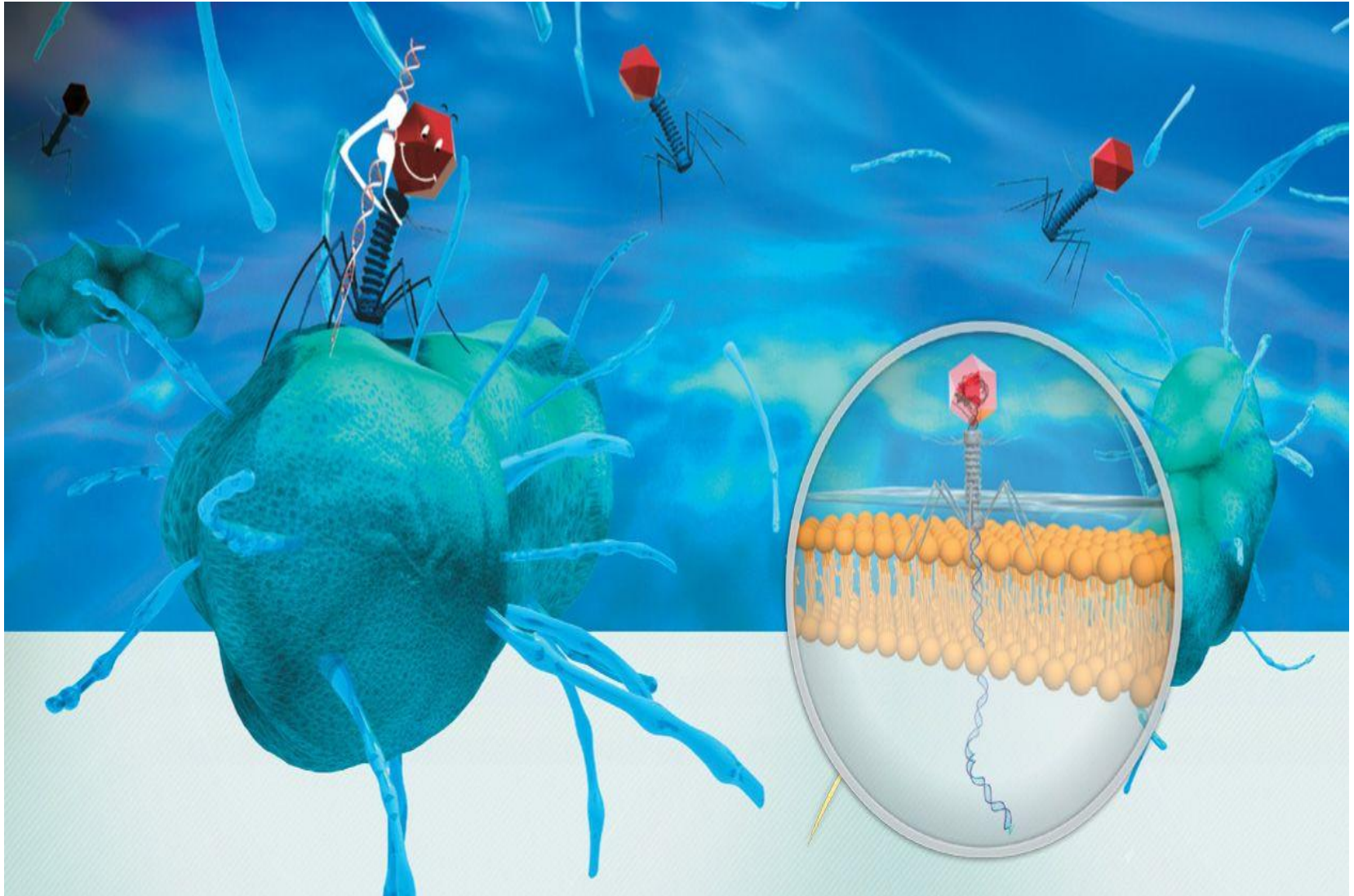


Бактериофаги.

Морфология, культивирование, титрование, применение.



Бактериофаги

(от лат.«phagos» - пожирающий)

**вирусы бактерий, которые вызывают
гибель соответствующих им видов
бактерий за счет внутриклеточного
размножения и разрушения
бактериальной клетки,
сопровождающегося выходом зрелых
фаговых частиц, способных к
заражению новых бактериальных
клеток**

История открытия бактериофага

В 1898 г. **Н.Ф. Гамалея** наблюдал спонтанный лизис сибиреязвенных бактерий.

В 1915 г. английский бактериолог **Ф. Туорт** описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий.

В 1917 г. французский ученый **Ф.Д. Эррель** подробно изучил взаимодействие фага и бактерий и сделал заключение, что открытый им литический агент является вирусом бактерий и назвал его «бактериофагом» — пожирателем бактерий.

