

*На правах рукописи*



**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**

**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 «21» 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

2008А

11359

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Становится все более 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.

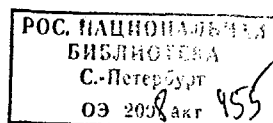
Применение специфических и литически высокоактивных бактериофагов для борьбы с сальмонеллезом голубей позволит санировать птицу от сальмонеллоносительства, обеспечить защиту от заболевания с первых дней жизни, предотвратить поствакцинальные осложнения и повысить сохранность поголовья, ограничив применение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

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 голубяток, 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/см<sup>3</sup>,  $1,0 \times 10^7$  БОЕ/см<sup>3</sup>,  $1,4 \times 10^8$  БОЕ/см<sup>3</sup> 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 МЁ  | 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 всех 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).

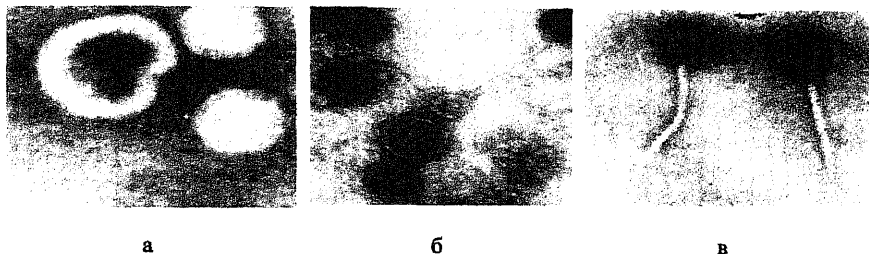


Рис. 1. Бактериофаги Phagum *S. typhimurium* (а - №5 ТЗ, б - №8 МЁ, в - №9 ММ)

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 двужезую 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  $1 \text{ см}^3$ , консервированный 0,01% раствором хинозола (рис. 2).

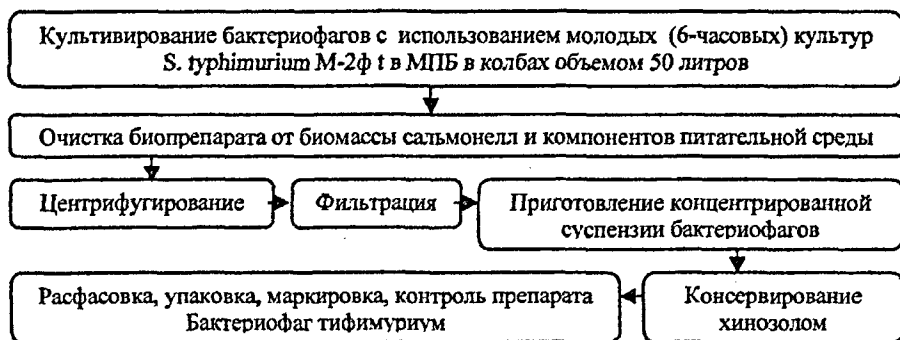


Рис 2. Схема изготовления препарата Бактериофаг тифимуриум

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.

Больная 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  $LD_{50}$  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 см<sup>3</sup> 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  $LD_{50}$ ).

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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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                  |
| Заболеваемость, %         | 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:<br>- количество проб<br>- получено положительных результатов | 20<br>0                | 20<br>0 | 20<br>0 | 20<br>0 | 20<br>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, диареи. 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 см<sup>3</sup> препарата, фазанам, уткам – по 1 см<sup>3</sup>, селезням, павлинам – по 3 см<sup>3</sup>, гусям, лебедям – по 5 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 проведения 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 | Аппельмана                      | Грациа, БОЕ/см <sup>3</sup> |
| 11 ФЧ               | круглые                       | прозрачные                         | 5,0-8,0     | $10^{10}$                       | $3,2 \times 10^8$           |
| 12 Ф <sub>1</sub> 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 <sub>2</sub> М | круглые                       | прозрачные                         | 1,0-2,5     | $10^5$                          | $1,7 \times 10^4$           |
| 18 ГО               | круглые                       | прозрачные                         | 5,0-6,0     | $10^9$                          | $2,7 \times 10^7$           |
| 19 БЕ               | круглые                       | прозрачные                         | 1,0-2,0     | $10^5$                          | $1,7 \times 10^4$           |
| 20 Н <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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. Сровариант *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/см<sup>3</sup>;  $1,0 \times 10^7$  БОЕ/см<sup>3</sup>;  $1,4 \times 10^8$  БОЕ/см<sup>3</sup> 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.Тихонско, 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 депонированы 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 мышцах.

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 сальмонеллы 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. Тихоенко, 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 МЁ – 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 противозoonотических 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**

2008A

11359

08-1 1359