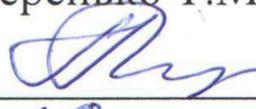


Міністерство охорони здоров'я України
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
01601, Київ-1, бульвар Шевченка, 13
тел. (044) 234-60-63



ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректора з наукової роботи
НМУ імені О.О. Богомольця,
професор Черенько Т.М.

 2017 р.
10

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу

«Вивчення чутливості клінічних штамів спектру умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів до лікарських засобів ШОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® – полівалентних бактеріофагів виробництва ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна для НеоПробіоКеар Інк., Канада»

Керівник НДР:

завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
НМУ імені О.О. Богомольця,
академік НАН та НАМН України,
доктор медичних наук, професор



Широбоков В.П.

Київ-2017

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ**Керівник НДР:**

Завідувач кафедри мікробіології,
вірусології та імунології НМУ імені
О.О. Богомольця, академік НАН та
НАМН України, доктор медичних наук,
професор



Широбоков В.П.

Відповідальний виконавець:

кандидат медичних наук, доцент



Понятовський В.А.

Виконавці:

кандидат медичних наук, доцент



Бобир В.В.

асистент



Єгоров Д.П.

інженер першої категорії



Степанова Т.Ф.

РЕФЕРАТ

Звіт по НДР: стор. 28, табл. 7, рис. 11, літературних джерел 6.

При експериментальному дослідженні бактеріофагових препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® виробництва ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна для НеоПробіоКеар Інк., Канада, по відношенню до референтних і клінічних ізолятів *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* було показано наявність специфічної активності даних препаратів до всіх груп використаних мікроорганізмів різного ступеню вираженості.

Доведено, що досліджувані препарати активні у відношенні прототипних АТСС-штамів стафілококів, ентерококів, *Pseudomonas aeruginosa* та *E.coli*.

Активність препаратів до клінічних ізолятів різних видів мікроорганізмів була неоднакова.

Так, препарати проявляють виражену специфічну бактеріолітичну дію по відношенню до ряду клінічних штамів грампозитивних коків (94% чутливих стафілококів та 47 % ентерококів).

Представники родини Enterobacteriaceae мали різну чутливість, яка коливалася від 75 % (у сальмонел) та 25 % (у кишкової палички та протеї).

Клінічні ізоляти та музейні штами *Pseudomonas aeruginosa* виявилися помірно чутливі (специфічна бактеріолітична дія проявлялася у 53,8% штамів) по відношенню до обох препаратів.

Отже, препарати ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® виробництва ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна для НеоПробіоКеар Інк., Канада, можуть розглядатись як перспективні препарати швидкої бактерицидної дії. Бажана корекція препаратів по відношенню до кишкової палички, враховуючи велику кількість нечутливих клінічних ізолятів цього виду мікробів.

**БАКТЕРІОФАГ «ІНТЕСТИФАГ», БАКТЕРІОФАГ «ПОФАГ»,
АВТЕНТИЧНІСТЬ, СПЕЦИФІЧНА АКТИВНІСТЬ, ТИТР
БАКТЕРІОФАГУ, ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ БАКТЕРІОФАГІВ.**

ЗМІСТ

	Стор.
Вступ	6
Розділ 1. Матеріали і методи	8
Розділ 2. Підтвердження видової приналежності використаних клінічних ізолятів бактерій	10
Розділ 3. Дослідження фізичних характеристик та специфічної активності препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® виробництва ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна для НеоПробіоКеар Інк., Канада до референтних та клінічних ізолятів мікроорганізмів різних таксономічних груп	23
Розділ 4. Електронно-мікроскопічні дослідження препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® виробництва ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», Україна для НеоПробіоКеар Інк., Канада	23
Висновки	27
Використана література	28

ВСТУП

Відомо, що останніми роками відмічається зростання лікарської резистентності мікроорганізмів до антибіотиків та число побічних реакцій при їх використанні. У зв'язку з цим, потреба в антимікробних препаратах, дієвих щодо сучасних збудників та таких, що не пригнічують нормофлору людини, змусила клініцистів звернути увагу на препарати, виготовлені на основі бактеріофагів, які успішно застосовувалися для лікування кишкових і гнійних інфекцій ще до відкриття антибіотиків.

Інфекції, викликані умовно-патогенними мікроорганізмами, в тому числі *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та ін. в даний час представляють істотну проблему, як з клінічних, так і з епідеміологічних позицій. Традиційними препаратами етіотропної терапії гнійно-запальних захворювань є антибіотики. Однак застосування антибіотиків пов'язане не тільки із загибеллю патогенних агентів, що підтримують інфекційний процес, але і з пригніченням нормальної мікрофлори людини, зокрема її адгезивних властивостей. Питання ефективної профілактики і терапії гнійно-септичних інфекцій набуває надзвичайної актуальності в умовах формування полірезистентності мікроорганізмів до антибіотиків [4]. У зв'язку з цим сьогодні інтенсифікуються наукові дослідження щодо вдосконалення та розробки альтернативних методів лікування, в тому числі і фаготерапії. Основними перевагами препаратів бактеріофагів є висока чутливість до них патогенної мікрофлори, можливість комбінування з іншими видами традиційної антибактеріальної терапії, відсутність протипоказань до застосування [1].

У сфері бактеріофагового виробництва актуалізуються питання, пов'язані з конструюванням нових препаратів та удосконаленням технологічного процесу, включаючи відбір і використання високочутливих штамів продуцентів, вдосконалення існуючих способів культивування бактеріофагів, виготовлення більш широкої номенклатури лікарських форм на основі

бактеріофагів. На думку дослідників, в умовах поліетиологічності багатьох захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, найбільш доцільним є створення полівалентних комбінованих бактеріофаговмісних препаратів [4].

Таким чином, в умовах поліетиологічності багатьох захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, розробка полівалентних комбінованих бактеріофаговмісних препаратів є одним з найбільш перспективних напрямків сучасної медицини.

Мета роботи: Визначення специфічної активності бактеріофагових препаратів компанії НеоПробіоКеар Інк., щодо референтних і клінічних ізолятів мікроорганізмів різних таксономічних груп.

Завдання роботи:

1. Здійснити дослідження специфічної активності препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® по відношенню до референтних і клінічних ізолятів мікроорганізмів різних таксономічних груп.
2. Провести електронно-мікроскопічну індикацію бактеріофагів, що входять до досліджуваних препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ®.
3. Електронно-мікроскопічними методами встановити можливість контамінації дослідних препаратів мікроорганізмами вірусної чи бактеріальної природи.

РОЗДІЛ 1

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Фізичні характеристики дослідних препаратів. (рН, каламутність, стерильність) вивчали регламентованими методами [2]. Стерильність визначали методом прямого посіву.

Для визначення автентичності і специфічної активності бактеріофагів використовували ліофілізовані еталонні штами бактерій, отримані з Національної колекції патогенних мікроорганізмів при ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України». Роботу з культурою мікроорганізмів проводили відповідно до рекомендацій, що представлені в паспорті до нього.

