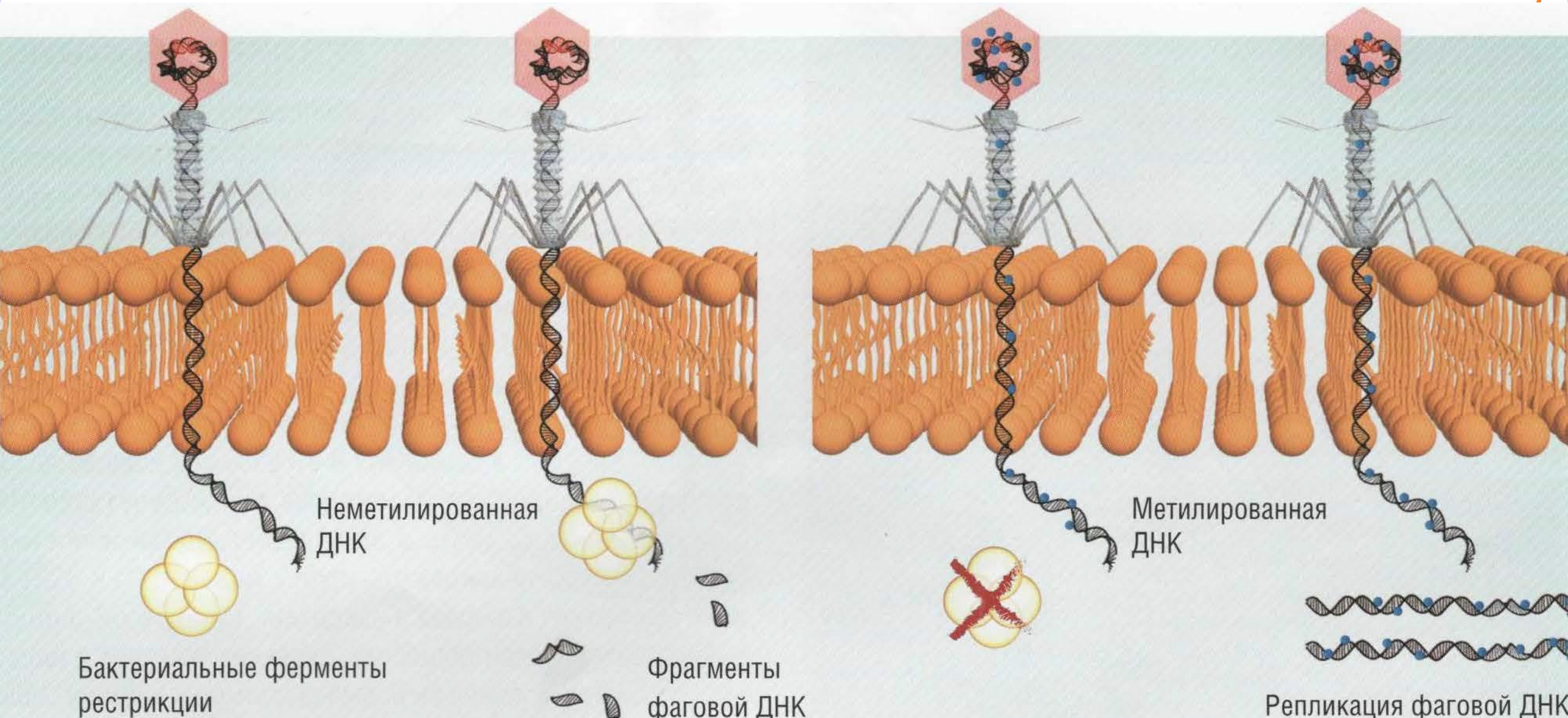
Умеренные и дефектные фаги

Факторами изменчивости бактерий могут быть умеренные или дефектные фаги, напоминающие по своим свойствам плазмиды бактерий. Встраиваясь в хромосому, они вызывают лизогенизацию бактерий, которые могут приобретать новые признаки. Изменчивость лизогенных бактерий связана с приобретением генов, переносимых данными фагами от их предыдущих хозяев (**бактерий-доноров**) или с экспрессией «молчащих» генов бактерий-реципиентов. В последнем случае фаговая ДНК, встраиваясь вблизи повреждённого промотора, заменяет его. При этом синтезируются определённые продукты, например, протоксины *Corynebacterium diphtheriae*, клостридий.

Факторы патогенности бактерий, кодируемые фагами

Бактериофаг	Бактерия-хозяин	Фактор патогенности	Ген	Функция
β-фаг	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	дифтерийный токсин	<i>tox</i>	экзотоксин
Фаг C1	<i>Clostridium botulinum</i>	нейротоксин	<i>C1</i>	экзотоксин
Фаг CTXφ	<i>Vibrio cholerae</i>	холерный токсин А, В	<i>ctxAB</i>	экзотоксин
Фаг лямбда	<i>Escherichia coli</i>	белок наружной мембраны Lom	<i>Lom</i>	адгезин
Фаг φC3208	<i>Escherichia coli</i>	гемолизин	<i>hly2</i> <i>stx2AB</i>	экзотоксин
Фаг φETA	<i>Staphylococcus aureus</i>	эксфолиатин А	<i>eta</i>	экзотоксин
Фаг H4489A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	гиалуронидаза	<i>hylP</i>	инвазин
Фаг SopEφ	<i>Salmonella typhimurium</i>	эффектор III типа секреторной системы	<i>sopE</i>	инвазин

Механизмы преодоления бактериальной защитной системы рестрикции



CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами, разделённые спейсерами, система, располагающаяся в нуклеоиде, иногда в плаزمиде бактерий, содержащая информацию о геномах бактериофагов, с которыми встречалась бактерия, блокирующая репликацию бактериофага, обеспечивающая формирование у бактерии приобретённого иммунитета. Состоит из спейсеров, повторов, лидерной последовательности, задающей направление транскрипции CRISPR-кассеты. Начало и конец повтора обратно комплементарны. Повторы разделены спейсерами, которые совпадают по нуклеотидной последовательности с протоспейсерами бактериофагов и совместно с ассоциированными генами (Cas-гены) защищают бактерии от бактериофагов. В результате процессинга CRISPR-локуса при участии Cas-белков, нарезающих первичный РНК-предшественник, образуется короткая РНК, гибридизирующаяся с протоспейсером, введённым бактериофагом в бактериальную клетку, что препятствует его размножению. CRISPR-гены участвуют в иммунитете против ДНК бактериофагов, в репликации и сегрегации репликонов при делении бактерий, в рекомбинации между повторами, в репарации ДНК.

