

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ВЕТЕРИНАРИИ

В.В. Нифонтова, *Пермская государственная сельскохозяйственная академия им. акад. Д.Н. Прянишникова*

Е.О. Чугунова, *Пермская государственная сельскохозяйственная академия им. акад. Д.Н. Прянишникова*

Дано описание процесса выделения бактериофагов из патологического материала, получения фаголизата и применение его для лечения гнойного отита у собаки. Известно, что в настоящее время появляются антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов и бактериофаги могут служить альтернативным источником антибактериальных средств терапии. В рамках данного исследования объектом служила собака породы кокер спаниель, страдающая гнойным отитом. Стандартное лечение, направленное на подавление патогенной микрофлоры, результатов не дало, микрофлора гнойного экссудата *in vitro* оказалась нечувствительной к антибиотикам. Асептически собрав гнойный экссудат, мы провели индикацию и идентификацию микрофлоры, а затем выделили из данного патологического материала стафилококковый и протейный бактериофаги. На следующем этапе исследований определили чувствительность и специфичность фаголизата к соответствующей микрофлоре, а также установили титр бактериофагов по методу Аппельмана и Грациа. После лабораторных испытаний полученного фаголизата перешли к фаготерапии гнойного отита, которая оказала терапевтический эффект в течение трех дней.

Ключевые слова: *гноеродные микроорганизмы, бактериофаги, титр по методу Аппельмана и Грациа.*

Бактериофаг – ультрамикроскопический, внутриклеточный облигатный паразит-вирус, лизирующий бактерии и актиномицеты. Впервые явление бактериофагии наблюдал в 1898 г. Н.Ф. Гамалея, позднее – Туорт в 1915 г. и д'Эррель в 1917 г. [4]. Бактериофагу присущи наследственность, изменчивость, приспособляемость и другие свойства вирусов. Они несут всю информацию, необходимую для процесса их репродукции в соответствующих клетках, но не имеют собственного механизма для генерации энергии и рибосом для синтеза белков. Корпускулы бактериофагов имеют форму

сперматозоидов, состоят из сферической, цилиндрической или многогранной головки и короткого или длинного, прямого или изогнутого отростка. Каждая фаговая частица (вирион) содержит геном, представленный молекулой ДНК или РНК, заключенный в белковую или липопротеиновую оболочку (капсид), которые вместе формируют нуклеокапсид. В отростке фаговой корпускулы имеется футляр и центрально расположенный стерженек белковой природы, так хвостовой отросток напоминает иглу для шприца. На конце отростка имеет утолщение в виде пластинки, от которого отходят белковые ни-

ти диаметром не более 2 миллимикрон [2, 4]. Размер различных фагов колеблется от 0,1 мкм в диаметре до 20 мкм [1], хвост фага в 1,5 раза длиннее головы и в 4 раза тоньше [4].

Бактериофаги широко распространены в природе. Почти везде, где условия обитания благоприятны для размножения бактерий и актиномицетов, удается обнаружить паразитирующие в их клетках бактериофаги. Они поражают более 140 различных родов бактерий [2, 6]. Их можно обнаружить в организмах животных, а также в желудочно-кишечном тракте, на коже и слизистых человека, таким образом, фаги – нормальные симбионты тела человека [4]. С.В. Цыганова (2009) для выделения бактериофагов методом обогащения в качестве источников фагов использовала внутренние органы гусей и сточные воды птицеводства. Таким образом, выделить бактериофаг можно из различных материалов, где могли раньше или в данный момент присутствовать бактерии, на которых выделенный фаг размножается. При отсутствии подходящих хозяев многие фаги могут сохранять способность к инфицированию десятилетиями, если не будут повреждены внешними агентами [2].

В литературе имеются сообщения, свидетельствующие о положительном лечебно-профилактическом действии препаратов бактериофагов при использовании их во время эпидемии холеры, при дизентерии и других желудочно-кишечных болезнях. Фаги применяют в хирургической и акушерско-гинекологической практике.