Досліджували також клінічні ізоляти шигел Зонне, сальмонел, тифимуріум, інфантіс, ентеритидис, патогенної кишкової палички різних сероваріантів, протей вульгаріс та мірабіліс, ентерококів, стафілококів та псевдомонас аеругіноза, отримані з бактеріологічних лабораторій м. Києва та Київської області.

Діапазон і ступінь специфічної активності бактеріофагів визначали за методом Грація (на щільних поживних середовищах двошаровим методом) з використанням поживного агару для культивування мікроорганізмів [3, 6]. Дослідження проводили в трьох повторях.

Концентрацію мікробних клітин при титруванні бактеріофагів визначали за допомогою оптичного стандарту мутності (ОСО – 42-28085 на 10 ОД, виробництва ДІСК імені Л.А. Тарасовича).

Також, бактеріофаги досліджували з використанням електронного мікроскопу Jeol JEM 100 CX II (Японія) з переведенням зображення у цифровий формат та комп'ютерним аналізом отриманих знімків.

Плівки-підложки готували із формвару та колодію, їх зміцнювали шляхом напилювання вуглецю у вакуумі. В окремих випадках, для отримання високоякісних знімків, готували так звані «перфоровані» плівки-підложки.

Досліджувані зразки піддавали негативному та позитивному контрастуванню, в якості контрастерів використовували 1-2% розчини фосфорно-вольфрамової кислоти, 2% розчин фосфорно-молібденової кислоти, 2% розчин уранілацетату та 0,59 М розчин оцтовокислого свинцю. При цьому об'єкти наносили на плівку-підложку крапельним способом.

На всіх представлених в роботі електроннограмах вказане збільшення електронного мікроскопу, при якому було проведено фотозйомку об'єктів. В процесі досліджень використовували інструментальне збільшення електронного мікроскопу в 45000 разів.

Ідентифікацію клінічних ізолятів проводили в лабораторіях м. Києва та Київської області. Перед початком дослідження всі клінічні ізоляти проходили повторне підтвердження.

РОЗДІЛ 2

ПІДТВЕРДЖЕННЯ ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ ВИКОРИСТАНИХ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ БАКТЕРІЙ

Для виключення хибно негативних результатів всі отримані клінічні ізоляти із лабораторій м. Києва та Київської області проходили повторну ідентифікацію. Для реалізації цього завдання визначалися морфологічні та деякі їх біохімічні і культуральні властивості (культивування на спеціальних, селективних та диференційно-діагностичних середовищах).

Для підтвердження відношення мікроорганізмів до виду *Staphylococcus aureus* використовували маніт-сольовий та жовтково-сольовий агари (рис. 1 та 2).

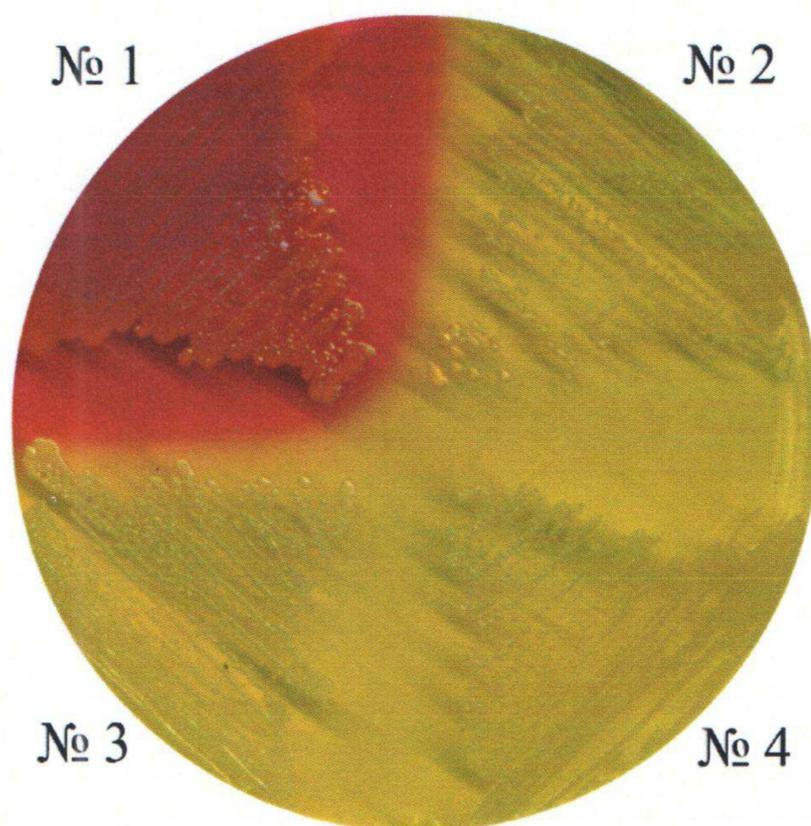


Рисунок-1. Ріст стафілококів на маніт-сольовому агарі: № 1 – негативний контроль (*Staphylococcus epidermidis*), № 2 – позитивний контроль *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, № 3 та 4 – клінічні ізоляти.

