

## БАКТЕРИОФАГИ ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЕ КУР

*Ленев С.В., кандидат биологических наук,  
ФГБУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации  
лекарственных средств для животных и кормов (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва,  
Тел. (8 495) 982 50 83, slenev@yandex.ru*

**Ключевые слова:** сальмонеллез, бактериофаги, антибиотики, куры, профилактика, лечение

*Приведены результаты изучения биологических свойств бактериофагов S. Enteritidis, S. Typhimurium и S. Gallinarum, а также сравнения литического действия фагов и антибиотиков на сальмонеллы.*

Введение. В России, как и во многих странах мира, среди пищевых зоонозов с установленным бактериальным агентом, сальмонеллез имеет наибольшую эпидемиологическую значимость. Показатель заболеваемости сальмонеллезом в РФ составил в 2011 году 35,89 на сто тысяч населения, его доля составляла 17,9% от всех этиологически расшифрованных кишечных инфекций (1).

Ситуация по сальмонеллезу в настоящее время не может считаться благополучной, что делает необходимым применение в практике ветеринарии и здравоохранения эффективных мер борьбы с заболеванием.

Установлено, что интенсивность циркуляции сальмонелл в природе во многом связана с интенсификацией процессов выращивания и переработки птицы. При этом, продукция птицеводства рассматривается как главный путь передачи возбудителя человеку.

Проблема поиска эффективной альтернативы антибиотикам, а также ограничения по химической обработке птицы (использование хлорированной воды при убое) возродила интерес к использованию бактериофагов в качестве средства профилактики зоонозных заболеваний, в том числе и сальмонеллеза птиц (2).

Концепция, по обеспечению безопасной продукции животного происхождения, в том числе и птицеводства, рекомендованная МЭБ и ФАО ВОЗ, направлена на предотвращения распространения сальмонелл вдоль всей пищевой цепи (по принципу - «от фермы до стола»).

В этой связи препараты бактериофагов обладают уникальными возможностями, так как могут быть эффективно использованы на разных стадиях пищевой цепи. Бактериофаги для контроля пищевых патогенов предлагается использовать в первичной звене для санации возбудителя при выращивании птицы, обработке тушек и оборудования при убое, а также обработке продукции готовой для употребления (3).

Основными сероварами сальмонелл инфицирующими кур в Российской Федерации являются: S. Enteritidis, S. Gallinarum и S. Typhimurium, составляющие вместе около 95% сальмонелл циркулирующих в птицеводческих хозяйствах. Этиологическая структура сальмонеллеза птиц за последние 15 лет существенно не изменилась. В этот период возросла этиологическая значимость серовара S. enteritidis и уменьшилась серовара S. Gallinarum.

В данной работе приведены результаты изучения биологических свойств бактериофагов S. Enteritidis, S. Typhimurium и S. Gallinarum, а также сравнения литического действия фагов и антибиотиков на сальмонеллы.

**Материалы и методы исследований.** Выделение изолятов фагов проводили из сточных вод птицефабрик, неблагополучных по сальмонеллезу кур. Для повышения вероятности

обнаружения фагов использовали метод обогащения, описанный М. Адамсом (4). Чистые линии фагов получали последовательным клонированием морфологически однотипных негативных колоний. Сравнительную оценку морфологии негативных колоний различных фагов проводили, используя одну партию питательной среды и одинаковые условия культивирования.

Электроннограммы вирионов бактериофагов выполняли на электронном микроскопе JEM-100-CX, при ускоряющем напряжении 80 киловольт, с использованием метода негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой по А.С. Тихоненко (5). В качестве модельного тест объекта использовали бактериофаг T<sub>2</sub>.

Активность бактериофагов определяли общепринятыми способами – по количеству жизнеспособных фаговых частиц методом Грациа, и по литической активности фагов методом Аппельмана.

Чувствительность сальмонелл к 8 антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), США.

Для изучения антибиотикорезистентности использовали 308 штаммов сальмонелл. 200 из них, представляли собой штаммы, собранные в коллекции микроорганизмов ВГНКИ в период 1948 по 2009 годы, а 108 - были изолятами сальмонелл, выделенными из пищевых продуктов, кормов и биоматериалов от животных в различных регионах РФ в 2010 - 2012 годах.

