

УДК: 619:579.6

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.3.36

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Пименов Н.В. – д-р биол. наук, проф. каф. иммунологии и биотехнологии (ORCID: 0000-0003-1658-1949); **Иванникова Р.Ф.*** – канд. биол. наук, доц. каф. физиологии, фармакологии и токсикологии (ORCID: 0000-0002-3522-0447); **Айгинин А.А.** – студ. (ORCID: 0009-0002-8001-886X); **Евтеев Н. А.** – студ. (ORCID: 0009-0008-3018-3633).

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина»

* regiotf@yandex.ru

Ключевые слова: кератоконъюнктивит, бактериологическое исследование, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, бактериофаги.

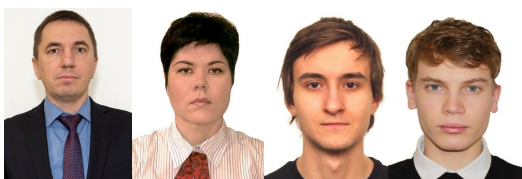
Key worlds: keratoconjunctivitis, bacteriological examination, *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi*, bacteriophages.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках конкурса Российского научного фонда 2023 года «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами» (соглашение № 24-26-00168 от 29.12.2023 г).

Поступила: 27.08.2024

Принята к публикации: 20.09.2024

Опубликована онлайн: 01.10.2024



РЕФЕРАТ

Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота – высококонтагиозное заболевание, широко распространенное во многих странах мира с развитым молочным и мясным животноводством, причиняющий большой экономический ущерб. Это контагиозное заболевание, характеризующееся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, серозно-гнойным истечением, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобуса или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения пораженного глаза животного. Основными возбудителями кератоконъюнктивита являются *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*. В связи с развитием множественной лекарственной устойчивости к различным противомикробным химиотерапевтическим лекарственным препаратам возникает необходимость в поиске альтернативных антибактериальных средств, к которым можно отнести бактериофаги. В настоящей работе стояла цель, выделить специфичные к *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi* бактериофаги. С этой целью были отобраны 13 образцов с животноводческого хозяйства в Подмоскowie. По результатам спот-теста из образцов получены два бактериофага,

один имел специфичность только к *Moraxella bovoculi*, второй обладал литической активностью как к *Moraxella bovoculi*, так и к *Moraxella bovis*. Активность по методу Апфельмана составляла от 10^{-6} и 10^{-7} для *Moraxella bovoculi* и 10^{-4} для *Moraxella bovis*. По методу Грация урожайность составляла $3,2 \times 10^7$; 4×10^6 для *Moraxella bovoculi* и 2×10^4 бляшкообразующих единиц для *Moraxella bovis*. Специфичность литического спектра была подтверждена на культурах *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Pasteurella multocida*.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Причиной возникновения инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого (моракселлеза) чаще всего являются бактерии *M. bovis* и *M. bovoculi*. Заболевание влечёт за собой серьёзный экономический ущерб для сферы животноводства. Специфическая профилактика на данный момент не имеет широкого распространения, вакцины не обладают необходимым защитным эффектом [4]. В связи с этим для лечения кератоконъюнктивита крупного рогатого скота активно применяется терапия с использованием антибиотиков. Но различные исследования из разных географических районов мира показывают снижение восприимчивости *M. bovis* и *M. bovoculi* к антибиотикам [3,5,6]. В связи с этим возникает потребность в использовании новых антибактериальных агентов. Такой заменой могут стать бактериофаги. Говоря об их значимости в лечении инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, важно упомянуть патогенез этой болезни. Основной локализацией бактерий является роговица и конъюнктура глаз [1,2,7]. В таком случае воспалительный процесс развивается непосредственно снаружи. Одной из особенностей бактериофагов является высокий эффект при местном применении. Данное отличие повышает актуальность выделения бактериофагов к *M. bovis* и *M. bovoculi*.

Цель исследования состоит в выделении бактериофагов, литически активных в отношении *M. bovoculi* и *M. bovis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Культуры *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *M. bovis* и *M. bovoculi*, на которых производилось исследование, были взяты

из библиотеки штаммов кафедры иммунологии и биотехнологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Образцы, в которых, предположительно, мог находиться моракселлёзный бактериофаг, были взяты из подмосковного хозяйства. Всего было отобрано 13 образцов. 2 образца были взяты от здоровых коров из конъюнктивы глаз, ещё 2 образца были отобраны из того же места у коров с клиническими проявлениями кератоконъюнктивита. 2 образца были взяты из носовой жидкости здоровых коров и из того же места ещё 2 от коров с кератоконъюнктивитом. Ещё 4 образца были собраны из подстилки больных и здоровых животных. Последний образец был взят из места общего сбора сточных вод стойл коров. Все образцы отбирались в стерильные одноразовые ёмкости.

