

УДК 579.254.4: 579.64

UDC 579.254.4: 579.64

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ПРИМЕНЕНИЯ НЕТРАНСДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ *E. COLI* ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСТ-ОТЪЕМНОЙ ДИАРЕИ ПОРОСЯТ **EFFICIENCY OF DIFFERENT METHODS OF USING THE NON TRANSDUCING *E. COLI* BACTERIOPHAGES FOR PROPHYLAXIS OF POST-WEANING DIARRHEA OF PIGS**

Скобликов Николай Эдуардович
к.м.н.

Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства, Краснодар, Россия

Skoblikov Nikolay Edwardovich
Cand.Med.Sci.

North-Caucasian Research Institute of Animal Husbandry, Krasnodar, Russia

Кононенко Сергей Иванович
д.с.-х.н.

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Kononenko Sergei Ivanovich
Dr.Sci.Agr.

Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Зимин Андрей Антонович
к.б.н.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (ИБФМ), Пушкино (Московская обл.), Россия

Zimin Andrej Antonovich
Cand.Biol.Sci.

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moscow region, Russia

Изучено влияние четырёх экспериментальных препаратов, сконструированных на основе нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli*, на коли-титр и титр коли-фагов у поросят с пост-отъёмным синдромом в зависимости от способа применения (перорально и интракутанно). Установлено, что при применении фага Т4-типа, имевшего условный лабораторный № 8, титр *E. coli* корректировался в наибольшей степени (до 5,52 КОЕ/г к 37-дневному возрасту) параллельно с нарастанием титра фагов (до 5,73 БОЕ/г к 40-дневному возрасту). При интракутанном способе введения отдельных экспериментальных фаговых препаратов (на основе фагов № 6 и № 8) наблюдается определённый положительный эффект по коррекции наблюдаемой в контроле отрицательной динамики коли-фагов

The influence of four experimental phage preparations, designed based on non-transducing *E. coli* bacteriophages on pigs with post-weaning diarrhea studied. The influence of these phages in depending by methods of its applying (*per os* and *intra cutis*) on colititer and coli-phages titer studied. It is established, that the best survival rate and the clinical condition showed animals treated with the *E. coli* phage T4-type with lab. number «8» (till 5,52 lg CFU/g at 37-days age) in parallel with an increase in titer of phages (till 5,73 lg CFU/g at 40-days age). Intradermal (*intra cutis*) method of applying of experimental phage preparations (constructed on basis of phage “6” and phage “8”) showed the some positive effects on correction of negative dynamics of coli-phages titer in control group

Ключевые слова: СВИНЬИ, ЭШЕРИХИОЗ, ПОСТ-ОТЪЕМНЫЙ СИНДРОМ, БАКТЕРИОФАГИ, ТРАНСДУКЦИЯ ГЕНОВ

Keywords: PIGS, ESCHERICHIOSIS, POST-WEANING DIARRHEA, BACTERIOPHAGES, GENE TRANSDUCING

Работа была поддержана грантами РФФИ: 08-04-99111-р_офи; 11-04-96575-р_юг_ц.

Введение

Ведущее место в спектре кишечных токсикоинфекций сельскохозяйственных животных занимают эшерихиозы – инфекционные

заболевания, этиологическим агентом которых являются патогенные типы кишечной палочки – бактерии *E.coli*. В наибольшей степени патогенный потенциал возбудителей реализуется у молодняка животных в периоды отъёма, для чего в англоязычной литературе существует специальный термин для обозначения данной нозологии – *Post-Weaning Diarrhea (PWD)* – пост-отъёмная диарея, вызываемая энтеропатогенными штаммами *E. coli (EPEC)* [4].

Наличие данной проблемы в значительной степени обусловлено накоплением возбудителя в кормах в период хранения. Решение проблемы методами, повышающими санитарно-гигиенический уровень кормохранилищ, не всегда реализуем технически и всегда чрезвычайно затратен экономически. Практически реализуемыми методами, остающимися в арсенале специалистов сельского хозяйства, остаётся применение ветеринарных препаратов: антибиотиков, вакцин, пробиотиков и бактериофагов. Однако применение каждого из средств-представителей указанных классов ветпрепаратов в свою очередь сопряжено с определёнными трудностями.

