УДК 619:615

Научная статья

Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2023-369-4-51-56

Селекция штаммов фагов сальмонелл для создания лечебно-профилактического препарата против сальмонеллеза поросят

С.В. Ленев,
М.К. Пирожков,
А.В. Моторыгин,
А.А. Галиакбарова,
А.С. Клёнов,
Н.С. Абросимова ✉

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

✉ *n.abrosimova@vgnki.ru*

Поступила в редакцию:
01.02.2023

Одобрена после рецензирования:
28.02.2023

Принята к публикации:
30.03.2023

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Препараты бактериофагов являются перспективным средством профилактики и лечения зоонозов. Доказана эффективность применения фаговых препаратов на разных стадиях производства пищевой продукции: при выращивании животных, при переработке продуктов их убоя и санации готовой продукции от возбудителя сальмонеллеза. Создание эффективного средства, способного предохранять поросят от заболевания сальмонеллезом в период высокого риска заражения при их отъеме, является актуальной задачей.

Методы. Для изучения свойств бактериофагов использовали методы определения: литической активности (по Аппельману и Грациа), спектра их литического действия, диапазона специфичности, частоты образования фагоустойчивых форм, выбранных для их размножения штаммов бактерий. Выбор штаммов фагов, перспективных для изготовления на их основе препарата для лечения и профилактики сальмонеллеза свиней, проводили по критериям, рекомендованным для выбора производственных штаммов бактериофагов.

Результаты. Сформирована коллекция из 24 вирулентных фагов сальмонелл. Изучение их биологических свойств позволило выбрать четыре штамма бактериофагов, перспективных для изготовления на их основе препарата против сальмонеллеза свиней.

Ключевые слова: сальмонеллы, бактериофаги, препараты, литическая активность, свиньи

Для цитирования: Ленев С.В., Пирожков М.К., Моторыгин А.В., Галиакбарова А.А., Кленов А.С., Абросимова Н.С. Селекция штаммов фагов сальмонелл для создания лечебно-профилактического препарата против сальмонеллеза поросят. *Аграрная наука*. 2023; 369(4): 51–56. https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-369-4-51-56

© Ленев С.В., Пирожков М.К., Моторыгин А.В., Галиакбарова А.А., Кленов А.С., Абросимова Н.С.

Research article

Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2023-369-4-51-56

Selection of Salmonella phage strains for the creation of a therapeutic and prophylactic drug against salmonellosis in piglets

Sergey V. Lenev,
Mikhail K. Pirozhkov,
Anton V. Motorygin,
Alsu A. Galiakbarova,
Alexey S. Klenov,
Nadezhda S. Abrosimova ✉

All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, Moscow, Russia

✉ *n.abrosimova@vgnki.ru*

Received by the editorial office:
01.02.2023

Accepted in revised:
28.02.2023

Accepted for publication:
30.03.2023

ABSTRACT

Relevance. Bacteriophage preparations are a promising tool for the prevention and treatment of zoonoses. The effectiveness of the use of phage preparations at different stages of food production has been proven: in the cultivation of animals, in the processing of their slaughter products and in the sanitation of finished products from the causative agent of salmonellosis. The creation of an effective agent capable of protecting piglets from salmonellosis during a period of high risk of infection during weaning is an urgent task.

Methods. To study the properties of bacteriophages, methods were used to determine: lytic activity (according to Appelman and Grazia), the spectrum of their lytic action, the range of specificity, the frequency of formation of phage-resistant forms, bacterial strains selected for their reproduction. The selection of phage strains that are promising for the manufacture of a preparation based on them for the treatment and prevention of pig salmonellosis was carried out according to the criteria recommended for the selection of industrial strains of bacteriophages.

Results. A collection of 24 virulent Salmonella phages was formed. The study of their biological properties made it possible to select 4 strains of bacteriophages promising for the manufacture on their basis of a drug against swine salmonellosis.

Key words: salmonella, bacteriophages, drugs, lytic activity, pigs

For citation: Lenev S.V., Pirozhkov M.K., Motorygin A.V., Galiakbarova A.A., Klenov A.S., Abrosimova N.S. Selection of Salmonella phage strains for the creation of a therapeutic and prophylactic drug against salmonellosis in piglets. *Agrarian science*. 2023; 369(4): 51–56. https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-369-4-51-56 (In Russian).

