

БАКТЕРИОФАГИ MORAXELLA: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

**Пименов Н.В., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой
иммунологии и биотехнологии**

Мохаммед З.С., аспирант, Тел. +79851325110

Zahraasahib92@gmail.com

ФГБОУ ВО МГАВМИИБ – МВА имени К.И. Скрябина

Ключевые слова: *Moraxella*, IBK, инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота, бактериофаги, свойства

Целью работы являлось выделение и характеристика бактериофагов, уникальных для видов *Moraxella*, возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота (IBK). Выделены три перспективных бактериофага, изучены их биологические свойства, позволяющие определить данные фаги как штаммы-кандидаты для создания лекарственного средства. Результаты исследований демонстрируют потенциал фаготерапии в борьбе с моракселлезной инфекцией.

Введение. Виды *Moraxella*, особенно *Moraxella bovis* и *Moraxella bovoculi*, являются значительными патогенами у крупного рогатого скота, вызывая инфекционный кератоконъюнктивит у коров (IBK), который представляет собой острое инфекционное заболевание, характеризующееся слезотечением, гиперемией, инъекцией конъюнктивальных артерий и фотобоязнью. Это вызывает выделение, помутнение и изъязвление роговицы, а, также, деформацию глазного яблока, что может привести к частичной или полной слепоте. [1]

Инфекционный кератоконъюнктивит у крупного рогатого скота вызывается сочетанием биологических и физических факторов. Пыль, высокая трава и недостаток витамина А на пастбище влияют на течение болезни как у отдельных животных, так и у всего пораженного стада. [2-3]

Эффективность специфической профилактики низкая. Помимо этого, чрезмерное использование антибиотиков в ветеринарной практике усугубляет проблему антимикробной резистентности, что может осложнить терапевтические мероприятия и увеличивает их стоимость и трудоемкость [4].

В свете этих трудностей все большее число организаций проявляет интерес к альтернативным методам терапии. Использование бактериофагов — вирусов, которые избирательно атакуют и уничтожают бактерии — является одной из многообещающих стратегий. Фаги — это природные вещества, которые можно найти в различных средах, включая воду, почву и ткани животных. Они являются важным оружием в борьбе с болезнями, устойчивыми к антибиотикам. Фаговая терапия минимизирует повреждение микробиома хозяина, селективно лизируя патогенные бактерии, в отличие от традиционных антибиотиков, которые могут нарушить всю микробную экосистему [5-6].

Новые подходы к лечению бактериальных инфекций у крупного рогатого скота стали возможны благодаря недавним достижениям в бактериофаговой терапии. Изоляция и характеристика фагов, которые избирательно нацеливаются на виды *Moraxella*, являются темой активных исследований.

Материалы и методы. В процессе работы были отобраны 156 образцов биологического материала (пробы речных вод, почвы, навоза в животноводческих комплексах Московской области) для выделения фагов. В качестве тест-культур моракселл использованы изоляты нашей коллекции *Moraxella bovis* (n=3), *Moraxella bovoculi* (n=4), *Moraxella ovis* (n=3), выделенные ранее из клинического материала от больных животных в Московской области и Республике Дагестан.

Изоляция фагов осуществлялась с использованием метода двойного агарного наложения бактериофаги были изолированы путем смешивания образцов окружающей среды с культурой *Moraxella*.

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и методу Грация. Морфологию бактериофагов изучали в электронной микроскопии с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM-1011 на базе НПО «МикроМир». Устанавливали адсорционную способность,

латентный период и средний урожай фаговых частиц (размер вспышки) традиционными методами, описанными М. Адамсом в одночном цикле развития.

Различные штаммы *Moraxella* и другие грамотрицательные бактерии были протестированы на чувствительность к изолированным фагам для определения специфичности хозяев.

Результаты исследований и их обсуждение. Три бактериофага были выделены из воды реки Москва, и результаты были получены после проведения точечного теста на агаре Мюллера-Хинтона. Через 24 часа появились прозрачные пластины – зоны негативного роста: первый фаг имел прозрачные зоны диаметром 1-2 мм с ореолом, второй – прозрачный центр с гладким краем и диаметром 0,5-1 мм, а третий – прозрачный центр с ореолом 1-3 мм. (табл. 1)

Таблица 1. Выделенные фаги и их эффективность

Фаг	Морфология негативных колоний		Литическая активность	
	Форма	Диаметр	по методу Аппельмана	по методу Грация
Фаг 1	Прозрачный центр с ореолом	1-2 мм	10^{-8}	$5.3 \cdot 10^8$
Фаг 2	прозрачный центр с гладким краем	0.5-1 мм	10^{-8}	$12 \cdot 10^9$
Фаг 3	прозрачный центр с ореолом	1-3 мм	10^{-6}	$5.5 \cdot 10^7$

Электронная микроскопия позволила изучить морфологию бактериофагов и отнести их к семейству *Myoviridae*. У них нет оболочки, и они состоят из головки и хвоста. Головка имеет икосаэдрическую симметрию, в то время как хвост трубчатый и демонстрирует спиральную симметрию. В капсиде, который образует головку, находится 152 капсомера. Средняя длина хвоста составляет 193 нм, а средний диаметр головы – 84 нм. (рисунок 1)



Рис. 1. Электронная микрография бактериофагов Phagum *Moraxella bovis* №1 (250k)

Было установлено, что изолированные фаги показали положительные результаты лизиса на всех изолятах *Moraxella*, в том числе и на *Moraxella ovis*, нозологическая роль в ИВК которой была нами ранее установлена и описана. [7] При этом бактериофаги не проявили литической активности к микроорганизмам других видов, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*.