Штаммы сальмонелл, относящиеся к основным сероварам сальмонелл инфицирующих кур - *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Gallinarum*, были испытаны на чувствительность к бактериофагам.

Для оценки эффективности лечебного и профилактического эффекта от применения фагов при сальмонеллезе на лабораторных животных использовали белых беспородных мышей массой от 8-10г до 14-16 грамм, а также цыплят и кур различного возраста кроссов «Смена - 4», «Хайсекс коричневый» и «Иза-Браун». Профилактические свойства экспериментальных препаратов бактериофагов изучали, вводя перорально белым мышам по 10<sup>6</sup> и цыплятам по 10<sup>8</sup> фаговых частиц, с последующим заражением через 2 часа опытных и контрольных животных 5LD<sub>50</sub> вирулентного штамма сальмонелл. Лечебные свойства фагов проверяли, вводя их аналогично, и в тех же дозах, через трое суток после инфицирования вирулентными штаммами сальмонелл.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Из проб сточных вод птицеводческих хозяйств выделено 27 изолятов бактериофагов *S. Enteritidis*, 14 - *S. Typhimurium* и 10 фагов *S. Gallinarum*. Состав популяций выделенных фагов был гетерогенным и был представлен несколькими типами негативных колоний. После их клонирования и проведения пяти последовательных пассажей на штаммах бактерий -хозяинах, из выделенных фагов отобраны наиболее активные. В их фаголизатах в течение 3-5 часов культивирования в стационарных условиях накапливалось от 8,4x10<sup>9</sup> до 2,0x10<sup>11</sup> жизнеспособных фаговых частиц. Среди этих штаммов фагов в свою очередь отобраны фаги, обладающие наименьшим периодом латентным периодом развития, высокой адсорбционной способностью и максимальной урожайностью. Установлено, что диапазон специфичности выделенных фагов ограничен пределами рода *Salmonella*.

Электронно-микроскопические исследования вирионов селекционированных фагов показали, что все они обладают бинальным типом симметрии, состоят из равносторонней головки в виде изометрического многогранника в форме икосаэдра с диаметром от 50 до 70 нм, длинного несокращающегося отростка с поперечной исчерченностью длиной 105 -150 нм, имеют базальную пластинку и короткие фибриллы (рис.1). Фаги данного типа входят в семейство *Siphoviridae*, относятся к морфотипу B1 по классификации Н.В. Ackermann, М.С. Dubow (6).

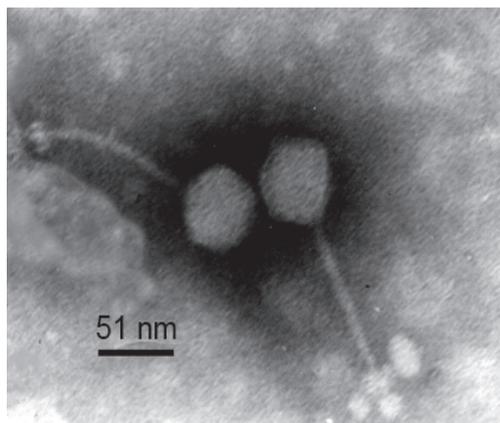


Рис. 1 - Морфология вирионов бактериофага F-6 S.enteritidis

Таблица 1 - Сравнение чувствительности коллекционных штаммов к антибиотикам и изолятов сальмонелл поступивших в лабораторию в 2010-2012 гг.

	устойчивые		промежуточно устойчивые		чувствительные	
	коллекция	изоляты	коллекция	изоляты	коллекция	изоляты
Ампициллин	2,8%	5,6%	6,2%	0	90,9%	94,4%
Цефтазидим	1,4%	1,8%	12,2%	7,41%	86,4%	90,1%
Цефтриаксон	0,9%	0	9,9%	8,3%	89,1%	91,7%
Доксициклин	11,9%	21,3%	22,2%	23,2%	65,8%	51,6%
Ципрофлоксацин	0	0	2,6%	10,2%	97,4%	89,8%
Гентамицин	0,8%	0,9%	0	1,9%	99,1%	97,2%
Норфлоксацин	0	0,9%	0,5%	2,8%	99,5%	96,3%
Стрептомицин	3,7%	6,5%	10,7%	9,3%	85,6%	84,3%

Как следует из представленных данных, изученные штаммы сальмонелл в основном были чувствительны ко всем использованным в работе антибиотикам, за исключением доксициклина. Следует отметить, что среди изолятов, выделенных в 2010-2012гг., в 2 раза возросла частота обнаружения сальмонелл, устойчивых к ампициллину и доксициллину, в 1,8 раза - к стрептомицину (рис.2).

