

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НЕТРАНСДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ КИШЕЧНОГО ЭШЕРИХИОЗА СВИНЕЙ

Скобликов Н.Э., кандидат медицинских наук

ГНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт
животноводства Россельхозакадемии (СКНИИЖ)

тел. 8(918)4989891, skoblikow@yandex.ru

Зимин А.А., кандидат биологических наук

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина
РАН (ИБФМ РАН)

8(4967)730479, zimin@ibpm.pushchino.ru

Ключевые слова: бактериофаги, трансдукция, колибактериоз, свиньи, биобезопасность, фаготерапия, фагопрофилактика

Проведено сравнительное исследование различных схем применения нетрансдуцирующих фагов для поросят с пост-отъёмным синдромом в целях повышения сохранности поголовья, сокращения продолжительности протекания пост-отъёмной диареи, улучшения показателей динамики коли-титра. Установлено, что оптимальной схемой является их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста.

Введение. Начиная с первой работы по изучению эффективности применения бактериофагов в лечении эшерихиозной диареи свиней [1], опубликовано значительное количество исследований, посвящённых исследованиям фаготерапии инфекций, вызванных представителями семейства *Enterobacteriaceae* и вида *Escherichia coli* в частности [2]. Несмотря на высокую эффективность бактериофагов в отношении данной группы возбудителей [3], на пути широкого распространения бактериофагов возникает ряд проблем, среди которых одной из самых серьёзных является их способность к трансдукции и изменению генетических свойств в сторону расширения арсенала факторов патогенности [4].

В медицине важность определения трансдуцирующего потенциала фагов [5] признана одним из критериев отбора эффективных и безопасных бактериофагов [6], в то время как важность этого признака в аналогичных работах исследователей в области ветеринарии до последнего времени обходили вниманием. Тем более, отсутствуют данные по изучению эффективности нетрансдуцирующих бактериофагов на моделях инфекций сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы исследований. Получение препаративных количеств нетрансдуцирующих фагов, отобранных из обширной рабочей коллекции в ходе предыдущих работ, реализовывали с помощью методов биотехнологии. Всего было отобрано пять фагов. Для подбора оптимальной схемы применения *in vivo* был взят один фаг (условный лабораторный № 3), выделенный из одного из природных водоёмов Приморского края, идентифицированный как фаг T4-типа семейства *Myoviridae*, отрицательный по наличию гена *hoc* (гена, кодирующего иммуноглобулиноподобный белок капсида).

После инкубации на культуре *E.coli* B, фаг был сконцентрирован методом центрифугирования, в результате чего была получена опытная партия экспериментального фагового препарата в виде взвеси фаговых частиц. Титр фага определяли методом агаровых слоёв

контрольным высевом на культуру чувствительного штамма *E.coli*, измеряя его в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл взвеси. Концентрация фага в полученных таким образом экспериментальных препаратах колебалась в пределах от $1,0 \times 10^9$ до $1,4 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

Опыт *in vivo* был проведён на поросятах породы СМ-1. Были сформированы 7 групп животных (по 30 голов в каждой группе), отличающиеся по возрасту первого приёма экспериментального фагового препарата: группы №№ 1-2 – на 28-й день, группы №№ 3-4 – на 19-й день, группы №№ 5-6 – на 10-й день. В состав группы № 7 (контрольной) входили гнёзда с поросятами всех возрастов. Животным групп №№ 1-6 вводился экспериментальный фаговый препарат *per os* из расчёта $1,0 \times 10^{10}$ БОЕ (группы №1, №3, №5) на голову и $1,0 \times 10^9$ БОЕ (группы №2, №4, №6) на голову с периодичностью 1 раз в трое суток в течение 7 дней (всего по 3 введения на голову) (таблица 1).

