

УДК 579.254.4: 636.4.033

UDC 579.254.4: 636.4.033

КОМБИНИРОВАННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НЕТРАНСДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ *E. COLI* С ПРОБИОТИКОМ В ПОСТ-ОТЪЁМНОМ ПЕРИОДЕ У ПОРОСЯТ **COMBINED USING THE NON TRANSDUCING *E. COLI* BACTERIOPHAGES WITH PROBIOTIC AT POST-WEANING PERIOD OF PIGS**

Скобликов Николай Эдуардович
к. м. н.

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

Skoblikov Nikolay Eduardovich
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 Andrey Antonovich
Cand.Biol.Sci.

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

Проведено исследование терапевтического влияния микстуры из четырёх нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli*, а также их комбинации с пробиотиком на основе эндемичного штамма *Lactobacillus paracasei*, ранее выделенного от поросят этого возраста местной популяции, на состояние, выживаемость и лабораторные показатели поросят с пост-отъёмным синдромом. Наибольшее влияние на коррекцию динамики *E. coli* оказывает комбинированное пероральное применение фаговой микстуры и пробиотического препарата. Наибольшее влияние на коррекцию динамики титра коли-фагов оказывает не только комбинированное применение фаговой микстуры (причём как перорально, так и интракутанно) и пробиотического препарата, но и изолированное пероральное применение фаговой микстуры

Studied the investigation of the therapeutic effect of experimental mixture of four non-transducing *E. coli* bacteriophages and it combinations with probiotic, designed on the basis of the endemic *Lactobacillus paracasei* strain, previously isolated from pigs in this age of the local population in the state, the survival rate and laboratory parameters of pigs with post-weaning diarrhea. The most influence on the correction of *E. coli* dynamics has a combined oral administration of phage medicine and probiotic preparation established. The most influence on the dynamics of titer phages has not only the combined using (both oral and intradermal) of phage medicine with the probiotic preparation, but also an isolated ingestion of phage mixture

Ключевые слова: СВИНЬИ, ЭШЕРИХИОЗ, ПОСТ-ОТЪЁМНЫЙ 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

Одним из наиболее безопасных и недорогих методов повышения качества мясного сырья является применение в кормлении

сельскохозяйственных животных пробиотиков – живых микроорганизмов и кормовых добавок на их основе, оказывающих благоприятные эффекты на организм животного-хозяина, путём коррекции его нормофлоры [4]. Общеизвестным на мировом уровне является определение пробиотиков, принятое такими международными структурами как *FAO (Food and Agriculture Organization*, Организация по продовольствию и сельскому хозяйству при ООН) и *WHO (World Health Organization*, Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ) в октябре 2001 г.; с этого времени «пробиотики» определяются как «живые микроорганизмы, которые при применении в адекватном количестве приносят пользу здоровью хозяина» [7].

Интерес учёных и специалистов прикладных отраслей хозяйства к использованию микроорганизмов-пробиотиков особенно возрос в последние два десятилетия в связи с бурным развитием биотехнологии, в т. ч., и сельскохозяйственной [6]. Одной из важнейших функций пробиотиков, используемых в практике, является защитная, реализующаяся как через повышение колонизационной резистентности пищеварительного тракта, так и через реализацию пробиотическими микроорганизмами антагонистического (в отношении облигатно- и условно патогенных микроорганизмов) потенциала. Пробиотические микроорганизмы (традиционно – бактерии рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Bacillus*) находят широкое применение в качестве биопротекторов для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний. Пробиотики рассматриваются как наиболее перспективные заменители антибиотиков в сельском хозяйстве [1].

В отличие от антибиотиков, они обладают рядом положительных характеристик:

1. не поражают нормофлору кишечника;

2. инертны в отношении эукариотических клеток животного (не оказывают токсического и сенсибилизирующего эффекта);
3. способны к саморазмножению с последующей самоэлиминацией.

Кроме того, немало значимым фактором является относительно небольшая цена производства пробиотических препаратов. Однако, несмотря на очевидные преимущества, существенным недостатком пробиотиков является их довольно умеренная антагонистическая активность, не позволяющая в полной мере развить их потенциал в условиях развившегося инфекционно-воспалительного процесса (тем более, вызванного облигатными патогенами). По способности препятствовать облигатным патогенам пробиотики уступают бактериофагам [2, 8, 11, 12, 14]. Бактериофаги – вирусы бактерий, также способные к саморазмножению и инертные в отношении клеток-эукариот, что роднит их с традиционными (бактериальными) пробиотиками. Однако, в отношении патогенных бактерий-мишеней они отличаются узкой специфичностью и более высокой эффективностью действия.

