

На правах рукописи



003448923

/

ЧИРКОВА
Ирина Владимировна

**Биологические свойства бактериофагов
к *Salmonella typhimurium* и их применение
в борьбе с сальмонеллезом голубей**

16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

16 ОКТ 2008

Москва 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВМиБ).

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Пименов Николай Васильевич.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Бессарабов Борис Филиппович;
кандидат ветеринарных наук
Капустин Андрей Владимирович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ГНУ ВИЭВ).

Защита диссертации состоится «24» октября 2008 г. в «14»00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.042.01 при Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» по адресу: 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23; тел. (495) 377-93-83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Автореферат разослан «23» сентября 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
профессор



Т.Н. Грязнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Становится все болсс распространенным разведение голубей. Среди бактериальных инфекций голубей сальмонеллез занимает одно из ведущих мест (Гусев В.В., 2005). Основной серовариант, вызывающий эпизоотический процесс на голубятнях относится к серогруппе В – *Salmonella typhimurium* (Georgiades G.K., 2002 г). Кроме того, *S. typhimurium* – основной возбудитель сальмонеллеза уток, гусей (80-90%) (Осидзе Д.Ф., 1987), и один из основных сероваров, вызывающих пищевые токсикоинфекции человека (Гусев В.В, 2005).

Борьба с сальмонеллезом голубей актуальна для обеспечения санитарного благополучия и профилактики пищевых токсикоинфекций человека, для лечения и профилактики сальмонеллеза клубных голубей, для профилактики сальмонеллеза в промышленном птицеводстве и животноводстве

Применение специфических и литически высокоактивных бактериофагов для борьбы с сальмонеллезом голубей позволит санировать птицу от сальмонеллоносительства, обеспечить защиту от заболевания с первых дней жизни, предотвратить поствакцинальные осложнения и повысить сохранность поголовья, ограничив применение антибиотиков

Цель и задачи исследований. Целью настоящих исследований являлось выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов к *S. typhimurium*, а также создание и определение эффективности применения фагового препарата для борьбы с сальмонеллезом голубей.

Для осуществления данной цели были поставлены задачи:

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по сальмонеллезу голубей в Московском регионе.
2. Выделить и селекционировать высокоактивные бактериофаги к *Salmonella typhimurium*.
3. Изучить морфологию, литическую активность, специфичность и спектр литического действия селекционированных фагов тифимуриум.
4. Создать фаговый препарат, изучить его профилактическую и лечебную эффективность для голубей в лабораторных условиях.
5. Изучить эффективность применения экспериментальных серий препарата в неблагополучных по сальмонеллезу голубятнях и вольерах.

Научная новизна. Изучена эпизоотическая ситуация по сальмонеллезу голубей

в г. Москве и Подмосковье. Выделены бактериофаги к *S. typhimurium*, селекционированы наиболее активные из них и изучены их биологические свойства. Создан биологический препарат Бактериофаг тифимуриум, предназначенный для лечения и профилактики сальмонеллеза голубей, изучена его профилактическая и лечебная эффективность в лабораторных и практических условиях. Терапевтическая эффективность препарата составила 100%.

Практическая ценность работы. Рекомендован для внедрения в биологическую промышленность и ветеринарную практику Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей с установленной эффективностью.

Разработаны и внедрены «Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза голубей».

Бактериофаги к *Salmonella typhimurium* депонированы в ФГУ ВГНКИ.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на Открытой Всероссийской научно-практической конференции «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 24-26.04.2007); на Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди аспирантов и молодых ученых вузов МСХ РФ (г. Воронеж и г. Москва, 2007); X Всероссийской медико-биол. конференции «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 20-21.04.2007), на Всероссийском конкурсе «Развитие АПК РФ» (Москва, 27-29.05.2008), межфакультетских заседаниях ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликованы 6 научных статей и методические рекомендации, одобренные Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ от 11.04.2008 № 25-25/16.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, сведений о практическом использовании результатов исследований, рекомендаций по использованию научных выводов, приложений. Список использованной литературы включает 185 источников, из них 43 – зарубежных авторов. Работа содержит 18 таблиц и 15 рисунков.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

1. Эпизоотическая ситуация по сальмонеллезу голубей в Москве и Московской области.

2. Биологические свойства выделенных и селекционированных бактериофагов к *S.typhimurium*.

3. Протективные и лечебные свойства препарата Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Работа выполнена в 2005-2008 г. в основном объеме на базе кафедры клинической диагностики и болезней молодняка ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Белые мыши массой 14-16 г – 320 голов, голуби различных пород, фазаны, лебеди, утки и другая птица – 1245 голов, штаммы и изоляты *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. dublin*, *S. newlands* и другие культуры микроорганизмов, питательные среды, О-; О- и Н- агглютинирующие сальмонеллезные сыворотки, электронный микроскоп JEOL-100 S, ДНК-амплификатор «Терцик», центрифуги, автоматические пипетки-дозаторы, бактериальные фильтры, водяная баня, термостат, микроскопы, лабораторная посуда и другие.