Отдельные попытки использования различных бактериофагов при инфекционных болезнях животных были предприняты в 20–30-х годах. Д'Эрелль (1928, 1935) пытался использовать фаги при пуллорозе-тифе у кур.

И.Ф. Квеситадзе (1957) применил бактериофаг для лечения 6 000 больных сальмонеллёзом телят. Эффективность фаготерапии сальмонеллёзных телят в отдельных хозяйствах достигала 90–100 %.

К.Н. Шерстобаев (1949) использовал

бактериофаг для лечения и профилактики колибактериоза поросят. При лечении 4 964 поросят было отмечено выздоровление у 95,6 % животных.

И.Л. Бирюков и Р.К. Петренко (1958) сообщили, что дача цыплятам пуллорумфага предохраняла их от пуллороза на 90 % в лабораторных и до 80 % в производственных условиях [3].

С открытием и развитием антибиотиков бактериофаги были незаслуженно забыты. Однако в настоящее время на фоне появления антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов бактериофаги могут служить альтернативным источником антибактериальных средств терапии.

Цель исследования – получить бактериофаги для лечения гнойного отита у собак.

Задачи:

- 1) произвести отбор патологического материала (экссудат из среднего и наружного уха) от больного животного;
- 2) определить состав микрофлоры в полученном экссудате;
- 3) выделить бактериофаги из патологического материала и установить их литическую активность в отношении соответствующих микроорганизмов;
- 4) провести фаготерапию полученным фаголизатом.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – собака породы американский кокер спаниель, страдающая отитом наружного и среднего уха.

Материалом для исследования служили: экссудат из ушей, собранный асептически стерильным инструментом в стерильную одноразовую емкость; выделенные из экссудата микроорганизмы и полученные к ним бактериофаги. Метод исследования – бактериологический.

Для выделения фага исследуемый материал высевали на мясопептонный агар (МПА) в чашки Петри и на селективные питательные среды, инкубировали при 37 °С и через 24 часа получали колонии

микроорганизмов, которые характеризовали по морфологическим признакам, окрашивали по Граму, при необходимости проводили серологическую идентификацию. Далее усиливали патогенные и вирулентные свойства соответствующих бактерий, и в фазе логарифмического роста засеивали их на мясопептонный бульон (МПБ) совместно с патологическим материалом. Бульон инкубировали при 37 °С в течение 18–24 часов, затем проводили ряд процедур для удаления оставшихся бактерий. На первом этапе очистки среду фильтровали через ватно-марлевый и бумажный фильтры, прогревали в циркуляционном термостате TW2 при температуре 60 °С в течение 30 мин, затем центрифугировали 20 мин при 3 000 об/мин и добавляли хлороформ в соотношении 1 капля на 10 мл фаголизата. Очистку бактериофага от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ осуществляли осветляющей микрофльтрацией через мембраны Владипор марки МФАС-ОС-3 с размером пор 0,8 мкм, затем МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, которые представляют собой мелкопористый пленочный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы. В итоге фаголизаты подвергали стерилизующей фильтрации с помощью фильтрующей насадки фирмы «Millipore Millex-GP» с полиэфирсульфо-

новым наполнителем и диаметром пор 0,22 мкм (рис. 1). Фаголизат собирали в стерильные одноразовые пробирки в условиях ламинарного бокса.

Результаты исследования

В результате инкубации посеянного на мясопептонный агар экссудата получили гладкие, выпуклые, с желтоватым пигментом колонии стафилококков; единичные мелкие серые колонии стрептококков и протей, который занимал 70–75 % площади чашки Петри. При этом отмечен характерный гнилостный запах и феномен роевания протей.