Таблица 1 - Схема опыта по выяснению оптимальной схемы применения экспериментальных коли-фаговых препаратов для профилактики пост-отъёмного синдрома поросят (n=30)

№ группы	Дозировка препарата (БОЕ/гол)	Возраст первого приёма препарата	Дни приёма препарата		
1	$1,0 \times 10^{10}$	28 дней	28	31	34
2	$1,0 \times 10^9$	28 дней	28	31	34
3	$1,0 \times 10^{10}$	19 дней	19	22	25
4	$1,0 \times 10^9$	19 дней	19	22	25
5	$1,0 \times 10^{10}$	10 дней	10	13	16
6	$1,0 \times 10^9$	10 дней	10	13	16
7	0	—	—	—	—

Препарат вводили с помощью аппарата Шилова утром, вскоре после кормления (9^{00} – 10^{00}). Общий период наблюдения за животными составил 10 дней. В течение всего периода эффективность фагового препарата оценивалась по сохранности поголовья в гнёздах, клиническому состоянию поросят (сроку продолжительности диареи после отъёма) и лабораторным данным титра энтеробактерий в фекалиях поросят.

Результаты исследований и их обсуждение. При подборе оптимальных доз препарата опирались на полученные ранее в предварительных опытах *in vivo* на мышах данные, согласно которым применение бактериофагов в титре не менее 10^5 на 1 грамм массы животного приводит к эффективной элиминации эшерихий из кишечника. При учёте того, что средний вес поросят-отъёмышей составил около 25 кг, необходимая доза препарата составила бы $2,5 \times 10^9$ БОЕ на голову.

По результатам исследования по подбору оптимальной схемы введения (дозировка, возраст первого применения) экспериментального фагового препарата, выяснилось, что применение фагов в возрасте 28-34 дней обеспечило 100-процентную сохранность в группах независимо от дозировки фага. В то же время, в группах, получавших фаг в возрасте 19-25 дней, сохранность (96,2 % и 96,8 %) не превышала контрольный показатель (96,0 %) (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты опыта по выяснению оптимальной схемы применения экспериментальных коли-фагов (n = 30)

№ группы	Контролируемые параметры				
	сохранность (% выживших)	дни* с диареей	коли-титр (lg КОЕ/г)		
			в возрасте 31 дней	в возрасте 34 дней	в возрасте 37 дней
1	100,0	4,0	6,25±0,16	6,15±0,15	6,29±0,14
2	100,0	3,0	6,43±0,33	5,89±0,52	6,13±0,52
3	96,2	5,3	6,08±0,26	5,39±0,09	7,69±0,18
4	96,8	5,7	6,43±0,13	5,94±0,21	6,82±0,66
5	96,6	5,3	6,90±0,55	5,48±0,68	7,15±0,37
6	100,0	6,3	6,94±0,03	6,33±0,43	7,53±0,34
7	96,0	6,0	6,27±0,41	6,43±0,43	7,27±0,52

* – Количество суток со дня отъёма (32-й день), в течение которых в группах наблюдалась диарея

Также выяснилось, что продолжительность периода диареи у животных почти у всех опытных групп сократилась по сравнению с контрольной группой (6 сут.). Наименьшей (3 – 4 сут.) она оказалась у животных, получавших фаг в возрасте 28-34 дней. При этом стоит подчеркнуть, что полностью избежать явления диареи не удалось ни в одной из опытных групп.

Что касается динамики коли-титра, то у всех групп, получавших фаг, отмечалось снижение содержания *E. coli* после отъёма (к 34-ому дню) с последующим ростом к 37-му дню, а у животных контрольной группы в периоде отъёма не отмечалось снижения содержания *E. coli* на 34-й день.

