

Дрогалина Наталья Александровна

СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ И ФАГОУСТОЙЧИВЫХ
АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ SALMONELLA TYPHIMURIUM
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КУР

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва - 2008

Работа выполнена в лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против зоонозных болезней Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»), Россельхознадзора Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Ленев С.В.

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук
Тугаринов О.А.
кандидат ветеринарных наук
Серегин И.Г.

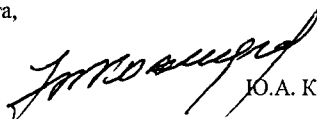
Ведущая организация - ФГОУ ВПО «Ульяновская Государственная сельскохозяйственная академия»

Защита диссертации состоится «19» февраля 2008 г. в «13⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Россия, 123022, Москва, Звенигородское шоссе, 5, ФГУ «ВГНКИ»)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ВГНКИ»

Автореферат диссертации разослан «19» декабря 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук,
Заслуженный ветеринарный врач РФ


Ю.А. Козырев

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Развитие промышленного птицеводства неизбежно сопровождается концентрацией поголовья птицы и увеличением заболеваемости инфекционными болезнями, в том числе и сальмонеллезом.

Сальмонеллез кур – инфекционная болезнь, характеризующаяся у молодняка явлениями септицемии, поражением органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, а у взрослых птиц – хроническим течением с поражением репродуктивных органов и бактерионосительством.

Профилактика и борьба с этой инфекцией у кур в промышленном птицеводстве сводятся к проведению организационных и ветеринарно-санитарных мероприятий, выявлению бактериологическими или серологическими методами зараженной птицы и ее ликвидации, применению антибиотиков и других химиотерапевтических препаратов (А.В. Куликовский, 1990). Однако, эффективность данных мер не обеспечивает благополучие птицеводческих хозяйств по сальмонеллезу. По мнению комитета экспертов ВОЗ, проблема не может быть решена без применения эффективных средств специфической иммунопрофилактики сальмонеллеза кур (Wray C. & Wray A., 2000).

В разных странах были предложены живые, инактивированные и химические вакцины против сальмонеллеза кур, однако только их применение не решало проблемы защиты цыплят первых дней жизни и санирования птицепоголовья от бактерионосительства (Б.Ю. Шустер, Ю.А. Малахов, 1984; Р. А. Barrow, 1991; В.А. Кузьмин, 1993; С.В.Ленев, Л.В. Киселева, 1995; С. Wray & A. Wray, 2000).

Сотрудниками ФГУ «ВГНКИ» (Малахов Ю.А., Ленев С.В., 1995) разработан препарат против сальмонеллеза кур «Сальмофаг энтеритидис», выпускаемый ФГУП «Ставропольская биофабрика». Препарат обладает высокой лечебной и профилактической активностью по отношению к *Sal. enteritidis* и *Sal. gallinarum-pullorum*.

В его состав входят: вакцинный генетически маркированный, фагоустойчивый штамм *Sal. enteritidis* и высокоактивные бактериофаги к эпизотическим штаммам сальмонелл *Sal. enteritidis* и *Sal. gallinarum-pullorum*.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы было селекционировать фагоустойчивые штаммы *Sal. typhimurium* и бактериофаги, перспективные для использования их в качестве производственных при изготовлении лечебно-профилактического препарата против сальмонеллеза кур (сальмофага).

Для достижения цели работы перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Выделить и селекционировать бактериофаги *Sal. typhimurium*.
2. Изучить биологические свойства штаммов бактериофагов *Sal. typhimurium*:
 - а) морфологию негативных колоний;
 - б) морфологию вирионов;
 - в) спектр литической активности;
 - г) способность к образованию литического фермента (Е-признак);
 - д) адсорбционные свойства;
 - е) характеристики фагов в цикле одиночного развития;
 - ж) серологические свойства.
3. Селекционировать фагоустойчивые высокоиммуногенные штаммы *Sal. typhimurium*.
4. Изучить расселение и сроки персистирования бактериофагов и фагоустойчивых аттенуированных штаммов в организме лабораторных животных (белые мыши, цыплята).
5. Изучить лечебную и профилактическую эффективность фагового и вакцинного компонентов Сальмофага тифимуриум на лабораторных животных (белые мыши, цыплята).

