

Phages Attack

A History of Bacteriophage Production and Therapeutic Use in Russia

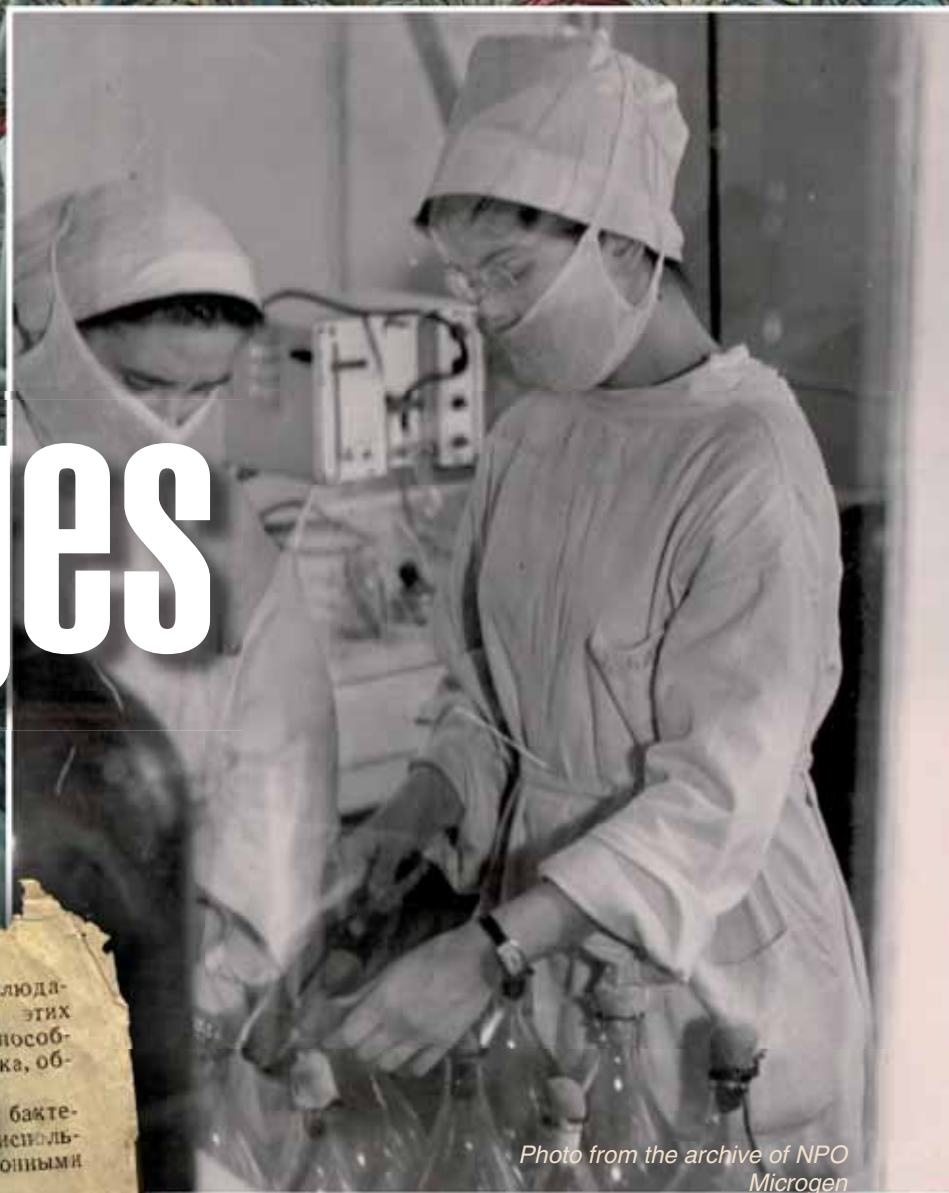


Photo from the archive of NPO Microgen

In Russia, bacteriophages have been produced and used for medical purposes for almost 80 years: during World War II, phages saved lives of thousands of wounded soldiers and prevented a cholera epidemic in the besieged Stalingrad before the famous Battle of Stalingrad. The development and widespread use of antibiotics virtually wiped out the production of bacteriophages worldwide; for decades, the Soviet Union had been the only country where bacteriophage technology not only continued to evolve, but a whole industry was built around it. Today, Russia remains the world leader in the production and therapeutic use of these effective and safe antibacterial agents



