

Частота обнаружения вирулентных и умеренных эндогенных бактериофагов у больных с термической травмой

Е. Б. Лазарева¹, Е. Д. Меньшикова¹, Н. В. Евдокимова¹, Т. В. Черненькая¹, Т. Г. Спиридонова¹,
Е. А. Жиркова¹, Е. Л. Жиленков²

¹ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы

²ООО НПЦ «МикроМир», г. Москва

Frequency of virulent and moderate endogenous bacteriophages detection in patients with thermal trauma

E. B. Lazareva, E. D. Menshikova, N. V. Evdokimova, T. V. Chernenkaya, T. G. Spiridonova, E. A. Zhirkova, T. L. Zhilenkov
Research Institute of Emergency Care n.a. N. V Sklifosovsky, MikroMir Co.; Moscow, Russia

Резюме

Проведено исследование наличия эндогенных бактериофагов у больных с ожоговой травмой при бактериемии. Представлены данные по частоте выделения у них вирулентных и умеренных фагов. Установлено, что сепсис и летальные исходы у больных, имевших эндогенные фаги, независимо от формы взаимодействия с микробной клеткой, встречались реже, чем у больных без фагов.

Ключевые слова: микроорганизмы, умеренные и вирулентные эндогенные бактериофаги, термическая травма, сепсис, бактериемия.

Summary

The study of the presence of endogenous bacteriophages in burned patients with bacteremia has been made. The data on the frequency of virulence and moderate phage are presented. It was been established that sepsis and fatal outcomes in patients with endogenous phages, regardless of the form of interaction with the microbial cell, were less common than in patients without phages.

Key words: microorganisms, virulent and moderate bacteriophages, thermal injury, sepsis, bacteremia.

Микрофлора человека — это совокупность множества микробиоценозов, включающая в себя десятки и сотни различных видов. В организме человека содержится до 10^{14} клеток — представителей микробиоты, что на порядок больше, чем число клеток всех органов и тканей макроорганизма [1, 2]. Микробиом человека представлен условно патогенными микроорганизмами — нормальными обитателями различных биотопов. В случае дисбаланса микроорганизмов или попадания в организм патогенной микрофлоры развивается инфекционное заболевание. Однако в природе существуют защитные механизмы для борьбы с микроорганизмами, одним из которых являются бактериофаги. По своей природе бактериофаги — внутриклеточные облигатные паразиты бактерий. Их численность в природе примерно равна общей численности бактерий — от 10^{30} до 10^{32} вирусных частиц в биосфере. В природных условиях фаги встречаются в тех

местах, где есть гомологичные к ним бактерии: в почве, выделениях человека и животных, в воде и т. д. Они могут находиться и в организме человека, осуществляя его защиту от микроорганизмов, вызывающих то или иное заболевание не только при использовании лечебных бактериофагов, но, возможно, без их применения [3, 4, 5].

В зависимости от конечного результата взаимодействия бактериофага с микробной клеткой они подразделяются на умеренные и вирулентные. С лечебной целью используют препараты, содержащие только вирулентные фаги.

В связи с широким распространением устойчивости микроорганизмов, вызывающих различные инфекционные процессы, к антибиотикам, возродился интерес к бактериофагам, которые в нашей стране активно использовали в различных областях медицины еще с 30-х годов XX века. При использовании в комплексе лечебных мероприятий бактериофагов реже встречаются инфекционные

осложнения и летальные исходы. Однако до сих пор отсутствуют сведения о роли собственных эндогенных бактериофагов в профилактике и лечении гнойно-воспалительных осложнений.

Целью работы явилось изучение частоты выделения эндогенных бактериофагов из организма больных с термической травмой и формы их взаимодействия с бактериальной клеткой.

Материал и методы

Обследовано 27 больных с ожоговой травмой: 20 мужчин и 7 женщин в возрасте 20–81 года (48 (29; 59) лет). Общая площадь ожога составляла от 1 до 70% (30 (23; 45)% поверхности тела (п. т.), глубокие ожоги III степени занимали от 1 до 45 (10 (5; 25)% п. т.).

Больные по показаниям получали антибактериальную терапию, включающую преимущественно цефалоспорины и фторхинолоны. Коррекцию лечения при

необходимости проводили после получения результатов микробиологических исследований.

Всего получено 40 проб крови. Рост микроорганизмов обнаружен в 33 пробах, выделены 35 возбудителей. В семи пробах роста микроорганизмов не было. Бактериологическое исследование крови проводили с помощью автоматического анализатора гемокультур Bactec-9050. Идентификацию выделенных микроорганизмов выполняли с использованием автоматического микробиологического анализатора WalkAway 40.

