

ФАГИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA – КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПОДХОД В АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ

Нозокомиальные инфекции являются одной из основных проблем современного здравоохранения в силу своего повсеместного распространения. Обострение проблемы нозокомиальных инфекций обусловлено глобальным распространением антибиотикоустойчивости среди микроорганизмов. Альтернативной стратегией борьбы с бактериальными инфекциями в условиях антибиотикорезистентности может стать применение литических бактериофагов.

Целью данной статьи был обзор исследований, направленных на разработку и испытания фаговых препаратов, предназначенных для борьбы с одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка).

Ключевые слова: бактериофаги, *Pseudomonas aeruginosa*, нозокомиальные инфекции, антибиотикоустойчивость

Синегнойная палочка - причина развития антибиотикоустойчивых нозокомиальных инфекций.

Бактерии рода *Pseudomonas* - большая гетерогенная группа микроорганизмов, способных приспосабливаться к различным физико-химическим условиям среды. В основе такого разнообразия лежит биохимическая способность усваивать в качестве основного источника углерода и азота разнообразные природные и синтетические соединения, включая большую группу токсичных веществ, таких как нафталин, толуол, фенол и т.д. Промежуточные соединения подобной деградации являются превосходными антибиотическими соединениями, дающими преимущество при освоении новых экотопов. Эти свойства данной группы микроорганизмов сочетают положительные и отрицательные стороны практического применения в народном хозяйстве. С одной стороны, они широко применяются при борьбе с химическими загрязнениями, производстве микробных препаратов, нефтедобыче, а с другой являются бичом медицинских учреждений, которые используют большое разнообразие химических соединений. Бактерии рода *Pseudomonas* способны быстро расщеплять подобные соединения, что приводит к их активному росту и, как следствие, развитию нозокомиальных инфекций у пациентов с иммунодепрессивным состоянием [1,2].

Согласно текущему изданию Справочника Берджи по бактериологической систематике в роде идентифицированы 7 основных представителей, а именно в *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas pertucinogena*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* и *Pseudomonas syringae*. Хорошо изученными видами являются: *Pseudomonas syringae*, один из фитопатогенов, поражающих различные виды растений, возбудитель инфекционных заболеваний насекомых - *Pseudomonas entomophila*, является смертельным патогеном для *Drosophila melanogaster*. Типовым представителем данного рода является *Pseudomonas aeruginosa* - оппортунистический патоген человека.

Pseudomonas aeruginosa представляет собой грамотрицательную и широко распространённую в различных средах бактерию. Её можно обнаружить в воде и почве, она является возбудителем инфекционных заболеваний животных и растений [3, 4]. Будучи основным патогеном человека, *P. aeruginosa* способна вызвать широкий спектр опасных для жизни и здоровья острых и хронических инфекций, особенно у людей с нарушенной иммунной защитой, стать причиной развития внутрибольничных заболеваний среди госпитализированных пациентов и медицинского персонала. При этом борьбу с данным патогеном осложняет развитие у него устойчивости к широкому сектору антибиотических препаратов [5].

Данный возбудитель обладает эффективными механизмами адаптации к негативным воздействиям такими как «чувство кворума» (QS), подвижность, способность к образованию биопленок. Проводимые когортные исследования показали, что основной причиной развития нозокомиальных инфекций в европейских отделениях интенсивной терапии является синегнойная палочка, так же по последним оценкам в США ежегодно регистрируется до 51 тысячи случаев внутрибольничных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* [6]. Согласно сообщению Международного комитета по контролю и надзору за нозокомиальными инфекциями, *P. aeruginosa* вызываемые ей инфекции стали одной из основных проблем мирового здравоохранения с 2016 года [7].

Резистентность *P. aeruginosa* ко многим противомикробным агентам, основана на взаимодействии нескольких основных механизмов. Один из главных - это низкая проницаемость наружных мембран по сравнению с другими грамотрицательными видами, что препятствует переносу многих антибиотиков внутрь клетки [8]. Помимо этого, *P. aeruginosa* обладает несколькими видами молекулярных насосов для выведения молекул, включая MexAB-OprM [9], который позволяет быстро исключить из метаболизма бактериальной клетки множество разнообразных соединений, в том числе некоторые антибиотики.

На генетическом уровне устойчивость к антибиотикам у *P. aeruginosa* определяется наличием генов β -лактамаз обладающих широким спектром изменчивости. Разнообразие данного гена, по данным Bush K. & Jacoby G.A., достигло 17 групп [10]. Подобная комбинация механизмов мутационного и приобретенного сопротивления приводит к резистентности почти ко всем противомикробным агентам. Сообщалось о штаммах, которые устойчивы практически ко всем классам обычно используемых антибиотиков, включая аминогликозиды, фторхинолоны, и β -лактамы антибиотики [11,12]. Особую озабоченность представляют штаммы генотипа А с локусом ST 235, широко распространенным на территории России, Венгрии, Сербии, Польше, Испании, Норвегии, Бразилии, Китае, Сингапуре, Нигерии и Казахстане [13].