Спейсеры и протоспейсеры

Спейсер - переменный участок ДНК бактерии, совпадающий по нуклеотидной последовательности с протоспейсером бактериофагов и совместно с ассоциированными генами (Cas-гены) защищающий бактерии от бактериофагов; в результате процессинга CRISPR-локуса при участии Cas-белков, нарезающих первичный РНК-предшественник, образуется короткая РНК, гибридизирующаяся с протоспейсером, введённым бактериофагом в бактериальную клетку, что препятствует его размножению.

Протоспейсер - участок чужеродной ДНК бактериофагов, совпадающий по нуклеотидной последовательности со спейсером бактерии.

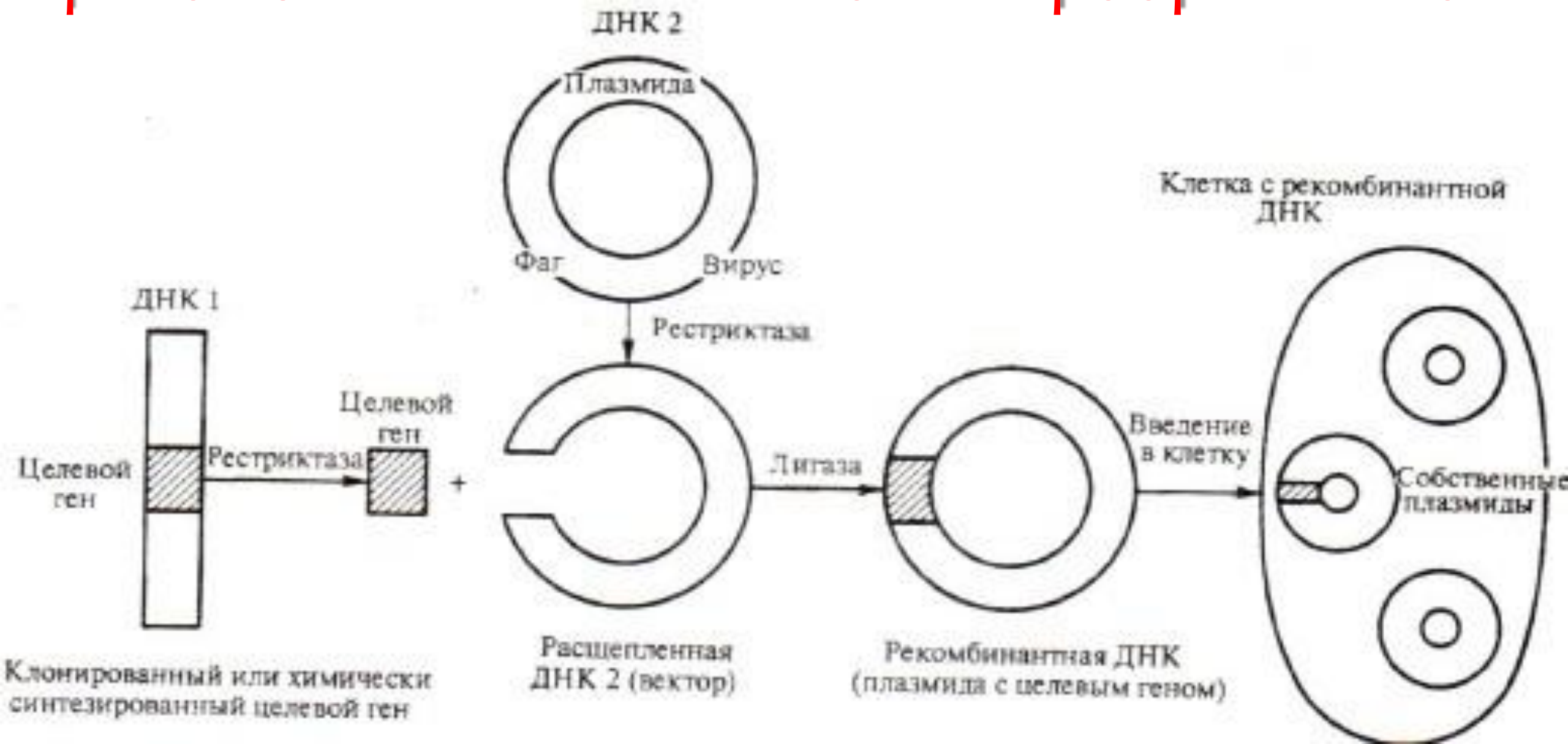
Значение CRISPR/Cas-системы

- Точный «молекулярный скальпель»
- Способна вырезать любую последовательность нуклеотидов из ДНК
- Тонкое редактирование генома бактерий и даже эукариот

Направления использования CRISPR/Cas-системы

- генотерапия наследственных болезней – мультиплексное редактирование нескольких «неправильных» генов;
- создание производственных штаммов бактерий устойчивых к различным бактериофагам;
- инактивация эндогенных ретровирусов в организме;
- индикация патогенов (вирус Зика и др.);
- создание бактериофагов избирательно лизирующих антибиотикорезистентные бактерии.

