

поросят одновременно, независимо от типа эксфолиативного токсина. Первые клинические признаки инфекции появились на второй день. У животных наблюдалась сильная гиперемия (рис. 1) в месте введения суспензии стафилококка. Площадь поражения составляла примерно 3–5 кв. см.

На третий день после введения инокулята началась сильная эксфолиация эпителия на этом же участке кожи. Причем поражения затронули уже большую поверхность кожи, в основном уши и рядом расположенные участки кожи. У поросенка, зараженного штаммом с наличием гена, детерминирующего синтез эксфолиативного токсина *exhB*, начали проявляться поражения на внутренней поверхности левого бедра. Поражения проявлялись в виде пустул, заполненных экссудатом.

На 5 день (рис. 2) наблюдались обширные некротические поражения кожного покрова у всех зараженных живот-

ных практически на всех участках тела, но больше всего в области живота и головы.

На 12 день все зараженные поросята, кроме одного, подверглись эвтаназии.

У животных контрольной группы, которым не вводилась суспензия *Staphylococcus hyicus*, а также у поросят, которым был введен штамм К-2, клинических проявлений эксудативного эпидермита не наблюдалось.

За последним поросенком продолжали следить в течение месяца. Поросенок в течение всего данного периода сильно отставал в росте и развитии от поросят контрольных групп.

Вывод

Экссудативный эпидермит могут вызывать штаммы *S. hyicus*, обладающие генами, детерминирующими синтез эксфолиативных токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC* или *exhD*. Напротив, штаммы, не обладающие таковыми генами, инфекцию у поросят не вызывают.

SUMMARY

S. hyicus is worldwide known as causative agent of exudative epidermitis in pigs. The disease is characterized by a general infection of the skin, exfoliation and vesicle formation. *S. hyicus* is part of the normal skin flora of pigs, cattle and poultry. A strains of *S. hyicus* producing exfoliative toxins type A, B, C and D (*exhA*, *exhB*, *exhC* and *exhD*). 12 Pigs were experimentally inoculated with toxin producing *S. hyicus* strains DSM 20459, 1289D-88, 6407/01 and K-10. By clinical observations of the skin alterations, all pigs revealed development of generalized exudative epidermitis. 2 pigs were experimentally inoculated with no toxin producing *S. hyicus* strain K-2. The result of this study show that toxin producing strains *S. hyicus* may cause exudative epidermitis in pigs.

Литература

1. Гельвиц Э.-Г. Заболевания свиней. Пер. с нем. М. ООО «Издательство Астрель»: ООО «Издательство АСТ», 2003. 112 с.
2. Ahrens P. and Andresen L.O. Cloning and sequence analysis of genes encoding *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin types A, B, C, and D. *Bacteriol.* 186 (6), 2004. P 1833–1837.
3. Blobel H., Schliesser T. *Handbuch der bakteriellen infektionen bei Tieren.* Band II/1. Jena-Stuttgart: Gustav Verlag, 1994. 293 c.

УДК 619:612.014.11

С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, А.С. Мелехин,

Е.А. Бульканова, Н.А. Феоктистова, Е.Н. Пожарникова

(Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия)

БАКТЕРИОФАГИ МАЛОИЗУЧЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

В 1898 году русский ученый Н.Ф. Гамалея обнаружил, что при обработке дистиллированной водой бацилл сибирской язвы выделяется специфическое вещество, которое обуславливает просветление взвеси сибирезвенных палочек и растворяет свежевыращенную культуру. Это специфическое вещество исследователь назвал бактериолизином и высказал мнение, что оно образуется бактериями при их распаде.

В последующие годы канадский микробиолог Д'Эрелль (1915,1927,1935) опубликовал обширные материалы, привлечение всеобщее внимание к феномену растворения микробов. Ученый обнаружил в фильтрате из испражнений выздоравливающего больного, страдающего тяжелой формой дизентерии Шига, вещество, которое при пересеве растворяло свежeweделенную культуру палочки Шига, при этом

активность вещества при пересевах увеличивалась. На основании проведенных исследований Д'Эрелль создал новую, весьма привлекательную теорию о том, что наблюдаемое им растворение дизентерийных бактерий, вызывается не веществом, а живым существом, ультрамикроскопическим паразитом бактерий, невидимым в обычном микроскопе даже при самом сильном увеличении. Образующие им стерильные пятна на газоне агаровой культуры, по представлению исследователя, есть не что иное, как колонии размножившихся живых существ, которых он назвал бактериофагами, что в переводе с греческого означает «пожиратели бактерий». Это название используется до настоящего времени, хотя оно и не отвечает в полной мере современным представлениям о природе фага и его взаимодействии с бактериями, отражая лишь видимую невооруженным глазом одну из сторон этого сложного процесса – лизис микробной клетки. В специальной литературе наряду с указанным термином можно встретить наименования: фаг, вирус бактерий или просто вирус, фаговые частицы или корпускулы, бляшкообразующие единицы (БОЕ).

В бывшем СССР одним из центров бактериофагии стал институт Бактериологии, позднее переименованный в Институт вакцин и сывороток, а в настоящее время – Тбилисский институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии.

В настоящее время известны фаги почти у всех видов патогенных и сапрофитных бактерий.

Всесторонние исследования по изучению бактериофагов, выполненные за последние 40–45 лет, позволили широко использовать их для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, биохимии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологических исследований. Поэтому бактериофагия, развивающаяся вначале как узкая область медицинской микробиологии, в настоящее время приобрела общебиологическое значение.

С 1940 годов бактериофаги стали одним из наиболее популярных объектов молекулярной биологии. Исследования с использованием фагов позволили раскрыть механизмы таких фундаментальных биологических процессов, как репликация ДНК, рекомбинация, транскрипция и генная регуляция. Благодаря изучению фагов открылись также возможности разработки многих важных методов и направлений

генной инженерии.

С помощью фагов проводятся широкие радиобиологические исследования, а также первичный отбор химиотерапевтических средств и некоторых антибиотиков против вирусных болезней и злокачественных опухолей.

С выходом человека на космические орбиты фаги стали использовать для важнейших биологических исследований космического пространства.

В ветеринарии и медицине практическое использование фагов связано с изучением наследственной изменчивости бактерий (трандукция, фаговая конверсия), индикацией и идентификацией патогенных бактерий, фаготерапией и фагопрофилактикой.

Однако в течение двух последних десятилетий преобладало мнение, что изучение фагов уже не может дать науке ничего принципиально нового. В России в момент возникновения генной инженерии произошел резкий отход от изучения фагов в пользу более современных и лучше финансируемых исследований. Лишь несколько лабораторий в России продолжают до настоящего времени фундаментальные исследования фагов. По мнению большинства специалистов-фагологов очевидно, что отход от исследования фагов был необоснован. Так, несмотря на накопленный научный материал по изучению биологических свойств бактериофагов, многие вопросы требуют дополнительных исследований. Например, у большинства, как считалось ранее, прекрасно изученных модельных эшерихиозных фагов Т-серии, несмотря на 40-летний период напряженных исследований, так и не удалось выяснить функцию двух третей продуктов. Кроме этого нет единой схемы таксономии и морфологической классификации этих микроорганизмов, отсутствуют стандартные наборы бактериофагов многих возбудителей заболеваний животных и человека, а также схемы и параметры их применения.

Интерес к фагам возродился недавно по ряду причин. Прежде всего, вспомнили о возможности фаготерапии в связи с появлением множественно-устойчивых к антибиотикам возбудителей болезней. В настоящее время в результате молекулярно-генетических исследований была обнаружена связь генома патогенности бактерий с профагом и, наконец, предположена возможность генетического обмена не только между бактериями и фагами, но и между фагами и эукариотами (В.Н. Кры-

лов, 2003).

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УГСХА определила одно из приоритетных научных направлений — выделение и изучение бактериофагов. На кафедре в сотрудничестве с ведущими научными центрами страны (ВНИИВСГЭ, ВГНКИ, ВНИИЗЖ, ВНИИВиМ) более тридцати лет проводится научно-исследовательская работа по этой проблеме, в частности, изучение бактериофагов малоизученных в ветеринарии энтеробактерий.

Выбор этого научного направления связан с тем, что в последние годы, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление об этиологическом значении бактерий семейства Enterobacteriaceae в патологии животных и человека. Представители этого семейства широко распространены в природе и большинство из них являются нормальной микрофлорой желудочно-кишечного тракта животных и человека. Однако среди этих микроорганизмов имеются патогенные роды, виды и варианты, способные вызывать у животных и людей как самостоятельные заболевания (эшерихиоз, сальмонеллез, иерсиниоз, клебсиеллез и др.), так и различные воспалительные процессы (энтериты, нагноение ран, абсцессы, маститы, эндометриты, менингиты, пневмонии, сепсис и т.п.), пищевые и кормовые токсикозы и токсикоинфекции и др.

Особого внимания заслуживают работы разных исследователей по изучению роли этих микроорганизмов в этиологии желудочно-кишечных заболеваний молодняка животных, которые продолжают представлять большую проблему, имеют повсеместное распространение и наносят огромный экономический ущерб животноводческим хозяйствам, особенно крупным фермам.

Долгое время, особенно в период 60–80-х годов минувшего столетия, почти все заболевания новорожденных животных с клиническими симптомами диареи относили к незаразным функциональным болезням, называемыми «диспепсиями», несмотря на наличие всех признаков эпизоотического процесса. Хотя уже тогда в мероприятиях по лечению и профилактике этих «диспепсий» присутствовали меры, направленные на микробный агент и разрыв эпизоотической цепи (применение антибактериальных препаратов, дезинфекция, периодическая смена помещений на основе

принципа «все пусто – все занято» и др.).

К настоящему времени накоплен огромный фактический материал, свидетельствующий о том, что в преобладающем большинстве случаев желудочно-кишечные заболевания молодняка животных имеют инфекционную природу и обусловлены разнообразными агентами. Особое место в этиологии заболеваний новорожденных животных занимает так называемая «стойловая» условно-патогенная микрофлора, которая в отличие от возбудителей «классических инфекций» ежедневно поступает с экскрементами клинически здорового маточного поголовья (животных-бактерионосителей), а при возникновении первых случаев болезни — с фекалиями больного молодняка в репродукторные помещения, где рождаются животные и проводится их выращивание в первые недели жизни.

К такой микрофлоре, наряду с некоторыми другими микроорганизмами, относятся бактерии семейства Enterobacteriaceae, знания о которых, как возбудителей заболеваний животных и человека, в последние десятилетия расширились благодаря работам многих исследователей.

До начала 90-х годов прошедшего столетия ветеринарные лаборатории нашей страны бактериологические исследования патологического материала от больного и павшего молодняка животных сводили к выявлению в нем только патогенных эшерихий и сальмонелл, не принимая во внимание наличия представителей других родов семейства Enterobacteriaceae ввиду отсутствия нормативных документов по диагностике болезней, вызываемых этими микроорганизмами. Последние были впервые разработаны и утверждены в конце 1991 года (Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями) и затем переработаны в 1999 году, согласно которым бактерии родов *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia* и др. получили официальное признание возбудителей болезни.

В конце прошлого и в начале настоящего века также было установлено, что диарею у молодняка животных с признаками геморрагического гастроэнтерита, а также отечную болезнь у поросят, могут вызывать штаммы эшерихий серогруппы O157 (серовары O157:H7 и O157:H), считавшиеся ранее непатогенными для животных (О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков,

Ю.А. Малахов, 2001; С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев, 2005).

Контаминируя пищевое сырье и продукты питания, вышеперечисленные энтеробактерии представляют опасность и для людей, вызывая у них тяжело протекающие токсикоинфекции.

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременной диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых патогенными представителями энтеробактерий или протекающих с их участием, уделяется большое внимание.

При постановке диагноза бактериологическим методом существует ряд трудностей. Одна из них состоит в том, что основной идентификации этих бактерий являются их биохимические свойства. Трудоемкость и длительность изучения ферментативных свойств не позволяет быстро и точно идентифицировать названные микроорганизмы. Современные методы лабораторной диагностики (ПЦР, ИФА, РИА), которые могут быть использованы для этих целей, хотя и являются высокоспецифичными и чувствительными, но сложность методик, высокая стоимость оборудования и реактивов для постановки этих реакций, делает их пока недоступными для большинства ветеринарных лабораторий.

В связи с этим возникла необходимость в поиске альтернативных методов лабораторной диагностики, которые были бы менее трудоемкими, более быстрыми и доступными. Одним из таких методов является фагодиагностика. Методы фагодиагностики, разработанные в середине прошлого века, являются специфичными, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны лабораториям всех уровней.

Ввиду отсутствия в нашей стране стандартных наборов фагов для диагностики заболеваний, вызываемых патогенными энтеробактериями, одной из задач наших исследований явилось выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов, конструирование из них диагностических препаратов и разработка методов их практического применения.

В результате исследований проб сточных вод, фекалий животных, воды открытых водоемов, патологического материала от больных и павших телят и поросят нами было выделено и селекционировано более 130 изолятов фагов, лизирующих штаммы патогенных для живот-

ных и человека энтеробактерий, следующих родов: *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, видов: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii* и *E. coli* серогруппы O157 (сероваров O157:H7 и O157H). Ведется поиск новых изолятов фагов активных в отношении бактерий родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Enterococcus*, *Serratia* и др., представители которых имеют этиологическое значение в патологии животных и могут вызывать пищевые токсикоинфекции у людей.

У выделенных фагов изучены основные биологические свойства. Определено классификационное положение изученных изолятов согласно современной классификации и таксономии вирусов (С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук и др., 2005).

Четырнадцать перспективных штаммов фагов (*Phagum Morganella morganii* M17 УГСХА — ДЕП., *Phagum Morganella morganii* M20 УГСХА — ДЕП., *Phagum Escherichia coli* O157 E-61 УГСХА — ДЕП., *Phagum Escherichia coli* O157 E-67 УГСХА — ДЕП., *Phagum Citrobacter* C-61 УГСХА — ДЕП., *Phagum Citrobacter* C-66 УГСХА — ДЕП., *Phagum Citrobacter* C-52 УГСХА — ДЕП., *Yersinia enterocolitica* Y/9 УГСХА — ДЕП., *Phagum Proteus* П-16 УГСХА — ДЕП., *Phagum Proteus* П-261 УГСХА — ДЕП., *Phagum Enterobacter* En-2 УГСХА — ДЕП., *Phagum Enterobacter* En-13 УГСХА — ДЕП., *Phagum Klebsiella* К-10 УГСХА — ДЕП., *Phagum Klebsiella* К-81 УГСХА — ДЕП.) депонированы в ВГНКИ ветеринарных препаратов, и рекомендованы для изготовления диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

Используя строгую специфичность селекционированных бактериофагов, нами разработаны методы идентификации вышеперечисленных энтеробактерий, которые позволяют определить родовую, видовую и даже серогрупповую принадлежность выделенной культуры микроорганизмов без изучения ферментативных и серологических свойств в течение 48 часов вместо 5–7 суток, что позволяет значительно сократить сроки и затраты на диагностические исследования.

Ускоренное обнаружение возбудителя болезни в патологическом материале, кормах, пищевых продуктах и объектах внешней среды рекомендуем проводить при помощи реакции нарастания титра фага (РНФ) с использованием тех же наборов

бактериофагов.

Сущность РНФ заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует искомым возбудитель заболевания, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступая во взаимодействие с ним, интенсивно размножается, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага указывает на присутствие в исследуемом субстрате гомологичного возбудителя.

РНФ с применением предлагаемых нами наборов фагов по технике выполнения является простым, чувствительным и специфическим методом диагностики, позволяющим за относительно короткий срок (11–22 час) обнаружить искомые бактерии в концентрации 10^2 – 10^4 микробных клеток в 1 г (мл) исследуемого материала в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистых культур энтеробактерий. Бактериологическим методом такую концентрацию микроорганизмов обнаружить, как правило, не удается.

Диагностические исследования рекомендуется проводить в соответствии с разработанными нами методиками, изложенными в семи методических рекомендациях по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Enterobacter*, видов *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica* и энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7 и O157:H в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утвержденных Отделением ветеринарии РАСХН (2004, 2006).

К сожалению, биологическая промышленность страны в настоящее время не изготавливает специфических средств для профилактики и терапии кишечных инфекций, вызываемых выше перечисленными энтеробактериями или протекающих с их участием (за исключением эшерихиозных вакцин и сывороток), что существенно снижает эффективность мероприятий по борьбе с этими заболеваниями.

Применение антибиотиков и нитрофурановых препаратов для лечения и профилактики инфекционной диареи молодняка в ряде случаев не дает ожидаемого положительного результата, что связано с приобретением устойчивости условно-патогенных микроорганизмов к 3–5 и более антибиотикам. Об этом свидетельствуют результаты наших исследований (С.Н. Золотухин, 2002, 2004), которые согласуются с

литературными данными многих отечественных и зарубежных авторов (Е.С. Воронин и др., 1989; Е.Т. Парайко, 1990; М. Warben, РН Waer-Worth, 1964; Н. Trollenir, 1980; Р.М. Hawekey и др., 1983).

Первые попытки использовать бактериофаги для лечебно-профилактических целей были предприняты в медицине. В литературе имеются сообщения, свидетельствующие о положительном лечебно-профилактическом действии препаратов бактериофагов при использовании их во время эпидемии холеры, при дизентерии и других желудочно-кишечных болезнях.

Отдельные попытки использования различных бактериофагов при инфекционных болезнях животных были предприняты еще в 20–30-х годах. Д.Эрелль (1928, 1935) пытался использовать фаги при пуллорозе-тифе у кур.

В связи с возрастанием уровня устойчивости возбудителей болезни к антибиотикам и отрицательным влиянием последних на организм животных, а через продукты питания и на человека, фаготерапия и фагопрофилактика инфекционных заболеваний вновь стала привлекать к себе внимание многих исследователей.

Поэтому разработка и изготовление лечебно-профилактических фаговых препаратов для нужд ветеринарии в настоящее время приобретает большую актуальность для практики. Преимуществом этих средств является их экологическая безопасность, безвредность, даже в больших дозах и отсутствие побочных действий на организм животных (дисбактериоза, аллергических реакций, угнетения функций иммунной системы). В тоже время фаготерапия и фагопрофилактика не исключают применения симптоматического лечения, серотерапии и серопрфилактики, пробиотиков, антибиотикотерапии, вакцинопрофилактики, а также всего комплекса ветеринарно-санитарных и зооигиенических мероприятий.

В настоящее время мы изучаем возможность применения бактериофагов для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний молодняка животных, а также ликвидации скрытого бактерионосительства. Ведутся научные исследования по разработке технологических параметров получения и контроля новых биопрепаратов, подбор оптимальных дозировок, схем и способов их применения.

Для этих целей используются выделен-

ные и селекционированные нами изоляты фагов вышеперечисленных энтеробактерий из коллекции УГСХА в различных комбинациях, в зависимости от этиологии заболевания и чувствительности к ним идентифицированных возбудителей болезни, циркулирующих на конкретной ферме.

С целью повышения эффективности научно-исследовательской работы в Ульяновской государственной сельскохозяйственной

РЕЗЮМЕ

Таким образом, бактериофаги продолжают оставаться одним из интересных биологических объектов, а бактериофагия — перспективным направлением, как для фундаментальных, так и прикладных научных исследований.

Литература

1. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Жигалева О.Н., Русалиев В.С., Каврук Л.С. Разработки УлГСХА в области фагодиагностики, фаготерапии и фагопрофилактики // *Материалы Международного семинара «Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами»*. Тбилиси, 2005. С. 14.
2. Д'Эрель. Бактериофаг и феномен выздоровления. Тбилиси: Изд. Тбилисского государственного университета. 1935. С. 139.
3. Золотухин С.Н. Антибиотикорезистентность полевых штаммов морганелл, выделенных от погибших и больных диареей поросят // *Материалы 7-ой межгосударственной конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии»*. Санкт-Петербург, 1995. С. 78–79.
4. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями // *Уч. пособие*. Ульяновск, 2005.
5. Парайко Е.Т. Антибиотикочувствительность изолятов протей, выделенных от поросят при желудочно-кишечных заболеваниях // *Проблемы научного обеспечения животноводство Молдавии*. Тез. докл. Кишинев, 1990. С. 99–100.
6. Тугаринов О.А., М.К.Пирожков, Ю.А.Малахов. Сборник научных трудов. М.: ВГНКИ. 2001. Т. 62. С. 68–75.
7. Barben M., Water-Worth P.N. Antibiotic sensitivity of *Proteus* species // *J. Chin. Pathol.* 1964. Vol. 27. P. 69–74.
8. Trollidenier H. Die Resistenzenentwicklung pathogener Kieme aus veterinarmedizinschen Untersuchungsmaterial in den Jari 1971 bis 1977 // *Veterinarmedizin*, 12, 1980. P. 460–467.

Н.Г. Толстенко*(ВИЭВ)*

ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ

В последнее время в отечественной и зарубежной литературе все чаще обсуждается вопрос о микобактериозах, заболеваниях вызываемых нетуберкулезными микобактериями.

В медицинской практике они являются в ряде случаев причиной легочных заболеваний, шейных лимфаденитов, поражений кожи, мочеполового тракта и т.д. (Т.Ф. Оттен, А.В. Васильев, 2005, Wolinsky E., 1981).

В животноводстве интерес к нетуберкулезным микобактериям объясняется в основном тем, что они обладают аллергизирующей способностью и вызывают перекрестные реакции на введение туберкулина, что вызывает затруднения при поста-

новке диагноза на туберкулез.

Однако ряд авторов указывают на способность нетуберкулезных микобактерий проявлять патогенность при определенных условиях (Меин А., Шлиссер Т., 1962; Насаль Ю., 1963; Нелюбин В.П., 1968; Козлов Н.Н., 1977, и др.). Шлиссер считает, например, что микобактерии-сапрофиты способны вызывать у людей и животных туберкулезоподобные изменения.

Согласно данным Merone et al. (2001) в странах Центральной Африки широко распространена кожная инфекция, вызванная *M. ulcerans*, характеризующаяся образованием болезненных эритематозных узелков с последующим развитием некроза и язв.