Новый способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3

Ю. А. Захарова, д.м.н., зам. директора по научной работе
О. С. Федотова, н.с.
Н. А. Шмелева, н.с.

ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций»
Роспотребнадзора, г. Екатеринбург

New method of evaluating specific bacteriophage activity using HLE-3 cell culture

Yu. A. Zakharova, O. S. Fedotova, N. A. Shmelyova
Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, Russia

Резюме

В представленном исследовании была проведена оценка эффективности специфических бактериофагов в условиях *in vivo* для купирования инфекционного процесса, вызванного *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Продemonстрировано, что применение в течение часа специфического бактериофага, обладающего высокой литической активностью, приводит к снижению адгезивной активности микроорганизмов. Время эксперимента составило один час.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, адгезия, клеточная культура ЛЭЧ-3, бактериофаг.

Summary

In the presented study, we evaluated the efficacy of specific bacteriophage activity *in vivo* for resolution of infections caused by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. It was demonstrated that administration of a specific bacteriophage with high lytic activity in an hour leads to a decrease in the adhesive activity of the microorganisms. The duration of the experiment was one hour.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, adhesion, cell culture HLE-3, bacteriophage.

Введение

За последние годы практически не разрабатывалось новых антибактериальных препаратов (АБП), в то время как устойчивость к известным антибиотикам неуклонно росла и во многих случаях достигла критической отметки [1, 8]. В этой связи ключевыми задачами национального значения являются разработка и внедрение в клиническую практику дополнительных средств борьбы с инфекционными заболеваниями, в качестве которых, несомненно, можно рассматривать бактериофаги. Доступность и эффективность фаготерапии находят все более широкое применение, включая случаи тяжелых форм инфекционной патологии. Антимикробный эффект бактериофагов обусловлен их высокой специфичностью, разрушением бактериальной клетки без нарушения представителей нормальной микрофлоры [2].

Известно, что бактериальная инфекция на клеточном уровне является результатом необратимой адгезии микроорганизмов в тканях хозяина и их

последующей колонизацией с формированием первичного очага. Принимая во внимание последовательность этих процессов, одним из механизмов сдерживания инфекции является снижение адгезии и подавление инвазии [3].

Настоящая работа включала серию экспериментов, позволяющих непосредственно на культурах клеток человека ингибировать адгезию микроорганизмов под воздействием бактериофагов. Модель с применением человеческих клеточных культур позволяет адекватно проецировать применяемую методику на организм человека. Благодаря этому модель (клеточная культура) может быть использована как для обширного скрининга антибактериальных препаратов, так и для детального тестирования перспективных соединений на доклиническом уровне проведения исследований [6].

Цель работы: оценка специфической активности бактериофага и их влияние на адгезивную активность микроорганизмов с использованием клеточных культур.

Материалы и методы

Бактерии. В работе использовано по 20 штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, выделенных от больных с различной инфекционной патологией. Идентификацию бактериальных изолятов осуществляли на клинических базах медицинских организации по месту их выделения в соответствии с нормативными документами [4, 5].

Клетки. В эксперименте использовали штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека ЛЭЧ-3 (банк-музей Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций). Клетки свободны от контаминирующих агентов, не обладали туморогенной активностью и на протяжении первых двух фаз стабильно сохраняли биологические свойства, присущие штаммам диплоидных клеток человека.

Бактериофаги. Применяли производственные препараты Бактериофаг Стафилококковый® и Бактериофаг псевдомонас аеруиноза

