

**OPTIMIZATION OF INOCULUM DOSE OF
INACTIVATED SWINE INFLUENZA VACCINE
FOR IMMUNE PROTECTION OF PIGS**

*Remyga S.G., Goryushev O.Y., Gruzdev K.N., Shevtsov A.A.,
Biryuchenkov D.A.*

Keywords: *swine influenza, vaccine, antibody titers.*

The amount of vaccine immunizing dose can significantly affect the rate of active immunity formation, intensity and the number of positively react animals in the herd to the vaccination.

The objective of our research was to determine the vaccination dose of emulsified inactivated vaccine against swine influenza virus (SIV) for immunization of pigs.

УДК 579.24

БАКТЕРИОФАГИ КЛЕБСИЕЛЛ: ИХ РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ

*Садртдинова Г.Р., аспирант факультета ветеринарной медицины
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,
Ульяновск, Россия*

Ключевые слова: бактериофаги, штамм, антибиотики, биопленки

*В статье приводится современный обзор литературы, отражающей значимость и роль вирусов бактерий рода *Klebsiella*, в том числе и в жизни человека.*

Бактерии рода *Klebsiella* известны как возбудители многих опасных заболеваний: пневмонии, заболеваний мочеполовой системы, острых кишечных инфекции, различных гнойно-септических осложнений, а также внутрибольничных инфекций, менингитов. Известно так

же, что *K. pneumoniae* играет этиологическую роль при маститах, пневмониях, септицемиях коров, свиней, лошадей, обезьян, инфекционной диарееи молодняка животных [1,2,3,5]. Отмечено носительство данного микроорганизма, так *K. pneumoniae* выделяли из ротоглотки и ЖКТ у 5 % практически здоровых людей [11].

Помимо организма животных и людей, фаги обнаруживают также во внешней среде: в пресной и морской воде, сточных водах, почве, на растениях в промышленных стоках, древесине [15,16, 18, 19]. Такое широкое повсеместное распространение клебсиелл называют экологической загадкой, и связано оно, по-видимому, с особыми биологическими свойствами микроорганизмов – наличием капсулы, которая, возможно, обеспечивает их устойчивость ко многим факторам окружающей среды. При комнатной температуре клебсиеллы сохраняются неделями и месяцами. В пробах пыли, взятой при различной степени влажности, они сохраняются до 2,5 лет.

Об устойчивости клебсиелл к низким температурам свидетельствует и тот факт, что их, как единственных представителей семейства энтеробактерий, удалось обнаружить в воде Антарктического озера. Выделенные из воды и из организма больных диареей полярников штаммы клебсиелл могли расти при температуре от +4° до +45 °С. При этом культуральные и ферментативные свойства у вышеупомянутых культур микроорганизмов проявлялись одинаково как при +37°, так и при +4 °С [13].

Так, в США в период 2010-2012 серьезной проблемой стала пневмония, вызванная бактерией *Klebsiella*, которая живет в кишечнике и через лимфоток проникает в легкие, вызывая их воспаление. В 100 % случаев такой больной обречен. В Германии, Австрии вред от внутрибольничных заболеваний, вызванных клебсиеллами-огромен. Политика этих стран в области здравоохранения направлена на решение данной проблемы. Огромные средства уходят на разработку препаратов, способных бороться с клебсиеллами. В связи с тем, что постоянно мутирующие бактерии клебсиелл приобретают устойчивость к антибиотикам, эффективность их применения за последние годы ослабла. В последнее время внимание исследователей стали привлекать бактериофаги - вирусы, «пожирающие» бактерии [9].

Изучением бактериофагов *Klebsiella* занимались разные научные школы, как в нашей стране, так и зарубежом. Активная работа в этой области проводилась отечественными, польскими и венгерскими учеными. А. Przondo-Hessek (1968) изучила способность типирования тридцати пяти выделенных ею фагов четырехсот восьмидесяти штам-

мов *Klebsiella*. В дальнейшем автором были подвергнуты сравнительному изучению 46 фагов из венгерской и польской коллекций и составлен рабочий фаговой набор. В этот набор вошли 10 фагов для фаготипирования *K. pneumoniae* и 6 – для фаготипирования *K. rhinoscleromantis*.

Английские исследователи M. Gaston et al. (1987) разработали новую схему фаготипирования клебсиелл (*K. pneumoniae* и *K. oxytoca*). Авторы использовали в работе 11 фагов польской коллекции и 63 выделенных из сточных вод. В результате были отобраны 15 типизирующих фагов (9 из польской коллекции). Эти фаги типировали из 286 бактериальных штаммов до 87,3 %, штаммы принадлежали более чем к 70 сероварам. Причем штаммы сероваров K2, K3 и K21 удалось типировать в 93,89 % случаев.