© Lenev S.V., Pirozhkov M.K., Motorygin A.V., Galiakbarova A.A., Klenov A.S., Abrosimova N.S.

Введение/Introduction

Сальмонеллез свиней — инфекционная болезнь, протекающая с первых дней жизни до шестимесячного возраста. Заболевание начинает проявляться в возрасте 12–15 дней, когда ослабевает колостральный иммунитет, однако массовое проявление сальмонеллеза происходит в возрасте 1–3 месяцев — в период отъема и перегруппировки поросят [1]. Сальмонеллез свиней способны вызывать несколько десятков сероваров сальмонелл. Большинство из них имеют у животных хроническое носительство. Энзоотии и спорадические случаи сальмонеллеза с большой смертностью поросят и массовым заболеванием животных связаны с небольшим количеством сероваров. Основная часть изолятов сальмонелл, выделяемых от свиней в России (около 80%), является сероваром, адаптированным к хозяину — *Salmonella Choleraesuis*. Вторым по этиологической значимости является серовар *S. Typhimurium*, обусловливающий 10–15% случаев возникновения сальмонеллеза свиней. Серовары сальмонелл *S. Enteritidis, S. London* и *S. Dublin* вызывают менее 3% заболеваний животных [2].

В ветеринарной практике для лечения больных сальмонеллезом поросят применяют антитоксическую сыворотку против сальмонеллеза животных, антибиотики, сульфаниламидные и нитрофурановые препараты. Эти препараты могут ликвидировать клинические проявления болезни, но часто не позволяют полностью санировать организм животных от возбудителей сальмонеллеза [3].

Одним из перспективных направлений для профилактики, лечения и контроля зоонозов бактериальной этиологии является применение препаратов на основе бактериофагов [4, 5]. Доказана эффективность применения фаговых препаратов на разных стадиях производства пищевой продукции: при выращивании животных, при переработке продуктов их убоя и санации готовой продукции от возбудителей зоонозов [6–8]. Несколько групп исследователей разрабатывают фаговые препараты и изучают их эффективность при сальмонеллезе свиней. Установлено, что введение фагов не оказывает негативного влияния на нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта свиней и позволяет в 100–1000 раз снизить количество сальмонелл в органах и тканях поросят-отъемышей, зараженных сальмонеллезом, в сравнении с их количеством в контрольной группе животных, не получивших препарат [9–12]. В течение многолетней практики разработки и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов сформировался ряд критериев для выбора перспективных штаммов фагов для изготовления препаратов на их основе [13, 14].

Цель исследования — селекция штаммов бактериофагов для изготовления лечебно-профилактического препарата против сальмонеллеза свиней.

Материалы и методы/ Materials and methods

В работе были использованы:

• 19 изолятов бактериофагов, выделенных в 2019–2020 гг. из объектов внешней среды, отобранных в пяти свиноводческих хозяйствах Белгородской области и Краснодарского края, и 5 штаммов бактериофагов из коллекции отдела бактериологии ФГБУ «ВГНКИ»;

• 90 штаммов различных сероваров рода *Salmonella* из коллекции музея микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ», эпизоотические штаммы сальмонелл, выделенные в 2007–2020 гг. от больных животных в различных регионах страны, а также штаммы бактерий родов *Escherichia, Proteus, Citrobacter, Morganella, Klebsiella* и *Shigella*.

Для определения биологических свойств штаммов использовали следующие питательные среды, реактивы и диагностикумы: мясопептонный бульон (Oxoid, Великобритания); мясопептонный агар (МПА) с концентрацией агара 0,25%, 0,6% и 1,2% (HiMedia, Индия); среда Эндо; хромогенный агар для сальмонелл (Oxoid, Великобритания); среда Раппапорта-Вассилиадиса (Oxoid, Великобритания); набор реактивов для окраски по Граму; тест-система для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек api20E (bioMerieux SA, Франция); сыворотки диагностические сальмонеллезные «Петсал» (ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России).

