

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Юшкевич Е.А.<sup>1</sup>, Калашников В.А.<sup>1</sup>, Шаповалов С.О.<sup>1</sup>, Лаишевцев А.И.<sup>2,4</sup>, Плешаков А.В.<sup>2</sup>, Киселева И.А.<sup>3</sup>, Зубкова Е.С.<sup>3</sup>, Андреева А.А.<sup>3</sup>, Пасивкина М.А.<sup>3</sup>, Капустин А.В.<sup>4</sup>, Алешкин А.В.<sup>3</sup>

## АЛГОРИТМ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭРРАДИКАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛ КАК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИЙ

<sup>1</sup> ООО Научно-испытательный центр «ЧЕРКИЗОВО», 107143, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ООО «ЦБО Микроэкологии» (Evolink), 143026, Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

<sup>4</sup> ФГБНУ Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, 109428, Москва, Россия

**Введение.** Сальмонеллез - одна из самых распространенных в мире зоонозных бактериальных инфекций. Вызывая заболевания у птицы на агропромышленных холдингах, сальмонеллы создают угрозу горизонтального переноса к людям, которые могут быть заражены, употребляя контаминированные продукты питания. В последнее время большое внимание уделяется бактериофагам, которые используются для профилактики и лечения сальмонеллеза у птицы, фаг-опосредованной биодезинфекции объектов санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора.

**Материал и методы.** Были исследованы степ-пробы с птицеводческих хозяйств; отобраны штаммы сероваров *Salmonella*, циркулирующих на этих объектах. Использован антибактериальный коктейль, сконструированный на основе сальмонеллезных бактериофагов: *Salmonella Enteritidis* BF-1354, *Salmonella Infantis* BF-1355, *Salmonella Typhimurium* BF-1356. В работе применялись микробиологические, масс-спектрометрические и молекулярно-генетические методы исследования.

**Результаты.** При отработке алгоритма индивидуализированного подбора, удалось сконструировать высокоэффективный коктейль на основе сальмонеллезных фагов не только в отношении широко распространенных ранее серотипов *Salmonella enterica*: *Infantis*, *Enteritidis*, *Typhimurium*, но и против приобретающих в настоящее время особую актуальность для вертикально ориентированных агропромышленных холдингов серотипов *Heidelberg*, *Kedougou*, *Nadar*. Было подтверждено, что методы Отто и стекающей капли подходят для экспресс-анализа. Для эффективного подбора бактериофагов необходимо использовать методы Анпельмана и Грация, *in vitro* показывающие, что бактериофаги реплицируются на полевых изолятах. Можно с уверенностью сказать, что *in vivo* данные бактериофаги будут лизировать бактерии на площадке холдинга. При исследовании титров бактериофагов методом Грация, можно подобрать необходимый титр бактериофагов, который в дальнейшем будет использован в птицеводческом хозяйстве. Для автоматизации учёта результатов по методу Анпельмана использовали постановку на анализаторе автоматическом бактериологическом *Тетро filler*.

**Заключение.** Полученные результаты, заключающиеся в оптимальном наборе методов, выстроенных в алгоритм подбора бактериофагов, могут быть использованы в лабораторной практике клинических региональных служб Роспотребнадзора и Россельхознадзора.

**Ключевые слова:** сальмонеллез; бактериофаги; птицеводство; диагностика; антибиотикорезистентность

**Для цитирования:** Юшкевич Е.А., Калашников В.А., Шаповалов С.О., Лаишевцев А.И., Плешаков А.В., Киселева И.А., Зубкова Е.С., Капустин А.В., Алешкин А.В. Алгоритм индивидуального подбора бактериофагов для эффективной эррадикации сальмонелл как возбудителей зоонозных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (1): 43-57.  
DOI: <https://doi.org/10.51620/EIB-2024-29-1-43-57>

**Для корреспонденции:** Лаишевцев Алексей Иванович, директор по разработке ООО «ЦБО Микроэкологии»; e-mail: [alaishevtsev@bk.ru](mailto:alaishevtsev@bk.ru)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила	11.02.2024
Принята к печати	19.02.2024
Опубликовано	00.03.2024

*Yushkevich E.A.<sup>1</sup>, Kalashnikov V.A.<sup>1</sup>, Shapovalov S.O.<sup>1</sup>, Laishevtsev A.I.<sup>2,4</sup>, Pleshakov A.V.<sup>2</sup>, Kiseleva I.A.<sup>3</sup>, Zubkova E.S.<sup>3</sup>, Andreeva A.A.<sup>3</sup>, Pasivkina M.A.<sup>3</sup>, Kapustin A.V.<sup>4</sup>, Aleshkin A.V.<sup>3</sup>*

## ALGORITHM FOR INDIVIDUAL SELECTION OF BACTERIOPHAGES FOR EFFECTIVE ERADICATION OF SALMONELLA AS PATHOGENS OF ZOOZOTIC INFECTIONS

<sup>1</sup> ООО «Scientific Testing Center «CHERKIZOVO»», 107143, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> LLC «CBO Microecology» (Evolink), 143026, Moscow, Russia;

<sup>3</sup> G. N. Gabrichevskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 125212, Moscow, Russia;

<sup>4</sup> Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV), 109428, Moscow, Russia

**Introduction.** Salmonellosis is one of the most common zoonotic bacterial infections in the world. By causing diseases in poultry at agro-industrial holdings, salmonella poses a threat of horizontal transmission to people who may be infected while eating contaminated food. Recently, much attention has been paid to bacteriophages, which are used for the prevention and treatment of salmonellosis in poultry, phage-mediated biodesinfection of sanitary, epidemiological and veterinary surveillance facilities.