Left to right:
Tatyana V. PRISADA, Cand. Sci. (Med.), Head of the Bacteriophage Production Unit at the ImBio company (Nizhni Novgorod), a producer of bacterial preparations and a subsidiary of NPO Microgen;
Marina G. EFIMOVA, Cand. Sci. (Med.), Head of the Bacteriophage Department, NPO Biomed (Perm), a subsidiary of NPO Microgen;
Alexandra N. DABIZHEVA, Cand. Sci. (Med.), Head of the Marketing and Promotion Department, NPO Microgen, Russian Ministry of Health (Moscow);
Natalia N. VOROSHILOVA, Dr. Sci. (Med.), Head of the Bacteriophage Production Unit at the Immunopreparat company (Ufa), a subsidiary of NPO Microgen

The cooperation between two outstanding scientists—Félix d'Hérelle from France and George Eliava from Georgia—fructed into the world's first and only research center of bacteriophagology, which was set up in the Soviet Union in the 1920s. Despite political repressions, as a result of which its first director, Eliava, was shot and some of its staff were sent into exile, the Institute of Bacteriophages (Tbilisi, Georgia) survived and persisted to become the world's leading center of therapeutic research and production of these bacterial killers.

Soviet bacteriophages were first used on a mass scale in emergency situations caused by the outbreaks of bacterial infections in the late 1930s. Thus, in 1938 there was a cholera epidemic in several areas of Afghanistan near the Soviet border. To prevent the spread of this serious bacterial disease, it was decided to use the cholera bacteriophage. The phage drug was given to the local population and put into wells and ponds. As a result, not a single case of cholera was recorded on the Soviet territory.

Key words: phage therapy, choleraic bacteriophage, treat for injuries, battle of Stalingrad, Research and Production Association "Microgen"

However, a truly serious test for bacteriophages was still ahead, when the Soviet Union was at war with Finland in 1939–1940. Before the discovery of antibiotics, the fate of a wounded soldier during a military campaign often depended on whether the wound was infected. An integrated team of 11 people, including surgeons, bacteriologists and laboratory assistants, began to use bacteriophage drugs developed and produced at the Tbilisi

© A. N. Dabizheva, N. N. Voroshilova,
T. V. Prisada, M. G. Efimova

М. П. ПОКРОВСКАЯ, Л. С. КАГАНОВА, М. А. МОРОЗОВ
А. Г. БУЛГАКОВА, В. Е. СКАЦЕНКО

ЛЕЧЕНИЕ РАН БАКТЕРИОФАГОМ

Бактериофаг является хорошим вспомогательным средством в руках хирурга в профилактике и лечении раневых инфекций и должен занять подобающее ему место в арсенале медицинских средств для лечения ран.

Книга М. П. Покровской и ее сотрудников будет полезным пособием, которое даст возможность освоить новый высокоэффективный метод.

Док. младший Санитарного управления Красной армии
Бригадир Журавлев

НАРКОМЗДРАВ СССР
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
«МЕДИГИЗ»
МОСКВА 1941 ЛЕНИНГРАД

на них сближающих иннов после освобождения от патогенных бактерий при помощи бактериофага. Ускорение процесса заживления ран имеет огромное практическое значение. При этом несколько случаев успешной фатотерапии, проведенной бригадой хирургов под руководством проф. А. П. Сулукидзе.

