

**N. P. Ivanov, R. S. Sattarova, F. A. Bakiyeva,  
M. G. Goderdzishvili, S. Rigvava, N. Karumidze**

LLP "Kazakh Scientific research Veterinary Institute", Almaty, Kazakhstan,  
George Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia.  
E-mail: akademik-vet@mail.ru; ranosaitomarovna@gmail.com; flurachka-78@mail.ru; mgoderdzishvili@pga.ge;  
sophierigvava@pga.ge; natiakuramidze@pga.ge.

## **ISOLATION OF PHAGE AGAINST CAUSATIVE AGENTS OF MOROCCELOSIS IN CATTLE IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

**Abstract.** According to official statistics of veterinary reports, during the period 2012–2017, 29 356 animals of the Aberdeen-Angus breed used in beef production were imported to the Republic. 11,038 heads of which – 37.6%, had eye lesions with infectious keratoconjunctivitis. Throughout oblasts, the percentage of animals with infected eyes ranged from 39.87 to 40.0%.

The first studies to identify the etiologic factor of the disease were conducted in the Kazakh SRVI with the biomaterial delivered from economic entities of the Almaty and Akmola oblasts. Isolated bacterial culture was assigned to the genus *Moraxella* after differentiation.

One of the promising methods of pathogen destruction, hence moraxella, is bacteriophage due to its relatively superficial parasitism (on the sclera of the eyeball and mucous conjunctiva).

**Keywords:** culture, strain, bacteria, moraxella, infectious keratoconjunctivitis, antibiotic sensitivity, phages.

УДК 619:616.98.578.636

**Н. П. Иванов, Р. С. Саттарова, Ф. А. Бакиева,  
М. Годердзишвили, С. Ригвава, Н. Курамидзе**

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы, Казахстан,  
Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии им. Г. Элива, Тбилиси, Грузия

## **ВЫДЕЛЕНИЕ ФАГА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МОРАКСЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН**

**Анотация.** Согласно официальным статистическим данным ветеринарной отчетности, за 2012–2017 гг. в Республику было завезено 29 356 животных породы Абердино-Ангусов мясного направления продуктивности. Из указанного количества 11 038 голов, что составляло 37,6%, имели поражения глаз инфекционным кератоконъюнктивитом. В разрезе областей процент животных с пораженными глазами колебался от 39,87 до 40,0.

Первые исследования по выявлению этиологических факторов заболевания были проведены Казахским НИВИ с биоматериалом доставленным с хозяйствующих субъектов Алматинской и Акмолинской областей. При этом была выделена бактериальная культура, которая при дифференциации отнесена нами к роду *Moraxella*.

Одним из перспективных приемов губительного воздействия на возбудителя болезни, каким является моракселла, в силу его относительно поверхностного паразитирования (на склере глазного яблока и слизистой конъюнктивы) является бактериофагия.

**Ключевые слова:** культура, штамм, бактерия, moraxella, инфекционный кератоконъюнктивит, антибиотикочувствительность, фаги.

**Актуальность темы.** Болезни глаз инфекционной этиологии у животных причиняют животноводству большие экономические потери. К настоящему времени в Казахстане большое эпизоотологическое значение имеет инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота моракселлезной этиологии.

Моракселлез относится к экзотическим болезням, так как чаще отмечается у импортированного скота мясной породы (Абердино-Ангусы).

Экономический ущерб, причиняемый моракселлезом, складывается из снижения продуктивности больных животных, нередко вынужденной выбраковки пораженного поголовья, а также затрат на лечение заболевшего скота и проведение профилактических мероприятий. Сложность лечения при болезнях глаз требует индивидуального подхода, что представляет трудность осуществления этих мероприятий, особенно с наличием большого числа зараженных особей в стаде.

В литературе имеются сообщения о положительном результате применения антибиотиков при ИКК [1-3]. На основании теста на антибиотикочувствительность ранее нами было предложена мазь для лечения ИКК моракселлезной этиологии, которая была апробирована на крупном рогатом скоте в одном из хозяйствующего субъекта Алматинской области [4].