Спектр негативного влияния применения антибиотиков в сельском хозяйстве настолько широк (аллергенность, токсичность, дисбиогенность, селекция антибиотикорезистентных штаммов), что правительства ряда стран (в первую очередь – ЕС) проводят с 1998 г. политику, направленную на максимальное ограничение, а в перспективе – и на полный запрет применения антибиотиков в сельском хозяйстве. Вакцинирование не всегда решает проблему эшерихиозов из-за значительного иммунологического полиморфизма патогенных штаммов эшерихий. Кроме того, до настоящего времени полностью не решена проблема пост-вакцинальных осложнений (вплоть до летальных исходов) вследствие высокой антигенной нагрузки на организм животных-реципиентов. Что касается пробиотических и пребиотических препаратов, то оно, хотя и

практически лишено побочных эффектов, не всегда обеспечивает высокий уровень профилактической эффективности при достаточно умеренной терапевтической эффективности [3, 6, 11].

В таких условиях (особенно при развитии инфекционного процесса, вызванного полирезистентными штаммами патогенных бактерий), бактериофаги остаются единственным средством эффективной этиотропной терапии. По сравнению с другими классами антимикробных препаратов, бактериофаги, безусловно, обладают рядом значительных преимуществ: они специфично действуют на определенные виды и даже штаммы бактерий, не поражая нормофлору кишечника (благодаря этому могут сочетаться с применением пробиотических препаратов); они инертны в отношении эукариотических клеток животного (не оказывают токсического и сенсибилизирующего эффекта); они способны к саморазмножению с последующей самоэлиминацией. Это обусловило возрождение интереса исследователей и практических специалистов к применению фаговых препаратов в сельском хозяйстве в последнее десятилетие XX века.

Благодаря тому, что с момента открытия бактериофагов, основным и «излюбленным» объектом большинства исследователей в данной области были бактериофаги кишечной палочки (*Escherichia coli*, *E. coli*), экспериментальные эшерихиозы стали наиболее частой моделью изучения особенностей фагопрофилактики и фаготерапии [5]. Многие исследователи в данной области используют в своих работах модели и методы, предложенные группой ученых, проведших серию экспериментов по фаготерапии в 1940-х – 1980-х гг. [7].

Разумеется, в первую очередь, были детально охарактеризованы модели терапии, предполагающие наиболее физиологичный способ применения фагов при инфекциях пищеварительного тракта животных – пероральный. [8, 9, 10]. Оказалось, что используемый фаг чувствителен к

низкому уровню рН в кишечнике телят, но эта проблема может быть решена, если давать препарат вместе с молоком или сразу после кормления.

Позднее был успешно использован другой метод заражения – введение препарата бактериофагов ректально, непосредственно в слизистый слой прямой кишки на модели экспериментального колибактериоза мышей, овец и телят [1].

В работах этих же исследователей было показано системное действие фагового препарата при парентеральном введении. Внутримышечное введение специфичного фага предотвращало развитие эшерихиозного менингита, вызванного патогенными штаммами *E.coli* в эксперименте, причём эффективность фага превышала эффективность большинства применяемых в эксперименте антибиотиков. Позднее эти данные были подтверждены, равно как и факты эффективности парентерально введённых фагов в отношении мозговых абсцессов, вызываемых *E.coli* [2].

Как видно, несмотря на непрерывную работу в области фагопрофилактики и фаготерапии энтеробактериальных кишечных инфекций, остается ещё много вопросов. В-первую очередь, это вопросы, касающиеся определения оптимальных параметров применения бактериофага: доза, время, длительность и способ введения препарата в зависимости от конкретного патогена.

Таким образом, исследование применения нетрансдуцирующих колифагов при эшерихиозе поросят позволит не только охарактеризовать их эффективность, но и подобрать эффективный способ применения перспективных фаговых препаратов, конструируемых на их основе.

Целью проведённых исследований было различных способов применения экспериментальных фаговых препаратов, сконструированных на основе нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* (коли-фагов), в опыте профилактики пост-отъёмного синдрома поросят.

