

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВМЕСТНОГО ЛЕЧЕБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛАКТОГЛОБУЛИНА И БАКТЕРИОФАГА САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО

Н.В. Алексанина, О.В. Моисеева

ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Широкое распространение лекарственноустойчивых форм возбудителей, затрудняющее профилактику и лечение острых кишечных инфекций, определяет целесообразность использования бактериофагов и иммунных лактоглобулинов для антибактериальной терапии этих заболеваний. Целью данного исследования явилось изучение антибактериальной эффективности совместного применения иммунного лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага при лечении экспериментального сальмонеллеза у мышей. Экспериментальную сальмонеллезную инфекцию воспроизводили путем однократного интрагастрального введения $2LD_{50}$ суточной агаровой культуры *S. typhimurium*. В результате отмечено развитие сальмонеллезной инфекции длительностью до 14 суток. Животные были разделены на четыре группы по характеру лечения. Для лечения животных применяли препараты: «Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл» коровий сухой, «Лактоглобулин» жидкий, бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE жидкий. Препараты вводили мышам перорально с помощью зонда через сутки после заражения в течение 7 дней. При изучении совместного лечебного действия лактоглобулина и бактериофага особое значение придавали срокам элиминации возбудителя из органов животных. Анализ полученных данных показал, что во всех четырех группах выявлена положительная динамика выведения из организма мышей возбудителя. В группах животных, получавших оба препарата, элиминация сальмонеллы из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в контрольных группах мышей. Одновременно в опытных группах уже на третьи сутки лечения препаратами выявлено статистически достоверное снижение количества *S. typhimurium* в содержимом толстого кишечника животных. В процессе исследования установлено, что применение для лечения животных иммунных лактоглобулинов в сочетании с сальмонеллезным бактериофагом в течение 7 дней уменьшало тяжесть и длительность течения заболевания и блокировало дальнейшее развитие инфекционного процесса, способствовало эффективному и быстрому очищению организма животных от возбудителя инфекции, повышало степень выживаемости мышей. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного применения препаратов иммунных лактоглобулинов и бактериофагов для лечения острых кишечных инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами сальмонелл.

Ключевые слова: сальмонеллезная инфекция, лактоглобулин, бактериофаг, животные, эксперимент.

Адрес для переписки:

Алексанина Наталья Владимировна
344010, Россия, г. Ростов-на-Дону, Газетный пер., 119,
Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии.
Тел.: 8 (863) 234-70-55 (служебн.); 8 961 288-02-59 (моб.).
E-mail: nataly10_09@mail.ru

Contacts:

Natalya V. Aleksanina
344010, Russian Federation, Rostov-on-Don, Gazetny per., 119,
Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology.
Phone: +7 (863) 234-70-55 (office); +7 961 288-02-59 (mobile).
E-mail: nataly10_09@mail.ru

Библиографическое описание:

Алексанина Н.В., Моисеева О.В. Экспериментальное изучение эффективности совместного лечебного действия лактоглобулина и бактериофага сальмонеллезного // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 297–302. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-297-302

Citation:

Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V. Experimental study of the effectiveness of the joint therapeutic action of lactoglobulin and salmonella bacteriophage // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 297–302. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-297-302

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE JOINT THERAPEUTIC ACTION OF LACTOGLOBULIN AND SALLMONELLA BACTERIOPHAGE

Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V.

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The wide spread of drug-resistant forms of the pathogens, complicating prevention and treatment of acute intestinal infections, determines the feasibility of using bacteriophages and immune lactoglobulins for antibacterial therapy of these diseases. The aim of this study was to investigate the antibacterial efficacy of the joint use of immune lactoglobulin and Salmonella bacteriophage in the treatment of experimental salmonellosis in mice. The experimental Salmonella infection was reproduced by means of a single intragastric administration of 2LD₅₀ of daily agar culture of *S.typhimurium*. As a result, the development of Salmonella infection lasting up to 14 days was noted. The animals were divided into four groups according to the pattern of the treatment. The following preparations were used for the treatment of animals: «Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella» dry cow, «Lactoglobulin» liquid, bacteriophage of Salmonella ABCDE groups, liquid. The preparations were daily administered to mice orally after the infection for 7 days. In the study of the joint therapeutic effect of the lactoglobulin and bacteriophage the special attention was paid to the terms of elimination of the pathogen from animal organs. Analysis of the data showed that in all four groups a positive dynamics of excretion of the pathogen of mice was revealed. In groups of animals that were treated with both drugs, the elimination of Salmonella out of organs occurred 1.5 times faster than in the control groups of mice. At the same time in the experimental groups on the third day of treatment with preparations the statistically significant decrease in the number of *S.typhimurium* in the contents of the large intestine of animal was revealed. The study found that immune lactoglobulin used simultaneously with Salmonella phage for 7 days reduced the severity and duration of the disease course and blocked the further development of the infectious process, promoted the efficient and rapid cleansing of animals organism of the pathogen, increased the survival of mice. The obtained data suggest the applicability of joint use of immune lactoglobulin preparations and bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections caused by antibiotic-resistant strains of Salmonella.