На современном этапе развития науки, в направлении поиска и разработки новых химических антибактериальных препаратов, наблюдается снижение активности, при этом уже существующие антибиотики продолжают постепенно терять свою эффективность. Сохранение такой тенденции, в конечном итоге, приведёт к исчерпанию средств для борьбы с устойчивыми микроорганизмами [14].

На Генеральной Ассамблее ООН 21 сентября 2016 года при рассмотрении альтернативных стратегий профилактики и борьбы с бактериальными инфекциями было предложено пересмотреть отношение к практике фаговой терапии. Сторонники фаговой терапии указывают несколько основных преимуществ, которые бактериофаги имеют в отношении антибиотиков, таких как специфичность по отношению к хозяину, самоамплификация, деградация биопленки и низкая токсичность для людей [15, 16, 17, 18]. Поэтому использование литических бактериофагов для борьбы с инфекциями, вызванными антибиотикоустойчивыми штаммами *P. aeruginosa* является актуальным и естественным направлением развития современной фаготерапии.

Разнообразие бактериофагов, поражающих *P. aeruginosa*

На сегодняшний день обнаружено, что 94,2% из 137 известных фагов, поражающих род *Pseudomonas*, принадлежат к отряду Caudovirales, который включает три семейства двуцепочечных ДНК (dsDNA) фагов, отличающихся характеристиками хвостового отростка фага: Podoviridae, с коротким и несокращающимся отростком; Myoviridae, с длинным и сокращающимся хвостом и Siphoviridae с длинным и несокращающимся хвостом [19 - 21]. До сих пор были выделены только 8 фагов *Pseudomonas* без хвостовых отростков: 2, принадлежащие к семейству Inoviridae (одноцепочечные ДНК [ssDNA] фаги) [22], 2, принадлежащие к семейству Leviviridae (ssRNA-фаги) [23], и 4, принадлежащих к семейству Cystoviridae (dsRNA-фаги) [24, 25].

Согласно собранным данным по всему миру, 85% засеквенированных фагов *Pseudomonas*, принадлежащих к отряду Caudovirales, являются специфичными для вида *P. aeruginosa* и явное большинство (приблизительно 60%) из них представляют собой литические фаги, тогда как 21,8% являются умеренными, а 18,2% не классифицированы. Среди лизирующих фагов *P. aeruginosa*, 41% принадлежат к семейству Myoviridae, а 38% к семейству Podoviridae, а наименее представительная группа -

сифовирусы(20%). Только 1% от количества литических фагов *P. aeruginosa* остаются неклассифицированными. Размеры геномов литических фагов *P. aeruginosa* различных семейств довольно расходятся, так фаги семейства *Myoviridae*, обладают размером генома от 64,1 кб до 309,2 кб, тогда как геномы *Podoviridae* и *Siphoviridae* фагов намного меньше и находятся в диапазоне от 41,6 до 74,9 кб и 34,5 до 11,1 кб соответственно.

Литические фаги *P. aeruginosa* выделяются из различных источников по всему миру (рисунки 1), но наиболее вероятные места их обнаружения - это сточные воды, включая сточные воды больницы и места их очистки, откуда было выделено около 56% всех известных на сегодняшний день литических фагов *P. aeruginosa* [26].

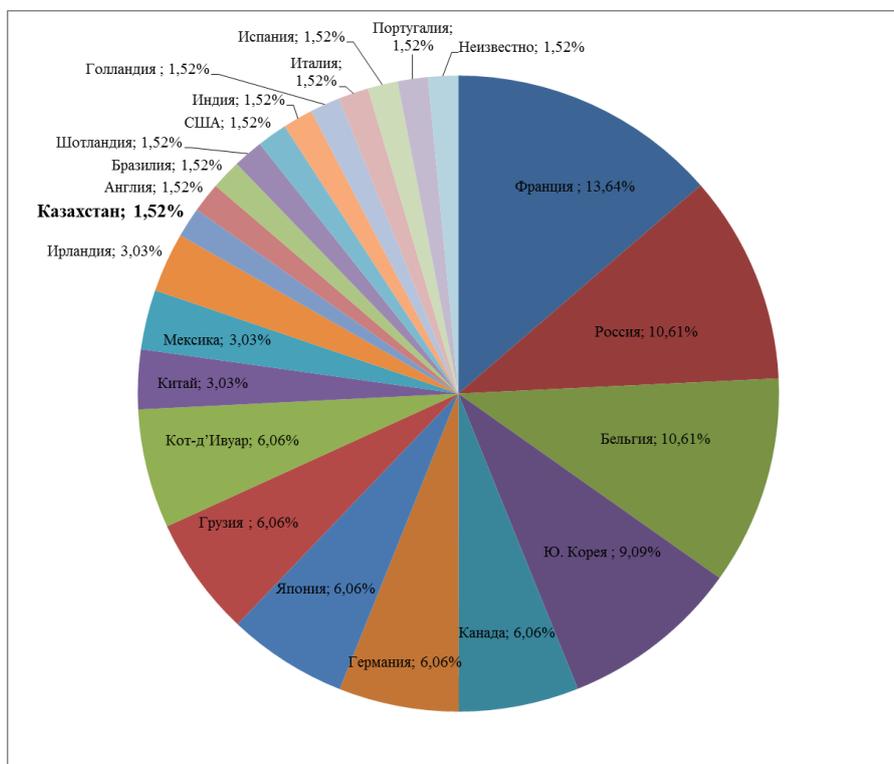


Рисунок 1- Распределение изолятов литических фагов *P. aeruginosa* по странам

Влияние бактериофагов на активность роста *P. aeruginosa* in vitro

В последние годы было проведено много исследований *in vitro* для оценки потенциала фагов против клинических изолятов *P. aeruginosa*, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (MDR), в планктонных культурах или в биопленках.