Морфология бактериофагов

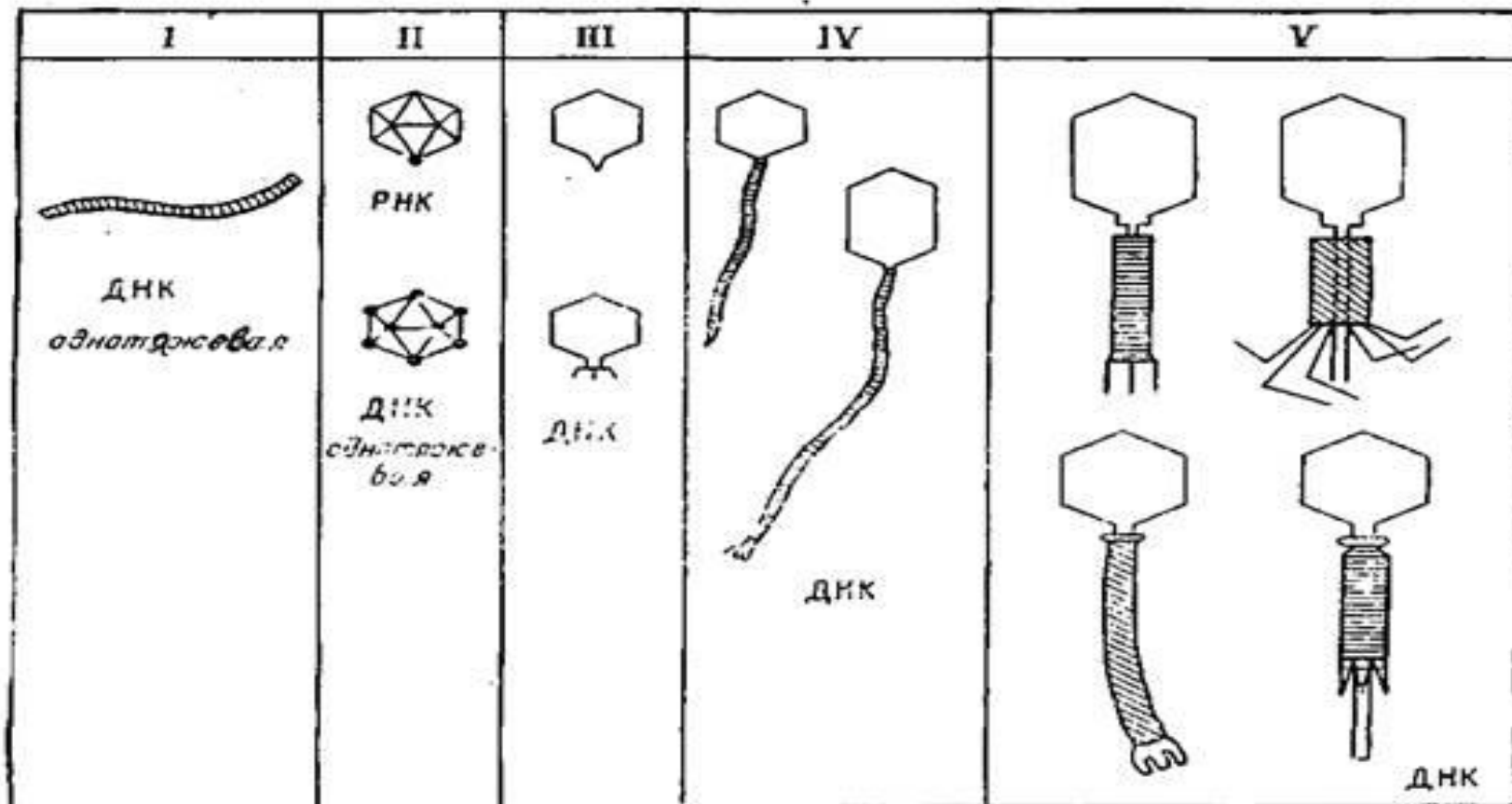
Фаги 1 типа – нитевидные фаги

Фаги 2 типа – представлены головкой и рудиментом хвоста

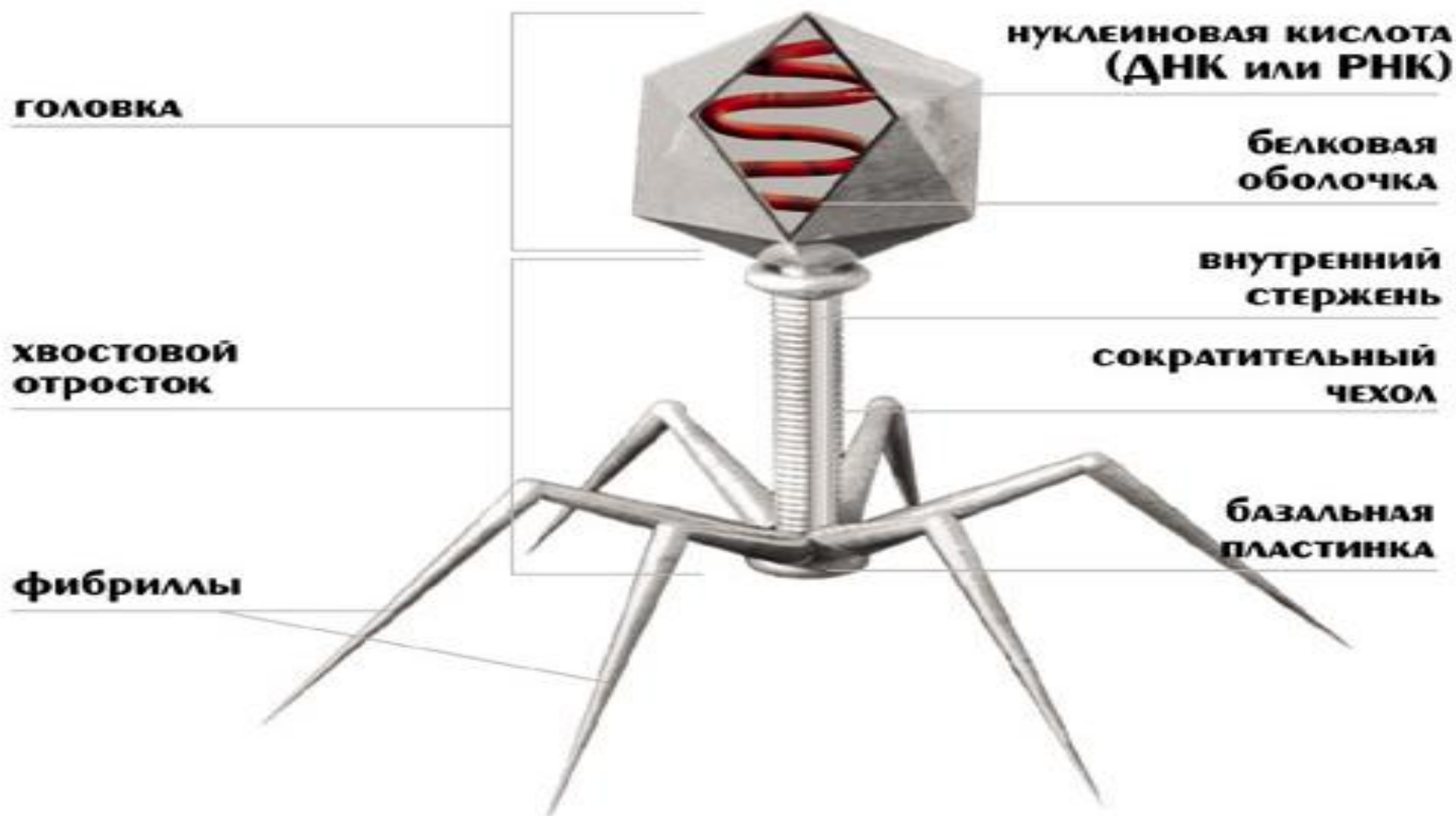
Фаги 3 типа – представлены головкой и коротким хвостом (Т-фаги 3 и Т-фаги 7)

Фаги 4 типа – фаги с несокращающимся хвостом (Т-фаги 1 и Т-фаги 5)

Фаги 5 типа – фаги с сокращающимся чехлом (Т-фаги 2 Т-фаги 4)



Строение Т-чётного фага



Свойства фагов как вирусов

- **неклеточная форма жизни**
- **содержат одну нуклеиновую кислоту – ДНК или РНК**
- **отсутствуют белоксинтезирующие системы и самостоятельный метаболизм**
- **облигатные внутриклеточные паразиты на генетическом уровне**

Химический состав фагов

- **Белки**
- **Нуклеиновые кислоты – ДНК или РНК**
- **Небольшое количество углеводов**
- **Нейтральные жиры**

Взаимодействие фагов с бактериями может протекать:

- **по продуктивному типу** – образуется фаговое потомство и бактерии лизируются
- **по абортивному типу** – фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность
- **по интегративному типу** – геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней

Виды бактериофагов

```
graph TD; A[Виды бактериофагов] --> B[вирулентные фаги]; A --> C[умеренные фаги]; B --> D[вызывают продуктивную инфекцию, при которой происходит репродукция фагов и лизис бактериальной клетки]; C --> E[встраиваются в генетический аппарат бактериальной клетки, не вызывая ее лизис (существуют в виде профага)];
```

вирулентные фаги

вызывают
продуктивную
инфекцию, при
которой
происходит
репродукция
фагов и лизис
бактериальной
клетки

умеренные фаги

встраиваются в
генетический
аппарат
бактериальной
клетки, не вызывая
ее лизис
(существуют в виде
профага)

Взаимодействие вирулентного бактериофага с бактериальной клеткой

- Адсорбция — с помощью нитей хвостового отростка.
- Проникновение в клетку.
- Репродукция белка и нуклеиновой кислоты внутри клетки.
- Сборка и формирование зрелых фагов.
- Лизис клетки, выход фага из нее.

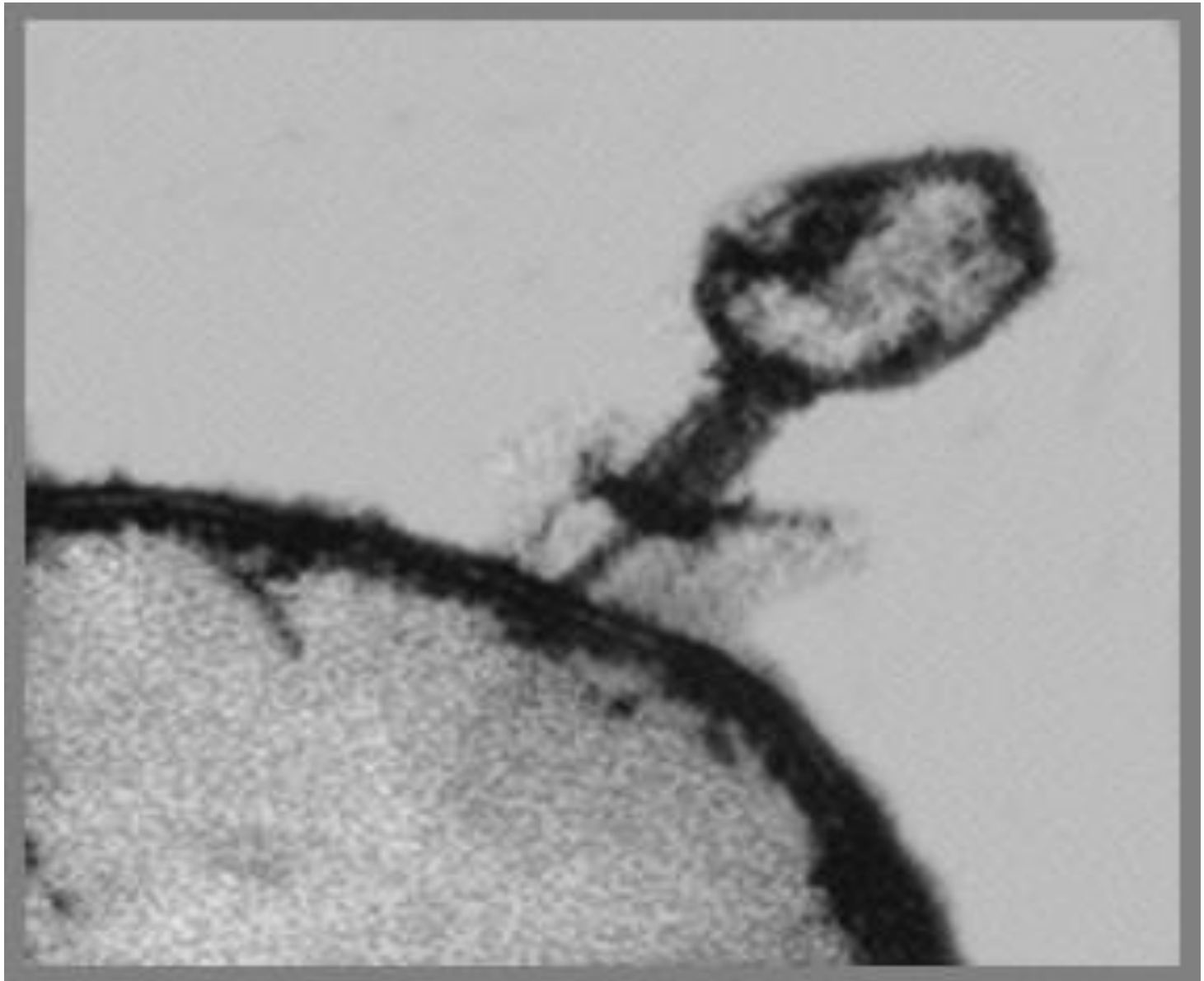
Взаимодействие умеренного бактериофага с бактериальной клеткой

- Адсорбция — с помощью нитей хвостового отростка.
- Проникновение в клетку.
- Образование профага (ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии и реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии).
- Лизис бактериальной клетки не происходит. Бактериофаг клетку не покидает.