Антибиотики, наряду с эффективностью, нередко кумулируются в органах животных и могут передаваться по пищевой цепочке в организм человека. При выделении их в окружающую среду они отрицательно влияют на экологические условия [5].

Антибиотикорезистентность бактерий – это результат бесконтрольного применения антибактериальных препаратов не только для лечения, но и в качестве профилактических средств в области медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности и в быту [6-12]. А. Флеминг, первооткрыватель пенициллина, предупреждал, что устойчивость микробов к препарату может появляться достаточно быстро [13, 14].

При усилении резистентности бактерий к антибиотикам возникает острая необходимость изыскания альтернативных путей антимикробного воздействия.

В конце XIX (1896 г. британский бактериолог Эрнест Ханкин [15], 1898 г. российский ученый Н. Ф. Гамалея) и начале XX столетия (английский бактериолог Туорт, 1915 г., канадский бактериолог Феликс Д'Эрелль, работавший в институте Пастера в Париже, 1917 г. и в последующем его учеником Г. Элиава) был обнаружен литический агент бактерий, чему Д'Эрелль дал название «бактериофаг» – пожиратель бактерий, который был незаслуженно забыт после появления и применения антибиотиков [16].

Имеются данные о клиническом применении фага при стафилококковых инфекциях Р. Брюнинго и Ж. Майзином [17].

Бактериофаги – вирусы микробов. Они обладают специфической активностью лизировать бактерии, не нанося вредного действия на макроорганизм и нормальной микрофлоре [18-21].

Институт им. Г. Элиава в Тбилиси (Грузия) считается основоположником и остается ведущей организацией в вопросах изучения и применения фагов [22].

**Цель исследования** – изоляция фагов против бактерий рода *Moraxella*.

### Материалы и методы

В качестве объекта для изоляции фагов использовали культуры, выделенные из организма крупного рогатого скота двух областей Республики Казахстан, которые были идентифицированы по морфологическим, тинкториальным, физико-химическим и иммунологическим свойствам относительно типовых штаммов бактерий *Moraxellabovis* «Г97-ВНИВИ» и *Moraxellabovoculi* «СХЧ-6» полученные из коллекции лаборатории бактериальных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань, Россия), в соответствии с «Определителем зоопатогенных микроорганизмов» [23].

Выявление фагов против моракселл проводилось в ЮЛПП «Институт бактерио-фагии, микробиологии, и вирусологии им. Г. Элиава» (г. Тбилиси, Грузия), в лаборатории общей микробиологии под руководством заведующего лабораторией, доктора биологических наук М. Годердзишвили.

Изучались культуры выделенные в республике Казахстан Б1, А3/20, К136, МТФ и Б2. В дальнейшем культурам были даны порядковые номера Б1 – №1; К136 – №2; А20 – №3; МТФ – №4; Б2 – №5.

Титрование фага проводили по методу агаровых слоев, предложенному Грация и в жидкой среде по Аппельману.

## Результаты и их обсуждение

При определении чувствительности исследуемых нами культур бактерий *Moraxella* к фагам, имеющимся в коллекции лаборатории: *E.coli*, *Pseud.*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Acinobacter*, были получены отрицательные результаты.

При изучении возможности получения фагов к культурам *Moraxella* был произведен забор сточных вод из реки Мткв́ари из трех различных мест по 1 литру с одной точки забора.

В лаборатории общей микробиологии в равном соотношении смешивали все пробы сточных вод. Всего сделано 5 проб по количеству изучаемых культур. В каждую колбу со сточной водой внесли концентрированный бульон brainheartinfusion, тщательно перемешали и добавили туда же по 1,0 см<sup>3</sup> взвеси суточной изучаемой культуры (каждую в отдельную колбу). Смесь выдерживали в термостате при 37°C в течение суток.

На следующий день сточные воды с бактериальной культурой центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 минут. Затем надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр с порами диаметром 0,22 мкм.

Из суточной 1 млрд взвеси готовили газон на ч. Петри куда наносили каплями фильтрат, в котором предполагали наличие фага.