Получение рекомбинантных молекул ДНК и рекомбинантных штаммов микроорганизмов



Выделение бактериофагов из патологического материала и объектов окружающей среды

Методы выделения бактериофагов

- **Прямой метод:** исследуемую жидкость фильтруют, наличие фага в фильтрате определяют на плотных или жидких питательных средах
- **Метод обогащения «без подсева»** - создание наиболее благоприятных условий для размножения находящихся в исследуемом материале бактерий и соответствующего им искомого бактериофага
- **Метод обогащения «с подсевом»** - предварительное обогащение исследуемого материала теми бактериями к которым ищется бактериофаг, внесённые бактерии размножаются и вместе с ними размножается фаг.

Схема выделения бактериофагов

Образцы объектов окружающей среды (сточные воды, почва), клинический материал



Низкоскоростное центрифугирование (5-7 тыс. g 15-20 мин.)



Фильтрация через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм



Суспензия с различными фагами свободная от бактериальных клеток



Спот-тестирование суспензии на чувствительность к фагу культуре бактерий



Извлечение фрагмента агара из зоны лизиса; суспендирование в 0,5 мл физиологического раствора



«Обогащённый» фаговый препарат, содержащий несколько видов фагов



Титрование образца на чувствительной культуре бактерий методом агаровых слоёв



Получение чистых линий фагов

Методы индикации бактериофагов

- Обнаружение бактериофага в жидкой питательной среде
- Спот-тест (обнаружение бактериофага на плотной питательной среде в виде пятна)
- Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах двухслойным методом Грациа
- Электронная микроскопия

Количественные методы обнаружения фагов

- Титрование в жидкой питательной среде по методу Аппельмана
- Титрование на плотной питательной среде по методу агаровых слоёв Грациа



Санитарная микробиология воды

Санитарно-показательные микроорганизмы

Группа	Представители	Исследуемые объекты	Трактовка обнаружения
Обитатели кишечника человека и животных - индикаторы фекального загрязнения	1. Бактерии семейства Enterobacteriaceae (или общие колиформные бактерии)	Вода (питьевая централизованного водоснабжения, плавательных бассейнов); почва; предметы обихода, оборудование; пищевые продукты	
	2. Термотолерантные колиформные бактерии	Вода (питьевая централизованного водоснабжения плавательных бассейнов)	Свежее фекальное загрязнение
	3. Энтерококки	Сточные воды; почва; вода поверхностных водоёмов	Свежее фекальное загрязнение
	4. Клостридии сульфитредуцирующие	Вода (питьевая централизованного водоснабжения); пищевые продукты; почва	
	5. P. aeruginosa	Вода плавательных бассейнов; питьевая вода, расфасованная в ёмкости; питьевые минеральные воды	
	6. Коли-фаги	Вода всех видов водопользования	Загрязнение энтеровирусами
Обитатели верхних дыхательных путей, кожи	Стафилококки	Вода (плавательных бассейнов); воздух (ЛПУ, родовспомогательных учреждений); пищевые продукты; предметы обихода, оборудование	загрязнение микрофлорой кожи, верхних дыхательных путей
	Гемолитический стрептококк	Воздух в местах массового скопления людей	загрязнение микрофлорой верхних дыхательных путей
Сапрофиты		Почва, поверхностные водоёмы	индикаторы процессов самоочищения

Микроорганизмы-индикаторы процессов самоочищения почвы, поверхностных водоёмов:

- бактерии-аммонификаторы,
- нитрификаторы,
- целлюлозоразлагающие,
- некоторые грибы,
- актиномицеты,
- бациллы,
- бделловибрионы,
- сине-зелёные водоросли,
- простейшие,
- бактериофаги

Санитарно-показательные микроорганизмы воды

- общие колиформные бактерии;
- термотолерантные колиформные бактерии;
- энтерококки;
- стафилококки;
- **колифаги;**
- синегнойная палочка.

Микробиологические показатели для питьевой воды:

1. термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ),
2. общие колиформные бактерии (ОКБ),
3. общее микробное число (ОМЧ),
4. Колифаги - бактериальные вирусы, способные лизировать кишечную палочку и формировать зоны лизиса (бляшки) через 18 ч. при 37° С на её газоне на питательном агаре.

Определение колифагов в питьевой воде

- 1. Прямой метод** (по эпид. показаниям или в случае необходимости получения быстрого результата анализа).
Принцип - исследование нормируемого объёма воды (100 мл) путём прямого посева на газон кишечной палочки в чашках Петри с питательным агаром с последующим учётом количества бляшек.
- 2. Титрационный метод** (для проведения текущего анализа воды).
Принцип - предварительное подращивание колифагов в среде обогащения в присутствии кишечной палочки и последующее выявление бляшек колифагов на газоне кишечной палочки на питательном агаре.

Результаты выражаются в БОЕ на 100 мл пробы воды.

Нормативы качества питьевой воды

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Общие колиформные бактерии ²	Число бактерий в 100 мл ¹	Отсутствие
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл ¹	Отсутствие
Общее микробное число ²	Число образующихся колоний бактерий в 1 мл	Не более 50
Колифаги ³	Число БОЕ в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий ⁴	Число спор в 20 мл	Отсутствие
Цисты лямблий ³	Число цист в	Отсутствие

При обнаружении в пробе воды **колифагов** проводится их определение в повторно взятых в экстренном порядке пробах воды. Для выявления причин загрязнения одновременно проводится определение хлоридов, аммонийного азота, нитратов, нитритов. При обнаружении в повторно взятых пробах воды **колифагов** в количестве 2 и более в 100 мл проводится исследование проб для определения патогенных бактерий кишечной группы и/или энтеровирусов.