Метод выделения бактериофагов

Выделение изолятов фагов проводили из сточных вод и других объектов внешней среды свиноводческих комплексов, неблагополучных по сальмонеллезу свиней. Пробы, содержащие механические включения, предварительно центрифугировали на центрифуге Sigma 3-30KS (Германия) при 2000 g в течение 10 минут. Супернатант фильтровали через фильтр MF-Millipore с пористостью 0,45 ммк из нитрата и ацетата целлюлозы (Merck, Германия), очищенные образцы использовали для поиска в них вирусов бактерий. Пробы фекалий поросят, суспендированных в забуференном физиологическом растворе в соотношении 1:10, очищали аналогичным способом. Для повышения вероятности обнаружения фагов использовали метод обогащения, описанный Адамсом [15]. Исследуемый материал засевали в мясопептонный бульон (МПБ) совместно со штаммами *S. Typhimurium* и *S. Choleraesuis*, находящимися в логарифмической фазе роста, инкубировали 18–24 часа при температуре 37 °С. Пробы фильтровали через фильтры MF-Millipore с пористостью 0,22 ммк из нитрата и ацетата целлюлозы (Merck, Германия), затем определяли наличие фагов в полученных стерильных фильтратах, высевая их на жидкие и плотные питательные среды, предварительно засеянные индикаторными штаммами *S. Typhimurium* и S. *Choleraesuis*.

Чистые линии фагов получали последовательным клонированием морфологически однотипных негативных колоний. Сравнительную оценку морфологии негативных колоний различных фагов проводили, используя одну партию питательной среды и одинаковые условия культивирования.

Методы исследования бактериофагов

Определение титра и количества фаговых частиц. Активность бактериофагов определяли общепринятыми способами — по количеству жизнеспособных фаговых частиц методом Грациа и по литической активности фагов методом Аппельмана, описанными Адамс [15].

Определение спектра литической активности бактериофагов. Спектр литической активности бактериофагов оценивали методом нанесения фага (spot-тест) на газон бактериальной культуры в чашках Петри с 1,5% МПА. Наличие фагов определяли по пятнам лизиса на газоне после культивирования в течение 18–24 часов в термостате при температуре 37 °С. Для определения спектра использовали музейные и эпизоотические штаммы *S. Typhimurium* и S. *Choleraesuis*.

Определение диапазона специфичности бактериофагов. Оценку диапазона специфичности бактериофагов проводили аналогично с помощью spot-теста.

Для определения использовали музейные и эпизоотические штаммы сероваров сальмонелл гетерологичных *S. Typhimurium* и *S. Choleraesuis*, а также представителей других родов энтеробактерий.

Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов. На поверхность 1,5% МПА в чашке Петри наносили 0,1 мл бактериофага с титром не менее 10^8 БОЕ/мл и равномерно распределяли шпателем до полного впитывания фага. Затем на поверхность агара с фагом наносили 0,1 мл бактериальной культуры с концентрацией не менее 10^8 КОЕ/мл и растирали по поверхности чашки шпателем. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Частоту возникновения фагорезистентных мутантов определяли как отношение количества фагорезистентных клонов к количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл среды.

Метод выделения и идентификации Salmonella spp. Исследования проводили согласно МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». Для отнесения выделенных изолятов микроорганизмов к роду *Salmonella* изучали их ферментативные свойства с помощью тест-системы для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек api20E (bioMerieux SA, Франция). Изоляты сальмонелл также исследовали на бактериологическом анализаторе Sensititre (TREK Diagnostic Systems, Великобритания) с использованием тест-системы GNID, определяющей 32 ферментативные реакции для идентификации штамма. Серологическую идентификацию серовара проводили с помощью сальмонеллезных агглютинирующих сывороток «Петсал».

Таблица 1. **Спектр литического действия бактериофагов *S. Typhimurium***
Table 1. **Spectrum of lytic activity of *S. Typhimurium* bacteriophages**