Полученный материал был пропущен через бумажный фильтр с диаметром пор – 10 мкм. Далее фильтрат был разлит по пробиркам типа эппендорф объёмом в 1,5 мл. Для осаждения тяжёлых компонентов заполненные эппендорфы были помещены в центрифугу «CENTRIFUGE CM-50», центрифугирование образцов происходило при 8000 об/мин в течение 30 минут. Полученный супернатант отбирали с помощью дозаторов «Колор, 20-200 мкл» и «Колор, 100-1000 мкл» со стерильными наконечниками. Надосадочную жидкость вносили в стерильные стеклянные тубы объёмом 50 мл. С помощью одноразовых шприцов и шприцевых фильтров с диаметром пор в 0,22 мкм происходила конечная фильтрация фагов от бактерий и других посторонних элементов. Для получения более концентрированной суспензии бактериофагов фильтрат в объёме 200

мкл помещали в бульонные суточные культуры *M. bovis* и *M. bovoculi*. Через 24 часа процедуру фильтрации повторяли.

При оценке первичной специфичности бактериофага были сделаны спот-тесты. Для этого была приготовлена суспензия *M. bovis* и *M. bovoculi* в соотношении $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (колониобразующих единиц). Из каждой суспензии суточной культуры моракселл было отобрано по 100 мкл и внесено по отдельным одноразовым чашкам Петри диаметром 90 мм, в которых предварительно был разлит агар с сердечно-мозговым экстрактом «Condalab». Внесённые суспензии бактерий были растёрты микробиологическим шпателем для получения сплошного газона. Из суспензии, в которой, предположительно, находился бактериофаг, было отобрано 150 мкл. На чашки были внесены капли со всеми 13 тестируемыми образцами. Далее чашки инкубировали в термостате в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Оценка результатов спот-теста проводилась визуальным методом. Поверхность питательной среды осматривалась на наличие зоны подавления роста микроорганизмов. Диаметр пятен измерялся линейкой.

Оценку активности выделенных бактериофагов проводили по методу Аппельмана и Грация [2].

Специфичность литической культуры подтверждали на суточных культурах *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Pasteurella multocida*.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Капля фильтрата, полученного из конъюнктивы глаза больной коровы, дала лизис на культуре *M. bovoculi* в виде прозрачного округлого пятна с гладкими краями диаметром 5 мм, но тот же образец не дал никакого эффекта на культуре *M. bovis*. Ещё один образец, отобранный из места общего сбора сточных вод стойл с коровами, дал лизис обоих культур моракселл в виде полупрозрачного округлого пятна с шероховато-гладкими краями диаметром 5 мм для *M. bovis* и прозрачного округлого пятна с гладкими краями

диаметром 7 мм для *M. bovoculi*.

Литическая активность для бактериофага, специфичного к *M. bovoculi* составила 10^{-7} по методу Аппельмана. Для бактериофага, проявляющего специфичность к обоим культурам, активность составила 10^{-4} для *M. bovis* и 10^{-6} для *M. bovoculi*. Урожайность по методу Грация составила $3,2 \times 10^7$; 2×10^4 ; 4×10^6 БОЕ/мл, соответственно.

По результатам оценки литического спектра не было обнаружено чувствительности бактериофагов к культурам *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Pasteurella multocida*.

Второй полученный фаг представляет большой интерес для использования в лечебной терапии кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Полученный вирус способен давать лизис бактериальных клеток как *M. bovis*, так *M. bovoculi*.

Опыт выделения бактериофагов против моракселл очень органичен, поэтому полученные результаты имеют большую важность для дальнейшего развития темы замещения антибиотиков в антибактериальной терапии инфекционного кератоконъюнктивита.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Получены два литически активных моракселёзных бактериофага. Результаты по методам Аппельмана и Грация говорят о высокой активности выделенных фагов. Полученные фаги являются потенциально лечебными в антибактериальной терапии инфекционного кератоконъюнктивита.

FEATURES OF BACTERIOPHAGE ISOLATION IN BOVINE KERATOCONJUNCTIVITIS

Pimenov N. V. – Professor of the Department of Immunology and Biotechnology, Doctor of Biological Sciences (ORCID: 0000-0003-1658-1949); **Ivannikova R. F.*** – Associate Professor of the Department of Physiology, Pharmacology and Toxicology, Candidate of Biological Sciences (ORCID: 0000-0002-3522-0447); **Aiginin A. A.** – student (ORCID: 0009-0002-8001-886X); **Evtsev N. A.** – student (ORCID: 0009-0008-3018-3633).

