

Бактериофагите, свързаните с тях ендолизини и техните литични свойства в терапията и профилактиката на мастит и метрит при крави

Научен обзор

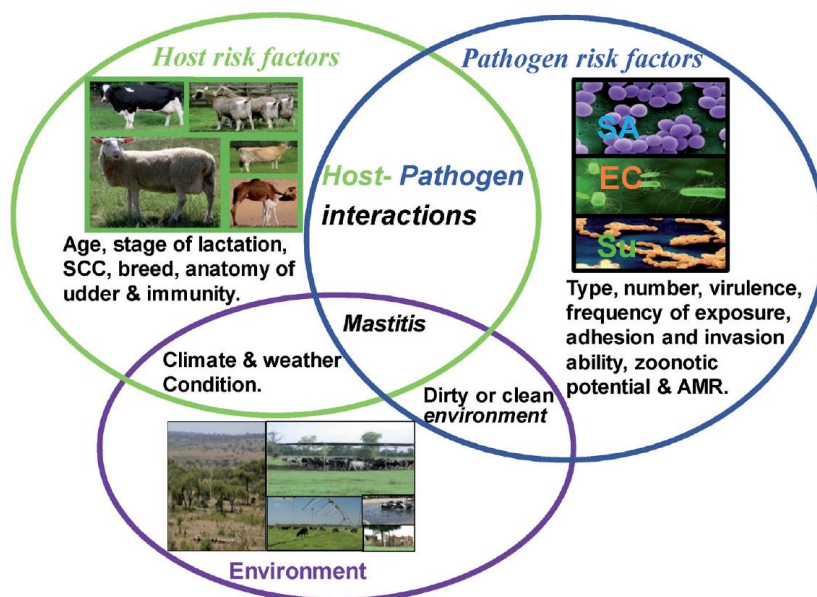
Маститът, възпаление на млечната жлеза, е едно от най-важните заболявания в млекопроизводството поради голямата честота и значителния му икономически ефект. До 50% от всички говеда, млечно направление, имат някаква форма на мастит (*Wilson et al.*, 1997). Загубите, причинени от мастит, включват ветеринарни разходи, изисквания за повишена лабораторна подготвеност и изисквания за персонала, изхвърлено мляко и млечни продукти, намален добив и качество на млякото и съкращаване на продуктивния живот (*Hogeveen et al.*, 2011). Икономическата загуба, причинена от мастит, е изчислена на около 35 милиарда щатски долара годишно (*Hertl et al.* 2010). В Китай общата годишна загуба се оценява на повече от 8 милиона долара, което не включва икономическата загуба, понесена от млекопреработвателните предприятия поради спад в качеството на млякото (*Zhang* 2017).

Маститът може да бъде причинен от широк спектър от патогенни организми, включително Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, микоплазми, дрожди и гъби. Най-честите причини за мастит при говедата са *Staphylococcus* (*Staph.*) *aureus*, коагулаза-отрицателни *Staphylococcus*, *Streptococcus* (*Strep.*) *agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *Escherichia coli* (*E. coli*) и други колиформни бактерии (*Malinowski et al.*, 2006; *Tenhagen et al.*, 2006; *Sztachañska et al.*, 2016). *Escherichia coli*, като един от най-честите причинители на мастита при кравите, има различни характеристики на конкретния бактериален щам, които позволяват вътреклетъчна инвазия на млечните епителни клетки (*Dopfer et al.*, 1999; *Dogan et al.*, 2012).

Острият пуерперален (следродилен) метрит, като второто най-често докладвано заболяване при крави, е остро системно заболяване, което се появява в рамките на 21 дни след раждането и има вредни ефекти върху репродуктивните и икономически показатели при млечно направление стада крави (*Sheldon et al.*, 2009; *Piccardi et al.*, 2016). Рискът от заболяемост от метрит варира от 20% до 40% (*Markusfeld*, 1987; *Drillich et al.*, 2001; *LeBlanc et al.*, 2011). *E. coli* и *Trueperella pyogenes* са най-разпространените бактерии, изолирани от лумена на матката при говеда с маточни заболявания, заедно с редица анаеробни бактерии, като *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum* и *F. Nucleatum* (*Williams et al.*, 2007; *Sheldon et al.*, 2010).

Сред основните фактори, допринасящи за наличието на мастит при крави са типът животновъден обект, размерът на стадото, видът постеля за животните, доенето на маститните крави, породата крави, възрастта на животните, съотношението, етапът

на лактация, млечността, хигиената на вимената и краката, положението на вимето и морфологията на млечните жлези, имунитетът на животните, антимикробната резистентност и други.



Фиг. 1: Схематично представени рисковите фактори, предизвикващи мастит при крави

Подобрените стратегии за контрол на метрит и мастит при крави са намалили честотата на докладване на тези заболявания. Настоящите програми за контрол на мастит се основават на дезинфекция, антибиотична терапия и умъртвяване на хронично заразени крави. **Няма единна ефективна ваксина срещу който и да е патоген, предизвикващ мастит.** Разработването на подобрени и ефективни ваксини, които преодоляват ограниченията, свързани с превенцията, терапията и лечението на мастита, използвайки бързо напредващите молекулярни, геномни и имунологични инструменти, е устойчив подход за овладяване на това заболяване.

Използването на антибиотици при продуктивни животни допринася за повишена антимикробна резистентност в млечното направление говеда и околната среда. **Антимикробната резистентност сред патогените, попадащи в млякото, особено тези бактериални щамове, които причиняват мастит при кравите е висока и е необходимо антибиотичните средства да бъдат използвани разумно и контролирано или да се премине към алтернативни терапии каквато е бактериофаговата терапия.** Стратегиите за намаляване употребата на антимикробни средства в животинския и растителния сектор, както и в околната среда са добро начало и добър подход за борба с нарастващия в световен мащаб проблем антимикробна резистентност. Стратегии, включващи разумно използване на антибиотици за лечение на заболявания като мастит и метрит, включват идентифициране на патогена, причиняващ инфекцията, определяне на чувствителността / модела на резистентност на патогена, секвентен анализ за определяне наличието на гени за резистентност, за да се оцени най-подходящият

антибиотик, който да се използва за лечение, и достатъчна продължителност на лечението, за да се осигурят ефективни концентрации на антибиотика за елиминиране на патогена.

Предаването на антимикробно устойчив патоген, предизвикващ мастит и/или хранителен патоген на хора може да се случи чрез пряк контакт с животно или непряко през хранителната верига, ако се консумира замърсено непастьоризирано мляко или млечни продукти, от замърсено сурово мляко, което е друга много важна причина, поради която хората не трябва да консумират сурово неизследвано предварително мляко. По същия начин устойчивите бактерии, замърсяващи месото, могат лесно да се предадат на хората чрез консумация на термично необработено месо.

Алтернативите на антибиотичното лечение, за поддържане на здравето и благосъстоянието на животните и продуктивността им, като превантивни мерки, включващи ваксинация, подобро хранене, спазване на условията по биосигурност и биобезопасност във фермите, добри хигиенни практики в предприятията и подбор на генетични характеристики на животните, осигуряващи устойчивост на заболявания, заедно с напредналите диагностични методи и молекулярното характеризирание на патогените, несъмнено играят неразделна роля в стратегиите, насочени към подобряване на млечната производителност с подобрена безопасност на млечните продукти за консумация от човека.

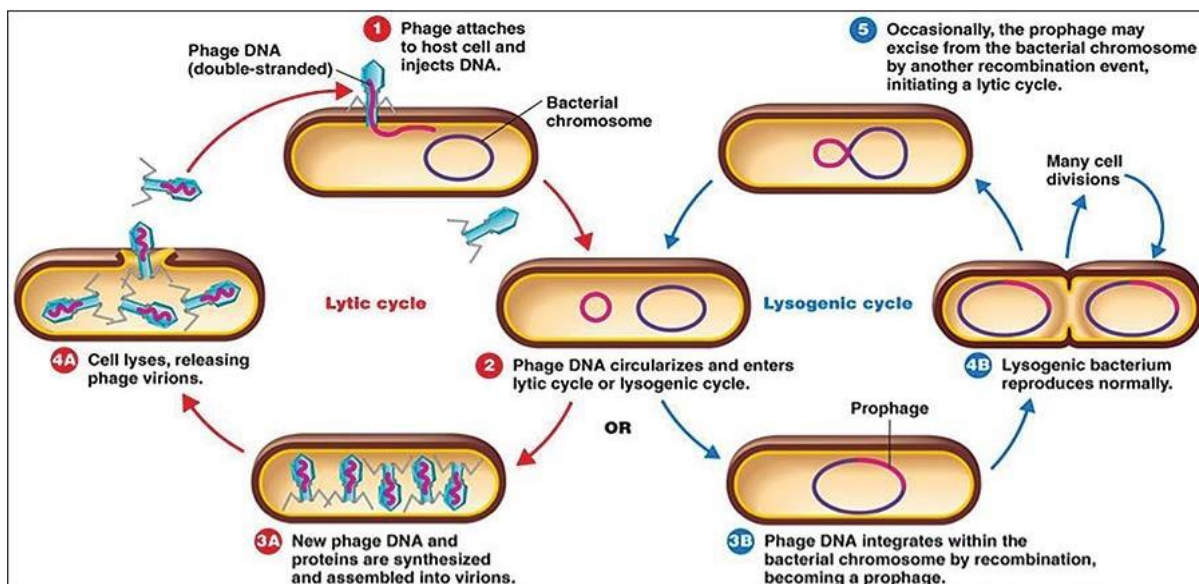
Все пак въпреки многобройните стратегии в борбата за намаляване на мастита и метрита при крави, ***S. aureus* остава водещ причинител на мастит в млекодайнните стада в световен мащаб** (Misra et al.2018). Според направена научна оценка в САЩ от Haran et al.2012, 10% от всички млекодайни крави са заразени със *S. aureus* и 84% от стадата са положителни за наличие на тези патогенни бактерии. Проучванията на Basanisi et al.2017 и Liu et al.2017 сочат, че около 10-40% от случаите на мастит в Китай са причинени от *S. aureus*. **Инфекцията със *S. aureus* е една от най-трудните за лечение** (Notebaert, Meyer 2006).

Широкоспектърните антибиотици са използвани систематично или като интрамамарно лечение за колиформен мастит. Терапевтичните проучвания показват **съмнителна клинична ефикасност на антибиотиците срещу инфекции с *E. coli*** по време на периода на лактация (Suojala et al., 2013). Антибиотиците, прилагани срещу интрамамални инфекции по време на сухостойния период, могат да помогнат за елиминиране на колиформните инфекции, наблюдавани в края на периода на лактация и предотвратяване на нови инфекции преди отелване. Терапията с дългодействащи антибиотици на животните през сухостойния период се счита за стандартна практика в почти всички краища на света, но все още **колиформния мастит представлява значителен проблем**, което поставя под съмнение ефективността на антибиотичната терапия (Bradley and Green, 2001). Рутинната профилактична употреба на интрамамарни антибиотици при крави понастоящем е под строг контрол поради **опасения от трансфер на гени за резистентност от животински патогени към човешки патогени** (Mollenkopf et al., 2010). На биофермите не е разрешено използването на антибиотици в сухостойния период на кравите и все повече се наблюдава **липсата на ефикасни алтернативни превантивни мерки** за това заболяване (колиформен мастит) (Mullen et al., 2013, 2014).

Целите на настоящия научен обзор са да се направи научен преглед на проучванията с бактериофаги срещу мастит, причинен от патогенни бактериални видове, да се оцени активността на фагите, да се определи дали суспензията от бактериофаги може да намали адхезията и инвазията на патогените, причиняващи хроничен колиформен мастит на млечните епителни клетки, както и да се провери ефективността на тази терапия като алтернатива на антибиотичното лечение и справянето с наболелия в световен мащаб проблем антимикробна резистентност (AMP).

Бактериофагите и свързаните с тях ендолизини са предложени като алтернатива на антибиотичното лечение на мастит и метрит при крави. Много бактериофаги са изолирани и се характеризират с голям литичен потенциал срещу бактериите, причиняващи мастит и метрит при кравите. Няколко ендолизини с подчертана литична активност срещу патогените, причиняващи мастит *in vitro* също са произведени от стафилококови и стрептококови бактериофаги. В малкото клинични проучвания обаче е налице доказателствен материал за високата ефикасност на бактериофагите в терапията на мастит, причинен от *Staphylococcus aureus*. По същия начин литичните бактериофаги имат подчертана антимикробна активност *in vitro* срещу щамове на *E. coli* в матката на млечното направление крави след раждането.

Бактериофагите са вируси, които могат да се размножават вътре в бактериите, като по този начин подтискат тяхната пролиферация. Употребата на „бактериални вируси“ като терапевтични агенти е проучена още през 1919г. от Феликс д’Херел, съоткривател на фагите. Напоследък се наблюдава възобновяване на интереса към фаговата терапия поради появата на резистентни към антибиотици бактерии и трудно лечение на често срещани заболявания при животните (Saini et al., 2013; Tsonos et al., 2014). Няколко проучвания върху животни са показали безопасната и ефикасна употреба на фаговата терапия срещу инфекции с *E. coli* (Brussow, 2005; Lu, Koeris, 2011). През 80-те години на миналия век Смит и Хъгинс (1983 г.) използват колифаги за защита на телета, прасета и агнета от диария, след като им се дават перорални дози ентеропатогенни щамове *E. coli*. Доказано е, че коктейл от различни фаги срещу *E. coli* O157:H7 намалява размножаването на тези бактерии при експериментално заразени овце (Raya et al., 2006, 2011; Callaway et al., 2008). Освен това бактериофагите са използвани срещу *E. coli* инфекции на матката след раждането с надеждата фаговата терапия да служи като алтернатива на антибиотиците за лечение на метрит при млекодайно направление крави след време (Bicalho et al., 2010; Santos et al., 2010).



Фиг. 2: Схематично представен механизмът на действие на бактериофагите спрямо техния специфичен гостоприемник (литичен и лизогенен цикъл)

Ефикасност и механизми на действие на експерименталните фагови терапии при преживни животни

В проучване на *Marta Dec*, *Andrzej Wernicki* и *Renata Urban-Chmiel* много обстойно са описани механизмите на действие на бактериофагите.

Бактериофагите се характеризират със специфични механизми на действие срещу клетките гостоприемници:

- Репликацията се извършва изключително в живи бактерии, които са податливи на даден фаг. Механизмите на репликация имат доста сходства с еукариотните вируси.
- Както в литичния, така и в лизогенния цикъл се наблюдават етапи на: адсорбция, проникване, репликация на нуклеинова киселина, образуване на вириони и тяхното освобождаване от клетката гостоприемник.
- Фагите са строго специфични към определен бактериален щам.
- Фагите могат да предават нови гени на микроорганизмите, което допринася за генетичното разнообразие на бактериите и появата на патогени, обогатени с нови фактори на вирулентност, като адхезини или токсини.
- Спецификата и спектърът на активност на фагите се определят от наличието на рецептори на повърхността на бактериалните клетки, т.е. *LPS*, протеини на клетъчната стена и други протеини (*Weinbauer, 2004; Skurnik u Strauch, 2006; Rakhuba et al., 2010*).

Критериите за таксономията на бактериофагите, прилагани от *ICTV* (Международен комитет по таксономия на вирусите, ЕС, 2016 г.), се основават главно на геномния тип и морфологията на вирионите, включително геномните и протеомните методи. **Бактериофагите са класифицирани в повече от 870 вида, в 14 семейства, с над 204 родове и повече от 6000 вида фаги** (*Ackermann u Prangishvili, 2012; Krupovic et al., 2016; Adriaenssens et al., 2017*). Класификацията на бактериофагите търпи постоянна

актуализация, в резултат на което през 2018г. вече има 142 семейства, 81 подсемейства и около 4978 признати вида (ICTV, 2018).

Бактериофагите могат да бъдат разграничени по форма, структура и капсидна симетрия – изометрична (полиедрална) и спирална (спирала), нуклеинова киселина и взаимодействие с бактериалния гостоприемник. Фагите също се отличават по размер – малки, средни или големи; форма – филиформна или сферична; и наличието или отсъствието на глава и/или опашка. Повечето бактериофаги принадлежат към три семейства: *Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae* (Karthik et al., 2014; Urban-Chmiel et al., 2015; Wernicki et al., 2017).

Основното делене и охарактеризиране на бактериофагите се основава на вида на нуклеиновата киселина (ДНК или РНК) и на структурата на капсида, която е изградена от структурни протеини. Многобройни научни доклади (Karthik et al., 2014; Adriaenssens and Brister, 2017) потвърждават, че бактериофагите имат само един вид нуклеинова киселина и че по-голямата част от тях имат двойна или по-рядко единична ДНК. Има и видове с едно- или двойноверижна РНК.

Съгласно класификацията, предложена от Goyal et al.(1987), въз основа на рецепторите на гостоприемника, фагите могат да бъдат:

- Соматични фаги – с рецептори на клетъчната стена.
- Капсулни фаги – с рецептори на капсулния полизахарид.
- Придатъчни фаги – с рецептори, локализирани върху флагелума, пилите, или ресничките.

