

высокой чувствительностью, высокой специфичностью, не требует выделения культуры чистой культуры возбудителя, не требует дорогостоящего оборудования и материалов, методика достаточно проста.

Все перечисленное позволяет судить о высокой экономической эффективности метода РНФ в сравнении с существующими методами индикации аэромонад [2].

Библиографический список

1. Викторов, Д.А. Разработка методов диагностики, лечения и профилактики псевдомоноза рыб с использованием биопрепарата на основе бактериофагов / Д.А. Викторов, О.А. Тен, И.И. Богданов // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии: Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых учёных Молодёжь и наука XXI века, Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С. 6-8.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги и их применение в ветеринарии.- Ульяновск, 1988, с.45.
3. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромоназом карповых рыб, Минсельхоз-прод России, Департамент ветеринарии, 1998.
4. Методические указания по лабораторной диагностике аэроманоза карпов, Госагропром СССР, М.,1986.

APPLICATION OF THE METHOD OF REACTION OF RISE OF TITRE OF PHAGE TO DISPLAY AEROMONADS IN FISH PRODUCTS

Nasibullin I.R., Gorshkov I.G., Kuklina N.G., Viktorov D.A., Vasilev D.A., Nafeev A.A.

Key words: *Aeromonas, bacteriophages, biological product, indication, response phage titer rise.*

The authors identified bacteriophages of bacteria species Aeromonas hydrophila, investigated their basic biological properties and developed diagnostic biopreparation. On the basis of created preparation a new method of indication of Aeromonas hydrophila with the use of the reaction of rise of titre of the phage was suggested.

УДК 619:616-07

ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОНЕНТОВ КОММЕРЧЕСКИХ КОРМОВ

*Перельгин В.В., кандидат биологических наук, снс,
тел. 8 (4967) 36-00-27, Perelygin@obolensk.org*

*Светоч Э.А., доктор ветеринарных наук, профессор,
ГНЦ ПМБ, тел. 8(4967) 36-00-79, Svetoch@obolensk.org*

Похиленко В.Д., доктор технических наук,

Веревкин В.О. кандидат медицинских наук,

Воложанцев Н.В. кандидат биологических наук, nikvol@obolensk.org

Ключевые слова: Бактериофаги, обезвоживание, инкапсулирование, компоненты кормов, лечебный препарат, энтеробактерии.

Работа посвящена биотехнологии приготовления сухих лечебных препаратов бактериофагов на основе компонентов коммерческих кормов для лечения и профилактики заболеваний, вызванных патогенными энтеробактериями. Полученные композиции фагов и препараты лечебных кормов были исследованы на лабораторных животных и птице при различных условиях введения, в том числе и при предъявлении через корм. Во всех случаях получены положительные результаты, однозначно свидетельствующие о высокой эффективности композиции специфических бактериофагов (SG-3, SG-6, C11 и F62), а также (V7811, V7817), инкорпорированных в состав сухих кормов, для лечения и профилактики сальмонеллезной и эшерихиозной инфекций у животных и птицы

Введение. Одним из основных источников кишечных заболеваний человека являются продукты питания, в том числе продукты птицеводства (мясо и яйцо), инфицированные патогенными микроорганизмами, особенно представителями родов *Salmonella* и *Escherichia*.

Использование антибиотиков для борьбы с кишечными инфекциями в настоящее время не рационально по причине высокой вероятности спонтанного появления антибиотикорезистентных патогенов бактериальной природы. В качестве альтернативы антибиотикам в последние годы активно рассматриваются бактериофаги - вирусы, специфически лизирующие бактериальные клетки патогенных микроорганизмов [1, 2].

Бактериофаги могли бы способствовать получению экологически чистых продуктов птицеводства, если бы существовали малозатратные и масштабируемые технологии приготовления препаратов бактериофагов.

Для достижения высокого уровня сохраняемости биологических свойств бактериофагов на технологических стадиях получения препарата и в процессе его хранения и применения требуется использовать недорогие, но эффективные защитные соединения.

Бактериофаги, должны быть также защищены от действия клеточных и гуморальных факторов иммунитета, литических секретов и ферментов внутренней (полостной) среды организма. Высока вероятность, что защита бактериофагов может быть достигнута при инкапсулировании или иммобилизации фаговых частиц на различных носителях, включая природные и синтетические полимеры органической природы. Например, для обработки поверхности кожных покровов успешно использовали бактериофаги, защищенные органическими полимерами, такими как карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, хитозан [1,2]. Цель исследования - разработать доступную технологию приготовления сухих препаратов бактериофагов с использованием природных компонентов, традиционно входящих в состав кормов.

Материалы и методы исследований. Из основ науки ангидробиоинженерии [3] следует, что для обратимой консервации микроорганизмов, включая бактериофаги и вирусы, из них следует удалить приемлемым способом избыток влаги.