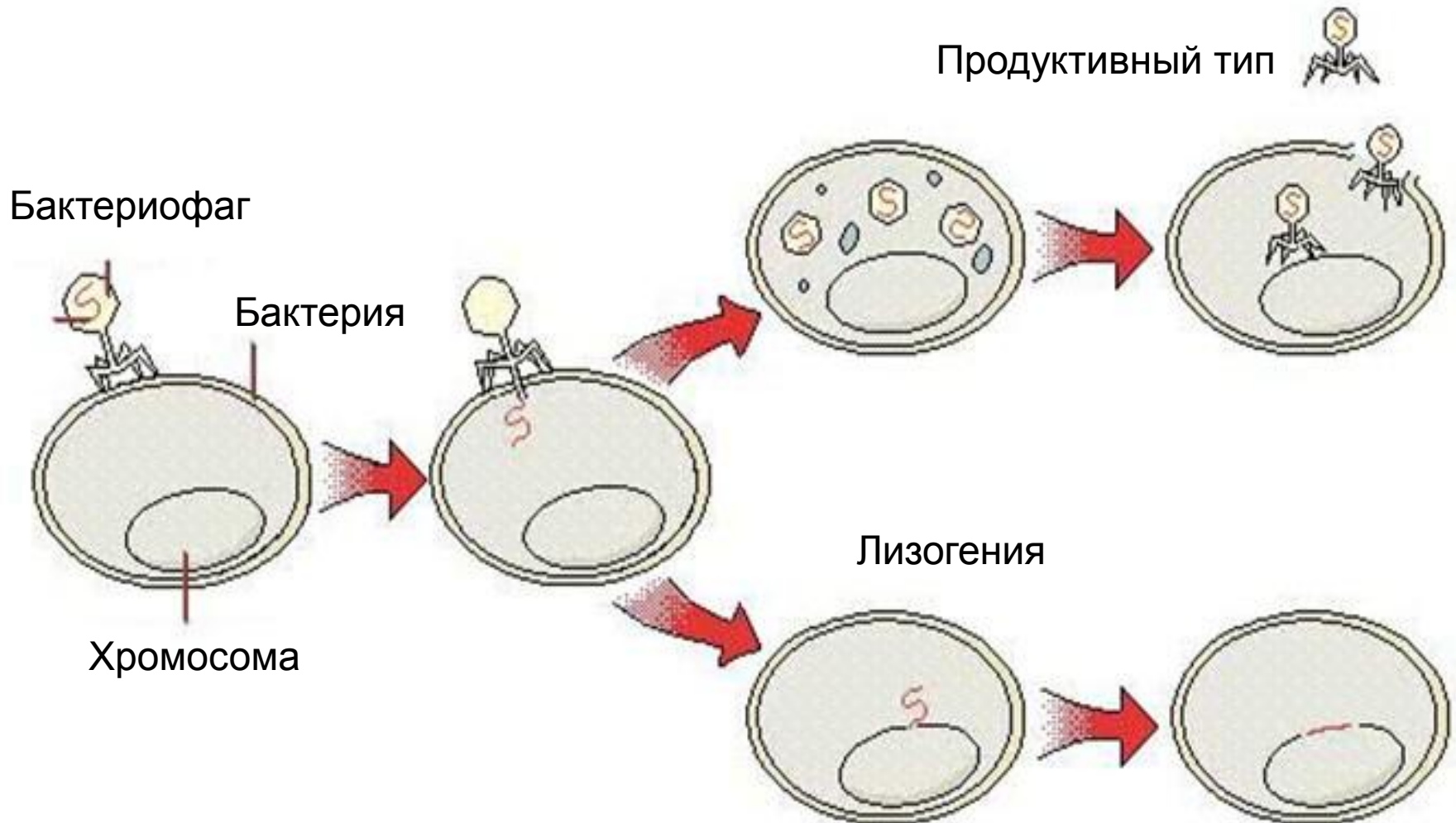
Адсорбция бактериофага



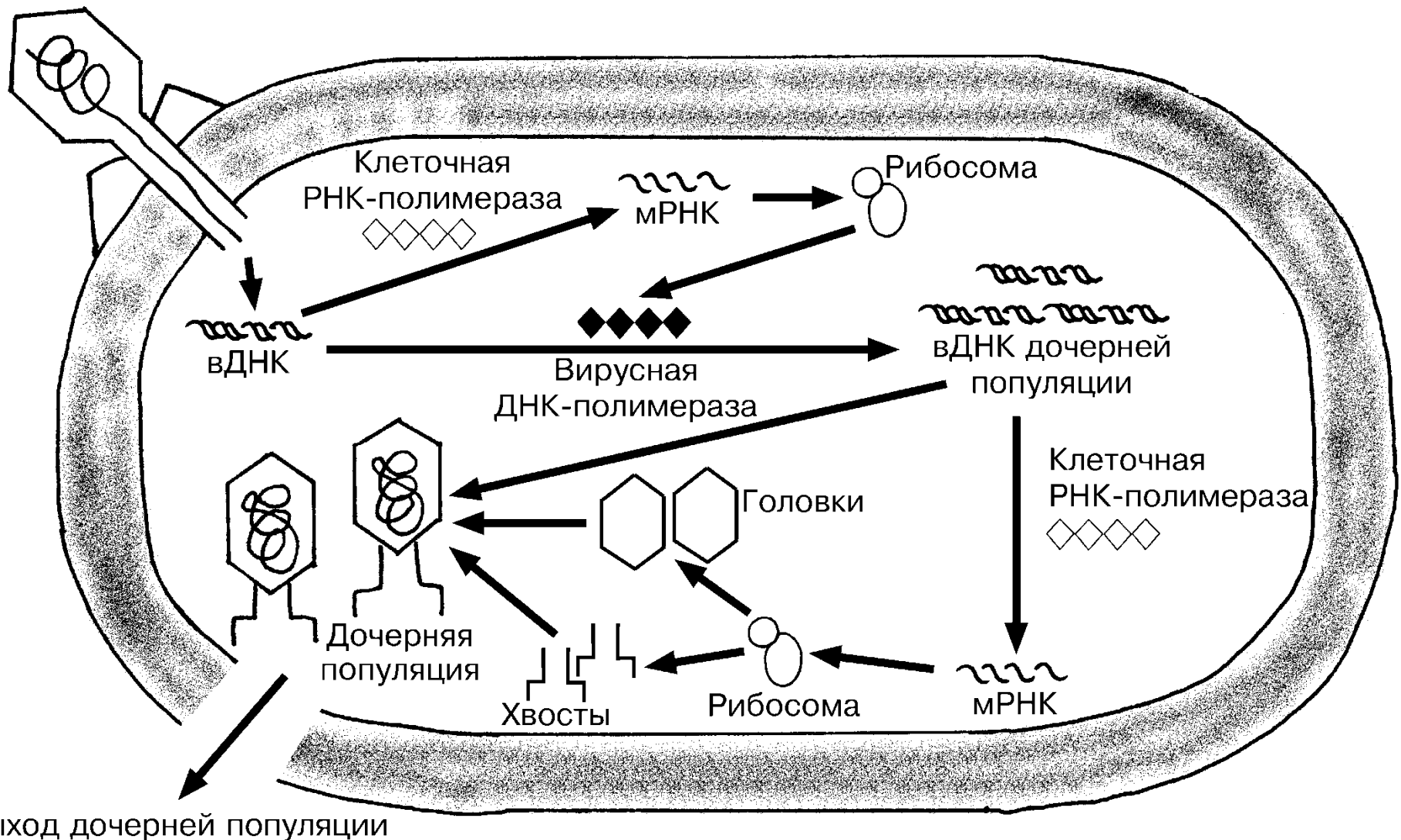
Внедрение бактериофага



Взаимодействие бактериофага с бактериальной клеткой



Взаимодействие вирулентного фага с бактериальной клеткой



Лизогения

**способности бактериальной культуры в
бесчисленном ряду поколений нести в
своем составе фаг в особой
неинфекционной форме, называемой
профагом.**

**Бактерии, в составе
которых есть профаг,
называются
ЛИЗОГЕННЫМИ**

Лизогенная (фаговая) конверсия -

**изменение свойств
микроорганизмов под
влиянием профага.**

**Изменение генотипа или фенотипа
бактерий в результате фаговой
конверсии приводит к изменению
культуральных, биохимических,
токсигенных, антигенных свойств,
чувствительности к антибиотикам**

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ФАГОВ

Применение вирулентных бактериофагов:

- **Фагопрофилактика** - способ предупреждения развития заболеваний в очагах инфекции посредством применения коммерческих препаратов бактериофагов (бактериальной дизентерии, холеры, сальмонеллеза и др.).
- **Фаготерапия** – метод лечения инфекционных заболеваний посредством применения коммерческих препаратов бактериофагов, к которым чувствительны возбудители.

- **Фагодиагностика** - метод идентификации выделенных культур микроорганизмов, основанный на способности диагностических фагов лизировать чувствительные бактерии.
- **Фагоиндикация** – способ выявления бактериального загрязнения, когда присутствие фага рассматривается как косвенный показатель загрязненности исследуемого материала.

