

И.В. Чиркова, Н.В. Пименов

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ PHAGUM SALMONELLA TYPHIMURIUM И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БОРЬБЕ С САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ ПТИЦ.

Бактериофаги, биологические специфичные вирусоподобные объекты, были открыты еще в 1915 году английским бактериологом F. Twort и в 1917 году канадским ученым E. d'Herle. Незаслуженно забытые с наступлением эры антибиотиков, в настоящее время они заслуживают внимание. Рассвет антибиотикотерапии привел к проблемам, вызванным появлением лекарственно-устойчивых патогенных и условно-патогенных бактерий, а борьба со многими бактериальными заболеваниями, опасными для человека и животных, сопровождается многочисленными трудностями при применении только химиотерапевтических средств.

В связи с этим в настоящее время растет актуальность применения безопасных биологических объектов для лечения заболеваний и повышается интерес к изучению их действия.

Бактериофаги лизируют бактериальные клетки, к которым специфичны, обеспечивая бактерицидный эффект. Механизм действия фагов состоит в проникновении и взаимодействии их с геномом клетки бактерии, что приводит к лизогенному или литическому эффекту. При литическом типе инфекции бактериофаги в бактерии сразу начинают размножаться, быстро разрушая клетку. При лизогенном взаимодействии геном фага внедряется в геном бактерии и передается из поколения в поколение. При этом, время от времени в бактериальных клетках синтезируются вирионы, лизирующие эти клетки и выходящие затем во внешнюю среду [1, 2].

Бактериофаги подразделяются на вирулентные и умеренные, в зависимости от характера взаимодействия с микробной клеткой. Вирулентные фаги вызывают литический эффект, а умеренные – лизогенный. При взаимодействии вирулентных фагов с бактерией выделяют несколько стадий – адсорбцию, проникновение, биосинтез нуклеиновой кислоты и белков, сборку и выход из клетки с ее разрушением. Взаимодействие вирулентных фагов завершается лизисом бактериальной клетки и выходом из нее новых фаговых частиц. В результате такого цик-

ла размножения, длящегося 30-40 минут может образоваться до 200 фаговых частиц. Литические формы фагов есть основной элемент биологической борьбы с бактериальной инфекцией. Их поиск и изучение свойств представляют большой интерес [1, 2].

Умеренные бактериофаги, в свою очередь, инфицируют клетку, но не вызывают ее лизиса. ДНК бактериофага, попавшая в клетку, интегрирует с ее генетическим аппаратом (профаг) и передается по наследству от клетки к клетке. Под действием различных факторов может происходить превращение профага в вегетативную форму, сопровождающуюся размножением бактериофага, лизисом клетки и выходом фагов [1, 2].

Целью наших исследований являлся поиск, выделение и изучение биологических свойств, а также селекция высокоактивных вирулентных бактериофагов против *Salmonella typhimurium*.

S. typhimurium – один из основных серовариантов сальмонелл, патогенных для молодняка крупного рогатого скота, свиней, пушных зверей, гусей, уток, фазанов, голубей, других животных и птиц. Кроме того, *S. typhimurium* является одним из основных возбудителей пищевых токсикоинфекций человека. Для голубеводства *S. typhimurium* – доминирующий возбудитель сальмонеллеза (более 90%) [3, 4].

За последние годы возросла эпизоотическая роль *S. typhimurium* в птицеводстве. На долю *S. typhimurium* среди всех зарегистрированных случаев сальмонеллеза у птиц приходится около 6-18% (по данным за 2004-2007 гг. ФГУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория»).

Все чаще выделяются высокоактивные штаммы сальмонелл. Например, LD₅₀ штамма *S. typhimurium* M 2-ф t₁, выделенного из трупа голубя в г. Москва в 2003 г., составил 5011 микробных клеток.

При исследованиях, проводившихся с 2005 г. по 2008 г., на первом этапе нами было проведено по методу Адамса [5] фаговыделение из пометных и сточных вод голубятен Москвы, Тулы, Московской об-

ласти.