Fu с соавторами изучали влияние литических фагов на образование биопленок *P. aeruginosa* в катетерах, покрытых гидрогелем. Для этого они предварительно обрабатывали катетеры фагом M4 семейства *Myoviridae* в течение 2 часов до бактериальной инокуляции, через 24 часа после формирования биопленок, наблюдали уменьшение количества жизнеспособных клеток на 2,8 lg по сравнению с контролем (необработанными катетерами). Но в промежутке между 24 и 48 часами было зафиксировано возобновление роста биопленок. Изоляты биопленки, устойчивые к фагу, были извлечены из предварительно обработанных катетеров и, на основании их профиля восприимчивости по отношению к другим фагам, был разработан коктейль из пяти бактериофагов. Предварительная обработка катетеров данной смесью фагов привела к сокращению количества жизнеспособных клеток в биопленке на 3 lg по сравнению с необработанными катетерами после 48 часов инкубации [27]. В результате проведенных Fu et al. исследований был получен достаточно эффективный фаговый препарат для борьбы с биопленками, формируемыми *P. aeruginosa*.

Hall с соавторами изучали влияние использования одного, двух или четырех фагов либо последовательно, либо одновременно против суспензионной культуры *P. aeruginosa* PAO1. Было обнаружено, что полифаговый препарат более эффективен в снижении бактериальной плотности, а эффективность одновременного применения фагов равна или превосходит эффективность последовательного [28].

В других исследованиях, проводимых Pires et al. по контролю образования биопленок *P. aeruginosa* использовали фаг с широким диапазоном клеток - хозяев. Несмотря на то, что через 6 ч после обработки биопленки фагом происходило значительное сокращение количества жизнеспособных клеток, через 24 ч наблюдали увеличение количества клеток в биопленке, что указывало на возникновение фагоустойчивых фенотипов [29].

Таким образом выше приведенные исследования, а также другие многочисленные исследования доказывают, что комбинация двух или более фагов с различным диапазоном хозяев в одной суспензии - фаговым коктейлем - более эффективна, чем использование только одного фага [30 - 32].

Также был изучен альтернативный подход контроля роста *P. aeruginosa* - сочетание фагов с другими противомикробными препаратами. Torres-Barceló et al. проводили исследования, при котором использовали комбинацию *Podoviridae* phage LUZ7 и стрептомицина против *P. aeruginosa* PAO1. В экспоненциальную фазу роста культуры *P. aeruginosa* добавляли либо каждый препарат по отдельности, либо в комбинации, после чего отслеживали плотность популяции бактерий в течение 70 часов. Комбинированный препарат показал положительный синергизм, в результате чего плотность бактерий была ниже, чем наблюдалась после добавления каждого препарата по отдельности [33].

Knezević с соавторами также изучали эффективность антимикробных препаратов, состоящих из специфичных к *P. aeruginosa* фагов, принадлежащих к семействам *Podoviridae* и *Siphoviridae* в сочетании с субингибирующими концентрациями гентамицина (аминогликозида), цефтриаксона (цефалоспорины), ципрофлоксацина (хинолона) и полимиксина В (полипептид). Эффективность комбинированных препаратов определялась методом кривой критического времени (time-kill curve), и только комбинация цефтриаксона с одним из фагов, используемых в исследовании, выявила синергический эффект [34]. В другой работе сообщалось об использовании смеси, состоящей из литических РНК-фагов в сочетании с хлором против биопленок *P. aeruginosa*, в ходе чего была выявлена повышенная эффективность данной смеси в снижении образования биопленки или ее уничтожение по сравнению

с результатами использования каждого компонента смеси отдельно[35].

Обзор приведенных выше исследований показывает, что в экспериментах *in vitro* бактериофаги и созданные на их основе препараты способны значительно снижать или даже полностью уничтожать устойчивые штаммы *P. aeruginosa*, что создаёт большие перспективы для использования фаговой терапии против антибиотикоустойчивых инфекций, вызываемых данным возбудителем.

Клинические испытания бактериофагов *P. aeruginosa* на моделях животных.

Эффективность и безопасность фаговой терапии были проанализированы в экспериментах *in vivo* с использованием животных. Большая часть клинических испытаний препаратов на основе фагов *P. aeruginosa*, о которых сообщалось в последнее десятилетие, были проведены на моделях мышей и показали чрезвычайно обнадеживающие результаты.