Бактериологическое исследование проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике сальмонеллезов животных и человека», утвержденным Департаментом ветеринарии РФ и Госкомсанэпиднадзором Минздрава РФ 18.06.96

Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили на базе ФГУ ВГНКИ, используя тест-системы НИИ эпидемиологии.

Выделение изолятов бактериофагов сальмонелл проводили из фекальных вод голубятен, используя метод обогащения, описанный Адамсом (1961). Изучение биологических и морфологических свойств фагов проводили методами, описанными А.С. Тихоненко (1968), В.Я. Ганюшкиным (1988), А.П. Пономаревым (2002) Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили по Н.А. Плохинскому в соответствии с методами, описанными в работах П.И. Ашмарина и А.А. Воробьева.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эпизоотическая ситуация по сальмонеллезу голубей

По результатам исследования патологического материала за 2004-2007 гг. в ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» число *S. typhimurium* среди случаев выделения сальмонелл других серовариантов от птиц в 2004 г. составило 6,2%, 2005 г. – 38,0%, 2006 г – 7,1%, в 2007 г. – 6,6%. От голубей в ФГУ ЦНМВЛ выделение *S. typhimurium* отмечали в период 2003-2007 гг. в среднем в

85,19% случаев.

При исследовании нами патологического материала от диких и синантропных птиц, декоративных голубей г. Москвы, Подмосковья за период 2004-2008 гг. положительные результаты на сальмонеллез отмечены в 97 из 123 анализов – 78,9%. *S.typhimurium* была выделена нами в 96%, *S. enteritidis* – в 1,6% случаях, в остальных случаях – другие виды сальмонелл.

Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов к *S.typhimurium*

По методу обогащения Адамса нами были исследованы пробы пометных вод и фекалий голубей, выделены 10 бактериофагов к *S. typhimurium*, из которых три: №5 ТЗ, №8 МЁ, №9 ММ – с наиболее высокой степенью литической активности.

Литическая активность фагов к эталонному штамму *S.typhimurium* М-2ф т-ДЕП, составила: по методу Аппельмана 10^{-10} , 10^{-8} и 10^{-10} ; по Грациа $3,6 \times 10^8$ БОЕ/см³, $1,0 \times 10^7$ БОЕ/см³, $1,4 \times 10^8$ БОЕ/см³ соответственно.

Для получения чистых колоний фагов морфологически однотипные негативные колонии клонировали 7 раз и из 10-кратных разведений фаголизата суспензии высевали по методу Грациа. Бактериофаги №5 ТЗ, №9 ММ формировали на бактериальном газоне круглые, прозрачные с ровными краями колонии диаметром 1,5-2,5 мм, №8 МЁ – крупные, прозрачные колонии диаметром 2,5-3,5 мм со вторичным ростом индикаторной культуры.

Исследованный спектр литической активности и диапазон специфичности фагов с музейными и полевыми культурами микроорганизмов представлен в таблице 1.

1. Диапазон специфичности бактериофагов №5 ТЗ, №8 МЁ, №9 ММ

Микроорганизмы	Бактериофаги		
	5 ТЗ	8 МЕ	9 ММ
<i>S typhimurium</i>	29/32	28/32	26/32
<i>S gallinarum-pullorum</i>	5/7	6/7	6/7
<i>S enteritidis</i>	8/10	9/10	8/10
<i>S. dublin</i>	3/4	4/4	3/4
<i>S newlands</i>	1/3	2/3	2/3
<i>Escherichia coli</i>	0/7	0/7	0/7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0/3	0/3	0/3
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0/2	0/2	0/2
<i>Proteus vulgaris</i>	0/2	0/2	0/2
<i>Proteus mirabilis</i>	0/3	0/3	0/3
<i>Pasteurella multocida</i>	0/2	0/2	0/2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0/2	0/2	0/2
<i>Listeria monocytogenes</i>	0/2	0/2	0/2

Примечание – в числителе – количество лизируемых культур бактерий, в знаменателе – количество тестируемых штаммов

Как видно из таблицы 1, селекционированные фаги показали широкий спектр литического действия: Phagum *S. typhimurium* №5 ТЗ лизировал 29 из 32, Ph. *S. typhimurium* №8 МЁ – 28 из 32, Ph. *S. typhimurium* №9 ММ – 26 из 32 изолятов *S. typhimurium*, кроме того, лизировали *S. enteritidis* (из 10 штаммов – 80-90%), *S. gallinarum-pullorum* (из 7 – 75-100%), *S. dublin* (из 4 – 85-100%), *S. newlands* (из 3 – 33-67%), но не лизировали бактерии других родов семейства Enterobacteriaceae и других семейств, что подтверждает специфичность их действия.