Според Wittebole et al.(2014), бактериофагите могат да бъдат класифицирани и въз основа на специфичния прицелен бактериален гостоприемник, например стафилококовата фамилия фаги (Deghorain и Van Melder, 2012) или фамилията *Pseudomonas* фаги (Ceyssens и Lavigne, 2010); средата на местообитание на фагите; и неговия жизнен цикъл – литична или лизогенна, псевдолизогенна или хронична инфекция (Ackermann, 2011; Wernicki et al., 2017).

Род	Семейство	Морфология	Вид на нуклеинова киселина
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	Необвит, къса съкращаваща се опашка	Линейна двойноверижна ДНК
	<i>Siphoviridae</i>	Необвит, дълга неконтракtilна опашка	
	<i>Podoviridae</i>	Необвит, къса неконтракtilна опашка	
	<i>Lipothrrixvirida</i>	Обвит, пръчковиден	
<i>Ligamenvirales</i>	<i>Rudeiviridae</i>	Необвит, пръчковиден	Линейна двойноверижна ДНК
Некласифицирани	<i>Ampullaviridae</i>	Обвит	Линейна двойноверижна ДНК

	<i>Bicaudaviridae</i>	Необвит	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Clavaviridae</i>	Необвит, пръчковиден	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Corticoviridae</i>	Необвит, изометричен	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Fuselloviridae</i>	Необвит	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Cystoviridae</i>	Обвит, сферичен	Сегментирана двойноверижна ДНК
	<i>Globuloviridae</i>	Обвит, изометричен	Линейна двойноверижна ДНК
	<i>Guttaviridae</i>	Необвит, яйцевиден	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Inoviridae</i>	Необвит, нишковиден	Сферична еднoверижна ДНК
	<i>Leviviridae</i>	Необвит, изометричен	Линейна еднoверижна РНК
	<i>Microviridae</i>	Необвит, изометричен	Сферична еднoверижна ДНК
	<i>Plasmaviridae</i>	Обвит, плеоморфен	Сферична двойноверижна ДНК
	<i>Tectiviridae</i>	Необвит, изометричен	Линейна двойноверижна ДНК

Таблица 1: Класификация на бактериофагите

Фагови експериментални терапии при животни

Високата ефикасност и безопасност на фаготерапията в сравнение с антибиотиците се дължи отчасти на тяхната специфичност за избрани бактерии, което се проявява чрез способността да се заразяват само един вид, серотип или щам. Такъв механизъм не причинява разрушаване на чревната микрофлора на коменсалния тракт и поради самовъзпроизвеждането на бактериофагите по време на терапията често са ненужни повтарящи се приложения. Следва също да се отбележи, че механизмите на бактериална резистентност срещу фаги и антибиотици показват значителни различия между видовете (Scott et al., 2007a; Sultan et al., 2018). Използването на фаги в хуманната и ветеринарната медицина, както и в селскостопанската индустрия, не влияе значително на чувствителността на бактериите към антибиотици, използвани в хуманната медицина, което е ключов въпрос при използването на антибиотици в агрохранителната верига. Някои проучвания потвърждават, че **еднократното прилагане на бактериофаги напълно елиминира патогенните бактерии, в контраст с някои антибиотици**, които трябва да се прилагат многократно (Bach et al., 2003; Brussow, Kutter, 2005; Rivas et al., 2010). Друго важно предимство е липсата на междувидова бариера в антибактериалната активност на фагите, което означава, че същите бактериофаги могат да се използват за

борба с инфекциите при човешки и животински гостоприемници, включително патогени като *Staphylococcus* spp., различни серотипове на *Escherichia coli* или други бактериални видове (Alomari et al., 2016).

Много проучвания (Sheng et al., 2006; Wall et al., 2010) са потвърдили, че бактериофагите, използвани в целеви експериментални терапии, могат да се използват за предотвратяване и лечение на различни бактериални инфекции при продуктивните животни. Доказано е намаляване с до 99% или в някои случаи дори 100% на бактериалните патогени, включително зоонозните патогени, което значително подобрява клиничните резултати при много експериментални лечения на инфекции при говеда или свине.

Тъй като **бактериофагите са навсякъде в околната среда**, употребата им във ветеринарната медицина или промишленото животновъдство и растениевъдство **е една от най-екологичните антибактериални терапии**, налични днес. Това означава, че **бактериофагите нямат отрицателен ефект върху околната среда**, както в случая на антибиотиците или други химиотерапевтични средства.

Фагите имат няколко важни предимства пред антибиотиците. Някои примери за експериментална терапия с бактериофаги включват лечение на инфекции, причинени от *Salmonella* и *E. coli* при мишки, домашни птици, телета, прасета и агнета; на инфекции, причинени от *Clostridium* spp. и *Pseudomonas aeruginosa* при мишки или други лабораторни животни, като хамстери и плъхове; и на инфекции от *Staphylococcus aureus* при мишки, крави и други животни. Предимствата и потенциалните недостатъци на употребата на фаговата терапия са представени в **Таблица 2**:

Предимства	Недостатъци
Литичните бактериофаги задължително унищожават бактериите, докато антибиотиците често действат само като бактериостатични агенти (Kutter et al., 2010).	Само силно литични фаги са подходящи за фаготерапия (Pirnay et al., 2015).
Бактериофагите се възпроизвеждат на мястото на инфекцията, така че не е необходимо да се прилагат в големи количества или в многократни дози (Loc-Carrillo, Abedon, 2011; Borie et al., 2014).	Грам-отрицателните бактерии, лизирани от фагите освобождават ендотоксини или други токсични протеини, които причиняват треска и потенциално фатален край в живите организми (Pirnay et al., 2015).
Някои бактериофаги могат да причинят лизис на бактерии, които са резистентни на антибиотична терапия, включително на тези, които образуват биофилм (Ul Haq et al., 2011; Khalifa et al., 2015).	Фаговите частици са по-големи от повечето лекарства. Това може да попречи на употребата им при някои заболявания, тъй като те няма да могат да достигнат до заразените тъкани.
Бактериофагите проявяват ограничена специфичност при бактериалните гостоприемници и могат да бъдат активни	Бактериофаговите протеини могат да предизвикат имунен отговор, защото съдържат чужди протеини, които са

срещу резистентни към антибиотици Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, които понякога инфектират само един вид или дори един щам, така че не засягат коменсалната и симбиотичната флора, което намалява риска от вторична инфекция с патогенни бактерии (<i>Kutter et al., 2010; Loc-Carrillo, Abedon, 2011</i>).	потенциални епитопи за антитела (<i>Loc-Carrillo u Abedon, 2011, Gorski et al., 2012, D^browska et al., 2014</i>).
Бактериофагите (с изключение на тези, чиито вириони имат липидна съставка) са съставени единствено от протеини и нуклеинови киселини, което ограничава техните потенциални механизми на токсичност (<i>Loc-Carrillo u Abedon, 2011</i>).	Индукцията на имунен отговор срещу бактериофаговете протеини може потенциално да намали ефективността на терапията или да причини смърт в резултат на анафилактичен шок (<i>Skurnik u Strauch, 2006; Loc-Carrillo u Abedon, 2011</i>).
Бактериофагите не оставят остатъци в тъканите и за тази терапия няма карентен срок.	Фагите се изчистват от ретикулоендотелните системи. Техният полуживот при животните е кратък, но може да бъде удължен чрез субкултуриране на фаги при заразени животни и изолирани мутанти, които са по-трудни за неутрализация (<i>Loc-Carrillo u Abedon, 2011</i>).
Бактериалните мутации, свързани с резистентност към специфични фаги са по-рядко срещани, отколкото при антибиотиците; освен това, ако се появят бактерии, устойчиви на фаги, много по-лесно е да се намери друг фаг, отколкото да се открие или синтезира нов антибиотик (<i>Elbreki et al., 2014</i>).	Ограниченото познаване на кинетиката на фагите е основен проблем, тъй като трябва да се вземат предвид няколко параметъра, включително степента на адсорбция, броят на циклите на репликация, латентният период в началната доза на фагите и тяхното елиминиране от ретикулоендотелната система (<i>PIRNAY et al., 2015</i>).
Спецификата на бактериофагите ограничава възможността за поява на резистентност, тъй като те не упражняват селективен натиск върху бактерии, които не са гостоприемници (<i>Loc-Carrillo u Abedon, 2011</i>).	Поради спецификата на бактериофагите един фаг не може да се използва за лечение на широк спектър от инфекции, както в случая с антибиотиците. В много случаи може да се наложи етиологичният агент да бъде точно идентифициран и да бъде избрана подходяща суспензия от фаги (<i>Loc-Carrillo u Abedon, 2011</i>).
Фагите могат да се използват в комбинация с други антибактериални средства, включително други фаги, което	Не всички бактериофаги могат да се използват за лечение. По-специално, фагите с лизогенен цикъл, не са

значително разширява спектъра им на антибактериална активност (<i>Kutter et al., 2010</i>).	подходящи, тъй като репликацията на генома на такъв фаг не убива гостоприемника и неговото присъствие често предпазва бактериалната клетка от инвазия от други фаги (<i>Wernicki et al., 2017</i>).
Отпадъците от производството на фагови препарати и остатъците от терапията с тях са предимно биоразградими и тяхната екотоксичност засяга само потенциалните гостоприемници на фагите.	По време на лизис на бактериални клетки, освободените ендотоксини (главно <i>LPS</i> и компоненти на бактериалната клетъчна стена) могат да предизвикат треска и да доведат до токсичен шок (<i>Krylov et al., 1993, Wernicki et al., 2017</i>).
Производството на фагови препарати е просто и икономично (<i>Skurnik et al., 2007</i>)	Фаговите препарати лесно губят активността си, ако се съхраняват неправилно или твърде дълго (<i>Pirnay et al., 2015; Wernicki et al., 2017</i>)
Хората са в постоянен контакт с бактериофагите. Те присъстват във водата, въздуха и храната и все още не са докладвани отрицателни реакции от фаговите частици (<i>Wright et al., 2009; Kutter et al., 2010</i>)	Съществуват проблеми с възприятието на потребителите, свързано с използването на фагови препарати за борба с патогените в храните. Наличието на бактериофаги в храните може да разубеди потребителите да консумират тези храни. Въпреки това, има решение на този проблем с използване на бактериофагови ендолизини или пречистен лизозим (<i>Moyle et al., 2018</i>)

Таблица 2: Предимства и недостатъци на фаговата терапия

Фаготерапия при продуктивни животни е прилагана и в борбата с инфекциите, причинени от зоонозни микроорганизми, които представляват заплаха за човешкото здраве, особено патогенните щамове на *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. и *Listeria* spp., които се пренасят чрез храна.

Използването на **бактериофаги за лечение на инфекции при хора** е имало **висок процент на успеваемост (около 85% или дори повече)**, особено в случаи на смесени инфекции, причинени главно от *S. aureus*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, и ванкомицин-резистентен *Enterococcus* (*Smith и Huggins, 1983; Smith et al., 1987a, 1987b; Weber-Dqbrowska et al., 2000; Morozova et al., 2018*).

При експериментални лечения на продуктивни животни, **бактериофагите** са доказали, че са **ефективен инструмент за борба с болестите по домашните птици, говедата, овцете, свинете и рибите**. Например, ефективността на фаготерията е потвърдена при некротичен ентерит, индуциран от анаеробни бактерии от вида *Clostridium perfringens* при домашни птици.

Видовете и ефективността на фаговите терапии, използвани при домашните птици, са предмет на многобройни публикации (*Loc Carrillo et al., 2005 г.; Scott et al.,*

2007b и други). Препаратите от фаги под формата на суспензии са използвани при домашни птици в експериментални терапии срещу инфекции, причинени от патогени като *Salmonella* spp., *E. coli* и *Campylobacter* spp.

Изследванията в областта на фаготерапията при средни и едри животни, като говеда, свине, овце и кози, играят важна роля. Използването на бактериофаги при говеда и други видове животни е доказано ефективно средство за намаляване на бактериалната колонизация в хода на хронични кожни лезии, причинени главно от стафилококи и стрептококи, както и при респираторни заболявания. В много случаи броят на бактериите е ограничен до 2-4 log₁₀ CFU, което е отразено в хода на процеса на заболяването като смекчаване на симптомите на заболяването (Tiwari et al., 2014).

При преживни животни са тествани експериментални фагови терапии за борба с инфекциите при новородени телета и агнета, причинени главно от ентеротоксигенни щамове на *E. coli*. Проучванията потвърждават **ефективността на тези терапии** главно чрез **смекчаване на симптомите на заболяването** (диария и повишена температура) и намаляване на смъртността от 15% на около 6.7%. Освен това фагите остават в червата на животните, докато са налице патогенни щамове на *E. coli*.

Тъй като говедата и другите преживни животни са основните резервоари на патогенни и зоонотични щамове на *E. coli*, включително O157:H7, голяма част от изследванията се отнасят до използването на бактериофаги за елиминиране на тези патогени (Goodridge, Bisha, 2011).

Ефективността на фаготерапията срещу инфекции, причинени от ентеротоксигенни щамове на *E. coli* при новородени телета, е различна и изследователите (Johnson et al., 2008) показват, че тя зависи от редица фактори, включително: експериментален дизайн на инфекцията, вида фаги и специфичността им към даден бактериален патоген, количественият и качествен състав на дозата бактериофаги.

В едно ранно проучване на Смит и Хъгинс (1983г.) е използвана фагова суспензия от два фага- **B44/1** и **B44/2**, с титър 10¹¹ PFU mL⁻¹, срещу ентеротоксигенния *E. coli* щам O9:K30.99, предизвикващ ентерит при телета. Авторите показват **висока (почти 93%) ефикасност на експерименталното лечение при телета, които са лекувани с фаги, дори когато са налице клинични симптоми**. Резултатите потвърждават, че **фаговата суспензия може значително да намали заболяемостта и смъртността**, дори когато се прилага в случаи на значими клинични симптоми.

В проучване на Callaway et al.(2008), пероралното приложение на фаговата суспензия, получена за референтен щам на *E. coli* O157:H7 щам 933 (ATCC 43895) води до значително намаляване на бактериите в отделните сегменти на стомашно-чревния тракт: ректума, цекума и търбуха. Броят на патогенните бактерии, изолирани от животни след прилагане на фаговата суспензия, варира от 10² до 10³ PFU g⁻¹ цекумно и ректално съдържание във всички изследвани проби.

Значително намаляване на *E. coli* O157:H7 щам 933 (също патогенен за човека серотип) също е наблюдавано от Sheng et al.(2006) след перорално приложение на бактериофагова суспензия на млади телета. Авторите наблюдават значително

намаляване на колонизацията до пълно елиминиране на ентеротоксигенните щамове *E. coli* O157:H7 серотип от стомашно-чревния тракт до 16-ия ден след приложението.

Многократното прилагане на бактериофаги с мляко или коластра при 10^5 PFU mL⁻¹ води до висока антибактериална ефикасност в случай на прилагане на фаги от 4 до 10-12 часа след инфекция. Авторите потвърждават високи фагови титри на 10^{11} PFU mL⁻¹ *in vivo* само 5 часа след приложение, а също така съобщават, че прилагането на малки дози фаги с титри до 10^2 PFU mL⁻¹ веднага след появата на диария значително облекчава симптомите на заболяването (*Brussow and Kutter, 2005*). Въз основа на различните резултати, получени при експериментални фагови терапии при телета, се заключава, че определени дози фаги могат да се използват за "контролиране хода на заболяването" (диарията е била предотвратена дори когато суспензията е приложена до 8 часа след експериментална инфекция при телета с ентеротоксигенни *E. Coli*.

Изследване, проведено от *Chase et al.(2005)*, в което авторите използват „коктейл“ от 37 фаги, специфични за щамове *E. coli* O157:H7 при отбити телета *Black Angus* на възраст 4-6 месеца, показват значително намаляване на бактериалната концентрация до 16 или 24 часа в зависимост от броя на приложенията. Освен това щамове *E. coli* O157:H7 не са придобили резистентност към нито един от 37-те бактериофаги, използвани в експеримента, дори и след повторно заразяване, което трябва да се счита за много полезен терапевтичен ефект.

Важно неблагоприятно явление на бактериофаговата терапия е свързано с ограничената продължителност на ефективния антибактериален титър на бактериофагите при преживните животни, основно свързан с чувствителността на бактериофагите към чревната среда. Жизнеспособността на бактериофагите, приложени *per os* може значително да намалее поради киселинната среда на стомаха, наличието на микрофлора в тъбруха и активността на храносмилателните ензими и жлъчката (*Goodridge and Bisha, 2011*). Някои бактериофаги не могат да оцелеят в среда с рН 2-3 или 7, което значително намалява титъра им (чувствителността към специфични стойности на рН зависи и от вида бактериофаги). Някои изследвания потвърждават (*D^browska et al., 2005*), че някои бактериофаги имат висок процент на оцеляване при рН в диапазон от 2 до 7. Освен това проблемът с инактивирането на фаги чрез ниско стомашно рН може да бъде разрешен чрез прилагане на фаговата суспензия заедно с млякото или непосредствено след хранене на телетата с мляко, както се потвърждава от *Barrow et al.(1998)*. Прилагането на вещества, неутрализиращи стомашната киселина, главно солеви разтвори, непосредствено преди прилагането на бактериофаговата суспензия също изглежда важен елемент от ефективната терапия.