Выделены 10 бактериофагов. Из них отобраны и селекционированы три наиболее литически активных бактериофага – Phagum Salmonella typhimurium № 5 ТЗ – ДЕП, Phagum Salmonella typhimurium № 8 МЕ – ДЕП, Phagum Salmonella typhimurium № 9 ММ – ДЕП, депонированные в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Литическая активность, определенная методом Аппельмана [6, 8], составила для Ph. S. typhimurium № 5 ТЗ – ДЕП – 10^{-10} , № 8 МЕ – ДЕП – 10^{-8} , № 9 ММ – ДЕП – 10^{-10} . Литическая активность определенная по методу Грациа [7, 8] составила: Ph. S. typhimurium № 5 ТЗ – ДЕП – $3,6 \times 10^8$ БОЕ/см³, № 8 МЕ – ДЕП – $1,0 \times 10^7$ БОЕ/см³, № 9 ММ – ДЕП – $1,4 \times 10^8$ БОЕ/см³⁰.

Бактериофаги при посеве на штамм-хозяине в течение 18 ч культивирования при 37° С формировали на бактериальном газоне негативные колонии: № 5 ТЗ – ДЕП и № 9 ММ – ДЕП – круглые, прозрачные с ровными краями колонии диаметром 1,5-2,5 мм, № 8 МЕ – ДЕП – крупные, прозрачные колонии диаметром 2,5-3,5 мм с вторичным ростом индикаторной культуры.

Изучение морфологии фагов проводили при помощи электронно-микроскопических исследований на электронном микроскопе JEOL-100 методом негативного контрастирования с 2%-ным водным раствором уранил-ацетата при инструментальном увеличении в 53018 раз и фотографическом 25-80 раз. В процессе электронного фотографирования были изучены фазы взаимодействия бактерий, запечатленные нами на электронных фотографиях, которые подтверждают характерные свойства литически активных бактериофагов.

По классификации А.С. Тихоненко [9] все три бактериофага по морфологии вирионов были отнесены к четвертой группе. Это фаги с длинным, несокращающимся отростком и изометрическими головками размером от 50 до 100 нм, содержащими внутри двутяжевую ДНК, входят в семейство Siphoviridae – общей чертой всех представителей которого является длинный, тонкий, несокращающийся отросток с периодической исчерченностью, напоминающий гофрированную трубку, длиной 1215-5450 А шириной 75-350 А; голо-

вка – в форме многогранника икосаэдрической формы [9].

Изучена биологическая активность выделенных штаммов к различным изолятам бактерий. Штаммы обладают широким спектром литического действия по отношению к изолятам Salmonella typhimurium, выделенным в неблагополучных по сальмонеллезу голубятнях, лизируют более 80-90% из 32 изолятов сальмонелл. Кроме того, выделенные бактериофаги лизируют S. enteritidis (было испытано действие на 10 штаммах – 80-90%), S. gallinarum-pullorum (на 7 штаммах – 75-100%), S. dublin (из 4 штаммах – 85-100%), S. newlands (на 3 штаммах – 20-60%), но не лизируют другие энтеробактерии – Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis и другие, что подтверждает специфичность их действия.

Большой спектр и высокая степень литической активности бактериофагов по Аппельману 10^{-7} - 10^{-8} (в то время как у сальмонеллезных бактериофагов, используемых в медицинских препаратах, активность 10^{-4} - 10^{-5}) позволили нам на базе данных бактериофагов создать лечебно-профилактический препарат Бактериофаг тифимуриум для борьбы с сальмонеллезом, вызванным S. typhimurium, в первую очередь птиц: голубей, а также лебедей, гусей, уток, фазанов, перепелов.

Бактериофаг тифимуриум обладает лечебным и профилактическим эффектом, saniрует организм от сальмонеллоносительства. Биологические свойства компонентов препарата позволяют, избегая антибиотикотерапию, предупреждать осложнения и выдерживать требования к качеству животноводческой продукции. При необходимости лечение возможно сочетать с пробиотиками и антибиотиками.

Лабораторное испытание препарата Бактериофаг тифимуриум в остром опыте проводили на 30 цыплятах 14-дневного возраста в сентябре 2007 г. Для этого были созданы три группы: две опытные (по 10 цыплят) и контрольная (10 цыплят), которых кормили и содержали по принципу аналогов.

Заражение цыплят проводили смесью из 2 изолятов S. typhimurium (с вирулентностью для белых мышей при подкожном инъецировании 5011 тыс. микробных клеток) в одинаковом количестве каждого изолята, орально в общей дозе 2 млн. микробных клеток (дозу определяли по опти-

ческому стандарту мутности энтеробактерий ВГНКИ).