Случай 6. Большой В-ом. Перелом лопатки, обширная рана, размером 20 × 12 см, глубиной 4 см с гнойным налетом. В ране обнаружены гемолитические стрептококки и негемолитические стафилококки, прекрасно лигирующиеся бактериофагами. Лечение начато на 4-й день после ранения. Сделано пять орошений и три подкожные инъекции смеси стафилококкового и стрептококкового бактериофагов. На 11-й день на рану наложены швы, после снятия которых осталась узкая гранулирующая полоска, шириной в 1–1,5 см. В этом случае удалось обработкой бактериофагом достигнуть заживления раны и через 16 дней, на что при обычных методах лечения потребовалось бы 1,5–2 месяца (рис. 2).



2. Сближающие швы на ране, обработанной бактериофагом.

Случай 7. Большой В-ом. Рана мягких тканей бедра, размером 8 × 10 см, глубиной 4 см с гнойным налетом. В ране обнаружены гемолитические стафилококки, гемолитические и негемолитические стрептококки, прекрасно лигирующиеся московскими и тифлискими стафилококковым и стрептококковым бактериофагами. Сделано подкожно по 10 см³ и три подкожные инъекции. На 5-й день после ранения бактериофагом наложены швы. Заживление раневых тканей. Только в одном промежутке шов разошелся, оставив узкую рану, которую в 0,5 см шириной. На 16-й день большой эластичный шов.

39

ПРЕДИСЛОВИЕ

В книге изложен опыт применения бактериофага при лечении ран во время войны с белофиннами, представлена методика применения бактериофага и результаты лечения им ран.

Высокая эффективность бактериофага в профилактике и лечении дизентерии, а также опыт ряда хирургов по применению бактериофага при лечении гнойных инфекций дали право д-ру Покровской предложить это средство и для лечения ран в военно-полевой обстановке. Полученные результаты представили убедительные доказательства ценности этого начинания.

С тех пор прошло больше года. За это время накоплен большой опыт применения бактериофага в хирургии. Тысячи больных с помощью бактериофага быстро восстановили свое здоровье, а сотни бактериофаг спас жизнь.

Конференция по бактериофагу, состоявшаяся в декабре 1940 г., записала в своих резолюциях, что бактериофаг «в ряде случаев с успехом применен в качестве активного средства борьбы с гнойными инфекциями, что, несомненно, имеет оборонное значение».

Истекший после конференции период показывает дальнейшее, все ускорение его применения.

Хирургический препарат бактериофага после ранения и т. п., а также в профилактике ран.

Понятно, что такое антисептическое средство в каждом случае ранения.

В то время септические раневые процессы, особенно в ране, бывают только тогда, когда в рану попадают бактерии.

2. Лечение ран



This unique publication summarizes the experience in the use of bacteriophages to treat wounds and purulent infections in the military field conditions during the Russian–Finnish war of 1939–1940.

Photo: the title page, the preface and an illustration from the book *Treatment of Wounds with Bacteriophage*, Moscow: USSR People's Commissariat of Public Health (Narkomzdrav), 1941

Institute to save the soldiers wounded in the war with the White Finns.

They found that a relatively small amount of bacteria get into the tissue at the time of wounding, and those bacteria could be easily destroyed by bacteriophages during the first hours, when the bacteria were still on the wound surface. In most cases, an early treatment of wounds with bacteriophages prevented suppurative processes in tissues and led to faster healing.

As a result, the use of staphylococcal and streptococcal bacteriophages helped clean wounds from bacteria in more than half of the cases and achieve a complete sterilization of the wound in 30–40% of the patients. The elimination of infection through the use of bacteriophages allowed surgeons to suture the wound a week earlier, thus accelerating the healing process. Bacteriophages also proved effective in treating acute inflammatory processes (phlegmons, tendovaginitis, abscesses, etc.); in most cases, the treatment was conservative, without large incisions.

All these results showed the great importance of the prevention of purulent complications in wounds through the use of bacteriophages, which were not only completely harmless but also widely available, inexpensive and easy-to-manufacture therapeutic agents.

