

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*

*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*

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

правительства ряда стран с 1998г проводят политику, направленную на максимальное ограничение, а в перспективе – и на полный запрет применения антибиотиков в сельском хозяйстве. [1]

Появление антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов привело к неэффективности лечения бактериальных болезней у животных, к увеличению заболеваемости и смертности и, как следствие, к продолжительному бактерионосительству. Антибиотикорезистентность появляется у многих видов возбудителей, в том числе таких как *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*. [2] В связи с ограничениями, вводимыми на применение антибиотических препаратов, еще более актуальным является вопрос о включении бактериофагов в противоэпизоотические мероприятия в промышленном птицеводстве. Поэтому в ветеринарной практике все более широкое применение находят экологически безопасные методы лечения, которые в комплексе с другими лечебными мероприятиями часто дают более высокий терапевтический эффект. К последним относят и бактериофаготерапию. [3]

Значительная доля всех инфекционных болезней в птицеводстве приходится на болезни бактериальной этиологии. На первом месте стоит колибактериоз (49%), а затем микоплазмоз, сальмонеллез (25%), пастереллез. [4, 5, 7].

Целью настоящей работы явилось изучение распределения бактериофагов по органам и тканям цыпленка при выпаивании суспензии бактериофага здоровым птицам и инфицированным сальмонеллой.

Материалы и методы. В работе использовали бактериофаги – Ps-1 и Ps-2, выделенные из стоков и напольной подстилки птицефабрики и селектированные на штаммах №465 и №105. [6,8] Штаммы сальмонелл - *Salmonella enteritidis* - №465 и *Salmonella gallinarum* - №105 – выделены и охарактеризованы в лаборатории болезней птиц ГНУ ИЭВСиДВ.

Бактериофаги Ps-1 и Ps-2 размножали на специфичных штаммах №465 и №105, лизаты были очищены фильтрованием. Литическую активность проверяли на ряде коллекционных штаммов.

Суспензию бактериофагов с концентрацией 10^8 б.о.е./мл выпаивали 3-х суточным цыплятам в количестве $2-3 \times 10^8$ б.о.е. В контрольную партию входили здоровые цыплята, а опытная партия состояла из цыплят, предварительно инфицированных штаммами сальмонелл.

Органы забирали через 2, 4, 6, 8 и 20 часов после выпаивания суспензии фагов. Далее ткани взвешивали, гомогенизировали и суспендировали в физиологическом растворе. Полученную суспензию высевали на агаризованные питательные среды для проверки на наличие сальмонелл, к оставшейся суспензии добавляли хлороформ (2%), осветляли центрифугированием и аликвоты раскапывали на агар из чувствительной культуры. Чашки инкубировали при 37°C, 20 часов.

Таблица 1 - Специфичность выделенных фагов к коллекционным и лабораторным штаммам микроорганизмов.

Штаммы микроорганизмов	Бактериофаги	
	Ps-1	Ps-2
<i>Salmonella typhimurium B-581</i>	лизис	лизис
<i>Salmonella enteritidis DS – 1</i>	лизис	нет
<i>Salmonella enteritidis DS – 3</i>	лизис	нет
<i>Salmonella 1 №105</i>	лизис	лизис
<i>Salmonella gallinarum №465</i>	лизис	нет
<i>Shigella B - 582</i>	лизис	лизис
<i>Escherichia coli AB - 259</i>	нет	нет
<i>Escherichia coli B - 34</i>	нет	нет

Таблица 2 - Чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам.

Наименование препаратов	№105 (мм)	№465 (мм)
Гентамицин (10мкг)	22	25
Канамицин (30мкг)	20	17
Спектиномицин (100мкг)	-	16
Амоксициллин (20мкг)	21	24
Норфлоксацин (10мкг)	22	26
Энрофлоксацин (5 мкг)	-	21
Офлоксацин (5мкг)	18	22
Ципрофлоксацин (5мкг)	-	-
Флорфеникол (30мкг)	-	22
Линкомицин(15мкг)	-	-
Левомецетин (30мкг)	21	22
Полимиксин (300ЕД)	18	17

Результаты. В процессе работы были выделены два бактериофага, специфичных штаммам сальмонелл №465 и №105. Литическая активность бактериофагов проверяли на коллекционных штаммах. В таблице 1 показано, что бактериофаги Ps-1 и Ps-2 имеют достаточно узкую специфичность.