После появления клинических признаков заболевания: потеря аппетита, одышка, угнетение, взъерошенность оперения, иногда – диарея (6-12 часов) цыплятам первой опытной группы орально вводили бактериофаг тифимуриум из расчета 0,5 мл при помощи автоматической пипетки-дозатора. Обработку проводили трижды с интервалом 12 часов, а затем с интервалом 48 часов еще 2 раза. За три часа до выпойки бактериофага тифимуриум цыплят выдерживали без поения. Цыплятам второй опытной группы использовали стандартный метод лечения с использованием энрофлоксацина – энрофлон 10%-ный раствор в дозе 0,5 мл на 1 л воды 5 дней согласно временному наставлению. Цыплят контрольной группы бактериофагом тифимуриум не обрабатывали и инфицировали в таких же дозах смесью культур *S. typhimurium*.

За птицей наблюдали 15 дней, после чего проводили убой. Бактериологическое исследование трупов павших и убитых цыплят проводили по схеме: посевы из паренхиматозных органов, крови сердца и красного костного мозга на МПА, МПБ, агар Эндо, висмут-сульфитный агар, окраска мазков-отпечатков и мазков растущих культур по Граму, реакция агглютинации с О-комплексными и О- и Н-агглютинирующими монорецепторными сальмонеллезными сыворотками.

Проведенные исследования показали, что в контрольной группе летальность составила 90%. Все павшие цыплята имели характерные клинические признаки и патологоанатомические изменения: одышку, потерю аппетита, диарею, энтерит, ринит и др. При бактериологическом исследовании у цыплят выделили *S. typhimurium*, обладающую характерными свойствами. По результатам опытов, сохранность цыплят в первой опытной группе составила 100%, сроки выздоровления составили 3-5 дней, сальмонеллоносительства на 15 сутки не было установлено, из патологоанатомического материала *S. typhimurium* не выделялась.

Традиционная схема лечения энрофлоксацином, оказалась менее эффективной, по сравнению с нашим способом лечения, так как во второй опытной группе летальность составила 30%, скрытое носительство – 20%.

Действие препарата бактериофаг ти-

фимуриум было проверено и в практических испытаниях – на голубятнях в Подольском и Домодедовском районах Московской области. Клиническая картина сальмонеллеза у голубей проявлялась взъерошенностью оперения, угнетением, одышкой, потерей координации движения, потерей способности к полету, иногда – «вертячкой», отказом от корма; помет становился жидким серого и зеленого цвета с примесью крови и слизи; у некоторых голубей отмечали ринит. Диагноз был подтвержден бактериологическими исследованиями и методом молекулярной диагностики (ПЦР). Летальность составляла 65% на голубятне в Домодедово (при заболеваемости 80%) и 1,7% на голубятне в Подольском районе при заболеваемости 14,3% (на фоне антибиотикотерапии).

Проведенный курс терапии бактериофагом тифимуриум в дозе 0,5 мл на голубя при групповой выпойке с водой трижды с интервалом 48 часов в течение месяца уже со вторых суток применения останавливали развитие заболеваемости, проявление клинических признаков заболевания и случаи гибели птицы. Через 14 суток при бактериологическом исследовании смывов из клоаки больных и других голубей из исследуемых голубятен бактерии рода *Salmonella* не выделялись. При контрольных исследованиях в ПЦР через 30 дней положительных результатов не было в выборочных 40 пробах крови из здоровенных голубятен. За период наблюдения – 6 месяцев рецидивов сальмонеллеза не отмечали.

Терапевтическая эффективность препарата была исследована в передвижном частном зоопарке «Ташир», где в ноябре 2005 г наблюдали заболеваемость уток, фазанов и других птиц сальмонеллезом. Клиническая картина заболевания проявлялась преимущественно у молодых фазанов (из 28 фазанов разных пород типичную клинику заболевания отмечали у 6 (21%)), 2 фазана 3-х месячного возраста пали.

У утят инфекция отмечалась в 25-40-дневном возрасте с гибелью 5 из 8 птиц. Все утки и фазаны положительно реагировали в ПЦР на сальмонеллез. При бактериологическом исследовании в 100% случаев из смывов клоаки всех птиц выделена *S. typhimurium*.