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology - MVA named after K.I. Skryabin»

*regiotf@yandex.ru

Financing: *The materials were prepared within the framework of the 2023 Russian Science Foundation competition "Conducting Basic Scientific Research and exploratory scientific research by small individual scientific groups" (Agreement No. 24-26-00168 of 12/29/2023).*

ABSTRACT

Infectious bovine keratoconjunctivitis is a highly contagious disease that is widespread in many countries of the world with developed dairy and meat farming, causing great economic damage. This is a contagious disease characterized by lacrimation, hyperemia of conjunctival vessels, photophobia, serous-purulent discharge, opacification and ulceration of the cornea, deformation of the eyeball in the form of keratoglobus or keratoconus, partial or complete loss of vision of the affected eye of the animal. The main causative agents of keratoconjunctivitis are *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*. Due to the development of multidrug resistance to various antimicrobial chemotherapeutic drugs, there is a need to search for alternative antibacterial agents, which can include bacteriophages. In this work, the goal was to isolate bacteriophages specific to *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi*. For this purpose, 13 samples were selected from a livestock farm in the Moscow region. According to the results of the spot test, two bacteriophages were obtained from the samples, one had specificity only to *Moraxella bovoculi*, the second had lytic activity as to *Moraxella bovoculi*, and to *Moraxella bovis*. The activity according to the Appelman method ranged from 10^{-6} and 10^{-7} for *Moraxella bovoculi* and 10^{-4} for *Moraxella bovis*. According to the Grazia method, the yield was 3.2×10^7 ; 4×10^6 for *M. bovoculi* and 2×10^4 plaque-forming units for *M. bovis*.

The specificity of the lytic spectrum was confirmed in cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Pasteurella multocida*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мохаммед, З. С. Патогенная роль *Moraxella* и направления в борьбе с моракселлезной инфекцией / З. С. Мохаммед, Н. В. Пименов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2023. – № 1. – С. 73-83. – DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202301007. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=50366030>
2. Байгазанов, А. Н. Инфекционный кератоконъюнктивит (моракселлез) крупного рогатого скота в Восточном Казахстане / А. Н. Байгазанов, Э. А. Абдуллина // Евразийский союз ученых. – 2020. – № 9-3(78). – С. 49-53. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44217026>
3. ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические». Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0002-15-bakteriophagi-lechebno-profilakticheskie/>
4. Angelos JA, Ball LM, Byrne BA. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. J Vet Diagn Invest. 2011 May;23(3):552-5. doi: 10.1177/1040638711404154.
5. Angelos JA, Elizalde P, Griebel P. Bovine Immune Responses to *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* Following Vaccination and Natural or Experimental Infections. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2021 Jul;37(2):253-266. doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.002.
6. Maboni G, Gressler LT, Espindola JP, Schwab M, Tasca C, Potter L, de Vargas AC. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. Braz J Microbiol. 2015 Jun 1;46(2):545-9. doi: 10.1590/S1517-838246220140058. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26273272/>
7. McConnel CS, Shum L, House JK. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. Aust Vet J. 2007 Jan-Feb;85(1-2):70-1. doi: 10.1111/j.1751-

0813.2006.00108.x.

REFERENCES

1. Mohammed, Z. S. The pathogenic role of Moraxella and directions in the fight against moraxella infection / Z. S. Mohammed, N. V. Pimenov // Veterinary medicine, animal science and biotechnology. - 2023. - No. 1. - pp. 73-83. - DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202301007.
2. Baigazanov, A. N. Infectious keratoconjunctivitis (moraxellosis) of cattle in East Kazakhstan / A. N. Baigazanov, E. A. Abdullina // Eurasian Union of Scientists. - 2020. - № 9-3(78). - Pp. 49-53. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=4421702>
3. OFS.1.7.1.0002.15 "Bacteriophages therapeutic and prophylactic". URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0002-15-bakteriofagi-lechebno-profilakticheskie>
4. Angelos JA, Ball LM, Byrne BA. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for Moraxella bovoculi associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. J Vet Diagn Invest. 2011 May;23(3):552-5. doi: 10.1177/1040638711404154.
5. Angelos JA, Elizalde P, Griebel P. Bovine Immune Responses to Moraxella bovis and Moraxella bovoculi Following Vaccination and Natural or Experimental Infections. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2021 Jul;37(2):253-266. doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.002. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34049657/>
6. Maboni G, Gressler LT, Espindola JP, Schwab M, Tasca C, Potter L, de Vargas AC. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of Moraxella bovis, M. bovoculi and M. ovis. Braz J Microbiol. 2015 Jun 1;46(2):545-9. doi: 10.1590/S1517-838246220140058.
7. McConnel CS, Shum L, House JK. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine Moraxella isolates. Aust Vet J. 2007 Jan-Feb;85(1-2):70-1. doi: 10.1111/j.1751-0813.2006.00108.x.