6. Изучить лечебную и профилактическую эффективность фагового и вакцинного компонентов экспериментального Сальмофага на лабораторных животных (белые мыши, цыплята).

Научная новизна. Выделены и селекционированы бактериофаги *Sal. typhimurium*, изучены их биологические свойства (морфология негативных колоний, вирионов, способность к образованию литического фермента, спектр литической активности, адсорбционные свойства, характеристики в цикле одиночного развития, серологические свойства). Определены сроки персистенции бактериофагов в организме мышей и цыплят, которые ограничены в среднем 10 сутками.

Селекционированы фагоустойчивые аттенуированные штаммы *Sal. typhimurium*, изучены их культуральные, морфологические, ферментативные, антигенные свойства, иммуногенность и остаточная вирулентность. Показано, что длительность персистенции аттенуированных штаммов *Sal. typhimurium* в организме цыплят ограничивается 15, а белых мышей – 26 днями.

В лабораторных условиях при испытании на белых мышках и цыплятах экспериментального препарата доказано, что введение в состав коммерческого сальмофага компонентов *Sal. typhimurium* расширяет спектр его лечебного и профилактического действия.

Практическая значимость работы. Селекционированные фагоустойчивые аттенуированные штаммы и бактериофаги *Sal. typhimurium* могут быть использованы как для создания Сальмофага тифимуриум, так и для введения в состав коммерческого препарата Сальмофага энтеритидис.

Разработан проект нормативной документации на Сальмофаг, включающий, в дополнение к *Sal. enteritidis*, новые фаговый и вакцинный компоненты *Sal. typhimurium*.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены и получили положительную оценку на:

- Международной научной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для человека и животных» – Ульяновск, 2006 г.

- Конференции молодых ученых ФГУ «ВГНКИ» «Лекарственные средства для животных и корма. Современное состояние и перспективы» - Москва, 2007 г.

- Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», посвященной 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2008 г.

- Международной научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел», посвященной 110-летию юбилею Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко – Москва, 2008 г.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей, в том числе 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 134 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения и выводов. Библиографический список включает 188 публикаций, из них 101 - зарубежные источники. Материалы иллюстрированы 6-ю электронно-микроскопическими фотографиями, 24 таблицами, 3 графиками, 1 диаграммой и документальным приложением.

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

1. Результаты изучения биологических свойств выделенных нами бактериофагов *Sal. typhimurium*.

2. Результаты изучения биологических свойств селекционированных нами фагоустойчивых аттенуированных штаммов *Sal. typhimurium*.

3. Результаты изучения профилактической и лечебной эффективности экспериментального Сальмофага против сальмонеллеза вызываемого *Sal. typhimurium* и Сальмофага против сальмонеллеза вызываемого *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* кур в лабораторных условиях.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2005-2008 г. на базе лаборатории качества и стандартизации лекарственных средств против зоонозных болезней ФГУ «ВГНКИ».

В качестве экспериментальных животных использовали: белых беспородных мышей массой 14-16 (1820 голов), цыплят кросса Ломан Браун 3-, 5-дневного возраста (550 голов), кроликов массой 3,5-4,0 кг породы «Шиншилла» (21 голова).

Были использованы следующие штаммы: *Sal. typhimurium* M-2, *Sal. typhimurium* 371Rif, *Sal. typhimurium* №3, *Sal. enteritidis* S-7, *Sal. enteritidis* R-6, штаммы гетерологичных сероваров сальмонелл, музейные штаммы различных родов семейства Enterobacteriaceae.

Изучение этиологической структуры сальмонеллеза птиц в Российской Федерации проводили совместно с С.С. Яковлевым (Россельхознадзор), О.Н. Витковой и М.В. Калмыковым (ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»).

Выделение изолятов фагов сальмонелл проводили из сточных вод птицефабрик. Для выделения фагов, использовали метод «обогащения», описанный Адамсом М (1961г).

Для выделения штаммов бактериофагов было исследовано 67 проб сточных вод птицефабрик.

Чистые линии фагов получали последовательным клонированием морфологически однотипных негативных колоний.