KenFukudas соавторами изучали терапевтический эффект фага KPP12 (семейства *Myoviridae*), выделенного из реки Кочи, Япония, на 8-ми недельных мышах. На роговицах левого глаза у восьмидневных мышей линии C57BL/6 под визуализацией стереоскопического микроскопа, стерильной иглой проводились три 1 мм царапины. После чего на поверхность роговицы наносили 5 мл суспензии, содержащей $5 \cdot 10^6$ клеток *P. aeruginosa* штамм PA33. Через 30 минут после заражения поверхность роговицы обрабатывали 5 мл жидкости содержащей $5 \cdot 10^8$ бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага. Глаза мышей обследовали через 1, 3 и 5 дней после инфицирования для определения степени тяжести заболевания. В результате исследования было показано, что у мышей, которым однократно обрабатывали глаза каплями, содержащими бактериофаг KPP12, в первый день после заражения имелись незначительные повреждения роговицы, которые постепенно исчезли на 5 день наблюдений. Инфицированные контрольные мыши, глаза которых не подвергались обработке бактериофагом, имели обширные повреждения роговицы и её полную непрозрачность через 5 дней после заражения *P. aeruginosa*[36].

Alemauehi с соавторами изучали способность фагов fMR299-2 (семейства *Podoviridae*) и fNH-4 (семейства *Myoviridae*), выделенных из сточных вод на очистных сооружениях, лизировать псевдомонады в легких у 8-недельных самок мышей линии BALB. Для этого мышей инфицировали бактериями *P. aeruginosa*, трансформированными плазмидой p16Slux (маркированные генами люциферазы) для облегченного наблюдения за распространением клеток *Pseudomonas* по тканям легких в режиме реального времени. Через 2 часа после заражения в лёгких инфицированных мышей было зафиксировано достаточное наличие бактерий *P. aeruginosa*, затем экспериментальной группе мышей через дыхательные пути распыляли суспензию исследуемых бактериофагов. Через 6 часов наблюдений в лёгких контрольной группы мышей, которая не подвергалась обработке бактериофагами, фиксировали увеличение *P. aeruginosa* в 3 раза, в то время как в лёгких мышей обработанных бактериофагами наблюдали снижение количества псевдомонад на величину от 3 до 4 логарифмических единиц по сравнению с исходным количеством бактерий. [37].

Morellos соавторами оценивали лечение легочной инфекции у мышей при использовании бактериофага P3_CNA (*Myoviridae*), выделенного из сточных вод. Легочную инфекцию у экспериментальных животных вызывали летальной дозой ($3 \cdot 10^6$ колониеобразующих единиц (КОЕ)) мукоидного штамма *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью. Данный штамм был выделен у пациента с кистозным фиброзом. Бактерии и бактериофаги мышам вводили интраназально. В течении всего срока наблюдения фиксировали гибель животных, анализировали бронхоальвеолярную жидкость, проводили количественную оценку бактерий, бактериофагов, противоспалительных и цитотоксических маркеров, а также анализ гистологии и иммуногистохимии. В результате проведенных исследований было показано, что одной дозы бактериофага в размере $3 \cdot 10^8$ БОЕ, введенной через 2 часа после заражения, достаточно для выживания 95% инфицированных животных. Четырёхдневное профилактическое лечение той же дозой бактериофага приводило к выживанию 100% инфицированных мышей [38].

Olszak с соавторами оценивали антибактериальную активность бактериофагов, выделенных из сточных вод с полей орошения расположенных во Вроцлаве, Польша. Предварительно были отобраны штаммы бактериофагов, обладающие максимальной литической активностью - PA5oct и KT28. Электронно-микроскопический анализ данных штаммов позволили их отнести к семейству *Myoviridae* отряда *Caudovirales* согласно основным морфологическим признакам.

Для изучения возможных вариаций чувствительности к фагу были выбраны шесть изолятов *P. aeruginosa*: PA01 в качестве эталонного штамма,

non-CF0038, клинический штамм, выделенный из зараженной раны; CF217 (уникальный кластер, раннее инфекционное заболевание); CF708 (кластер 1, поздняя инфекция), CF532 не мукоидный изолят и CF832 мукоидный изолят от пациента с кистозным фиброзом.

Анализ антибактериальной активности фагов PA5oct и KT28 проводили *in vivo* на модели личинок *G. mellonella*. Личинки предварительно подвергались 7-дневной акклиматизации.

Определения степени патогенности штаммов *P. aeruginosa* проводили путём введения личинкам 10 мкл разбавленной бактериальной суспензии, серийно разведённой до 10^{-8} КОЕ. Как бактерии так и бактериофаги личинкам вводили инъекционно в вентральную часть последней пары псевдоподий. После инъекции личинки инкубировали 72 ч при 37° С. Степень заражения фиксировали по проценту выживаемости и макроскопическому виду личинок через 8, 24, 48, 72 и 96 ч после инъекции.

Для оценки антибактериальной активности исследуемых фагов, личинкам вводили 10 мкл бактериальной суспензии и через 1 ч, 10 мкл фаголизата при титровании которого, множественность инфекции (МИ) равна 100. Каждый эксперимент проводили в течение 72 ч при 37°С, результаты фиксировали на 8, 24, 48 и 72 ч. Результаты выражали через процент выживаемости.