Обратной стороной специфичности является необходимость подбора конкретного фага (фагов) для элиминации каждого отдельного патогена. Кроме того, препараты на основе бактериофагов обладают ещё несколькими недостатками, такими как:

1. возможность развития фагорезистентности;
2. относительно небольшая стабильность препаратов;
3. участие фагов в горизонтальном переносе генов.

Однако, в настоящее время существуют достаточно эффективные способы решения перечисленных недостатков бактериофагов. Так, возникающая в процессе фагопрофилактики и фаготерапии «фагорезистентность» компенсируется чрезвычайным «эволюционным полиморфизмом» бактериофагов: в отношении каждого штамма бактерии-возбудителя инфекционного заболевания активно значительно большее

количество бактериофагов. Проблема узкой направленности действия эффективных фагов решается сочетанным применением фагов с различным спектром специфичности, зачастую применяемых в рамках комплексных препаратов – «фаговых коктейлей» или «фаговых микстур». Ещё один недостаток фаговых препаратов – относительно меньшая стабильность получаемых препаратов – сейчас успешно решается с развитием методов биотехнологии, позволяющих стабилизировать хранение препарата и смягчить требования к условиям его применения. Что касается возможного участия бактериофагов в горизонтальном переносе генов, то способность фагов к реализации такого феномена (трансдукции) является в настоящее время одним из самых существенных ограничений фаготерапии. Речь идёт о способности определённых разновидностей фагов, не завершая цикла развития лизисом клетки-мишени, передавать (трансдуцировать) последние гены, приобретённые в процессе предыдущего цикла у другой бактерии, в том числе – генетические детерминанты антибиотикорезистентности [10].

В медицине важность определения трансдуцирующего потенциала фагов [12] признана одним из критериев отбора эффективных и безопасных бактериофагов [9]. В то же время, несмотря на интенсивный поиск новых средств терапии и профилактики инфекционных заболеваний [5], определение трансдуцирующего потенциала профилактических и терапевтических фагов в работах исследователей в области ветеринарии до последнего времени обойдена вниманием.

Поскольку в качестве модели изучения трансдукции традиционно использовался такой объект, как кишечная палочка, *Escherichia coli*, оптимальной моделью изучения применения нетрансдуцирующих фагов в сельском хозяйстве может служить именно эшерихиоз (колибактериоз), в особенности – эшерихиозы (колибактериозы) свиней [3]. Комбинированное применение фагов с пробиотиками позволит, с одной

стороны, создать более надёжный микробиологический барьер на пути патогена, а с другой – обеспечить его более специфичную и эффективную элиминацию.

Представляется интересным изучение эффективности комбинированного (сочетанного) применения двух классов этих препаратов; тем более что до сих пор не проводилось исследование комбинированного применения пробиотиков, сконструированных на основе штаммов лактобацилл, выделенных от животных местной популяции, и фагов, не обладающих трансдукционными свойствами.

Целью проведённых исследований было изучение эффективности комбинированного применения нетрансдуцирующих бактериофагов *E.coli* с пробиотиком для профилактики пост-отъёмной диареи поросят.

Новизна исследований заключалась в том, что впервые были получены данные по влиянию различных способов комбинированного применения нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* (коли-фагов) с пробиотиками на коли-титр и титр коли-фагов поросят с пост-отъёмным синдромом.

Материалы и методы

Получение препаративных количеств нетрансдуцирующих фагов, отобранных из обширной рабочей коллекции в ходе предыдущих работ, 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 высевом 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.

В предыдущих опытах было установлено, что оптимальной схемой является их трёхкратное (с интервалом в три дня) применение *per os* в дозировке $1,0 \times 10^{10}$ БОЕ на голову животным 28-дневного возраста.

Исследовали влияние микстуры отобранных фагов (№№ 6, 8, 9, 15), а также их комбинации с пробиотиком (кисломолочная закваска на основе штамма *Lactobacillus paracasei*, ранее выделенного от поросят этого возраста местной популяции) на показатели кишечного микробиоценоза (коли-титр и титр коли-фагов) свиней.

Параллельно с изучением эффективности традиционного (перорального) способа применения коли-бактериофагов (*per os*), проверялось предположение о системном эффекте исследуемых бактериофагов при их парентеральном пути введения. Препарат вводили утром, вскоре после кормления ($9^{00} - 10^{00}$) с помощью безыгольного инъектора интракутанно (внутрикожно) в область основания правого уха.