Изучение морфологии отобранных бактериофагов проводили при помощи электронно-микроскопических исследований на электронном микроскопе JEOL-100 S при ускоряющем напряжении 80 кВ с использованием метода негативного контрастирования с 2%-ным водным раствором уранил-ацетата в ГУ НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН при инструментальном увеличении в 53018 раз и фотографическом в 25-80 раз. Получены электронные фотографии фагов (рис. 1).

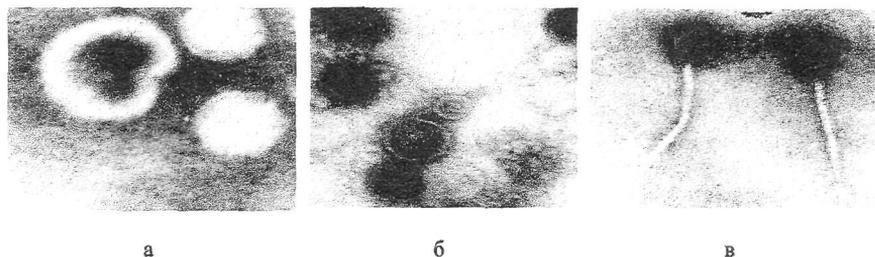


Рис. 1. Бактериофаги Phagum *S. typhimurium* (а - №5 ТЗ, б - №8 МЁ, в - №9 ММ)

По А.С. Тихоненко (1968) все три бактериофага были отнесены к IV классификационной группе. Это фаги с длинным, несокращающимся отростком с периодической исчерченностью и изометрическими головками, содержащими внутри двутяжевую ДНК, входят в семейство Siphoviridae, относятся к морфотипу В1. Основные размеры структурных элементов вирионов фагов Ph. *S. typhimurium* 5 ТЗ, 8 МЁ, 9 ММ представлены в таблице 2.

2. Размеры структурных элементов вирионов фагов, нм

Изолят бактериофага	Диаметр головки, нм	Диаметр хвостового отростка, нм	Ширина хвостового отростка, нм	Морфотип фага
№ 5 ТЗ	50	225	11	В1
№8 МЁ	64	120	11	В1
№9 ММ	37	117	10	В1

Как видно из таблицы 2, выделенные бактериофаги имеют сходную морфологию, размер головки от 50 до 100 нм. Фаг № 9ММ имеет диаметр головки 37 нм, но по остальным морфологическим свойствам сходен с бактериофагами № 5 ТЗ и № 8 МЁ.

Изготовление препарата Бактериофаг тифимуриум

Три высокоактивных бактериофага были депонированы в ФГУ ВГНКИ как Phagum Salmonella typhimurium №5 ТЗ – ДЕП, Phagum Salmonella typhimurium №8 МЁ – ДЕП, Phagum Salmonella typhimurium №9 ММ – ДЕП. На их основе приготовлен препарат для профилактики и лечения сальмонеллеза голубей с содержанием 10^8 фаговых частиц в 1 см^3 , консервированный 0,01% раствором хинозола (рис. 2).

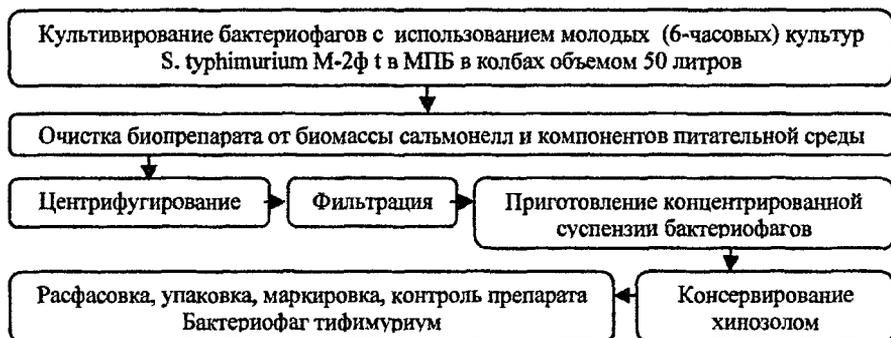


Рис 2. Схема изготовления препарата Бактериофаг тифимуриум

Готовый препарат – Бактериофаг тифимуриум против сальмонелллез голубей проверяли на стерильность высевом на МПА и в МПБ, а также на активность, для чего белым мышам массой 14-16 г (10 голов) подкожно вводили *S. typhimurium* M-2φ t в дозе 10 тыс. мкр. кл. ($5LD_{50}$) и, спустя 20 минут, – препарат в дозе $0,5 \text{ см}^3$. Контрольной группе лабораторных мышей вводили только культуру сальмонеллы в указанных дозах. Наблюдали 14 дней – в опытной группе сохранность составила 100%, тогда как в контрольной группе все 10 мышей пали, из их паренхиматозных органов была выделена *S. typhimurium*.