№ п/п	№ фага / Штамм сальмонелл	1	2	3	4	5	11	12	13	14	15	17	18
1	*S. typhimurium* ATCC 10428	scl	scl	scl	scl	cl	-	scl	ol	cl	-	cl	scl
2	*S. typhimurium* 38	-	cl	scl	-	cl	-	scl	cl	cl	-	scl	scl
3	*S. typhimurium* 1626	cl	cl	cl	cl	cl	scl	cl	ol	-	scl	cl	cl
4	*S. typhimurium* 3	scl	scl	cl	scl	scl	-	scl	cl	scl	-	cl	cl
5	*S. typhimurium* 24	cl	cl	scl	cl	cl	-	cl	scl	-	-	scl	scl
6	*S. typhimurium* 4/1	scl	cl	scl	-	cl	scl	ol	scl	-	-	scl	scl
7	*S. typhimurium* Glasgow O1	scl	cl	scl	cl	cl	-	-	-	-	-	-	-
8	*S. typhimurium* Индейка	cl	scl	scl	cl	cl	-	cl	scl	-	-	scl	scl
9	*S. typhimurium* 6324	cl	cl	scl	-	scl	-	scl	scl	-	-	ol	t.v.
10	*S. typhimurium* 1281	-	cl	scl	cl	cl	-	cl	scl	-	-	scl	scl
11	*S. typhimurium* 3379	-	cl	scl	cl	cl	-	scl	ol	-	-	scl	scl
12	*S. typhimurium* 383/2	-	scl	scl	cl	cl	-	-	-	-	-	scl	scl
13	*S. typhimurium* 137	t.v.	t.v.	scl	scl	cl	-	-	-	-	-	scl	t.v.
14	*S. typhimurium* 1279	-	cl	scl	scl	scl	-	scl	scl	scl	-	scl	scl
15	*S. typhimurium* 3359	-	cl	scl	cl	cl	-	-	scl	-	-	scl	scl
16	*S. typhimurium* 1282	-	scl	scl	scl	cl	-	-	-	-	-	scl	scl
17	*S. typhimurium* 312	-	-	-	-	cl	-	-	-	-	-	-	-
18	*S. typhimurium* M-2	cl	cl	cl	-	cl	ol	cl	cl	cl	-	scl	-
19	S.typhimurium 371	scl	-	-	cl	cl	-	-	-	-	-	scl	-
20	*S. typhimurium* № 3	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	scl	scl	cl	cl
21	*S. typhimurium* Северин	scl	scl	scl	scl	cl	-	cl	cl	cl	-	scl	cl
22	*S. typhimurium* Мос. обл. голубь	cl	scl	scl	scl	cl	-	ol	ol	ol	-	scl	scl
23	*S. typhimurium* Габричевского	cl	scl	scl	scl	cl	-	scl	scl	scl	scl	scl	ol
24	*S. typhimurium* «МС»	scl	scl	scl	scl	cl	-	-	-	scl	-	scl	scl
25	*S. typhimurium* «М-9»	scl	scl	scl	cl	cl	-	scl	scl	cl	-	scl	scl
26	*S. typhimurium* «МС»-2	ol	cl	cl	cl	cl	-	-	-	-	-	cl	cl
27	*S. typhimurium* «Лопатникова»	scl	scl	scl	cl	cl	-	scl	-	scl	-	cl	cl
28	*S. typhimurium* 415	scl	scl	scl	cl	cl	-	ol	-	ol	-	cl	cl
29	*S. typhimurium* б/н, Тульская обл.	-	-	-	scl	cl	-	-	-	-	-	-	-
30	*S. typhimurium* «Голубь»	cl	scl	scl	scl	scl	-	cl	cl	scl	-	cl	cl
31	*S. typhimurium* «Казань»	scl	scl	scl	-	scl	-	-	-	-	-	scl	scl
32	*S. typhimurium* H27	scl	-	-	scl	cl	-	-	-	-	-	ol	ol

Примечания: cl, scl, ol, t.v. — степень лизиса бактериального газона культуры исследуемого штамма чистой линией бактериофага: cl — чистый полный лизис без вторичного роста бактерий, scl — полный лизис с небольшим ростом бактерий на негативном пятне, ol — лизис со значительным ростом бактерий, t.v. — отдельные мелкие негативные фага колонии на фоне пятна spot-теста; отсутствие лизиса.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Выделение бактериофагов, активных к S. Typhimurium и S. Choleraesuis. Поиск бактериофагов, активных к основным возбудителям сальмонеллеза поросят *S. Typhimurium* и S. *Choleraesuis,* проводили в образцах сточных вод, в смывах с оборудования и поверхности помещений и в пробах фекалий, отобранных в свиноводческих хозяйствах Белгородской области и Краснодарского края. В результате исследования 72 образцов было выделено 19 изолятов бактериофагов, способных лизировать культуры возбудителей сальмонеллеза свиней.