Активность бактериофагов определяли общепринятыми способами – по количеству жизнеспособных фаговых частиц методом Грациа (1936 г.), и по литической активности фагов методом Аппельмана (цит. по Зуеву В.А. 1969 г.).

Морфологию негативных колоний фагов изучали на плотных питательных средах, используя метод агаровых слоев, описанный Грациа (1936 г.).

Изучение морфологии вирионов фагов *Sal. typhimurium* проводили совместно с Маныкиным А.А. на базе института вирусологии имени Д.И. Ивановского на электронном микроскопе JEM-100B (JEOL) при инструментальном увеличении в 25000 раз и фотографическом увеличении в 6 раз.

Фагоустойчивый мутант штамма *Sal. typhimurium* №3 получали, культивируя его с равнообъемной смесью фагов *Sal. typhimurium*, с последующей селекцией клона, не расщепляющегося на фагочувствительные варианты.

Культуральные, морфологические, ферментативные, антигенные свойства и наличие генетических маркеров, а также остаточную вирулентность и иммуногенность полученных фагоустойчивых клонов исследовали в сравнении с исходным аттенуированным штаммом *Sal. typhimurium* №3 по общепринятым методикам.

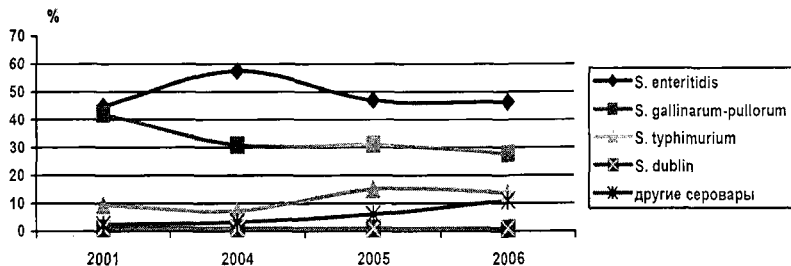
Эффективность вакцинного и лечебного компонентов сальмофара *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* определяли в остром лабораторном опыте на цыплятах кросса Ломан Браун.

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента (1962). Для обработки данных также использовали программу Statistica 7.0 (Statsoft, 2006 г.).

2.2. Результаты собственных исследований

При изучении эпизоотологической ситуации по сальмонеллезу птиц в России было установлено, что сальмонеллез, вызываемый *Sal. typhimurium*, является широко распространенной инфекционной болезнью сельскохозяйственной птицы. Отмечено, что *Sal. typhimurium* занимает третье место среди сальмонеллез у кур: *Sal. enteritidis* (46,4%), *Sal. gallinarum-pullorum* (27,8%) и *Sal. typhimurium* (13,8%).

Динамика сероваров сальмонелл



Необходимо отметить, что этиологическая структура сальмонеллеза птиц за последние годы существенно не изменилась. Вместе с тем, снизилось выделение от птиц серовара *Sal. gallinarum-pullorum* и увеличилось *Sal. typhimurium*, а также возросло число нетипированных сероваров.

Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Sal. typhimurium*

Из 67 проб сточных вод птицефабрик методом обогащения нами было выделено 14 изолятов бактериофагов *Sal. typhimurium*. Для получения чистых линий фагов проводили последовательное клонирование морфологически однотипных негативных колоний. После проведения пяти последовательных пассажей выделенных фагов их сравнивали по литической активности. В результате сравнения литической активности были отобраны 8 фагов, литическая активность которых по Аппельману была не ниже 10^{-7} : Phagum *Salmonella typhimurium* F-1, Ph. *Sal. typhimurium* F-2, Ph. *Sal. typhimurium* F-3, Ph. *Sal. typhimurium* F-4, Ph. *Sal. typhimurium* F-6, Ph. *Sal. typhimurium* F-7, Ph. *Sal. typhimurium* Stm-3 и Ph. *Sal. typhimurium* M-2.

Выделенные нами бактериофаги формировали четыре типа негативных колоний:

1) Колонии диаметром 4-6 мм, круглые, прозрачные, с ровными четкими краями, прозрачным центром и с зоной лизиса по периферии. К этому типу отнесены фаги F-1, F-6 и F-7.