Като се вземат предвид горните недостатъци, специално внимание е обърнато на възможността за ректално прилагане на фаговата суспензия с цел заобикаляне на стомашния сок и микрофлората в тъбруха (*Bielke et al., 2012*). Проучване на *Sheng et al.(2006)* показва, че прилагането на коктейл *KH1* и *SH1* фаги върху говеда под формата на ректална суспензия с едновременно приложение на същите литични фаги с водата за поене на животните е причинило значителна редукция в шига токсин-продуциращите щамове *E. coli* O157:H7 при експериментално заразени телета.

Комбинацията от различни методи за бактериофагово приложение под формата на суспензия при говеда за елиминиране на патогенни щамове *E. coli* O157:H7 също е

била предмет на изследване, представено от *Rozema et al.*(2009). Авторите също така използват едновременно перорално и ректално приложение на суспензията от фаги, като е наблюдавано намаляване на броя на екскретираните *E. coli*, но стойностите не са статистически значими.

Друг пример за средство за контрол на инфекциите при телетата включва пръскане на бактериофагова суспензия под формата на аерозол за елиминиране на бактериални патогени. Установено е също, че използването на фаги, получени от замърсени места и основно ферми за отглеждане на телета (постеля, остатъци от храна или изпражнения), води до високоефективна защита срещу патогенни бактерии на експериментално заразени телета. Когато бактериофаговата суспензия е аерозолно разпръсната върху постелята на животните непосредствено преди инфекцията и до 6 часа преди инфекцията, бактериите са елиминирани в рамките на 10 дни. Впръскване на бактериофагова суспензия аерозолно върху лигавиците на храносмилателния тракт на телетата в рамките на 24 часа от началото на инфекцията напълно елиминира клиничните симптоми в следващите 20 часа.

Според *Sheldon et. al. (2006)* и *Machado et al. (2012)*, бактериофагите могат също да имат благотворно въздействие за намаляване на честотата на маточни инфекции, предизвикани от *E. coli*. Като проблем обаче в научната литература се посочва, че метрита при млекодайните крави много често е резултат от смесени инфекции, предизвикани от патогенни щамове на *E. coli*, *Trueperella pyogenes* и *Fusobacterium necrophorum*, което прави елиминирането на инфекциите особено трудно. Подобна ситуация се наблюдава и в ранните опити за борба с мастита при крави, причинен от *S. aureus*. При прилагане на първите фагови терапии на крави с мастит и метрит се наблюдава не особено висока успеваемост, което авторите предполагат, че може да се дължи на активността на ензимите, съдържащи се в млякото при лактационния период, което инактивира бактериофагите или поради не до край разработените първични фагови препарати (*Gill et al., 2006a, 2006b*).

Друг пример за използването на бактериофаги за борба с бактериалните инфекции при говеда е препарат, който съдържа фагови ензими в комбинация със специфични бактериофаги. Този пример е подкрепен от проучване на инфекциите по кожата и лигавиците, причинени от *F. necrophorum* при говедата (патентно приложение № WO 2004064732 A2).

Установено е, че хранителните добавки, съдържащи фаги, специфични срещу инфекции със смесени патогени като *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus* и *C. perfringens* като алтернатива на антибиотични стимуланти за растеж, също значително подобряват растежа и наддаването на тегло на животните (*Kim et al., 2014; Svircev et al., 2018*).

В заключение, за да може фаготерапията да бъде ефективна алтернатива на антибиотиците, трябва да бъдат преодолені няколко важни пречки (*Tsonos et al., 2014*). Бактериофагът, атакуващ например *Escherichia coli* често проявява щамова специфичност, което ограничава способността му да инфектира разнообразна група от колиформни патогенни изолати. Този проблем на фагите налага използването на множество фаги в “коктейл”, за да се увеличи диапазона на специфичност на фагите към гостоприемника (*Brussow, 2005*). Фаговите коктейли се използват и в борбата с

бактериалната резистентност във все повече научни проучвания (Lu, Koeris, 2011). Въпреки че е лесно да се демонстрира активността на бактериофагите *in vitro*, сравнително малко проучвания разглеждат как фагите инфектират бактериите, възпроизвеждат се и продължават при *in vivo* условия. Например, за да може фагите да бъдат ефективни при лечението на *ING* или при предотвратяването на мастит, те трябва да могат да лизират бактериите и в суровото мляко и в секрети от крави в сухостойния период. В проучване със *Staphylococcus aureus* и бактериофага К, резултатите показват, че специфичността към гостоприемника на фагите и литичната им активност са били потискани в сурово пълномаслено мляко, но не и в топлинно обработеното мляко (O'Flaherty et al., 2005; Gill et al., 2006).

Антибиотична терапия при мастит и метрит при говеда

Понастоящем основният метод за лечение на говежди мастит е прилагането на антибиотици (Petitclerc et al. 2007). Тази стратегия обаче има някои недостатъци, включително ниска степен на ефективност, повишена честота на резистентност и наличие на остатъци от антибиотици в млякото (Gomes and Henriques 2016). Освен това увеличаването на разпространението на резистентни към антибиотици бактерии е намалило ефективността на антибиотичната терапия (Azam u Tanji 2019). Бързото увеличаване на броя на резистентни към антибиотици патогенни микроорганизми (Michael et al. 2014), което се улеснява от подчертана редукция в разработването на нови антибиотици (Norrby et al. 2005), наложи търсенето на нови методи за борба с инфекциите, причинени от резистентни бактерии. В този смисъл **бактериофагите представляват отлична алтернатива за справяне с бактерии, които са резистентни към широкоспектрните антибиотици** (Varela et al. 2018).

Фаготерапията е особено обещаваща, тъй като включва високо селективни бактериофаги, които конкретно инфектират и убиват прицелните патогенни бактерии, като същевременно нямат ефект върху микрофлората (Kumaran et al. 2018). Едно от първите научни съобщения за приложение на фаготерапията при мастит по говедата е на Schmelcher et al. 2012, но са необходими допълнителни проучвания и доказателства в подкрепа на фаготерапията като стандартен ефективен антибактериален агент за лечение на мастит.

Антибиотиците за момента се използват широко за лечение и профилактика на мастит през периода на лактация при крави и за намаляване на интрамамарните инфекции през нелактационния период. В млечното направление животновъдство приблизително 70% от антибиотиците се използват превантивно (Kuipers et al., 2016; Krömker u Laibach, 2017). Ефективността на лечението на мастит с антибиотици намалява все повече и повече и остатъците от антибиотици в млякото могат да представляват риск за човешкото здраве¹.

¹ Появата на мултирезистентни бактерии е спешен въпрос от световен интерес и употребата на антибиотици в животновъдството е прецизно оценена и мониторирана (Tang et al., 2017). Световната здравна организация (СЗО) издаде препоръки за намаляване на употребата на антибиотици в животновъдството (СЗО, 1998, 2017). Съществува ново европейско законодателство (от 2006 г.), което

Следродилният метрит също се лекува често с антибиотици. За лечение на метрит има вътрематочно приложение на антибиотици, системно или и двете. При оценка на резултатите след антибиотично лечение обаче има документиран голям процент на неуспех от 23% и 35% (*Drillich et al., 2001; McLaughlin et al., 2012; Haimerl et al., 2014*), което налага търсене на алтернативи на антибиотичната терапия.

Бактериофаги и свързаните с тях ендолизини като алтернатива на антибиотичното лечение на мастит при говеда

Използването на **бактериофаги и фагови ендолизини** представляват **потенциална алтернатива за лечение на бактериална инфекция на млечната жлеза и матката при крави** (*Santos et al., 2010; Basdew and Laing, 2011; Vander Elst and Meyer, 2018; Gutiérrez et al., 2019*).

Бактериофагите (фаги) са вируси, които са видово / щамово специфични за патогенните бактерии. По време на инфекцията се наблюдава вмъкване на фаговия геном в бактериалната цитоплазма в резултат на производството на ендолизини, които смилаат бактериалната клетъчна стена. След заразяване с бактерии, фагите могат да индуцират лизогенен цикъл, където геномът на фага ще се интегрира в генома на гостоприемника и ще се реплицира заедно с бактериалния, или ще има индукция на литичен цикъл (образуват се нови фагови частици и резултатът е клетъчен лизис (нарушаване на клетъчната стена) поради освобождаването на тези частици) (*Kutter and Sulakvelidze, 2004*). Освен това фагите и ендолизините също нарушават нормалната структура на биофилмите, които са защитни структури, произведени от много бактерии, причиняващи мастит и метрит, като *Staph. aureus*, коагулаза-отрицателни *Staphylococcus*, *E. coli*, *T. pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* и други (*Chan и Abedon, 2015*).

In vitro изследвания на бактериофаговата терапия срещу бактерии, причиняващи мастит при крави

През последните години нараства интересът към терапевтичното използване на бактериофаги за лечение на мастит при крави. Резултати от многобройни *in vitro* проучвания показват, че този подход за лечение на мастит е ефективен поради **ефективността на фагите или ендолизините срещу някои бактерии, причиняващи мастит** при кравите. Повечето от изследванията са фокусирани върху мастит, причинен от *Staph. aureus* поради устойчивостта на този патоген.

O'Flaherty et al. (2005) в своето проучване изолира два антистафилококови фага (**DW2** и **CS1**) от отпадни води от кравеферми. И двата фага са литични срещу свързаните с мастит стафилококи. Коктейлът от тези фаги и фаг К, който инхибира широк спектър от стафилококови щамове, се вкарва чрез инфузия във вимето на кравите без клинични

ограничава или напълно забранява превантивната употреба на антимикробни средства или разрешава антибиотична употреба само когато това е наложително и единствено и само по предписание от ветеринарен лекар (Регламент (ЕС) 2019/6, 2019) и когато има висок риск от инфекция или при лиса на подходящи алтернативи на терапия.

симптоми на мастит. Няма забележимо увеличение на броя на соматичните клетки в млякото, което показва, че фагите не дразнят тъканите на млечната жлеза.

Synnott et al. (2009) описва изолирането на два фага от отпадни води, обозначени с **ΦSA012** и **ΦSA039**, за които е установено, че имат литичен ефект върху широк диапазон от *Staphylococcus aureus* изолати, получени от млякото на крави с мастит.

Garcia et al. (2009) в проучването си са изолирали осем различни фага от млечни проби. Всички тези фаги са инвазирали щамове *Staphylococcus aureus*, предизвикващи мастит. Фаговата смес е по-ефективна от еднофаговото приложение за намаляване на броя на *Staphylococcus aureus*.

Kwiatek et. al. (2012) идентифицира бактериофаг, **MSA6**, изолиран от крава с мастит, който е литичен срещу патогенни стафилококи, предизвикващи мастит при говеда.

Han et al. (2013) характеризира фаг (**SAH-1**) с подчертана *in vitro* литична активност спрямо щамове *S. aureus*, изолирани от млечно направление крави с мастит.

Други литични бактериофаги (**SPW** и **vB_SauM_JS25**) срещу *Staph. aureus*, изолирани от млечно направление крави с мастит, са описани от *Li et al., 2014; Zhang et al., 2015*.

Hamza et al. (2016) са изолирали бактериофаг **SA** от отпадни води и са установили, че този фаг има литична активност срещу *Staph. aureus* изолати от крави с мастит. Фагът е бил ефективен за намаляване на бактериалния растеж, доказан след провеждане на тест за редукция на бактериалния растеж.

Всички изброени фаги се считат за потенциални терапевтични или профилактични кандидат алтернативи срещу *S. aureus*, при инфекции на вимето водещи до мастит при кравите.

Оценка на ефективността на фагите, чрез използване на опитни животни за неутрализиране на мастит-индуциращи бактерии, изолати от говеда

Ефективността на фаговото лечение на мастит при говеда е оценена с помощта на *in vitro* експериментална терапия с лабораторни мишки.

В проучване на *Breyne et al. (2017)*, млечните жлези на мишките са инокулирани със *Staph. aureus*, изолиран от крави, при които е диагностициран клиничен мастит. Резултатите от проучването показват, че лечението с двуфагов коктейл води до по-малко патологични индикации за мастит въз основа на броя на бактериите.

В проучване на *Geng et al. (2019)*, два фага (**vBSM-A1** и **vBSP-A2**) с подчертана литична активност спрямо *Staph. aureus* са изолирани от отпадните води на ферми. Лабораторните опитни мишки с индуциран мастит са подложени на фагова терапия с един вид фаги, или като суспензия от група бактериофаги. **Фаговата суспензия е по-ефективна от индивидуалното фагово лечение за потискане на симптомите на *Staph. aureus* предизвикания мастит.**

Проучвания и изследвания *in vitro* на ефективността на фаговете ендолизини срещу бактерии, причиняващи мастит при крави

Бактериофаговите литични ензими, ендолизини, нарушават клетъчната стена на околните Грам-положителни бактерии, което води до загуба на патогенния потенциал на бактериите, което прави тези ензими интересни „кандидати“ за **антимикробни средства**. Клетъчната стена на Грам-отрицателните организми имат външна мембрана, която функционира като физическа защитна бариера срещу активността на ендолизините. Резултати от проучвания, при които е извършена оценка на пермеабилитета на външната мембрана, показват, че ендолизините са ефективни за лечение на заболявания, предизвикани от Грам-отрицателни бактерии (Love et al., 2018).

Произведените фагови ендолизини са тествани *in vitro* и при миши модели за ефективност при намаляване на броя на Грам-положителни бактерии, причиняващи мастит по говедата.

O'Flaherty et al. (2005) демонстрират производството от генетично модифицирана млечнокисела бактерия чрез индуциране на експресията на стафилококов ендолизинов ген на *Myoviridae* **LysK**. Лизатите, съдържащи рекомбинантен **LysK**, ограничават патогенезата на широк спектър от стафилококи, включително патогенни *Staph. aureus* щамове, причиняващи мастит при крави. Donovan et al. (2006) съобщават, че рекомбинантен ендолизин, получен от *Staph. aureus* бактериофаг **phi11** е ефективен за намаляване на патогенезата на *Staph. aureus* и срещу много коагулаза-отрицателни стафилококи, изолирани от крави с мастит. Ендолизинът от фаг **phi11** е активен при физиологично рН (6,7) и когато има свободни концентрации на калций (3 mM) в млякото на кравите.

Zhou et al. (2017) изследва литичната активност на рекомбинантния фагов лизин **LysK Δ amidase** за намаляване на патогенезата на стафилококови щамове, свързани с мастит при говеда. Лизинът е показал **широк литичен спектър** и лечението *in vitro* напълно е **инхибирано патогенезата на изолатите на тестваните щамове стафилококи**, включително устойчив на метицилин *S. aureus*.

В проучване на Fan et al. (2016), е тествана ефективността на рекомбинантен ендолизин **Trx-SA1** от бактериофага **IME-SA1** срещу *Staph. aureus*. Този ендолизин е бактериолитичен срещу 43% от тестваните *Staph.* щамове. Тези ендолизини са произведени с помощта на избрани пептиди, за да се получи ново поколение литични протеини с подобрени антибактериални свойства.

Schmelcher et al. (2012) оценяват два химерни лизина, състоящи се от стрептококов **λ SA2** ендолизинов ендопептидазен домен, слят със стафилококови доменни свързващи клетъчни протеини лизостафин (**λ SA2-E-Lyso-SH3b**) или от стафилококов фаг К ендолизин (**λ SA2-E-LysK-SH3b**). И двете конфигурации имат значителна активност при лизиране на 16 тествани изолати на *S. aureus* и редуциран бактериален брой при мишки с индуциран мастит.

От Becker et al. (2016) са проектирани т стафилококови литични пептидогликанови хидролази с три уникални антимикробни активности от два родителски протеина, които се комбинират в един хибриден протеин, като е оценена активността на тази доменна конструкция с три литични функции, и като резултат е наблюдавано разграждане на биофилма от *S. aureus* и пълен лизис на бактериалните клетки при мишки с мастит.

Porter et. al. (2016) в проучването си на тема: „*In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis*“ изследва *in vitro* потенциалното използване на бактериофаги за предотвратяване на мастит, причинен от *E. coli* при крави. Използвана е **суспензия, състояща се от четири различни бактериофаги**, като е наблюдавано, че тя има **инхибиращо действие върху растежа на повече от 50% от изолатите на *E. coli***. Предварителната обработка с фагова суспензия намалява адхезията и вътреклетъчната цялост на *E. coli*.