Наибольшая эффективность выделения бактериофагов сальмонелл наблюдалась при исследовании образцов сточных вод и фекалий поросят.

В ряде случаев состав популяций выделенных изолятов бактериофагов был гетерогенным и представлен несколькими типами негативных колоний. В таких случаях от трех до пяти раз проводили последовательное клонирование фагов из негативных колоний до получения их однородной популяции (чистой линии).

Активность изолятов бактериофагов, полученных после клонирования в чистых линиях, составила от 10^{-2} до 10^{-7} по Аппельману, их фаголизаты содержали от 1,5 x 10^3 до 5,2 x 10^7 фаговых частиц в 1 мл.

Кроме выделенных изолятов, в исследованиях использовали пять штаммов бактериофагов (четыре фага *S. Typhimurium* и один — *S. Choleraesuis*) из коллекции лаборатории.

Определение спектра литической активности бактериофагов к S. Typhimurium. Результаты исследований определения спектра литической активности выделенных изолятов бактериофагов по отношению к музейным и эпизоотическим 32 штаммам *S. Typhimurium* представлены в таблице 1. Номер бактериофага определялся по моменту начала проведения исследований его свойств.

Наиболее широким литическим спектром из числа изученных обладали изоляты фагов: фаг № 5, способный лизировать все из 32 использованных в опыте штаммов *S. Typhimurium*; фаг № 3, лизирующий 87,5% штаммов; фаги № 2, 17, лизирующие 84,4% штаммов; фаг № 18, способный лизировать 71,9% штаммов.

Определение спектра литической активности бактериофагов к S. Choleraesuis. Результаты исследований определения спектра литической активности выделенных изолятов бактериофагов по отношению к музейным и эпизоотическим 25 штаммам *S. Choleraesuis* представлены в таблице 2. Номер бактериофага определялся по моменту начала проведения исследований его свойств.

Таблица 2. **Спектр литического действия бактериофагов *S. Choleraesuis***
Table 2. **Spectrum of lytic activity of *S. choleraesuis* bacteriophages**

№ п/п	№ фага / Штамм сальмонелл	6	7	8	9	10	16	19	20	21	22	23	24
1	*S. Choleraesuis* ATCC 10708	cl	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
2	*S. Choleraesuis* № 9	cl	cl	-	-	-	-	-	-	-	cl	scl	scl
3	*S. Choleraesuis* 370	-	cl	scl	-	-	-	cl	-	scl	cl	cl	cl
4	*S. Choleraesuis* 997	cl	cl	-	scl	cl	cl	scl	scl	scl	cl	cl	cl
5	*S. Choleraesuis* 964	cl	cl	-	cl	cl	ol	-	-	-	cl	cl	cl
6	*S. Choleraesuis* 2686	cl	cl	scl	scl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
7	*S. Choleraesuis* 941	cl	cl	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
8	*S. Choleraesuis* Kunz. Латвия	cl	cl	cl	scl	cl	cl	-	ol	ol	cl	cl	cl
9	*S. Choleraesuis* 133/11	cl	cl	cl	scl	scl	scl	-	-	-	cl	cl	cl
10	*S. Choleraesuis* 4192	cl	cl	cl	cl	cl	ol	-	-	-	scl	ol	ol
11	*S. Choleraesuis* 434	-	cl	-	scl	scl	ol	-	-	-	scl	scl	scl
12	*S. Choleraesuis* 2887	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
13	*S. Choleraesuis* 903	scl	-	-	-	-	-	-	-	scl	-	-	-
14	*S. Choleraesuis* 7035	cl	cl	cl	scl	scl	cl	-	cl	-	cl	cl	scl
15	*S. Choleraesuis* 23	cl	cl	scl	ol	scl	-	-	-	-	cl	cl	cl
16	*S. Choleraesuis* 1045	cl	cl	scl	scl	scl	-	-	-	-	cl	cl	scl
17	*S. Choleraesuis* 2774	cl	cl	-	ol	ol	scl	ol	-	-	cl	-	cl
18	*S. Choleraesuis* 4091	cl	cl	scl	scl	scl	ol	scl	scl	cl	-	scl	-
19	*S. Choleraesuis* 4037	cl	cl	scl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
20	*S. Choleraesuis* 852	cl	cl	cl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
21	*S. Choleraesuis* 228/2	cl	cl	scl	scl	cl	scl	scl	ol	ol	cl	cl	cl
22	*S. Choleraesuis* «Кирова»	cl	cl	cl	cl	cl	cl	scl	scl	scl	cl	cl	cl
23	*S. Choleraesuis* 200	cl	cl	-	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
24	*S. Choleraesuis* 99/2	cl	cl	scl	scl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
25	*S. Choleraesuis* «Американский», Латвия	cl	scl	scl	scl	scl	cl	cl	scl	cl	cl	cl	cl