2) Круглые, с ровными краями, диаметром 5-8 мм, с зоной роста устойчивых клонов бактерий вокруг прозрачного центра колонии и мутной зоной неполного лизиса вокруг. К этому типу отнесены фаги F-2, F-4.

3) Колонии диаметром 6-7 мм, круглые, с неровными краями, с прозрачным центром, мутной периферией и мутным ореолом вокруг колонии. К этому типу отнесены фаги F-3, M-2.

4) Колонии диаметром 2-3 мм, круглые, с ровными краями, прозрачным центром и мутной периферией. К этому типу отнесен один фаг - Stm-3.

Полученные клоны изолятов использовали для дальнейшего изучения биологических свойств бактериофагов, в частности, для электронно-микроскопических исследований морфологии их вирионов, являющейся одной из наиболее надежных характеристик для дифференциации фагов.

Большая часть вирионов выделенных фагов была сходна по размерам и строению.

По классификации Тихоненко А.С. (1968 г.) фаги M-2, F-1, F-2, F-3, F-4 относятся к IV группе, B1-морфотипу (семейство Siphoviridae) по классификации Н.В.Аскерманн (2001 г.), а фаг Stm-3 - к III морфологической группе и к C1-морфотипу (семейство Podoviridae) по классификации Н.В.Аскерманн (2001 г.).

Характеристики некоторых структур вирионов фагов *Sal. typhimurium* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Строение вирионов фагов S. typhimurium

Название фага	Размеры головки вириона, нм	Длина отростка, нм	Наличие базальной пластинки	Наличие сокращающегося чехла	Классификация		
					А.С. Тихоненко	Н.В.Аскерманн	Семейство
M-2	53±2,1х60±2,3	133±3,2	+	-	IV	B1	Siphoviridae
F-1	46±1,3х53±1,4	113±4,1	+	-			
F-2	60±4,2х67±4,0	134±2,8	+	-			
F-3	60±3,5х60±3,2	140±2,4	+	-			
F-4	60±3,6х60±3,8	133±1,5	+	-			
Stm-3	60±4,1х47±3,9	27±3,0	-	Установить не удалось	III	C1	Podoviridae

Для определения диапазона литической активности фагов было проведено определение фагочувствительности 29 музейных и 18 эпизоотических штаммов *Sal. typhimurium*.

Таблица 2

*Спектр литического действия штаммов
бактериофагов Salmonella typhimurium*

Штамм бактерий	Штамм бактериофага							
	F-1	F-2	F-3	F-4	Stm-3	F - 6	F-7	M-2
<i>Sal. typhimurium</i> (музейные штаммы)	26/29*	29/29	21/29	29/29	25/29	18/29	22/29	19/29
<i>Sal. typhimurium</i> (изоляты)	17/18	18/18	14/18	18/18	17/18	16/18	16/18	15/18

* - в числителе указано количество штаммов, лизируемых бактериофагом; в знаменателе - количество всех тестируемых штаммов.

Спектр специфичности выделенных фагов ограничен пределами подвида *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

Установлена способность фагов лизировать штаммы сальмонелл серогруппы B (*Sal. typhimurium*, *Sal. abortusovis*, *Sal. abortusequi*), серогрупп D (*Sal. dublin*, *Sal. enteritidis*), C (*Sal. choleraesuis*) и E (*Sal. london*, *Sal. anatum*).

Формирование фагами литического фермента внутри зараженных ими бактериальных хозяев варьировало незначительно.

Изучаемые нами фаги обладали выраженной антигенной специфичностью. По значениям констант скорости нейтрализации нейтрализующая активность антисывороток, полученных нами к фагам M-2, F-2, являлась высокой и составляла, соответственно, 121 и 116 мин⁻¹. Иммуногенность фагов F-3, F-1, оцененная по константам нейтрализации, составляла 106 и 112 мин⁻¹. Фаги Stm-3, F-4, имеющие значения констант скоростей нейтрализации 73 и 94 мин⁻¹, соответственно, обладали низкой иммуногенностью.