Микробиологические показатели воды поверхностных водоёмов

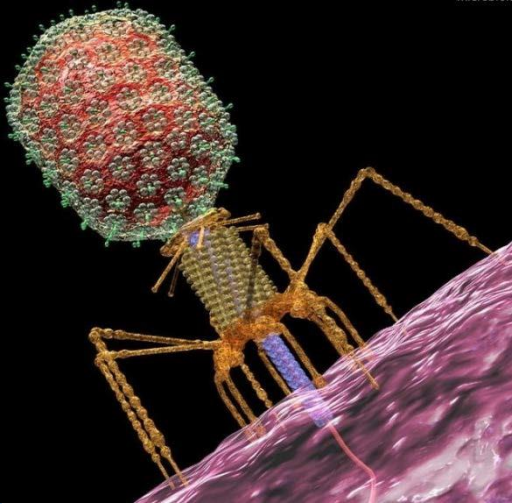
- термотолерантные колиформные бактерии;
- общие колиформные бактерии;
- **колифаги**;
- жизнеспособные яйца гельминтов и цисты патогенных кишечных простейших;
- возбудители кишечных инфекций.

СанПин 2.1.5.-980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»

Нормативы качества воды поверхностных водоёмов

Показатели	Категории водопользования	
	1-ая	2-ая
возбудители кишечных инфекций	не должна содержать возбудителей кишечных инфекций	не должна содержать возбудителей кишечных инфекций
жизнеспособные яйца гельминтов (аскарид, власоглав, токсокар, фасциол), цисты патогенных кишечных простейших	Не должно обнаруживаться в 25 л воды	Не должно обнаруживаться в 25 л воды
термотолерантные колиформные бактерии	Не более 100 КОЕ/100мл*	Не более 100 КОЕ/100мл*
общие колиформные бактерии	Не более 1000 КОЕ/100 мл*	Не более 500 КОЕ/100 мл*
колифаги	Не более 10 БОЕ/100 мл*	

Примечание: * для централизованного водоснабжения, при нецентрализованном
питьевом водоснабжении вода подлежит обеззараживанию



Применение бактериофагов

Направления применения бактериофагов

Бактериофаг-опосредованный биоконтроль	Мероприятия по уничтожению бактерий, поражающих сельскохозяйственные растения и животных на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие предприятия
Фаговый биопроцессинг	Деконтаминация и продление срока годности овощей, фруктов, мяса, рыбы и т. д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой полуфабрикатов и готовой к употреблению продукции
Фагопрофилактика	Профилактическое применение пероральных специализированных продуктов на основе бактериофагов для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек ОКИ и ИСМП
Фаготерапия	Индивидуальный подбор штаммового состава бактериофагов с учётом быстрого изменения циркулирующих штаммов-возбудителей и формирования антифагового иммунитета, создание новых лекарственных форм и методов лечения.
Фагокосметика	Использование бактериофагов для создания косметических средств и средств личной гигиены
Фаг-опосредованная биодезинфекция	Дезинфекция помещений и инструмента ЛПУ и пищевых производств средствами на основе фагов
Фагодиагностика	Индикация и идентификация микроорганизмов с помощью фаговых диагностикумов
Фаговый дисплей и транспорт лекарств	Экспонирование, отбор, доставка молекул с заданными свойствами (АТ, вакцина и др.) в организме

Бактериофаг-опосредованный биоконтроль

Бактериофаг-опосредованный биоконтроль



Мероприятия по уничтожению бактерий, поражающих сельскохозяйственные растения и животных на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы

Фаговый биопроцессинг

Фаговый биопроцессинг



Деконтаминация и продление срока годности овощей, фруктов, мяса, рыбы и т. д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой полуфабрикатов и готовой к употреблению продукции

Фаг-опосредованная биодезинфекция

Фаг-опосредованная биодезинфекция



Дезинфекция помещений и инструмента ЛПУ и пищевых производств средствами на основе фагов