Фаговата суспензия, състояща се от 4 различни бактериофага, е генерирана чрез скрининг на 36 изолати на *E. coli* от млечно направление крави с клиничен мастит. Бактериофаговият “коктейл” инхибира растежа на 58% от изолатите от щата Вашингтон и 54 % от изолатите на *E. coli* в Ню Йорк, което предполага, че **коктейлът от фаги е имал сравнително широк спектър на действие** срещу релевантни щамове от 2 различни географски зони. Способността за потискане на бактериалния растеж на тези изолати в течна среда на растеж не е повлияна от съотношението на бактериофаговите частици и бактериалните клетки (MOI^2). За тези *E. coli*, които са били напълно инхибирани от фаговия коктейл, MOI до 10 има същия ефект като 10 $\mu\text{g/mL}$ цефтиофур³ върху скоростта на растеж на *E. coli* за период от 12 часа, като се използват методи за измерване на оптична плътност на популацията. Постигнати са резултати за **намаляване на растежа на *E. coli* от 3,3 до 5.6-log**, когато патогенните бактерии са инкубирани с фаговата суспензия, в сурово мляко за период от 12 часа, при физиологична температура.

Предварителното третиране на клетъчни култури с фагов коктейл значително намалява адхезията и вътреклетъчната преживяемост на *E. coli* в сравнение с контролите. Когато се комбинира с бисмут-базиран уплътнител, фаговата суспензия е в състояние да инхибира бактериалния растеж, когато е предизвикан с $1,6 \times 10^3$ cfu/ml от *E. coli* щам, предизвикващ мастит при крави. *In vitro* резултатите от приложението на **фаговата суспензия са показали бактерицидна активност в сурово мляко и тъканите на млечните жлези**.

За това проучване са използвани две колекции от клинични щамове на *E. coli*. Единия щам *E. coli* първоначално е изолиран от *Washington State University College* от крави с клиничен колиформен мастит. Щамовете от Ню Йорк са предоставени от *Cornell University College of Veterinary Medicine (Ithaca, NY)* и преди това са класифицирани като устойчиви (*Dogan et al., 2006, 2012*). За да са разграничими инокулантните бактерии в суровото мляко от фоновите колиформи, е модифициран един от системните щамове (P5) с pUC-18 плазмид, съдържащ гени на резистентност към ампицилин (**Amp-R**). Щам P5 е използван и за теста на базата на бисмут. Три персистиращи щамове (P4, P5 и P6) са използвани за експерименти с тъканни култури. Всички щамове са тествани за потвърждение на колиформната морфология.

² MOI - Multiplicity of infection - *In microbiology, the multiplicity of infection or MOI is the ratio of agents (e.g. phage or more generally virus, bacteria) to infection targets (e.g. cell) – съотношението бактериофаги, в случая, необходимо да инфектира таргетните патогенни бактерии*

³ https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/naxcel-epar-product-information_bg.pdf

За изолиране на бактериофагите са използвани проби от първичните отпадни води от местна пречиствателна станция, като се използва стандартен протокол за изолация (Carlson, 2005).

За оценка на диапазона на всеки отделен изолат бактериофаги към гостоприемника е използван точков лизис тест. Фаговите геноми са секвенирани с помощта на *Illumina HiSeq 2000* в *Oregon State University (Corvallis)* с 200x покритие.

За да се оцени въздействието на различните дози бактериофаги върху растежа на *E. coli*, за всеки бактериален щам са създадени стандарт на оптична плътност и криви на растежа, измерени при 570 nm (OD₅₇₀). Процентното инхибиране е изчислено за всеки щам, подложен на фагова терапия със подбраната суспензия от фаги въз основа на измерените стойности на OD след 12 часа.

За да се анализира ефектът на различния бактериофагова *MOI* върху кривата на растежа на 62 изолата на *E. coli*, е използван линеен модел. Взаимодействието между терапията с бактериофаги и времето също е включено в модела. Същият статистически метод е използван за изследване на ефекта на фаговата суспензия върху кривата на растежа на персистиращ щам *E. coli* в сурово мляко, с изключение на това, че зависимата променлива в тези случаи е изразена в cfu. Всички статистически тестове са проведени в *JMP Pro (11.0, SAS Institute Inc., Cary, NC)*.

Като резултат от това обстойно проучване, от 74 бактериофаги, четири фаги са избрани като кандидати за фагова суспензия, въз основа на различните им широки диапазони към гостоприемника (патогенните щамове бактерии, предизвикващи мастит). Геномните размери на тези фаги се оценяват на между 140 и 172 kb след анализ чрез импулсна гел електрофореза. Три от четирите фагови генома са податливи на разпадане при стандартни условия чрез *EcoRV* ензима⁴. Резултатите показват, че всеки от фаговите препарати съдържа един бактериофаг, генетично различен от другите. Геномният анализ на секвенциите потвърждава това, разкривайки, че суспензията съдържа 2 *T4*-подобни фаги, *rV5*-свързан фаг и *phi92* -свързан фаг (Kropinski et al., 2013). Бактериофаг *phi92* е известен с **широкия си обхват на гостоприемници** поради многовалентния адсорбционен апарат (Schwarzer et al. 2012). Всички фаги в суспензията от това проучване са литични.

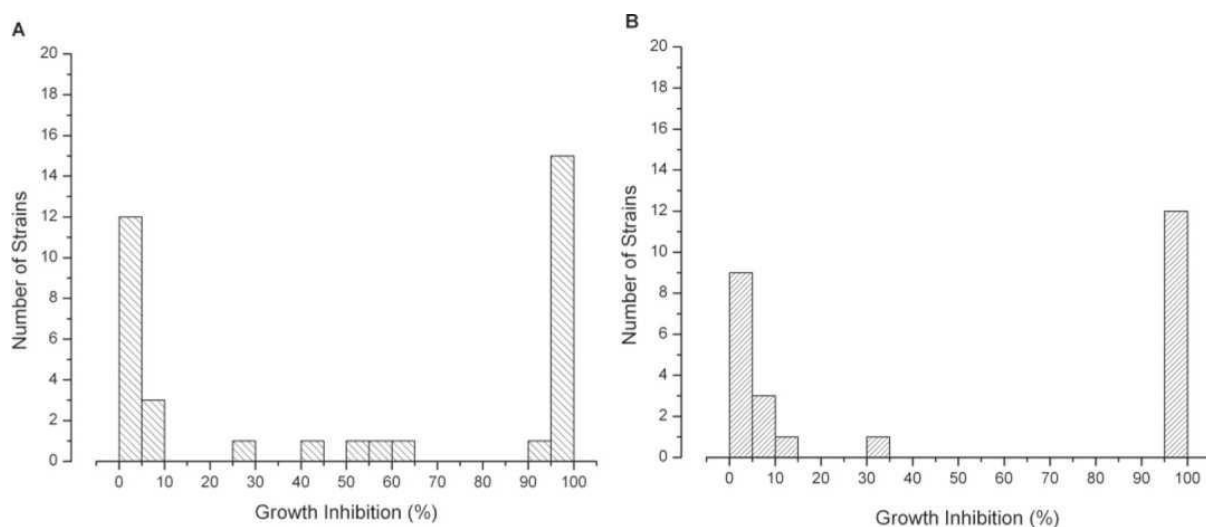
Различни дози от суспензията бактериофаги (*MOI*) са използвани за измерване на способността и да потиска растежа на 36-те клинични щамове на *Washington State E. coli*. Фаговата суспензия е показала широк спектър от действия срещу тези изолати. Двадесет и един щамове *E. coli* (58%) са напълно или частично инхибирани от фаговата суспензия при 100 *MOI*. За да бъде оценен ефекта на фаговата суспензия към полеви щамове *E. coli*, различни от тези, използвани за изолиране на фагите, е направен същия анализ на кривата на растежа върху колекция от 26 щамове от Ню Йорк, предизвикващи клиничен мастит. Фаговият „коктейл“ е показал подобни резултати за потискането на растежа като за щамове от щата Вашингтон, като 14 (54%) щамове са пълно или частично инхибирани. Пълното инхибиране се определя като > 90% намаляване на бактериалния растеж от бактериофаговата суспензия на 12-тия час в сравнение с контролите. Частичното

⁴ *EcoRV* (произнася се "eco R five") е тип II рестрикционна ендонуклеаза, изолирана от определени щамове *Escherichia coli*. Алтернативното име на този ензим е *Eco32I*.

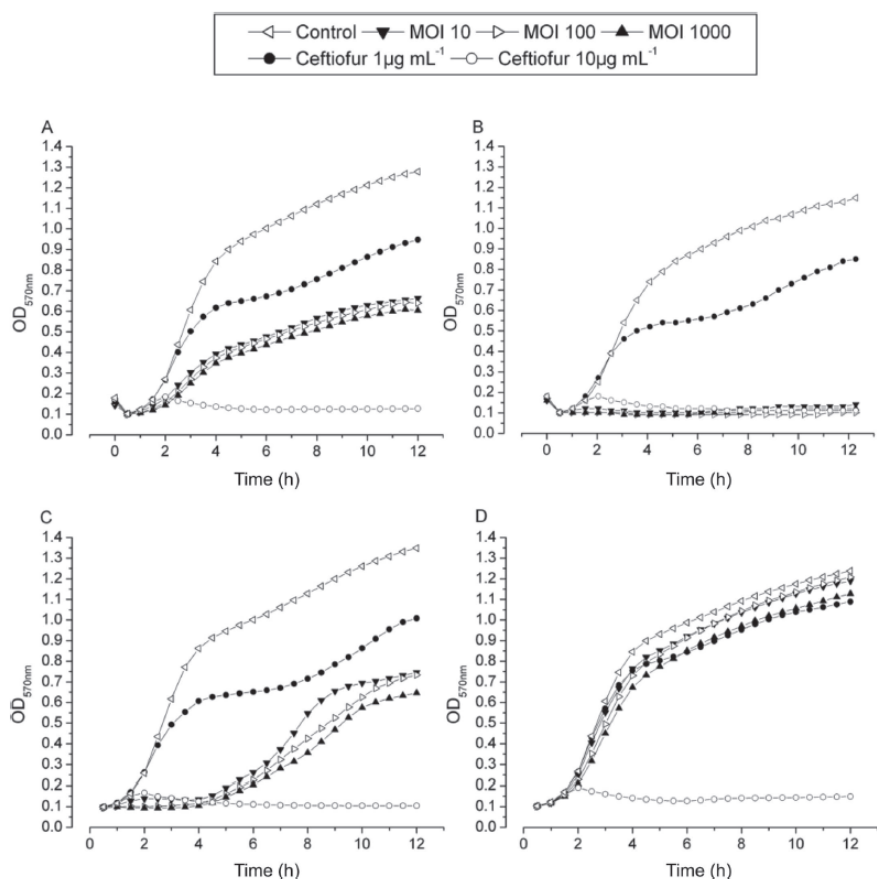
инхибиране е определено като редукция между 10 и 90% и липса на инхибиране и подтискане растежа на бактериите с <10%. За всички изследвани щамове на *E. coli* кривите на растежа не са повлияни значително от дозата, което показва, че обхватът на **тестваните MOI е еднакво ефективен за потискане на бактериалния растеж**. Всички щамове са напълно податливи на цефтиофур при 10 µg/ml, но растежът им е бил частично инхибиран от цефтиофур и при 1 µg/ml. При щамове, които са били напълно или частично инхибирани, няма статистически значима разлика в ефекта между положителната контрола (цефтиофур 10 µg/ml) и фаговата суспензия ($P < 0.05$).

Общият брой на бактериите в суровото мляко е бил измерен след 12 часа инкубация с фаговата суспензия, в която са включени редица начални бактериални инокулантни дози на трансформиран персистиращ щам *E. coli*. Постигната е редукция от 3,3 до 5,6-логаритъма (log) на бактериалния растеж в сравнение с контролата, като фаговата суспензия е предизвикана с 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , и 10^6 cfu/ml ($P < 0.05$) бактериална култура. Освен тези резултати е направена 12-часова крива на бактериален растеж със и без фагова суспензия в сурово мляко. Измерват се и титрите на бактериофагите в суровото мляко. **Фаговата суспензия значително инхибира бактериалния растеж в сравнение с отрицателните контроли, постигайки 3,75-log намаление на бактериалния растеж за 12 часа** ($P < 0.05$). Намаляването на броя на колон образувачите единици съответства на увеличаване на броя на биофилм образувачите единици, което показва **фаголиза на бактерии между 4 и 8 часа**.

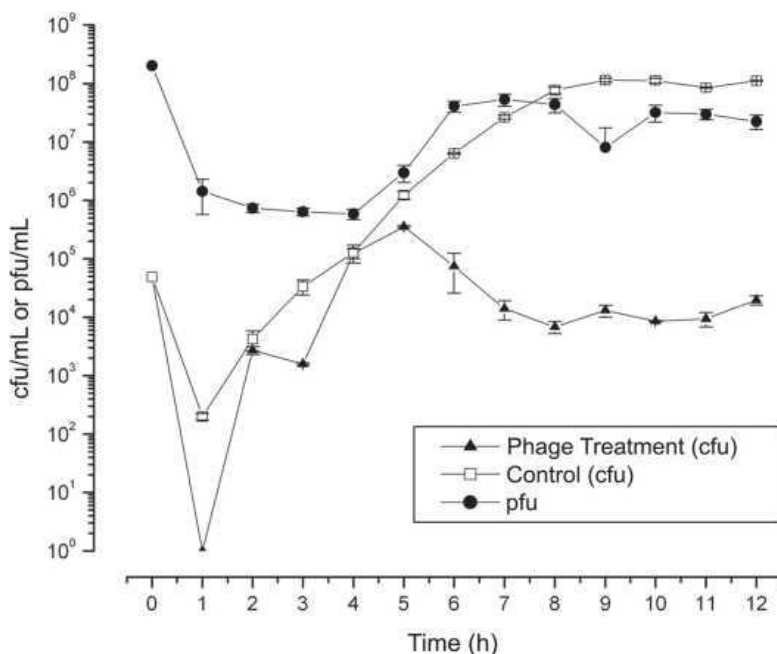
За да бъде проверено дали фаговата суспензия може да предотврати и изчисти хронични колиформни инфекции, е използвана тъканна култура като *ex vivo* модел, за да се проучат ефектите на бактериофагите върху способността на *E. coli* да се придържа към и да нахлува в епителните клетки на млечните жлези. Тъканнокултуралните изпитвания, с предварително третиране с приблизително 10^8 pfu от фаговия коктейл, показват намалена адхезия на 3 щамове *E. coli* - с 98,0, 99,6 и 99,7% ($P < 0,05$). За да бъде сравнена вътреклетъчната преживяемост на персистиращата *E. coli* инфекция със и без бактериофагова суспензия, е проведено изследване за дългосрочна инвазия над 3 дни. Въпреки че не е наблюдавана значителна разлика в броя на бактериите след 48 и 72 часа инкубация с гентамицин, броят на бактериофагите е бил относително стабилен през цялото време на изследването и изглежда се е увеличил в отговор на бактериалния растеж.



Фиг. 3: Инхибиране на растежа на бактериалните изолати в 2 различни етапа на 12 часа, което показва, че коктейлът от бактериофаги има широка гама от гостоприемници (бактерии, изолирани от различни места): А) 58% от 36-те бактериални изолати от щата Вашингтон са били напълно или частично инхибирани; Б) 54% от 26-те изолати от щата Ню Йорк също са потиснати.



Фиг. 4: Оптична плътност, кривите на растеж (OD_{570nm}) на *Escherichia coli* изолатите



Фиг. 5: Крива на растеж на персистиращ щам *Escherichia coli* P5-AmpR, инокулиран с бактериофаги или фагова суспензия в сурово мляко. Първоначалните концентрации са ~ 50 000 cfu/mL и 2×10^8 pfu/mL за бактерии и фаги, съответно.

Коктейлът от бактериофаги е емулгиран с бисмут-базиран уплътнител (*Orbeseal*) и действието му е тествано в течна среда на растеж. Използвайки доза $1,6 \times 10^3$ cfu/ml от бактериален щам, фаговата суспензия при концентрация 10^9 е успяла 6кратно да намали бактериалния растеж съответно с 5,40 и 2,80 логаритъма след 12 часа инкубация при физиологична температура.

Част от негативите, свързани с употреба на бактериофаги като терапия на мастит, включват факта че *Escherichia coli* е широко разпространен патоген в околната среда и щамове, изолирани от крави с мастит, са генетично разнообразни, дори от една и съща ферма (Moser et al., 2013). Не са установени специфични генетични маркери или фактори на вирулентност, които могат да разграничат щамове, предизвикващи мастит при крави от *E. coli* изолати от околната среда, и от мандрите (Wenz et al., 2006). Бактериофаги, които са изолирани с помощта на един клиничен щам, може да не са в състояние да инвазират различни полски щамове поради високата бактериална специфичност на гостоприемника.

