

26. Wakabayashi H, Toyama T, Iida T. A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. Fish Pathol 1994; 29: 101-4.

## ABOUT THE PROSPECTS OF PHAGES-DIAGNOSTICS OF FLAVOBACTERIOSIS OF FISH

*Paramonova N.A., Viktorov D.A., Vasilev D.A., Zolotukhin S.N.*

**Key words:** *Flavobacterium psychrophilum*, bacterial cold-water fish disease, diagnosis, treatment, prevention, bacteriophages.

*The paper provides a review of the published data of national and foreign authors, the problem of diagnostics, treatment and prevention of bacterial cold-water fish disease caused by *Flavobacterium psychrophilum* is considered. The analysis points to the urgency of the development of methods phages-diagnostics and phagotherapy for the mentioned diseases of fish.*

УДК 619:616.98:579.842.14

## БАКТЕРИОФАГИ В БОРЬБЕ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ ПТИЦ

*Пименов Н.В., доктор биологических наук, доцент,  
ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины  
и биотехнологии имени К.И.Скрябина»,  
тел. 8(495)3778567, pimenov-nikolai@yandex.ru*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, сальмонеллез птиц, лечение, оздоровление, препарат*

*В работе изложены результаты исследований по выделению активных бактериофагов и созданию препарата против сальмонеллеза птиц. Создание бивалентного бактериофага на основе *Phagum Salmonella typhimurium* и *Phagum Salmonella enteritidis*, разработка технологии его биологического производства и успешная апробация фагового препарата открывают новые перспективы в противоэпизоотической борьбе с сальмонеллезом.*

**Введение.** Сальмонеллез птиц продолжает оставаться острой проблемой для ветеринарной и гуманитарной медицины. По заключению экспертов Всемирной организации здравоохранения сальмонеллез, как зоонозная инфекция, не имеет себе равных по сложности эпизоотологии, эпидемиологии и трудностям борьбы с ней. В последние годы произошел серьезный дрейф в сторону развития у полевых штаммов сальмонелл множественной резистентности к антибиотикам. Латентно больные птицы (например, дикие и домашние голуби) могут являться причиной распространения опасного возбудителя и расширения границ эпизоотического очага, что в серьезной степени увеличивает социальную опасность [1].

Проблема антибиотикорезистентности актуализирует проблему переориентирования медикаментозных подходов при лечении сальмонеллеза от использования химиотерапевтических групп препаратов к применению других эффективных и менее опасных групп. Такими являются препараты, приготовленные на основе бактериофагов [2].

**Материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение.** Для создания препарата бактериофагов против сальмонеллеза птиц нами по методу обогащения из сточных вод птицефабрик, пометных вод голубятен и зоопарков были выделены 39 изолятов Phagum *Salmonella typhimurium*. Изучили их происхождение, морфологию вирионов, морфологию колоний, активность, диапазон специфичности, спектр литической активности, что позволило отобрать, паспортизировать и депонировать производственные штаммы. Три наиболее активных штамма – Ph. S. *typhimurium* №5 ТЗ, 8 МЕ, 9 ММ отличались высокими литическими качествами. Их литическая активность составляла  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  по методу Аппельмана и превосходила  $10^7$  по методу Грациа. При последующих исследованиях еще 15 бактериофагов тифимуриум паспортизированы в качестве резервных для препарата. У всех фагов отмечен максимальный спектр литического действия при специфичности литической активности к бактериям вида *Salmonella enterica*.

По морфологической структуре выделенные и селекционированные бактериофаги отнесены к 4 классификационной группе по Тихоненко, В1 морфотипу и семейству Siphoviridae.

Фаги 5 ТЗ и 8 МЕ обладали выраженным лизинообразованием. Кроме того, депонированные фаги обладали выраженными свойствами адсорбции на клетках хозяев. При этом наибольшие показатели скорости адсорбции –  $(4,96 \pm 0,05) \times 10^{-9}$  см<sup>3</sup>мин<sup>-1</sup> и количества адсорбированных фаговых частиц – 91,7±0,25%, отмечены у бактериофага Ph. S. *typhimurium* №8 МЕ -ДЕП, который также наиболее интенсивно формировал литический фермент.