Параллельно проводили титрацию предполагаемого фага по методу Грация. Метод титрования фага заключался в определении количества активных фаговых частиц в 1,0 см<sup>3</sup> фильтрата путем внесения образца в полужидкий агар, содержащий чувствительную к фагу культуру, с последующим наслаением смеси полужидкого агара с бактериальной взвесью на плотный агар в чашки Петри с последующим термостатированием и подсчетом количества негативных колоний.

Учет реакции проводили на следующий день: на газоне чашек Петри и по Грация в культурах №1 и №3 видно просветление и сплошной лизис (рисунок 1) на местах нанесения фага, а в чашках Петри с культурами №№ 2, 4, 5 и в контрольных, без фага – равномерный рост культур без просветлений.

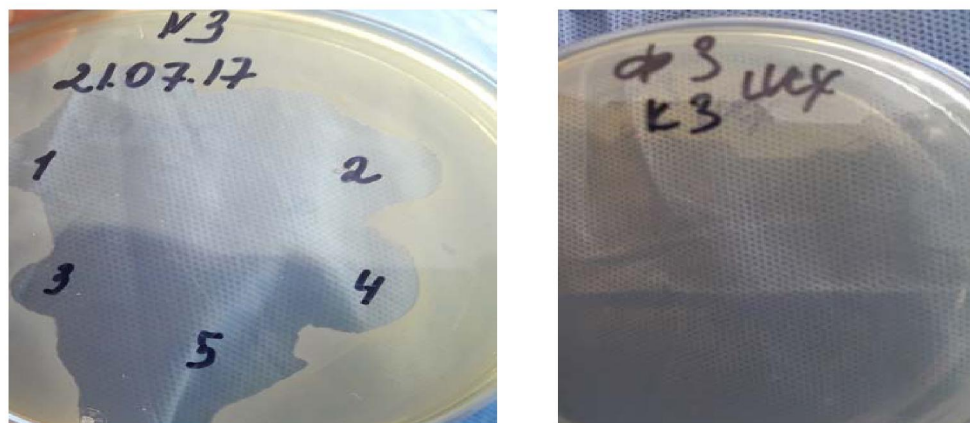


Рисунок 1 – Негативные колонии на газоне и по Грация

По методу Грация – видны мелкие негативные бляшки в культурах при разведениях фага от исходного до 10<sup>-3</sup> №1, №2, №3. В остальных – сплошной рост культур.

Затем на газон с суточной 1 млрд-ной культурой клеток наносили по 1 капле фагов, полученных из сточных вод.

При просмотре чашек Петри на следующий день видны просветления на местах нанесения фагов №№ 3,5 в культурах на чашках Петри №1, 2 – на местах нанесения всех 4-х фагов видны негативные колонии диаметром приблизительно 1,0 см с легким вторичным ростом культур (рисунок 2).

В культуре на чашке Петри №3 – на местах нанесения фагов №№ 2,5 видны негативные бляшки с четкими границами диаметром 0,8–1,0 см, фаг № 3 – видна зона лизиса с радиально расположенными негативными колониями (рисунок 3).



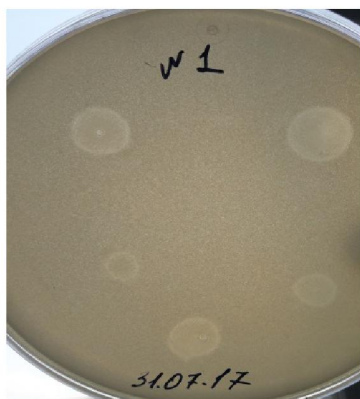


Рисунок 2 – Зоны лизиса в местах нанесения полученных фагов

Рисунок 3 – Негативные радиально расположенные колонии фагов

Культуры на чашках №4,5 – полное отсутствие просветления на всей поверхности чашки Петри.

Проявление активности фагов на чашках Петри имело следующие характеристики – на чашке Петри с культурой №2 – лизис бактериальных колоний внешне имел размытые неровные края разного размера от 0,5 до 2,0 см<sup>2</sup>; на чашке №3 – круглые колонии с четкими краями, мелкие, от 0,1 до 0,2 см<sup>2</sup>.