Бактериофагите често се срещат в пробите от сурово мляко и могат да създадат проблеми за производителите на сирене и мляко, като заразят стартерните бактериални култури (Madera et al., 2004; Garcia et al., 2009). Въпреки че стафилококовият бактериофаг K е в състояние да инхибира растежа на *Staphylococcus aureus* в пастеризираното мляко, той не може да повлияе на растежа на бактериите в суровото мляко поради бактериалната аглутинация, която предотвратява свързването на фагите (O'Flaherty et al., 2005). Топлинно обработеното мляко инактивира суроватъчните протеини, което позволява на фагите да се свързват и да лизират *Staph. aureus* ефективно

(Gill et al., 2006). В заключение това проучване доказва потенциала на бактериофагите да елиминират *E. coli* в суровото мляко при температура от 25°C (McLean et al., 2013). Освен това резултатите показват, че бактериофагът може да лизира и инактивира *E. coli* в суровото мляко и значително да намали бактериалните титри след 12 часа инкубация при физиологична температура. Изглежда, че в сурово мляко бактериофагът взаимодейства с *E. coli* по различен начин, отколкото със *Staph. aureus*, което позволява на фагите ефективно да инхибират растежа на *E. coli*.

Потенциалните неблагоприятни последици от терапията с бактериофаги срещу *E. coli* в сухостойния период при крави все още не са изследвани задълбочено, затова преди провеждането на полеви клинични изпитвания трябва да се докаже, че превантивната употребата на препарат от бактериофаги е безопасна в сухостойния период при кравите и ги предпазва от експериментална инфекция с *E. coli*.

Schmelcher et al. (2015) изследва ендолизини λ SA2 и B30 от стрептококови фаги както *in vitro*, така и при мишки, при които е предизвикан мастит. И двата ендолизина имат почти **оптимална активност** при физико-химичните условия в кравето мляко. Ендолизинът λ SA2 **намалява количеството *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* и *Strep. uberis in vitro* в млякото на крави**, докато B30 лизинът е по-малко ефективен. При мишки, при които е бил индуциран мастит, **терапията с двата ензима води до намаляване на интрамамарните концентрации и на трите стрептококови вида**. Не е имало синергичен ефект на двата ензима *in vitro* при мишките с индуциран мастит.

Прекомерната употреба на антибиотици е основен проблем при лечението на говежди мастит и се очаква бактериофаговата терапия да осигури алтернативно лечение. Основната цел на проучване на тема „*Evaluation of phage therapy in the treatment of Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice*“ на Huijun Geng & Wei Zou & Meixia Zhang & Le Xu & Fanming Liu & Xiaoyu Li & Lili Wang & Yongping Xu е да се оцени ефикасността на фаговата терапия срещу мастит в експериментални животни (мишки). Първо, щамът *Staphylococcus aureus* е изолиран от млечни проби, взети от крави с мастит от стопанства в Синцзян, Китай, и е определен като **Sau-XJ-21**. След това, два фага (определени като **vBSM-A1** и **vBSP-A2**) със силна литична активност срещу **Sau-XJ-21** са изолирани от смесени проби от отпадни води, взети от три животновъдни стопанства в Синцзян. Фагите vBSM-A1 и vBSP-A2 принадлежат съответно към семейства *Myoviridae* и *Podoviridae*. Двата фага показват **широка специфичност към гостоприемници**, особено фаги vBSM-A1. За да се оцени ефективността на двата фага в лечението срещу мастит, женските мишки са третирани с фагова терапия 10-14 дни след раждането. Мишките са разделени на шест групи: една група служи като контрола, докато останалите пет групи са инокулирани с изолирания щам на *S. aureus* за индуциране на мастит. Четири часа след бактериалната инокулация мишките в тези групи са инжектирани с 25 μ L фосфатен буферен разтвор (отрицателна контрола), цефтиофур натрий (положителна контрола) или бактериофаги поотделно или като суспензия. Мишките са умъртвени 20 часа по-късно, а млечните жлези са отстранени и подложени на по-нататъшен анализ, включително количествено определяне на колон образувачи единици (CFU), плака образувачи единици (PFU) и макроскопско изпитване, както и

хистопатологично наблюдение. Мишките от групите с индуциран мастит проявяват характерната патология и **понижен бактериален брой, след като са били подложени на фагово лечение**, като **фаговата суспензия показва по-добър резултат от терапията с отделни бактериофаги**. **Ефективността на фаговата суспензия е сравнима с тази от приложението на цефтиофур натрий**. Данните, получени от експериментално предизвикания мастит при мишки, сочат че **фаговата терапия може да се разглежда като иновативна алтернатива на антибиотиците за лечение на мастит при говеда**. Полученият резултат предполага, че фаготерапията може да има голям потенциал за лечение на мастит при крави.

Щамът *Staphylococcus aureus* Sau-XJ-21, е изолиран от проби от мляко на крави с мастит, отглеждани в животновъдна ферма в Синцзян (2016 г.). Идентичността на тези бактерии е потвърдена от автоматизирания инструмент *VITEK® 2 COMPACT* за тестване на ID/AST (*Biomerieux*).

Проби от отпадни води са взети от три животновъдни стопанства в Синцзян. Пробите са комбинирани и използвани за изолиране на фаги, както е описано по-горе, но с малки модификации (*Kim, Ryu 2011*). Фаговата морфология е изследвана чрез трансмисионна електронна микроскопия (*TEM*). Способността на изолираните фаги да инфектират и лизират щамове *S. aureus*, се тества по метода, описан от *Kutter et al.(2010)*. За да се определи количествено степента на клетъчното лизиране, предизвикано от фагите, и инхибирането на растежа на изолирания щам *S. aureus* са приложени определени СОП (*Li et al.2016*). Фаговата суспензия в това проучване се състои от смес от двата фага в съотношение 1:1.

Всички опити с животни са проведени в съответствие с общопризнатите насоки за хуманно отношение към животните (Министерство на науката и технологиите на Китай) и са доказани от Комитета по етика за хуманно отношение към животните и научни изследвания към Технологичния университет в Далиан (2019-040).

За експеримента с фаготерапията, от мишките след експозиция на *S. aureus* в продължение на 24 часа, са взети кръвни проби (1 ml). Сред всички кръвни показатели броят на белите кръвни клетки (*WBC*), броят на неутрофилните гранулоцити (*NE*) и броят на лимфоцитите (*LY*) са избрани като показатели за анализ при последващи експерименти.

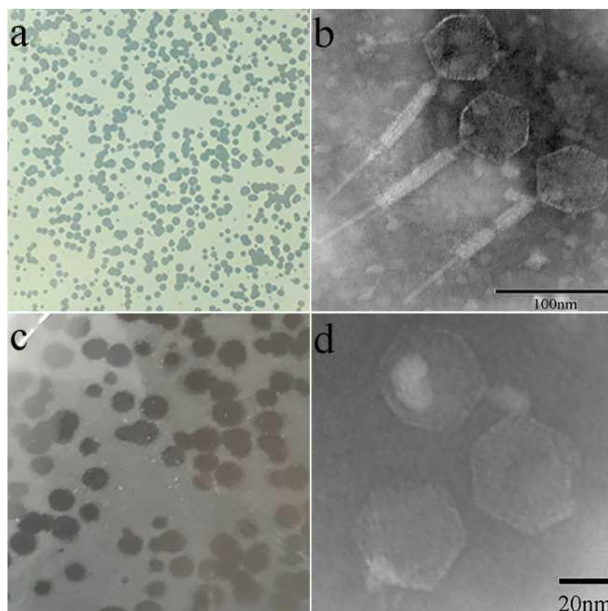
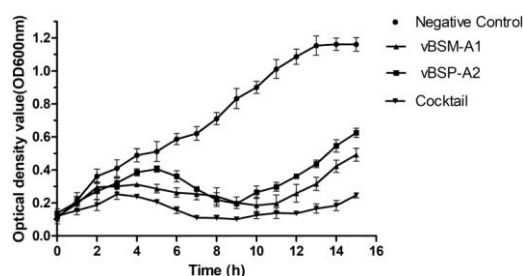
Бактериалните колонии (*CFU*) са преброени и трансформирани в базови 10 логаритмични стойности ($\log_{10}$). За трите групи, на които е приложена фагова терапия, фаговият титър (*PFU*) в тъканната проба от млечните жлези също е определен и трансформиран в $\log_{10}$ стойности.

Направена е също и хистопатологична оценка на тъканите на млечната жлеза посредством парафинови срезове. Всяка проба е изследвана за наличие на некроза, полиморфонуклеарно неутрофилно възпаление (т.е. неутрофилно възпаление) и лимфоцитно възпаление.

Данните са анализирани чрез дисперсионен анализ (*ANOVA - Analysis of variance*), използвайки *Prism 5.0*. Значителни разлики са открити с помощта на теста за множество сравнение на *Tukey*. Статистическата значимост е взета предвид на ниво $P < 0.001$ или $P < 0.05$, а резултатите са изразени като средна стойност $\pm$ S.E. (стандартна грешка).

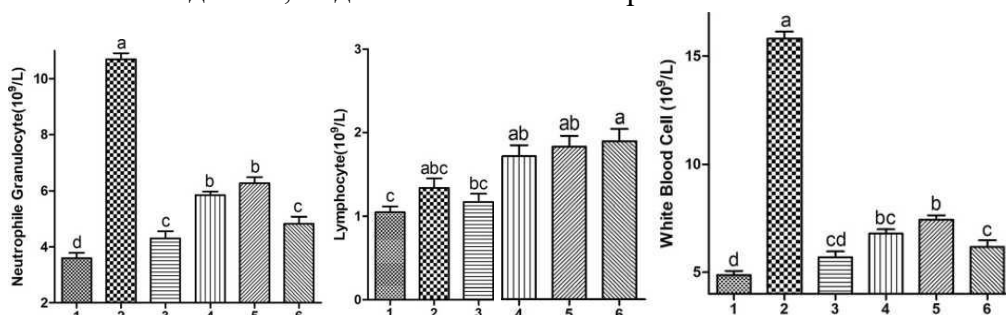
В заключение, двата фага произвеждат ясни плаки, което показва потенциалът им за инвазия на патогенния *Sau-XJ-21*. Гамата гостоприемници на двата фага също е оценена чрез тестване на способността им да инвазират други бактерии освен щама *S. aureus*, с цел потвърждение на ефективността на фаговата терапия. Бактериофаг *vBSP-A2* може да причини лизис на 16 от изследваните щамове на 27 *S. aureus* (15 от говеда и 1 от хора), докато *vBSM-A1* може да причини лизис на 23 от тези щамове на *S. aureus* (19 изолата от говеда и 4 - от човек). И двата фага могат да причинят лизис на *S. aureus* от млекодайки крави, отглеждани в различни региони, включително Синцзян, Далиан и *Zhejiang*. Като цяло, двата фага могат да заразят широк спектър от гостоприемници, особено фаги *vBSM-A1*.

Три часа след инфекцията бактериалните култури, инвазирани от един от двата фага при *MOI* от 10, започват да показват значително ($P < 0.05$) намаляване на оптичната плътност (OD_{600}) в сравнение с контролната неинвазирана култура. Намаляването на OD_{600} в култури, инокулирани с *vBSM-A1*, *vBSP-A2*, и суспензия от двата фага започва съответно на 5, 6 или 4-тия час. За културите, заразени с *vBSM-A1* и *vBSP-A2*, OD_{600} се увеличава съответно на 11 и 10 часа. Липсата на увеличение на OD_{600} след продължителна инкубация показва, че суспензията от бактериофаги е по-ефективна за инхибиране на растежа на *Sau-XJ-21*.



Фиг. 6. Морфология на двата фагови вида, изолирани от проби от отпадни води, взети от ферми за едър рогат добитък в Синцзян и оптичната плътност измерена преди и след фаговата терапия.

Резултатите от кръвните тестове са показали значително увеличение на броя на левкоцитите при мишки с индуциран мастит, които не са подложени на лечение. Средният брой на WBC в тази група е повече от 3 пъти по-голям от този на здравата контролна група мишки. Мишки с индуциран мастит, които са лекувани с цефтиофур натрий или бактериофаги (индивидуално или в суспензия), показват значително намаляване на броя на левкоцитите в сравнение с тези, на които не е прилагано лечение, въпреки че средният им брой на WBC остава по-висок от средния брой на WBC за здравата група. Сред групите, подложени на фагова терапия, групата, третирана с комбинирана суспензия от бактериофаги vBSM-A1 и vBSP-A2, води до най-голямо намаление на броя на WBC, последвано от vBSM-A1- и vBSP-A2- третирани групи, което предполага, че **прилагането на фагова суспензия има по-голям ефект върху заболяването, отколкото само един от двата фага**. Данните за нивата на неутрофилите (NE) показват тенденция, подобна на тази на WBC. При всички групи с индуциран мастит не е наблюдавана значима разлика в броя на LY между нетретираната група и някоя от другите третирани групи. Въпреки това, броят на LY във всички групи, лекувани с фаги, е значително по-висок от този на здравата контролна група, което предполага, че фагите може да са предизвикали имунен отговор и са необходими допълнителни изследвания, за да се изясни този въпрос.



Фиг. 7: Сравнение на избраните кръвни тестови параметри при различни групи мишки. (1) Здрава контролна група, (2) индуциран мастит + PBS, (3) мастит + терапия с цефтиофур натрий, (4) мастит + терапия с vBSM-A1, (5) мастит + терапия с vBSP-A2 и (6) мастит + терапия с фагова суспензия.

Групата на мастит плюс PBS има средно бактериално натоварване от $8,3 \log_{10}$ CFU на грам жлезна тъкан за 24 часа след бактериалното инокулиране. За разлика от това, групата мишки с лечение с цефтиофур натрий има бактериално натоварване от $2,2 \log_{10}$ CFU/g. По същия начин групите, които са лекувани с бактериофаги, показват също така значително ($P < 0,001$) по-ниско бактериално натоварване спрямо групата, третирана с PBS, съответно с 4,9, 6.0 и $3,5 \log_{10}$ CFU/g за групите, третирани с vBSM-A1, vBSP-A2, и комбинирана терапия със суспензия от vBSM-A1/vBSP-A2.

В сравнение с групата, служеща за отрицателна контрола, всички групи, които са получили лечение, показват забележително понижение на нивата на TNF-а и IL-113 в тъканите на млечните жлези, като групата, третирана с цефтиофур натрий, показва най-значимото намаление. Сред групите, третирани с фаги, групата, третирана със суспензия

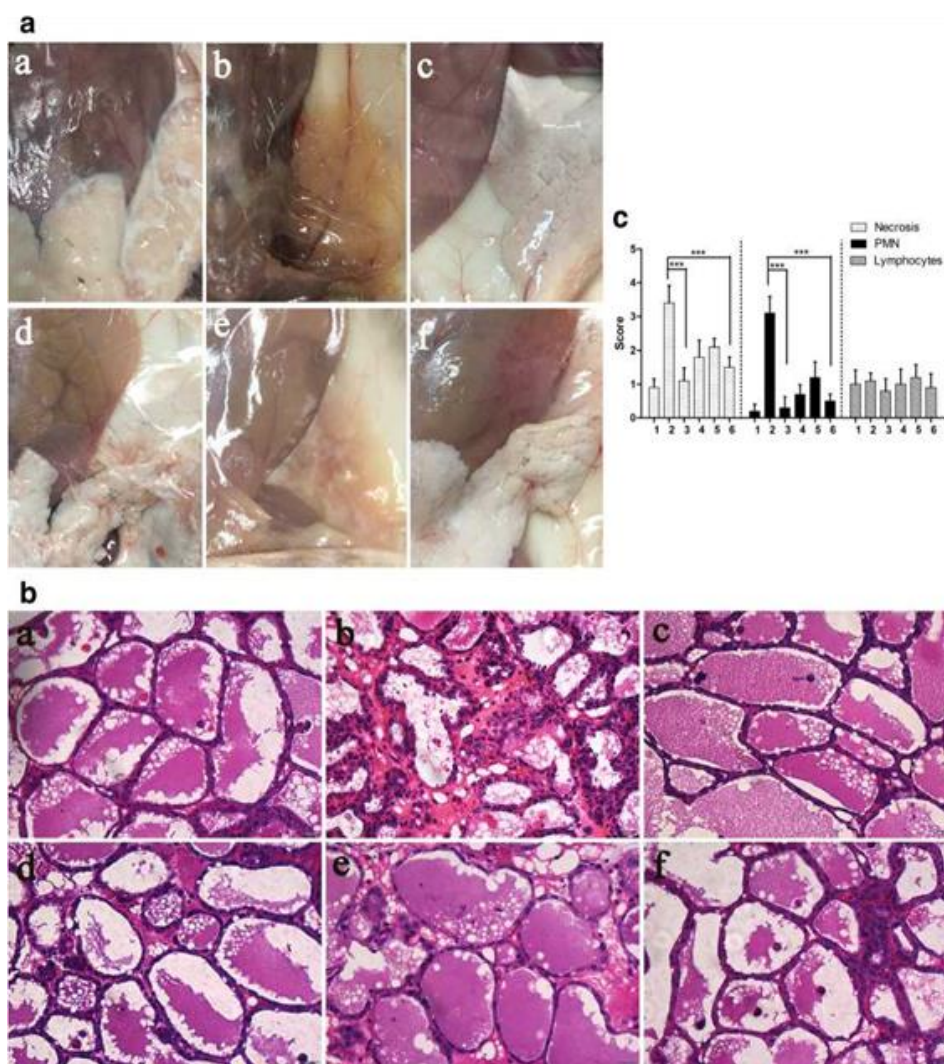
от *vBSM-A1* и *vBSP-A2*, води до по-голямо намаление, последвано от *vBSM-A1*- и *vBSP-A2*- групите, което предполага, че суспензията от *vBSM-A1* и *vBSP-A2* има по-голям ефект върху мастита, отколкото самостоятелната терапия с фагите.