В результате определения степени патогенности было показано, что изоляты *P. aeruginosa* PA01, non-CF0038 и CF217 были смертельными в дозе 10 КОЕ, при введении которой, после 1 дня наблюдений отмечали более 90% гибели личинок. Для остальных штаммов летальная доза была установлена в 10^5 КОЕ.

По результатам исследований антибактериальной активности фагов было установлено что, бактериофаг KT28 был наиболее эффективным, по сравнению с фагом PA5oct в отношении не фибринозно-кистозных штаммов *P. aeruginosa* (PA01, non-CF0038), процент выживаемости личинок составил около 20% даже через 2 дня после применения смертельной дозы *P. aeruginosa*. Кроме того, препарат KT28 был более эффективен против изолята *P. aeruginosa* CF708 в сравнении с фаговым препаратом PA5oct. Применение фаговых препаратов KT28 или PA5oct по отдельности для лечения инфекции фагоустойчивого штамма CF217 не было эффективным, тогда как смесь обоих лизатов фагов увеличивало коэффициент выживания личинок *G. mellonella* до 30 и 20% на 24 и 48 ч соответственно [39].

Бактериофаговая терапия *P. aeruginosa* может с успехом использоваться в сельском хозяйстве и ветеринарии. Так KhairnarKet.alпоказали влияние бактериофаговой терапии на инфекцию *P. aeruginosa* множественной лекарственной устойчивостью у пресноводного сома *C. gariepinus*, который является важной промысловой рыбой [40 – 42].

Исследуемые бактериофаги были выделены из сточных вод Индии, на основании электронно-микроскопического анализа данных секвенирования фаги были отнесены к семейству *Podoviridae*. В эксперименте, фаговую суспензию в концентрации 10^{10} БОЕ / мл наносили ватным тампоном на места инфекционного поражения кожи рыб. Терапевтический эффект от применения фагового препарата проявился через 8-10 дней, в результате которого было установлено уменьшение диаметра кожных поражений в 7 раз по сравнению с кожными поражениями необработанной фаговым препаратом рыбы [40].

Hawkins соавторами проводили оценку терапевтической активности штаммов бактериофагов при лечении хронического отита собак, вызванного *P. aeruginosa*. Собакам с хроническим отитом во внешний слуховой канал вводили 10^5 БОЕ каждого из 6

исследуемых штаммов бактериофага, активных против *P. aeruginosa*. Во время введения бактериофага и через 48 ч после введения была измерена внутренняя температура каждой собаки и подсчитано среднее количество фагов и клеток бактерий. Через 48 ч после лечения, клинический балл и количество клеток бактерий *P. aeruginosa* из ушей значительно уменьшились: среднее снижение балла на 30,1%, уменьшение среднего количества клеток *P. aeruginosa* на 67%, количество бактериофагов увеличилось по сравнению с вводимой дозой в среднем в 99,1 раза. Во время эксперимента не было обнаружено воспаления, вызванного лечением или других побочных эффектов. Это первый отчет о ветеринарном клиническом исследовании бактериофагового терапевтического инфицирования. Результаты показывают, что введение смеси бактериофагов приводит к лизису *P. aeruginosa* в ухе без явной токсичности [43].

Козлова Ю.Н. и др. изучали возможность применения специфического фага ph 57, выделен из экскрементов животных вивария, для лечения у крыс экспериментальной пневмонии, вызванной синегнойной палочкой. Животным вводили суспензию *P. aeruginosa* объемом 500 мкл с титром 10^9 КОЕ/мл и подвергали воздействию низких температур. Через сутки после заражения крысам перорально вводили 500 мкл бактериофага ph 57 с титром 8×10^7 БОЕ/мл, на третьи сутки производили повторное введение бактериофага в той же дозе. В результате эксперимента было показано, что в течение 8 дней наблюдения ни одно животное получавшее бактериофаг не погибло. Гиподинамия и внешние признаки дыхательной недостаточности исчезли к 4-м суткам наблюдения. Из образцов тканей органов крыс методом отпечатков на среду РПА не было высеяно инфекционного штамма. В контрольной группе животных, которым не вводили бактериофаг отмечали наличие гиподинамии, затруднения дыхания с влажными хрипами. Из печени и легких животных этой группы методом отпечатков был произведен посев на питательную среду РПА с последующей фиксацией сплошного роста инфекционного штамма *P. aeruginosa*. [44].

Обзор выше приведенных исследований показал, что фаговая терапия значительно способствовала контролю, и профилактики инфекций *P. aeruginosa* in vivo. Клинические испытания на моделях различных животных подтверждают терапевтическую эффективность антибактериальных фаговых препаратов, а также полное отсутствие у них токсичности. Поэтому использование бактериофагов в клинической практике для профилактики и лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa* является весьма перспективным.

Клинические испытания бактериофагов *P. aeruginosa* на людях.

