

УДК: 615.281.9:578.81:616.24-002.153-084:636.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.20

ОЦЕНКА ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В ОТНОШЕНИИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, АССОЦИИРОВАННОЙ С БРОНХОПНЕВМОНИЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Киянчук М.В.* – асп. (ORCID 0009-0006-2884-9630); Сухинин А.А. – д-р биол. наук, проф. (ORCID 0000-0002-1245-3440)

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет
ветеринарной медицины»

* kiyanchuk.margosha@yandex.ru

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, телята, фаготерапия, ESKAPE, носоглоточная слизь

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, calves, bacteriophage therapy, ESKAPE, nasopharyngeal mucus

Поступила: 10.09.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

В связи с тем, что возрастает количество сообщений о резистентности к противомикробным препаратам среди различных возбудителей бактериальных болезней, наблюдается ревитализация исследований, направленных на совершенствование лечебных мероприятий, ассоциированных с фаготерапией. Однако вызывает существенное беспокойство тот факт, что данные о эффективном применении фагосодержащих препаратов ограничены, что, в свою очередь, значительно затрудняет активное внедрение данной альтернативы антибиотикам в комплекс противоэпизоотических мероприятий. В связи с этим целью исследования является анализ эффективности жидких коммерческих препаратов бактериофагов при оценке литической активности в отношении *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от телят с признаками бронхопневмонии, *in vitro*. Определение фаговых частиц проводили общепринятым методом Грациа. Литическую активность бактериофагов в ходе работы оценивали методом «spot-test». Анализ полученных нами результатов демонстрирует возможность потенциального применения коммерческих фагосодержащих препаратов в составе схемы терапевтических мероприятий при инфекционной бронхопневмонии сельскохозяйственных животных. Выделенные из носоглоточной слизи телят изоляты *Klebsiella pneumoniae* проявили чувствительность к бактериофагам, входящим в состав коммерческих биопрепаратов, применённых в исследовании. Поскольку возрастает проблема нарастающей антибиотикорезистентности среди микроорганизмов, фаготерапия становится привлекательной альтернативой.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Значительную озабоченность вызывает широкое применение антибиотиков в животноводстве, поскольку данная проблема приводит к глобальному распространению различных бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, включая *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter species*. [1]

Бактериофаги, в силу своих особенностей, являются привлекательной альтернативой антибиотикам. Род *Klebsiella* принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* – это грамотрицательный, неподвижный, инкапсулированный палочко-видный микроорганизм, который является одним из основных патогенов, вызывающих инфекции дыхательных путей как у человека, так и у животных. *Klebsiella pneumoniae* также продуцирует различные внеклеточные полисахариды, такие как липополисахариды, капсульные полисахариды и экзополисахариды, которые играют важную роль в защите бактериальных колоний от воздействия антибиотиков. [2]

Фаготерапия – это комплекс лечебных мероприятий с применением фагов в основном в качестве лекарственных средств для лечения животных от болезней инфекционной этиологии. [3, 4] На данный момент на территории Российской Федерации изготавливаются разнообразные фагосодержащие препараты, эффективные против различных возбудителей, в том числе – *Klebsiella pneumoniae*. Однако фаготерапия сталкивается с биологическими, нормативными и экономическими препятствиями на пути её дальнейшего внедрения в область сельского хозяйства. Целью исследования является анализ эффективности жидких коммерческих препаратов бактериофагов при оценке литической активности в отношении *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от телят с признаками бронхопневмонии, *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Гипермукоидные изоляты *Klebsiella pneumoniae* выделили из носоглоточной слизи телят животноводческих комплексов Ленинградской области. Работу с препаратами бактериофагов осуществляли согласно Государственной фармакопейной статье ОФС.1.7.1.0002.15. Фаговые частицы в 1 мл определяли с применением метода Грация (агаровых слоёв).

Мясопептонный 1,5% агар (ГРМ-агар) разливали в чашки Петри (диаметром 90 мм) по 20 ± 2 мл и подсушивали в стерильных условиях. Готовили десятикратные последовательные разведения фагосодержащего препарата в физиологическом растворе по методу Аппельмана от 10^{-1} до 10^{-5} . В стерильную пробирку вносили 2,5 мл, расплавленного и остуженного до 45°C 0,7% мясопептонного агара, затем добавляли 0,1 мл лизата фага и 0,5 мл суточной бульонной культуры микроорганизма. Содержимое пробирок быстро перемешивали вращением и выливали вторым слоем на поверхность 1,5% агара в чашки Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1$. Литическую активность бактериофагов оценивали методом «spot-test». На поверхность 1,5% мясопептонного агара наносили суточную культуру микроорганизма плотностью 5 ЕД по ОСО 42-28-86. Изучение чувствительности бактериальных штаммов проводилось к коммерческим лекарственным препаратам, представленным в таблице 1. Данные препараты потенциально могут выступать в качестве эффективного терапевтического средства при бронхопневмонии животных. Количество фаговых частиц в 1 мл определяли методом Грация (агаровых слоёв). Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (*Klebsiella polyvalent bacteriophage purified*) и Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (*Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified*) оценивали с *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из носоглоточной слизи телят животноводческих комплексов Ленинградской области. Проводили три параллельных опыта с каждым изолятом.