Применение умеренных фагов:

- 1) на лизогенных бактериях изучают механизмы функционирования различных генов; с помощью трансдукции устанавливают локализацию генов на бактериальной хромосоме,
- 2) лизогенные бактерии используются при поисках противоопухолевых веществ: если препарат обладает индуцирующими свойствами, т.е. он взаимодействует с нуклеиновыми кислотами, и его можно испытывать как противоопухолевый препарат,
- 3) лизогенные штаммы используют при изучении различных мутагенных факторов (излучение),
- 4) умеренные фаги широко используются в генной инженерии. Модель "профаг - клетка" лежит в основе вирусогенетической гипотезы происхождения опухолей.

**Препараты бактериофагов с лечебной
и профилактической целью
выпускаются в виде:**

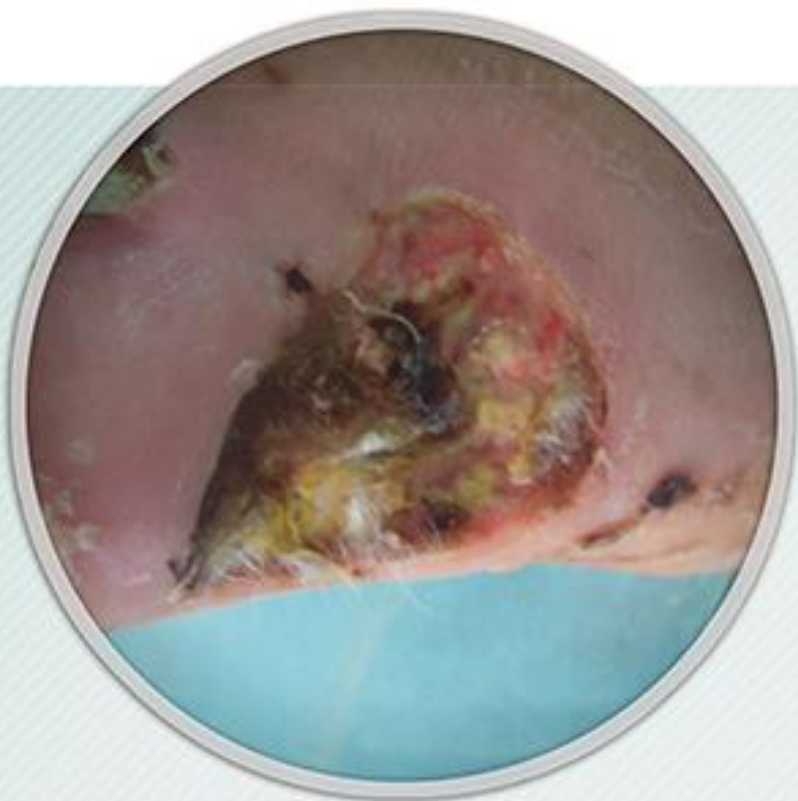
- **Таблеток**
 - **Мазей**
- **Аэрозолей**
 - **Свечей**
- **Суспензии**

МИКРОХГЕН



Преимущества

- **Высокая специфичность в отношении штаммов-хозяев**
- **Не токсичны**
- **Не угнетают нормальную микрофлору**
- **Не подавляют иммунную защиту**
- **Не вызывают аллергических реакций**
- **Могут применяться с антибиотиками и иммунопрепаратами**



Бакпосев для выявления
патогенного микроорганизма



Обработка раны
фаговым препаратом

Синдром диабетической стопы

Лечебно-профилактические бактериофаги по составу подразделяются:

- **Монокомпонентные** - лекарственные средства, содержащие вирулентные фаги против одного рода или вида бактерий
- **Комбинированные** – лекарственные средства, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов

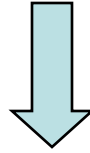
Лечебно-профилактические бактериофаги и их целевая направленность

Наименование препарата бактериофага	Специфическая направленность
Монокомпонентные	
Стафилококковый	Staphylococcus spp. (S. aureus)
Стрептококковый	Streptococcus spp. (в том числе, Enterococcus spp.)
Псевдомонас аеругиноза (синегнойный)	Pseudomonas aeruginosa
Коли	Escherichia coli
Протейный	Proteus mirabilis и P. vulgaris
Дизентерийный поливалентный	Shigella flexneri 1,2,3,4,6 сероваров; S.sonnei
Брюшнотифозный	Salmonella typhi
Сальмонеллезный гр. АВСДЕ	S. typhimurium, S. paratyphi A, S.paratyphi B, S. heidelberg, S. newport, S. choleraesuis, S. oranienburg, S.infantis.
Клебсиелл пневмонии	Klebsiella pneumoniae

Комбинированные

Коли-протейный	<i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>
Клебсиеллезный поливалентный	<i>K. pneumoniae</i>, <i>K. ozaenae</i>, <i>K. rhinoscleromatis</i>
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i>
Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. vulgaris</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>E. coli</i>
Пиобактериофаг комплексный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>
Интести	<i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, <i>S. sonnei</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>S. paratyphi</i> A, <i>S. paratyphi</i> B, <i>S. heidelberg</i>, <i>S. newport</i>, <i>S. choleraesuis</i>, <i>S. oranienburg</i>, <i>S. infantis</i>, <i>S. dublin</i>, <i>S. enteritidis</i>, <i>S. anatum</i>, <i>S. newlands</i>, <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>, <i>E. coli</i>, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>

Фагодиагностика



Фаготипирование

**Фаготипы (фаговары) -
представители одного вида бактерий,
отличающиеся по чувствительности к
бактериофагам**



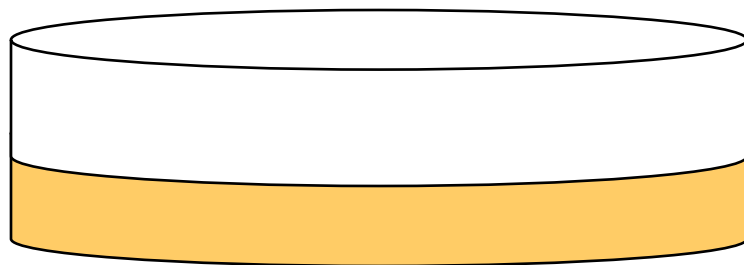
НИИЭМ им.Н.Ф. Гамалеи РАМН
(Филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН)
Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18
тел. (499)193-30-50, (499)190-44-59 факс (499)190-66-71

**БАКТЕРИОФАГИ СТАФИЛОКОККОВЫЕ ТИПОВЫЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ, СУХИЕ –
АНГЛИЯ (МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАБОР)**

№№ 29, 52, 52А, 79, 80, 3А, 3С, 55, 71, 6, 42Е, 47, 53, 54, 75, 77,
83А, 84, 85, 94, 96, 81, 95

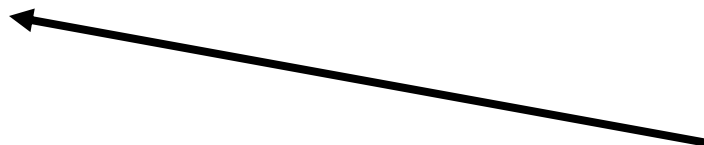
Фаготипирование *S.aureus*

Посев газоном

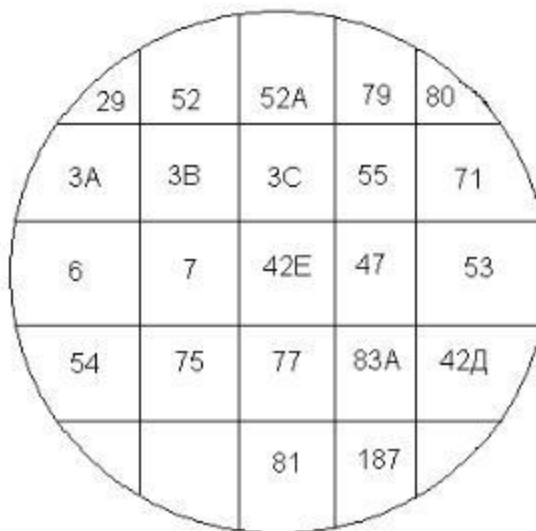


Питательный агар

0,1 мл



культура *S.aureus*
в МПБ



Дно засеянной чашки расчерчивают маркером на 23 квадрата (по числу типовых бактериофагов)