Таким образом, было установлено, что изготовленный препарат Бактериофаг тифимуриум активен и безопасен для белых мышей.

Экспериментальная инфекция сальмонеллеза голубей

Экспериментальную инфекцию сальмонеллеза голубей вызывали путем орального заражения невакцинированных голубей породы синий 3-месячного возраста. Всего было использовано 4 группы по 4 голубя на каждый тестируемый штамм *S. typhimurium* М-5в t, М-2ф t, Д-1в t из коллекции кафедры. Наблюдение за птицей вели в течение 14 дней после инфицирования, учитывали количество заболевших и павших.

Большая птица хохлилась, отмечали повышение температуры до 43,0-43,5°C, слабость, угнетение, одышку, анорексию, атаксию, диарею с содержанием слизи и желчи, в некоторых случаях – ринит и др. Гибель отмечали преимущественно на 5-10 сутки после инфицирования. При вскрытии наблюдали катаральное воспаление слизистой оболочки кишечника, незначительное увеличение селезенки, некротические узелки на печени.

Значения LD₅₀ составили для *S. typhimurium* М-5в t = 2,025 млн мкр. кл.; *S. typhimurium* М-2ф t = 2,8856 млн мкр. кл.; *S. typhimurium* Д-1в t = 3,135 млн мкр. кл.

Определение эффективности бактериофагового препарата в остром лабораторном опыте при сальмонеллезе голубей

Для определения профилактического действия Бактериофага тифимуриум голубям первой опытной группы (10 голубей 3-месячного возраста породы синий) орально вводили препарат из расчета 0,5 см³ индивидуально автоматической пипеткой-дозатором. Через 12 часов проводили заражение голубей смесью штаммов *S. typhimurium* М-5в t, *S. typhimurium* М-2ф t, *S. typhimurium* Д-1в t по 0,7 мл, в концентрации 5 млн мкр. кл. в 1 мл, т.е. общая инфицирующая доза составила 10,5 млн мкр. кл. (4 LD₅₀).

Голубям второй опытной группы бактериофаг выпаивали согласно разработанному временному наставлению. Необходимое для обработки поголовья птиц количество доз препарата добавляли в питьевую, предварительно кипяченую и охлажденную до 20-30°C воду, из расчета 10-20 мл на голубя на одно выпаивание. За три часа до выпойки Бактериофага тифимуриум голубей выдерживали без поения. Заражение птиц проводили через 12 часов аналогично первой группе. Птиц контрольной группы

инфицировали смесью штаммов в тех же дозах, но обработку бактериофагом не проводили.

Наблюдение вели 15 дней, после чего проводили убой и бактериологическое исследование трупов павших и убитых голубей. В результате проведенных лабораторных испытаний отмечены профилактические свойства 90-100% при 10% сохранности в контрольной группе (табл. 3).

3. Профилактическая эффективность применения Бактериофага тифимуриум

Группа	Количество голубей, голов	Заболело, голов	Пало, голов	Летальность, %	Выделение <i>S. typhimurium</i> от голубей	
					голов	%
1-опытная	10	0	0	0	0	0
2-опытная	10	1	1	10	1	10
Контрольная	10	9	9	90	10	100

Примечание: $P < 0,05$

Определение терапевтического действия Бактериофага тифимуриум проводили на 30 голубях породы синий 3-месячного возраста. Были созданы три группы: две опытные (по 10 голубей) и контрольная (10 голубей), которых кормили и содержали по принципу аналогов. Голубей всех групп инфицировали смесью: *S. typhimurium* М-5в т, *S. typhimurium* М-2ф т, *S. typhimurium* Д-1в т аналогично предыдущему опыту, затем через 12 часов голубям первой опытной группы орально вводили бактериофаг из расчета $0,5 \text{ см}^3$ препарата индивидуально. Голубям второй опытной группы бактериофаг выпаивали через 12 часов после инфицирования, добавляя его в питьевую воду. Голубей контрольной группы Бактериофагом тифимуриум не обрабатывали. Наблюдение вели 14 дней, после чего проводили убой и бактериологическое исследование трупов (табл. 4).