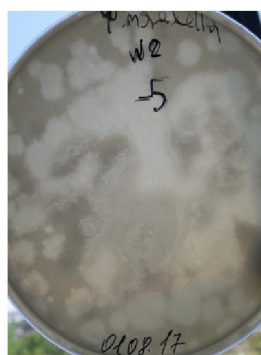


Рисунок 4 – Морфология колоний фагов на культурах №2 и №3

Параллельно проводилось изучение активности фага методом тест полосок на 5-ти культурах с 4-мя фагами.

В рядах культур №1 и №3 высеванных на агар в виде полосок, на которые наносили фаги, во всех случаях отмечены негативные бляшки.

Культуры моракселл (№№ 2,4,5), нанесенные на поверхность агара в чашках Петри виде полосок, в местах нанесения фага росли без негативных колоний, не отмечено лизирующего влияния фага.

Фаги, собранные с чашек Петри с мест негативных бляшек были собраны шпателем в стерильную пробирку и подвергнуты центрифугированию при 5000 оборотах в течение 30 минут. Надосадочную часть декантировали и фильтровали через фильтр диаметром 0,20 мкм.

Полученный фильтрат, содержащий фаговые частицы титровали по Грация до разведения 10<sup>6</sup>. Далее определяли оптимальное соотношение фага и бактериальной культуры для дальнейшего получения фага с наибольшей литической активностью. Последнюю определяли на жидких средах путем установления его максимального разведения, вызывающего полный лизис бульонной культуры бактерий по методу Аппельмана.

С этой целью в ряд стерильных пробирок с одинаковым диаметром наливали по 4,5 см<sup>3</sup> бульона Хоттингера. В первую пробирку внесли 0,5 см<sup>3</sup> фильтрата с испытуемым фагом, который в дальнейшем последовательно разводили, перенося из пробирки в пробирку по 0,5 см<sup>3</sup> (каждый раз

отдельной стерильной градуированной пипеткой). Готовили 3 разведения фага. Из последней (3-й) пробирки лишние 0,5 см<sup>3</sup> выливали. Затем во все пробирки вносили 1–2 капли суточной миллиардной культуры с агара. В качестве контроля служила дополнительная пробирка, в которой находилась жидкая питательная среда и культура (без фага). Все пробирки помещали в термостат при t° 37° на 16–18 часов. Литическую активность фага, выраженную в титре, устанавливали по последней пробирке, в которой отсутствовала бактериальная помутнение или образование осадка. При учете результатов опыта пробирки встряхивали. В результате в исследуемых культурах полный лизис наблюдался в титре 10<sup>-4</sup>.

При определении спектра литического действия выделенного нами фага на референтные штаммы *E.coli*, *Pseud.*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Acinobacter* был получен отрицательный результат, кроме *E.coli*, что свидетельствует о специфичности литического действия испытуемого фага.

Для исключения наличия *E.coli* в исследуемых нами культурах был проведен дополнительный API 20 EV4.1 тест. Результат был отрицательным;

С целью изучения морфологии полученных фагов изолированных нами сделаны электронные снимки выделенных фагов из различных культур вида *Moraxella*. На снимках видны фаги разной морфологии – головки шестигранные, как с длинным, так и с коротким цилиндрическим хвостом. Хвостовые придатки собранные, не распущенные.

По современной классификации бактериофагов [24] выделенные фаги относятся к *siphoviridae* (а) и *myoviridae* (б,в,г) (рисунок 5).