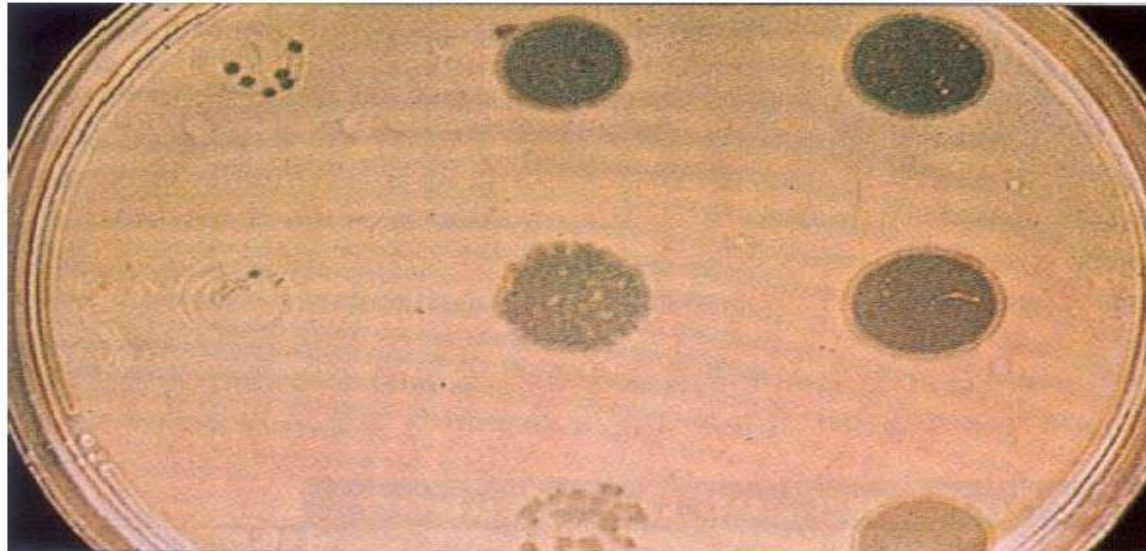
Фагогруппы *S. aureus*

Фагогруппы	Номера бактериофагов
I	29, 52, 52A, 79, 80
II	3A, 3C, 55, 71
III	6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85
V	94, 96
Вне групп	81, 95

Негативные колонии бактериофага

прозрачные пятна на питательной
среде

**ФАГОТИПИРОВАНИЕ
СТАФИЛОКОККОВ**

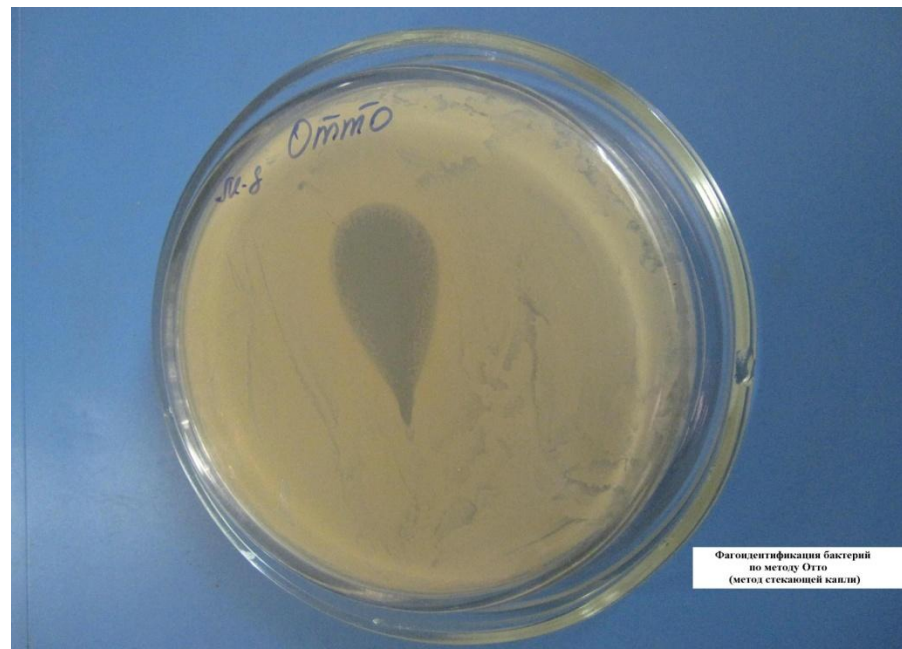


- **Одна и та же культура может лизироваться разными фагами, из чего складывается профиль фагочувствительности (фагомозаика) штаммов. Так как число подобных спектров велико и на практике их трудно учитывать, фаги объединены в группы. Каждый штамм относится к одной из фагогрупп и соответствующему фаготипу; предпочтение отдают фагам с наибольшей литической активностью. Совпадение фагомозаики у штаммов, изолированных от разных больных, говорит об общем источнике инфекции.**

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 день	Рост стафилококка на МПБ	<p>1) Произвести посев 0,1 мл культуры бактерий на питательный агар методом газона.</p> <p>2) Нанести пипеткой на размеченные квадраты соответствующие бактериофаги.</p> <p>3) Инкубировать при T=30°C 18-20 часов.</p>	
2 день	Выращенные посевы (фаготипирование)	<p>Определить образование негативных колоний.</p> <p>Определить фаговар и фагогруппу S.aureus.</p>	 <p>Закключение: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ОТТО (МЕТОД СТЕКАЮЩЕЙ КАПЛИ)

- На чашку с МПА шпателем выполняется посев суточной бульонной культуры бактерий
- Затем наносят каплю известного бактериофага и, наклонив чашку, дают капле несколько растечься по поверхности питательной среды
- Через сутки наблюдают полную задержку роста в месте внесения диагностического фага

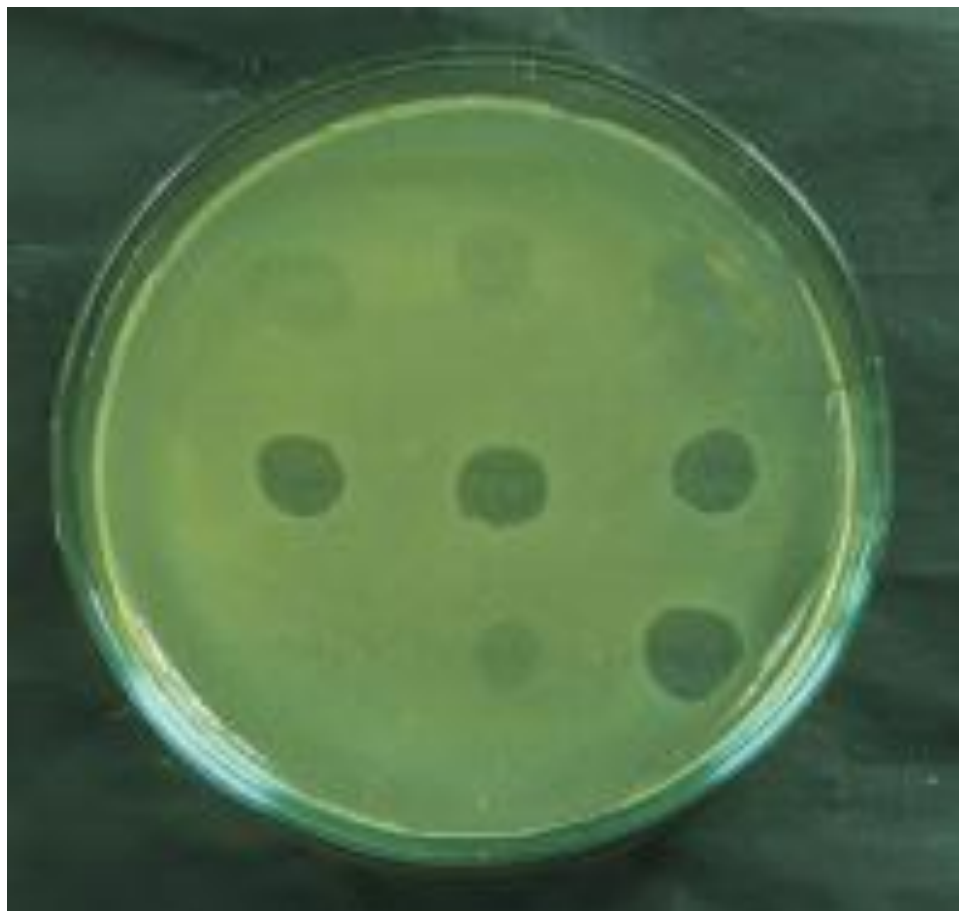


Фагоидентификация бактерий
по методу Отто
(метод стекающей капли)

Определения чувствительности микроорганизмов к дизентерийному бактериофагу

Дата, день	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 день	Чистая культура <i>S. flexneri</i>	1. Приготовить взвесь культуры в физиологическом растворе. 2. Произвести посев методом газона. 3. Нанести на чашку каплю поливалентного дизентерийного бактериофага пипеткой. 4. Посевы поместить в термостат и инкубировать при 37°C 18-24 часа.	
2 день	Выращенные посевы	Изучение посева и учет результатов.	

Лизис культуры бактерий бактериофагом



Лечебно-профилактические бактериофаги

**Представляют собой стерильные
очищенные фильтраты фаголизатов
соответствующих видов бактерий,
освобожденные от эндо- и
экзотоксинов, продуктов фаголизиса
бактериальных клеток, антигенных
комплексов и белковых компонентов
питательной среды**

**Лечебно-профилактические бактериофаги –
содержат только вирулентные фаги !!!!**

**Главным условием клинической
эффективности при назначении
бактериофагов является
фагочувствительность
бактерий-возбудителей**

Производство бактериофагов

- 1. Выделение чистых культур штаммов бактерий.**
- 2. Выделение вирулентных бактериофагов (маточных).**

Питательные среды

- Не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека.
- Должны обладать хорошими ростовыми качествами
- Должны быть стерильными

Рекомендуемые питательные среды:

- МПБ –мясопептонный бульон
- МПА – мясопептонный агар (1,5-2%)
- Бульон или агар Хоттингера (1,5-2%) с необходимыми добавками в зависимости от специфических потребностей бактерий-мишеней фаговых препаратов

Производственные штаммы бактерий-продуцетов бактериофагов

- **Получают от больных гнойно-септическими или кишечными инфекциями**
- **Коллекция штаммов должна ежегодно обновляться**
- **Штаммы бактерий должны обладать типичными свойствами, не продуцировать энтеротоксины и не содержать умеренных бактериофагов в своем геноме**
- **Штаммы бактерий должны лизироваться маточными фагами в исследовании по методу Аппельмана**

Производственные штаммы бактерий хранят в специализированных помещениях в лиофилизированном состоянии в ампулах при температуре 2 – 8 С в течение 10 лет и в пробирках с 0,4- 0,7 % агаризованной питательной средой (на основе гидролизата Хоттингера или МПБ) под стерильным вазелиновым маслом при температуре 2- 8 С не более 1 года при регулярном пересеве каждые 2-3 месяца.