След инжектирането на *Sau-XJ-21* в млечните жлези, заразените мишки са развили типични клинични симптоми на мастит. Груба инспекция на млечните жлези на тези мишки показва зачервяване, а жлезите са хиперемични и подути, показателно за наличието на тежка локална възпалителна реакция. **За разлика от тях, млечните жлези на заразените мишки, които са получили лечение с цефтиофур натрий или фагова суспензия, изглеждат сходни с млечните жлези на здрави мишки, без видими признаци на възпаление или други патологични изменения.** Самостоятелното прилагане на *vBSM-A1* или *vBSP-A2* също частично е облекчила зачервяването и подуването на млечните жлези.

Тъканните участъци на млечната жлеза от здрави (група 1) мишки показват нормални здрави тъкани без патологични изменения. За контраст, млечните жлези на мишките с индуциран мастит (група 2) показват множество локални микроабсцеси, придружени от ексудати в паренхима с пълно нарушаване на млечната жлеза. Епителните клетки са некротични. Мишки с индуциран мастит, които са лекувани с цефтиофур натрий (група 3), показват нормална структура на млечните жлези. Няма възпалителна реакция, освен при подкожната мастна тъкан и мускулната тъкан. Броя на неутрофилите е малък, а лимфоцитното възпаление е минимално. В сравнение с нетретирани мишки, **тъканите на млечната жлеза на мишките от всички третирани с фаги групи показват относително по-малко патологични изменения,** особено от групата, лекувана с фагова суспензия. Тези опитни животни, които са подложени на фагова терапия със суспензия от фаги показва много по-здрави жлези и епителни клетки, намалена е и инфилтрацията на възпалителни клетки (*Duarte et al.2018; Iwano et al.2018*).

Дали лечението с фаги може да облекчи увреждането, причинено от мастит, е допълнително проучено чрез хистопатологична оценка на млечните жлези. Сред мишките, които са имали мастит, нелекуваната контролна група показва умерена некроза и най-високата полиморфонуклеарна (PMN) неутрофилна възпалителна мутация. Групата, третирана с цефтиофур натрий, не показва значително намаляване на концентрацията на лимфоцити в млечните жлези в сравнение с групата, третирана с *PBS*, като се наблюдава и по-ниско ниво на некроза и полиморфонуклеарни клетки (PMN). Що се отнася до групата, която е третирана с **фагова суспензия, животните нямат некроза** в сравнение с групата, третирана с *PBS*. Тази група също така има **значително по-ниски нива на неутрофилите, леко до умерено лимфоцитно възпаление.** И двете групи на монофагово лечение показват по-слаба степен на некроза и добри нива на PMN в сравнение с нелекуваната група.

Всички горепосочени резултати показват, че фаговата суспензия е по-ефективна терапия от самостоятелното фагово лечение за потискане на симптомите на мастит при мишки, експериментално заразени със *Sau-XJ-21*.



Фиг. 8: Микроскопски препарати и хистопатологично наблюдение, снимки от тъканни проби, взети от всички групи животни

Това проучване с двата литични бактериофаги (vBSM-A1 и vBSP-A2) предоставят **убедителни доказателства за потенциалът на фаготерапията при лечението на говежди стафилококов мастит *in vitro* и *in vivo*.**

Мишките модели, използвани за експериментално индуциране на мастит са използвани успешно още през 1970 г. за първи път от *Chandler* и екип, които от тогава са се превърнали в стандартен модел за изследване на мастита при едри преживни животни, и за проследяване на промените в клиничните симптоми, патологичните състояния и нивата на цитокините. През последните години някои учени доказаха, че четвъртата и петата двойка млечни жлези при мишките са много сходни с тези при кравите (*Loessner 2005; Xiao 2015*). Мишките като експериментални животни показват същите патологични изменения и нива на цитокини като мишките с естествено придобит мастит (*Brouillette, Malouin 2005*).

В предходно проучване се съобщава за силно повишаване на TNF цитокините при индуциран от *S. aureus* мастит при мишки както и в нивата иРНК (*Li 2014*). Освен това, *TNF* и *IL-1 β* са многофункционални цитокини, които участват в клетъчната пролиферация, възпаление и локален имуен отговор (*Maskrey et al., 2011*) и се

използват за оценка на степента на възпалителната реакция в млечните жлези на мишки (*Tuchscher et al.*, 2005).

Известно е, че фагите са в симбиоза с бактериите и следват фармакокинетичен фармакодинамичен модел - хищник/храна (*Lenski, R. E. and B. R. Levin. 1985.; Kawa et al. 2012*), което означава, че фагите сами не може напълно да елиминират цялата популация на целевите патогенни бактерии в системата, както и антибиотиците, към които повечето патогенни бактерии са развили резистентност. **Клиничната полза от фагите се крие в способността им да намалят бактериалното натоварване на гостоприемника** до такава степен, че **имунната система на гостоприемника да може сама да елиминира останалата инфекция** (*Abedon et al. 2011; Kutter et al. 2010*). Чрез провеждане на CFU тест, *Koen et al. (2017)* отбелязва, че лечението с фаги не е в състояние да постигне същата ефективност като тази, получена при лечение с цефтиофур натрий, но е наблюдавано подобрение на клиничния резултат при мишки, третирани с фагова суспензия. Прилагането на **фагова терапия може да намали растежа на бактериите в засегнатото животно** до определено ниво, но не може изцяло да премахне бактериалната популация. Многократното прилагане на фаговата терапия може допълнително да намали бактериалната популация, но все още са необходими допълнителни изпитвания с цел повишаване ефективността на фаговата терапия за лечение на мастит, като методът на приложение на фаговата терапия трябва да бъде също допълнително проучен. При последващи експерименти може да се окаже, че е необходимо комбинирано лечение или удължаване времето на фаговата терапия или увеличаване честотата на терапевтичните дози.

В проучване на *Scholte et. al. (2018)* на тема: “*Recombinant bacteriophage endolysin PlyC is nontoxic and does not alter blood neutrophil oxidative response in lactating dairy cows*” е изследван ефекта на специфичния за стрептококи рекомбинантен **C1 фагов ендолизин (PlyC** - мощна пептидогликанова хидролаза), причиняващ целенасочен лизис на клетъчната стена на *Streptococcus uberis* при говеда *in vitro*. При концентрация от 1.0 µg/mL, рекомбинантният **PlyC може да индуцира литична активност**, което предполага, че ниска доза може успешно да елиминира инфекцията. В това проучване е направена оценка доза-ефект на **PlyC (1-50 µg/mL)** върху цитотоксичността и окислителния отговор върху полиморфно-ядрените левкоцити в говежда кръв (*PMN*), взета от 12 здрави крави, млечно направление. След инкубация на 0,5 и 2 часа, цитотоксичността се определя чрез измерване на освобождаването на лактат дехидрогеназа от изолирани клетки. Оксидативната реакция се характеризира като интензитет на хемилуминесценция, получена при взаимодействието на реактивни кислородни форми, генерирани в отговор на 0 или 1,6 µg/mL от форбол 12-миристен-13-ацетат (*РМА*) с луминесцентен субстрат със и без добавяне на **PlyC** към инкубационната матрица. Цитотоксичността на **PlyC** не се влияе от концентрации до 50 µg/mL. Както се очаква, цитотоксичността на **PlyC** върху *PMN* варира във времето на инкубация, измерена при 2 часа инкубация в сравнение с 0,5 часа и се дължи предимно на краткия живот на *PMN ex vivo*. Концентрациите на **PlyC** до 50 µg/mL не повлияват окислителния отговор; окислителният отговор обаче се влияе от времето на инкубация и концентрацията на *РМА*. Ендолизинът **PlyC** не е имал цитотоксичен ефект и не е повлиял

оксидативния отговор на говеждите кръвни полиморфно-ядрени левкоцити (PMN). В обобщение, **различните дози PlyC са нетоксични**. Тези ранни наблюдения в това проучване подкрепят работата по приложението на ендолизините и бактериофагите като алтернатива на антибиотиците в борбата с мастита при крави.

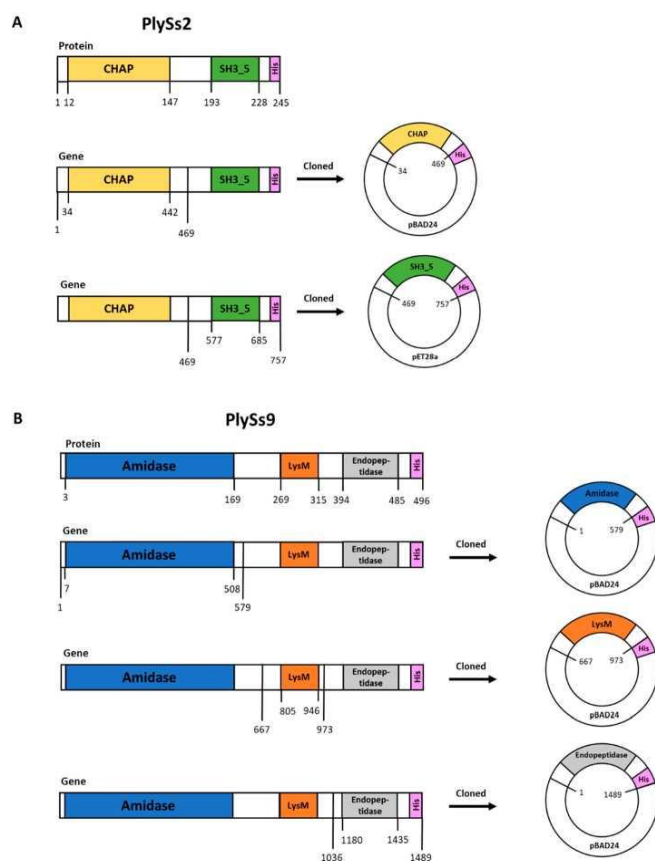
Lorena Rodríguez-Rubio et. al. (2016) в проучването си на тема: “*Artilycation*’ of endolysin λ Sa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci” дава още едно доказателство за **положителния ефект на ендолизините и фаговата терапия в борбата с мастита и метрита при крави**. В проучването се съобщава, че **броя на *Strep. agalactiae* в резултат на лечение с Art-240 е намалял**, като комбинацията от химерен протеин на анти-стрептококов ендолизин и поликатионен пептид, е приблизително два пъти по-ефективна от третирането с ендолизини от див тип.

Art-240 има същата специфичност като λ Sa2lys, но показва повишена бактерицидна активност. И за двата ендолизина λ Sa2lys и Art-240 е проследена специфичността на антибактериалната активност срещу колекция от 39 Грам-положителни и 5 Грам-отрицателни бактериални щамове. Спектърът на активност е сходен и за двата протеина при най-високата тествана концентрация (5 μ M). Всички тествани стрептококови видове (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. suis*, *S. porcinus*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* и *S. viridans*) и един щам *Staphylococcus epidermidis* са чувствителни, докато други Грам-положителни видове като *S. aureus* и *Enterococcus faecium* не са засегнати. Модифицирането не разширява литичната активност на ендолизин λ Sa2lys към Грам-отрицателни щамове *P. aeruginosa*, *E. coli* и *Salmonella*. **Модифицирането на ендолизин λ Sa2lys значително увеличава обаче антибактериалната активност срещу повечето от тестваните Грам-положителни щамове, причинявайки намаляване на жизнеспособността на бактериите с 0,5–1,5 log единици**. Например, Art-240 намалява броя на клетките на *S. agalactiae* LiCC S461 с $2,78 \pm 0,38$ log единици, докато намаляването с $1,56 \pm 0,21$ log единици е установено след обработка с λ Sa2lys; наблюдава се намаление от $2,83 \pm 0,29$ log единици в броя на клетките за *S. pyogenes* LiCC S271 в сравнение с $1,37 \pm 0,06$ log единици след обработка с λ Sa2lys и $2,43 \pm 0,32$ log единици в сравнение с $1,43 \pm 0,21$ log единици в случая на *S. uberis* LiCC S640. Ефектът на Art-240 и λ Sa2lys е подобен върху *S. aureus* LiCC S20 и той е най-висок при *S. aureus* в сравнение с други щамове *E. faecium*, *S. Typhimurium* и *E. Coli*.

В проучване на тема: „*Characterization of the Bacteriophage-Derived Endolysins PlySs2 and PlySs9 with In Vitro Lytic Activity against Bovine Mastitis Streptococcus uberis*“ на авторски колектив: *Niels Vander Elst, Sara B. Linden, Rob Lavigne, Evelyne Meyer, Yves Briers and Daniel C. Nelson*, изключително обстойно е описана отново **ролята и ползите от употребата на бактериофаги и техните ендолизини в борбата с мастита при говедата**. Маститът по говедата се причинява и от Грам-положителния патоген *Streptococcus uberis*, патоген, засегнат в настоящото проучване. Въпреки че добрите хигиенни практики по време на доенето намаляват честотата на стрептококовия мастит по говедата, пълното ликвидиране се оказва невъзможно. Допълнително приложени са и превантивни мерки като ваксиниране и пробиотици. Въпреки че тези мерки намаляват

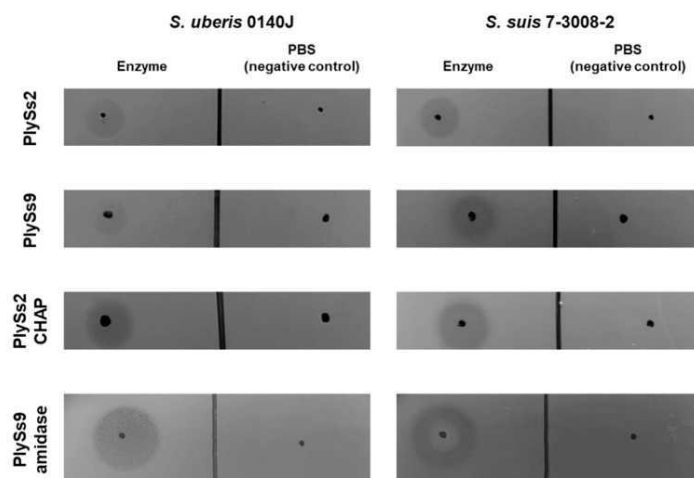
честотата на инфекциите, те не водят до елиминиране на заболяването. Следователно антибиотиците все още са основният превантивен и терапевтичен инструмент за мастит по говедата, което води до прекомерна употреба и антимикробна резистентност в млекопреработвателната промишленост, което стимулира търсенето на алтернативни решения.

Използването на бактериофаги (фаги) и техните литични ензими са предложени като стратегии, които могат да допълнят настоящия антибиотичен арсенал. Въпреки че фаготерапията първоначално се счита за обещаваща, по-скорошните прозрения разкриват няколко **оставащи препятствия**, т.е. **непредвидима фармакокинетика и -динамика, голям молекулен размер в сравнение с антибиотиците, слабо проникване в тъканите, тясна бактериална специфичност, необходимост от възпроизвеждане *in vivo*, повишаване на броя на соматичните клетки в кравето мляко и инактивиране на бактериофага с протеини от суроватката**. Въпреки това **ензимите, получени от фагите**, като деполимеразите и ендолизините **преодоляват тези проблеми**. Доказано е, че ендолизините, най-добре проучените пептидогликанови хидролази, получени от бактериофаги, успешно убиват бактериите *in vitro*, при различни животински модели и при хора. Следователно **ендолизините предлагат обещаващ потенциал в контекста на ветеринарната медицина**. По-конкретно, няколко ендолизина вече са предложени за приложение срещу Грам-положителни патогени, причиняващи мастит по говедата. В настоящото проучване два ендолизина, наречени ***PlySs2* и *PlySs9***, са показали **потенциални антимикробни характеристики срещу говеждия мастит**, причиняван от *S. uberis*. Известно е, че *PlySs2* показва широка литична активност срещу няколко стрептококи, т.е. *Streptococcus equi*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus pneumoniae* и група *E* стрептококи. Освен това литичната му активност е потвърдена при животински модел, показващ ликвидиране на *S. suis* при мишки с редукия с повече от 4 log. *PlySs9* ендолизин е в състояние да лизира *S. dysgalactiae* и *S. agalactiae in vitro* и неговата ефикасност и безопасност вече са предварително оценени *in vivo*.