Таблица 1
Характеристика адгезивной активности микроорганизмов

Показатель	КК + бактерии + бактериофаг (I. Опыт) n = 20	КК + бактерии (II. Контроль) n = 20	One-way ANOVA
	m ± SE [95% ДИ]		
S. aureus			
log10 (ИА)	0,68 ± 0,05* [0,57–0,78]	1,30 ± 0,03 [1,23–1,37]	F(1, 38) = 101,23; p < 0,001
ИА®	4,79 ± 1,12* [3,72–6,03]	19,95 ± 1,07 [16,98–23,44]	
ф-преобразование (ПК)	0,32 ± 0,02* [0,28–0,36]	1,42 ± 0,07 [1,27–1,58]	F(1, 38) = 205,66; p < 0,001
ПК®	2,54 ± 0,01* [1,95–3,21]	42,49 ± 0,12 [35,19–50,46]	
P. aeruginosa			
log10 (ИА)	0,65 ± 0,07* [0,52–0,79]	1,44 ± 0,07 [1,31–1,58]	F(1, 38) = 73,48; p < 0,001
ИА®	4,47 ± 1,17* [3,31–6,17]	27,54 ± 1,17 [20,42–38,02]	
ф-преобразование (ПК)	0,51 ± 0,04* [0,43–0,60]	1,55 ± 0,10 [1,34–1,75]	F(1, 38) = 95,42; p < 0,001
ПК®	6,36 ± 0,04* [4,55–8,73]	48,96 ± 0,25 [38,56–58,91]	
A. baumannii			
log10 (ИА)	0,67 ± 0,05* [0,56–0,77]	1,20 ± 0,06 [1,08–1,33]	F(1, 38) = 46,28; p < 0,001
ИА®	4,68 ± 1,12* [3,63–5,89]	15,58 ± 1,15 [12,02–21,38]	
ф-преобразование (ПК)	0,60 ± 0,03* [0,54–0,66]	1,53 ± 0,12 [1,29–1,77]	F(1, 38) = 62,14; p < 0,001
ПК®	8,73 ± 0,0002* [7,11–10,50]	47,96 ± 0,36 [36,14–59,89]	

Примечание: КК — клеточная культура; One-way ANOVA — однофакторный дисперсионный анализ; F — значение критерия Фишера; ф — угловое фи-преобразование; * — статистически значимые различия между группами I и II (p < 0,05); ® — данные приведены к исходным значениям путем потенцирования логарифмированных значений: $y = \log_{10}(x + 1)$ — логарифмирование; $x = 10^y$ — антилогарифм; ® — данные приведены к исходным значениям путем обратного преобразования: $y = 2 \arcsin(\sqrt{x/100})$ — угловое фи-преобразование; $x = [\sin(y/2)]^2 \times 100$ — ретрансформация.

(синегнойный)® (НПО «Микроген», Россия), а также экспериментальную серию ацинетобактерного бактериофага. Экспериментальная серия препарата бактериофага с литической активностью 10^{-5} против *Acinetobacter baumannii* получена из биологического материала от пациентов и из сточных вод стационаров городов Перми и Санкт-Петербурга в 2014 году [7].

Техника постановки эксперимента. В пробирку на покровное стекло с монослоем клеток ЛЭЧ-3 наносили 0,2 мл суточной культуры соответствующего микроорганизма в дозе $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (0,5 по Макфарланду) с добавлением 0,2 мл специфического бактериофага с литической активностью 10^{-5} – 10^{-7} (опытный инокулят). В качестве контрольного инокулята использовали смесь 0,2 мл питательной среды «Игла MEM» с 0,2 мл суточной культуры соответствующего микроорганизма в той же дозе. Пробирки инкубировали в течение одного часа при температуре 37 ± 1 °C, периодически встряхивая, затем клетки монослоя отмывали от неприкрепившихся

микроорганизмов трехкратно фосфатно-буферным раствором, фиксировали 96-градусным этиловым спиртом, окрашивали по Романовскому-Гимзе и исследовали под микроскопом Olympus. Интенсивность процесса адгезии оценивали по следующим показателям:

1. индекс адгезии (ИА) выражали средним числом бактериальных клеток на одной эукариотической клетке;
2. процент пораженных клеток монослоя (ПК, %) на 100 клеток.

Поскольку распределение показателя индекса адгезии смещено относительно нормального, использовали логарифмическое преобразование: $y = \log_{10}(x + 1)$. Распределение долевых параметров (ПК) априорно отлично от нормального, поэтому применяли угловое фи-преобразование: $y = 2 \arcsin(\sqrt{x/100})$. Подобные преобразования помогают свести распределение к нормальному и стабилизировать дисперсии (условие однородности дисперсий или гомоскедастичности).

Данные выборки представлены в эксперименте как среднее ± стандартная ошибка среднего с указанием доверительного интервала (m ± SE [95% ДИ]). Независимые группы сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft, США).

Результаты

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что специфические бактериофаги блокировали адгезивную активность изучаемых штаммов микроорганизмов (табл. 1).

Так, при оценке данных, индекс адгезии микроорганизмов достоверно снизился относительно контроля: *S. aureus* — 4,79 [95% ДИ: 3,72–6,03], *P. aeruginosa* — 4,47 [95% ДИ: 3,31–6,17], *A. baumannii* — 4,68 [95% ДИ: 3,63–5,89].