Устойчивость трех изолированных фагов была измерена их активностью при различных температурах и pH. Все три фага были активны и демонстрировали полную стабильность лизиса в диапазоне температур 4 -40 °С, два из фагов оставались стабильными также при -20 °С, а один из фагов был стабильным при +50 °С.

Все выделенные нами фаги были стабильны при нейтральном pH (7), не показывая снижения титра. и все они были стабильны в диапазоне (5-9), один фаг был активен при pH (4), а другой был стабильным при pH=10.

Скорости, с которыми фаги прилипают к своим бактериальным хозяевам, известны как скорость адсорбции, и они напрямую влияют на то, насколько хорошо фаг снижает количество бактерий.

С помощью метода двойного слоя агар-агара было количественно определено количество инфекционных фагов после инкубации фагов с бактериальным хозяином. В течение первых получаса средняя скорость быстрой адсорбции изолированных фагов на изолятах *Moraxella* достигла примерно 86,21 % от их максимальной адсорбции. Высокая плотность бактериальных клеток в культуре, которая предлагает множество мест связывания для фагов, вероятно, является причиной этого быстрого прикрепления.

Латентный период трех фагов составлял 40, 50 и 35 минут, при этом этот период определяется как время между инфекцией бактерии фагом и первым высвобождением новых фаговых частиц. Размер выброса определяется как количество новых фаговых частиц, высвобождаемых из одной инфицированной бактериальной клетки, и для наших фагов среднее количество новых высвобожденных фагов составляет 72 фага.

Заключение. Наше исследование позволило успешно изолировать и охарактеризовать бактериофаги, уникальные для видов *Moraxella*, что свидетельствует о их перспективности в качестве альтернативного метода лечения инфекционного кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота. Выделенные бактериофаги оказались литически активными ко всем изолятам *Moraxella bovis* (n=5), *Moraxella bovoculi* (n=4), *Moraxella ovis* (n=3) нашей коллекции. То есть каждый бактериофаг был невидоспецифичен, а специфичен ко всем нозологически актуальным видам и эпизоотическим штаммам, отобранным в трехлетний период в различных хозяйствах Российской Федерации.

Оценка стабильности этих фагов при различных температурах и уровнях pH показала, что они остаются высокоактивными в регулируемых условиях, что указывает на их потенциал для использования в терапевтических целях. Кроме того, тесты в одиночном цикле развития показали эффективность фагов в снижении популяций бактерий и их быструю адсорбцию на клетках *Moraxella*.

Полученные бактериофаги с их производственно-перспективными свойствами позволяют нам прототипировать лекарственное средство для лечения инфекционного

кератоконъюнктивита крупного и мелкого рогатого скота. В настоящее время проводятся доклинические испытания фагового коктейля.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 24-26-00168 <https://rscf.ru/project/24-26-00168/>

Библиографический список:

1. Гаффаров, Х.З. Клинико-эпизоотологические особенности инфекционных диарей новорожденных телят и основные принципы их профилактики и лечения/Х.З.Гаффаров//Труды первого съезда вет. врачей РТ. - Казань, 1995.- С. 163-167.
2. Гаффаров, Х.З. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота/Х.З.Гаффаров //Ветеринария, 2007. - С. 21-24.
3. Карайченцев, Д.В. Совершенствование лабораторной диагностики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, автореф. дис канд, вет. наук /Д.В. Карайченцев, 2016. – С. 23.
4. Kneipp, M. Perceptions and practices of Australian cattle farmers for the treatment of pinkeye (infectious bovine keratoconjunctivitis) /M.Kneipp, A.Green,M.Govendir,M.Laurence,N.Dhand//Prev.Vet.Med. – 2021.- С. 105-204.
5. Ленев, С.В. Бактериофаги как средство борьбы с сальмонеллезом и колибактериозом/С.В.Ленев, М.К.Пирожков, А.В.Моторыгин, А.А. Галиакбарова, Н.В.Пименов, А.С.Клёнов, Н. С. Абросимова, // Ветеринария, зоотехния и биотехнология, 2021. - С. 28–35.
6. Глазунов, Е.А.Изучение профилактической эффективности препарата бактериофагов при эндометритах у коров в условиях молочно-товарной фермы /Е.А. Глазунов, Н. В.Пименов, Л.Ф.Сотникова, // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 2016. – С. 90-96.
7. Мохаммад, З.С.Зоопатогенная роль *Moraxella ovis*. / З.С. Мохаммад, Н.В.Пименов//Мат-лы Междунар. науч.-практ. конфю, посвящ. 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности МЗ РК «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития»; Алматы, 6-8 сентября 2023 г. – Алматы: НИИПББ, 2023.–С.50-52.

MORAXELLA BACTERIOPHAGES: BIOLOGICAL PROPERTIES AND PROSPECTS FOR APPLICATION

Pimenov N.V., Mohammed Z.S.

FGBOU VO MGAVMIIB – MBA named after K.I. Skryabin

Keywords: *Moraxella, IBK, infectious keratoconjunctivitis of cattle, small ruminants, bacteriophages, properties*

The aim of the work was to isolate and characterize bacteriophages unique to Moraxella species, the causative agents of infectious keratoconjunctivitis in cattle. (IBK). Three promising bacteriophages have been isolated, and their biological properties have been studied, allowing these phages to be identified as candidate strains for the development of a therapeutic agent. The results of the studies demonstrate the potential of phage therapy in combating Moraxella infection.