Выпойку Бактериофага тифимуриум против сальмонеллеза проводили групповым способом (1:20 с водой) всей пти-

Таблица.
Свойства резервных бактериофагов

	11-фч	13- вг	п-14	1 15-S	16-фз	гол 18	бел-19	бир-21	праз-22	тула-23
Литическая активность по методу Апфельмана	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰
Литическая активность по методу Грациа	3,2×10 ⁸	2,5×10 ⁸	3,0×10 ⁸	40×10 ⁹	5,0×10 ⁷	2,7×10 ⁷	3,0×10 ⁷	1,2×10 ⁷	3,6×10 ⁷	1,2×10 ⁹
Морфология негативных колоний	Круглые, прозрачные с ровными краями, диаметр 5,0-8,0 мм	Круглые, прозрачные колонии с ровными краями, диаметр 2-3,0 мм	Круглые, прозрачные колонии с ровными краями, диаметр 2-3,0 мм	Круглые колонии с неровными краями 3,0- 5,0 мм в диаметре	Круглые, прозрачные колонии с ровными краями, диаметр 2,0-3,0 мм	Круглые, прозрачные с неровными краями до 6 мм в диаметре	Круглые, прозрачные, с неровными краями, диаметр 5,0- 7,0 мм	Круглые, прозрачные с неровными краями колонии 7,0-9,0 мм	Круглые, прозрачные с неровными краями, диаметр 0,5 см	Круглые, прозрачные колонии с ровными краями диаметром 1,5- 2,5 мм

це зоопарка из расчета: перепелам – по 0,5 мл препарата, фазанам, уткам – по 1 мл, селезням, павлинам – по 3 мл, гусям, лебедям – по 5 мл трижды с интервалом 12 часов, четвертую и пятую выпойки – через 48 часов.

На 3 сутки после начала лечения состояние птицы улучшилось, температура тела нормализовалась, восстановился аппетит, помет оформился, приобрел серо-коричневую окраску. Гибель птицы больше не отмечали. Через 15 суток при бактериологическом анализе смывов из клоаки у всех птиц зоопарка, бактерий рода *Salmonella* не выделяли.

Проведенные исследования показали биологическую активность фагов в отношении вирулентных сальмонелл *in vivo*, что доказывает возможность применения их для терапии и борьбы с сальмонеллезом птиц, вызванным *S. typhimurium*.

Но, параллельно встает вопрос о возможности длительного использования та-

кого метода лечения. Существует мнение, что к бактериофагам так же, как к антибиотикам, развивается устойчивость бактерий – достаточно одной мутации в рецепторах бактерии, чтобы вирус потерял способность в нее проникнуть [10, 11] Для исследования возможности и быстроты возникновения устойчивости бактерий к препарату бактериофаг тифимуриум нами были проведены исследования взаимодействия фаг-бактерия на примере вирулентного штамма *S typhimurium* M-5v t и бактериофага, входящего в препарат, в течение 30 месяцев на 15 голубях, которые содержались (с осени 2005 до весны 2008 г) в изолированном помещении.

Опытных голубей заражали выделенным штаммом сальмонелл *S typhimurium* M-5v t орально в дозе 2 LD₅₀ 1290 микробных клеток. Через 12 часов однократно голубям вводили фаг *P. S. typhimurium* № 9 ММ – ДЕП – в дозе 0,5 мл с питьевой водой. Эти же опытные группы голубей че-

рез каждые 10 месяцев были подвергнуты очередному заражению штаммом *S. typhimurium* М-5в t и обработкой бактериофагом № 9 ММ – ДЕП.

Для контроля создана группа птиц (по 2 птицы), не обрабатываемых бактериофагом, но зараженных бактериями.

За время опыта у голубей опытной группы клинических признаков сальмонеллеза выявлено не было, у голубей контрольной группы отмечали потерю аппетита, угнетение, гибель на 6-12 сутки после заражения. Через 14 дней проводили контроль реакцией ПЦР с кровью и бактериологическое исследование помета. У голубей контрольной группы из помета и из патологического материала выделена *S. typhimurium*. У птицы опытной группы сальмонеллу не выделяли, в ПЦР все реагировало отрицательно.