Для обезвоживания бактериофагов был использован контактно-сорбционный метод высушивания [4,5], который по своей сути близок к методу «L-высушивания». В качестве поглотителей влаги применены высушенные растительная мука или соевый протеин, мелкие или крупные фракции стандартного корма для животных и птицы. Такого рода сухие вещества после смешивания в определенном соотношении с фаговой суспензией связывают основную массу воды. Сорбированная вода затем удаляется другим способом, обеспечивая кондиции готового продукта по остаточной влажности (8-10%). Сухие препараты, содержащие жизне-

способные бактериофаги, используются как добавки к корму, либо непосредственно в виде корма, что определяется дозой бактериофагов в соответствии с установками по профилактике и лечению.

Другим способом обезвоживания является сублимационное высушивание на лабораторных установках в соответствии с выбранными режимами. Подобранные сочетания защитных соединений позволяет получить после высушивания до 50% жизнеспособных бактериофаговых частиц. Лиофилизированные препараты хорошо диспергируются в воде, они пригодны для инъекционного введения, для выпаивания, а также могут использоваться для аэрозольной обработки животных и птицы.

Методика сублимационного высушивания была использована для получения препаратов с высокой концентрацией бактериофагов. Способ лиофилизации, однако, не всегда пригоден для сушки бактериофагов из-за отсутствия достоверных данных об оптимальном уровне остаточной влажности в сухих препаратах различных бактериофагов.

В качестве защитных соединений применены протеины (соевый белок), растительная мука, органические полимеры (декстраны, полиглюкин, крахмал, поливинилпирролидон), а также известные природные соединения, которые часто используются в виде кормовых добавок. Эти соединения обволакивают частицы бактериофагов и защищают их от действия внешних неблагоприятных факторов, а также при действии кислот в желудочно-кишечном тракте животного или птицы.

Бактериофаги, лизирующие бактерии *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella Gallinarum-pullorum*, *Salmonella Cholerae suis*, *Escherichia coli*, были выделены из фекальных масс птицы и сточных вод убойных цехов птицефабрик. В качестве лечебного фагового препарата использовали смесь очищенных специфических антисальмонеллезных бактериофагов (SG-3, SG-6, F62, C11 и BM), которая была включена в состав гранул (частиц) приготовленного корма.

Бактериофаги размножали на культуре чувствительных бактерий *S. Enteritidis* в жидкой питательной среде. Концентрацию бактериофагов определяли при титровании препаратов на культуре тех же бактерий и выражали в бляшко-образующих единицах (БОЕ). Титры исходных фаговых препаратов находились в пределах $1 \cdot 10^{12}$ - $1 \cdot 10^{14}$ БОЕ.

Результаты и их обсуждение. В процессе разработки технологии получения сухих препаратов проведено изучение выживаемости фагов в гранулах комбикорма с использованием бактериофага Г-1, специфичного в отношении *S. Enteritidis*, взятого в концентрации $1 \cdot 10^{11}$ БОЕ/мл.

Препараты бактериофагов при использовании компонентов кормов, получали методом экструзии с последующим дроблением до достижения оптимального размера частиц (2-3 мм). Инструментальный контроль уровня остаточной влажности осуществляли как в процессе обезвоживания, так и при закладке бактериофаговых препаратов на хранение для последующего использования.

Обезвоживание фаговой суспензии проводили в смесителе контактно-сорбционным способом с использованием комбинаций различных носителей.

Проведенные исследования показали, что контактно-сорбционное высушивание суспензии бактериофагов на комбинациях носителей в целом дает неплохие результаты. Выживаемость бактериофагов в зависимости от варианта композиции составляла от 4,3 до 17,3%, что сравнимо с результатами, получаемыми в таких условиях для клеток бактерий [6]. Низкая выживаемость фага при использовании сорбента - TiO_2 объясняется пересушиванием материала (о.в. 0,79%), что необходимо учитывать при создании сухих бактериофаговых препаратов.

Уровень инактивации бактериофагов в процессе хранения был оценен после исследо-

вания герметично укупоренных кормовых препаратов, находившихся при температуре от 2 до 8 °С в течение 60 дней. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. - Сохранение жизнеспособности бактериофагов при хранении

№	Препарат	Вес пробы, мг	Титр фага в препарате, БОЕ		Выживаемость %
			до хранения	через 60 дней	
1	Фаг + соевая мука	50	2,9'10 ⁸	4,4'10 ⁸	100
2	Фаг + ПВП + соевая мука	50	2,1'10 ⁸	5,0'10 ⁸	100
3	Фаг + смесь корм: соевая мука (1:1)*	108	2,0'10 ⁸	2,7'10 ⁸	100
4	Фаг + смесь корм: соевая мука (1:1)**	104	1,7'10 ⁸	3,9'10 ⁸	100

* - выдавлено через "фильтры", гранулы высушены в токе горячего воздуха.