После выделения культур возбудителей флаконы крови и чашки Петри с выделенными патогенами отправляли в лабораторию ООО НПЦ «МикроМир» для определения наличия эндогенных бактериофагов. Кроме того, от пациентов с положительными посевами крови отбирали пробы мочи и перевязочный материал с раневой

поверхности, которые также исследовали на наличие эндогенных бактериофагов. Работу с бактериофагами выполняли на основании традиционных вирусологических методов. Бактериофаги, извлеченные из зон лизиса после спот-тестирования, исследовали на электронном микроскопе JEOL-1011 (Япония). У 11 больных выделение эндогенного бактериофага проводили, не разделяя материал, и у 16 — изучали отдельно из каждого вида материала. В динамике обследованы девять больных, от которых получено от 2 до 3 проб крови.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программы Statistica 10. Описательная статистика количественных признаков представлена медианами и квартилями в формате Me (LQ; UQ). Независимые группы сравнивали с применением критериев Манна-Уитни (M-U) и χ^2 . Пороговый уровень значимости принят равным 0,05 [6, 7].

Результаты исследования

У 17 из 27 больных выделен бактериофаг (62,9%), у 10 больных фаги отсутствовали (37,1%).

Общая площадь ожогового поражения в группе больных с фагами составила 35 (30; 40)% п.т., в группе без фагов — 25 (15; 45)% п.т., (M-U, $p = 0,242$). Площадь глубоких ожогов у больных с фагами — 5 (5; 20)% п.т. и без фагов 15 (7; 25)% п.т. (M-U, $p = 0,276$). Возраст больных с выделенными фагами составил 53 (39; 59) года, больных без фагов — 39 (24; 52), (M-U, $p = 0,333$). Таким образом, статистически значимых различий по общей площади ожогового поражения, площади глубоких ожогов, а также возрасту больных между группами не выявлено.

Из 17 больных, у которых присутствовали эндогенные бактериофаги, двум пациентам был поставлен диагноз «сепсис» (11,8%). Одна из этих больных умерла, летальность в этой группе составила 5,9%. Из 10

Таблица 1
Эндогенные бактериофаги у больных, обследованных в динамике

№ п/п	Микроб	Дата	Наличие эндогенного бактериофага		
			Кровь	Моча	Перевязочный материал
1	<i>Klebsella pneumoniae</i>	11/V			Умеренный
	Роста нет	16/V	Вирулентный		
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	11/VII		Умеренный	
	<i>Serratia marcescens</i>	25/VII	Вирулентный		Вирулентный
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	6/X	Умеренный		
	Роста нет	10/X			
4	<i>Klebsella pneumoniae</i>	13/X	Умеренный		Вирулентный
	Роста нет	3/XI			
5	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	27/IX	Вирулентный		Вирулентный
	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	3/X			Умеренный
	Роста нет	12/X			
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	26/X			Умеренный
	Роста нет	17/XI	Умеренный		
7	<i>Klebsella pneumoniae</i>	20/VII			
	Роста нет	31/VII			Умеренный
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	7/VI			
	Роста нет	15/VI	Умеренный		
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	4/V			Умеренный
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6/VI			Умеренный
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23/VI			

БАКТЕРИО ФАГИ В ПОМОЩЬ ПРОФЕССИОНАЛАМ



Созданы природой, проверены временем

Технология конструирования и производства позволяет поддерживать актуальный состав фаговых частиц средства с бактериофагами.

Отофаг: антибактериальная защита ЛОР-органов

Фагодент: антибактериальная защита полости рта

Фагодерм: антибактериальная защита кожи и мягких тканей

Фагогин: антибактериальная защита интимной сферы



МИКРОМИР

НПЦ «Микромир»

107031, Россия, Москва,
Нижний Кисельный
переулок, 5/23, стр. 1

8 495 625 32 65
www.micro-world.ru
www.micromir.bio

В АПТЕКАХ
ВАШЕГО ГОРОДА

НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ НЕОБХОДИМО ОЗНАКОМИТЬСЯ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

пациентов, у которых отсутствовали бактериофаги, четверо умерли (40%) (χ^2 , $p < 0,05$), у трех из них диагностирован сепсис (30%). От 17 больных из различных проб биоматериала выделены 26 бактериофагов к гомологичным микроорганизмам: 19 (73%) — умеренные и 7 (27%) — вирулентные. Из них умеренные бактериофаги к *Staphylococcus aureus* — 10, к *Klebsella pneumoniae* — 5, к *Enterococcus faecalis* — 2 и по одному к *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Вирулентные фаги встречались при выделении *K. pneumoniae* (2), *S. epidermidis* — также 2 и к *Serratia marcescens* — 3.