Для этого были сформированы 6 групп животных (по 18-20 голов в каждой группе), в возрасте 29-30 дней с клиникой пост-отъёмного синдрома. Животные 1-й и 3-й групп получали микстуры фагов №№ 6, 8, 9, 15 (в дозе, содержащей по $2,5 \times 10^8$ БОЕ на голову трёхкратно, с интервалом три дня) перорально; животные 2-й и 4-й групп получали микстуры фагов интракутанно в область основания правого уха; животные 3-й, 4-й и 5-й групп получали пробиотический препарат ($2,0 \times 10^{11}$ КОЕ на голову); животные 6-й группы (контрольной) получали только основной рацион (таблица 1).

Общий период наблюдения за животными составил 13 дней. В течение всего периода эффективность фагового препарата оценивалась по данным титра *E.coli* (коли-титра) и фагов *E.coli* (коли-фагов) в фекалиях

поросят. Количество *E.coli* определяли посевами на среду Эндо и измеряли в колоние-образующих единицах (КОЕ), обнаруживающихся в 1 г пробы.

Таблица 1 – Схема опыта по изучению влияния микстуры отобранных фагов и применения их в комбинации с пробиотиком (n=20)

№ группы	Приём фаговой микстуры		Приём пробиотика	Дни приёма препаратов			Контролируемые параметры	
	<i>per os</i>	<i>intra cutis</i>		28	31	34	Коли-титр (lg КОЕ/г)	Титр коли-фагов (lg БОЕ/г)
1	+	—	—	28	31	34	Коли-титр (lg КОЕ/г)	Титр коли-фагов (lg БОЕ/г)
2	—	+	—					
3	+	—	+					
4	—	+	+					
5	—	—	+					
6	—	—	—					

Результаты и обсуждение

По результатам исследования влияния различных способов применения микстуры отобранных фагов (№№ 6, 8, 9, 15), а также их комбинации с пробиотиком, на коли-титр у поросят было установлено, что пероральное применение фаговой микстуры корректирует коли-титр животных в большей степени, чем интракутанное введение. Разница между показателями у животных 1-й (получавших фаги *per os*) и 2-й (получавших фаги внутрикожно) групп к 37-дневному возрасту составила 0,82 lg КОЕ/г (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние микстуры отобранных фагов и применения их в комбинации с пробиотиком на коли-титр у поросят (n=20)

№ группы	Приём фаговой микстуры		Приём пробиотика	Коли-титр (lg КОЕ/г)			
	<i>per os</i>	<i>intra cutis</i>		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	+	—	—	6,59	6,04	6,08	6,52
2	—	+	—	6,85	6,23	6,90	6,64
3	+	—	+	6,54	5,45	5,43	5,85
4	—	+	+	6,70	6,15	6,18	6,28
5	—	—	+	6,48	5,18	6,36	6,26
6	—	—	—	6,11	6,36	6,75	7,30

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 72 измерений (посевов).

Дополнительный приём пробиотика оказывал синергический эффект на коррекцию коли-титра при применении фаговых микстур обоими способами, однако более выражено – при пероральном применении. Так, комбинированное пероральное применение фагов и пробиотика (3-я группа) демонстрировало наибольшее среди всех групп снижение коли-титра к 37-дневному (5,43 lg КОЕ/г) и 40-дневному (5,85 lg КОЕ/г) возрасту. Примечательно, что изолированное применение пробиотика (5-я группа), оказывая положительное влияние на динамику содержания *E. coli* по сравнению с контролем, уступало по результатам снижения коли-титра комбинированному применению фагов и пробиотика (3-я группа), однако незначительно превосходило изолированное пероральное применение фагов (1-я группа) в возрасте 34-дней. К 40-дневному возрасту различия между показателями коли-титра 1-й и 5-й групп составляли менее 0,3 lg КОЕ/г.

Проведённое параллельно исследование содержания коли-фагов в кишечнике поросят показало, что изолированное внутрикожное применение фаговой микстуры практически не оказывает влияния на динамику коли-фагов в 37-дневном и 40-дневном возрасте (различия с контролем недостоверны). Пероральное применение фаговой микстуры, наоборот, в наибольшей степени способствовало восстановлению доотъёмного уровня коли-фагов (5,38 lg БОЕ/г) по сравнению с контролем (3,78 lg БОЕ/г) (таблица 3).

Изолированное применение пробиотика (5-я группа) практически не корректировало падение титра коли-фагов, однако способствовало его положительной коррекции при применении фаговой микстуры; причём, при интракутанном применении (4-я группа) – в большей степени, чем при пероральном (3-я группа).