Bacteriophages in the Battle of Stalingrad

The further history of phage therapy is associated with the tragic events of World War II in 1941–1945. In those years, with a total lack of antibacterial drugs (at the beginning of the war, the Soviet Union did not have a technology to produce penicillin), it was decided to organize mass production of bacteriophages to treat infections in the soldiers of the Red Army.

Particular attention was given to phages that destroy bacteria causing intestinal infections such as cholera, typhoid, dysentery, salmonellosis, etc. The reason was the inevitable lack of hygiene in the field conditions. Later,

In the early stages of industrial production of phage drugs, bacteriophages were grown in large glass containers such as three-liter bottles

“Mass production of bacteriophages for practical purposes requires enormous attention and diligence as well as in-depth theoretical knowledge on the part of the bacteriologist who organizes this production. The isolated bacteriophages must be thoroughly examined before they are put into production. It is only active bacteriophages, which double the number of corpuscles in about 10 minutes – a criterion for the high virulence of a bacteriophage race – that have therapeutic value. The bacteriophage must dissolve the majority of strains of a given bacterial species from most diverse sources and from various locations.

“The bacteriophage must have good viability. The virus must be cultivated on freshly isolated bacterial strains that have undergone as few passages in artificial media as possible.

Given that the individual properties of different bacteriophage races are largely different, therapeutic products should use a mix of several virulent races of a given bacteriophage. The bacteriophage must be thoroughly controlled after the production. The control must ensure the high quality of the product, its sterility, and the absence of harmful effects when the product is administered into the body.

“The vials used for bottling the bacteriophage must be made of highest-grade glass that does not emit alkali; otherwise, the pH of the liquid will change over time and the bacteriophage may die. Provided that the bacteriophage is properly prepared at the highest scientific level, health professionals are armed with an extremely valuable weapon to fight various infectious diseases” (Pokrovskaya *et al.*, 1941)

и поэтому время от времени запасы бактериофага нужно повторно проверять, чтобы для практической работы всегда давать только высококачественный препарат.

ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Для лечения хирургических заболеваний в СССР изготовляются различные бактериофаги: стафилококковый, стрептококковый, синегнойный, энтерококковый, бактериофаги против кишечной палочки, против возбудителей газовой гангрены и др. Эти бактериофаги употребляются в тех случаях, когда бактериологическое исследование точно установило вид микроорганизма, обуславливающего данный инфекционный процесс. В тех случаях, когда бактериологическое исследование не произведено или процесс вызывается несколькими видами микроорганизмов, д'Эрелль предложил применять смеси из бактериофагов, не дожидаясь постановки точного бактериологического диагноза. Смеси бактериофагов дают возможность в практической обстановке применить бактериофаг немедленно. Д'Эрелль предлагает в хирургической практике употреблять смесь из стафилококкового, стрептококкового, паракишечного, энтерококкового, протейного и синегнойного бактериофагов. Эту смесь д'Эрелль назвал пиофагом.

При применении пиофага в больном организме «работают» (лизируют) только те бактериофаги, которые встретились с соответствующими их литической специфичности бактериями, обуславливающими данное заболевание. Остальные бактериофаги, имеющиеся в смеси, остаются инактивными; никакого вреда организму они не принесут и через некоторый небольшой срок будут выделены из организма.

При отсутствии готового пиофага можно самим сделать смесь из имеющихся в распоряжении хирурга бактериофагов. Желательно составлять смеси таким образом, чтобы не включать в них лишние бактериофаги. Например, бактериологическими исследованиями установлено, что в первые часы после ранения из аэробных микробов в ране чаще всего обнаруживаются стрептококки и стафилококки. Протей и синегнойная палочка появляются в ранах значительно позже. Поэтому лечение свежих ран можно производить смесью из стрептококкового и стафилококкового бактериофагов, не включая в нее протейного и синегнойного. Нужно иметь в виду, что в очень сложных смесях происходит, по нашим наблюдениям, ослабление отдельных компонентов, что снижает лечебные качества препарата. Подробно об этом сказано ниже, в

18

As shown by the experience of the Russian–Finnish War, the use of bacteriophages to treat wounds enabled surgeons to suture the wounds a week earlier, which accelerated the healing process.