Контрольные штаммы бактерий

- Используются при определении специфической активности готовых препаратов бактериофагов.
- Их отбирают в качестве контрольных из коллекции производственных штаммов бактерий.
- Они не должны использоваться при производстве данной серии препарата.

Подготовка вирулентных (маточных) бактериофагов

- **Используют только вирулентные бактериофаги.**
- **Должны иметь широкий диапазон действия к штаммам бактерий.**
- **Должны обладать высокой активностью, стабильностью лизиса.**
- **Должны обладать высокой урожайностью.**
- **Выделяют из природных источников – клинического материала, сточных вод, почвы.**
- **Подбирают высоко активные штаммы фагов к слаболизирующимся и фагорезистентным штаммам бактерий.**

Контроль маточных бактериофагов

- Определение **содержание** фаговых частиц в 1 мл методом агаровых слоев **по Грациа**
- Определение **специфической активности** путем титрования в жидкой питательной среде **по методу Аппельмана**
- Определение **стабильности лизиса** (сохранность полученных результатов лизиса) **по методу Аппельмана**
- Контроль стерильности

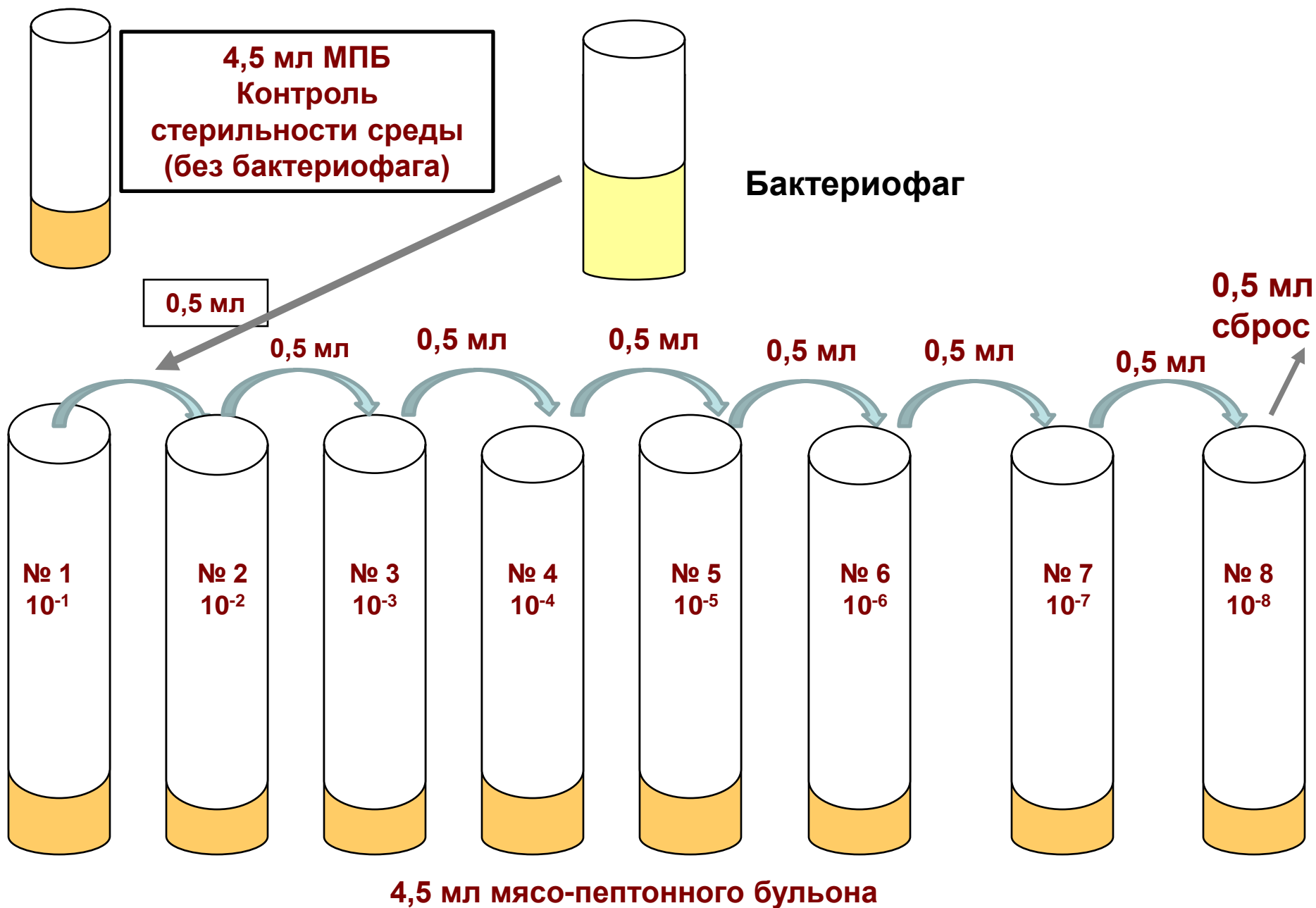
Специфические методы исследования лечебно-профилактических бактериофагов

- **Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу **Аппельмана****
- **Определение фаговых частиц в 1 мл по методу **Грация** (на плотных питательных средах двухслойным методом)**

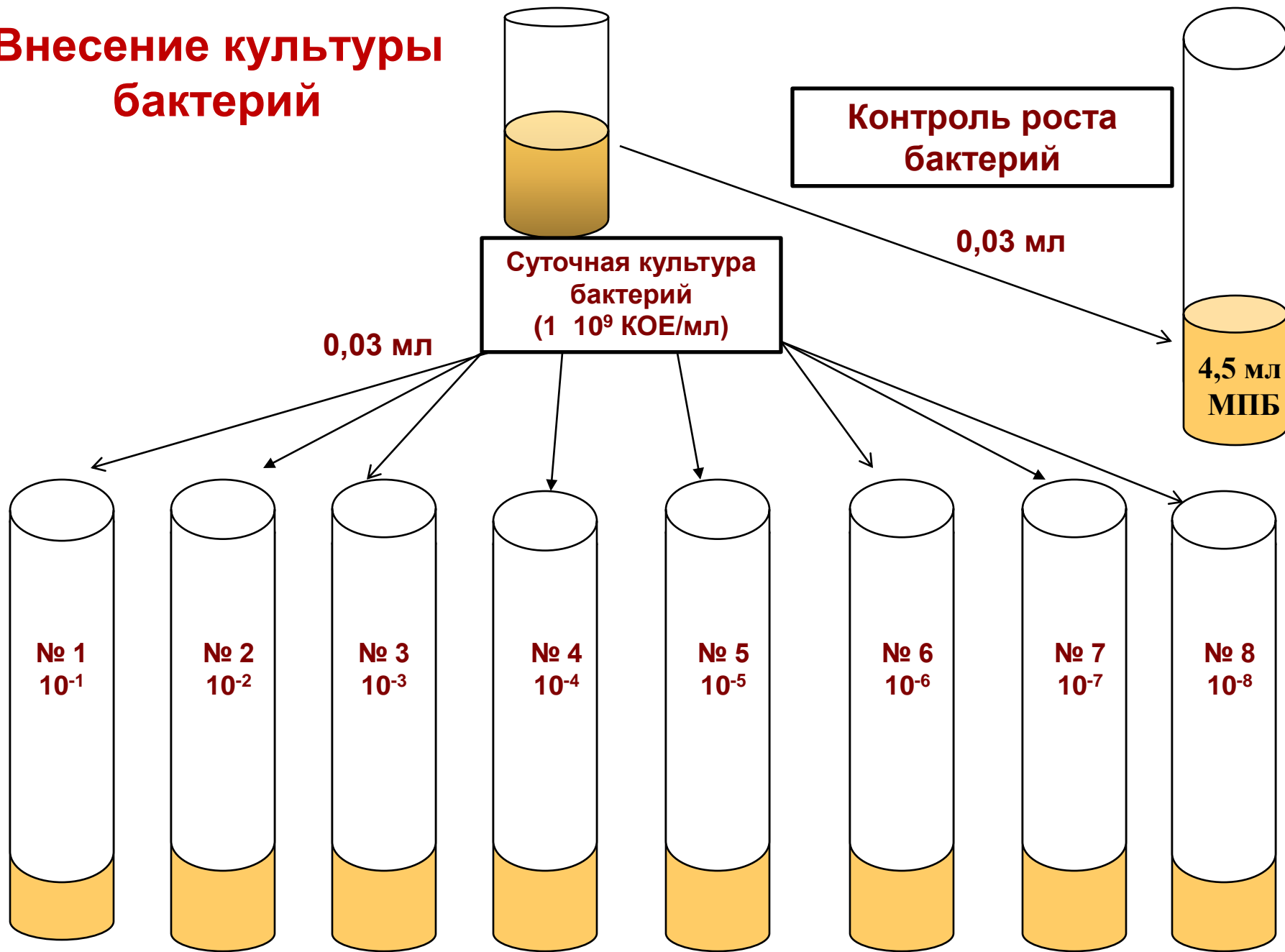
Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу **Аппельмана**

- Используют гомологичные тест-штаммы бактерий (контрольные штаммы).
- Контрольные штаммы отбирают из коллекции производственных штаммов бактерий.