Штаммы сальмонелл №465 и №105 проверили на чувствительность к антибиотикам. Результаты представлены в таблице 2.

Исследование органов цыплят контрольной группы показало, что уже через 2 часа фаговые частицы распределяются по тканям печени, селезенки и кишечника. В пробах, отобранных через 4, 6 и 8 часов, также найдены фаговые частицы в кишечнике и печени, к 20 часам фаг остается только в кишечнике и обнаружен лишь у одной особи из двух.

При исследовании органов цыплят экспериментально инфицированных штаммами сальмонелл и пропоеванных суспензией бактериофага мы наблюдали несколько иную картину. В первых пробах (2 часа и 4 часа) при использовании 1 модели: штамм №105 – PS-2 – фага не обнаружено, а в модели 2: штамм №465 – PS-1 – количество фага в органах значительно меньше по сравнению с контрольными образцами. Однако к 20 часам картина кардинально меняется: в модели 1 наблюдается накопление фаговых частиц во всех исследуемых органах до концентрации $5-7 \times 10^4$ б.о.е./г ткани, а в модели 2 - найдены во всех исследуемых органах,

Таблица 3 - Распределение бактериофагов по органам цыплят.

Органы цыплёнка	Кол-во бактериофагов в органах (б.о.е./г)				
	2 часа	4 часа	6 часов	8 часов	20 часов
Контрольная группа птиц					
кишечник	10^3	10^3	$7,0 \times 10^3$	10^3	$4,0 \times 10^2$
печень	10^2	53	10	10	-
селезёнка	10^2	-	-	-	-
Группа птиц предварительно инфицированная PS-2 (модель1)					
кишечник	-	-	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^3$	$6,2 \times 10^4$
печень	-	-	-	10^3	$2,0 \times 10^4$
селезёнка	-	-	-	10^2	$2,6 \times 10^3$
Группа птиц предварительно инфицированная PS-1 (модель2)					
кишечник	10^2	10^2	10^2	$3,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^4$
печень	-	-	10^2	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$
селезёнка	-	-	-	40	80

но с меньшей концентрацией - до $1-3 \times 10^4$ б.о.е./г. Результаты представлены в таблице 3.

Заключение. При введении препарата бактериофага цыплятам методом выпаивания бактериофаг обнаруживается в органах цыплёнка через 2 часа, постепенно выводится из тканей органов и через 20 часов остаётся только в кишечнике. При заражении птицы 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.

Библиографический список

1. Скобликов Н.Э. КубГАУ, №78(04), 2012г.
2. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных у домашних голубей / Н.В. Пименов, Н.В. Данилевская. - // Ветеринария. - 2006. - № 9. - С.20-24.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. –640 с.
4. Бобылева Г.А. Состояние и перспективы развития отрасли птицеводства// VI Межд. ветер. конгр. по птицев.(апрель 2010 г., М.).-М., 2010.- С.7-14.
5. Мельникова А.А. III Межд. Ветер. Конгр. по птицев, (апрель 2007г), Москва.
6. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.
7. Эпидемиологический надзор за сальмонеллезной инфекцией. Методические рекомендации (Рачковская Ю.К., и др.) – Л., 1987.- 26 с.
8. Цыганова С.В. Выделение бактериофагов против возбудителей бактериальных болезней птиц и изучение их биологических свойств: авт. дисс. канд. вет наук.- СПб, 2009. - 23 с.

PHARMACOKINETIC STUDIES OF SALMONELLA PHAGES IN CHICKEN CROSS AZI

Pugachev V.G., Totmenina O.D., Timakova O.I., Agienko A.I., Leonov S.V., Seliverstova N.A., Yushkov Yu.G.

Key words: *bacteriophage, Salmonella, poultry, phagotherapy*

The study investigated the distribution of phages to organs and tissues of a chicken after uninfected and infected with Salmonella birds were fed with a suspension of bacteriophage. The results showed that the phages can quickly spread to organs of chicken with the oral way of introduction and gradually disappear in the absence of bacteria to multiply. After 20 hours phage particles remain only in the intestines. In the case of infection with Salmonella bacteriophages are concentrated and multiply in the tissues of the liver, the spleen, and in the intestines. A significant increase in the concentration of bacteriophage to 20 hour shows that multiplication of phages in the specific pathogen bacteria within the organs of infected chickens is occurred.