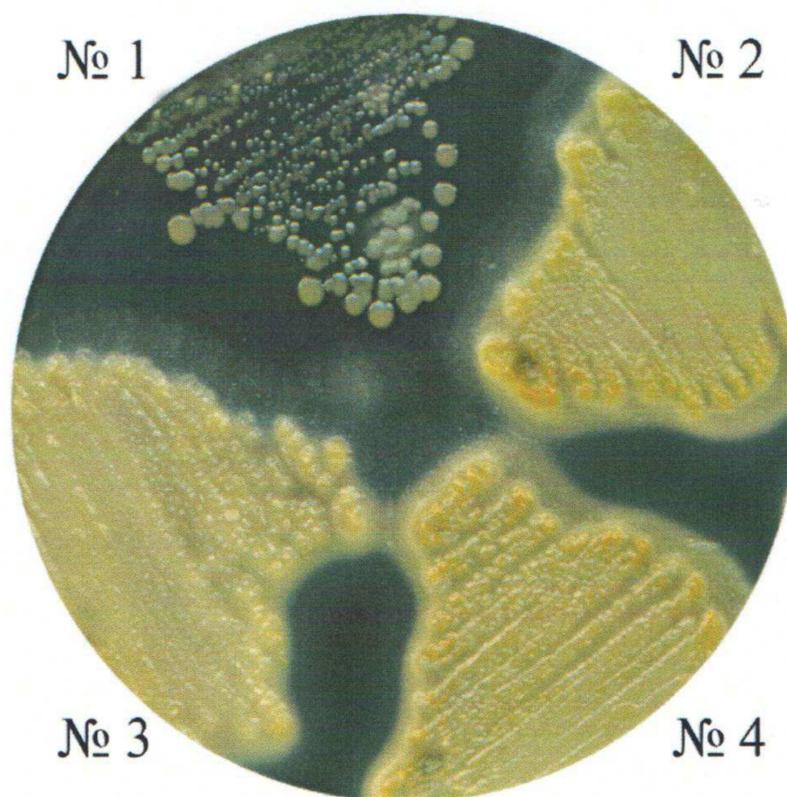
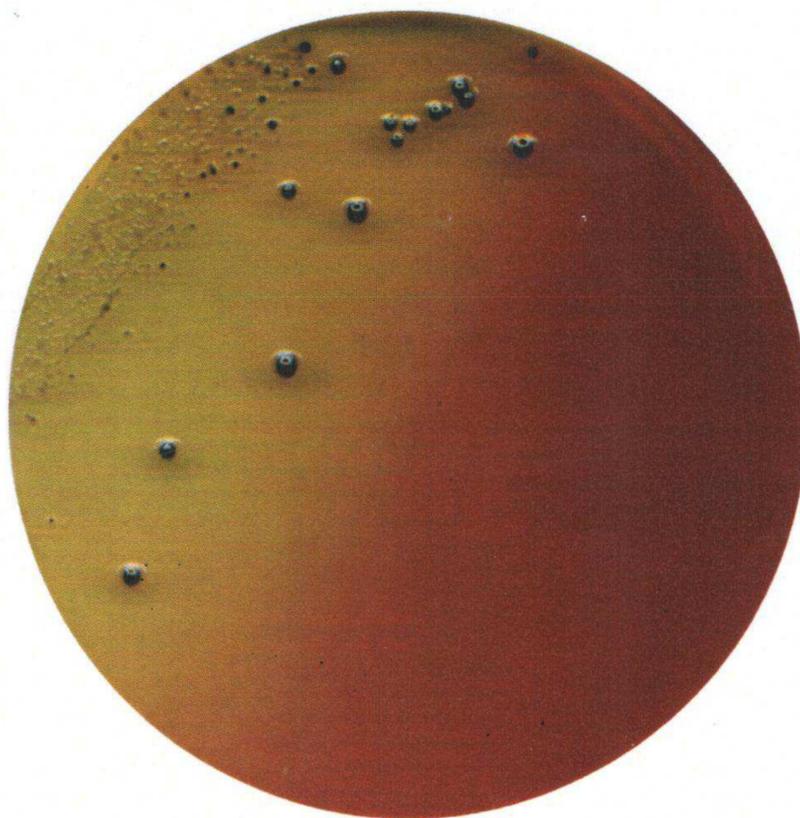
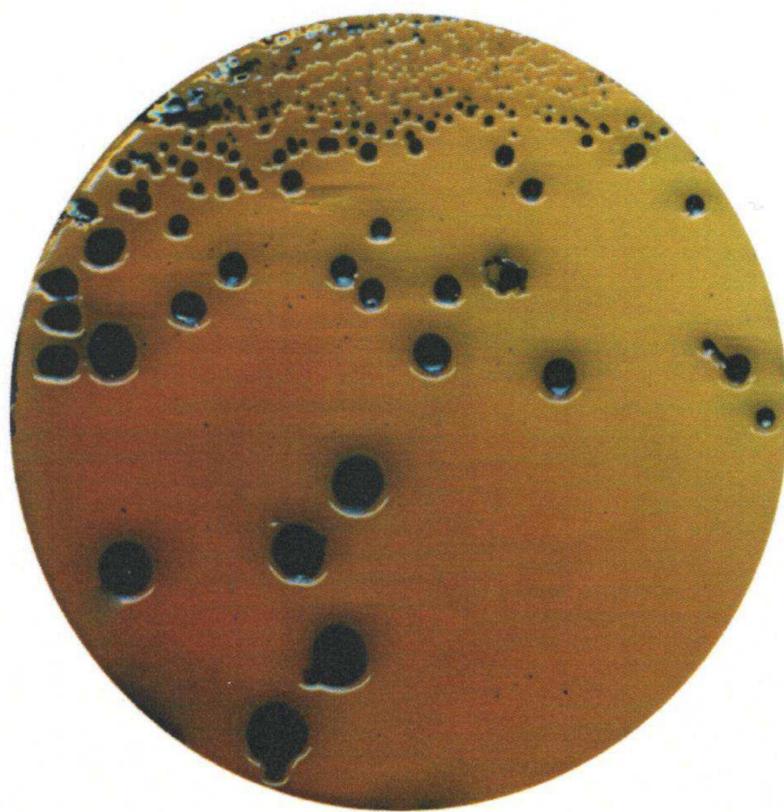


Рисунок-2. Ріст стафілококів на жовтково-сольовому агарі: № 1 – негативний контроль (*Staphylococcus epidermidis*), № 2 – позитивний контроль *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, № 3 та 4 – клінічні ізоляти.

Для підтвердження відношення мікроорганізмів до роду *Salmonella* використовували вісмут-сульфіт агар та S-S-агар (рис. 3.)



А.



Б.

Рисунок-3. Ріст сальмонел на селективних середовищах: А. – ріст на SS агарі, Б. – ріст на вісмут-сульфіт-агарі.

Для підтвердження відношення мікроорганізмів до роду *Shigella* використовували S-S-агар (рис. 4).

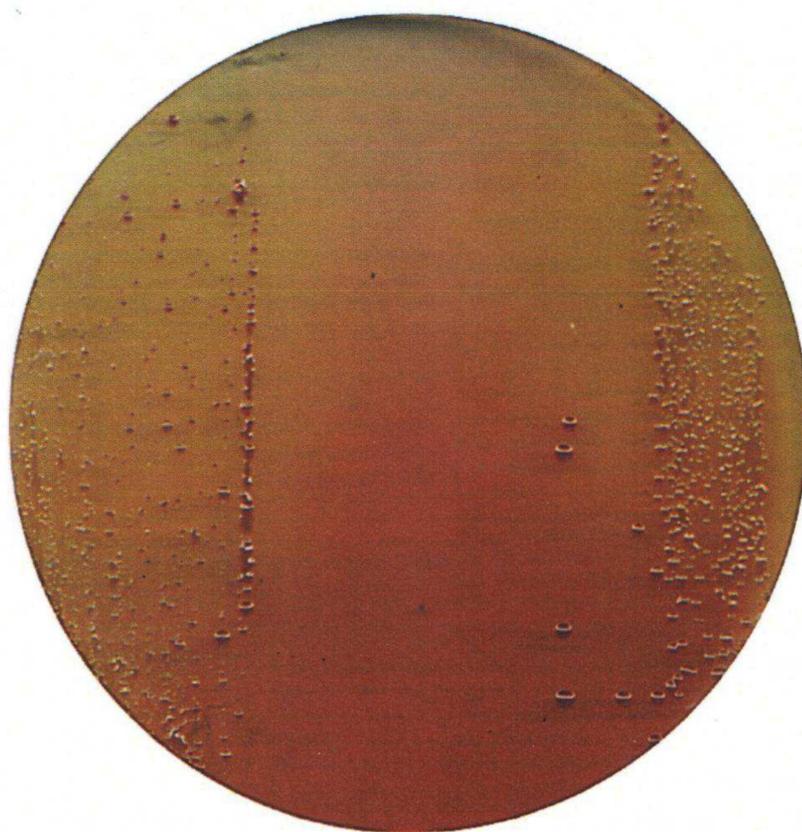


Рисунок-4. Ріст шигел на SSагарі.

Для підтвердження відношення мікроорганізмів до роду *Enterococcus* використовували ескуліновий агар з азидом (рис. 5)

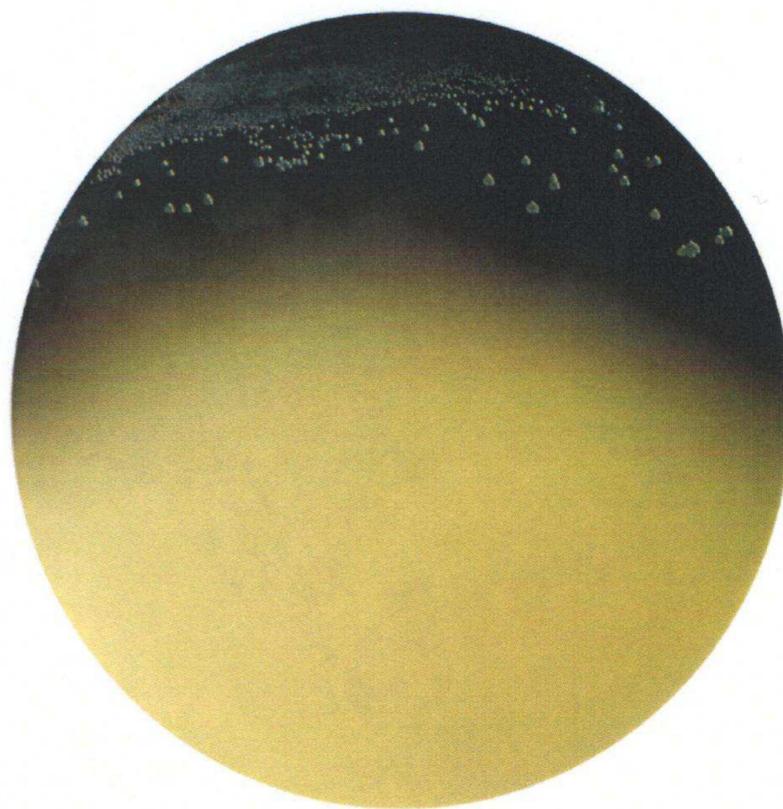


Рисунок-5. Ріст ентерококів на ескуліновому агарі.

При рості на поживних середовищах представники роду *Proteus* утворювали феномен «роїння» (рис. 6).



Рисунок-6. «Роїння» протею на поживному агарі для культивування мікроорганізмів.

Для культивування представників роду *Pseudomonas* застосовували псевдомонадний агар (рис. 7).



Рисунок-7. Ріст синьо-гнійної палички на псевдомонадному агарі.

Для культивування кишкової палички застосовували агар Ендо.

РОЗДІЛ 3

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА
СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ПІОФАГ® ТА
ІНТЕСТІФАГ® ВИРОБНИЦТВА ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», УКРАЇНА
ДЛЯ НЕОПРОБІОКЕАР ІНК., КАНАДА, ДО РЕФЕРЕНТНИХ ТА
КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ МІКРООРГАНІЗМІВ РІЗНИХ
ТАКСОНОМІЧНИХ ГРУП**

Встановлено, що фізичні характеристики досліджених препаратів відповідають показникам, зазначеними виробником, а саме: препарати ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ®, являють собою прозору безбарвну рідину, рН дослідного зразку становив – 7,1. Препарат є стерильним, не містить супутньої мікрофлори бактеріального походження.

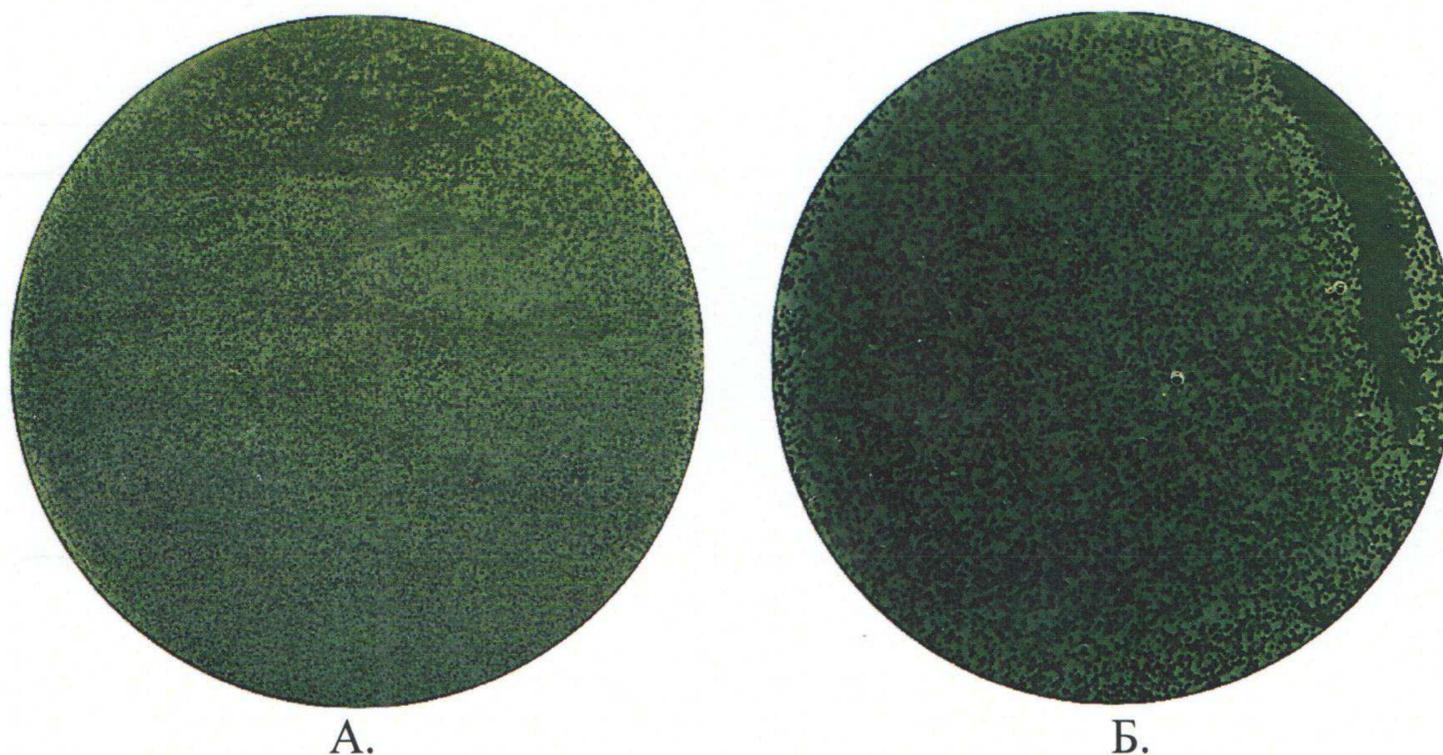
Отримані результати досліджень специфічної активності бактеріофагових препаратів на музейних штаммах (АТСС № 25923) та клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus* свідчать про те, що дослідні препарати мають виражену специфічну літичну дію по відношенню до використаних штамів (таблиця 1). 94 % клінічних ізолятів стафілококів виявилися чутливими до дії досліджуваних препаратів (16 із 17).