Key words: *Salmonella infection, lactoglobulin, bacteriophage, animals, experiment.*

Введение

Острые кишечные инфекции (ОКИ) на протяжении ряда лет занимают лидирующее место в структуре инфекционной патологии детского возраста и представляют одну из актуальных проблем здравоохранения и педиатрии. По данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется более миллиарда диарейных заболеваний, при этом более половины случаев приходится на ранний детский возраст [4, 5].

Ведущее место в патологии детей первых лет жизни занимают ОКИ, вызванные антибиотикорезистентными штаммами сальмонелл. Сальмонеллы относятся к разряду внутригоспитальных и протекают в виде ограниченных вспышек или разрозненных спорадических заболеваний. Наиболее часто возбудителями сальмонеллезов у детей являются *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. Летальность при этих инфекциях достигает 30–60%. Лечение данного заболевания затруднено высокой частотой (60–90%) антибиотикорезистентности, проявлением токсических и многочисленных аллергических реакций, а также осложнениями в виде явлений дисбактериоза [2].

Широкое распространение лекарственно-устойчивых форм возбудителей в последние годы обусловило использование бактериофагов для антибактериальной терапии, альтернативно приему антибиотиков. Бактериофаги — биологические препараты антибактериального

действия для лечения и профилактики ОКИ и бактерионосительства, применение которых не нарушает нормального биоценоза человека. Бактериофаги незаменимы при устойчивости возбудителей к антибиотикам и химиопрепаратам, не вызывают побочных токсических и аллергических реакций, вызывают лизис бактерий, сочетаются с другими лекарственными средствами [3, 7].

Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл разработан в Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии. Представляет собой стерильную лиофилизированную фракцию иммуноглобулинов молозивной сыворотки коров (IgG, IgA, IgM до 96% состава препарата), предварительно вакцинированных против комплекса возбудителей — микроорганизмов, вызывающих кишечные инфекции и дисбактериозы. Сочетает в себе свойства этиотропного и патогенетического средства. Нормализует микрофлору кишечника, обладает определенной степенью бифидогенности. Предназначен для лечения детей с дисбактериозами и острыми кишечными инфекциями, вызванными сальмонеллами, клебсиеллами, протеем, псевдомонадами и их ассоциациями. Препарат обладает антибактериальным, антитоксическим, антиадгезивным, иммуномодулирующим действием, совместим с антибиотиками и бактериофагами, препаратами нормофлоры [1, 6].

Целью данного исследования явилось изучение антибактериальной эффективности сов-

местного применения иммунного лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага при лечении экспериментальной сальмонеллезной инфекции у мышей.

Материалы и методы

Для проведения исследования нами была разработана модель сальмонеллезной инфекции и использован для заражения вирулентный штамм *S. typhimurium*. В качестве подопытных животных были взяты мыши белые беспородные весом 16–18 г. Моделирование сальмонеллезной инфекции проводили на группе животных, которым после суточного голодания интрагастралью однократно с помощью зонда в объеме 0,5 мл вводили 2LD₅₀ *S. typhimurium*. В результате отмечено развитие сальмонеллезной инфекции длительностью до 14 суток. Возбудитель высевался из печени, селезенки, тонкого и толстого кишечника. Для лечения животных применяли препараты «Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл» коровий сухой, «Лактоглобулин» жидкий, полученный методом мембранных технологий, бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE жидкий.

Препараты (лактоглобулины и бактериофаг) вводили мышам перорально с помощью зонда в количестве 0,5 мл через сутки после заражения ежедневно в течение 7 дней. Животных умерщвляли под эфирным наркозом, вскрывали после начала лечения препаратами на 1, 3, 5, 7, 10, 12 сутки, изучали динамику обсемененности органов (печени, селезенки, содержимого тонкого и толстого кишечника). Стерильно вырезанные кусочки органов методом отпечатков высевали на плотные питательные среды (BCA, среду Эндо). Содержимое толстого кишечника разводили 0,9% стерильным раствором NaCl от 10⁻¹ до 10⁻⁸ и делали высевы на BCA и среду Эндо. Идентификацию возбудителя проводили с использованием биохимических тест-систем и соответствующих сывороток.

Учитывали число павших животных в течение всего эксперимента. При изучении совместного лечебного действия лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага особое значение придавали срокам элиминации возбудителя инфекции из органов животных.

Исследование проводили на 4-х группах животных (табл. 1).