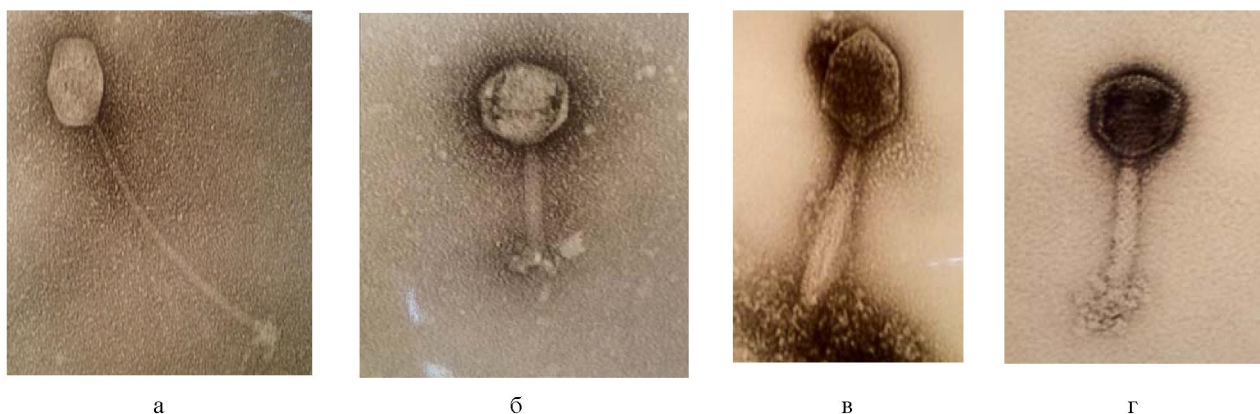


Рисунок 5 – Фото выделенных нами фагов

**Заключение.** Проведенные нами исследования позволяют сделать следующее заключение:

1. Были выделены активные бактериофаги к двум культурам *Moraxella* с титром по Грации 3x10<sup>7</sup> в культуре №2, 6x10<sup>8</sup> в культуре №3;
2. Титр фага по Аппельману в культурах бактерий №2 и №3 был равен 10<sup>-4</sup>;
3. На твердой питательной среде выделенные фаги имели разную морфологию. Так, в культуре №2 негативные колонии имели размытые, не ровные края, прозрачные, а в культуре №3 негативные колонии были с четко выраженными краями, прозрачные;
4. Электронномикроскопическими исследованиями полученных фагов было установлено, что они относятся к группам *siphoviridae* (а) и *myoviridae* (б,в,г);

#### REFERENCES

- [1] Sargison N.D., Hutner J.E., West D.M., Gwozdz M.J. Observations on the efficacy of mass treatment by subconjunctival penicillin injection for the control of an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. *N Z Vet J.* 1996; 44: 142-144.
- [2] Roeder B.L., Clark F.D., Skogerboe T.L., Kelly E.J. Effect of early treatment with parenteral long-acting oxytetracycline on performance of beef calves with acute eye lesions. *Agri-Practice* 1995; 16: 6-11.
- [3] Allen L.J., George L.W., Willits N.H. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. *J AmVetMedAssoc* 1995; 206: 1200-1203.
- [4] Ivanov N.P., Sattarova R.S., Bakieva F.A., Egorova .N. (2016) Determination of sensitivity to antibiotics of pathogenic microorganisms isolated from the affected eye when infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) [Opredelenie chuvstvitelnosti k antibiotikam patogennoj mikroflory, vydelennoj iz porazhennyh glaz KRS] LXII: 155-158. (In Russian)