Примечания: cl, scl, ol, и t.v. — степень лизиса бактериального газона культуры исследуемого штамма чистой линией бактериофага: cl — чистый полный лизис без вторичного роста бактерий, scl — полный лизис с небольшим ростом бактерий на негативном пятне, ol — лизис со значительным ростом бактерий, t.v. — отдельные мелкие негативные фага-колонии на фоне пятна spot-теста; отсутствие лизиса.

Наиболее широким литическим спектром из числа изученных обладали изоляты фагов № 6, 7, способные лизировать 96% (24 из 25) испытанных штаммов сальмонелл серовара *S. Choleraesuis*, фаг № 22, способный лизировать 92% штаммов, фаги № 23, 24, лизирующие 88% штаммов.

Для проведения дальнейших исследований были отобраны восемь изолятов бактериофагов, обладающих наиболее широким спектром литического действия среди изученных фагов, а именно бактериофаги *S. Typhimurium* № 2, 5, 17, 18 и бактериофаги *S. Choleraesuis* № 6, 7, 22, 23.

Диапазон специфичности бактериофагов к гетерологичным сероварам сальмонелл. При определении диапазона специфичности исследуемых фагов использовали штаммы четырех серогрупп сальмонелл — O4(B), O7(C), O9(D) и O10(E), включающие серовары, наиболее часто вызывающие заболевание животных сальмонеллезом.

Изучаемые изоляты бактериофагов, помимо серовара, гомологичного штамму хозяина, были способны активно лизировать штаммы гетерологичных сероваров сальмонелл. Среди фагов *S. Typhimurium* наиболее широким спектром обладал изолят фага № 5, он был способен лизировать сальмонеллы сероваров *S. Enteritidis* (исследована чувствительность шести штаммов), *S. Dublin* (пять штаммов), *S. Abortuseqvi* (три штамма), *S. California* (один штамм), *S. Choleraesuis* (пять штаммов), *S. Infantis* (пять штаммов), *S. Anatum* (три штамма) и *S. London* (три штамма). Среди фагов *S. Choleraesuis* наиболее широким спектром обладал изолят фага № 7, он лизировал сальмонеллы сероваров *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* (исследована чувствительность пяти штаммов), *S. Gallinarum* (пять штаммов), *S. Abortuseqvi, S. Virchow* (два штамма).

Диапазон специфичности бактериофагов к гетерологичным видам семейства энтеробактерий. Для определения диапазона специфичности выделенных фагов по отношению к штаммам гетерологичных родов семейства *Enterobacteriaceae* использовали восемь изолятов бактериофагов, упомянутых выше, и по три типовых штамма родов *Escherichia, Proteus, Citrobacter, Morganella, Klebsiella* и *Shigella*. Литического действия фагов на штаммы гетерологичных родов энтеробактерий не обнаружено. Таким образом, диапазон специфичности выделенных фагов ограничен пределами рода *Salmonella*.

Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов. Частота возникновения фагорезистентных форм бактериальных клеток штаммов-хозяев бактериофагов *S. Typhimurium* фага составила: для фага № 2 — 4,6 x 10^{-8}, для фага № 5 — 1,5 x 10^{-9}, для фага № 17 — 3,2 x 10^{-9}, для фага № 18 — 4,6 x 10^{-8} резистентных клеток в 1 мл фаголизата.

Частота образования фагорезистентных форм бактериальных клеток штаммов-хозяев бактериофагов *S. Choleraesuis* была значительно выше и составила: 3,7 x 10^{-8} резистентных клеток в 1 мл фаголизата для фага № 6; 5,4 x 10^{-5} — для фага № 7; 4,6 x 10^{-7} — для фага № 22, 3,2 x 10^{-5} — для фага № 23.