Первые бактериофаги в терапевтических целях применили в Париже в 1919 году, когда Д'Эрелль вводил перорально препарат фага для лечения бактериальной дизентерии [45]. Пациенты, получавшие однократную дозу фагосодержащего препарата начали восстанавливаться в течение 24 часов после начала лечения [46]. В совместной работе д'Эрелля и Ашишова, опубликованной в 1931 году, описывается способ лечения холеры у людей путём внутривенного введения бактериофага. Так же при участии д'Эрелля доктор Давид во Франции смог вылечить «безнадёжный» случай стафилококковой бактериемии, вводя пациенту смесь фага с физиологическим раствором в объёме 500 мл в течении одного часа [47, 48]. В 1921 году Vgynoghe и Maisin была опубликована работа в которой сообщалось, о применении фагов для лечения кожных заболеваний, вызванных стафилококками (фурункулы и карбункулы) у пациентов. Через 48 часов после фаготерапии у больных фиксировали снижение болевых ощущений, отёка и температуры [49].

В первой половине XX века фаготерапия представляла собой перспективное направление, по которому проводилось много исследований, показывающих эффективность использования бактериофагов в терапевтических целях [50, 51]. Но после открытия антибиотиков Флемингом и началом применения их в клинической практике массовый интерес к бактериофагам как к терапевтическим препаратам снизился. Вновь интерес к бактериофагам, как к средствам борьбы с бактериальными инфекциями приобрёл всеобщий характер в XXI веке, после развития и распространения антибиотикостойчивости у бактерий.

В 2009 году Wright с соавторами опубликовали работу о клинических испытаниях фагового препарата (BioPhage-PA) против инфекций *P. aeruginosa*. По данным авторов, 12 пациентов с хроническим отитом, вызванным антибиотикорезистентным *P. aeruginosa*, получали однократную дозу данного препарата. После 7, 21 и 42 дней лечения были зарегистрированы значительные клинические улучшения по сравнению с 12 пациентами, получавшими плацебо. Кроме того, при применении фагового препарата у пациентов не наблюдали проявления каких-либо местных или системных побочных эффектов и токсичности, что подчеркивает безопасность фаговой терапии [52].

Sivera Magza с соавторами сообщили об успешном использовании фага при его местном применении для лечения ожоговых ран пациента, инфицированных *P. aeruginosa*. Для терапии применяли очищенный фаговый препарат, адсорбированный на фильтровальных бумажных дисках, которые помещались на ожоговые, инфицированные участки кожи пациента. Через 3 дня после лечения инфекционный штамм не высеивался на питательную среду [53].

Merabishvili с соавторами описали мелкомасштабное производство фагового коктейля (BFC-1) с контролируемым качеством для использования в клинической практике человека. Коктейль был разработан для лечения инфекций *P. aeruginosa* и *St. aureus* при ожоговых ранах. Авторами были оценены параметры контроля качества фагового коктейля, такие как стабильность, пирогенность, стерильность и цитотоксичность [54]. Фаговый коктейль BFC-1 местно применяли на ожоговых ранах девяти пациентов, инфицированных мультирезистентными *P. aeruginosa* и/или *S. aureus*. Хотя это исследование не дало результатов относительно терапевтической эффективности фагового коктейля, проявление неблагоприятных эффектов или клинических аномалий при его применении не наблюдалось [55].

Обзор выше приведённых материалов показал отсутствие каких-либо побочных или токсичных эффектов как местного, так и системного характера после испытаний фаговых препаратов на людях. Так же данные исследования свидетельствуют об результативности применения бактериофагов при лечении бактериальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Всё это позволяет сделать выводы, что фаготерапия является эффективным и безопасным методом борьбы с бактериальными инфекциями и имеет высокую актуальность и перспективность для дальнейших исследований и внедрения в клиническую практику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Moradali M.F., Ghods S., Rehm H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. - doi: 10.3389/fcimb.2017.00039
- 2 Lam J.S., Taylor V.L., Islam S.T., Hao Y., Kocincová D. Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide // *Front Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. - doi: 10.3389/fmicb.2011.00118
- 3 Pereira S.G., Rosa A.C., Ferreira A.S. et al. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydrophobic facility and respiratory infections // *J. Appl. Microbiol.* – 2014. – Vol. 116. – P. 1359–1368.
- 4 Wagner V.E., Filiatrault M.J., Picardo K.F., Iglewski B.H. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues // In Cornelis P (ed), *Pseudomonas genomics and molecular biology.* - Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press, 2008. – P. 129–158.
- 5 Athanasiou C.I., Kopsini A. A systematic review on the use of time series data in the study of antimicrobial consumption and *Pseudomonas aeruginosa* resistance // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* – 2018. - doi: 10.1016/j.jgar.2018.06.001
- 6 Lambert M.L., Suetens C., Savey A. et al. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study // *Lancet Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 11. – P. 30–38.
- 7 Rosenthal V.D., Al-Abdely H.M., El-Kholy A.A. et al. International nosocomial infection control consortium report, data summary of 50