- [5] Birjukova N.P., Rusakov S.V. Safety monitoring of veterinary medicines as the basis of veterinary medicines as the basis of their rational use [Monitoring bezopasnosti veterinarnykh lekarstvennykh preparatov kak osnova ih racional'nogo primeneniya] 1: 9-12. (In Russian)
- [6] Chambers H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001;7:178–82. [PMC free article] [PubMed]
- [7] Burnet M. Natural history of infectious disease. Cambridge, England: Cambridge University Press; 1962.
- [8] Finland M., Kirby W.M., Chabbert Y.A., et al. Round table: are new antibiotics needed? *Antimicrob Agents Chemother.* 1965; 5: 1107-14. [PubMed]
- [9] Petersdorf R.G. The doctors' dilemma. *N Engl J Med.* 1978; 299: 628-34. [PubMed]
- [10] Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 155-64. [PubMed]
- [11] Bartlett J.G., Gilbert D.N., Spellberg B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 1445-50. [PubMed] Rice L.B. The Maxwell Finland Lecture: for the duration-rational antibiotic administration in an era of antimicrobial resistance and *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 491-6. [PubMed]
- [12] Spellberg B. The antibacterial pipeline: why is it drying up, and what must be done about it? In: Choffnes E.R., Relman D.A., Mack A., editors. Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: workshop summary. For the Institute of Medicine, Forum on Antimicrobial Threats. Washington, DC: National Academies Press; 2010. P. 299-332.
- [13] New York Times; 1945. Penicillin's finder assays its future; p. 21. 26 June.
- [14] Miroshnikov K. (2013) Bacteriophages [Pozhirateli bakterij] №10 <http://elementy.ru/lib/432141>
- [15] Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10(5): 461-472. doi: 10.1016/j.mib.2007.08.002. [PubMed] [Cross Ref]
- [16] Chanishvili N. (2017) Felix D'Herelle and his discover, Tbilisi, Georgia. P. 17.
- [17] Bruynoghe R., Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage du Staphylocoque. *Compt Rend Soc Biol.* 1921; 85: 1120-1.
- [18] Clark J.R., March J.B. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol.* 2006, 24(5): 212-218. 10.1016/j.tibtech.2006.03.003
- [19] Kutter E. (2001) Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. – Sankt-Peterburg. P. 5-6. (In Russian)
- [20] Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Jr. *Bacteriophage therapy.* *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 649-659. 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
- [21] Sulakvelidze A., Kutter E. Bacteriophage therapy in humans. In *Bacteriophages: Biology and Applications* / Edited by: Kutter E., Sulakvelidze A. CRC Press; 2005: 381-436.
- [22] Kutateladze M. (2017) Bacteriophage institute, its history and current developments, Tbilisi, Georgia. P. 16.
- [23] Sidorov M.A., Skorodumov D.I., Fedotov V.B. (1995). The determinant of zoopathogenic microorganisms. Moskva. 168-177. (In Russian)
- [24] Kumaragurubaran Karthik, Narayanan Selvaraj Muneeswaran, Haranahalli Vasanthachar Manjunathachar, Marappan Gopi, Appavoo Elamurugan, Semmannan Kalaiyarasu. Bacteriophages: Effective Alternative to Antibiotics. *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 2 (3S): 1-7 Special Issue-3 (Approaches in Diagnosis and Management of Diseases of Livestock and Poultry) <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7>

**Н. П. Иванов, Р. С. Саттарова, Ф. А. Бакиева,  
М. Г. Годердзишвили, С. Г. Ригвава, Н. И. Курамидзе**

«Қазақ ғылыми-зертеу ветеринария институты» ЖШС, Алматы, Қазақстан,  
Г. Элива атындағы бактериофагия, микробиология және вирусология институты, Тбилиси, Грузия

### **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНДА ІРІ ҚАРА МАЛДА КЕЗДЕСЕТІН МОРАКСЕЛЛЕЗ ҚОЗДЫРҒЫШЫНА ҚАРСЫ ФАГ АЛУ**

**Аннотация.** Ветеринариялық есептерге сәйкес, Қазақстан республикасына 2012–2017 жылдар аралығында 29 356 басасыл тұқымды Абердин-Ангус ет бағытындағы мүйізді ірі қара әкелінген. Импортталған малдың 37,6 пайызын құрайтын 11 038 бас мал індетті кератоконъюнктивитпен ауыратындығы анықталды. Республика аумағындағы облыстарда көздері індетті кератоконъюнктивитпен зақымдалған малдың пайыздық көрсеткіші 39,87-ден 40,0 аралығында. Алғашқы ғылыми жұмыстар «Қазақ ғылыми зерттеу ветеринариялық институтында» Алматы, Ақмола облыстарынан алып келінген биоматериалдарды зерттеуден басталды. Нәтижесінде бактерия өсімділері *Moraxella* туысына жататындығы анықталды. Бактериофагия – *Moraxella* қоздырғышымен күресудің бірден-бір тиімді жолы.

**Түйін сөздер:** өсімді, штамм, бактерия, моракселла, індетті кератоконъюнктивит, антибиотиктерге сезімталдық, фагтар.