Новизна исследований заключалась в том, что впервые были получены данные по влиянию экспериментальных фаговых препаратов, сконструированных на основе нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* (коли-фагов) на коли-титр и титр коли-фагов поросят с пост-отъёмным синдромом в зависимости от способа их применения (перорального и внутрикожного).

Материалы и методы

Получение препаративных количеств фагов реализовывали с помощью методов биотехнологии. После инкубации (каждый из отобранных фагов инкубировался изолированно) на культуре *E.coli B*, фаги были сконцентрированы методом центрифугирования, в результате чего были получены опытные партии экспериментальных фаговых препаратов в виде взвеси фаговых частиц. Титр фагов определяли методом агаровых слоёв контрольным высеvom на культуру чувствительного штамма *E.coli*, измеряя его в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл взвеси. Концентрация фагов в полученных таким образом экспериментальных препаратах колебалась в пределах от $1,0 \times 10^9$ до $1,4 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

Оптимальная схема применения препаратов была установлена в предварительном опыте, по результатам которого оптимальной схемой применения фаговых препаратов оказалось их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение в дозировке $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста.

После установления оптимальной схемы применения препаратов была проведена сравнительная оценка профилактической эффективности имеющихся в наборе фагов, для чего были сформированы 5 групп животных (по 18-20 голов в каждой группе), в возрасте 28-29 дней; животные 1-й – 4-й групп получали взвеси фагов №№ 6, 8, 9, 15 (в дозе $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову трёхкратно, с интервалом три дня) соответственно;

животные из группы № 5 (контрольной) не получали фаговые препараты (таблица 1).

Таблица 1 – Схема опыта по проведению сравнительной оценки применения экспериментальных коли-фаговых препаратов для профилактики пост-отъёмного синдрома поросят (n=20)

№ группы	Фаг	Дни приёма препарата			Способы введения		Контролируемые параметры	
1	«№ 6»	28	31	34	<i>per os</i>	<i>intra cutis</i>	Коли-титр	Титр коли-фагов
2	«№ 8»							
3	«№ 9»							
4	«№ 15»							
5	Без фага							

При пероральном способе применения препарат вводили с помощью аппарата Шилова утром, вскоре после кормления ($9^{00} - 10^{00}$) в дозе $1,0 \times 10^9$ БОЕ на голову. При интракутанном способе применения препарат в такой же дозировке вводили также вскоре после кормления ($9^{00} - 10^{00}$) внутрикожно в область за правым ухом с помощью безыгольного инъектора. Общий период наблюдения за животными составил 13 дней.

В течение всего периода эффективность применения фаговых препаратов оценивалась по сохранности поголовья в гнёздах, клиническому состоянию поросят и лабораторным данным титра *E. coli* и титра коли-фагов в фекалиях поросят.

Результаты и обсуждение

Опыт по проведению сравнительной оценки перорального применения экспериментальных коли-фаговых препаратов

По результатам исследования по сравнительной оценке профилактической эффективности перорального применения экспериментальных фаговых препаратов, выяснилось, что наиболее

эффективное снижение коли-титра обеспечивается применением фагов № 6 и № 8. При этом применение фага № 8 обеспечивает наибольшее (до 5,52 lg КОЕ/г) снижение коли-титра к возрасту 37 дней (при сроке отъёма 32 дня), тогда как применение фага № 6 – наибольшее (до 5,71 lg КОЕ/г) снижение коли-титра к 40-дневному возрасту. При этом контрольные показатели коли-титра для этих периодов составляли 7,43 lg КОЕ/г и 6,85 lg КОЕ/г соответственно (что может говорить о некоторой ауто-коррекции содержания *E. coli* в кишечнике поросят в период 5 – 8 дней после отъёма) (таблица 2).

Таблица 2 – Коли-титр у поросят при пероральном применении экспериментальных коли-фагов (n=20)

№ группы	Лаб. № фага	Коли-титр (lg КОЕ/г)			
		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	6	6,85	6,60	6,00	5,71
2	8	6,64	6,00	5,52	6,18
3	9	6,57	6,26	6,11	6,20
4	15	6,85	6,40	7,15	7,04
5	—	6,60	6,70	7,43	6,85

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 60 измерений (посевов).