Приготовление серийных разведений бактериофага



Внесение культуры бактерий



10-кратные разведения бактериофага

Учет

Контроль роста
бактерий

Контроль
(МПБ без бактериофага)

№ 1
 10^{-1}

№ 2
 10^{-2}

№ 3
 10^{-3}

№ 4
 10^{-4}

№ 5
 10^{-5}

№ 6
 10^{-6}

№ 7
 10^{-7}

№ 8
 10^{-8}

Роста микроорганизмов нет

Рост микроорганизмов

Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу Аппельмана

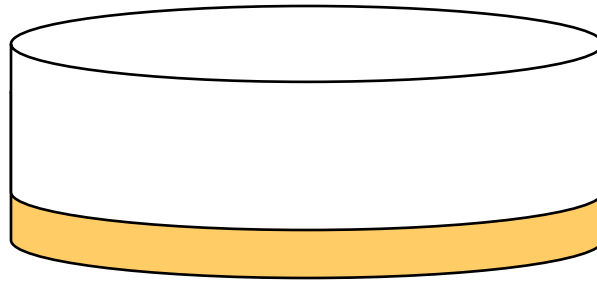
Дата, день	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 Д Е Н ь	Бактериофаг стафилококковый	1.Приготовить 10-кратные разведения бактериофага в МПБ. 2.Внести суточную агаровую культуру S.aureus. 3. Для определения активности бактериофага инкубировать в термостате T=37°C 18 часов. 4. Для определения стабильности лизиса бактериофага инкубировать в термостате T=37°C 2 суток.	

Дата, день	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
2 день	Титрование по Аппельману	<ol style="list-style-type: none">1. Определить специфическую активность стафилококкового бактериофага (титр).2. Определить стабильность лизиса культуры <i>S.aureus</i> стафилококковым бактериофагом.	Результат внести в таблицу