Для селективного обогащения стафилококков использовали солевой бульон (МПБ с 6,5 % NaCl). Через 24 часа после инкубирования при 37 °С произвели пересев на желточно-солевой агар, селективность которого обеспечивается высоким содержанием хлористого натрия, а добавленный яичный желток позволяет выявлять лецитовителлазную активность, которая является одним из показателей патогенности стафилококков. После 18 часов инкубации получили рост колоний, морфологически похожих на золотистый стафилококк (рис. 2), поэтому продолжили исследование и пересеяли типичные колонии на скошенный мясопептонный агар для последующей проверки выросших культур в реакции плазмокоагуляции. На



Рис. 1. Стерилизующая фильтрация стерильной насадкой фирмы «Millipore Millex-GP»



Рис. 2. Колонии золотистого стафилококка на желточно-солевом агаре

следующий день поставили реакцию с плазмой крови кролика, которая дала положительный результат и подтвердила наличие *S. aureus* в исследуемом экссудате.

Учитывая результаты идентификации возбудителей, решили выделить бактериофаги к золотистому стафилококку и протее. После стандартной процедуры очистки фаголизата от бактерий и их частиц определяли чувствительность, специфичность и титр полученных бактериофагов.

Полученные фаголизаты проверили методом «стекающей капли» по Отто на чувствительность и специфичность в отношении протее и золотистого стафилококка. Для определения данных показателей взвесив суточных культур *St. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Streptococcus haemolyticus*, *Salmonella typhimurium* посеяли газоном на твердые питательные среды в чашки Петри, подсушили и внесли по капле испытуемых фаголизатов. На следующий день после инкубирования при 37 °С в чашках с *St. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* обнаружены зоны лизиса различного диаметра, в остальных чашках наблюдали сплошной рост культуры (таблица). Результаты оценивали следующим образом:

- отсутствие лизиса;
- + лизис по ходу стекания капли;
- ++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;
- +++ наличие стерильного пятна и зон лизиса.

Таким образом, видно, что полученные нами фаголизаты проявляют специфичность и чувствительность в отношении соответствующих бактерий. Наиболее выраженное и крупное стерильное пятно получено для *Proteus vulgaris* (рис. 3).

Далее необходимо было определить ак-

тивность полученных бактериофагов и установить их титр по Аппельману и Грациа.

Для определения титра по методу Аппельмана использовали 12 пробирок с 4,5 мл мясопептонного бульона в каждой. В первую пробирку внесли 0,5 мл исследуемого фага, содержимое пробирки тщательно перемешали. Из этой пробирки 0,5 мл перенесли в следующую и т.д., приготовив ряд 10-кратных разведений фага (10^{-1} – 10^{-10}). В каждую пробирку приготовленного ряда внесли по одной капле соответствующей бульонной культуры. Пробирки №№ 11, 12 служили контролем, в одну из них внесли 0,5 мл исследуемого фага (контроль на отсутствие бактерий в исследуемом фаге), в другую пробирку – одну каплю микробной культуры (контроль культуры). Все пробирки поместили в термостат на 18 ч. Титр фага определяли по наибольшему разведению препарата, в котором была обнаружена литическая активность. В итоге получили титр 10^{-7} для стафилококкового бактериофага и 10^{-8} для протейного.

Далее определяли титр данных фаголизатов методом агаровых слоев по Грациа, используя разведения бактериофагов, показавших титр по Аппельману от 10^{-6} до 10^{-10} . В чашки Петри заливали 0,5 %-ный МПА с генцианвиолетом (0,1 мл 0,4 %-ного генцианвиолета на 1 дм³ среды) и подсушивали в термостате до полного удаления конденсата. Затем 0,7 %-ный МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой расплавляли на водяной бане и охлаждали до 48–50 °С, вносили 0,1 мл 1-миллиардной взвеси соответствующей суточной агаровой культуры и добавляли 1 мл соответствующего разведения исследуемого бактериофага, тщательно перемешивали вращательными движениями и содержимое пробирки вы-

Результаты определения чувствительности и специфичности фаголизатов

Вид микроорганизмов	Фаголизат к <i>St. aureus</i>	Фаголизат к протее	Контроль
<i>St. aureus</i>	++	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+++	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-



Рис. 3. Стерильное пятно протейного фага

ливали в чашку Петри с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяли по поверхности агара и оставляли чашку в горизонтальном положении на 40–50 мин, то есть до полного охлаждения агара. Затем чашки слегка подсушили и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 18–20 ч. На следующий день на фоне равномерного роста микробов отмечали негативные колонии, обусловленные лизисом микробной культуры в результате действия бактериофага (рис. 4).