Проведённое параллельно исследование влияния перорального применения экспериментальных фаговых препаратов на содержание коли-фагов в кишечнике поросят показало, что применение фагов позволяло значительно скорректировать наблюдавшееся падение количества коли-фагов (с 5,53 lg БОЕ/г до 3,59-3,85 lg БОЕ/г в контрольной группе) в кишечнике поросят в период отъёма (таблица 3).

Причём, характер коррекции динамики титра коли-фагов в течение периода наблюдения за животными оказался различным в группах, получавших разные фаговые препараты.

Таблица 3 – Титр коли-фагов у поросят при пероральном применении экспериментальных коли-фагов (n=20)

№ группы	Лаб. № фага	Титр коли-фагов (lg БОЕ/г)			
		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	6	5,65	5,30	4,92	5,11
2	8	5,75	3,69	5,60	5,73
3	9	5,04	4,54	4,95	4,51
4	15	5,80	3,68	5,08	4,71
5	—	5,53	3,59	3,70	3,85

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 60 измерений (посевов).

Так, если фаги № 6 и № 9 оказывали эффект уже на 3-й день применения (титры фагов 5,30 lg БОЕ/г и 4,54 lg БОЕ/г), то показатели титра коли-фагов у групп, получавших фаги № 8 и № 15, достоверно не отличались от показателя контрольной группы (3,59 lg БОЕ/г) в этом возрасте. Однако, уже к 37-му дню (после 2-го применения фаговых препаратов) титр коли-фагов у группы, получавшей фаг № 15 (5,08 lg БОЕ/г), уже был сопоставим с показателями 1-й и 3-й групп (4,92 lg БОЕ/г и 4,95 lg БОЕ/г соответственно), а у 2-й группы (получавшей фаг № 8), достоверно превышал (5,60 lg БОЕ/г) этот показатель. К 40-дневному возрасту у животных всех опытных групп титр коли-фагов был достоверно выше контрольного, однако только у животных 2-й группы (получавших фаг № 8) возвращался к уровню, фиксировавшемуся до отъёма.

Таким образом, установлено, что динамика титра коли-фагов у поросят в период отъёма в наибольшей степени корректируется применением экспериментального фагового препарата, сконструированного на основе фага *E. coli* № 8.

Опыт по проведению сравнительной оценки интракутанного применения экспериментальных коли-фаговых препаратов

По результатам исследования по сравнительной оценке профилактической эффективности интракутанного (внутрикожным) применения экспериментальных фаговых препаратов, выяснилось, что применение фагов при таком способе введения оказывало не очень выраженный эффект на динамику нарастания коли-титра у животных в возрасте 31-40 дней (таблица 4).

Таблица 4 – Коли-титр у поросят при интракутанном применении экспериментальных коли-фагов (n=20)

№ группы	Лаб. № фага	Коли-титр (lg КОЕ/г)			
		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	6	6,92	6,98	6,78	6,88
2	8	6,70	6,93	6,53	6,96
3	9	6,83	7,04	7,20	6,94
4	15	6,36	6,78	6,89	7,48
5	—	6,90	6,95	7,51	7,34

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 60 измерений (посевов).

Так, к возрасту 34-х дней между всеми пятью группами животных не наблюдалось достоверных различий по показателю коли-титра. К 37-дневному возрасту у животных 2-й группы (получавшей фаг № 8) наблюдалось достоверное снижение коли-титра (до 6,53 lg КОЕ/г) по сравнению с контролем (7,51 lg КОЕ/г). Однако к 40-дневному возрасту различия в коли-титре между всеми пятью группами животных составляли менее 0,60 lg КОЕ/г.

Проведённое параллельно исследование содержания коли-фагов в кишечнике поросят показало, что при интракутанном способе введения экспериментальных фаговых препаратов наблюдается определённый положительный эффект, особенно при применении фагов № 6 и № 8. В

группах, получавших эти фаги, отмечалась коррекция отрицательной динамики коли-фагов, наблюдаемой в контроле (таблица 5).