4. Терапевтическая эффективность Бактериофага тифимуриум в лабораторных условиях

Группа	Количество голубей, голов	Заболело, голов	Пало, голов	Летальность, %	Выделение <i>S. typhimurium</i> от голубей	
					голов	%
1-опытная	10	0	0	0	0	0
2-опытная	10	0	0	0	0	0
Контрольная	10	7	7	70	10	100

Примечание: $P < 0,05$

Из представленных в табл. 4 данных видно, что Бактериофаг тифимуриум обладает выраженными лечебными свойствами. У голубей, которым был выпоен бактериофаг, не было клинических проявлений сальмонеллеза. Через 14 дней при убое и бактериологическом исследовании в опытных группах сальмонелл не выделяли.

Таким образом, Бактериофаг тифимуриум обладает выраженной литической активностью против сальмонелл *in vivo*. Профилактическая эффективность препарата составила 90-100%, а терапевтическая – 100% при заражении голубей вирулентными штаммами *S. typhimurium* в лабораторных условиях.

Определение терапевтической эффективности препарата Бактериофаг тифимуриум в производственных условиях

Производственные испытания терапевтической эффективности Бактериофага тифимуриум были проведены на пяти голубятнях, расположенных в различных районах г. Москвы и Московской области.

Болезнь сопровождалась характерными клиническими признаками, острым, подострым и хроническим течением. Диагноз был подтвержден бактериологическими исследованиями и методом молекулярной диагностики в ПЦР.

Обработку голубей Бактериофагом тифимуриум проводили трижды с интервалом 48 часов в дозе 0,5 см³ на голубя групповым методом с питьевой водой в разведении 1:20.

На третьи сутки после начала фаготерапии состояние большинства заболевшей птицы улучшилось, появилась активность, восстановился аппетит, консистенция и цвет помета нормализовались, прекратились новые случаи заболевания и гибель птицы. При контрольных исследованиях положительных результатов на сальмонеллез не отмечали. За период наблюдения (6 месяцев) рецидивов сальмонеллеза на голубятнях не регистрировали.

5. Терапевтическая эффективность Бактериофага тифимуриум в условиях голубятен

Местоположение голубятни	Марьино, г. Москва	Кузьминки, г. Москва	г. Подольск, Моск. обл.	г. Домодедово, Моск. обл.	Бирюлево, г. Москва
1	2	3	4	5	6
Количество голубей, голов	162	76	295	150	75
Заболасваемость, %	69,1	13,6	15,2	58,0	14,7
Летальность, %	20,5	20,0	2,2	89,6	36,4

1	2	3	4	5	6
Падеж с начала лечения, гол	0	0	0	0	0
Бактериологический анализ через 14 сут. (смывы из клоаки)	сальмонелл не выделили				
ПЦР через 30 суток: - количество проб - получено положительных результатов	20 0	20 0	20 0	20 0	20 0

По результатам проведенных опытов показано, что при лечении сальмонеллеза в условиях голубятен Бактериофаг тифимуриум обладает 100% терапевтической эффективностью (табл. 5).

Экономическая эффективность полученных результатов лечения

Предотвращенный ущерб при лечении сальмонеллеза в среднем на 100 голубей составляет (при коэффициенте летальности 0,3; средней стоимости 1 голубя – 500 руб. и 90%-ной эффективности терапии) 10000 руб.

Один рубль вложенных средств позволяет получить экономический эффект в размере 16,67 руб. при условии, что цена одной дозы препарата составляет 2 рубля.

Изучение лечебного действия бактериофагового препарата в опыте на других видах птиц

Терапевтическая эффективность препарата была исследована в передвижном частном зоопарке «Ташир» и в зоопитомнике ФГУ «Московский зоологический парк».

В частном передвижном зоопарке «Ташир» в ноябре 2005 г. наблюдали заболеваемость уток, фазанов и других птиц сальмонеллезом, при этом у взрослой птицы отмечали матовое оперение, взъерошенный вид, апатию, периодически жидкий помет с зелеными прожилками, отставание в росте, повышение температуры тела, понижение аппетита.

Из 28 фазанов разных пород клиническую картину заболевания наблюдали у 6 (21%). 2 фазана 3-месячного возраста пали. При вскрытии павшей птицы обнаруживали катаральное воспаление слизистой оболочки кишечника, слизь на поверхности кишечника, мелкие кровоизлияния, очажки некроза в печени, на селезенке и другие изменения. *S. typhimurium* выделяли в смывах из клоаки у всех

фазанов. У 9 уток породы кряква отмечалась острая инфекция с развитием угнетения, анорексии, повышения температуры до 43,5-44,0°C, диарей. 5 уток из 9 пали. Утки положительно реагировали в ПЦР на сальмонеллез, из клоаки выделена сальмонелла.