Степень антигенного родства исследуемых фагов определяли по соотношениям между константами скорости нейтрализации в реакциях с гомологичными и гетерологичными антисыворотками. По результатам реакции, среди выделенных нами фагов можно было выделить три группы: группу фа-

гов F-1, F-2, являющихся родственными; фаг M-2, имеющий с ними незначительную степень антигенной общности; и фаги F-3, F-4, Stm-3 представляющие собой обособленные серологические типы. При перекрестных реакциях нейтрализации с антисыворотками к изучаемым фагам константы равнялись нулю, что свидетельствовало об отсутствии общих антигенов у исследуемых групп фагов.

Для изготовления лечебно-профилактических бактериофагов рекомендуется использовать штаммы фагов, обладающие выраженной адсорбционной способностью, минимальным латентным периодом и высокой урожайностью.

Большая часть выбранных нами для изучения бактериальных хозяев эффективно адсорбировала на своих клетках фаговые частицы. За время 5-минутного контакта клеток с фагами Stm-3, F-4, M-2, F-1, F-2 и F-3 адсорбировалось 80-91 % фаговых частиц и константа скорости адсорбции достигала $5,0 \times 10^{-9} \text{ см}^3 \text{ мин}^{-1}$.

Характеристики взаимодействия в системе «фаг-клетка» варьировали в значительной степени.

Таблица 3

Характеристики фагов в одиночном цикле развития (n=3)

Характеристики цикла	Штаммы бактериофагов					
	M-2	F-1	F-2	F-3	F-4	Stm-3
Латентный период, мин	30	28	18	24	22	26
Период стабилизации лизиса, мин	4	8	6	6	6	8
Средняя урожайность на бактерию	267±33	277±41	320±9	213±16	225±22	91±10

Наилучшими репродуктивными способностями, сочетающими относительно высокое значение латентного периода с максимальной урожайностью, обладал фаг F-2.

Таким образом, изучение биологических свойств позволило провести нам дифференциацию выделенных фагов, а также выбрать из них штамм фага F-2 для использования в качестве лечебного компонента препаратов против сальмонеллеза кур.

В ходе экспериментов по определению сроков персистирования бактериофагов в организме животных установлено, что фаговые частицы наиболее длительное время сохраняются в печени и селезенке белых мышей, в печени и бурсе цыплят и ограничены в среднем 10 сутками. Введение в организм животного вирулентного штамма на 7-е сутки после введения бактериофага, увеличивало сроки персистирования и количество фаговых частиц в организме.

Аттенуированные фагоустойчивые штаммы *Sal. typhimurium*

Исходным штаммом для получения фагоустойчивого аттенуированного штамма был выбран супрессорный ревертант *Sal. typhimurium* №3. Этот штамм входит в состав вакцин против сальмонеллеза животных, в частности, в состав вакцины против сальмонеллеза водоплавающей птицы.

Фагоустойчивый мутант получали путем последовательного культивирования штамма *Sal. typhimurium* №3 с равнообъемной смесью 8 фаговых штаммов. После 9 последовательных циклов культивирования были получены фагоустойчивые клоны аттенуированного штамма, не расщепляющиеся на фагочувствительные варианты. По культуральным, морфологическим, ферментативным, антигенным свойствам, по наличию генетических маркеров полученные фагоустойчивые клоны были одинаковы с исходным аттенуированным штаммом *Sal. typhimurium* №3.

Остаточную вирулентность и иммуногенность фагоустойчивых клонов определяли в сравнении с аттенуированным штаммом *Sal. typhimurium* №3 на белых мышах. Для белых мышей массой 14-16 г ED_{50} наиболее иммуногенного из селекционированных фагоустойчивых клонов составила 2818 ± 350 . Остаточная вирулентность была стабильной после десятикратного пассажа на питательных средах и пятикратного пассажа через организм белых мы-

шей, составила при этом $LD_{50} 5 \times 10^7$ микробных клеток. ED_{50} исходного аттенуированного штамма *Sal. typhimurium* №3 равнялась 3162 ± 685 , LD_{50} - 5×10^7 микробных клеток.

Установлено, что фагоустойчивый вакцинный штамм сальмонелл персистировал в организме цыплят в среднем 15 дней, белых мышей - 26 дней.