При исследовании такого показателя, как процент пораженных клеток (ПК, %) в монослое клеточных

Таблица 2
Учет результата литической активности бактериофага по бактериологическому высеву на питательные среды

Время эксперимента	Наличие микроорганизмов (КОЕ/мл) на МПА					
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
До начала инкубации	5×10^8	4×10^8	4×10^8	3×10^8	3×10^8	2×10^8
Через 1 час после инкубации при $37 \pm 1^\circ\text{C}$	—	—	—	—	—	—

Рисунок 1. Показатели процента пораженных клеток монослоя бактериофагом.

культур ЛЭЧ-3, были получены аналогичные результаты (среднее значение показателя пораженности *S. aureus* у контрольных штаммов составило $42,49 \pm 0,12\%$, а при совместном инкубировании со стафилококковым бактериофагом — $2,54 \pm 0,01\%$, соответственно $48,96 \pm 0,25\%$ у контрольных штаммов *P. aeruginosa*, при обработке синегнойным бактериофагом — $6,36 \pm 0,04\%$), см. рис 1.

При воздействии экспериментальной серии ацинетобактерного бактериофага на адгезированные на фибробластах *A. baumannii* также установлено снижение количества пораженных клеток: $8,73 \pm 0,0002$ против $47,96 \pm 0,36\%$.

Совместное культивирование бактериофагов с микроорганизмами (в течение 1 часа) приводило к статистически значимому снижению показателей адгезии ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольными штаммами без добавления бактериофага.

Снижение адгезивной активности бактерий происходило за счет бактериолитического эффекта бактериофага. Это подтверждали результаты проведенного дополнительного теста. Производили высеив инокулятов из пробирок на чашки Петри

с мясо-пептонным агаром (МПА) до начала инкубации и после 1 часа термостатирования при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Результаты посева инокулятов из соответствующих контрольных и опытных пробирок представлены в табл. 2.

Представленные в таблице данные свидетельствуют об отсутствии жизнеспособных клеток микроорганизмов как в контрольной, так и в опытной пробирках после 1 часа инкубации. Отсутствие роста микрофлоры на плотной питательной среде в контроле свидетельствовало о полной адгезии микроорганизмов на культуре клеток фибробластов в пробирках. В то же время отсутствие роста бактерий на МПА после 1 часа инкубации в опыте (с бактериофагом) свидетельствовало о гибели микроорганизмов за счет бактериолитического действия специфического бактериофага.

Таким образом, проведенные исследования по оценке специфической активности экспериментальной серии ацинетобактерного бактериофага и коммерческих препаратов бактериофагов Бактериофаг Стафилококковый® и Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный)® показали их высокую

антимикробную эффективность этих препаратов. Результаты, полученные с использованием клеточных культур, дают возможность использовать представленную экспериментальную модель для тестирования специфической активности бактериофага, включая способность подавлять факторы адгезии. Важно отметить, что разработанная нами методика позволяет провести оценку в течение одного часа, что относит ее к методам экспресс-диагностики.

Список литературы

1. Агеев В. А., Лазарева И. В., Сидоренко С. В. Проблема устойчивости к карбапенемным антибиотикам: распространение карбапенемаз в мире и России, эпидемиология, диагностика, возможности лечения. // Фарматека. — 2015. — № 14. — С. 9–16.
2. Асланов Б. И. Бактериофаги — эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам. // Медицинский совет. — 2015. — № 13. — С. 106–111.
3. Благонравова А. С., Афонин А. Н., Воробьева О. Н., Широкова И. Ю. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений. // Медицинский альманах. — 2011. — № 5 (18). — С. 215–218.
4. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985. № 535.
5. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. Пер. с англ. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. М., 1997.
6. Романова М. А., Додонова А. Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. // Молодой ученый. — 2016. — № 18. — С. 110–114.
7. Федотова О. С., Захарова Ю. А. Микробиологические аспекты получения препарата бактериофага против *Acinetobacter baumannii*. // Медицинский альманах. — 2018. — № 1 (52). — С. 126–129.
8. Falagas M. E. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / M. E. Falagas, P. K. Koletsi, I. A. Bliziotis // Journal of Medical Microbiology — 2006. — Vol. 55. — N 12. — P. 1619–1629.