Опыт еще продолжается, за период наблюдения возникновения резистентности сальмонеллы к действию фага установлено не было.

Для изучения развития фагоустойчивости у сальмонелл каждые 2 месяца проводился опыт *in vitro* на чашках Петри.

На три чашки Петри были засеяны штаммы сальмонелл: *S. typhimurium* Д-1 vt, М-2 ф t, М-5 vt. Чашки были разделены на два сектора, в которые вносили по капле фагов: Phagum *Salmonella typhimurium* № 5 ТЗ– ДЕП, № 8 МЕ – 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 негативным ростом фа-

га высевали на полужидкий агар и ставили на 2 месяца в холодильник. По истечению двух месяцев проводили аналогичную реакцию – на отдельные чашки с полужидкого агара высевали штаммы сальмонелл, при этом на каждый штамм сальмонелл капали тот же бактериофаг, что и в предыдущий раз. Данный опыт повторяли через каждые 2 месяца в течение 2,5 лет. Активность бактериофагов на изоляты сальмонелл оставалась неизменной – постоянно возникали очаги лизиса примерно одинаковые по размеру. При этом изменений в структуре колоний сальмонелл и биологических свойств бактерий выявлено не было. Из этого можно сделать вывод о том, что в период исследований возникновения фагоустойчивости не наблюдалось.

На длительную перспективу применения препарата нами были продолжены выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов к *Salmonella typhimurium*. Выделили дополнительно 24 бактериофага, из них 10 высокоактивных с активностью от 10^{-8} до 10^{-10} и 4 с активностью 10^{-5} до 10^{-7} , которые могут быть использованы для резерва и перспективного совершенствования препарата. Свойства выделенных высокоактивных бактериофагов представлены в таблице.

Резервные фаги, изученные при помощи электронной микроскопии, обладали длинным, несокращающимся отростком и изометрическими головками размером от 50 до 100 нм, содержащими внутри двутяжевую ДНК, были отнесены по классификации А.С. Тихоненко [9] к четвертой классификационной группе.

РЕЗЮМЕ

Проблема возросшей антибиотикоустойчивости сальмонелл и повысившиеся требования к экологической безопасности и качеству продукции птицеводства требуют эффективных и безопасных средств. Выделены и изучены бактериофаги Phagum *Salmonella typhimurium* №5 ТЗ– ДЕП, №8 МЕ – ДЕП, №9 ММ – ДЕП, отвечающие этим требованиям. На основе трех высокоактивных фагов изготовлен препарат бактериофаг тифимуриум. Препарат апробирован с положительным результатом на цыплятах, голубях, на фазанах, утках и другой птице. Селекционированы высокоактивные резервные штаммы фагов к *Salmonella typhimurium*, изучены их биологические свойства.

Литература

1. Стейниер Р., Эдельберг Э. и Ингрэм Дж. Мир микробов, пер. с англ., т. 2, М., 1979. – 165 с.
2. Шлегель Г. Общая микробиология, пер. с нем., М., 1987. – 142 с.
3. Гусев В.В. Сальмонеллезная инфекция у голубей/ Гусев Вал. В., Гусев Вик. // «Птицеводство» № 5; 2003. – С.48-53
4. Куриленко А. Н., Пименов Н. В., Ленев С. В. и др. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур. М., МГАВМиБ., 2002 г. –35с
5. Adams M.M. Bacteriophages. New-York-London, 1961. – 528 p.
6. Brashear D.A., Ward R. Comparison of methods for recovering indigenous viruses from raw wastewater sludge: Appl. And Environ. Microbiol. – 1982. – Vol. 43, № 6. – P 1413-1418
7. Gratia A. Des relation numeriques entre bacterins lysogenes et particules de bacteriophage. Ann. Institut. Pasteur. – 1936. – V. 57, № 6. – P. 652-676
8. Ганюшкин В.Л. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск, 1988. – 84 с.
9. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М., 1968. – 89 с.
10. Кузьмин В. А. Сальмонеллез птиц остается проблемой/ Архив вет. наук., 2003 г. – С.58-69.
11. А.А.Белкина/Научная Сеть. Nature News, "From Russia with gloves" Америке Россия подарила бактериофаг:23.04.2002.