Фагокосмецевтика

Кремы Gladskin с фаголизинном Staphhefekt™



MICREOS

Netherlands

Фаговый дисплей и транспорт лекарств

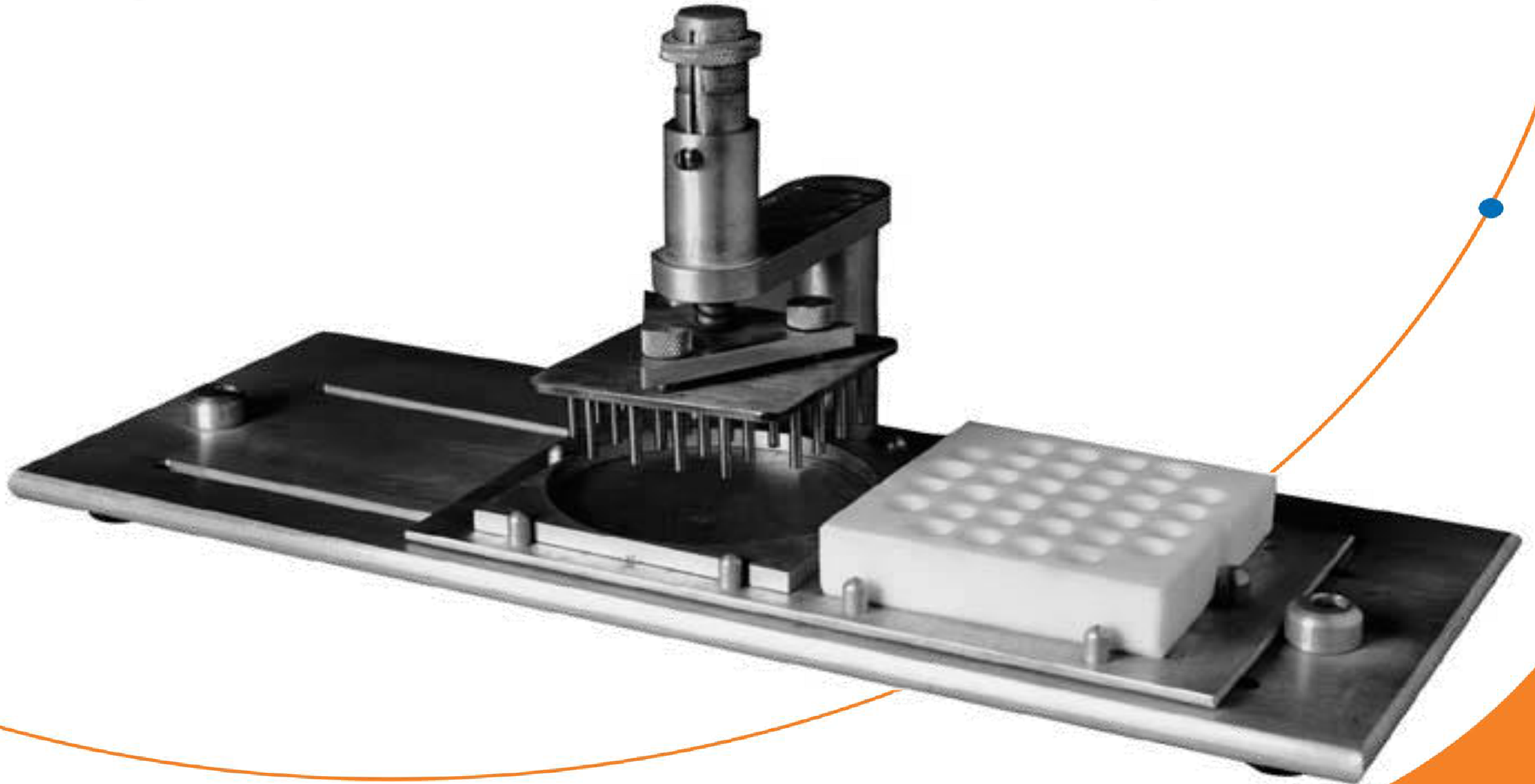
Фаговый дисплей и транспорт лекарств

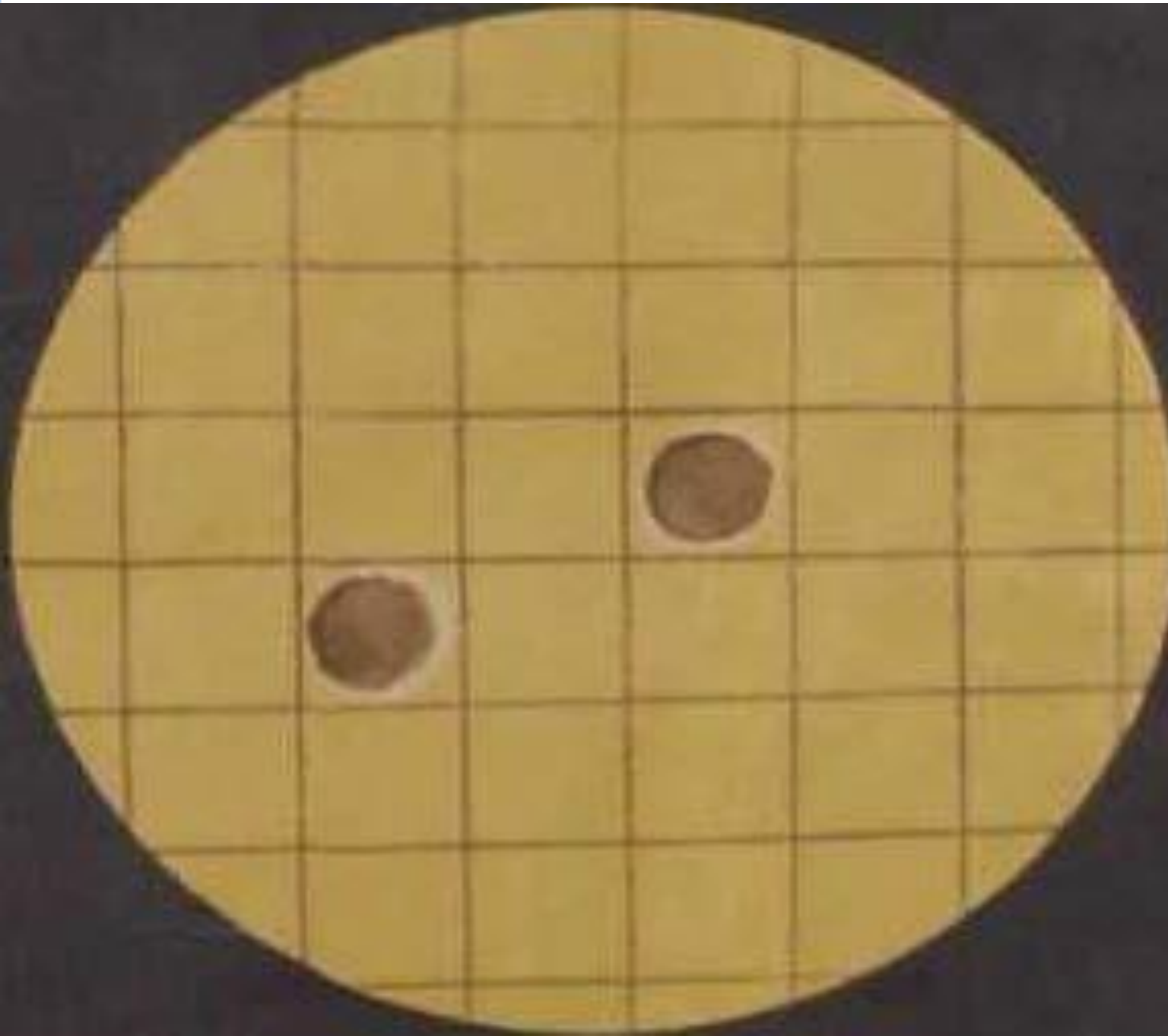
Бактериофаги, конъюгированные с антителами к вирусу, атакуют этот вирус