Таблиця 1

Специфічна активність бактеріофагових препаратів на музейних та клінічних штаммах *Staphylococcus aureus*

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату «ПІОФАГ®» (БТО/мл)	Літична дія препарату «ІНТЕСТІФАГ®» (БТО/мл)
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 25923	52×10^7	84×10^7
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 4	54×10^6	35×10^6
3.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 3699	$8,9 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 73	$5,5 \times 10^4$	$9,8 \times 10^4$
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1	$6,3 \times 10^6$	29×10^6

6.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1130	$9,1 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
7.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1092	$1,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
8.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1136	$3,9 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$
9.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 6538	$2,8 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
10.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 8	$2,5 \times 10^3$	$7,7 \times 10^4$
11.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 98	11×10^6	62×10^6
12.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 13	53×10^6	105×10^6
13.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 3	38×10^5	88×10^5
14.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1096	0	0
15.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1291	$1,5 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$
16.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 101	$1,4 \times 10^3$	$9,8 \times 10^3$
17.	<i>Staphylococcus aureus</i> № 1281	$5,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$



А.

Б.

Рисунок-8. Специфічна дія препарату ІНТЕСТИФАГ® на музейні штами (А) та клінічні ізоляти (Б).

Дещо менша активність препарату ІНТЕСТИФАГ® виявлена щодо іншого представника кокової групи – *Enterococcus faecalis*. Препарат ІНТЕСТИФАГ® проявляв літичну дію по відношенню до музейного штаму (АТСС № 29212) у високих титрах. Клінічні ізоляти виявилися менш чутливими до дії фагів. Специфічна активність проявлялася у 47 % випадків (таблиця 2).

Таблиця 2

Специфічна активність бактеріофагових препаратів на музейних та клінічних штаммах *Enterococcus faecalis*

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 29212	103×10^5
2.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 262	58×10^5
3.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 326	$3,9 \times 10^5$
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1431	$5,5 \times 10^5$
5.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1518	0
6.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3501	0
7.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3360	0
8.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 6783	67×10^5
9.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3285	0
10.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1515	0
11.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1249	0
12.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3012	44×10^5
13.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1398	0
14.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 165	76×10^5
15.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 1479	0
16.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3289	0
17.	<i>Enterococcus faecalis</i> № 3362	11×10^3

При дослідженні препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® на представниках родини Enterobacteriaceae отримані такі дані:

1. Найвищу чутливість виявляли представники роду *Salmonella*. 75 % використаних штамів виявилися чутливими до препарату ІНТЕСТІФАГ® (препарат ПІОФАГ® по відношенню до сальмонел не використовується) (таблиця 3).

2. Препарат ІНТЕСТІФАГ® також має специфічну активність по відношенню до клінічних ізолятів бактерій роду *Shigella* (препарат ПІОФАГ® до сальмонел не використовується) (таблиця 4). Невелика вибірка штамів не дала можливість детально оцінити ступінь чутливість даних бактерій.
3. З приводу роду *Escherichia* спостерігалася наступна картина – музейні штами бактерій (*E. coli* B ATCC 8739, *E. coli* C ATCC 3240, *E. coli* K 12 Fr+) проявляли 100 % чутливість, на противагу цьому лише невелика кількість клінічних ізолятів була чутливою до дії обох препаратів (3 штами з 21) (таблиця 5). Отримані дані можна пояснити складною антигенною структурою кишкової палочки та великою штамовою різноманітністю.
4. Клінічні ізоляти бактерій, що відносяться до роду *Proteus* (*Proteus vulgaris* та *Proteus mirabilis*) також мали низьку чутливість до обох фагових лікарських засобів, 6 з 8 досліджених штамів не піддавалися лізису (таблиця 6).

Таблиця 3

Специфічна активність препарату ІНТЕСТІФАГ® на клінічних ізолятах бактерій роду *Salmonella*

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>Salmonella infantis</i> № 65	61×10^4
2.	<i>Salmonella enteritidis</i> № 3	33×10^4
3.	<i>Salmonella infantis</i> № 1	0
4.	<i>Salmonella enteritidis</i> № 5272	$1,2 \times 10^3$
5.	<i>Salmonella enteritidis</i> № 720	54×10^4
6.	<i>Salmonella enteritidis</i> № 1	38×10^4
7.	<i>Salmonella typhimurium</i> № 17214	0
8.	<i>Salmonella typhimurium</i> №2859	81×10^4

Таблиця 4

**Специфічна активність препарату ІНТЕСТІФАГ® на клінічних
ізолятах бактерій роду *Shigella***

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>Shigella sonnei</i> № 1	$3,4 \times 10^3$
2.	<i>Shigella sonnei</i> № 1145	$1,5 \times 10^2$