Photo: pages from the book *Guidelines to Surgical Treatment Methods*, Moscow: USSR People's Commissariat of Public Health (Narkomzdrav), 1942

hospitals began to use the wound infection bacteriophages that proved effective during the Russian–Finnish war. These drugs helped reduce the stay of a wounded soldier in a field hospital to a week. In total, during the war years, the production units established by Soviet bacteriological institutions manufactured more than 200,000 liters of wound bacteriophages for the Soviet army!

These organizations not only produced tons of phage drugs; they did a huge amount of research. The reason was that nutritional microbiological media were made from meat, which was in deficit during the war. Therefore, concurrent with the production, researchers had to find, as quickly as possible, new ways to prepare nutritional media, and they learned how to make them from placenta, casein and even blood clots.

It was bacteriophages (namely, the cholera bacteriophage) that became a key to success in the famous Battle of Stalingrad, the decisive battle of World War II. Cholera had always been an inevitable companion of armies at war. For instance, during the Sevastopol campaign of 1854–1855, the Anglo–French troops lost 73,000 men in military operations and 18,000 due to cholera! At Stalingrad in the summer of 1942, there was an outbreak of cholera on the territory occupied by German troops. On the one hand, it was an unexpected ally; on the other hand, it was a direct threat because the epidemic would not stop at the front line.

ЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГА

Мы могли убедиться, что Московский институт имени Мечникова и Тбилисский институт бактериофагии изготовляют препараты высокого качества (табл. 1).

Таблица 1

Лизирующая активность бактериофагов in vitro по отношению к микроорганизмам, выделенным из ран (в %)

Вид бактерий	Лизировано	Не лизировано
Гемолитические стафилококки	68,8	31,2
Негемолитические	50	50
Гемолитические стрептококки	84,5	15,5
Синегнойная палочка	50	50
Протей	24	76
Энтерококки	50	50

Литической активности бактериофагов сделан на основании исследований. Это дает материал для оценки качества бактериофагов, предназначенных для хирургическими инфекциями. В графе «Лизировано» учтены только случаи полного лизиса. Лизис менее отчетливый на



This counting and filling machine for the packaging of bacteriophage drugs was designed at the plant in the city of Gorky (now Nizhny Novgorod)



Soviet microbiologists implemented an inventive idea to produce an integrated phage drug, which was called by its author—Félix d'Hérelle himself—pyophage (from pyo meaning 'purulent'). The goal of combining several bacteriophage species targeting different bacteria was to expand the combat spectrum of the drug. This was particularly important for wounds: the injured area is infected by a variety of bacteria, and emergency prevention and treatment of already festering wounds is best done by different bacteriophages. The same principle was later used in the creation of intesti-bacteriophages, i. e., combined Russian drugs based on intestinal phages, which are still widely used for mass prevention and treatment of intestinal infections



Утверждаю
Начальник Санитарного управления
Красной армии
врач Е. И. Смирнов
6.VII.1941 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПРИМЕНЕНИЮ БАКТЕРИОФАГА В ХИРУРГИИ

Общие сведения

Препарат бактериофага представляет собой прозрачную массу, содержащую бактериофаг, обладающий способностью уничтожать патогенные микробы. Кроме бактериофага в жидкости содержатся безвредные для организма кожные продукты растворения тех микробов, из которых выделен препарат.

Бактериофаг выпускается в ампулах или герметически закрытых флаконах. На этикетке приводится название бактерии, указывающее, против каких бактерий действует данный препарат.

Время для применения в хирургической практике следующие препараты: стафилококковый, протейный, синегнойный, колифаг и бактериофаг 4 возбудителей анаэробной инфекции (бацилла, вибрион септика, гистолитикус) как по отдельности, так и в смеси.