Фагодиагностика

Устройство для фаготипирования





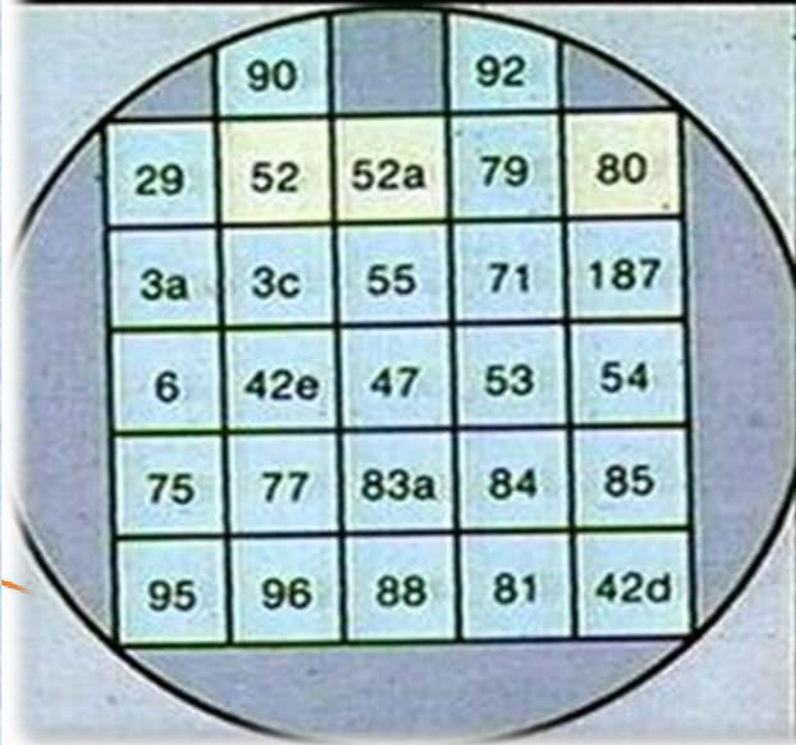
Метод фаготипирования бактерий позволяет не только определить видовую принадлежность культуры, но и её **фаговар**. У бактерий одного и того же вида имеются рецепторы, адсорбирующие строго определённые фаги, которые затем вызывают их лизис. Использование наборов специфических фагов позволяет проводить фаготипирование культур.

По наличию фагов во внешней среде (**водоёмах**) можно судить о содержании соответствующих бактерий. Данный метод индикации патогенных бактерий применяется в практике. Его эффективность повышается при постановке реакции нарастания титра фага, которая основана на способности специфических фагов репродуцироваться на определённых бактериальных культурах. При внесении такого фага в исследуемый материал, содержащий искомый возбудитель, происходит нарастание его титра.

Для выявления фагов используют спот-тест (**негативное пятно при росте колоний на плотной среде**) или метод агаровых слоёв (**титрование по Грациа**).

Внутривидовое типирование *S. aureus*

Phage type
52-52a-80



	90		92	
29	52	52a	79	80
3a	3c	55	71	187
6	42e	47	53	54
75	77	83a	84	85
95	96	88	81	42d



Проводится с помощью набора типовых фагов: на чистую культуру наносится 23 фага штампом-репликатором, результат 4+/3+/2+ считается сильным (номера указываются), +/- считается слабым (номера не указываются в ответе)

Фагопрофилактика

Фагопрофилактика

Купирование вспышек инфекционных болезней (ОКИ, ИСМП) с помощью профилактического приёма бактериофагов.



Фаготерапия



Архиепископ Симферопольский и Крымский Святитель Лука (Валентин Феликсович) Войно- Ясинецкий (1877-1961)

Лауреат Сталинской премии, доктор
медицинских наук, профессор
«Очерки гнойной хирургии»



Люди издавна сталкивались с чудесными случаями исцеления от инфекционных заболеваний. Часто их можно объяснить неосознанным использованием бактериофагов, которые распространены повсеместно. С древнейших времён для лечения ран и воспалений применялись грязи и смеси на основе природных продуктов. В 1920-х годах хирург-архиепископ Святитель Лука Войно-Ясинецкий, находясь в ссылке в глухой деревне, узнал о местной знахарке, умеющей излечивать гнойные раны с помощью смеси земли, кислого молока, золы. Он пытался разобраться в природе этого явления, экспериментируя с составом композиции. Результаты лечения плохо воспроизводились: иногда оно вело к фантастически быстрому излечению больных, иногда вовсе не помогало.



Основоположник
отечественной фаготерапии
**Элиава Георгий
Григорьевич**
1892-1937

Основал Институт Бактериофагов в
Тбилиси, который производил в 30-ые
годы XX века до 2 тонн бактериофагов в
неделю

Д'Эррель и Г. Г. Элиава в Тбилиси



Достоинства бактериофагов

- Специфичность действия
- Не вызывают дисбиоз
- Не токсичны
- Не реактогенны
- Способствуют нормализации иммунных показателей
- Совместимы с любыми лекарственными средствами
- Эффективность на уровне современных антибиотиков
- Самоэлиминация из организма

Сравнение фаго- и антибиотикотерапии

Антибиотики	
Достоинства	Недостатки
Широкий спектр действия	Вызывают дисбиоз
	Не способны концентрироваться в инфекционном очаге
	Побочное действие
	Формирование антибиотикорезистентности
	Высокая стоимость разработки новых препаратов
Бактериофаги	
Специфичность действия	Высокая избирательность действия
Поиск нового фага занимает дни-недели	
Производство дешёвое	
Производство экологически чистое	
Не вызывают дисбиоз	
Не токсичны	
Отсутствие побочного действия	
Самозелиминация из организма	