Таблица 3 – Влияние микстуры отобранных фагов и применения их в комбинации с пробиотиком на титр коли-фагов у поросят (n=20)

№ группы	Приём фаговой микстуры		Приём пробиотика	Титр коли-фагов (lg БОЕ/г)			
	<i>per os</i>	<i>intra cutis</i>		в возрасте 31 ^a дней	в возрасте 34 ^b дней	в возрасте 37 ^c дней	в возрасте 40 ^d дней
1	+	—	—	5,71	4,60	5,56	5,38
2	—	+	—	5,80	5,60	3,60	3,89
3	+	—	+	5,46	6,04	5,51	4,87
4	—	+	+	5,53	6,52	6,72	5,34
5	—	—	+	5,15	3,48	4,00	4,38
6	—	—	—	5,53	3,88	3,36	3,78

Примечание: даны средние показатели для групп поросят, каждая из которых состояла из двух гнёзд по 8-10 голов по данным 72 измерений (посевов).

Таким образом, установлено, что наибольшее влияние на коррекцию динамики содержания *E. coli* оказывает комбинированное пероральное применение фаговой микстуры и пробиотического препарата. Что касается динамики титра коли-фагов, то наибольшее влияние на его коррекцию оказывает не только комбинированное применение фаговой микстуры (причём как перорально, так и интракутанно) и пробиотического препарата, но и изолированное пероральное применение фаговой микстуры.

Выводы

1. Изолированное внутрикожное применение фаговой микстуры (содержащей, в т. ч., и эти фаги) практически не оказывает влияния на динамику коли-фагов в 37-дневном и 40-дневном возрасте.
2. Дополнительный приём пробиотика оказывает синергический эффект на коррекцию коли-титра при применении фаговых микстур как при пероральном, так и при интракутанном способе введения, однако более выражено – при пероральном применении.

3. Изолированное применение пробиотика, оказывая положительное влияние на динамику содержания *E. coli* по сравнению с контролем, уступает по результатам снижения коли-титра комбинированному применению фагов и пробиотика, однако незначительно превосходит изолированное пероральное применение фагов (1-я группа) в возрасте 34-дней.
4. Изолированное применение пробиотика практически не корректирует падение титра коли-фагов, однако способствует его положительной коррекции при применении фаговой микстуры, причём при интракутанном применении – в большей степени, чем при пероральном.
5. Наибольшее влияние на коррекцию динамики содержания *E. coli* оказывает комбинированное пероральное применение фаговой микстуры и пробиотического препарата.
6. Наибольшее влияние на коррекцию динамики титра коли-фагов оказывает не только комбинированное применение фаговой микстуры (причём как перорально, так и интракутанно) и пробиотического препарата, но и изолированное пероральное применение фаговой микстуры.

Список литературы

1. Малик, Н.И. Ветеринарные пробиотические препараты / Малик Н.И., Панин А.Н. // Ветеринария – 2001. – №1. – С. 46-50.
2. Duncan, S. H., Doherty, C. J., Govan, J. R., Neogrady, S., Galfi, P. & Stewart, C. S. (1999). Characteristics of sheep-rumen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* inhibitory to the growth of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiol Lett* 180, 305-310.
3. Fairbrother J. M., Nadeau E., Gyles C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies // *Anim Health Res Rev.* 2005; 6(1): 17-39.
4. Fuller, R. Probiotics in man and animals. // *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378, 1989.
5. Gill J. J., Pacan J. C., Carson M. E. et al. Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2006, Vol. 50, No. 9. p. 2912–2918.

6. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May 2002.C.176-187.
7. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO/WHO report, Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. C. 131-149.
8. Lema, M., L. Williams, and D. R. Rao. 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin. Res.* 39:31–39.
9. 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.
10. Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J. Transduction in *Escherichia coli* K-12. *Genetics.* 1956 Jan;41(1):142–156.
11. Ogawa, M., K. Shimizu, K. Nomoto, R. Tanaka, T. Hamabata, S. Yamasaki, T. Takeda, and Y. Takeda. 2001. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 68:135-140.
12. Ohya, T., T. Marubashi and H. Ito. 2000. Significance of fecal volatile fatty acids in shedding of *Escherichia coli* O157 from calves: experimental infection and preliminary use of a probiotic product. *J. Vet. Med. Sci.* 62:1151-1155.
13. Saunders J. R., Allison H., James C. E. et al. Phage-mediated transfer of virulence genes // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2001. 76:662–666.
14. Zhao, T., M. P. Doyle, J. Shere, and L. Garber. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ Microbiol.* 61:1290- 1293.