

показателей микробиоценоза за счет элиминации *Staphylococcus aureus* и энтеропатогенной *Escherichia coli* (рис. 3).

В настоящее время нормативно-техническая документация на разработанный коктейль бактериофагов в форме специализированного пищевого продукта диетического (профилактического) питания успешно прошла санитарно-эпидемиологическую экспертизу в НИИ питания РАМН. Федеральной службой Роспотребнадзора выдано свидетельство о государственной регистрации на СП «ФУДФАГ» № RU.77.77.19.004.E.001234.02.13 от 20.02.2013 года.

**Заключение.** Сконструированный специализированный пищевой продукт диетического (профилактического) питания на основе бактериофагов безопасен для человека и животных и может применяться в качестве средства профилактического фагирования декретированных контингентов работников предприятий различных отраслей с целью снижения риска развития спорадических случаев и вспышек пищевых инфекций.

## PROBIOTIC DIETARY SUPPLEMENT «FOODPHAGE» IN PROPHYLAXIS AGAINST FOOD-BORNE INFECTION

*Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Afanas'ev S.S., Verevkin V.V., Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N., Kiseleva I.A.*

**Key words:** *bacteriophages, food-borne infections, phage-based probiotic dietary supplement.*

*The risk of infection caused by the food products contaminated with Salmonella, Shigella, Escherichia, Listeria, Staphylococci is very high. Bacteriophages, active against the above mentioned bacteria, were sought and singled out. Their phenotypic and molecular genetic features were studied as well as safety and efficiency for lab animals and humans.*

УДК 619:616 -07

## ТЕХНОЛОГИЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

*Васильева Ю.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент, vet\_yulua@mail.ru  
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор, dav\_ul@mail.ru  
Семанина Е.Н., научный сотрудник НИИЦМиБ  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

**Ключевые слова:** *диагностика бордетеллёза, РНФ, Bordetella bronchiseptica, фаговые биопрепараты.*

*В статье приводятся данные по разработке схемы индикации Bordetella bronchiseptica в объектах ветеринарного надзора при помощи реакции нарастания титра фага с использованием нового диагностического биопрепарата. Представлены результаты разработки технологических параметров изготовления активного и специфического биопрепарата на основе бордетеллёзных фагов.*

В настоящее время бордетеллез является широко распространенным заболеванием животных во многих странах мира [5].

В нашей стране статистические данные по распространению, методам выявления и ликвидации данной инфекции у животных крайне недостаточны.

*Bordetella bronchiseptica* является возбудителем хронических и асимптоматических инфекций респираторного тракта (трахеобронхита) животных. Бордетеллёзом болеют собаки, лошади, свиньи, обезьяны, козы, лисы, кролики, кошки, хорьки, хомяки, крысы, морские свинки, птицы в любом возрасте, но наиболее тяжелые последствия развиваются у молодых особей. [7].

Инфекционный агент долго сохраняется в окружающей среде, поэтому чаще всего его обнаруживают в местах скученности животных (питомники, фермы, частные хозяйства). Возможность трансмиссии возбудителя из природных эпизоотических очагов к животным, содержащимся в фермерских хозяйствах, и, как следствие, значительных экономических потерь в малом и среднем сельскохозяйственном бизнесе вследствие гибели или снижения продуктивности животных, обуславливают необходимость выявления *B. bronchiseptica* и проведение противозооотических мероприятий. В связи с этим актуальным является разработка методов индикации и идентификации *B. Bronchiseptica*. Особо актуализирует поиск и разработку современных экспрессных высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики тот факт, что *B. bronchiseptica* может вызывать патологию дыхательных путей у человека [6].

Отсутствие недорогих высокоточных методов диагностики бордетеллёза значительно затрудняет получение исчерпывающей эпизоотологической и эпидемиологической информации.

В отечественной ветеринарной практике фагодиагностика бордетеллёза не изучена и, несомненно, представляет научный и практический интерес.