Таким образом, допуская, что каждый участок лизиса образовался в результате действия одной корпускулы фага, мы рассчитали количество активных корпускул фага в 1 мл препарата и получили титр протейного бактериофага по Грация 15×10^8 или $1,5 \times 10^9$. Данный титр стафилококкового фагового препарата оказался на порядок ниже и составил 8×10^6 .

Полученные фаголизаты объединили в стерильную одноразовую пробирку и обработали уши собаки созданным бактериофаговым препаратом. Терапевтиче-

ский эффект был отмечен уже в первые сутки после обработки, количество экссудата резко снизилось, исчез неприятный запах из ушей. Через три дня гнойные истечения из ушных раковин прекратились, т.е. был достигнут лечебный результат.

Выводы

Полученные нами фаголизаты проявили специфичность и чувствительность в отношении *St. aureus*, *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*. Наиболее выраженное и крупное стерильное пятно получено для *Proteus vulgaris*. Двумя способами установлены титры бактериофагов: по Аппельману получили титр 10^{-7} для стафилококкового бактериофага и 10^{-8} для протейного; по Грация – 8×10^6 и $1,5 \times 10^9$ соответственно. Фаготерапия показала высокий терапевтический эффект, который был достигнут за три дня.



Рис. 4. Результаты титрования протейного фага по методу агаровых слоев

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги / пер. с англ. Т.С. Ильиной и др. – М.: Иностран. лит., 1961. – 527 с.
2. Бактериофаги: биологическое и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе / пер. с англ.; науч. ред. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
3. Фаги листерий и их практическое применение: учебное пособие / И.А. Бакулов, Т.И. Кольщикова, Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновская ГСХА, 1998. – 33 с.
4. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии. – М.: Медгиз, 1958. – 347 с.
5. Цыганова С.В. Выделение бактериофагов против возбудителей бактериальных болезней птиц и изучение их биологических свойств: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – СПб. – 2009. – 23 с.
6. Ackerman H.W. Frequency of morphological phage descriptions // Arch. Virol. – 2001. – № 146. – P. 843–857.

НАУЧНЫЕ КОНФЕРЕНЦИИ, ШКОЛЫ, СЕМИНАРЫ
**OBTAINING BACTERIOPHAGES AND APPLICATION
IN VETERINARY**

B.B. Nifontova, E.O. Chugunova

Perm Agricultural Academy

The article shows the process of extracting bacteriophages from pathological material, obtaining bacteriophages drug and using phagotherapy for therapy of purulent otitis in dogs. It is known that there are antibiotic-resistant strains of microorganisms and bacteriophages can be an alternative source of antibacterial means of therapy. A cocker spaniel having purulent otitis served as the object of our research. Standard treatment directed at suppression of pathogenic microflora didn't show any results, the microflora of purulent effluent in vitro was not sensitive to antibiotics. Purulent effluent was collected aseptically, and after indication and identification of its microflora, then we allocated Staphylococcus and Proteus bacteriophages from this pathological material. At the next stage of research we determined sensitivity and specificity of bacteriophages to the corresponding microflora, and also bacteriophages titer using Appelman and Gratsia method. After laboratory testing of phagolysate, phagotherapy was applied to purulent otitis and showed therapeutic effect within three days.

Keywords: pyogenic microorganisms, bacteriophages, the titer of bacteriophages by Appelman's and Gratsia's method.

Сведения об авторах

Нифонтова Варвара Владимировна, студентка 3-го курса факультета ветеринарной медицины и зоотехнии, Пермская государственная сельскохозяйственная академия им. акад. Д.Н. Прянишникова (ПГСХА), 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 23; e-mail: nifanya.ya@yandex.ru

Чугунова Елена Олеговна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства факультета ветеринарной медицины и зоотехнии, ПГСХА; e-mail: chugunova.elen@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 25.05.2015 г.