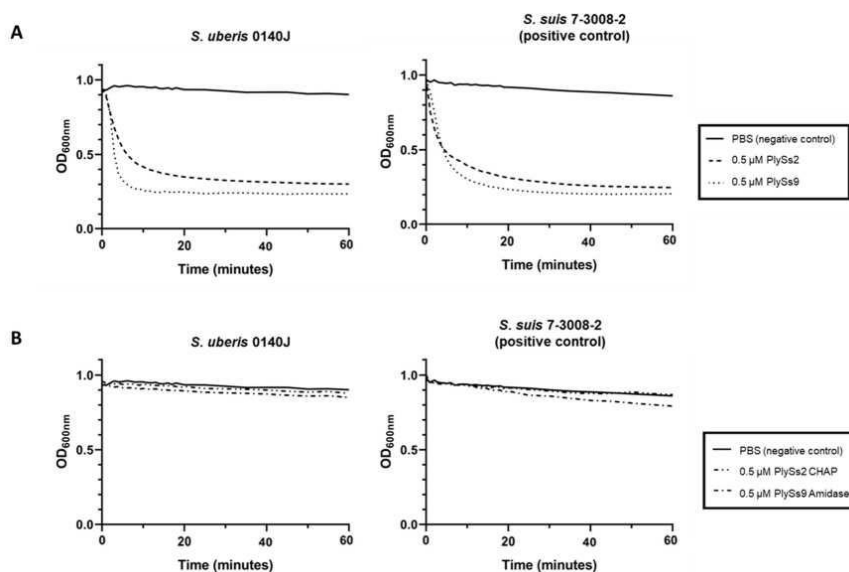
Фиг. 9: Схематично представяне на родителските *PlySs2* и *PlySs9*

За да се потвърди, че изразяването и пречистването както на родителските ендолизини, така и на техните каталитични поддомейни води до правилно нагънати и активни протеини, аналитичното изследване се извършва с *S. uberis*, както и с *S. suis*. Последният патоген е включен като положителна контрола, тъй като е гостоприемник на бактериофагите, от които са получени родителските ендолизини. ***PlySs2*, *PlySs9*, *PlySs2* CHAP и *PlySa9* амидаза всички дават ясни лизисни зони както за *S. uberis*, така и за положителната контрола**, докато в отрицателната контрола не се наблюдава лизис. Вzeti заедно, резултатите показват, че пълните ензими и каталитичните поддомейни са правилно нагънати.



Фиг. 10: Лизисни зони на PlySs2, PlySs9, PlySs2 CHAP и PlySa9 амидаза спрямо *S. Uberis* и *S. Suis*

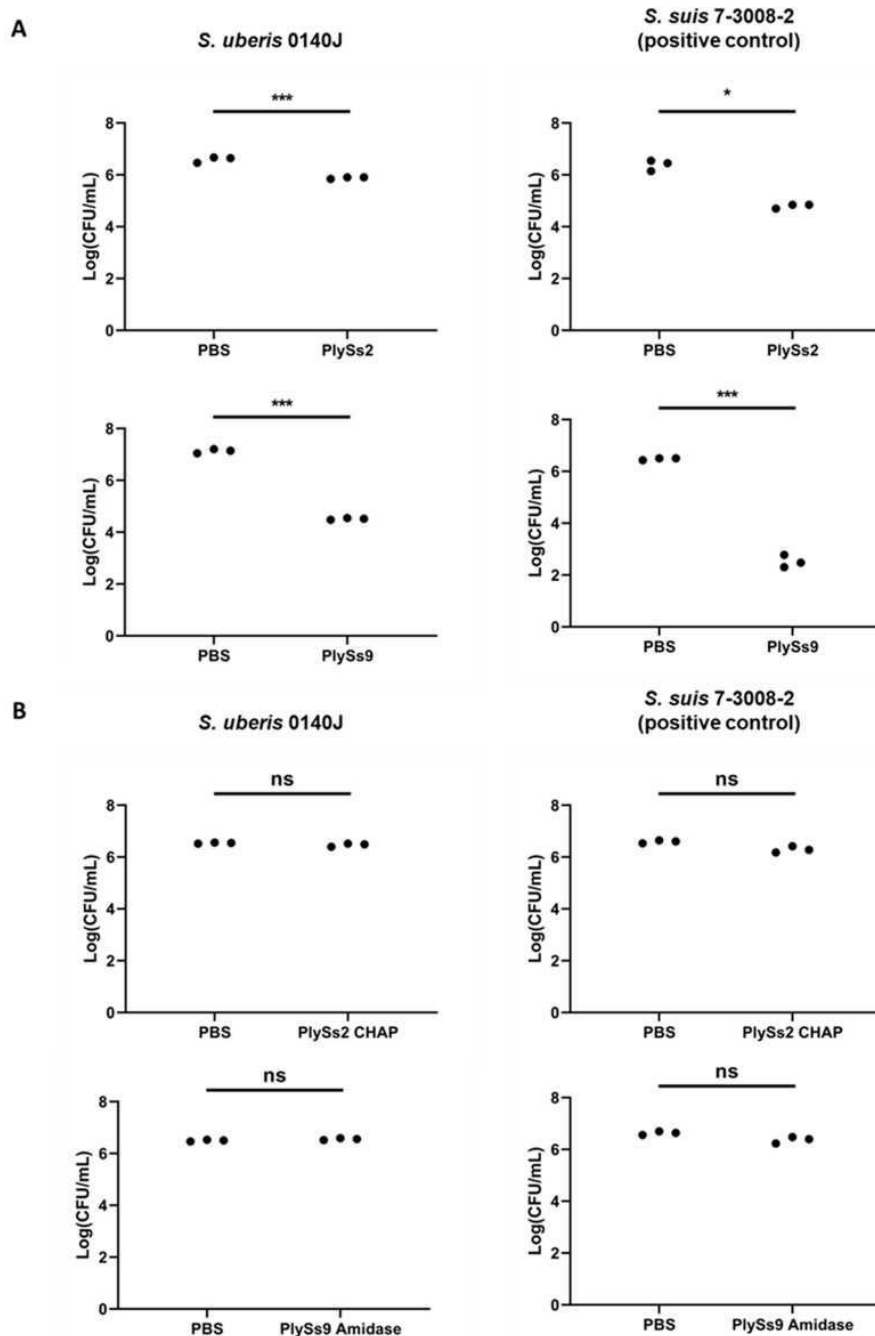
За да се определи количествено литичният капацитет на родителските ендолизини и техните каталитични поддомейни, към *S. uberis* са извършени TRA (turbidity reduction assays) тестове и тестове TKA (direct measure of bacterial cell death). *S. suis* отново служи като положителна контрола, докато бактериите в PBS отново служат като отрицателни контроли. При проведен TRA, при еквимоларни концентрации от 0,5 pM (съответстващи съответно на 13,45, 27,05, 8,60 и 10,90 gg/mL за PlySs2, PlySs9, PlySs2 CHAP и PlySs9 амидаза), **PlySs2 и PlySs9 предизвикват намаление на OD₆₀₀** (оптична плътност, измерена при 600 nm) за *S. uberis*.



Фиг. 11: Графики, отразяващи намаляване на оптичната плътност в резултат на 0,5gM PlySs2 и PlySs9 (A) и PlySs2 CHAP и PlySs9 амидаза (B) на *S. uberis* 0140J и *S. suis* 7-3008-2

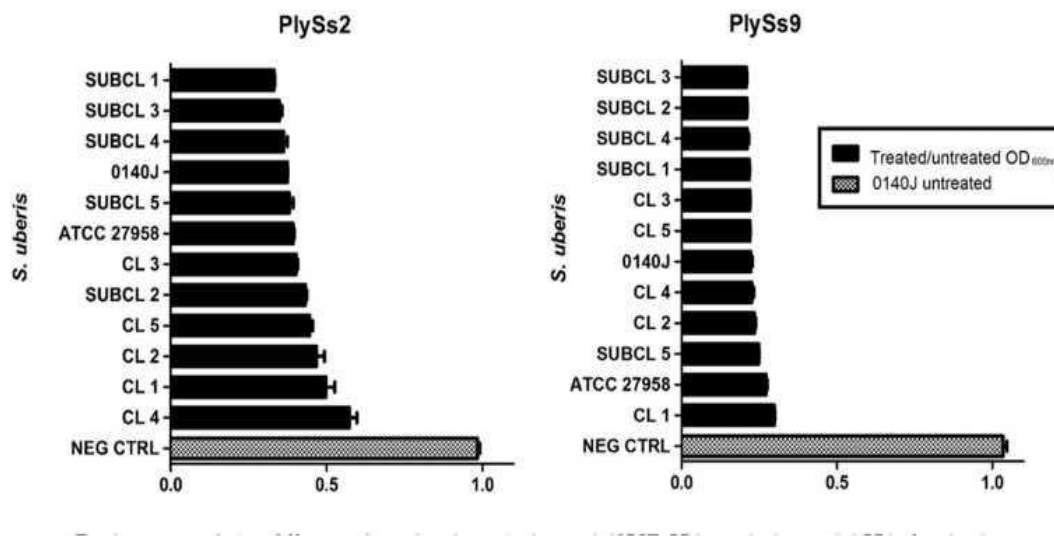
Направени са допълнителни TKA анализи, за да се оцени допълнително литичният капацитет на PlySs2 и PlySs9 при същите еквимоларни концентрации, както е описано за TRA. PlySs2 проявява литична активност и намалява с $1,09 \pm 0,37$ log популациите на *S. uberis*, PlySs9 проявява литична активност и намалява с $2.54 \pm 0,08$ log популацията на същия щам. За положителната контрола са наблюдавани сравними или по-високи литични капацитети, т.е. $1,36 \pm 0,25$ log за PlySs2 и $3,86 \pm 0,06$ log за PlySs9, съответно. Не е наблюдавано значително намаление при PlySs2 CHAP или PlySs9 амидаза. Освен това в положителната контрола не е наблюдавано намаляване на бактериалния брой.

Като трети количествен параметър е определена минималната инхибираща концентрация (MIC) както за родителските ендолизини, така и за техните каталитични области. Стойностите на MIC надвишават 5gM (съответстващи съответно на 86, 109 и 134,5 gg/ml за PlySs2 CHAP, PlySs9 амидаза и PlySs2), докато PlySs9 MIC е значително по-ниска, т.е. $0,48 \pm 0,16$ gM (съответстваща на $26,17 \pm 8,80$ gg/ml). Само PlySs9 е дал наблюдаем MIC в рамките на изпитваните концентрации.



Фиг. 12: Тестове с PlyS2 и PlySs9 (A) и PlySs2 CHAP и PlySs9 амидаза (B) за 2 часа при 37°C за *S. uberis* 0140J. *S. suis* 7-3008-2 служи като положителна контрола и бактериите в PBS са включени като отрицателни контроли

Щамове *S. uberis* 0140J са допълнително изпитани чрез MALDI-TOF. Всички щамове са податливи както на PlySs2, така и на PlySs9, както е показано от намаляването на OD₆₀₀.



Фиг. 13: *S. uberis* 0140J инкубиран в PBS служи като отрицателна контрола. Наблюдаваното намаление при OD₆₀₀ отново е най- високо за PlySs9 при всички изследвани щамове *S. uberis*.

Маститът по говедата е видно най-често срещаното производствено заболяване в млечната промишленост и често се причинява от патогена *S. uberis*. Предложени са няколко превантивни, профилактични и терапевтични мерки за борба с това инфекциозно заболяване, но антибиотиците понастоящем остават стандартното антимикробно превантивно и терапевтично лечение. Тази систематична (свръх) употреба на антибиотици в сектора на млякото и млечните продукти се поставя под въпрос и като такава, затова ендолизините са предложени като заместваща или допълваща стратегия. **И двата ендолизина PlySs2 и PlySs9, показват активност срещу всички щамове на *S. uberis* група, причиняваща мастит при говедата.** Изследването посредством методи като TRA, TKA и определянето на MIC са използвани за доказване на антимикробната активност на ендолизините. PlySs2 CHAP и PlySs9 амидазата показват значителна литична зона при проведените тестове.

Молекулярните методи, които са приложени за охарактеризиране на PlySs2 и PlySs9 в техните отделни каталитични области и CBD идентифицира каталитичните поддомейни като такива с недостатъчна литична активност към *S. uberis* в сравнение с техните родителски ендолизини. Предполага се, че наличието на каталитични поддомейни най-вероятно е необходимост за оптималното свързване с бактериалната клетъчна стена на *S. uberis*.

В заключение, **PlySs2 и PlySs9 имат *in vitro* добра литична активност срещу редица клинични и субклинични щамове на говежда *S. Uberis*, предизвикващ мастит.** Взети заедно, тези данни от проучването оправдават използването на PlySs2 и PlySs9, както и техните поддомейни като кандидати за нови антимикробни средства срещу говеждия мастит, причинен от *S. uberis*.

Как да бъде използвана фаговата терапия за постигане на най-добър терапевтичен ефект е един от текущите изследователски приоритети (Abedon 2017).

Други проучвания показват, че титърът на фаговите частици може да намалее *in vivo*, което често се дължи на активирането на адаптивния имунитет и са необходими допълнителни проучвания в това направление (някои автори предлагат увеличаване на дозата фагови частици при терапията, с цел да се компенсират неутрализираните от антителата фагови частици) (Abedon, Thomas 2010).

Поради разпространението на мултирезистентни бактерии (Sidjabat et al. 2011), съществува спешна необходимост от нови терапевтични агенти, които са насочени срещу такива патогени. **Фагите се считат за нови алтернативни агенти, защото работят чрез различни механизми в сравнение с антибиотиците (Hermoso et al., 2007).** В клиничните изпитвания препаратите, съдържащи бактериофаги, могат да се използват самостоятелно или като допълнение към традиционната антибиотична терапия докато не бъдат изчистени негативите, свързани с фаговата терапия.

Клинични проучвания *in vivo* за ефективността на бактериофагите и фаговите ендолизини при терапия на мастит при крави

Има само няколко проучвания относно клиничното приложение на бактериофаги и свързаните с тях ендолизини за лечение или профилактика на мастит при говеда. Lerondelle u Poutrel (1980) лекуват 24 крави, диагностицирани със стафилококов мастит, с различни дози (8 x 10¹⁰, 17 x 10¹⁰ и 54 x 10¹⁴ PFU = плака образувачи единици) от поливалентен **бактериофаг К** един или два пъти и няма потискащи бактериологични ефекти.

Gill et al. (2006a) е оценил ефективността на фаговата терапия за контрол на мастит по време на лактационния период на промишлени стада крави. Приложено е лечение на 24 крави със субклиничен мастит в резултат на *Staph. aureus* инфекция посредством интрамамарни инфузии на литичен бактериофаг К (1,25x10¹¹ PFU) или физиологичен разтвор, прилаган веднъж дневно в продължение на 5 дни. Ефикасността на лечението е малка. Има само 16,7%, при които лечението с бактериофаг К е бактериологично ефективно след 4 седмици приложение. Ефектите от интрамамарна инфузия на фаги в млечната жлеза на кравите също са проучени.

За разлика от констатациите на O'Flaherty et al. (2005a), след еднофагова инфузия при лактиращи крави без мастит, се наблюдава голямо увеличение на броя на млечните соматични клетки. Открити са жизнеспособни фаги в млякото, събирано след инфузия с фаги за период до 36 часа, което е и един от негативните ефекти на фаговата терапия и подлежи на допълнителни проучвания.

Fan et al. (2016) в своето проучване лекува крави, диагностицирани с лек мастит, с 20 mg **ендолизин Trx-SA1** веднъж дневно в продължение на 3 дни. При повечето животни концентрациите на патогенни бактерии са намалели след лечение.

Две обстойни проучвания още, в подкрепа на фаговата терапия и доказване на благотворния и ефект върху животните с мастит, на авторски колектив: Oudessa Kerro Dego, Paulina A. Pacha, Barbara E. Gillespie u Gina M. Pighetti на тема: "Bovine Mastitis,

Control and Prevention of Mastitis” са свободно достъпни на следният линк:
<https://www.intechopen.com/books/animal-reproduction-in-veterinary-medicine/bovine-mastitis-part-i>

Бактериофаги за предотвратяване на метрит при крави

Освен многобройните проучвания върху ефективността на бактериофаговата терапия и терапията с ендолизини като алтернатива на антибиотичната терапия при мастит, ефективността на бактериофагите е подложен на тест *in vitro* срещу изолатите на *E. coli* от матката на крави със следродилан метрит.

Има само няколко проучвания, при които ефикасността на фагите е оценена срещу *E. Coli*, предизвикваща пуерперален метрит при крави.