Проведение опытов одиночного цикла развития осуществляли в трех аналоговых повторностях согласно описанному методу Эллипса и Дельбрюкка на бульонных культурах депонированных штаммов сальмонелл. Учет результатов проводили после инкубации по исследованию посевов методом агаровых слоев, произведенных с интервалом в 2 минуты в течение 1 часа.

Отмечено, что среднее число негативных колоний в разведении 1:40 составляет 30-32 на протяжении 22 минут (фаг 5 ТЗ), с 26 минуты отмечается выраженный рост, на 28 минуте появляются негативные колонии в чашках, засеянных из разведения 1:100, и на 30 минуте проявляется полный лизис колоний в посевах из второго разведения (1:40). Таким образом, конец латентного периода начинает проявляться на 24-25 минутах и стабилизируется за 8 минут. Т.е. у селекционированных фагов выявлен минимальный латентный период внутриклеточного развития. Среднее число негативных колоний, полученных из разведения фага 1:100 – 132, значит, по окончании лизиса бактерий количество фаговых частиц составило 13200 в 0,1 мл материала. Средняя урожайность фагов на одну бактериальную клетку также отмечена на достаточно высоком уровне для производственных штаммов – 185-206 фаговых частиц. Таким образом, проведенные исследования определили характеристики полученным нами сальмонеллезным фагам тифимуриум, которые удовлетворяют требованиям к производственным штаммам для создания лечебно-профилактических препаратов.

Для определения степени антигенного родства производственных штаммов мы проводили исследования серологических свойств фагов, получая к ним антисыворотки методом иммунизации кроликов. Через 7-10 дней после последнего введения антигена у кроликов брали кровь из краевой вены уха и испытывали нейтрализующую активность антисывороток в разведениях 1:25-1:800. Если антисыворотка вызывала нейтрализацию свыше 90 % фаговых частиц при пятиминутном контакте, то ее активность считали приемлемой для дальнейшей работы.

Полученные гипериммунные сыворотки на производственные штаммы бактериофагов проявляли нейтрализующую активность в разведениях 1:50-1:400. Константы скорости нейтрализации фагов с гомологичными антисыворотками составили 240,21-270,26 мин<sup>-1</sup>, с гетерологичными антисыворотками – 124,42-163,67 мин<sup>-1</sup>. Т.о. было установлено, что штаммы

Ph. *S. typhimurium* №5 ТЗ, 8 МЕ, 9 ММ являются родственными и обладают выраженной иммуногенностью.

Принимая во внимание этиологическую структуру возбудителей сальмонеллеза для разных видов птиц, было отмечено, что *S. enteritidis* – доминирующий этиотропный серовариант для кур, второй из значимых (хотя и в принципиально меньшем соотношении) возбудителей сальмонеллеза голубей, некоторых декоративных и водоплавающих птиц. Кроме того, серовариант *S. enteritidis* является основным возбудителем пищевых токсикоинфекций у человека [3]. Сальмонеллоносительство у водоплавающих, синантропных, вольерных птиц с участием *S. enteritidis* довольно широко распространено, что отмечено нашими наблюдениями и исследовательскими данными [4].

Для создания бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц были использованы фаги к *S. enteritidis*, выделенные нами при исследовании по методу обогащения 52 проб птицефабрик и депонированные нами совместно с С.В. Леневым и Ю.А. Малаховым в качестве производственных – Ph. *S. enteritidis* А-1, ЮН-1, ЮН-2. Их характеризует литическая активность к эталонному штамму *S. enteritidis* №3-2 ВГНКИ по методу Аппельмана  $10^{-9}$ - $10^{-10}$ , специфичность и широкий спектр литического действия.

Бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц готовили, производя высев в разные емкости с предварительно нагретым до 37 °С разведенным 1:5 МПБ суспензий 6-часовой культуры штамма *Salmonella typhimurium* М-2ф t-ДЕП и фильтрата каждого из бактериофагов: Ph. *S. typhimurium* №5 ТЗ, 8 МЕ, 9 ММ, а также суспензий 6-часовой культуры *S. enteritidis* 25 Яв e-ДЕП и фильтрата каждого из бактериофагов Ph. *S. enteritidis* А-1, ЮН-1, ЮН-2.

Фаговый препарат готовили поэтапно. Культивирование фагов на молодых культурах сальмонелл проводили 18 часов, после чего осуществляли очистку биологического препарата бактериофагов от биологической массы сальмонелл, остатков клеток и компонентов питательной среды.

Следующим этапом осуществляли центрифугирование при 6000 об./мин. в течение 30 минут, фильтрацию через системы бактериальных фильтров Шамберленда и приготовление концентрированной суспензии бактериофагов. В качестве контроля служили отсутствие роста при посеве суспензии бактериофагов в разведенный МПБ и рост сальмонеллы без фагов по выраженной мутности питательной среды. Концентрированную суспензию бактериофагов контролировали по методу Аппельмана, доводя концентрацию до уровня  $10^8$  фаговых частиц в 1 см<sup>3</sup> среды.

В качестве консерванта приготовленной суспензии фагов применяли раствор хинозола до его конечной концентрации в фаголизате – 0,01%. Готовый препарат формировали смешиванием консервированных суспензий бактериофагов в соотношении 1:1:1:1:1, после чего проводили расфасовку, упаковку, маркировку и контроль препарата бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц.

Контроль экспериментальных серий препарата на стерильность осуществляли высевом на МПА, в МПБ, среды Китта-Тароцци и Сабуро.

Отмечены высокие результаты при постановке контролей на активность бивалентного бактериофага, осуществленных на белых мышах и голубях при подкожном инфицировании, для чего лабораторным объектам внутримышечно вводили культуры *S. typhimurium* М-2ф t-ДЕП (1 группа), *S. enteritidis* 25 Яв e-ДЕП (2 группа) в дозах по 5 LD<sub>50</sub> и смесь культур по 2,5 LD<sub>50</sub> (3 группа), а спустя 20 минут – препарат. Наблюдение и учет заболевших и павших голубей с бактериологическим исследованием проводили в течение 14 дней.

Результаты исследования активности бивалентного бактериофага против сальмонел-

леза птиц в остром лабораторном опыте на мышах и голубях показали их сохранность 90-100 % при сохранности в контрольных группах без фагообработки – 0-10 %. При этом единичные летальные случаи в опытных группах могли быть спровоцированы высокой дозой экзо- и эндотоксинов введенных сальмонелл, т.к. гибель по 1 голубю отмечали в первые 1-2 суток после начала эксперимента при введении *S. enteritidis* или смеси с ее присутствием. Причем от погибших голубей в опытных группах сальмонеллу не выделяли, при этом в контроле ее выделяли из материала, как от трупов, так и от клинически здоровых голубей.

Препараты сальмонеллезных фагов: как в моноисполнении, так и в виде бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц, способы их производства и применения были успешно апробированы в условиях птицеферм, голубятен, зоопарков, частных подворий и вольтеров для содержания птиц различных видов, неблагополучных по сальмонеллезу.

Основываясь на представленных материалах, Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей, бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц и способ лечения сальмонеллеза птиц при помощи этих препаратов были внедрены в практику и рекомендованы ветеринарным специалистам. Препарат против сальмонеллеза голубей и способ лечения сальмонеллеза голубей запатентованы. Фаговые препараты рекомендованы для борьбы с сальмонеллезом птиц, что нашло отражение в одобренных Департаментом ветеринарии МСХ РФ «Рекомендациях по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур» [5], «Рекомендациях по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза голубей» [6].

**Заключение.** Резюмируя вышеизложенное необходимо отметить, что возвращение препаратов на основе активных бактериофагов в практику ветеринарной медицины при борьбе с сальмонеллезом птиц является перспективным направлением противоэпизоотической работы, особенно в условиях множественной антибиотикорезистентности возбудителя и ограничительных требований по применению химиотерапевтических препаратов для профилактики и лечения болезней в птицеводстве.