Выпойку Бактериофага тифимуриум проводили групповым способом (1·20 с водой) всей птице зоопарка из расчета: перепелам – по 0,5 см³ препарата, фазанам, уткам – по 1 см³, селезням, павлинам – по 3 см³, гусям, лебедям – по 5 см³ трижды с интервалом 12 часов, четвертую и пятую выпойки – через 48 часов

На третьи сутки после начала фаготерапии состояние заболевших улучшилось, восстановился аппетит, оформился помет, температура к 5-6 дню лечения нормализовалась. Гибель птицы больше не отмечали, при бактериологическом анализе смывов из клоаки у фазанов и уток, проведенном через 14 суток, бактерий рода *Salmonella* не выделяли. ПЦР через месяц после начала фаготерапии не дала положительных результатов

В зоопитомнике Московского зоопарка наблюдали случаи заболевания голубей, уток, гусей и других птиц. В вольерах содержались 65 голубей, 30 гусей, 42 утки, 22 лебедя, 4 фазана, 1 павлин.

Клинически заболевание отмечали у 12 голубей (18,5%) породы гривуны, свердловские и др. в возрасте от 2 мес. до 2 лет. Заболевание характеризовалось типичными для сальмонеллеза клиническими признаками, у трех голубей отмечали неспособность к полету, опухание локтевых и коленных суставов. 8 голубей в возрасте от 2 до 8 мес. пали (смертность составила 12%) У уток отмечали схожие признаки, наиболее выраженные у утят 2-х месяцев. Пали 3 утенка из 8. У 1 золотистого фазана отмечали развитие угнетения, понижение аппетита, жидкий помет. У гусей, содержащихся в соседнем вольере, и у лебедей не отмечали клинических признаков заболеваний, однако из помета выделяли *S. typhimurium*.

Выпойку препарата проводили орально всей птице зоопарка. Лечение Бактериофагом тифимуриум показало высокую эффективность, выздоровление птиц к 4-6 суткам, отсутствие сальмонеллоносительства по результатам контрольных исследований на 10 день после начала лечения.

Таким образом, терапевтическая эффективность препарата Бактериофаг тифимуриум на птицах частного зоопарка «Ташир» и зоопитомника ФГУ «Московский зоологический парк» составила 100%.

Исследование возможности возникновения резистентности сальмонелл к бактериофагам

Инфицирование голубей *S. typhimurium* М-5в т орально в дозе 4 млн мкр. кл с однократной выпойкой Ph. *S. typhimurium* №9 ММ в дозе 0,5 см³ через 2 часа четырехкратно с интервалом 10 месяцев показало отсутствие возникновения фагорезистентности у сальмонеллы. Клинических признаков сальмонеллеза отмечено не было, в то время как у голубей контрольной группы без обработки фагом на второй день после заражения наблюдались признаки, характерные для сальмонеллеза: диарея с примесью слизи, вялость, взъерошенность, отказ от корма и гибель на 5-10 сутки.

Каждые 2 месяца проводили опыт, где на три чашки Петри высевали штаммы *S. typhimurium* Д-1в т, М-2ф т, М-5в т. Чашки делили на три сектора, в которые вносили по капле фагов: Ph. *S. typhimurium* №5 ТЗ – ДЕП, №8 МЁ – ДЕП, №9 ММ – ДЕП. Через сутки инкубирования проводили учет реакции по образованию зоны негативного роста, после чего культуры сальмонелл с каждого сектора агара вблизи границы с зоной негативного роста фага высевали в полужидкий агар и после инкубации помещали на хранение при температуре 4°С. По истечению двух месяцев проводили аналогичный опыт – на отдельные чашки высевали штаммы сальмонелл, хранившиеся в полужидком агаре и восстановленные при 8-12-часовом росте на МПБ. На каждую чашку Петри с высеванным штаммом сальмонелл капали те же фаги, что и в предыдущий раз. Данный опыт повторяли 8 раз с интервалом 60 суток. Активность фагов на изоляты сальмонелл оставалась неизменной – на каждый посев в течение 30 месяцев возникали очаги лизиса культуры бактерий примерно одинаковые по размеру. Изменений в структуре колоний и биологических свойствах *S. typhimurium* за время проведенных опытов выявлено не было.

Таким образом, при проведении опытов по возможности возникновения резистентности сальмонелл к фагам появления фагоустойчивых изолятов сальмонелл выявлено не было.