Канадскими исследователями P. Pieroni et al. (1994) для дифференциации изолятов *K. pneumoniae*, была создана панель из 91 бактериофага.

Польскими учеными (Slopek, 1978) исследована морфология и ультраструктура типизирующих фагов *Klebsiella* и составлен подробный атлас фотографий фаговых частиц, изученных с помощью электронной микроскопии.

В нашей стране аналогичные исследования проводили И.М. Габрилович с соавт. (1970; 1973; 1981; 1983). Ими были выделены типизирующие фаги (L1, 318, 634 и др., всего 9 наименований), испытанные вместе с 10 фагами польской коллекции (K11, K12 и др.) в опытах лизотипии 516 культур (Габрилович с соавт., 1973). Чувствительными к фагам оказалось 61,2 % клебсиелл, типичных по биохимическим признакам. Позднее И.М. Габрилович с соавт. (1983) исследовали 438 штаммов клебсиелл, выделенных из клинического материала, с помощью 24 типовых фагов из польской венгерской и отечественной коллекций. Авторы установили, что из 347 штаммов клебсиелл, типичных по биохимическим свойствам, оказались чувствительными к фагам 77,5 %, а из группы атипичных культур (91 штамм) определить фаготип удалось лишь у 14,2 % штаммов [6].

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновской ГСХА им.П.А.Столыпина», практически с самого начала своего существования, определила одним из приоритетных научных направлений – выделение и изучение бактериофагов, значимых в практике микроорганизмов. Начало исследований по бактериофагам на кафедре связано с именем В.Я.Ганюшкина (1967 год, бактериофаги *S.cholerae-suis*). Работу по выделению и изучению бактериофагов патогенных энтеробактерий продолжил С.Н.Золотухин. В настоящее время на базе кафедры создан Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии с одной из лабораторий прикладной микробиологии и биотехнологии бактериофагов [10, 12, 14]. К основным задачам, решаемым

коллективом кафедры, в т.ч. относится выделение, изучение биологических свойств и селекция бактериофагов бактерий рода *Klebsiella*.

Благодаря своему разрушающему (литическому) действию на бактерии фаги давно используются с лечебно-профилактической целью при различных заболеваниях (дизентерия, холера, различные гнойно-воспалительные заболевания).

Отечественная промышленность, в частности ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Биомед (г. Пермь), выпускает широкий спектр лекарственных бактериофагов, среди которых и клебсиеллезный фаг. В отличие от антибиотиков (табл.1), которые уничтожают как вредную, так и здоровую микрофлору организма, клебсиеллезные бактериофаги избирательны, под их воздействие попадают только патогенная микрофлора [7, 8].

Таблица 1 - Сравнение профилактического и терапевтического использования фагов и антибиотиков (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России)

Показатель	Бактериофаги	Антибиотики
Воздействие на бактерии	Фаги эффективно убивают чувствительные клетки бактерий (их действие бактерицидное).	Некоторые антибиотики (например, хлорамфеникол) бактериостатические; они скорее ингибируют рост бактерий, чем убивают клетки.
Побочные эффекты	Незначительные побочные эффекты при применении лечебных фагов (могут быть вызваны высвобождением эндотоксинов из бактерий, лизированных <i>in vivo</i> фагами).	Для антибиотиков характерно множество побочных эффектов, включая кишечные расстройства, аллергии и вторичные инфекции (например, грибковые инфекции).
Разработка новых препаратов	Естественная коэволюция бактерий и фагов может облегчить получение новых литических фагов против фагоустойчивых бактерий, появляющихся в результате действия других фагов или естественных изменений в бактериальных популяциях.	Создание новых антибиотиков (например, против антибиотикоустойчивых бактерий) требует временных затрат и может занять много лет.
Применение препарата	Из-за специфичности фагов их успешное использование для предупреждения и лечения бактериальных инфекций требует идентификации этиологического агента и определения его чувствительности к фаговому препарату <i>in vivo</i> перед началом фагового лечения.	Эмпирически назначенные до идентификации этиологического агента антибиотики с большей вероятностью будут эффективны нежели фаговые препараты.

Столь высокая эффективность применения клебсиеллезных бактериофагов состоит в отсутствии противопоказаний и осложнений, сочетаемости с другими лекарствами, активном воздействии на антибиотико-устойчивые микробы. Благодаря этим свойствам, бактериофаги оценены как препараты будущего для успешной борьбы с инфекциями, вызванными бактериями рода *Klebsiella*.

По современным данным, 95-99 % микроорганизмов образуют биопленку. Образование биопленки- одна из стратегий выживания бактерий в занимаемой ими экологической нише. Бактерии в биопленках более устойчивы к негативным воздействиям окружающей среды (изменение температурного оптимума, влажности, pH, осмолярности, доступности источников питания) и выживают в присутствии многих антибиотиков. Поэтому роль бактериофагов при разрушении биопленок, образованных различными патогенными и условно-патогенными бактериями (*Salmonella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*), несомненно, велика.