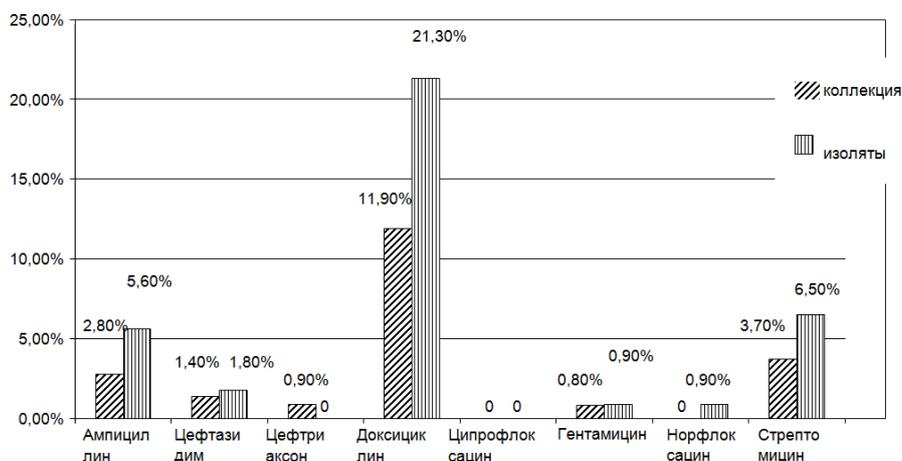
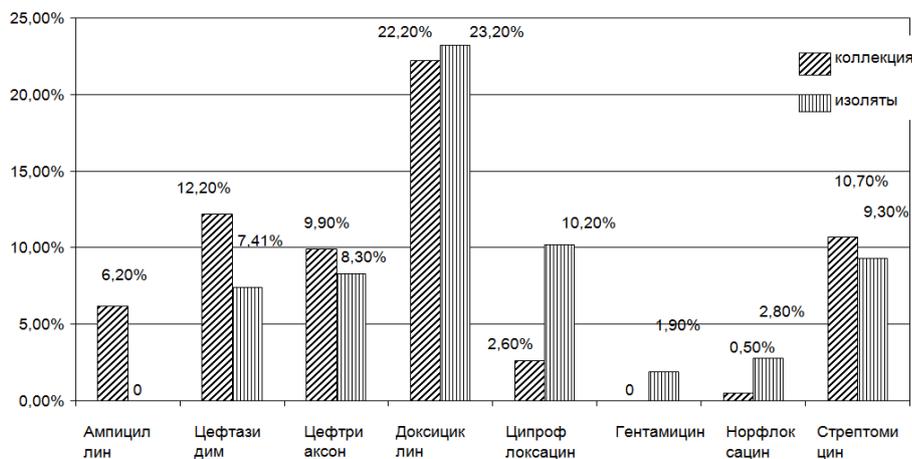


Рис. 2 - Штаммы и изоляты сальмонелл, устойчивые к антибиотикам

Также у сальмонелл, выделенных в этот период, значительно возросло количество изолятов имеющих промежуточную устойчивость к ципрофлоксацину (в 3,9 раза) и норфлоксацину – в 5,6 раза (рис.3).



**Рис. 3 - Штаммы и изоляты сальмонелл промежуточно-устойчивые к антибиотикам**

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ чувствительности к антибиотикам штаммов сальмонелл, собранных в коллекции микроорганизмов ВГНКИ в период с 1948 по 2009 годы, а также изолятов сальмонелл поступивших в институт в 2010-2012 годах, свидетельствует о возрастающей тенденции распространения штаммов возбудителей сальмонеллеза антибиотирезистентных к тетрациклам, аминогликозидам и фторхинолонам.