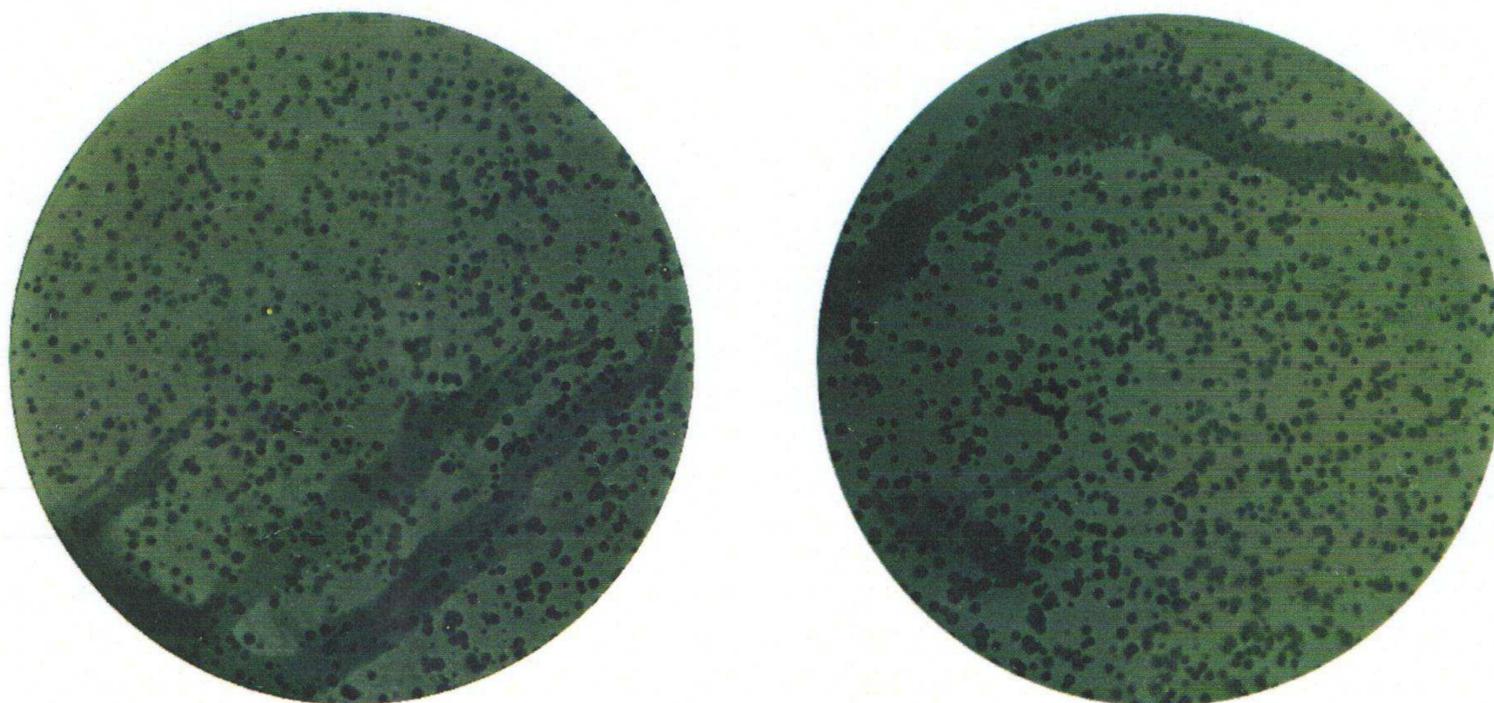


Рисунок-9. Специфічна дія препарату ІНТЕСТІФАГ® на клінічні ізоляти *Shigella sonnei*.

Таблиця 5

**Специфічна активність бактеріофагових препаратів ІНТЕСТІФАГ®
та ПІОФАГ® на музейних штаммах та клінічних ізолятах бактерій роду
*Escherichia***

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ПІОФАГ® (БТО/мл)	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>E. coli</i> B ATCC 8739	21×10^5	44×10^5
2.	<i>E. coli</i> C ATCC 3240	76×10^5	53×10^5

3.	<i>E. coli</i> K 12 Fr+	98×10^5	115×10^5
4.	<i>E. coli</i> № 3337	0	0
5.	<i>E. coli</i> № 2195	0	0
6.	<i>E. coli</i> № 8094	$5,0 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$
7.	<i>E. coli</i> № 3148	0	0
8.	<i>E. coli</i> № 3625	0	0
9.	<i>E. coli</i> № 327	0	0
10.	<i>E. coli</i> № 3469		0
11.	<i>E. coli</i> № 3285	0	0
12.	<i>E. coli</i> № 3471	0	0
13.	<i>E. coli</i> № 3625	0	0
14.	<i>E. coli</i> № 3479	16×10^3	8×10^3
15.	<i>E. coli</i> № 3511	0	0
16.	<i>E. coli</i> № 260	0	0
17.	<i>E. coli</i> № 3014	0	0
18.	<i>E. coli</i> № 2195		0
19.	<i>E. coli</i> № 1234	0	0
20.	<i>E. coli</i> № 8094	0	0
21.	<i>E. coli</i> № 3360	0	0
22.	<i>E. coli</i> № 360	79	56
23.	<i>E. coli</i> № 3376	0	0
24.	<i>E. coli</i> № 3339	0	0
25.	<i>E. coli</i> № 3428	0	0

Таблиця № 6

**Специфічна активність бактеріофагових препаратів ІНТЕСТІФАГ®
та ПІОФАГ® на музейних штаммах та клінічних ізолятах бактерій роду
*Proteus***

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ПІОФАГ® (БТО/мл)	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>Proteus mirabilis</i> № 748	45×10^5	79×10^5
2.	<i>Proteus vulgaris</i> № 2	69×10^6	88×10^6
3.	<i>Proteus mirabilis</i> № 3654	0	0
4.	<i>Proteus vulgaris</i> № 2633	0	0
5.	<i>Proteus mirabilis</i> № 3	0	0
6.	<i>Proteus vulgaris</i> № 5	0	0
7.	<i>Proteus vulgaris</i> № 4	0	0
8.	<i>Proteus vulgaris</i> № 7976	0	0

В результаті проведених експериментів, направлених на вивчення специфічної активності дослідних препаратів ІНТЕСТІФАГ® та ПІОФАГ® на 12 клінічних ізолятах та 1-му музейному штамі (АТСС 27853) *Pseudomonas aeruginosa* було встановлено, що дослідні бактеріофаги проявляють специфічну бактеріолітичну дію в 53,8% спостережень (таблиця 7).

Таблиця № 7

**Специфічна активність бактеріофагових препаратів ІНТЕСТІФАГ®
та ПІОФАГ® на музейних штаммах та клінічних ізолятах бактерій**

Pseudomonas aeruginosa

№ з/п	Культура бактерій	Літична дія препарату ПІОФАГ® (БТО/мл)	Літична дія препарату ІНТЕСТІФАГ® (БТО/мл)
1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 1	$5,2 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 27853	$3,3 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$

3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 55	0	0
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 2268	115	135
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 2	$1,9 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$
6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 2793	0	0
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 926	0	0
8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 1327	0	0
9.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 2293	98	122
10.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 927	$0,79 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
11.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 3	$1,2 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
12.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 1645	0	0
13.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 982	0	0

Виявлена в процесі експериментальних досліджень різна чутливість клінічних штамів *Salmonella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* до досліджуваних бактеріофагів виразно вказує на гетерогенність популяцій циркулюючих видів зазначених мікробів. Зважаючи на це, необхідно постійно оновлювати виробничі штами даних мікроорганізмів, які використовуються для отримання бактеріофагових препаратів, у відповідності до сучасної картини циркулюючих штамів на певній території, зокрема в Україні.

РОЗДІЛ 4.

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕПАРАТІВ ПІОФАГ® ТА ІНТЕСТІФАГ® ВИРОБНИЦТВА ТОВ «ФАРМЕКС ГРУП», УКРАЇНА ДЛЯ НЕОПРОБІОКЕАР ІНК., КАНАДА