В результате были отобраны наиболее перспективные, по нашему мнению, бактериофаги и фагоустойчивые аттенуированные штаммы *Sal. typhimurium*, что позволило изготовить экспериментальный препарат сальмофага, состоящего из фагового и вакцинного компонентов.

Испытание эффективности экспериментального сальмофага в лабораторных условиях

Протективные и лечебные свойства сальмофага *Sal. typhimurium* определяли на цыплятах 3- дневного возраста кросса Ломан Браун.

Для изучения протективного эффекта сальмофаг *Sal. typhimurium*, содержащий 10^8 фаговых частиц в 1 мл фагового и 2 млрд. микробных клеток вакцинного компонента, выпаивали цыплятам в 3-дневном возрасте (первая группа). Повторную выпойку препарата проводили в возрасте 5 дней.

Через 14 дней после повторной выпойки препарата цыплят первой и контрольной групп заражали вирулентным штаммом *Sal. typhimurium* 371Rif (10 млрд. микробных клеток).

Для изучения лечебного эффекта цыплятам второй группы за четыре часа до введения фагового и вакцинного компонентов сальмофага *Sal. typhimurium* выпаивали вирулентный штамм *Sal. typhimurium* 371Rif в дозе 10 млрд. микробных клеток.

Через 14 дней проводили диагностический убой всех цыплят с последующим бактериологическим исследованием.

Таблица 4

Протективный и лечебный эффект сальмофага Sal. typhimurium

Показатель	Группы цыплят		
	1 группа	2 группа	контроль
Цыплят в группе, гол	30	30	30
Пали (гол.)/%*	3±0,05 (10%)	6±0,07 (20%)	7±0,08 (23%)
Вынужденно убитые, гол	27	24	23
Носителей сальмонелл из вынужденно убитых (гол.)/%**	0	0	23±0,09 (35%)
Общее количество цыплят, от которых выделена сальмонелла (гол.)/%*	3±0,05 (10%)	6±0,07 (20%)	30 (100%)
Эффективность, %	90	80	0

Примечание: $p < 0,001$

* - % от общего количества цыплят в группе;

** - % от количества вынужденно убитых цыплят в группе.

В результате установлено, что сохранность цыплят в первой группе, вакцинированных *Sal. typhimurium*, составила 90,0%. Сохранность цыплят во второй группе (лечебный эффект сальмофага *Sal. typhimurium*) составила 80,0%. Выделение сальмонелл у цыплят в контрольной группе составило 100%.

Проведенные исследования показали, что одновременное введение фагоустойчивого вакцинного штамма *Sal. typhimurium* и высокоактивного бактериофага позволяет предотвратить заражение животных сальмонеллами в период формирования иммунитета к возбудителю.

При испытании профилактической эффективности фагового компонента установлено, что наилучший защитный эффект оказывал препарат, содержащий 75% фагов *Sal. enteritidis* и 25% фагов *Sal. typhimurium* – введение его животным предохраняло от гибели 100% мышей на 14 день после заражения вирулентными штаммами обоих сероваров сальмонелл. Фаги, введенные в соотношении 50:50, оказывали более низкий защитный эффект – введение их предотвращало гибель 66% животных. В группе, где были введены фаги в соотношении 25:75, к 14 дню отмечался защитный эффект только у 33% животных. Заражение животных, получавших только фаг *Sal. enteritidis* или *Sal.*

typhimurium, смесью вирулентных штаммов не оказывало защитного эффекта.

Протективные и лечебные свойства комплексного Сальмофага против *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* изучали в сравнении с Сальмофагом, выпускаемым ФГУП «Ставропольская биофабрика».

Для этого нами была изготовлена экспериментальная серия комплексного Сальмофага. Вакцинный компонент сальмофага содержал в 1 см^3 2×10^9 клеток фагоустойчивого аттенуированного штамма *Sal. typhimurium* K5 и 1×10^9 живых клеток фагоустойчивого штамма *Sal. enteritidis* R-6. Фаговый компонент препарата имел титр по Аппельману 10^9 по отношению к *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium*.

Оба компонента были не контаминированы посторонней микрофлорой и безвредны для лабораторных животных (белые мыши).