Интересно, что динамика коли-титра животных опытных групп отличалась своеобразием в зависимости от возраста первого применения фага. Так, у животных, получавших фаг в возрасте 10-16 и 19-25 дней, содержание *E. coli* к 31-му дню более, чем на 0,5 порядка превышало этот показатель у других групп (включая контрольную). Эти же группы отличались значительным разбросом показателя коли-титра в течение периода наблюдения: значительным (до 5,39 lg КОЕ/г) снижением в возрасте 34-х дней и значительным (до 7,69 lg КОЕ/г) повышением к 37-ому дню. Животные групп, получавших фаг в возрасте 28-34 дней, характеризовались наименьшими (в пределах 0,10 – 0,54 lg КОЕ/г) колебаниями содержания *E. coli* за весь период наблюдения. У животных этих же групп отмечались наименьшие показатели коли-титра к 37-му дню: более, чем на 0,69 lg КОЕ/г по сравнению с животными 3-й – 6-й опытных групп и на 0,84 – 0,98 lg КОЕ/г по сравнению животными контрольной группы. При этом различия показателей коли-титра на 37-й день у животных 1-й и 2-й групп были недостоверны.

Таким образом, оптимальной схемой применения фаговых препаратов являлось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста. Применение фага в большей концентрации ($1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову) оказывает менее выраженный эффект как на продолжительность протекания пост-отъёмной диареи, так и на показатели динамики коли-титра. Применение фага в более ранние сроки также характеризуется меньшей эффективностью как по клинической картине, так и по лабораторно контролируемым параметрам.

Проведённое исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Оптимальной схемой применения нетрансдуцирующих фагов являлось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным

28-дневного возраста.

2. Применение разрабатываемых нетрансдуцирующих фагов в большей концентрации ($1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову) или в более ранние сроки оказывает менее выраженный эффект как на продолжительность протекания пост-отъёмной диареи, так и на показатели динамики коли-титра.

3. В кишечнике поросят в пост-отъёмном периоде наблюдается нарастание титра *E. coli* в течение 5 дней после отъёма с $6,27 \lg$ КОЕ/г до $7,27 \lg$ КОЕ/г; при этом на 8-й день отъёма может наблюдаться ауто-коррекция коли-титра до $6,85 \lg$ КОЕ/г.

4. В кишечнике поросят в пост-отъёмном периоде наблюдается снижение содержания коли-фагов в течение 8 дней после отъёма с $5,53-6,08 \lg$ БОЕ/г до $3,74-3,78 \lg$ БОЕ/г.

Библиографический список

1. Zhang X., McDaniel A. D., Wolf L. E. et al. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice // *J Infect Dis.* 2000;181:664–670.
2. Johnson J R. Shigella and Escherichia coli at the crossroads: machiavellian masquerades or taxonomic treachery? *J Med Microbiol.* 2000; 49 :583–585.
3. Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C. et al. Bacteriophage Treatment of a Severe Escherichia coli Respiratory Infection in Broiler Chickens // *Avian Diseases*, 2003, Vol. 47, No. 4 , pp. 1399-1405;
4. Johnson J R. Shigella and Escherichia coli at the crossroads: machiavellian masquerades or taxonomic treachery? *J Med Microbiol.* 2000; 49 :583–585.
5. Saunders J. R., Allison H., James C. E. et al. Phage-mediated transfer of virulence genes // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2001. 76:662–666;
6. Masatoshi Yoichi, Masatomo Morita, Katsunori Mizoguchi et al. The criterion for selecting effective phage for Escherichia coli O157:H7 control // *Biochem. Engineering J.* 2004. Vol. №19, pp. 221-227.

EXPERIENCE OF APPLICATION OF NON TRANSDUCING BACTERIOPHAGES FOR PROPHYLAXY AND THERAPY OF INTESTINAL COLIBACTERIOSIS OF PIGS

Skoblikow N.E., Zimin A.A.

Key words: *bacteriophages, transduction, colibacteriosis, pigs, biosecurity, phage therapy, phage prophylaxy*

Realized the comparative study of various schemes of using the non-transducing E. coli bacteriophages for pigs with post-weaning diarrhea. It is established that the optimal scheme is to triple (at intervals of three days) at a dosage of application $1,0 \times 10^{10}$ PFU /head from the 28 days of age.