Определение фаговых частиц в 1 мл по методу Грациа

**проводится на плотных
питательных средах
двухслойным методом**

Подготовка питательной среды

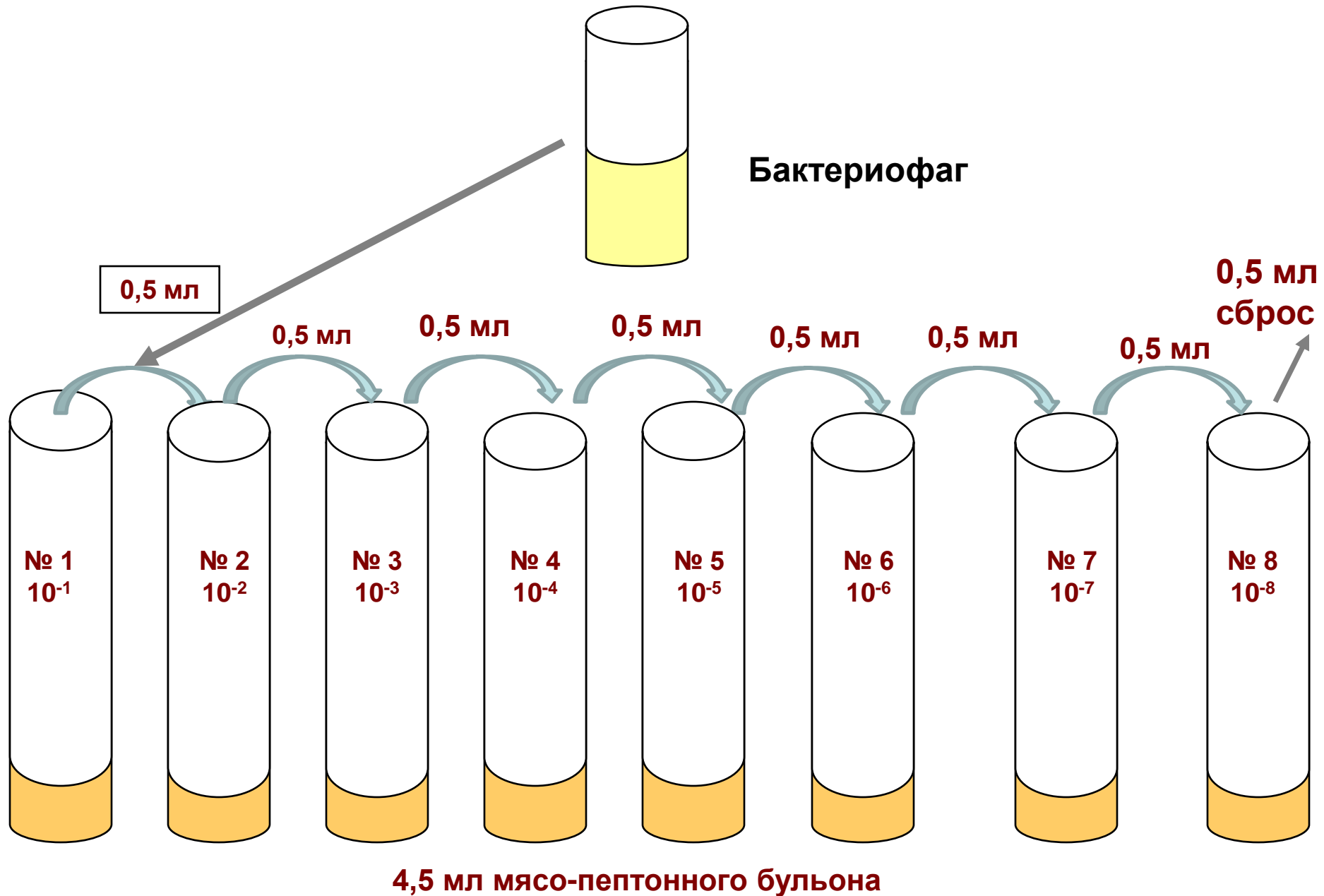


1 слой

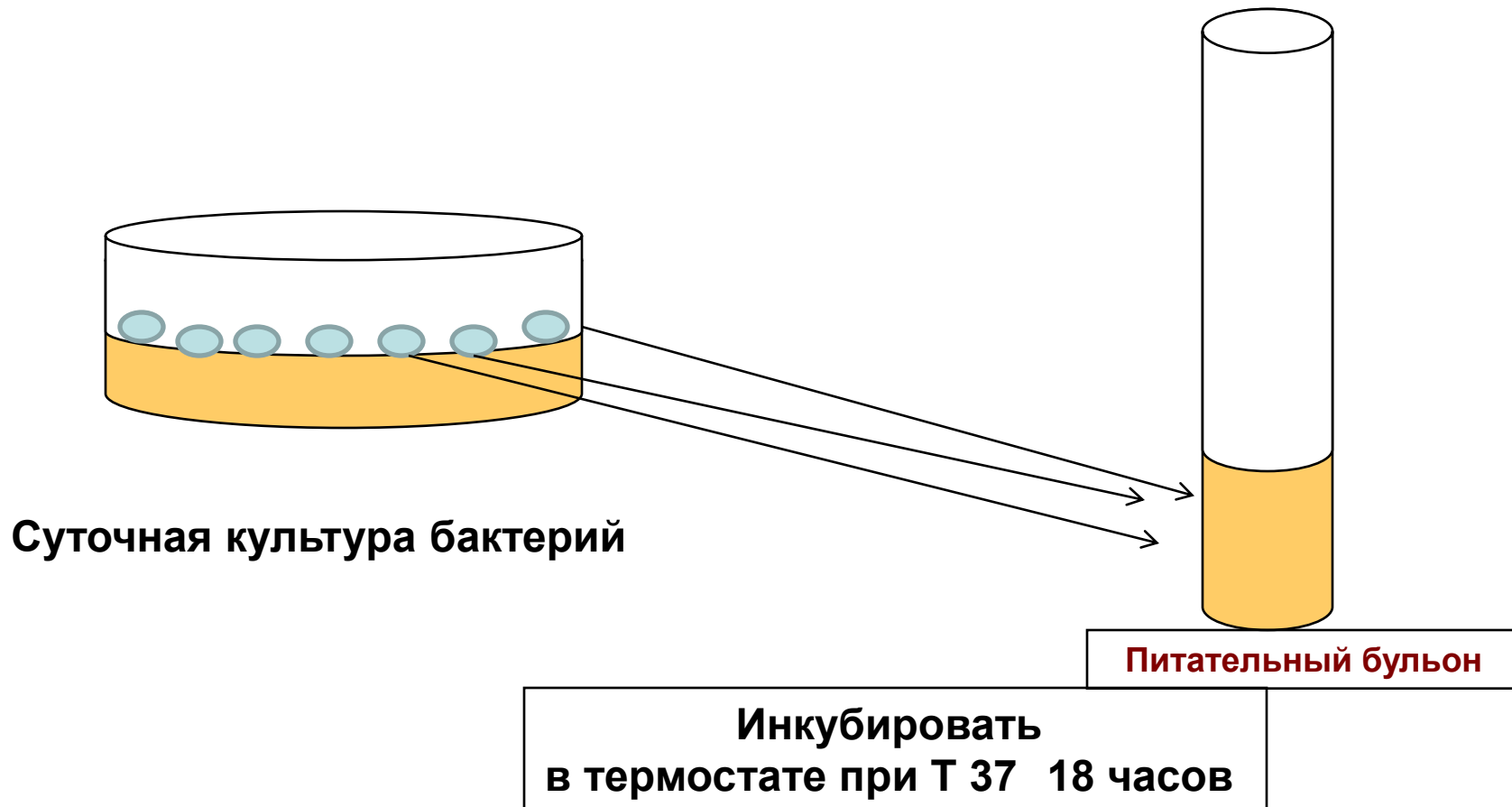
1,5% МПА 20 мл

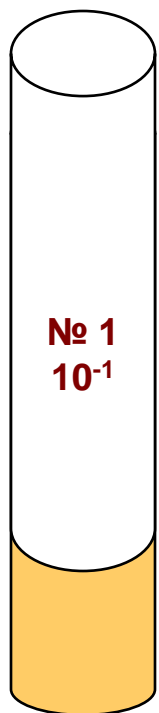
Перед использованием чашки с агаром подсушивают в перевернутом виде с прикрытой крышкой при температуре 37 С в течение 30-60 мин

Приготовление серийных разведений бактериофага



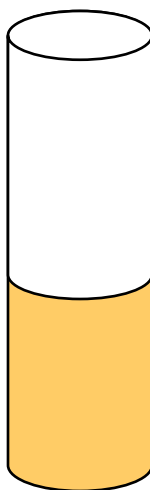
Подготовка культуры бактерий





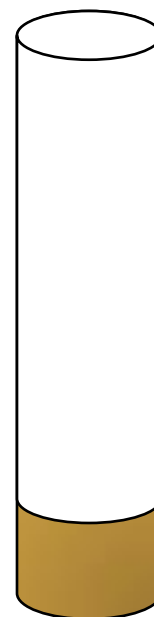
№ 1
 10^{-1}

1 мл



5 мл

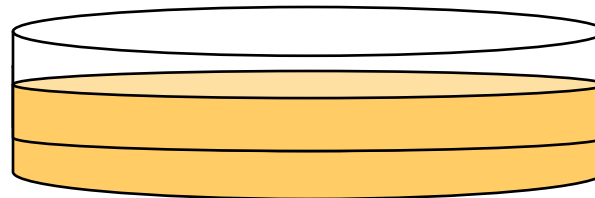
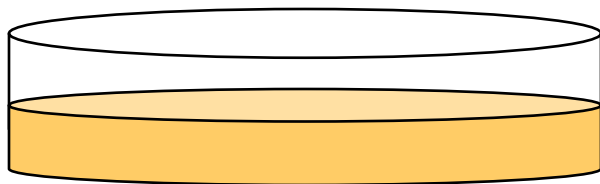
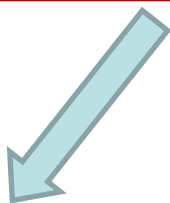
0,2 0,05 мл



18-часовая
бульонная
культура
бактерий

расплавленный и остуженный
до 45 °С 0,7% МПА

Содержимое пробирки быстро
перемешать вращением пробирки между
ладонями и вылить в чашку вторым слоем



бактериофаг

Подсчет фаговых частиц

$$N = n \cdot D$$

N- количество фаговых частиц в 1 мл исследуемого материала

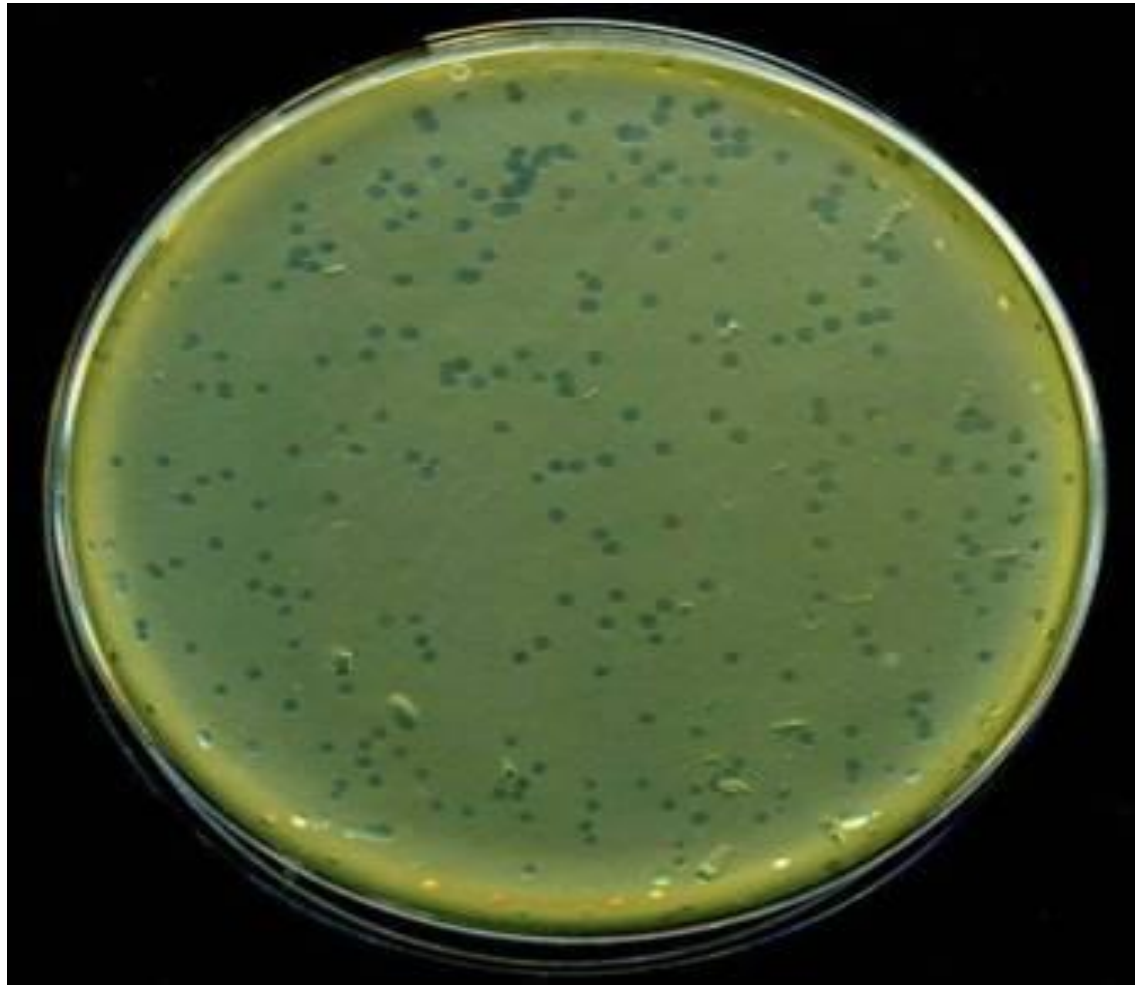
n- количество негативных колоний в чашке

D- степень разведения фага в чашке





Протокол. Определение фаговых частиц по методу Грация

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 день	Бактериофаг стафилококковый	<ol style="list-style-type: none">1. Приготовить десятикратные последовательные разведения бактериофага.2. Смешать 1 мл фага из пробирок с разведениями с расплавленным и остуженным до $T=45^{\circ}\text{C}$ 0,7 % МПА.3. Внести 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры <i>S. aureus</i>.4. Содержимое пробирок перемешать и вылить вторым слоем на поверхность 1,5% МПА в чашках Петри.5. Чашки инкубировать при $T=37^{\circ}\text{C}$ в течение 18 часов.	
2 день	Выращенные посеvy	<ol style="list-style-type: none">1. Подсчитать количество негативных колоний.2. Используя формулу $N = n \cdot D$, определить количество фаговых частиц в 1 мл фага, выразив в КОЕ/мл.3. Результат внести в таблицу.	Титр=

Негативные колонии бактериофага в плотной среде



Инновационные направления применения бактериофагов

<p>1.Бактериофаг-опосредованный биоконтроль</p> 	<p>Обработка сельскохозяйственных растений и животных на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты до сбора урожая; мясной и молочный скот, домашняя птица до забоя)</p>
<p>2.Фаговый биопроцессинг</p> 	<p>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</p>
<p>3.Фагопрофилактика</p> 	<p>Снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек кишечных и нозокомиальных инфекций путем перорального профилактического приема бактериофагов</p>
<p>4.Фагокосмецевтика</p> 	<p>Альтернатива бактериостатическим косметическим и гигиеническим средствам</p>
<p>5.Фаг-опосредованная биодезинфекция</p> 	<p>Дезинфекция помещений и инструментария лечебно-профилактических учреждений и пищевых производств средствами на основе бактериофагов</p>
<p>6.Фагоидентификация</p> 	<p>Индикация и идентификация потенциально опасных микроорганизмов с помощью фаговых диагностикумов</p>