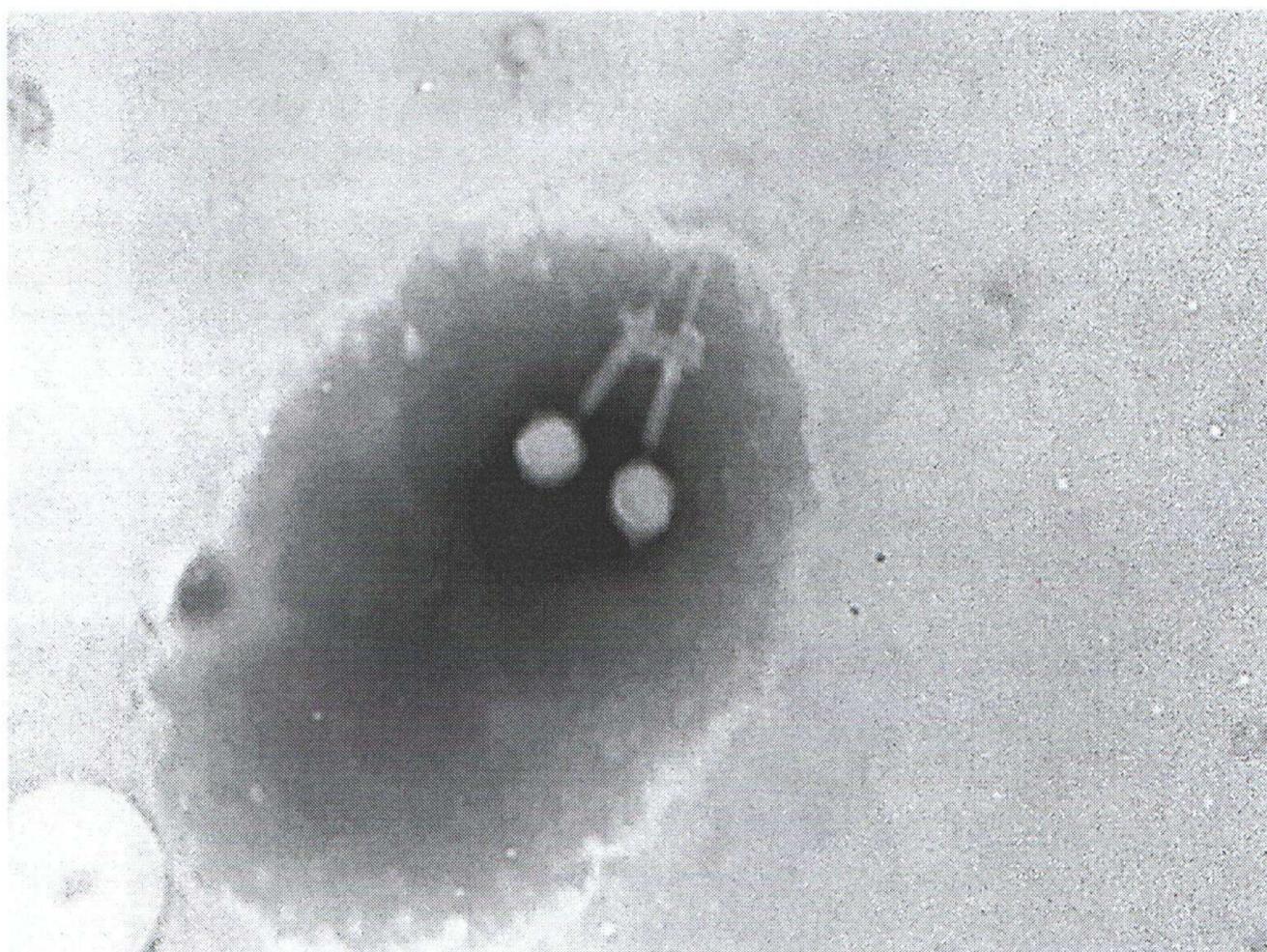
Об'єктом електронно-мікроскопічних досліджень слугували препарати ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ®.

В результаті проведених експериментів в обох препаратах виявлено бактеріофаги. Слід відмітити, що досліджуваний матеріал не підлягав жодній попередній обробці (очищенню, концентрації, культивуванню тощо). Це дає змогу стверджувати, що концентрація досліджуваних біологічних об'єктів складає не менше як 10^6 - 10^7 вірусних часточок в 1 мл.

Встановлено, що до складу обох зразків входять бактеріофаги, які належать в основному до шостого морфологічного типу, це ДНК бактеріофаги з довгим хвостовим відростком, чохол якого здатен до скорочення, в результаті чого на електроннограмах виявляється внутрішній стержень відростка.



А.

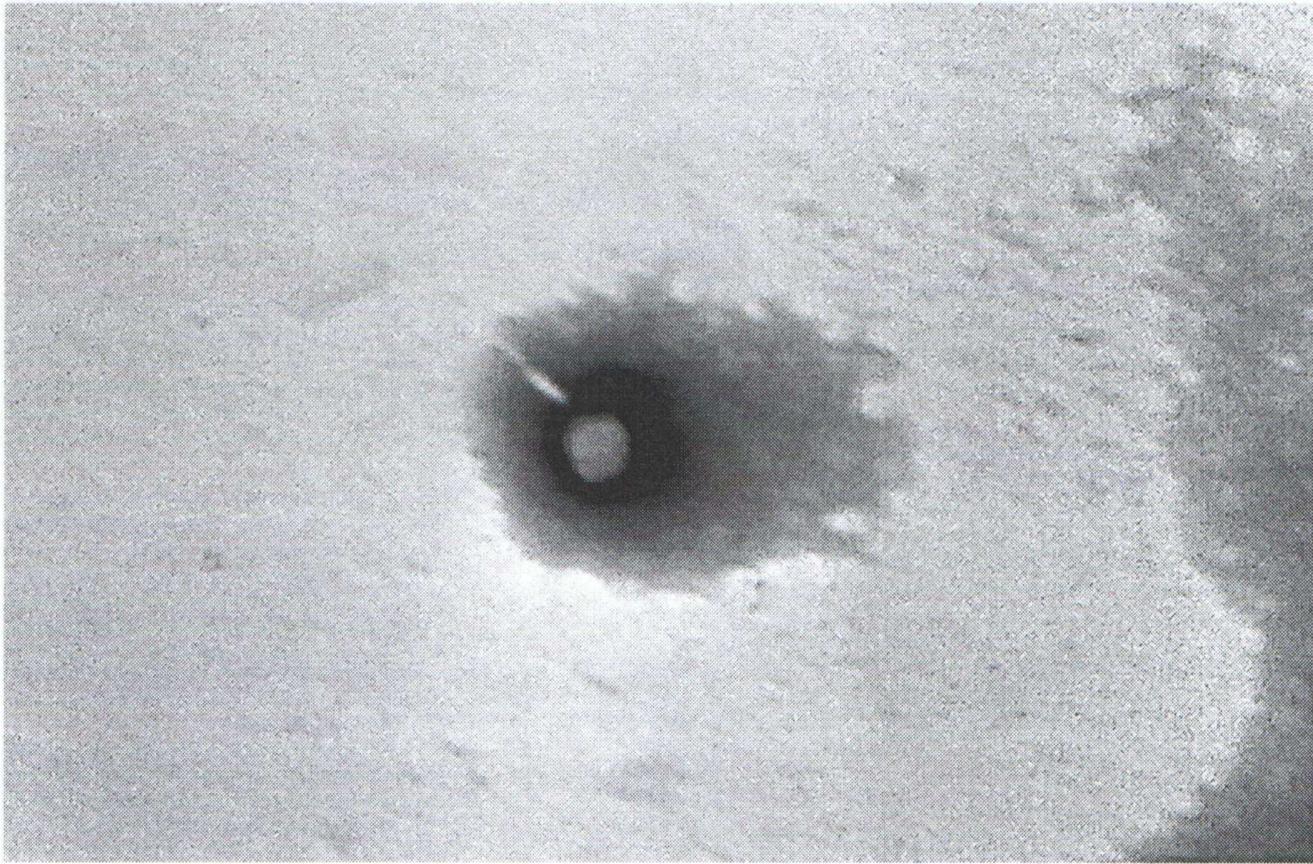


Б.