Таблица 5 – Титр коли-фагов у поросят при интракутанном применении экспериментальных коли-фагов (n=20)

№ группы	Лаб. № фага	Титр коли-фагов (lg БОЕ/г)			
		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	6	5,85	4,23	4,80	4,41
2	8	5,84	4,34	4,85	4,79
3	9	5,71	3,88	4,00	3,67
4	15	5,97	3,15	4,60	3,63
5	—	6,08	4,08	3,52	3,74

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 60 измерений (посевов).

Что касается интракутанного применения фагов № 9 и № 15, то, несмотря на наблюдавшуюся в 37-дневном возрасте положительную коррекцию в опытных группах, получавших эти фаги, к 40-дневному возрасту показатели титра коли-фагов в этих группах (3,67 lg БОЕ/г и 3,63 lg БОЕ/г соответственно), достоверно не отличались от контрольного значения (3,74 lg БОЕ/г).

Таким образом, данный опыт показал, что, несмотря на большее технологическое удобство, предполагаемая эффективность интракутанного (внутрикожного) пути введения фаговых препаратов значительно меньше традиционного (перорального) способа введения.

Таким образом, по результатам опытов с традиционным (пероральным) и интракутаным (внутрикожным) применением четырёх нетрансдуцирующих коли-фагов, установлено, что наибольшую профилактическую эффективность на основании клинических и микробиологических данных демонстрировал фаг № 8 при пероральном применении.

Выводы

1. По результатам исследования четырёх фаговых препаратов было установлено, что наилучшую сохранность поголовья и клиническое состояние показали животные, получавшие фаг, имевший условный лабораторный № 8.
2. При применении фага, имевшего условный лабораторный № 8, титр *E. coli* корректировался в наибольшей степени (до 5,52 КОЕ/г к 37-дневному возрасту) параллельно с нарастанием титра фагов (до 5,73 БОЕ/г к 40-дневному возрасту).
3. При интракутанном способе введения отдельных экспериментальных фаговых препаратов (на основе фагов № 6 и № 8) наблюдается определённый положительный эффект по коррекции наблюдаемой в контроле отрицательной динамики коли-фагов;
4. Несмотря на большее технологическое удобство, предполагаемая эффективность интракутанного (внутрикожного) пути введения фаговых препаратов значительно меньше традиционного (перорального) способа введения по данным динамики коли-титра и титра коли-фагов.

Список использованных источников

1. Bach, S. J., T. A. McAllister, D. M. Veira, V. P. J. Gannon, and R. A. Holley. Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial rumensystem (Rusitec) and inoculated sheep. 2003. Anim. Res. 52:89–101.
2. Bull J.J, Levin B.R., DeRouin T., Walker N., Bloch C.A. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. BMC Microbiol. 2002. Vol. 2. P. 35.
3. Duncan, S. H., C. J. Doherty, J. R. Govan, S. Neogrady, P. Galfi, and C. S. Stewart. Characteristics of sheep-rumen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* inhibitory to the growth of *Escherichia coli* O157. 1999. FEMS Microbiol. Lett. 180:305–310.
4. Gyles, C. L. 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK. 150p.
5. 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;

6. Ohya, T., T. Marubashi, and H. Ito. Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157:H7 on calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. 2000. J. Vet. Med. Sci. 62:1151–1155.
7. Smith, H.W. and Huggins, M.B. (1982) Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol 128, 307–318.
8. Smith, H.W., Huggins, M.B. and Shaw, K.M. (1987a) The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J Gen Microbiol 133, 1111–1126.
9. Smith, H.W., Huggins, M.B. and Shaw, K.M. (1987b) Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J Gen Microbiol 133, 1127–1135.
10. Smith H.W., Huggins M.B. Effectiveness in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhea in Calves, Piglets and Lambs // Journal of General Microbiology. 1983. Vol. 129 : 2659-2669;
11. Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. Mueller, and A. H. Parks. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. 1998. J. Clin. Microbiol. 36:641–647.