Бактериофаг выпускается также препарат, называемый «Бактериофаг-4», состоящий из смеси нескольких бактериофагов. Этот препарат преимущественно стафило- и стрептококковый. Фаги против возбудителей анаэробной инфекции в состав бактериофага не входят. При введении препарата следует применять только острый специальный обозначение на этикетке, указывающее на специальных средах, содержащих белок.

Бактериофагом перед употреблением следует проверить его содержимое, должно оставаться

в ампулах или флаконах. При прогрессировании инфекции показано также внутривенное введение стрепто- и перфрингенс-фагов в количестве 30–50 см³ каждого в смеси с физиологическим раствором до 300 г в подопретом виде.

12. Лечение бактериофагом не исключает применения противогангренозных сывороток, так как они действуют анти-токсически.

13. При тяжелых септических состояниях при метастатических гнойниках допускается внутривенное введение бактериофага от 30 до 50 см³. Этот способ должен применяться с большой осторожностью, так как может сопровождаться тяжелой реакцией как во время инъекции, так и после нее в ближайшие 2–4 часа. Реакция выражается ознобом, затрудненным и учащенным дыханием, появлением цианоза, падением кровяного давления. Поэтому внутривенное введение допускается лишь в стационарной обстановке и при возможности последующего тщательного наблюдения за больным в течение первых суток.

Вводят 30–50 г смеси равных количеств стафило- и стрептофагов в вену при помощи шприца, медленно (в течение 15–20 минут). Внутривенное введение бактериофага рекомендуется делать в разведении с физиологическим раствором — 300,0 в подопретом виде. Внутривенное введение повторяется 2–3 раза с промежутком в 1–2 дня.

Для борьбы с тяжелой реакцией применяется лобелин, кофеин, камфора, кислород, углекислота и согревание тела.

Главный хирург Красной армии
академик Бурденко

As shown by these guidelines for practicing surgeons, which were published at the beginning of World War II, by that time bacteriophages had become a recognized antibacterial agent and were recommended for use in surgical practice to treat wounds and acute infectious and inflammatory processes. Photo: the title page and preface to the book *Guidelines to Surgical Treatment Methods*, Moscow: USSR People's Commissariat of Public Health (Narkomzdrav), 1942

ГЛАВНОЕ ВОЕННО-САНИТАРНОЕ УПРАВЛЕНИЕ
КРАСНОЙ АРМИИ

ИНСТРУКЦИИ ПО МЕТОДАМ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

начальника Главного военно-санитарного управления
Красной Армии корврача Е. И. СМЕРНОВА

и
главного хирурга Красной Армии
корврача акад. Н. Н. БУРДЕНКО

Издание второе, исправленное
и дополненное

НАРКОМЗДРАВ СССР
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ «Медгиз»
МОСКВА — 1942

It was important to assess the risks on site, and this task was assigned to Prof. Zinaida Ermolieva from the Institute of Experimental Medicine (Moscow), who had already had an experience of working with bacteriophages under battlefield conditions. (By the way, it was Ermolieva who obtained in the same year 1942 the first Soviet penicillin (*krustozin VIEM*), which began to be used extensively in military hospitals by the end of World War II.)

To obtain *Vibrios cholerae*, one needed “material,” i.e., corpses of those who died from cholera. Berlin began to receive bizarre messages: dead bodies were disappearing from German field hospitals. The corpses were stolen and carried over the front line by Soviet scouts. However, the *Vibrios cholerae* that were sent to a factory in the city of Gorky (Nizhny Novgorod) were too weak to be used for the industrial cultivation of bacteriophages. The factory did a great deal of work to infect rabbits and cultivate the necessary pathogenic bacteria and their bacteriophages. Unfortunately, the train with the phage drugs, which had

been so difficult to obtain, was bombed out by German aircraft. Therefore, Ermolieva organized in besieged Stalingrad an underground secret laboratory for the production of the cholera bacteriophage directly. The drug was given to nearly 50,000 people every day.