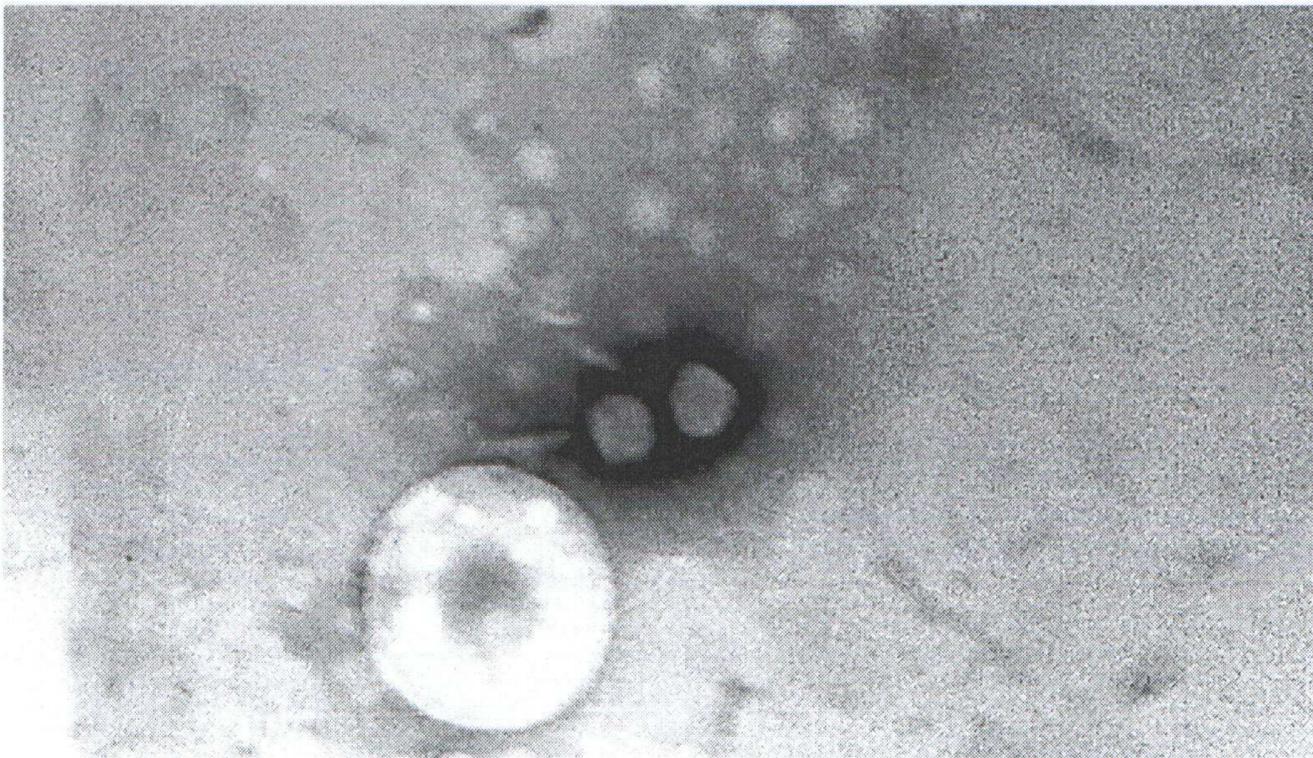


В.

Рисунок-10. Електронна мікроскопія. Бактеріофаги (ІНТЕСТИФАГ®).
Збільшення 45 000.



А.



Б.

Рисунок-11. Електронна мікроскопія. Бактеріофаги (ПІОФАГ®). Збільшення 45 000.

Крім того, проведена електронна мікроскопія досліджуваного та контрольного бактеріофагів, дала змогу встановити, що дослідний зразок на 85-95 % складають вірусні часточки, сформовані «повноцінними» віріонами, тобто віріонами які містять нуклеїнову кислоту і лише в 5-15 % виявлених вірусів відмічаються так звані «пусті» форми вірусів з втраченим геномом. Ці віруси не мають інфекційної активності щодо клітини хазяїна, в даному випадку бактеріальних клітин

сальмонел. У контрольному препараті частка «пустих» форм вірусів була близько 10 %.

Електронно-мікроскопічними методами не було виявлено контамінації дослідного та контрольного зразків мікроорганізмами вірусної чи бактеріальної природи, а також іншими забруднюючими компонентами. Досліджувані зразки містили лише бактеріофаги різних морфологічних типів.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених експериментів було вивчено автентичність і специфічну активність препаратів ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® компанії «Neo Probio Care Inc» по відношенню до референтних та клінічних ізолятів *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

1. Доведено, що дослідні препарати ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® проявляють не однакову специфічну активність по відношенню до бактерій різних таксономічних груп. Літична дія бактеріофагів, що входять до складу препаратів, виявлялася за феноменом «бляшкоутворення» на щільному поживному середовищі. Низька чутливість деяких бактеріальних представників до фагів вказує на необхідність в подальшому корекції препаратів з урахування актуальних для України штамів.

Отже, препарати ПІОФАГ® та ІНТЕСТІФАГ® компанії «Neo Probio Care Inc» можуть розглядатись як перспективні препарати швидкої бактерицидної дії за умов постійного оновлення фагового складу.

2. В результаті проведених електронно-мікроскопічних експериментів встановлено наявність типових фагових часток в складі препарату в концентрації не менше 10^6 - 10^7 одиниць в 1 мл.

Крім того, встановлено, що дослідний зразок на 85-95 % складають вірусні часточки, які сформовані повними віріонами, які містять нуклеїнову кислоту, і лише в 5-15 % – виявлених вірусів відмічаються так звані «пусті» форми вірусів з втраченим геномом. Зважаючи, що пусті форми з'являються при тривалому зберіганні, це є свідченням нативності препарату

На підставі проведених досліджень можна рекомендувати препарати для клінічного вживання. Разом з тим, вважаємо доцільним просити виробника збільшити спектр бактеріофагів до кишкової палички та протей, враховуючі не велику кількість чутливих штамів до даних препаратів.

Використана література:

1. Лыско К.А. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: краткий обзор // Лыско К.А., Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В. / Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». –Том II– 2013. – Ульяновск. – с. 30-36.
2. Стефанов А.В. Доклинические исследования лекарственных средств: Методические рекомендации. – К.: Авиценна, 2002. – 568 с.
3. Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г. “Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений”.
4. Функер Е.В., Микробиологические и технологические аспекты разработки комплексного препарата бактериофагов: Автореф. дисс. канд. мед. наук/2004-20с.
5. Мінер О.П., Вороненко Ю.В., Власов В.В. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині. – К.: Вища шк., 2003. – 350 с.
6. ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ. Бактериофаги. лечебно-профилактические. ОФС.1.7.1.0002.15. – 14 с.