Участие фагов в разрушении биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella*, сегодня еще изучается. Нельзя с точностью сказать какова направленность действия, как быстро, с какой силой и какова результативность разрушения сообщества микроорганизмов, при введении того или иного препарата бактериофага [17]. При помощи современной аппаратуры и современных методов изучения данного феномена, разрешение этих вопросов не «за горами».

Бактериофаги бактерий рода *Klebsiella*, их роль и значение продолжают изучаться учеными многих стран, многих научно-исследовательских центров. Это связано, в том числе, и с открытием новых «небезобидных» видов рода (*Kl.singaporensis*, *Kl.mobilis*, *Kl.variicela*, *Kl.aerogenes*, *Kl.milletis*, *Kl.senegalensis*). Открытие новых видов клебсиелл требует и выделения соответствующих фагов, и, как следствие, их изучение. Апробируются различные методики по деструкции бактериальных биопленок образованных бактериями рода *Klebsiella*, где одним из главенствующих факторов разрушения выступает бактериофаг. Есть масса идей по применению фага бактерий данного рода, например, в качестве потенциального лекарственного агента при инфекционных заболеваниях. Предлагается одна за другой потрясающие терапевтические концепции (вполне возможно, что в будущем антибиотики будут прикреплять к фагам, используя последние в качестве ультраточного транспорта к бактериальным клеткам [4].

Библиографический список:

1. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных // Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.

2. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями // Ульяновск ГСХА. – 2005. – С. 43 – 48.

3. Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Каврук Л.С., Молофеева Н.И., Пульчеровская Л.П., Коритняк Б.М., Бульканова Е.А., Феоктистова Н.А., Пожарникова Е.Н., Мелехин А.С., Барт Н.Г., Катмакова Н.П. Выделение и селекция клонов бактериофагов патогенных энтеробактерий // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: матер. междунар. научн. конф. – Ульяновск, 2006. – С. 227 – 231.

4. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – 365-369 с.

5. Кукава Г.Г., Джикидзе Э.К., Стасилевич З.К., Крылова Р.И., Кебу Т.И. Биологическая характеристика клебсиелл, выделенных от обезьян в норме и при патологии // Balt. J. Lab. Anim. Sci. – 1998. – № 4. – С. 231 – 237.

6. Ляшенко Е. // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2004.

7. Ляшенко, Е.А. Индикация бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов, в объектах ветеринарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» - Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. т. II - С. 36-40.

8. Ляшенко, Е.А. Обнаружение бактерий рода *Klebsiella* с помощью реакции нарастания титра фага в пищевом сырье и продуктах питания / Е.А. Ляшенко., С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // материалы V Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» - Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. - С. 101-104.

9. Мамонтова Л.М., Савилов Е.Д., Рахманин Ю.А. Условно-патогенные микроорганизмы и их распространение в водных экосистемах Сибири // Гигиена и санитария. – 2005. – № 3 – С. 13 – 17.

10. Молофеева Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* O157 и их применение в диагностике/ Н.И. Молофеева// Автореф. дис. кан. биол. наук. - Саратов, 2004. - 20 с.

11. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – М.: Медицина, 1999. – С. 389 – 393.

12. Пульчеровская Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике// Л.П. Пульчеровская// Афтореф. дис. канд. биол. наук. -Саратов, 2004. -21 с.

13. Трухина Г.М. Оценка методов выделения и циркуляции клебсиелл в объектах окружающей среды // Методы индикации биоценоза патогенных и потенциально патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды. – М., 1985. – С. 63 – 69.

14. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода *Proteus*// материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» - Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. - С. 171-185.

15. Bagley S.T., Seidler R.J., Talbot H.W.J., Morrow J.E. Isolation of *Klebsiellae* from within living wood // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1978. – V. 36. – P. 178 – 185.

16. Brown C., Seidler R.J. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma // *Appl. Microbiol.* – 1973. – V. 25. – P. 900 – 904.

17. Edberg S.C., Piscitelli V., Cartter M. Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – V. 52. – P. 474 – 478.

18. Matsen J.M., Spindler J.A., Blosser R.O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates // *Appl. Microbiol.* – 1974. – V. 28. – P. 672 – 678.

19. Seidler R.J., Knittel M.D., Brown C. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources // *Appl. Microbiol.* – 1975. – V. 29. – P. 819 – 825.

BACTERIOPHAGES KLEBSIELLA: THEIR ROLE AND IMPORTANCE

Sadrtdinova G.R.

Keywords: *bacteriophages, strain, antibiotics, biofilms*