Вследствие этого целью нашей работы явилась разработка диагностического биопрепарата для индикации и идентификации возбудителя бордетеллёза.

Для достижения поставленной цели мы поставили перед собой следующие задачи:

1. Подобрать оптимальный набор бактериофагов и сконструировать на их основе новый биопрепарат для диагностики бордетеллёза.
2. Разработать схему идентификации *B. bronchiseptica* с помощью бактериофагов.
3. Разработать биотехнологические параметры изготовления диагностического биопрепарата.
4. Разработать схему ускоренной индикации *B. bronchiseptica* в объектах ветеринарного надзора с помощью РНФ с использованием созданного биопрепарата.

**Материалы и методы исследований.** Объектами исследований явились 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica* № 1, № 7, № 214, № 22067, № 8344; 48 штаммов *B. bronchiseptica*, выделенных от животных с клиническими проявлениями респираторных заболеваний; 8 штаммов фагов *B. bronchiseptica*.

В работе использовали мясопептонный бульон, мясопептонный агар, среда Эндо, казеиново-угольный агар, бордетелл-агар, кровяной агар, среда Борде-Жангу, среды Гисса, биохимические тест-системы для ускоренной идентификации микроорганизмов, агар-агар, натрий хлорид, мочевины, перекись водорода, желатин, среда УГСХА ВВР 57.

Работу проводили согласно общепринятым микробиологическим методам выделения и идентификации бактерий и фагов. Постановку РНФ для индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом [1,2,3,4,8].

**Результаты исследований и их обсуждение.** На первом этапе работы по подбору фагов для диагностического биопрепарата нами была разработана схема выделения профагов из культуры *B. Bronchiseptica* методом облучения УФЛ. Выделенные по данной схеме восемь фагов пассировали для повышения их литической активности и в дальнейшем проводили селекцию по морфологическим признакам.

Проведённая селекция выделенных фагов позволила отобрать для дальнейшего использования в разработке биопрепарата бактериофаги В.br. – 1 УГСХА и В.br. – 7 УГСХА, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой литической активностью по Аппельману  $10^{-7} - 10^{-8}$ , по Грациа  $3,1 \times 10^8 - 4,3 \times 10^9$  активных корпускул в 1 мл.

Далее приступили к разработке технологических параметров изготовления и контроля диагностического фагового биопрепарата. Бордетеллёзные индикаторные бактериофаги получали путем культивирования в мясопептонном бульоне с *B. bronchiseptica*. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *B. bronchiseptica* № 8344, обладающий характерными для своего вида морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами.

Для повышения активности бактериофагов проводили пассажи. Опытным путем определяли оптимальное соотношение времени пассажа по литической активности фагов.

Установлено, что оптимальное время контакта культуры с фагами В.br. – 1 УГСХА и В.br. – 7 УГСХА составляет 7 часов. Этот режим мы использовали в дальнейших исследованиях.

Далее определили оптимальные количественные параметры соотношения фаговых корпускул и клеток бактерий *B. Bronchiseptica*. Результаты проведенных исследований показали, что литическая активность бордетеллёзных фагов при разных соотношениях индикаторной культуры и фага была одинаково высокая и соответствовала  $1,3 \times 10^7 - 3,1 \times 10^8$  фаговых корпускул в  $1,0 \text{ см}^3$ . Оптимальное соотношение количества фагов В.br. – 7 УГСХА, В.br. – 1 УГСХА и культуры составляет 1:2, литическая активность фагов при этом составляет  $2,1 \times 10^8, 4,3 \times 10^9$  активных корпускул в 1 мл соответственно.