Выделение и селекция резервных бактериофагов для препарата Бактериофаг тифимуриум

На длительную перспективу применения препарата нами были продолжены выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов к *S. typhimurium*. По методу обогащения выделили дополнительно 29 бактериофагов, из них

13 – с активностью от 10^{-8} до 10^{-10} и 2 – с активностью 10^{-5} до 10^{-7} (табл. 6)

6. Свойства резервных фагов

Название фага	Морфология негативных колоний			Литическая активность по методу	
	форма	цвет	диаметр, мм	Апель-мана	Грация, БОЕ/см ³
11 ФЧ	круглые	прозрачные	5,0-8,0	10^{-10}	$3,2 \times 10^8$
12 Ф ₁ Г	круглые	прозрачные	0,5-1,0	10^{-8}	$1,7 \times 10^8$
13 ВГ	круглые	прозрачные	2,0-3,0	10^{-10}	$2,5 \times 10^8$
14 ПП	круглые	прозрачные	2,0-3,0	10^{-9}	$3,0 \times 10^8$
15 СС	круглые	прозрачные	2,5-3,0	10^{-10}	$4,0 \times 10^{10}$
16 ФЗ	круглые	прозрачные	2,0-3,0	10^{-9}	$5,0 \times 10^7$
17 Ф ₂ М	круглые	прозрачные	1,0-2,5	10^{-5}	$1,7 \times 10^7$
18 ГО	круглые	прозрачные	5,0-6,0	10^{-9}	$2,7 \times 10^7$
19 БЕ	круглые	прозрачные	1,0-2,0	10^{-5}	$1,7 \times 10^7$
20 Н ₂ Ж	крупные, круглые	полупрозрачные, с вторичным ростом	2,5-5,0	10^{-8}	$5,5 \times 10^7$
21 БИ	круглые	прозрачные	7,0-9,0	10^{-8}	$1,2 \times 10^7$
22 ПР	круглые	прозрачные	2,5-3,0	10^{-8}	$5,6 \times 10^8$
23 ТУ	круглые	прозрачные	1,5-2,5	10^{-10}	$1,2 \times 10^9$
24 Ф ₂ В	круглые	прозрачные	1,5-2,5	10^{-8}	$6,8 \times 10^7$
25 ПО	круглые	прозрачные	1,0-2,0	10^{-6}	$3,1 \times 10^5$

Изучением специфичности и спектра литического действия наиболее высокоактивных фагов был отмечен лизис *S. typhimurium* (из 20 музейных и полевых культур – более 90-100%), *S. dublin* (из 4 культур – 85-100%), *S. enteritidis* (из 15 – 80-90%), *S. gallinarum-pullorum* (из 7 – 75-100%), *S. newlands* (из 3 – 20-60%) и отсутствие литического действия на штаммы других энтеробактерий.

Структуры вирионов наиболее литически высокоактивных резервных бактериофагов характеризовали по электронно-фотографическим изображениям (табл. 7).

7. Размеры структурных элементов вириона, нм

Изолят бактериофага	Диаметр головки, нм	Длина хвостового отростка, нм	Ширина хвостового отростка, нм	Морфотип фага
11 ФЧ	53	230	5	В1
13 ВГ	68	133	3	В1
14 ПП	60	280	6	В1
15 СС	62	237	5	В1
16 ФЗ	50	150	5	В1
18 ГО	63	233	5	В1

Данные исследования позволили фаги *Ph. S. typhimurium* 11 ФЧ, 13 ВГ, 14 ПП, 15 СС, 16 ФЗ, 18 ГО отнести к IV классификационной группе по А.С. Тихоненко, семейству Siphoviridae и паспортизировать.

ВЫВОДЫ

1. Сальмонеллез – широко распространенное бактериальное заболевание голубей. Серовариант *Salmonella typhimurium* является основным возбудителем сальмонеллеза голубей (96%).

2. Выделенные нами бактериофаги Phagum *Salmonella typhimurium* №5 ТЗ, Ph. S. *typhimurium* №8 МЁ и Ph. S. *typhimurium* №9 ММ являются высокоактивными (активность по методу Аппельмана составила 10^{-10} , 10^{-8} и 10^{-10} , по Грациа – $3,6 \times 10^8$ БОЕ/см³; $1,0 \times 10^7$ БОЕ/см³; $1,4 \times 10^8$ БОЕ/см³ соответственно), специфичными и обладают широким спектром литического действия по отношению к возбудителям сальмонеллеза голубей

3. Фаги Ph. S. *typhimurium* №5 ТЗ, №8 МЁ, №9 ММ по строению относятся к IV группе по А.С.Тихоненко, семейству Siphoviridae и морфотипу В1.

4. Бактериофаги Phagum *Salmonella typhimurium* №5 ТЗ – ДЕП, Ph. S. *typhimurium* №8 МЁ – ДЕП, Ph. S. *typhimurium* №9 ММ – ДЕП депонированны в ФГУ ВГНКИ. На их основе изготовлен препарат Бактериофаг тифимуриум для профилактики и лечения сальмонеллеза голубей. Препарат безвреден и высокоактивен в подкожном тесте на белых мышах.