** - выдавлено через "фильтры", гранулы высушены на окиси алюминия.

Из приведенных в таблице 1 результатов следует, что бактериофаги, инкорпорированные в гранулы соевого комбикорма, способны сохранять жизнеспособность, и практически не инактивируются в течение 60 дней при температуре от 2 до 8 °С.

Комплексные препараты бактериофагов, подтвердившие стабильность при длительном хранении, были использованы для лечения экспериментальных сальмонеллезной инфекции и колисептицемии у белых мышей и бройлерных цыплят.

Для моделирования сальмонеллезной инфекции у цыплят был выбран штамм *S. Enteritidis* 92, вирулентные свойства которого изучены ранее на белых мышах. При заражающей дозе 1,2'10⁷ ж.м.к. оказались инфицированными сальмонеллами 66,6 % цыплят. Исходя из этих данных, для заражения цыплят выбрана доза около 1'10⁸ ж.м.к.

В опытах на белых мышах установлено, что лечение экспериментального сальмонеллеза путем выпаивания им суспензии бактериофагов является не эффективным, в то время как скармливание фагов с гранулами корма позволяет вылечить 40-50% зараженных животных.

В опытах на бройлерных цыплятах, взятых в количестве 60 особей, все цыплята получили на второй день жизни *per os* около 6,9x10⁷ клеток *S. Enteritidis* 92. Контрольная группа лечения не получала, а опытная имела свободный доступ к кормовым гранулам, содержащим 2 x10⁸ БОЕ/г фаговых частиц, в течение последующих 25 дней. По окончании эксперимента в нелеченной (контрольной группе) культура сальмонелл обнаружена у 30 особей в селезенке и у 19 - в печени, в то время как в группе, потреблявшей бактериофаг в составе корма, были поражены только 2 особи (селезенка) и одна (печень).

Полученные результаты свидетельствуют об эффективном действии фагового препарата, предъявленного в составе лечебного корма, для профилактики сальмонеллеза у цыплят.

Заключение. В результате проведенных исследований разработаны лечебные формы бактериофаговых препаратов, пригодные для профилактики и лечения сальмонеллеза птиц на основе компонентов коммерческих кормов:

Сухой лиофилизированный концентрат бактериофагов (10¹⁰-10¹¹ БОЕ/г) во флаконах и ампулах, пригодный для приготовления жидких и инкапсулированных сухих препаратов лечебно-профилактического назначения.

Сухая гранулированная лечебная добавка, содержащая бактериофаги (10⁸-10⁹ БОЕ/г)

для использования с комбикормом. Готовый комбикорм, содержащий иммобилизованные бактериофаги в дозировке (10^6 - 10^7 БОЕ/г), достаточен для профилактического и лечебного действия. Срок хранения препаратов лечебных кормов не менее 6 месяцев, препаратов, лиофилизированных в герметично закупоренных флаконах, - не менее одного года при 2-10 °С.

Библиографический список

1. Stanford K, McAllister TA, Niu YD et al. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle // *J Food Prot.* 2010 Jul;73(7):1304-12.
2. Ghanbari Hossein A., Averback Paul . Composition containing bacteriophage and methods of using bacteriophages to treat infections// US Patent 6,121,036 September 19, 2000
3. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM.. Anhydrobiosis // *Annu Rev Physiol.* 1992; 54:579-99.
4. Светоч Э.А., Перельгин В.В., А.Н.Панин и др. Биопрепарат на основе фагов для профилактики и лечения сальмонеллеза животных //Патент РФ N 2232808, 2004
5. Светоч Э.А., Перельгин В.В., А.Н.Панин и др. Биопрепарат на основе фагов для профилактики и лечения колибактериоза (эшерихиоза) животных //Патент РФ N 2244747, 2004 .
6. Перельгин В.В. и др. Способ контактной сушки микроорганизмов. Описание изобретения // патент N2067114, 1996.

**OBTAINING DRY THERAPEUTIC PREPARATIONS
OF BACTERIOPHAGES WITH USING THE COMPONENTS
OF COMMERCIAL FODDERS**

Pereygin V.V., Svetoch E.A., Pokhilenko V.D., Volozhantsev N.V.

Key words: *bacteriophages, dehydration, encapsulation, the component of fodders, therapeutic preparation, enterobacterium.*

Work is dedicated to the creation of the biotechnology of the preparation of the dry therapeutic preparations of bacteriophages on the basis of the components of commercial fodders for treatment and preventive maintenance of the diseases of those caused by pathogenic enterobacteria. The obtained compositions of phages and the preparations of therapeutic fodders were on their basis investigated on laboratory animals and bird with the varied conditions of introduction, including with the presentation through the fodder. In all cases was obtained the positive results, which testify about the high efficiency of the composition of specific bacteriophages (SG-3, SG-6, C11 and F62), and also (V7811, V7817) the incorporated into the composition dry fodders for the treatment and the preventive treatment of salmonellosis and escherihiosis infections in animals and bird