Затем подобрали оптимальный температурный режим культивирования бактериофагов *B. Bronchiseptica*. Литическая активность фага В.br. – 1 УГСХА по методу Аппельмана при температуре 25 °С, 37 °С и 42 °С составила  $10^{-6}, 10^{-7}$  и  $10^{-6}$ ; по методу Грациа –  $1,3 \times 10^7, 3,1 \times 10^8$  и  $1,1 \times 10^7$ , соответственно. Титр фага В.br. – 7 УГСХА составил по методу Аппельмана  $10^{-7}, 10^{-8}$  и  $10^{-7}$  при 25 °С, 37 °С и 42 °С; по методу Грациа  $1,4 \times 10^8, 4,3 \times 10^9$  и  $2,6 \times 10^8$  активных корпускул в 1 мл соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод: оптимальным для культивирования фагов *B. bronchiseptica* является температура 37 °С.

Мы также изучили вопрос изменения литической активности бактериофагов с истечением времени для изыскания оптимальных условий хранения и кратности пересева производственных штаммов, установления срока годности фаговых препаратов. Селекционированные бактериофаги В.br. – 1 УГСХА и В.br. – 7 УГСХА хранились во флаконах, при температуре 4 °С в виде лизатов бульонных культур, без консерванта. Литическую активность определяли по истечении 3, 6, 9 и 12 месяцев. Анализируя результаты проведенных исследований, можно сделать вывод, что по истечении 12 месяцев бактериофаги В.br. – 1 УГСХА и В.br. – 7 УГСХА не изменили своей литической активности и могут использоваться в качестве диагностического биопрепарата в течении данного срока.

Мы провели контроль бактериофагов. Из полученного объема отбирали пробу каждого фага по 50 мл для определения чистоты физических свойств, титра фага по отношению к индикаторной культуре, спектра литической активности и специфичности.

Индикаторные фаги В.br. – 1 УГСХА и В.br. – 7 УГСХА не содержали посторонних

примесей, фаголизаты были прозрачными, светло-желтого цвета, на питательных средах с посевами рост бактериальной микрофлоры и грибов отсутствовал, литическую активность индикаторных бактериофагов *V.br. – 7 УГСХА* и *V.br. – 1 УГСХА* определяли методами Аппельмана и Грациа (литическая активность индикаторных фагов составила от  $10^{-7}$  по методу Аппельмана и от  $3,1 \times 10^8$  до  $4,3 \times 10^9$  по Грациа), спектр литического действия фага *V.br. – 7 УГСХА* составил 81,1%, фага *V.br. – 1 УГСХА* – 47,2% из числа изучаемых штаммов, совместный спектр лизиса гомологичных бактерий составил 92,5%. По результатам изучения специфичности установлено, что индикаторные бордетеллезные фаги являются неактивными в отношении штаммов других видов, родов.

Получив положительные результаты контроля, фаголизаты *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. – 7 УГСХА* разлили по 5,0 мл в стерильные флаконы и герметично закрыли. На флаконы наклеили этикетки с указанием наименования фага, его литической активности и даты упаковки.

Следующим этапом научной работы явилась разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага. Первоначально мы определили количественный показатель РНФ. Установили, что результат реакции является положительным (увеличение количества корпускул фагов *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. 7 УГСХА* более чем в 5 раз) в пробах при контаминации мясопептонного бульона бактериями *B. bronchiseptica* в концентрации  $10^3$  микробных клеток в 1 мл.

Затем определили оптимальное время постановки РНФ. В исследованиях использовали воду, смывы с глотки, фекалии, контаминированные бактериями *B. bronchiseptica* в концентрации  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  м.к. в 1 мл.

Опыты по изучению чувствительности реакции в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом показали, что РНФ с 7-часовой экспозицией материала с фагами *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. – 7 УГСХА* позволяет провести индикацию бактерий вида *B. bronchiseptica* в концентрации  $10^4$  м.к./мл за 19 часов.

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 часов позволяет обнаружить бактерии *B. bronchiseptica* в количестве  $10^3$  м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 часов.

Далее изучили возможность использования РНФ для выявления *B. bronchiseptica* у домашних животных и в объектах внешней среды.