5. В лабораторных условиях протективная эффективность препарата Бактериофаг тифимуриум против сальмонеллеза голубей составила 90-100%, терапевтическая эффективность – 100% при гибели в контрольных группах 70-100% инфицированных голубей.

6. Бактериофаг тифимуриум эффективен в условиях голубятен. На 5 неблагополучных по сальмонеллезу голубятнях г. Москвы и Московской области лечение Бактериофагом тифимуриум позволило ликвидировать инфекционный процесс и сальмонеллоносительство: контрольные исследования на 14-е сутки после применения препарата бактериологическими методами и на 30-е сутки в ПЦР – отрицательны

7. Экономическая эффективность лечения сальмонеллеза у голубей Бактериофагом тифимуриум составила 16,67 руб. на 1 руб. затрат.

8. Терапевтическая эффективность Бактериофага тифимуриум была отмечена на птицах различных видов зоопитомника ФГУ «Московский зоологический парк» (голуби, утки, фазаны) и вольеров передвижного зоопарка «Ташир» (утки, фазаны) и составила 100%.

9. Применение фагов, включенных в препарат Бактериофаг тифимуриум, в течение 30 месяцев не вызывает потери или снижения фагочувствительности у сальмонелл в опытах на питательных средах и на голубях.

10. Дополнительно выделены и селекционированы 15 резервных фагов с активностью 10^5 - 10^{10} и широким спектром литического действия в отношении *S. typhimurium*, а также *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. newlands*. Электронная микроскопия *Ph. S. typhimurium* 11 ФЧ, 13 ВГ, 14 ПП, 15 СС, 16 ФЗ, 18 ГО из числа резервных позволила отнести их к IV классификационной группе по методике А. С. Тихоненко, семейству Siphoviridae и морфотипу В1.

СВЕДЕНИЯ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Научные данные, полученные в ходе работы, использованы для составления «Рекомендаций по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза голубей», одобренных Департаментом ветеринарии МСХ РФ (№ 25-25/162 от 11.04.2008)

Результаты, полученные при изучении эффективности Бактериофага тифимуриум, внедрены в ветеринарную практику голубятен и зоопарков России. Материалы научных исследований используются в учебном процессе в ФГУ ВПО МГАВМиБ.

Выделенные бактериофаги Phagum *Salmonella typhimurium* №5 ТЗ – ДЕП, *Ph. S. typhimurium* №8 МЕ – ДЕП, *Ph. S. typhimurium* №9 ММ – ДЕП депонированы в ФГУ ВГНКИ в качестве производственных.

Получено уведомление о положительном результате формальной экспертизы по заявленному патенту на препарат против сальмонеллеза голубей и способ лечения сальмонеллеза голубей

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

Изученные особенности сальмонеллеза голубей при экспериментальном инфицировании, эффективность применения Бактериофага тифимуриум рекомендуется учитывать при планировании противозооотических мероприятий при сальмонеллезе голубей.

Препарат Бактериофаг тифимуриум рекомендован специалистам и владельцам голубятен для профилактики и лечения сальмонеллеза птиц.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пименов Н.В. Биологические свойства бактериофагов *Salmonella typhimurium* и их терапевтическая эффективность против сальмонеллеза голубей /Н.В.Пименов, И.В. Чиркова //Молодежь и наука XXI века: Сб. науч. тр – Ульяновск. УГСХА, 2007. – С. 336-340.
2. Пименов Н.В. Фаговыделение, терапия и профилактика сальмонеллеза голубей /Н.В Пименов, И.В. Чиркова //Ветеринария. – 2007. – №10. – С. 24-27.
3. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза голубей /Н.В. Пименов, А.Н Куриленко, И.В. Чиркова, С.С. Яковлев. – М: МСХ РФ. – Изд. «МегАрт». – 2008 – 43 с.
4. Чиркова И.В. Биологические свойства бактериофагов против сальмонелл тифимуриум и их использование в борьбе с сальмонеллезом птиц /И.В. Чиркова, Н.В. Пименов //Ветеринария и кормление. – 2008. – №3 – С. 32-33.
5. Чиркова И.В. Применение бактериофагов для лечения сальмонеллеза голубей с целью снижения заболеваемости сальмонеллезом человека /И.В Чиркова //Фундаментальная наука и клиническая медицина: Человек и его здоровье: Сб. науч. тр – СПб, 2007. – С. 510-511.
6. Чиркова И.В. Специфическая профилактика сальмонеллеза голубей /И.В Чиркова //Вопросы ветеринарии и ветеринарной биологии: Сб тр. мол. уч. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2006. – Вып.3. – С. 117-122.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»
ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.
Подписано в печать 06 09.08.
Тираж 100 экз. Усл. п.л 1
Печать авторефератов (495) 730-47-74, 778-45-60