Выбор штаммов бактериофагов для изготовления препарата. После сравнительного изучения свойств выделенных изолятов фагов из них отобраны четыре штамма фагов, наиболее перспективных для изготовления экспериментального препарата: штаммы фагов № 2 и 17 *S. Typhimurium* и штаммы фагов № 6 и 22 *S. Choleraesuis*. Выбранные фаги обладали высокой активностью (10^{-8} -10^{-9} по Аппельману), низкой частотой образования фагорезистентных форм и были способны лизировать от 84,4 до 96% штаммов основных возбудителей сальмонеллеза поросят. Помимо сероваров *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium*, выбранные изоляты фагов также способны эффективно лизировать ряд наиболее этиологически значимых возбудителей сальмонеллеза животных: штаммы сальмонелл сероваров *S. Enteritidis, S. Dublin, S. Abortuseqvi, S. California, S. Choleraesuis, S. Infantis, S. Anatum, S. Gallinarum, S. Virchow* и *S. London*.

Выводы/Conclusion

Создана коллекция из 24 бактериофагов, активных к основным возбудителям сальмонеллеза поросят *S. Choleraesuis* и *S. Typhimurium*. Сравнительное изучение основных биологических свойств селекционированных фагов позволило отобрать из них четыре штамма бактериофагов, соответствующих критериям выбора производственных штаммов при изготовлении препарата бактериофага для профилактики и лечения сальмонеллеза поросят. Выбранные штаммы фагов обладали высокой активностью, низкой частотой образования фагорезистентных форм бактерий, широким спектром литического действия по отношению к сероварам сальмонелл, наиболее часто вызывающих заболевания животных.

Все авторы несут ответственность за свою работу и представленные данные.
Все авторы внесли равный вклад в эту научную работу.
Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data.
All authors have made an equal contribution to this scientific work.
The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.
The authors declare no conflict of interest.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лимаренко А.А., Болоцкий И.А., Баранников А.И. Болезни свиней. Справочник. Санкт-Петербург: *Лань.* 2008; 640.

2. Анализ эпизоотической ситуации по сальмонеллезу животных. Информационный бюллетень. Москва: *Центр ветеринарии*. 2017; 59.

3. Ленев С.В. *и др.* Бактериофаги как средство борьбы с сальмонеллезом и колибактериозом. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* 2021; (10): 28–35. https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202110004

4. Пименов Н.В. Бактериофагия как основа для решения глобальной проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* 2020; (1): 30–35. https://doi.org/10.26155/vet.zoo.bio.202001004

5. Алешкин А.В. *и др.* Патент RU 2 705 302 C1. Антибактериальная композиция на основе штаммов бактериофагов для профилактики или лечения сальмонеллеза и/или эшерихиоза сельскохозяйственных животных или птиц, или человека. Опубликовано 06.11.2019.

6. Greer G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection.* 2005; 68(5): 1102–1111. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1102

7. Sulakvelidze A., Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.) Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: *CRC Press*. 2005; 335–380.

8. Wall S.K., Zhang J., Rostagno M.H., Ebner P.D. Phage therapy to reduce preprocessing Salmonella infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010; 76(1): 48–53. https://doi.org/10.1128/AEM.00785-09

REFERENCES

1. Limarenko A.A., Bolotskiy I.A., Barannikov A.I. Diseases of pigs. Manual. St. Petersburg: Lan'. 2008; 640. (In Russian)

2. Analysis of the epizootic situation of salmonellosis in animals. Information bulletin. Moscow: *Veterinary Center.* 2017; 59. (In Russian)

3. Lenev S.V. et al. Bacteriophages as a means of fighting salmonellosis and colibacteriosis. Veterinary, Zootechnics and Biotechnology. 2021; (10): 28–35. (In Russian) https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202110004

4. Pimenov N.V. Bacteriophagy as a basis for solving the global problem of antibiotic resistance of pathogenic bacteria. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2020; (1): 30–35. (In Russian) https://doi.org/10.26155/vet.zoo.bio.202001004

5. Aleshkin A.V. et al. Patent RU 2 705 302 C1. Antibacterial composition based on bacteriophage strains for the prevention or treatment of salmonellosis and/or escherichiosis of farm animals or birds, or humans. Published 11.06.2019. (In Russian)

6. Greer G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection.* 2005; 68(5): 1102–1111. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.1102

7. Sulakvelidze A., Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.) Bacteriophages: Biology and Applications. Boca Raton: *CRC Press*. 2005; 335–380.