Пробы физиологического раствора в объеме 5 мл вносили в колбы, содержащие по 50 мл МПБ, и контаминировали *B. bronchiseptica* в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл.

По результатам проведенных исследований нами установлено, что увеличение титра фагов *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. – 7 УГСХА* более чем в 5 раз произошло при концентрации  $10^3$  микробных клеток бордетелл в 1 мл физиологического раствора. Время исследований составило 26 часов.

У собак и кошек брали смыв физиологическим раствором с глотки, в объеме 5 мл. Вносили в колбы, содержащие по 50 мл МПБ и контаминировали *B. bronchiseptica* в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра фагов *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. – 7 УГСХА* более чем в 5 раз произошло при концентрации  $10^3$  микробных клеток бордетелл в 1 мл исследуемых смывов с глотки собак и кошек. Исследование составило 26 часов.

Пробы фекалий весом 5 г вносили в стерильные колбы, содержащие по 50 мл МПБ и контаминировали *B. bronchiseptica* в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра фагов *V.br. – 1 УГСХА* и *V.br. – 7 УГСХА* более чем в 5 раз произошло при концентрации  $10^4$  микроб-

ных клеток бордетелл в 1 г фекалий. Чувствительность реакции снизилась до этого уровня из-за обильного обсеменения фекалий посторонней микрофлорой, что повлияло на условия оптимального взаимодействия фагов V.br. – 1 УГСХА и V.br. – 7 УГСХА с *B. bronchiseptica*.

Мы провели повторное исследование исходных проб фекалий с увеличением времени экспозиции материала с фагом до 16 часов, это позволило повысить чувствительность РНФ до  $10^3$  м.к./мл, без выделения чистой культуры, при наличии посторонней микрофлоры.

**Заключение.** Таким образом, нами разработаны технологические параметры изготовления и контроля диагностического биопрепарата «V.br. – 11 УГСХА» на основе выделенных и изученных фагов V.br. – 1 УГСХА и V.br. – 7 УГСХА и параметры постановки реакции нарастания титра фага для ускоренной индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды. Метод РНФ с использованием биопрепарата «V.br. – 11 УГСХА» позволяет обнаружить указанные бактерии в концентрации от  $10^3$  м.к. в 1 мл исследуемого материала за 26 часов.

Разработанный нами диагностический биопрепарат «V.br. – 11 УГСХА» рекомендуется для индикации и идентификации *B. bronchiseptica*.

#### **Библиографический список**

1. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии. -Ульяновск, 1998. – 151 с.
3. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
4. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // М., 1962. – С. 65-71.
5. Baker D.G. Natural pathogens of laboratory animals: their effects on research / D.G. Baker // ASM Press, Washington, D.C. - 2003.
6. Bjornstad O.N. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Harvill // Trends Microbiol. – 2005. – N 13. – P. 355-359.
7. Yuk M.H. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- $\kappa$ B activation by the *Bordetella* type III secretion system / M.H. Yuk, E.T. Harvill, P.A. Cotter, J.F. Miller // Mol. Microbiol. – 2000. - №35. – P.991-1004.
8. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора/ Д.А. Васильев [и др.] // Вестник УГСХА. – 2012. - №3(19) – С. 69-73

### **THE TECHNOLOGY OF CONSTRUCTION OF DIAGNOSTIC BIOLOGICAL PREPARATION ON THE BASIS OF BACTERIOPHAGES *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* AND THE PROSPECTS FOR ITS USE**

*Vasileva Y.B., Vasilev D.A., Semanina E.N.*

**Key words:** *diagnostics of bordetellosis, Bordetella bronchiseptica, phage biopreparations.*

*The article presents the data on the elaboration of the scheme indicating Bordetella bronchiseptica in the objects of veterinary surveillance with the help of reaction of rise of titre of the phage with the use of new diagnostic preparation. The results of development of technological parameters of manufacture of active and specific biological preparation on the basis of bordetellosis phages are presented.*