### *Библиографический список*

1. Данилевская В.Н., Пименов Н.В. Проблема антибиотикорезистентности на примере лечения сальмонеллеза у домашних голубей//Российский ветеринарный журнал, 2005, №4, с. 21-24.
2. Ленев С.В. Сальмофаг энтеритидис//Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России: Сб. мат-лов науч. сессии РАСХН/ Под ред. А.М. Смирнова. – М.: РАСХН, 1992, с. 258-259.
3. Михаэль А. Сальмонеллез – вопросы и ответы?//Сб. докладов VI Междунар. вет. конгресса по птицеводству, 26-29 апреля 2010, М., 2010, с. 114-121.
4. Кузьмин В.А. Сальмонеллезная инфекция в условиях птицефабрик, методы профилактики и оздоровления: Автореф... дис. докт. вет. наук. – СПб: СПбГАВМ, 1995, 16 с.
5. Куриленко А.Н., Пименов Н.В., Ленев С.В., Малахов Ю.А., Яковлев С.С. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур. – М.: МСХ-МГАВМиБ, 2002, 34 с.
6. Пименов Н.В., Куриленко А.Н., Чиркова И.В., Яковлев С.С. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза голубей. – М.: МСХ; «МегАрт», 2008, 43 с.

## BACTERIOPHAGES AGAINST AVIAN SALMONELLOSIS

*Pimenov N.V.***Key words:** bacteriophages, salmonella birds, treatment, rehabilitation, medicine

*The article presents the results of research on the release of the active bacteriophages and the creation of medicine against salmonella birds. Creating a bivalent bacteriophage based on Ph. S. typhimurium and Ph. S. enteritidis, the development technology of its biological production and successful testing of phage preparations open new prospects in antiepidemic against salmonella.*

УДК 576.9+579.842./4.598.2/.9

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЁЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В ОРГАНИЗМЕ ЦЫПЛЯТ КРОССА ИЗА

*Пугачев В.Г., заведующий сектором; Томенина О.Д., научный сотрудник;**Тимакова О.И., инженер; Азиенко А.И., студентка**ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирской области**тел. 8(383)363-47-79, [pugachev@vector.ncs.ru](mailto:pugachev@vector.ncs.ru)**Юшков Ю.Г., кандидат ветеринарных наук; Леонов С.В., научный сотрудник;**Селиверстова Н.А., младший научный сотрудник**ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии, п. Краснообск, Новосибирской области**тел. 8(383)348-39-31, [348-39-31@mail.ru](mailto:348-39-31@mail.ru)***Ключевые слова:** бактериофаг, сальмонелла, птицеводство, фаготерапия.

*В работе исследовали распределение бактериофагов по органам и тканям цыпленка при выпаивании суспензии бактериофага здоровым птицам и инфицированным сальмонеллой. Результаты исследования показали, что фаги быстро распространяются по органам цыпленка при оральном введении и постепенно выводятся в отсутствие бактерий для размножения. Через 20 часов фаговые частицы остаются только в кишечнике. В случае заражения сальмонеллой бактериофаги концентрируются и размножаются в тканях печени, в селезенке и в кишечнике. Значительное увеличение концентрации бактериофага к 20 часам показывает, что в органах идет размножение на специфичных бактериях патогена.*

В настоящее время бактериофаги находят широкое применение в медицине, ветеринарии и биотехнологии. Узкая специфичность действия на бактериальную микрофлору, способность избирательно воздействовать на патогенные микроорганизмы, позволяет использовать их для диагностики, профилактики и лечения человека, животных и птиц.

Возникновение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов предполагает поиск новых препаратов для борьбы с ними. Современные лечебно-профилактические препараты бактериофагов составлены из вирулентных фагов широкого диапазона действия, активных и в отношении бактерий, устойчивых к антибиотикам.

Спектр негативного влияния применения антибиотиков в сельском хозяйстве настолько широк (аллергенность, токсичность, селекция антибиотикорезистентных штаммов), что