Фаги отсутствовали при выделении *S. aureus* от семи пациентов, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus spp.* и *E. faecalis* — по одному больному.

Из биоматериалов от девяти больных, обследованных в динамике (см. табл. 1), у семи фаги выделены при первичном исследовании — в трех случаях умеренный бактериофаг из перевязочного материала, в одном из мочи и в одном из крови. У двух больных в перевязочном материале обнаружен вирулентный фаг, а из крови этих же пациентов в одном случае выделен вирулентный бактериофаг, в другом — умеренный. У двух больных при первичном исследовании фаг отсутствовал и появился через восемь суток: у одного больного — умеренный бактериофаг в крови, у второго — через 11 дней в перевязочном материале также умеренный.

У семи пациентов, от которых выделены бактериофаги при первичном обследовании, через 4–22 суток микроорганизмы в крови не обнаружили, у трех из них к этому времени бактериофаги также элиминировались. У двух больных на фоне элиминации микроорганизмов из крови выделены бактериофаги в различных материалах: у одного на пятые сутки обнаружен в крови вирулентный бактериофаг (№ 1), у другого (№ 6) — на 22-й день исследования сохранился умеренный бактериофаг в перевязочном материале. У двух пациентов произошла смена возбудителя: у больной

№ 2 при первичном исследовании в крови присутствовал *S. aureus*, а в моче был обнаружен гомологичный к нему умеренный бактериофаг, через 14 дней из крови у нее была выделена *Serratia marcescens* с присутствием вирулентного фага в крови и перевязочном материале. У больного № 9 дважды с интервалом в два дня из крови высевали *S. aureus* и выделяли гомологичные умеренные бактериофаги из перевязочного материала. Еще через семь дней из крови был выделен *S. epidermidis*, при этом бактериофаг обнаружен не был.

Обсуждение

У 62,9% больных с ожоговой травмой при бактериемии были выделены эндогенные бактериофаги.

Сепсис и летальность у больных, у которых обнаружены эндогенные фаги, встречались значительно реже, чем у больных без фагов. Возможно, за счет того, что на этапе бактериемии микроорганизмы подавляются бактериофагами, содержащимися в организме больного. При этом оказалось, что защиту осуществляют как вирулентные, так и умеренные фаги, которые встречались у больных в 73% случаев. Известно, что в состав лечебных препаратов должны входить только вирулентные фаги, так как умеренные фаги могут передавать микроорганизмам факторы патогенности и устойчивости к антибиотикам. Известно, что кишечник населен не только микроорганизмами, но и вирусами, среди которых ведущее место занимают бактериофаги [8, 9]. Эти бактериофаги находятся преимущественно в умеренной форме, часть из них (до 35%) может временно переходить в вирулентную в случае активации модуля лизогении [4]. Но этот процесс сложно ловить. Дальнейшие исследования, возможно, позволят выяснить причину высокого содержания умеренных бактериофагов.

Выводы

1. Эндогенные бактериофаги выделены у 62,9% больных с ожоговой травмой, и только 27% представлены вирулентными формами.

2. В группе пациентов с обнаруженными эндогенными бактериофагами количество случаев сепсиса и летальность были значительно ниже, чем у больных без фагов.

Список литературы

1. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. — М.: ГРАНТЬ, 1998. — 288 с.
2. Luckey T.D. Overview of gastrointestinal microecology. // *Nahrung*. — 1987. — Vol. 31, N5–6. — P. 359–64.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение / под. ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. — М.: Научный мир, 2012. — 638 с.
4. Stern A., Mick E., Tirosh I., et al. CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome. // *Genome Res.* — 2012. — Vol. 22, N10. — P. 985–94.
5. Górski A., Weber-Dabrowska B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. // *Cell Mol Life Sci.* — 2005. — Vol. 62, N5. — P. 511–9.
6. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиа Сфера, 2003. — 312 с.
7. Марченко Б. И. Здоровье на популяционном уровне: статистические методы исследования: руководство для врачей. — Таганрог: Сфинкс, 1997. — 432 с.
8. Mills S., Shanahan F., Stanton C., et al. Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. // *Gut Microbes.* — 2013. — Vol. 4, N1. — P. 4–16.
9. Letarov A., Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. // *J Appl Microbiol.* — 2009. — Vol. 107, N1. — P. 1–13.