- countries for 2010-2015: device-associated module // *Am. J. Infect. Control.* – 2016. – Vol. 44. – P. 1495–1504.
- 8 Breidenstein E.B., Fuente-Nunez C, Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance // *Trends Microbiol.* – 2011. – Vol. 19. – P. 419–426.
 - 9 Li X., Nikaido H., Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1995. – Vol. 39. – P. 1948–1953.
 - 10 Bush K, Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, №3. – P. 969-762.
 - 11 Hancock R.E.W., Speert D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment // *Drug Resist. Update.* – 2000. – Vol. 3. – P. 247–255.
 - 12 Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – doi: 10.3389/fmicb.2011.00065.
 - 13 Воронина О.Л., Кунда М.С., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Габриэлян Н.И., Шагинян И.А., Лунин В.Г. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов в хирургических отделениях ФНЦТИО им. В.И. Шумакова // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2012. – Том 14, № 2. – С. 88-99.
 - 14 Асланов Б.И. Эпидемиологическая оценка бактериофагов как факторов эволюции госпитальных штаммов и средств борьбы с внутрибольничными инфекциями: автореф. дис. ... док. мед. наук. 14.02.02. / Асланов Батырбек Исметович. – СПб, 2016. – 44 с.
 - 15 Bourdin G., Navarro A., Sarker S.A. at al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails // *Microb. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 7. – P. 165-176.
 - 16 Donlan R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17. – P. 66-72.
 - 17 Lin D.M., Koskella B., Lin H.C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance // *W. J. of Gastro. Pharma. and Thera.* – 2017. – Vol. 8, №3. – P. 162-173.
 - 18 Scarascia G., Yap S.A., Kaksanen A.H., Hong P.Y. Bacteriophage Infectivity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Saline Conditions // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – doi: 10.3389/fmicb.2018.00875.
 - 19 Ceysens P.J., Lavigne R. Bacteriophages of *Pseudomonas* // *Future Microbiol.* – 2010. – Vol. 5. – P. 1041–1055.
 - 20 Azeredo J., Sillankorva S., Pires D.P. *Pseudomonas* bacteriophage isolation and production // In Filloux A, Ramos J.L. *Pseudomonas* methods and protocols. – NY: Humana Press, 2014. – P. 23–32.
 - 21 Ackermann H.W. Phage classification and characterization // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 501. – P. 127–140.
 - 22 Holland S.J., Sanz C., Perham R.N. Identification and specificity of pilus adsorption proteins of filamentous bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa* // *Virology.* – 2006. – Vol. 345. – P. 540–548.
 - 23 Ruokoranta T.M., Grahn A.M., Ravantti J.J. at al. Complete genome sequence of the broad host range single-stranded RNA phage PRR1 places it in the Levivirus genus with characteristics shared with alloviruses // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 9326–9330.
 - 24 Hoogstraten D., Qiao X., Sun Y. at al. Characterization of phi8, a bacteriophage containing three double-stranded RNA genomic segments and distantly related to Phi6 // *Virology.* – 2000. – Vol. 272. – P. 218–224.
 - 25 Gottlieb P., Wei H., Potgieter C., Toporovsky I. Characterization of phi 12, a bacteriophage related to phi 6: nucleotide sequence of the small and middle double-stranded RNA // *Virology.* – 2002. – Vol. 293. – P. 118–124.
 - 26 Pires D.P., Vilas B.D., Sillankorva S., Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections // *Journal of Virology* – 2015. – Vol. 89, №15. – P. 7449-7456.
 - 27 Fu W., Forster T., Mayer O. at al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54. – P. 397–404.
 - 28 Hall A.R., De Vos D., Friman V.P. at al. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78. – P. 5646–5652.
 - 29 Pires D., Sillankorva S., Faustino A., Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms // *Res. Microbiol.* – 2011. – Vol. 162. P. 798–806.
 - 30 Gu J., Liu X., Li Y. at al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №3. – doi: 10.1371/journal.pone.0031698.
 - 31 Chan B.K., Abedon S.T., Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy // *Future Microbiol.* – 2013. – Vol. 8. – P. 769–783.
 - 32 Jaiswal A., Koley H., Ghosh A. at al. Efficacy of cocktail phage therapy in treating *Vibrio cholerae* infection in rabbit model // *Microbes Infect.* – 2013. – Vol. 15. – P. 152–156.
 - 33 Torres-Barceló C., Arias-Sánchez F.I., Vasse M. at al. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – doi: 10.1371/journal.pone.0106628.
 - 34 Knezevic P., Curcin S., Alekic V. at al. Phage antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa* // *Res. Microbiol.* – 2013. – Vol. 164. P. 55–60.
 - 35 Zhang Y., Hu Z. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine // *Biotechnol. Bioeng.* – 2013. – Vol. 110. – P. 286–295.
 - 36 Fukuda K., Ishida W., Uchiyama J. at al. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – doi: 10.1371/journal.pone.0047742.
 - 37 Alemayehu D., Casey P.G., McAuliffe O. at al. Bacteriophages MR299-2 and NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells // *MBio.* – 2012. – Vol. 3. – doi: 10.1128/mBio.00029-12.
 - 38 Morello E., Saussereau E., Maura D. at al. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – doi: 10.1371/journal.pone.0016963.
 - 39 Olszak T. et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 99. – P. 6021–6033.
 - 40 Khairnar K., Raut M.P., Chandekar R.H. at al. Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in catfish // *BMC Vet. Res.* – 2013. – Vol. 9. – doi: 10.1186/1746-6148-9-264.
 - 41 Sanmukh S.G., Meshram D.B., Paunekar W.N., Swaminathan S. Interaction of fishes with pathogenic bacteria and application of phages for their control – a review // *Rev. Fish Biol. Fisheries.* – 2012. – Vol. 22. – P. 567–574.
 - 42 Osman A.G.M., McKawry I.A., Verreth J.J., Kirschbaum F. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) // *Fish Physiol. Biochem.* – 2007. – Vol. 33. – P. 1–13.
 - 43 Hawkins C., Harper D., Burch D., Anggård E., Sothill J. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 146. – P. 309–313.
 - 44 Козлова Ю.Н., Репин В.Е., Майбородин И.В. «Специфический бактериофаг для лечения хирургической инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, в эксперименте» // *Вест. Эксперим. и клин. хирургии.* – 2013. – Том VI, №4. – С. 425-431.
 - 45 Sulakvelidze A., Kutter E. Bacteriophage therapy in humans // In Kutter E, Sulakvelidze A (ed), *Bacteriophages: Biology and Applications.* – Boca Raton, FL: CRC Press LLC, 2004. – P. 381–436.
 - 46 Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Bacteriophage therapy // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 649–659.
 - 47 d'Hérelle F. An address on bacteriophage and recovery from infectious diseases // *Can. Med. Assoc. J.* – 1931. – Vol. 24. – P. 619–628.
 - 48 d'Hérelle F. Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections // *Bull. N. Y. Acad. Med.* – 1931. – Vol. 7. – P. 329–348.
 - 49 Bruynoghe R., Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du Staphylocoque // *Compt. Rend. Soc. Biol.* – 1921. – Vol. 85.