Комиссионные испытания эффективности вакцинного компонента комплексного Сальмофага проводили на 5-ти группах цыплят кросса Ломан Браун (Акт комиссионной проверки «Комплексного сальмофага» от 08.12.2008 г.). В группах использовали по 20 цыплят. Цыплят дважды обрабатывали препаратом в 3- и 5- дневном возрасте.

Первая группа цыплят получала комплексный Сальмофаг в профилактических целях. Фаговый компонент содержал два штамма фага в соотношении 75% *Sal. enteritidis* и 25% *Sal. typhimurium* и выпаивался в дозе 1 см^3 , вакцинный компонент содержал фагоустойчивые аттенуированные штаммы *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* в дозе 0,25 млрд. и 2 млрд. микробных клеток, соответственно.

Второй группе цыплят за четыре часа до введения комплексного Сальмофага выпаивали вирулентные штаммы *Sal. typhimurium* 371Rif (10 млрд. микробных клеток) и *Sal. enteritidis* S-7 (12 млрд. микробных клеток).

Цыплятам третьей группы выпаивали препарат Сальмофаг энтеритидис, изготовленный ФГУП «Ставропольская биофабрика», согласно наставлению по применению.

Цыплятам четвертой группы за четыре часа до введения Сальмофага энтеритидис выпаивали вирулентные штаммы *Sal. enteritidis* S-7 в дозе 12 млрд. микробных клеток и *Sal. typhimurium* 371Rif в дозе 10 млрд. микробных клеток.

Цыплята пятой группы - контрольные.

Через 14 суток после повторной выпойки препаратов цыплят 1, 3 и 5 контрольной групп заражали смесью вирулентных штаммов *Sal. enteritidis* (12 млрд. микробных клеток) и *Sal. typhimurium* 371Rif (10 млрд. микробных клеток).

Наблюдение за цыплятами проводили в течение 14 дней. После окончания срока наблюдения проводили диагностический убой цыплят всех групп с последующим бактериологическим исследованием.

Для дифференциации вирулентного штамма *Sal. typhimurium* 371Rif от вирулентного штамма *Sal. enteritidis* S-7 использовали его способность расти на средах, содержащих рифампицин (1200µg/ml).

Результаты испытания отражены в таблице 5.

Таблица 5.

Протективный и лечебный эффект сальмофага

Показатель	Группы цыплят				
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
Цыплят, гол	20	20	20	20	20
Пали (гол.)/%*	0	3±0,08 (15%)	6±0,1 (30%)	8±0,11 (40%)	14±0,1 (70%)
Вынужденно убитые, гол	20	17	14	12	6
Носителей сальмонелл из вынужденно убитых (гол.)	0	0	7	6	6
Общее количество цыплят, от которых выделена сальмонелла (гол.)/%*	0	3±0,08 (15%)	13±0,11 (65%)	14±0,1 (70%)	20 (100%)
Эффективность, %	100	85	35	30	0

Примечание: $p < 0,001$

* - % от общего количества цыплят в группе;

** - % от количества вынужденно убитых цыплят в группе.

Сохранность цыплят в опытных группах, вакцинированных *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium*, составила 100,0 % при заражении *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* и 35,0 % в группе цыплят, вакцинированных Сальмофагом, выпускаемым биологической промышленностью, при заражении обоими штаммами. Сохранность цыплят в группах с лечебным эффектом коммерческого (4) и комплексного (2) Сальмофагов составила 30,0 % и 85,0 %, соответственно. Выделение сальмонелл у цыплят в контрольных группах составило 100,0 %. Следует отметить, что в группах, вакцинированных коммерческим препаратом, при вскрытии выделялась *Sal. typhimurium*.

Из приведенных данных следует, что введение в состав сальмофага, выпускаемого биологической промышленностью, вакцинного и фагового компонентов *Sal. typhimurium*, значительно увеличивает лечебную и профилактическую эффективность препарата.

ВЫВОДЫ.

1. По результатам изучения этиологической структуры сальмонеллеза птиц в 2007 году основными сероварами сальмонелл, инфицирующими птицу в Российской Федерации, являются: *Sal. enteritidis* (46,4%), *Sal. gallinarum-pullorum* (27,8%) и *Sal. typhimurium* (13,8%).