Таблица 1 – Коммерческие лекарственные препараты, используемые в исследовании

Наименование препарата	Производитель
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	НПО «Микроген», Российская Федерация
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	НПО «Микроген», Российская Федерация

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Для определения концентрации фаговых частиц в маточном фаге подсчитывали количество негативных колоний (прозрачные пятна на матовом фоне глубинного роста бактерий) в каждой чашке, умножали на коэффициент разведения фага в пробирке с соответствующим разведением. Затем вычисляли среднее значение 3 определений. Результаты приведены в таблице 2.

Изучение литической активности коммерческих бактериофагов с микроорганизмами, выделенными из носоглоточной слизи телят, проводили «spot-test» и представили в таблице 3. Реакцию оценивали в соответствии с ОФС.1.7.1.0002.15.

В условиях нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей

респираторных болезней крупного рогатого скота фаготерапия позволяет усовершенствовать существующие и разработать новые схемы лечебно-профилактических мероприятий при болезнях дыхательной системы животных. При подборе препарата на основе бактериофагов следует избегать лизогенных фагов с потенциалом горизонтального переноса генов устойчивости к токсинам или антибиотикам между бактериями в пользу вирулентного фага, неспособного к лизогенному циклу. *In vitro* анализ литической активности позволяет оперативно и эффективно оценить потенциальную эффективность фагосодержащего препарата по отношению к конкретному возбудителю.

Таблица 2 – Концентрация фаговых частиц в коммерческих препаратах

Наименование препарата	Тест-штамм	Концентрация бактериофага, БОЕ/мл
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №1)	$9,0 \times 10^5 \pm 0,368 \times 10^5$
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №2)	$4,8 \times 10^5 \pm 0,124 \times 10^5$
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №3)	$4,7 \times 10^5 \pm 0,216 \times 10^5$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №1)	$9,4 \times 10^5 \pm 0,125 \times 10^5$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №2)	$5,0 \times 10^5 \pm 0,163 \times 10^5$
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №3)	$4,8 \times 10^5 \pm 0,125 \times 10^5$

Таблица 3 – Спектр литической активности коммерческих бактериофагов в отношении бактериальных культур, выделенных из носоглоточной слизи телят

Наименование препарата	Тест-штамм	Активность
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №1)	«++++»
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №2)	«++++»
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №3)	«+++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №1)	«++++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №2)	«+++»
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный (<i>Bacteriophage klebsiella pneumoniae purified</i>)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (животноводческий комплекс №3)	«+++»

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В ходе работы проанализировали *in vitro* эффективность коммерческих препаратов бактериофагов (Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный, Полибактериофаг комплексный). Анализ полученных результатов демонстрирует возможность их потенциального применения в составе схемы терапевтических мероприятий при инфекционной бронхопневмонии сельскохозяйственных животных. Выделенные из носоглоточной слизи телят изоляты *Klebsiella pneumoniae* оказались чувствительными к бактериофагам, входящих в состав коммерческих биопрепаратов. Поскольку возрастает проблема нарастающей антибиотикорезистентности среди микроорганизмов, фаготерапия становится привлекательной альтернативой.

EVALUATION OF LYTIC ACTIVITY OF COMMERCIAL BACTERIOPHAGE PREPARATIONS AGAINST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ASSOCIATED BRONCHOPNEUMONIA OF CATTLE

Kiyanchuk M.V.* – Postgraduate student; Sukhinin A.A. – Grand PhD in Biology, Professor

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

* kiyanchuk.margosha@yandex.ru

ABSTRACT

As the number of reports of antimicrobial resistance among various bacterial pathogens is increasing, there has been a revitalisation of research aimed at improving therapeutic measures associated with phage therapy. However, the fact that data on the effective use of phage-containing preparations are limited is of considerable concern, which, in turn, significantly hampers the active introduction of this alternative to antibiotics in the complex of anti-epizootic measures. In this regard, the aim of the study is to analyse the effectiveness of liquid commercial preparations of bacteriophages in assessing the lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* isolated from calves with signs of bronchopneumonia, *in vitro*. Determination of phage particles was carried out by the conventional Gratia method (agar layers). The lytic activity of bacteriophages was evaluated by «spot-test» method. The analysis of our results demonstrates the possibility of potential application of commercial phage-containing preparations as part of the scheme of therapeutic measures in infectious bronchopneumonia of farm animals.