8. Wall S.K., Zhang J., Rostagno M.H., Ebner P.D. Phage therapy to reduce preprocessing Salmonella infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology.* 2010; 76(1): 48–53. https://doi.org/10.1128/AEM.00785-09

9. Seo B.-J. *et al.* Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2018; 80(6): 851–860. https://doi.org/10.1292/jvms.17-0501

10. Zhang J. *et al.* Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2015; 6: 39. https://doi.org/10.1186/s40104-015-0039-7

11. Hooton S.P.T., Atterbury R.J., Connerton I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology.* 2011; 151(2): 157–163. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015

12. Callaway T.R. *et al.* Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce Salmonella populations in growing swine. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011; 8(2): 261–266. https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0671

13. Зурабов А.Ю., Каркищенко Н.Н., Попов Д.В., Жиленков Е.Л., Попова В.М. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фагов препаратов. *Биомедицина*. 2012; (1): 134–138. eLIBRARY ID: 17705763

14. Сятчихина Е.Н., Набатников П.А., Коровкин С.А., Катлинский А.В., Игнатьев Г.М. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Esherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2016; 16(2): 90–95. eLIBRARY ID: 26154564

15. Adams M.H. Bacteriophages. New York; London: *Interscience Publishers, Inc*. 1959; xviii + 592.

9. Seo B.-J. *et al.* Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2018; 80(6): 851–860. https://doi.org/10.1292/jvms.17-0501

10. Zhang J. *et al.* Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2015; 6: 39. https://doi.org/10.1186/s40104-015-0039-7

11. Hooton S.P.T., Atterbury R.J., Connerton I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. *International Journal of Food Microbiology.* 2011; 151(2): 157–163. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015

12. Callaway T.R. *et al.* Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce Salmonella populations in growing swine. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011; 8(2): 261–266. https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0671

13. Zurabov A.Yu., Karkischenko N.N., Popov D.V., Zhilenkov E.L., Popova V.M. Creation of native bacteriophages collection and principle of treatment and profilactic phages drug design. *Journal Biomed.* 2012; (1): 134–138. (In Russian) eLIBRARY ID: 17705763

14. Siatchikhina E.N., Nabatnikov P.A., Korovkin S.A., Katlinsky A.V., Ignatyev G.M. Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016; 16(2): 90–95. (In Russian) eLIBRARY ID: 26154564

15. Adams M.H. Bacteriophages. New York; London: *Interscience Publishers, Inc*. 1959; xviii + 592.

ОБ АВТОРАХ:

Сергей Васильевич Ленев,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
svlenev@vgnki.ru
https//orcid.org/0000-0002-0049-3728

Михаил Константинович Пирожков,
доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник,
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
mkpirojkov@vgnki.ru

Антон Валерьевич Моторыгин,
кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией,
Всероссийский государственный центр ка-чества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
avmotorygin@vgnki.ru

Алсу Анваровна Галиакбарова,
научный сотрудник,
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
a.galiakbarova@vgnki.ru

Алексей Сергеевич Кленов,
младший научный сотрудник,
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
a.klenov@vgnki.ru

Надежда Сергеевна Абросимова,
научный сотрудник,
Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов,
Звенигородское шоссе, д. 5, Москва, 123022, Россия
n.abrosimova@vgnki.ru

ABOUT THE AUTHORS:

Sergey Vasilevich Lenev,
Candidate of Biology Sciences, Leading Researcher
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022,
Russia
svlenev@vgnki.ru https//orcid.org/0000-0002-0049-3728

Mikhail Konstantinovich Pirozhkov,
Doctor of Veterinary Sciences, Leading Researcher,
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russia
mkpirojkov@vgnki.ru

Anton Valerievich Motorygin,
Candidate of Veterinary Sciences, chef la-boratory
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russia
avmotorygin@vgnki.ru

Alsu Anvarovna Galiakbarova,
Researcher,
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russia
a.galiakbarova@vgnki.ru

Alexey Sergeevich Klenov,
Junior Re-searcher,
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russia
a.klenov@vgnki.ru

Nadezhda Sergeevna Abrosimova,
Researcher,
All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed,
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russia
n.abrosimova@vgnki.ru