Направления фаготерапии

Фаги промышленного
производства



- Монофаги
- Поливалентные фаги (Phage cocktails)

Фаги лабораторного
изготовления



- Фаговые библиотеки
- Адаптация фагов



Белки фагового происхождения

Фаговый коктейль - препарат, содержащий несколько бактериофагов, отличающихся по специфичности

Лечебно-профилактические бактериофага производства МИКРОГЕН

Препарат	Спектр антибактериальной активности	Применение
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	Shigilla sonnei, S. flexneri	Лечение и профилактика дизентерии; санация реконвалесцентов
Бактериофаг сальмонеллёзный ABCDE	Salmonella серогрупп A, B, C, D, E	Лечение и профилактика сальмонеллёзов
Бактериофаг стафилококковый	Staphylococcus aureus и ряд видов КОС	Лечение и профилактика ГВЗ, вызванных стафилококками
Бактериофаг стрептококковый	Streptococcus, Enterococcus	Лечение и профилактика ГВЗ, ОКИ, дисбиозов; обработка ран
Бактериофаг протейный	Proteus vulgaris, P. mirabilis	Лечение и профилактика ГВЗ, ОКИ, вызванных протеем
Бактериофаг коли	Энтеропатогенные Escherichia coli	Лечение и профилактика ГВЗ, ОКИ, вызванных кишечной палочкой
Бактериофаг синегнойный	Pseudomonas aeruginosa	Лечение и профилактика ГВЗ различной локализации
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный	Klebsiella pneumoniae	Лечение и ГВЗ различной локализации, ОКИ, ИМП, селективная деконтаминация кишечника
Бактериофаг клебсиелл пневмонии поливалентный	Klebsiella rhinoscleromatis, K. pneumoniae, K. ozaenae	Лечение озы, риносклеромы и ГВЗ различной локализации
Бактериофаг коли-протейный	Энтеропатогенные Escherichia coli, Proteus vulgaris, P. mirabilis	Лечение и профилактика энтероколитов, лечение колипротейных кольпитов
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus, Streptococcus, энтеропатогенные Escherichia coli	Лечение и профилактика ГВЗ различной локализации, ОКИ, ИМП, дисбиоза кишечника
Пиобактериофаг комплексный	Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Klebsiella pneumoniae, K. oxytoca, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, энтеропатогенные Escherichia coli	Лечение и профилактика ГВЗ различной локализации, ОКИ, ИМП, дисбиоза кишечника
Интести-бактериофаг	Shigilla sonnei, S. flexneri, Salmonella paratyphi A, S. paratyphi B, S. typhimurium, S. infantis, S. choleraesuis, S. oranienburg, S. enteritidis, энтеропатогенные Escherichia coli, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas aeruginosa	Лечение дизентерии, сальмонеллёза, диспепсии, колита, энтероколита
Секстафаг (Пиобактериофаг поливалентный)	Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, P. mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus, Streptococcus, энтеропатогенные Escherichia coli	Лечение и профилактика ГВЗ различной локализации

Монофаги производства «МИКРОГЕН»

Н. Новгород	Бактериофаг дизентерийный поливалентный, таблетки
Пермь	Бактериофаг коли , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения, фл. 20 мл №4
Пермь	Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный, раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Уфа	Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный, раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Бактериофаг протейный , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения, фл. 20мл №4
Н. Новгород	Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный), раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный), раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Н. Новгород	Бактериофаг сальмонеллёзный групп ABCDE, таблетки
Н. Новгород	Бактериофаг сальмонеллёзный групп А,В,С,Д,Е жидкий (Бактериофаг сальмонеллёзный), раствор
Н. Новгород	Бактериофаг стафилококковый , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Н. Новгород	Бактериофаг стафилококковый , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Бактериофаг стафилококковый , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Бактериофаг стрептококковый , раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения

Полифаги производства «МИКРОГЕН»

Н. Новгород	Интести-бактериофаг, раствор для приёма внутрь и ректального введения
Н. Новгород	Пиобактериофаг комплексный жидкий, раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Н. Новгород	Пиобактериофаг комплексный жидкий, раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Интести-бактериофаг, раствор для приёма внутрь и ректального введения, фл. 100мл
Пермь	Секстафаг® (Пиобактериофаг поливалентный), раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Пермь	Интести-бактериофаг, раствор для приёма внутрь и ректального введения
Уфа	Пиобактериофаг поливалентный очищенный (Пиобактериофаг), раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения
Н. Новгород	Бактериофаг коли-протейный, раствор для приёма внутрь, местного и наружного применения

Возбудитель \ Бактериофаг	Интеги-бактериофаг	Пиобактериофаг комплексный	Секстафа® (Пиобактериофаг поливалентный)	Пиобактериофаг поливалентный очищенный	Бактериофаг коли-протейный	Бактериофаг дизентерийный поливалентный	Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный	Бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный)	Бактериофаг стафилококковый	Бактериофаг стрептококковый	Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE	Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный	Бактериофаг коли	Бактериофаг протейный
<i>Staphylococcus</i>	•	•	•	•					•					
<i>Streptococcus</i>		•	•	•						•				
<i>Enterococcus</i>	•	•												
<i>Proteus vulgaris</i>	•	•	•	•	•									•
<i>Proteus mirabilis</i>	•	•	•	•	•									•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	•	•	•	•				•						
Энтеропатогенные <i>Esherichia coli</i>	•	•	•	•	•								•	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		•	•	•			•					•		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		•												
<i>Klebsiella ozaenae</i>							•							
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>							•							
<i>Shigella flexneri</i> 1,2,3,4,6 сероваров, <i>Shigella sonnei</i>	•					•								
<i>Salmonella paratyphi</i> A, B, <i>typhimurium</i> , <i>choleraesuis</i> , <i>infantis</i> , <i>oranienburg</i> , <i>enteritidis</i>	•										•			

Антибактериальная активность бактериофагов



Белки фагового происхождения

1. Виролизин (**virolysin**) - фермент, вырабатываемый бактериями заражёнными фагами и разрушающий пептидогликан. Другие наименования: фаголизим, лизозим, лизин, литический фермент.
2. Антибактериальные пептиды:
 - кодируемые фагом литические факторы (**phage-encoded lytic factors**)
 - комплексы фагового хвоста (**phage tail complexes**).