– P. 1120–1121.

- 50 Rice TB. Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions: report of 300 cases // Am. J. Med. Sci.– 1930. – Vol. 179. – P. 345–360.
- 51 Schless R.A. Staphylococcus aureus meningitis: treatment with specific bacteriophage // Am. J. Dis. Child. –1932. – Vol. 44. – P. 813–822.
- 52 Wright A., Hawkins C.H., Anggård E.E., Harper D.R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy // Clin.Otolaryngol. –2009. – Vol. 34. – P. 349–357.
- 53 SiveraMarza J.A., Soothill J.S., Boydell P., Collins T.A. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in Pseudomonasaeruginosa infected patients // Burns. -2006. – Vol. 32. – P. 644–646.
- 54 Merabishvili M., Pirnay J.P., Verbeke G. et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials // PLoS One. –2009. – Vol. 4. - doi: 10.1371/journal.pone.0004944.
- 55 Rose T., Verbeke G., Vos D.D. et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps // Int. J. Burns Trauma. - 2014. – Vol. 4. – P. 66–73.

М.С. Алексюк, П.Г. Алексюк, А.П. Боговяленский, В.Э. Березин
«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ФАГТАРДЫ- МИКРОБҚА ҚАРСЫ ТЕРАПИЯДА БАЛАМАЛЫ ТӘСІЛ РЕТІНДЕ ҚОЛДАНЫЛУЫ

Түйін: Нозокомиальды жұқпалардың кең таралуы қазіргі заманғы денсаулық сақтаудың негізгі мәселерінің бірі болып табылады. Нозокомиальды жұқпа мәселесінің күшейюі микроағзалар ішінде антибиотикке төзімділігінің жаһандық таралуымен байланысты. Антибиотиктерге төзімділік жағдайында бактериялық жұқпасымен күресудің баламалы стратегиясы литикалық бактериофагтарды қолдану мүмкіндігі болып табылады.

Осы мақаланың мақсаты - нозокомиальды инфекция Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) негізгі патогендерінің біріне қарсы күресуге арналған фаг дәрілерін әзірлеуге және сынауға арналған зерттеулерді қарау.

Түйінді сөздер: бактериофагтар, Pseudomonas aeruginosa, нозокомиальды жұқпа, антибиотикке төзімділік.

M.S. Alexyuk, P.G. Alexyuk, A.P. Bogoyavlenskiy, V.E. Berezin
LP "Research and Production Center for Microbiology and Virology"

PHAGES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA AS AN ALTERNATIVE APPROACH IN ANTIMICROBIAL THERAPY

Resume: Nosocomial infections are one of the main problems of modern healthcare due to its widespread distribution. The aggravation of the problem of nosocomial infections is due to the global spread of antibiotic resistance among microorganisms. Application of lytic bacteriophages can be alternative strategy to fight against bacterial infections in antibiotic resistance conditions.

The purpose of this article was to review of studies designed to develop and test phage preparations aimed to fight against Pseudomonas aeruginosa, which is one of the major pathogens of nosocomial infections.

Keywords: bacteriophages, Pseudomonas aeruginosa, nosocomial infections, antibiotic resistance.