Bicalho *et al.* (2010) изолира 11 генетично разнообразни бактериофаги от торовата лагуна на две големи млечни ферми, като **тези бактериофаги са показали литична активност срещу изолатите на *E. coli***. Коктейлът от четири бактериофага има най-голяма антимикробна активност и **напълно инхибира растежа на 80% от 57-те изолати на *E. Coli***, изолирани от матката на млечно направление крави след раждането. Резултатите от втора част на това проучване (Santos *et al.*, 2010) сочат, че бактериофаговата суспензия има **значителен ефект върху антимикробната активност *in vitro* срещу резистентни *E. coli***. Доказано е, че съотношение от десет бактериофагови частици на бактериална клетка е ефективно за инхибиране на растежа на поне 50% от всички патогенни изолати. Двете части на проучването са достъпни на следните

адреси:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022030210702708?token=9F6AB415444DA38C17824E35A191B3B6D82FB852514A8F1BE06A805124E7D806038A2BAE0BC842022DEFDC605CF97FAB&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210706084618> и
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022030210702691?token=82697D22516075FFEA3CD7474ECC79CA8D6B9521EC579E50BB7D7E4AAC42277DEB1A69790F8643B5CB77FE5631266076&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210706084159>.

Въпреки че резултатите от *in vitro* проучванията показват, че има значителна антимикробна активност на бактериофаговата суспензия срещу вътрематочна *E. coli*, резултатите от *in vivo* проучванията показват, че няма особен ефект от терапията с бактериофаги за профилактика на това заболяване на матката при кравите. В проучване на Machado *et al.* (2012), е направена оценка на ефектите от вътрематочното приложение на този бактериофагов коктейл на 2 ± 1 дни след раждането в доза приблизително 10^7 PFU върху матката и репродуктивните показатели на 218 лактиращи млечни крави със специфичен фокус върху *E. coli* и *A. pyogenes*. Лечението не е ефективно за профилактика на метрит и ендометриоза. Вътрематочното приложение на бактериофаги не е повлияло възстановяването на матката, репродуктивните показатели или растежа на бактериалните култури *E. coli* и *A. pyogenes*. Отсъствието на положителен ефект и повлияване на тези бактериални щамове от бактериофаговата терапия, според авторите, може да се дължи на неправилно планирано лечение или на неадекватна приложена доза. Поради това Meira *et al.* 2013 са извършили подобно проучване, като лекуват кравите с

много по-голяма доза бактериофаги. Бактериофаговата суспензия, включва десет различни фага в лизат, с титър приблизително 10^9 PFU, като суспензията се прилага на 230, 260 и 275 дни от бременността. За съжаление, тази терапия е довела до голямо увеличение на честотата на задържана плацента и метрит. Няма разлика между лекуваната и контролната групи по отношение на броя на животните с положителни култури за *E. coli*.

Ограничения на бактериофагите за терапия на мастит и метрит при крави

Има няколко ограничаващи фактора, водещи до липса на ефективност на бактериофагите при лечението на мастит и метрит при кравите. Проблемът с фаговата терапия е голямата специфичност на бактериофагите спрямо гостоприемниците им. Фагите са навсякъде в околната среда и изборът на терапевтични фаги е от първостепенно значение за ефикасността при лечението на мастит и метрит при крави, млечно направление. Фагите, които са изолирани с помощта на един клиничен щам, може да нямат специфична инвазивност към различни полски щамове. Повечето фаги са насочени само към специфични подтипове в даден вид, серовар или серогрупа. Следователно, фаговите суспензии са необходими за увеличаване на обхвата на специфичност или специфичният патогенен агент трябва да бъде изолиран предварително и след това да бъде тестван за неговата фагова чувствителност (Nilsson, 2014). Фагите често намаляват само броя на бактериите и не елиминират популациите от патогенни бактерии (Gill et al., 2006a; Porter et al., 2016). Фагите са ефективни само ако достатъчно количество от тях могат да взаимодействат с патогенните целеви бактерии и ако има увеличение на броя на фагите *in situ*. В суровото мляко фаговото свързване с клетъчните повърхности на *S. aureus* е инхибирано поради образуването на бактериални кълстери, свързани с мастните глобули (O'Flaherty et al., 2005b). Разтворимите протеини в суроватката, главно IgG, са отговорни за образуването на агрегация (Gill et al., 2006b; Tanji et al., 2015). Gill et al. (2006a) съобщава, че е налице голям процент разграждане или инактивиране на инфузияния фагов коктейл или отделни фаги в млечната жлеза.

По отношение на метрит, предположението на Meira et al (2013) е, че лизатът съдържа бактериални продукти и фрагменти, особено липополизахариди (LPS), които биха могли да предизвикат свръхстимулация на рецептора-4 (TLR4)-хемокин, водещ до по-малък имунен отговор. LPS, присъстващ в бактериофаговия лизат, може също да има подтискаща функция на неутрофилите.

Съществуват и други опасения при прилагането на препарати на базата на фаги. Използването на фаги в интензивни търговски производствени предприятия крие рискове, свързани с потенциалния подбор на фагоустойчиви бактериални щамове като последица от фаговата терапия. Съобщава се вече за поява на фагоустойчиви бактериални варианти след фагова терапия (Oechslein, 2018). Възможно е и увеличаване на медираната от плазмиди антибиотична резистентност след фаготерапия. След лизис на бактериите, плазмидните гени за устойчивост на антибиотици, могат да бъдат прехвърлени на бактерии, които не са били засегнати от лечението с фаги (Colavecchio et al., 2017).

Заклучение

В заключение, резултатите от многобройни проучвания *in vitro* и при мишки, при които има индуциран мастит, **бактериофагите и ендолизините, имат обещаващ потенциал за контрол на мастит и метрит при кравите и са алтернатива на антибиотичното лечение на инфекции**, причинени от резистентни щамове патогенни бактерии. В малкото проведени клинични *in vivo* проучвания обаче има малка ефективност на бактериофагите за профилактика и лечение на мастит и метрит. Практическата полезност на фагите за тази цел е ограничена. На практика голямата специфичност на фаговия гостоприемник е основно ограничение за фаговата терапия. Необходими са повече клинични проучвания, за да се определи истинският потенциал на фагите и свързаните с тях ендолизини за профилактика и терапия на мастит и метрит при крави.

Проблемът обаче с антимикробната резистентност е огромен и продължава да расте предвид и пандемията от COVID-19 и предвид стандартната практика да се употребяват антибиотици от групата на азалидите в световен мащаб и в България за борба с вируса SARS-CoV-2 и предотвратяване на вторична бактериална инфекция и пневмония. Антимикробната резистентност е едно от най-големите предизвикателства пред съвременната хуманна и ветеринарна медицина. Поради факта, че управлението на COVID-19 е все по-зависимо от фармакологичните интервенции, рискът от развитието и разпространението на антимикробната резистентност е по-голям. Много проучвания в болнична среда разкриват **все по-голям ръст на труднолечими вътреболнични инфекции**, предизвикани от резистентни бактерии и **увеличаване на разнообразието на гени, отговорни за антимикробната резистентност.** Трябва да се отбележи, че тъй като повечето от тези антибиотични средства се използват и за други прицелни патогени, трябва **максимално да се ограничи употребата им превантивно в хуманната и ветеринарна медицина и да се работи в направление алтернативи на антимикробните средства каквито се явяват в случая бактериофагите и техните ендолизини.**

В заключение, и с оглед на нарастващия брой документирани проучвания и разработки, **фаговата терапия изглежда обещаваща алтернатива при лечението на някои бактериални инфекции, мултирезистентни или не.** Поради липсата на достатъчно данни от проведени клинични изпитвания, фагите в хуманната и ветеринарна медицина понастоящем се използват само в комплицирани случаи на пациенти, за които не съществува друга алтернативна терапия и винаги са придружени от антибиотично лечение. Възможностите за приложение обаче са обещаващи и многобройни и **е напълно възможно след време фаговите препарати да заместят напълно антибиотичното лечение.** Потенциалните приложения на бактериофагите надхвърлят значително приложението им само в хуманната и ветеринарната медицина, като са приложими и за биоконтрол и безопасност на храните (Mahony et al.,2011; Chan and Abedon,2015; Buttmer et al.,2017; Fernandez et al.,2018).

Изготвил:

Красимира Захариева, главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- *Susceptibility of Escherichia coli isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages Part I: Isolation and lytic activity estimation of bacteriophages* - R. C. Bicalho , T. M. A. Santos , R. O. Gilbert , L. S. Caixeta , L. M. Teixeira , M. L. S. Bicalho and V. S. Machado
- *Susceptibility of Escherichia coli isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages - Part II: In vitro antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics* - T. M. A. Santos , R. O. Gilbert , L. S. Caixeta , V. S. Machado , L. M. Teixeira and R. C. Bicalho
- *In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis* - J. Porter, J. Anderson, L. Carter, E. Donjacour, and M. Paros
- *Evaluation of phage therapy in the treatment of Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice* - Huijun Geng & Wei Zou & Meixia Zhang & Le Xu & Fanming Liu & Xiaoyu Li & Lili Wang & Yongping Xu
- *Bacteriophages and associated endolysins in therapy and prevention of mastitis and metritis in cows: Current knowledge* - Sławomir Zduńczyk, Tomasz Janowski
- *Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin* - David M. Donovan, Michelle Lardeo & Juli Foster-Frey
- *Association of milk microbiome in bovine clinical mastitis and their functional implications in cows in Bangladesh* - M. Nazmul Hoque¹, Arif Istiaq, Rebecca A. Clement, Munawar Sultana, Keith A. Crandall, AMAM Zonaed Siddiki, M. Anwar Hossain
- *Experimental Staphylococcus aureus Mastitis Infection Model by Teat Dipping in Bacterial Culture Suspension in Dairy Cows* - Oudessa Kerro Dego, Paulina A. Pacha, Barbara E. Gillespie and Gina M. Pighetti
- *Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care* - Michael J. Love, Dinesh Bhandari, Renwick C. J. Dobson and Craig Billington
- *Antimicrobial resistant bacteria in dairy cattle: A review* - January 2017 - Dr Sara Burgess, Prof Nigel French
- *Bovine Mastitis: Part I* - Oudessa Kerro Dego
- *Characterization of the Bacteriophage-Derived Endolysins PlySs2 and PlySs9 with In Vitro Lytic Activity against Bovine Mastitis Streptococcus uberis* - Niels Vander Elst, Sara B. Linden, Rob Lavigne, Evelyne Meyer, Yves Briers and Daniel C. Nelson
- *Control and Prevention of Mastitis: Part Two* - Oudessa Kerro Dego
- *Lytic bacteriophages as a potential alternative to control Staphylococcus aureus* - Juliana Almeida Leite, Hyago Passe Pereira, Cristiano Amâncio Vieira Borges, Bruna Rios Coelho Alves, Alessandra Isis Alves Pinheiro Ramos, Marta Fonseca Martins and Edna Froeder Arcuri
- *Efficacy of experimental phage therapies in livestock* - Marta Dec, Andrzej Wernicki and Renata Urban-Chmiel
- *Preliminary treatment of bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus, with trx-SA1, recombinant endolysin of S. aureus bacteriophage IME-SA*, Jindai Fana, Zhiliang Zenga, Kaijie Maia, Yu Yangb, Jiaqi Fenga, Yang Baia, Baoli Suna, Qingmei Xiea, Yigang Tongb, Jingyun Ma
- *Efficacy and Safety of a Bovine-Associated Staphylococcus aureus Phage Cocktail in a Murine Model of Mastitis* - Koen Breyne, Ryan W. Honaker, Zachary Hobbs, Manuela Richter, Maciej Zaczek, Taylor Spangler, Jonas Steenbrugge, Rebecca Lu, Anika Kinkhabwala, Bruno Marchon, Evelyne Meyer and Lucia Mokres

- *Staphylococcus aureus* Bacteriophage Suppresses LPS-Induced Inflammation in MAC-T Bovine Mammary Epithelial Cells - Lili Zhang, Xiang Hou, Lichang Sun, Tao He, Ruicheng Wei, Maoda Pang and Ran Wang
- Role of Bacteriophages in the Implementation of a Sustainable Dairy Chain - Diana Gutiérrez, Lucía Fernández, Ana Rodríguez and Pilar García
- Complete Genome Sequence of vB_EcoM-UFV13, a New Bacteriophage Able To Disrupt *Trueperella pyogenes* Biofilm - Vinicius S. Duarte, Roberto S. Dias, Andrew M. Kropinski, Pedro M. P. Vidigal, Flávia O. Sousa, André S. Xavier, Cynthia C. Silva, Sergio O. de Paula
- Isolation and characterization of a Myoviridae bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis - Jee Eun Han, Ji Hyung Kim, Sun Young Hwang, Casiano H. Choresca Jr., Sang Phil Shin, Jin Woo Jun, Ji Young Chai, Yong Ho Park, Se Chang Park
- The lytic activity of recombinant phage lysin LysKΔamidase against staphylococcal strains associated with bovine and human infections in the Jiangsu province of China - Yan Zhou, Hui Zhang, Hongduo Bao, Xiaomeng Wang, Ran Wang
- Chimeric Phage Lysins Act Synergistically with Lysostaphin To Kill Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* in Murine Mammary Glands - Mathias Schmelcher, Anne M. Powell, Stephen C. Becker, Mary J. Camp,b and David M. Donovan
- Antimicrobial Activity of a Phage Mixture and a Lactic Acid Bacterium against *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis - Isabel Titze and Volker Krömker
- 'Artilylation' of endolysin λSa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci - Lorena Rodríguez-Rubio, Wai-Ling Chang, Diana Gutiérrez, Rob Lavigne, Beatriz Martínez, Ana Rodriguez, Sander K. Govers, Abram Aertsen, Christine Hirl, Manfred Biebl, Yves Briers & Pilar García
- Triple-acting Lytic Enzyme Treatment of Drug-Resistant and Intracellular *Staphylococcus aureus* - Stephen C. Becker, Dwayne R. Roach, Vinita S. Chauhan, Yang Shen, Juli Foster-Frey, Anne M. Powell, Gary Bauchan, Richard A. Lease, Homan Mohammadi, William J. Harty, Chad Simmons, Mathias Schmelcher, Mary Camp, Shengli Dong, John R. Baker, Tamsin R. Sheen, Kelly S. Doran, David G. Pritchard, Raul A. Almeida, Daniel C. Nelson, Ian Marriott, Jean C. Lee & David M. Donovan
- Short communication: Recombinant bacteriophage endolysin PlyC is nontoxic and does not alter blood neutrophil oxidative response in lactating dairy cows - C. M. Scholte, D. C. Nelson, M. Garcia, S. B. Linden, T. H. Elsasser, S. Kahl, Y. Qu and K. M. Moyes
- The effect of intrauterine administration of mannose or bacteriophage on uterine health and fertility of dairy cows with special focus on *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* - V. S. Machado, M. L. S. Bicalho, R. V. Pereira, L. S. Caixeta, J. H. J. Bittar, G. Oikonomou , R. O. Gilbert and R. C. Bicalho
- USING CHITOSAN MICROPARTICLES TO TREAT METRITIS IN LACTATING DAIRY COWS – A THESIS OF EDUARDO BARROS DE OLIVEIRA
- https://corhv.government.bg/files/%d0%9d%d0%b0%d1%83%d1%87%d0%bd%d0%b8%20%d0%b8%d0%bd%d1%84%d0%be%d1%80%d0%bc%d0%b0%d1%86%d0%b8%d0%b8%20%d0%b8%20%d0%b0%d0%bd%d0%b0%d0%bb%d0%b8%d0%b7%d0%b8/03_Biologichni%20riskove/2020_07_09_Bacteriophages_role_in_poultry_production_BG_M_Vasileva.pdf
- <https://corhv.government.bg/%D0%94-%D1%80-%D0%9C%D0%90%D0%94%D0%9B%D0%95%D0%9D-%D0%92%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9B%D0%95%D0%92%D0%90-%D0%9A%D0%A0%D0%90%D0%A1%D0%98%D0%9C%D0%98%D0%A0%D0%90-%D0%97%D0%90%D0%A5%D0%90%D0%A0%D0%98%D0%95%D0%92%D0%90:->

[%D0%97%D0%B0-%D0%B8-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%B2-%D0%B8%D0%B7%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B7%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%BE-%D0%BD%D0%B0-%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B0%D0%B3%D0%B8-n-27-825](#)

- <https://corhv.government.bg/%D0%9A%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B0-%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%B2%D0%B0:-%E2%80%9E%D0%92%D0%B5%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BD%D0%B0%D1%80%D0%BD%D0%BE-%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D1%84%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%82%D0%B0-%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%BF%D0%B8%D1%8F-%D0%BF%D1%80%D0%B8-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%BD%D0%B8-n-27-1464>
- <https://corhv.government.bg/%D0%9A%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B0-%D0%97%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B5%D0%B2%D0%B0:-%D0%92%D1%8A%D0%B7%D0%BC%D0%BE%D0%B6%D0%BD%D0%BE-%D0%BB%D0%B8-%D0%B5-%D0%B1%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B0%D0%B3%D0%B8%D1%82%D0%B5-%D0%B4%D0%B0-%D1%81%D0%B0-%D0%BE%D1%82%D0%B3%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D1%80%D1%8A%D1%82-%D0%BD%D0%B0-%D0%BA%D1%80%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%82%D0%B0-n-27-1468>