Экспериментальные исследования на животных проводили с учетом норм и правил биомедицинской этики с разрешения этического комитета Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии (Протокол № 1 от 15.01.2014 г.).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения динамики выделения *S. typhimurium* из органов мышей в процессе лечения препаратами лактоглобулинов и бактериофагом представлены в таблице 2.

Анализ полученных данных показал, что во всех четырех группах животных мы наблюдали положительную динамику выведения из организма возбудителя. В группах мышей (3 и 4), леченных лактоглобулином совместно с бактериофагом, элиминация возбудителя из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в группах животных, получавших монопрепараты (1 и 2). При этом в этих группах происходит более быстрое очищение селезенки на 5-е сутки, печени на 7-е сутки, в то время как в первой и второй группах выделение *S. typhimurium* из этих органов продолжалось на 7-е сутки у 20% животных. Совместное лечение лактоглобулином и бактериофагом способствовало очищению от *S. typhimurium* тонкого кишечника на 7-е сутки в третьей группе и на 10-е сутки в четвертой группе, в двух других группах выделение *S. typhimurium* продолжалось на 10-е сутки у 20% животных. Очищение толстого кишечника происходило более медленно, возбудитель выделен на 12-е сутки от начала лечения в первой

Таблица 1. Препараты, использованные для лечения животных в основной и контрольной группах

Table 1. Preparations used for the treatment of animals in the main and control groups

Группа животных Groups of animals	Препараты для лечения Preparations for treatment
1 группа (контрольная) 1 st group (control)	Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл коровий сухой Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella, dry cow
2 группа (контрольная) 2 nd group (control)	Сальмонеллезный бактериофаг групп ABCDE жидкий Salmonella bacteriophage of ABCDE groups, liquid
3 группа (опытная) 3 rd group (experimental)	Лактоглобулин против условно-патогенных бактерий и сальмонелл и сальмонеллезный бактериофаг Lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella and Salmonella bacteriophage
4 группа (опытная) 4 th group (experimental)	Лактоглобулин жидкий и сальмонеллезный бактериофаг Lactoglobulin liquid and Salmonella bacteriophage

и второй группах; в третьей и четвертой группах на 10–12 день от начала лечения *S. typhimurium* не выделялась.

Результаты количественного анализа высеваемости *S. typhimurium* из толстого кишечника мышей в процессе лечения лактоглобулином и бактериофагом в сравнении с контрольными группами представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, в опытных группах (3 и 4) уже на третьи сутки от начала лечения

происходит статистически достоверное снижение количества выделяемой *S. typhimurium* ($P < 0,05$). Выделение возбудителя в третьей группе продолжалось до 7-х суток и в четвертой группе до 10-х суток только у одного животного в количествах 1,3 lg и 1,2 lg КОЕ/г соответственно.

Прекращение выделения *S. typhimurium* у опытных животных происходит на 10-е и 12-е сутки, в то время как в двух контрольных группах возбудитель выделен на 12-е сутки от нача-

Таблица 2. Динамика выделения *S. typhimurium* из органов животных при экспериментальном сальмонеллезе в процессе лечения препаратами

Table 2. Dynamics of isolation of *S. typhimurium* from the animals, organs during the experimental salmonellosis in the process of treatment with preparations

Группа животных Group of animals	Органы животных Organs of animals	Дни от начала лечения Days from the beginning of treatment					
		1	3	5	7	10	12
		Количество животных, выделяющих <i>S. typhimurium</i> The amount of animals producing <i>S. typhimurium</i>					
		абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
1	Печень Liver	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)
2	Печень Liver	5/5 (100)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)
3	Печень Liver	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
4	Печень Liver	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Селезенка Spleen	5/5 (100)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Тонкий кишечник Small intestine	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)	0/5 (0)
	Толстый кишечник Colon	5/5 (100)	5/5 (100)	3/3 (60)	2/5 (40)	1/5 (20)	0/5 (0)

Примечание: числитель — число животных, выделяющих возбудитель; знаменатель — число обследованных животных.
Note: numerator — the number of animals producing the pathogen; denominator — the number of the examined animals.

Таблица 3. Влияние лактоглобулина и бактериофага на количественное содержание *S. typhimurium* в толстом кишечнике мышей при экспериментальном сальмонеллезеTable 3. The influence of lactoglobulin and bacteriophage on the quantitative content of *S. typhimurium* in the colon of mice during the experimental salmonellosis

Группа животных Group of animals	Дни от начала лечения Days from the beginning of treatment					
	1	3	5	7	10	12
	Количество <i>S. typhimurium</i> в Ig КОЕ/г (M±m) The amount of <i>S. typhimurium</i> in Ig CFU/g (M±m)					
1	6,7±0,4	5,7±0,2	3,8±0,2	2,8±0,4	1,4±0,1	1,2
2	6,8±0,2	5,6±0,2	3,7±0,3	2,7±0,1	1,6±0,1	1,5
3	6,6±0,3	4,5±0,2	2,6±0,1	1,3	0	0
4	6,8±0,4	4,7±0,2	2,8±0,5	1,4±0,1	1,2	0
	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	

ла лечения. Количество выделяемой из толстого кишечника мышей *S. typhimurium* в сравниваемые дни значительно ниже в опытных группах, чем в контрольных, начиная с третьего дня от начала лечения. Необходимо отметить, что эффект от совместного применения жидкого лактоглобулина, полученного методом мембранных технологий, и бактериофага был менее выраженным, что вероятно связано с низким содержанием специфических антител к сальмонелле в этом препарате.