Показания к применению бактериофагов:

- Специфические и неспецифические ОКИ
- Профилактика ИСМП
- Инфекции ЛОР-органов
- Хирургические инфекции
- Ожоговые раны
- Инфекции дыхательных путей
- Урогенитальные инфекции
- Инфекции глаз
- Сепсис

Почему роль фаготерапии – предмет дискуссии?

1. Вопросы теории:

- 1) Что является действующим началом в фаголизате:
 - бактериофаг?
 - продукты дезинтеграции бактерий?
- 2) Приживляются ли фаги в организме пациента?

2. Юридические проблемы: предмет лицензирования - конечный продукт или технология его получения?

3. Плохая информированность практикующих врачей

Фаги в Российской Федерации

- Производство лечебных бактериофагов регламентировано статьями Государственной фармакопеи
- Бактериофаги присутствуют как отдельная группа препаратов в СП 3.3.2.561-96 «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов», отраслевом стандарте «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» № 91500.05.001-00.



Некоммерческое партнерство
НАСКИ
национальная ассоциация специалистов
по контролю инфекций

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций,
связанных с оказанием медицинской помощи

ФЕДЕРАЛЬНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

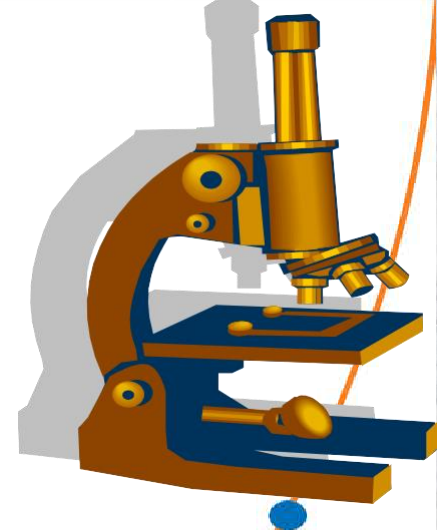
Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике

2017

Федеральные клинические рекомендации
«Рациональное применение бактериофагов в
лечебной и противоэпидемической работе»

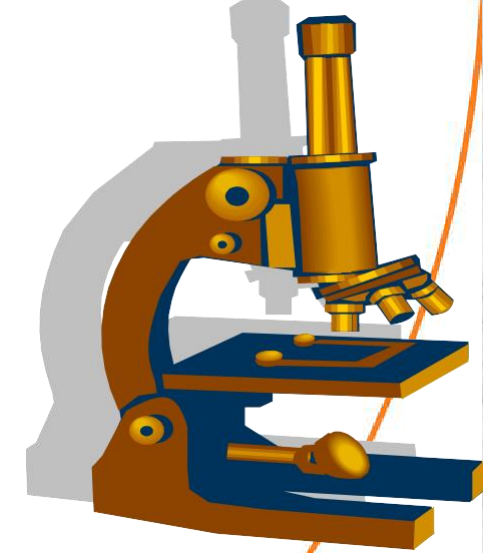
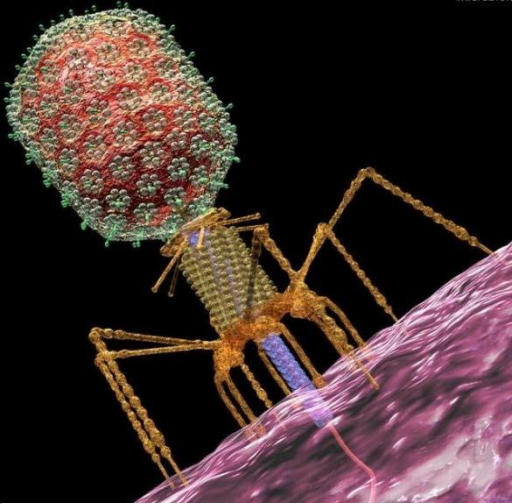
Перспективы применения фагов в медицине:

- Создание бактериофагов с изменённой и расширенной специфичностью
- Создание полных фаговых геномов
- Создание бактериофагов, продуцирующих антибактериальные токсины, которые будут доставляться непосредственно в бактериальную клетку
- Создание бактериофагов для транспорта лекарств (АТ, антибактериальных химиопрепаратов и др.)
- Новые антибактериальные препараты на основе компонентов фага и веществ, используемых ими для поражения бактерий (фаголизины, комплексы фагового хвоста)
- Фаговые вакцины – бактериофаги, несущие на своей поверхности определённые пептидные АГ
- Создание лекарственных форм фагов для парентерального применения (присоединение к поверхности бактериофага молекул полиэтиленгликоля позволяет бактериофагом длительное время циркулировать в кровотоке)



Благодарю за внимание

Москва



Бактериофаги



АКАДЕМИЯ
ПОСТДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ФНКЦ ФМБА РОССИИ

Кафедра Клинической лабораторной
диагностики и патологической
анатомии



Денисова



Ольга



Владимировна



Телефон +7-985-644-



80-90 (в том числе
вотсапп)



[email.com](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
[denisova_ov@inbox.r](mailto:denisova_ov@inbox.ru)
u