At the end of 1942, Zinaida Ermolieva received a direct call from the Commander-in-Chief Iosif Stalin, who asked her: “Is it safe to keep more than a million people at Stalingrad? Can the cholera epidemic interfere with the military plans?” The bacteriologist said that she had already won a victory at her front, now it was the time for the Red Army.

These events marked the beginning of the mass use of bacteriophages in the Soviet Union. Notably, this happened at the time when the world switched to antibiotics, which were discovered by a British scientist Alexander Fleming in 1928.

Contemporary history

The history of bacteriophages on the Soviet territory continued after World War II. Up to now, bacteriophage drugs have been successfully produced by Russian companies that make immunobiological products.

Currently, NPO Microgen, Russia's largest producer of such products, a state company under the Russian Ministry of Health, produces 14 drugs containing bacteriophages targeted at the most common pathogens of bacterial infections. They are used for the prevention and treatment of acute intestinal infections (dysentery, typhoid, salmonella, etc.) and for the treatment of purulent-septic and other diseases of various localization: surgical infections, diseases of the ear, nose, throat, lungs and pleura, urogenital pathologies, gastroenterocolitis, intestinal dysbacteriosis, and infectious diseases in newborns and infants. The drugs have been produced at three plants associated with microbiological institutions: in Ufa since 1939; in Gorky since 1941; and in Perm since 1995.

Of course, the bacteriophage cultivation technology has largely improved since the times of World War II. The companies now use a reactor cultivation technology and optimized growth media. Particular attention is paid to the cleaning of bacteriophages from ballast components. To this end, the producers use ultrafiltration, which increases the safety of the drugs.

Bacteriophages are currently produced in Russia on an unprecedented scale, like nowhere else in the world. Bacteriophages are manufactured as high-grade drugs, and the consumption of these antibacterial agents in Russia is more than 1 billion packs per year. However, it was only in 2016—one century after the discovery of bacteriophages!—that these drugs were included into the official Russian pharmacopoeia.



Глубинное выращивание бактериофага в реакторах –
важный этап в развитии производства фагов



One of the latest examples of the preventive use of Russian bacteriophages on a mass scale flood relief programs.

For instance, in 2013, about 70,000 doses of intesti-bacteriophage, which targets a broad spectrum of bacteria causing gastrointestinal disease, were delivered to the regions of the Russian Far East. In 2014, more than 8,000 packages of this drug were sent, together with dysentery and salmonella bacteriophages, to the Altai Krai and the Republic of Khakassia, which had also suffered from floods.

Thus, phage drugs have been and still are a means of rapid response to bacterial threat at the gravest moments in the Russian history. The culture of producing and using these antimicrobial agents, which has been preserved through the creative and selfless work of Russian scientists, is particularly valuable now, in the light of the rapidly growing bacterial resistance to antibiotics.

An important step in the development of industrial bacteriophage production was to design a technology of deep cultivation in fermenters (left). This method, which allows broad variations in the composition of the nutrient medium to achieve the maximum yield of the target product with minimal manual labor, is still successfully used at the plants of NPO Microgen (above)

References

Pokrovskaya M. P., Kaganova, L. S., Morozenko M. A., et al. *Lechenie ran bakteriofagom (Treatment of Wounds with Bacteriophage)*. Moscow: USSR People's Commissariat of Public Health (Narkomzdrav), Medgiz. 1941 [in Russian].

Instruktsiya po metodam khirurgicheskogo lecheniya (Guidelines to Surgical Treatment Methods). Moscow: USSR People's Commissariat of Public Health (Narkomzdrav), Medgiz. 1942 [in Russian].

This article uses illustration materials from the archive of NPO Microgen and from the books "Treatment of Wounds with Bacteriophage" (1941) and "Guidelines to Surgical Treatment Methods" (1942)

The editors thank B.A. Ryzhikov (NPO Microgen) for his help in preparing this article