Заключение

В результате эксперимента установлено, что лечение иммунным лактоглобулином в сочетании с сальмонеллезным бактериофагом в течение 7 дней уменьшало тяжесть и дли-

тельность течения заболевания и блокировало дальнейшее развитие инфекционного процесса, способствовало эффективному и быстрому очищению организма животных от возбудителя инфекции. В группах животных, получавших оба препарата, элиминация сальмонеллы из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в контрольных группах мышей. Одновременно в опытных группах уже на третьи сутки лечения препаратами выявлено статистически достоверное снижение количества *S. typhimurium* в содержимом толстого кишечника животных.

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного применения препаратов бактериофагов и иммунных лактоглобулинов для лечения ОКИ, вызванных антибиотикорезистентными штаммами сальмонелл.

Список литературы/References

- Алексанина Н.В., Соболева С.В. Микробиоценоз толстого кишечника детей с диарейными заболеваниями в процессе лечения лактоглобулином против условно-патогенных бактерий и сальмонелл // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Ростов-на-Дону, 2009. С. 302–305. [Aleksanina N.V., Soboleva S.V. Microbiocenosis of children's colon with diarrheal diseases in the process of treatment with lactoglobulin against opportunistic bacteria and Salmonella. *Actual issues of infectious pathology. Rostov-on-Don, 2009, pp. 302–305.*]
- Воротынцева Н.В., Мазанкова Л.Н. Острые кишечные инфекции у детей. М.: Медицина, 2001. 480 с. [Vorotyntseva N.V., Mazankova L.N. *Ostrye kischechnye infektsii u detei* [Acute intestinal infections in children]. Moscow: Medicine, 2001, 480 p.]
- Дроздова О.М., Брусина Е.Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 5. С. 20–24. [Drozdova O.M., Brusina E.B. Use of bacteriophages in epidemiological practice: a view after a century. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases, 2010, no. 5, pp. 20–24. (In Russ.)*]
- О профилактике острых кишечных инфекций: Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 19 марта 2010 г. № 21. [On the prevention of acute intestinal infections: Resolution Chief State Sanitary Officer Russian Federation of 19 March 2010 no. 21]. URL: docs.cntd.ru/document/902206076 (15.06.2017)
- Онищенко Г.Г. Заболеваемость острыми кишечными инфекциями в Российской Федерации // Иммунология. 2008. № 1. С. 18–23. [Onishchenko G.G. The incidence of acute intestinal infections in Russian Federation. *Immunologiya = Immunology, 2008, no. 1, pp. 18–23. (In Russ.)*]
- Соболева С.В. Лактоглобулины — препараты нового поколения для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и дисбактериозов // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Ростов-на-Дону, 2009. С. 251–255. [Soboleva S.V. Lactoglobulins — a new generations of drugs for treatment and prevention of acute intestinal infections and dis-bacteriosis. *Actual issues of infectious pathology. Rostov-on-Don, 2009, pp. 251–255.*]

7. Урсова Н.И., Минухина А.М. Бактериофаги. Клинико-иммунологическая эффективность иммунологических препаратов // Под ред. М.П. Костинова, Н.В. Медуница. М., 2008. 256 с. [Ursova N.I., Minuhina A.M. Bakteriofagi. Kliniko-immunologicheskaya effektivnost' immunologicheskikh preparatov. Pod red. M.P. Kostinova, N.V. Medunitsina [Bacteriophages. Clinical and Immunological Efficacy of immunological preparations. Eds.: M.P. Kostinov, N.V. Medunitsin]. Moscow, 2008, 256 p.]

Авторы:

Алексанина Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории санитарной микробиологии водных объектов и микробной экологии человека, Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Моисеева О.В., младший научный сотрудник лаборатории санитарной микробиологии водных объектов и микробной экологии человека, Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:

Aleksanina N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Sanitary Microbiology of Water Bodies and Human Microbial Ecology, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Moiseyeva O.V., Junior Researcher, Laboratory of Sanitary Microbiology of Water Bodies and Human Microbial Ecology, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2017
Отправлена на доработку 15.05.2017
Принята к печати 23.06.2017

Received 30.03.2017
Revision received 15.05.2017
Accepted 23.06.2017