2. В состав экспериментального Сальмофага включен штамм фага F-2, как наиболее активный из восьми отобранных для изучения бактериофагов и обладающий выраженной скоростью адсорбции $K = 5,0 \times 10^9 \text{ см}^3 \text{ мин}^{-1}$, коротким латентным периодом внутриклеточного развития – 18 мин, высокой урожайностью – 320 фаговых частиц из одной микробной клетки, широким спектром литической активности (100%) по отношению к музейным и эпизоотическим штаммам *Sal. typhimurium*.

3. Срок персистирования бактериофагов в организме белых мышей и цыплят составляет в среднем 10 дней.

4. Обработка животных селекционированным бактериофагом *Sal. typhimurium* F-2 до заражения предохраняет от гибели 88 % мышей и 100 %

цыплят при сохранности цыплят в контрольной группе, не превышающей 40-50 % и гибели 100 % мышей.

5. Наиболее иммуногенным из 6 селекционированных фагоустойчивых штаммов *Sal. typhimurium* №3 является K5. ED₅₀ штамма K5 для белых мышей массой 14-16 г составляет 2818 ± 350 , LD₅₀ - 5×10^7 микробных клеток. Сроки персистирования штамма в организме цыплят и мышей ограничены соответственно 15 и 26 сутками.

6. Сохранность цыплят при применении Сальмофага тифимуриум в группах по изучению профилактической эффективности составляет 90 %, а лечебной - 80 % поголовья.

Экспериментальный Сальмофаг, включающий фаговые и вакцинные компоненты *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* предохранял от заражения 100 % цыплят и оказывал лечебный эффект в 85 % случаях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Выделенные и селекционированные нами бактериофаги и фагоустойчивые аттенуированные штаммы *Sal. typhimurium* могут быть использованы для создания Сальмофага тифимуриум и усовершенствования коммерческого Сальмофага энтеритидис путем введения в его состав фагового и вакцинного компонентов *Sal. typhimurium*.

Научные данные, полученные в ходе работы, использованы для составления «Методических рекомендаций по профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур с использованием Сальмофага», утвержденных 15.12.2008 г. директором ФГУ «ВГНКИ», академиком РАСХН А.Н.Паниным.

Фагоустойчивый аттенуированный штамм *Sal. typhimurium* K5 и штаммы бактериофагов F-1, F-2, M-2 и Stm-3 депонированы во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, Россельхознадзора МСХ РФ.

Разработан проект СТО на Сальмофаг, включающий компоненты бактериофагов *Sal. enteritidis* и *Sal. typhimurium* и фагоустойчивые аттенуированные штаммы этих сероваров сальмонелл.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ленев С.В., Дрогалина Н.А., Бугаев С.А. Бактериофаги для лечения и профилактики сальмонеллеза птиц // Мат-лы Межд.науч.конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для человека и животных» – Ульяновск. – 2006. – с. 417.
2. Дрогалина Н.А., Ленев С.В. Селекция фагоустойчивых аттенуированных штаммов и бактериофагов *Sal. typhimurium* // Сб. науч. тр. ВГНКИ, - М., - 2007, - т. 68, - с. 80-86.
3. Ленев С.В., Дрогалина Н.А. Вакцинопрофилактика сальмонеллеза кур. // III Международный ветеринарный конгресс по птицеводству, - М., - 2007. – с. 153-156
4. Яковлев С.С, Ленев С.В., Дрогалина Н.А., Калмыков М.В., Виткова О.Н., Шурахова Ю.Н. Эпизоотическая ситуация по сальмонеллезам птиц в России //Ветеринария, - М., - 2008. - №6, - с. 12-13
5. Дрогалина Н.А., Ленев С.В. Изучение расселения и сроков персистенции бактериофагов в организме лабораторных животных // Материалы межд. научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных рыб и пчел» ВИЭВ - М., - 2008. – с. 325-328
6. Дрогалина Н.А., Ленев С.В. Повышение лечебной и профилактической эффективности сальмофага // Ветеринария и кормление, - 2008. – с. 32-



Для замстоk

Заказ № 135/12/08 Подписано в печать 17.12 2008 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,25



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru