SPECIFIC CONTROL OF SALMONELLA IN POULTRY

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ БОРЬБА С САЛЬМОНЕЛЛОЙ В УСЛОВИЯХ ПТИЦЕВОДСТВА

Pimenov N.V., Doctor of Biological Sciences
Пименов Н.В., доктор биологических наук

**Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology
named after K.I. Skryabin, Moscow, Russia**

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И.Скрябина, Москва, Россия

E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

ABSTRACT

Scientifically based and clinically validated new tools and methods to combat Salmonella infection in poultry, allowing to ensure the safety and health safety products - eggs and poultry meat. The method of selective decontamination involves the use of bivalent bacteriophage that is based on highly selected phages Phagum Salmonella typhimurium and Phagum Salmonella enteritidis, as well as probiotic laktobifadola. The developed tools and methods of selective decontamination followed by immunization with inactivated vaccine associated «Virosalm» allows you to eliminate salmonella infection in poultry.

АННОТАЦИЯ

Научно обоснованы и клинически подтверждены новые средства и методы борьбы с сальмонелла-инфекцией в условиях птицеводства, позволяющие обеспечить сохранность поголовья и санитарную безопасность продукции – яиц и мяса птиц. Метод селективной деконтаминации включает в себя применение бивалентного бактериофага, созданного на основе выделенных высокоактивных фагов Phagum Salmonella typhimurium и Phagum Salmonella enteritidis, а также пробиотика лактобифадол. Применение разработанных средств и метода селективной деконтаминации с последующей иммунизацией ассоциированной инактивированной вакциной «Виросальм» позволяет ликвидировать сальмонелла-инфекцию в условиях птицеводства.

KEY WORDS

Salmonella; Salmonellosis birds; Selective decontamination; Bacteriophages; Vaccine.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Сальмонелла; Сальмонеллез птиц; Селективная деконтаминация; Бактериофаги; Вакцина.

Бактерии рода Salmonella являются возбудителями опасной болезни, общей для птиц, животных и человека, – сальмонеллеза. По заключению экспертов Всемирной организации здравоохранения сальмонеллез, как зоонозная инфекция, не имеет себе равных по сложности эпизоотологии, эпидемиологии и трудностям борьбы с ним [12]. Хозяйства, сталкиваясь с сальмонеллой, несут большие потери из-за смертности молодняка, снижения продуктивности, качества продукции и наложения ограничительных мероприятий на выпуск продукции. Обсемененные сальмонеллами яйца и мясо птиц являются основными причинами пищевых токсикоинфекций у людей [2,4].

Сероварианты Salmonella enteritidis и Salmonella typhimurium являются доминирующими возбудителями у птиц разных видов, в т.ч. птиц промышленного содержания: кур (S. enteritidis 31,2-51,2%, S. typhimurium 9,5-28,2%; доля S. gallinarum-pullorum 21,0-38,4%, в основном приходится на эмбриональную смертность и

заболеваемость цыплят первой недели жизни), уток, гусей и других водоплавающих птиц (*S. typhimurium* 97,7%, *S. enteritidis* 0,8%), перепелов, индеек, фазанов (*S. typhimurium* 87,5%, *S. enteritidis* 3,8%) [3,6,9,11].

Эффективность проводимых мероприятий против сальмонеллеза птиц недостаточна. Не разработана эффективная система специфических мероприятий по борьбе с сальмонеллезом в условиях птицеводства разных направлений. Общесанитарные мероприятия и антибиотикообработки не позволяют избавить птицу от сальмонеллоносительства, не способны профилактировать и ликвидировать инфекцию, а предотвращают лишь массовое клиническое проявление заболевания [1,5,7].

Очевидно, что назрела необходимость переориентирования медикаментозных подходов при борьбе с сальмонелла-инфекцией, тем более на фоне вступления России в ВТО и ограничения широкого использования антибиотиков на производстве. Альтернативой применению химиотерапевтических препаратов может стать использование фагов. Высокоактивные бактериофаги – специфические агенты, способные лизировать сальмонеллу и санировать сальмонеллезную обсемененность, бактерионосительство [6,7,8].

Целью работы являлась разработка средств и совершенствование системы противозпизоотических мероприятий, направленных на борьбу с сальмонеллезом птиц.

Материалы и методы. В работе использованы 71 музейный штамм бактерий, 4 производственных штамма и 129 полевых изолятов сальмонелл, 42 бактериофага, диагностические сыворотки, питательные среды, реактивы, лабораторная посуда и оборудование, животные: белые мыши, кролики, голуби, куры и цыплята, утки, гуси и другие птицы, 3300 СПФ куриных эмбрионов. В ходе работы применяли эпизоотологические, бактериологические, серологические, статистические методы исследований, а также методы молекулярной диагностики, электронной микроскопии.

Для выделения бактериофагов использовали метод обогащения, описанный Адамсом, активность фагов определяли методами Аппельмана и Грация, изучение морфологии вирионов фагов проводили по методике А.С. Тихоненко, определение способности бактериофагов к образованию литического фермента – по методу В.А. Зуева и В.В. Желтовой в модификации Л.Б. Борисова.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из патологического материала от птиц разных хозяйств и направлений были выделены более 100 изолятов сальмонелл, из которых отобраны для исследований 39, соответствовавших требованиям к патогенности. Исследованиями на белых мышах выявили наиболее вирулентные и иммуногенные штаммы сальмонелл, что в дальнейшем подтвердили и на голубях (см. табл. 1).

Таблица 1 – Показатели LD₅₀ и ImD₅₀ производственных штаммов сальмонелл для белых мышей и голубей

Величина	LD ₅₀		ImD ₅₀	
	для бел. мышей, мкр. кл.	для голубей, тыс. мкр. кл.	для белых мышей, тыс. мкр. кл.	для голубей, тыс. мкр. кл.
Способ иммунизации	-	-	подкожно	внутримышечно
Способ инфицирования	подкожно	внутримышечно	подкожно	внутримышечно
<i>S. typhimurium</i> М-5в t	647	1122	12,6	7943
<i>S. typhimurium</i> М-2ф t	4074	2089	7,9	12589
<i>S. typhimurium</i> Д-1в t	5495	2291	12,6	12589
<i>S. enteritidis</i> 25 Яв	14125	49545	20,0	50119

Штаммы *S. typhimurium* М-2ф t, *S. typhimurium* М-5в t, *S. typhimurium* Д-1в t, *S. enteritidis* 25 Яв е были депонированы в ФГУ ВГНКИ в качестве производственных и производственно-контрольных.

Для выделения бактериофагов к *S. typhimurium* были отобраны и исследованы по методу обогащения пробы пометных вод и фекалий из голубятен и птицеферм Московской области, Москвы, Тулы и Тульской области в общем количестве 116. Выделены 39 бактериофагов Phagum *Salmonella typhimurium*, 16 из которых по методу Аппельмана обладали активностью 10^{-8} - 10^{-10} , еще 2 бактериофага – 10^{-5} - 10^{-7} .

Отобранные фаги обладали широким спектром действия в отношении сальмонелл специфического сероварианта, лизируя не менее 81 % полевых изолятов и музейных штаммов *S. typhimurium*, а преимущественно 90-100 % культур сальмонеллы тифимуриум (15 из 18 фагов).

Высокие результаты литической активности у исследованных бактериофагов отмечены и к другим серовариантам сальмонеллы, этиопатогенным для птиц: к *S. enteritidis* лизис культур на уровне 73-93 % отмечен у 16 фагов, еще 2 бактериофага – Ph. *S. typhimurium* №14 ПП и №17Ф₂М лизировали все 15 тестовых культур. Лизис штаммов *S. gallinarum-pullorum* фагами отмечен на уровне 5-6 из 7 (71-85 %), *S. dublin* – преимущественно 3 из 4, *S. newlands* – 1-2 из 3. В то же время проведенные исследования не выявили ни одного случая литической активности у исследованных изолятов фагов к бактериям других родов семейства Enterobacteriaceae – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* и к бактериям других семейств *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*. Результаты данных исследований констатируют специфичность литического действия отобранных фагов вариантами вида *Salmonella enterica*.

Выделенные бактериофаги характеризовались проявлением роста в виде негативных колоний преимущественно типа «А». При электронно-микроскопическом исследовании мы получили ультрафотографии с инструментальным увеличением 53018 раз и фотографическом – 1,8-4,9 раз, которые позволили отнести бактериофаги к семейству Siphoviridae и четвертой морфологической группе по А.С. Тихоненко (см. рис. 1, 2).

Рисунок 1 – Бактериофар *S. typhimurium*

Рисунок 2 – Лизис сальмонеллы фагами

При исследовании адсорбционных свойств фагов на депонированных штаммах сальмонелл, выявлены выраженные свойства адсорбции на клетках хозяев. При этом наибольшие показатели скорости адсорбции – $(4,96 \pm 0,05) \times 10^{-9}$ см³мин⁻¹ и количества адсорбировавшихся фаговых частиц – $91,7 \pm 0,25$ %, отмечены у бактериофага Ph. *S. typhimurium* №8 ME, который также наиболее интенсивно формировал литический фермент.

При проведении опытов одиночного цикла развития фага Ph. *S. typhimurium* №5 ТЗ среднее число негативных колоний в разведении 1:40 составляло 30-32 на протяжении

22 минут, с 26 минуты отмечался выраженный рост, на 28 минуте появлялись негативные колонии в чашках, засеянных из разведения 1:100, и на 30 минуте проявляется полный лизис колоний в посевах из второго разведения (1:40). Таким образом, конец латентного периода начинает проявляться на 24-25 минутах и стабилизируется за 8 минут. Среднее число негативных колоний, полученных из разведения фага 1:100 – 132, т.е. по окончании лизиса бактерий количество фаговых частиц составило 13200 в 0,1 мл материала. Средний выход фага рассчитывали отношением количества выхода бактериофага к исходному количеству в латентный период. Для Ph. S. typhimurium №5 ТЗ он составил 426. Штаммы Ph. S. typhimurium №8 ME, Ph. S. typhimurium №9 MM аналогично обладали выраженной интенсивностью формирования литического фермента, минимальным латентным периодом внутриклеточного развития, высокой урожайностью (206 и 185 соответственно), периодом стабилизации лизиса 6-8 минут, скоростью адсорбции $4,0-4,96 \times 10^{-9} \text{ см}^3 \text{ мин}^{-1}$.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные штаммы могут быть использованы в качестве производственных. В связи с этим три наиболее активных штамма – Phagum Salmonella typhimurium №5 ТЗ, Phagum Salmonella typhimurium №8 ME, Phagum Salmonella typhimurium №9 MM были депонированы в коллекции ФГУ ВГНКИ, еще 15 фагов паспортизированы в качестве резервных.

Для создания бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц были также использованы фаги к *S. enteritidis*, выделенные нами при исследовании по методу обогащения 52 проб сточных вод из цехов содержания молодняка и маточного поголовья птицефабрик и депонированные ранее в ФГУ ВГНКИ в качестве производственных [10].

Бивалентный бактериофаг против сальмонеллеза птиц готовили по схеме, представленной на рисунке 3. Исследования на активность бивалентного бактериофага осуществляли на белых мышах массой 14-16 г. Для этого формировали 3 опытные и 3 контрольные группы мышей по 10 голов.

В первых группах инфицирование перед фагообработкой проводили *S. typhimurium* М-2ф t в дозе 10 тыс. мкр. кл. (5 LD_{50}), во вторых – *S. enteritidis* 25 Яв е в дозе 70 тыс. мкр. кл. (5 LD_{50}), в третьих – обоими штаммами в дозах по $2,5 \text{ LD}_{50}$. В опытных группах, где вслед за летальной дозой культуры возбудителя вводили бивалентный бактериофаг, сохранность составила 90-100%. При этом, по окончании периода наблюдения – 14 дней и бактериологическом исследовании всех мышей опытных групп, бактерий рода *Salmonella* не выделяли. В контрольных группах, инфицированных как монокультурами, так и (в третьей группе) смесью штаммов обоих серовариантов, гибель мышей была максимальной, составила 90-100 %. Аналогичные исследования провели с голубями и цыплятами.

Для эффективного оздоровления хозяйств от сальмонеллеза нами разработан метод селективной деконтаминации, основанный на санировании организма птиц разных видов с одновременным использованием препаратов бактериофагов против сальмонеллеза и пробиотика лактобифадол.

Лактобифадол содержит живые микробные клетки бифидобактерий вида *Bifidobacterium adolescentis* и живые микробные клетки лактобактерий *Lactobacillus acidophilum*. Штаммы отличаются выраженными антагонистическими свойствами к патогенным бактериям, имеют выраженные адгезивные свойства, устойчивы к широкому диапазону pH, устойчивы к желчи, фенолу, повышенной концентрации хлорида натрия, имеют выраженную кислотообразующую, антагонистическую, биохимическую и ферментативную активность, образуют органические кислоты, витамины, ферменты, повышающие продуктивность и конверсию корма у животных и птиц. Сочетание конкурентного действия на патогенную микрофлору лактобифадола со специфическим литическим действием бивалентного бактериофага обеспечивает выраженный лечебный и профилактический эффект против сальмонеллеза птиц.

Метод селективной деконтаминации был апробирован при пероральном применении птице Бактериофага тифимуриум и лактобифадола. Испытание метода в остром опыте проводили на 30 цыплятах 14-дневного возраста, для чего были созданы

3 группы по 10 голов – 2 опытные и контрольная. Птицу в группах кормили и содержали по принципу аналогов. Инфицирование цыплят проводили смесью из свежих культур штаммов *S. typhimurium* Д-1в t и *S. typhimurium* М-2ф t орально в дозе 2 млрд. мкр. кл.

Рисунок 3 – Схема изготовления бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц

После появления клинических признаков заболевания, проявлявшихся в потере аппетита, одышке, взъерошенности оперения, иногда – диарее, цыплятам первой опытной группы орально вводили Бактериофаг тифимуриум из расчета $0,5 \text{ см}^3$, что соответствует 10^4 - 10^5 фаговых частиц, индивидуально при помощи автоматической пипетки-дозатора. Обработку проводили трижды с интервалом 12 часов, а затем еще дважды с интервалом 48 часов. За три часа до выпойки препарата цыплят выдерживали без поения. Лактобифадол вводили в корм из расчета 1,0 г на всех цыплят опытной группы ежедневно в течение 10 дней в виде формы препарата на отрубях. Цыплятам второй опытной группы использовали метод лечения с применением энрофлоксацина – энрофлон 10 %-ный раствор в дозе $0,5 \text{ см}^3$ на 1 л воды 5 дней согласно «Наставлению по применению энрофлона 10 % раствора для орального применения». Цыплят контрольной группы препаратами не обрабатывали.

За птицей наблюдали 15 дней, после чего проводили убой. Проведенные исследования показали, что в контрольной группе цыплят летальность составила 90 %. Павшие цыплята имели характерные клинические признаки и патологоанатомические изменения. При бактериологическом исследовании у всех 10 цыплят контрольной группы была выделена *S. typhimurium* (см. табл. 3).

Таблица 2 – Эффективность применения Бактериофага тифимуриум и лактобифадола в лабораторных условиях

Группа	Кол-во гол.	Пало, гол.	Сохранность, %	Кол-во цыплят, из которых выделена культура <i>S. typhimurium</i>	
				голов	%
Опытная 1 (Бактериофаг тифимуриум + лактобифадол)	10	0	100	0	0
Опытная 2 (энрофлоксацин)	10	3	70	2	20
Контрольная	10	9	10	10	100

С целью длительной иммунопрофилактики сальмонеллеза нами была создана инактивированная вакцина на основе депонированных штаммов сальмонелл и вируса ньюкаслской болезни птиц, инактивированных формалином, получившая при регистрации название «Виросальм». Применение вакцины «Виросальм» вызывало образование защитных антител на уровне, достаточном для предотвращения возникновения инфекции. До иммунизации у невакцинированных птиц в РТГА титр антител против болезни Ньюкасла и сальмонеллеза был на уровне менее $1 \log_2$, после вакцинации уровень антител выросал в несколько раз и в среднем по поголовью колебался в диапазоне от 6 до $7 \log_2$. Индекс нейтрализации у птиц, участвовавших в эксперименте, до вакцинации составил 0,2-0,42, после ревакцинации – 4,4-7,2. Уровень антител был стабильно высоким через 3 и 6 мес. после применения вакцины «Виросальм». Апробационные испытания успешно провели в условиях лаборатории, птицефабрики, вольеров, миниферм, частных подворий.

Базируясь на полученные результаты, лечебно-профилактические мероприятия в птицеводстве, направленные на борьбу с сальмонелла-инфекцией, необходимо усовершенствовать введением в систему метода селективной деконтаминации и последующей иммунизации восприимчивого поголовья вакциной «Виросальм». Специфическую профилактику сальмонеллеза необходимо осуществлять выпойкой бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц двукратно в дозе $0,5 \text{ см}^3$ с интервалом 72 часа и последующей двукратной иммунизацией вакциной «Виросальм» с 20-дневного возраста с интервалом 28-30 дней.

Предложенная комплексная схема лечения и профилактики сальмонеллеза птиц успешно апробирована в условиях ООО «Парк живой природы «До-До» Анапского района Краснодарского края, где была зафиксирована заболеваемость сальмонеллезом водоплавающих и куриных птиц, а также в условиях ОАО «Птицефабрика «Тульская», КФК «Барбасов» Наро-Фоминского района Московской области, частного сектора Владимирской и Московской областей.

ВЫВОДЫ

Проблемой качества и безопасности пищевых продуктов, а именно яиц и мяса птиц, является сальмонелла-инфекция, которая приводит к заболеваемости птиц или носительству с обсеменением продуктов птицеводства. Традиционно проводимые мероприятия по профилактике сальмонеллеза при производстве продуктов птицеводства не ликвидируют сальмонеллоносительство и не обеспечивают санитарную безопасность продукции.

Нашей работой для лечения и профилактики сальмонеллеза птиц научно обоснованы и клинически подтверждены метод селективной деконтаминации и

последующая вакцинация, эффективность которых доказана полным оздоровлением неблагополучных по сальмонеллезу пунктов с формированием у птиц стойкого иммунитета.

Для ликвидации сальмонеллы в птицеводческих хозяйствах необходимо применение бивалентного бактериофага против сальмонеллеза птиц, разработанного нами на основе высокоактивных штаммов Phagum *Salmonella typhimurium* и Phagum *Salmonella enteritidis*, специфических и активных в отношении вида *Salmonella enterica*, т.е. практически всех возбудителей сальмонеллеза птиц (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum-pullorum* и других менее значимых).

На основе штаммов сальмонелл *S. typhimurium* М-5в t -ДЕП, *S. typhimurium* Д-1в t -ДЕП, *S. enteritidis* 25 Яв е -ДЕП и вируса болезни Ньюкасла штамма «Н» или «PN-T» сконструирована вакцина «Виросальм» ассоциированная инактивированная против сальмонеллеза и болезни Ньюкасла птиц. Разработаны технология ее производства, методы контроля и способ применения. Антигенная активность вакцины по сальмонеллезным компонентам характеризовалась выраженной агглютинацией антигенов *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с сыворотками крови вакцинированных птиц. В лабораторных экспериментах сохранность иммунизированных голубей при инфицировании в летальных дозах 5 LD₅₀ составила 90-100 % при полной гибели птицы в контроле.

Доказана эффективность применения вакцины «Виросальм» на птице разных видов в условиях птицефабрики ОАО «Птицефабрика «Тульская», птицеферм, голубятен и индивидуальных подсобных хозяйств. Базируясь на многоплановых исследованиях, усовершенствована система противоэпизоотических мероприятий для борьбы с сальмонеллезом птиц разных видов, родов и семейств. Помимо неспецифических ветеринарно-санитарных мероприятий система предусматривает использование препаратов бактериофагов и пробиотика лактобифадол для лечения больных птиц и ликвидации сальмонеллоносительства с последующей иммунизацией вакциной «Виросальм».

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] Данилевская Н.В., Пименов Н.В. Проблема антибиотикорезистентности на примере лечения сальмонеллеза у домашних голубей // Российский ветеринарный журнал. – 2005. – № 4. – С. 21-24.
- [2] Данилевская Н.В., Пименов Н.В. Новое в антибиотикотерапии: антибиотикорезистентность – угроза реальна // Новейшие разработки в ветеринарии. Клеточная терапия: Мат-лы совм. конф. – М.: ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2006. – С. 16-22.
- [3] Дрогалина Н.А. Селекция бактериофагов и фагоустойчивых аттенуированных штаммов *Salmonella typhimurium* для производства лечебно-профилактического препарата против сальмонеллеза кур: автореф. дисс. канд. биол. наук; ФГУ ВГНКИ. – М., 2008. – 33 с.
- [4] Куриленко А.Н., Пименов Н.В., Ленев С.В., Малахов Ю.Н., Яковлев С.С. Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации сальмонеллеза кур. – М.: МСХ/ МГАВМиБ, 2002. – 34 с.
- [5] Ленев С.В. Мероприятия по профилактике сальмонеллеза птиц // II Междунар. вет. конгресс, VIII Междунар. вет. конгресс по птицеводству, г. Москва, 19-22 апреля 2012 г. – М, 2012. – С. 102-106.
- [6] Ленёв С.В., Малахов Ю.А., Шорохов В.В. Сальмофаг – лечебно-профилактический препарат // Мат-лы науч. конф., посвящ. 50-летию Краснодарской НИБС. – Краснодар, 1996. – Ч. 1. – С.26-30.
- [7] Пименов Н.В. Перспективы применения бактериофагов в ветеринарии // Ветеринария и кормление. – 2009. – № 5. – С. 34-35.

- [8] Пименов Н.В. Сальмонеллез птиц: перспективные направления в лечебно-оздоровительных мероприятиях // Ветеринария и кормление. – 2010. – № 3. – С. 24-25.
- [9] Пименов Н.В. Совершенствование системы противоэпизоотической борьбы с сальмонеллезом птиц // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 3. – С. 38-40.
- [10] Пименов Н.В., Ленев С.В., Куриленко А.Н. Протективная активность бивалентного сальмофага против сальмонеллеза энтеритидис и пуллороза-тифа кур // Сб. науч. трудов ВГНКИ. – М.: ФГУ ВГНКИ, 2003. – т. 64. – С. 178-182.
- [11] Bole-Hribovsek V., Zorman-Rojs O., Zdovc L., Urbanicic A. Vcinkovitost preparata Enroxil 10% Krkav, terapiji piscancev eksperimentalno ocuzynih S. Enteritidis // Kongres mikrobiologov Slovenije z mednarodno udelezbo. Portoroz. – 1998. – S. 138-141.
- [12] World Health organization (WHO). Control of Salmonellosis: Part Played by Veterinary Science and Nutrition Hygiene. – 11-12 June 1991. – Geneva, Switzerland: WHO, 1991. – (WHO/CDD/SER/91.14) – P. 436-437.