При испытании сальмонелл на чувствительность к селекционированным бактериофагам, установлено, что фаги *S. Enteritidis* способны лизировать 75 из 78 музейных и 101 из 104 штаммов гомологичного серовара. Фаги *S. Typhimurium* – 35 из 37 музейных и 23 из 24 изолятов сальмонелл этого серовара. Среди изученных штаммов сальмонелл серовара *S. Gallinarum* к фагам были чувствительны 51 из 53 музейных штаммов и 42 из 42 изолятов. Фагорезистентные штаммы сальмонелл имели «R» и «S-O» форму колоний и, по всей видимости, представляли собой мутанты адсорбционного типа. Наличие устойчивых к фагам штаммов сальмонелл не было связано с давностью и источником их выделения. В целом, изученные музейные штаммы и «полевые» изоляты сальмонелл обладали очень высокой чувствительностью к селекционированным бактериофагам.

При оценке профилактического и лечебного эффекта бактериофагов введенных лабораторным животным, установлено, что бактериофаги предохраняли от заболевания и гибели 90-100% белых мышей и 95-100% цыплят и оказывали лечебный эффект в 80-96% случаев, при гибели 80-100 животных в контрольной группе.

**Заключение.** Селекционированные штаммы бактериофагов *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* и *S. Typhimurium* используется в качестве производственных при изготовления фагового компонента Сальмофага, единственного в настоящий момент, лечебно - профилактического препарата содержащего фаги, зарегистрированного в РФ. Сальмофаг состоит из двух компонентов – сухой живой вакцины из фагоустойчивого аттенуированного штамма сальмонелл и бактериофага. Лечебный эффект препарата создается за счет высокоактивных бактериофагов широкого спектра действия. Фагоустойчивый вакцинный штамм обеспечивают формирование иммунитета к возбудителям после санации организма птиц бактериофагом.

Контролируемые опыты по применению промышленных серий препаратов сальмофа-

га содержащих бактериофаги *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* и *S. Typhimurium* в птицеводческих хозяйствах различных регионов страны, неблагополучных по сальмонеллезу, показали их высокую лечебно-профилактическую эффективность.

#### **Библиографический список**

1. Информационный бюллетень Референс – центра по мониторингу за сальмонеллезами №24, - М., 2012.- 66с.
2. R. J. Atterbury, M. A. P. Van Bergen, F. Ortiz, M. A. Lovell, J. A. Harris et al., Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens // Appl Environ Microbiol. 2007 July; 73(14), 4543–4549.
3. S. Hagens, M. J. Loessner Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations// Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11, 58-68
4. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Изд.ин. литературы, 1961. – 527с.
5. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – 89с.
6. Ackermann H.W., Dubow M.S. Viruses of prokaryotes. V.1. General properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, FL., 1987. - p. 96.

## **BACTERIOPHAGES IN SALMONELLOSIS CHICKENS**

*Lenev S.V.*

**Key words:** *salmonellosis, bacteriophages, antibiotics, chickens, prevention, treatment*

*Given the results of the study of biological properties of bacteriophages S. Enteritidis, S. Typhimurium and S. Gallinarum, as well as the comparison of the lital actions of phages and antibiotics for Salmonella.*

## **ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГОВ: КРАТКИЙ ОБЗОР**

*Лыско К.А., Игнатъев Г.М., Отрашевская Е.В.*

*ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, г. Москва*

**Ключевые слова:** *антибактериальные препараты, антибиотики, антибиотикорезистентность, бактериофаги, бактериальные инфекции, производство, фаготерапия.*

*В обзорной статье приведены основные черты, характеризующие современное состояние производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов в России и за рубежом. Представлен перечень выпускаемых препаратов бактериофагов, очерчена область применения, приведены конкретные примеры использования препаратов в клинической практике и в комплексе противоэпидемических мероприятий. Также сформулированы основные преимущества препаратов бактериофагов в сравнении с препаратами антибиотиков.*

В ноябре 2009 года в Москве в рамках круглого стола «Эра антибиотиков заканчивается: альтернативные возможности в антибактериальной терапии» представителем объединен-