Klebsiella pneumoniae strains isolated from nasopharyngeal mucus of calves showed sensitivity to bacteriophages included in commercial biopreparations used in the study. As the problem of growing antibiotic resistance among microorganisms is increasing, phage therapy becomes an attractive alternative.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abedon ST. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015 Apr 18;5 (1):e1020260. doi: 10.1080/21597081.2015.1020260. PMID: 26442188; PMCID: PMC4422798.
2. Carmody, Lisa A «Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection» *The Journal of infectious diseases* vol. 201,2 (2010): 264-71. doi:10.1086/649227
3. Dzuliashvili, M et al. «Study of therapeutic potential of the experimental *Pseudomonas* bacteriophage preparation» *Georgian medical news*, 147 (2007): 81-8. Finlay WH: *Mechanics of Inhaled Pharmaceutical Aerosols: An Introduction*. Academic Press, San Diego, CA; 2001.
4. Schooley, Robert T «Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails to Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection» *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 61,10 e00954-17. 22 Sep. 2017, doi:10.1128/AAC.00954-17
5. Takemura-Uchiyama, Iyo et al. «Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice.» *Microbes and infection* vol. 16,6 (2014): 512-7. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.011
6. Talavera-Gonzalez, Juan & Talavera-Rojas, Martín. (2021). Bacteriófagos, los virus comebacterias: historia de dos mentes científicas. *Revista Digital Universitaria*. 22. 10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.5.9.
7. Wright, A et al. «A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy» *Clinical otolaryngology: official journal of ENT-UK ; official journal*

of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery vol. 34,4 (2009): 349-57. doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x

8. Zurabov F, Zhilenkov E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation. *Virology*. 2021 Jan 6;18(1):9. doi: 10.1186/s12985-020-01485-w. PMID: 33407669; PMCID: PMC7789013.

9. Амирбеков, М. Респираторные болезни рогатого скота в условиях промышленного и отгонного животноводства Таджикистана (этиология, профилактика и лечение): специальность 16.00.03: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Амирбеков Муложон. – Москва, 1993. – 39 с.

10. Кольберг, Н. А. Анализ эпизоотической ситуации при респираторных заболеваниях крупного рогатого скота инфекционной этиологии в предприятиях Уральского региона / Н. А. Кольберг, О. Г. Петрова, С. А. Марковская // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. – 2013. – № 6(37). – С. 46-51.

REFERENCES

1. Abedon ST. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015 Apr 18;5 (1):e1020260. doi: 10.1080/21597081.2015.1020260. PMID: 26442188; PMCID: PMC4422798.
2. Carmody, Lisa A et al. «Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection» *The Journal of infectious diseases* vol. 201,2 (2010): 264-71. doi:10.1086/649227
3. Dzuliashvili, M et al. «Study of therapeutic potential of the experimental *Pseudomonas* bacteriophage preparation» *Georgian medical news*, 147 (2007): 81-8. Finlay WH: *Mechanics of Inhaled Pharmaceutical Aerosols: An Introduction*. Academic Press, San Diego, CA; 2001.
4. Schooley, Robert T et al. «Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails to Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter*

- bacter baumannii Infection.” Antimicrobial agents and chemotherapy vol. 61,10 e00954-17. 22 Sep. 2017, doi:10.1128/AAC.00954-17
5. Takemura-Uchiyama, Iyo et al. «Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by Staphylococcus aureus in mice» Microbes and infection vol. 16,6 (2014): 512-7. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.011
6. Talavera-Gonzalez, Juan & Talavera-Rojas, Martín. (2021). Bacteriófagos, los virus comebacterias: historia de dos mentes científicas. Revista Digital Universitaria. 22. 10.22201/cuaiced.16076079e.2021.22.5.9.
7. Wright, A et al. “A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy.” Clinical otolaryngology: official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery vol. 34,4 (2009): 349-57. doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x
8. Zurabov F, Zhilenkov E. Characterization of four virulent Klebsiella pneumoniae bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation. Virol J. 2021 Jan 6;18(1):9. doi: 10.1186/s12985-020-01485-w. PMID: 33407669; PMCID: PMC7789013.
9. Amirbekov, M. Respiratory diseases of horned cattle in conditions of industrial and distant cattle breeding in Tajikistan (etiology, prevention and treatment) : speciality 16.00.03 : thesis abstract for the degree of Doctor of Veterinary Sciences / Amirbekov Mulozhon. - Moscow, 1993. - 39 c. (in Russ.)
10. Kolberg, N. A. Analysis of the epizootic situation in respiratory diseases of cattle of infectious etiology in the enterprises of the Ural region / N. A. Kolberg, O. G. Petrova, S. A. Markovskaya // Agrarnaya nauka Euro-North-East. - 2013. - № 6(37). - С. 46-51. (in Russ.)