**Material and methods.** Step samples from poultry farms were examined; strains of *Salmonella* serovars circulating at these facilities were selected. An antibacterial cocktail was used, designed on the basis of *Salmonella* bacteriophages: *Salmonella* Enteritidis BF-1354, *Salmonella* Infantis BF-1355, *Salmonella* Typhimurium BF-1356. Microbiological, mass spectrometric and molecular genetic research methods were used in the work.

**Results.** When working out the algorithm of individualized selection, it was possible to design a highly effective cocktail based on *Salmonella* phages not only in relation to the previously widespread serotypes of *Salmonella enterica*: *Infantis*, *Enteritidis*, *Typhimurium*, but also against the serotypes *Heidelberg*, *Kedougou*, *Hadar*, which are currently gaining special relevance for vertically oriented agro-industrial holdings. It has been confirmed that the Otto and drip methods are suitable for express tests analysis. For effective selection of bacteriophages, it is necessary to use the methods of Appelman and Grazia, which in vitro show that bacteriophages replicate on field isolates. It is safe to say that in vivo these bacteriophages will kill bacteria at the holding site. When examining the titers of bacteriophages by the Grazia method, it is possible to select the necessary titer of bacteriophages, which will later be used in poultry farming. To automate the accounting of the results using the Appelman method, an automatic bacteriological analyzer Tempo filler was used.

**Conclusion.** The obtained results, including an optimal set of methods built into the bacteriophages selection algorithm, can be used in the laboratory practice of the clinical regional services of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing Veterinary and Phytosanitary Surveillance Service.

**Key words:** salmonellosis; bacteriophages; poultry farming; diagnostics; antibiotic resistance

**For citation:** Yushkevich E.A., Kalashnikov V.A., Shapovalov S.A., Laishevtsev A.I., Pleshakov A.V., Kiseleva I.A., Zubkova E.S., Andreeva A.A., Pasivkina M.A., Kapustin A.V., Aleshkin A.V. Algorithm for individual selection of bacteriophages for effective eradication of *Salmonella* as pathogens of zoonotic infections. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni (Epidemiology and Infectious Diseases)*. 2024; 29 (1): 43-57 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/EIB-2024-29-1-43-57>

**For correspondence:** Laishevtsev Alexey Ivanovich, Director of Development LLC «CBO Microecology»; e-mail: [a-laishevtsev@bk.ru](mailto:a-laishevtsev@bk.ru)

#### Information about authors:

Yushkevich E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4140-3300>;

Kalashnikov V.A., <https://orcid.org/0009-0001-1223-8644>;

Shapovalov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-5630-5247>;

Laishevtsev A.I., <https://orcid.org/0000-0002-5050-2274>;

Pleshakov A.V., <https://orcid.org/0009-0004-1221-1662>;

Kiseleva I.A., <http://orcid.org/0000-0001-7206-4220>;

Zubkova E.S., <https://orcid.org/0009-0007-1843-4754>;

Andreeva A.A., <https://orcid.org/0009-0007-7680-766X>;

Pasivkina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6223-1347>;

Kapustin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0136-2487>;

Aleshkin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0532-1378>.

**Conflict of interest.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 11.02.2024

Accepted 19.02.2024

Published 05.03.2024

**Введение.** Вопрос о безопасности выпускаемых продуктов питания актуален во всех странах, поскольку пищевые отравления, особенно бактериальной этиологии, представляют собой глобальную проблему. Одной из самых распространённых в мире зоонозных бактериальных инфекций, передающихся через продукты питания, и одной из главных причин возникновения групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя инфекции является сальмонеллёз. По данным службы Роспотребнадзора за 10 месяцев 2023 года отмечается увеличение заболеваемости сальмонеллёзами в Российской Федерации в сравнении с аналогичным периодом предыдущего года на 29%, при этом заболеваемость не превышает среднемноголетних значений и приближается к уровню, регистрируемому до пандемии COVID-19. Сальмонеллы занимают одно из ведущих мест среди микроорганизмов-возбудителей, обнаруживаемых у птицы [1] и могут быть источником контаминации пищевой про-

дукции из постоянно заражённых птицеводческих хозяйств, инкубаториев, посредством вертикальной передачи [2]. По данным референс-центра по мониторингу сальмонеллёзов в 2022 году наиболее значимыми в эпидемиологическом отношении являлись серотипы видов *Salmonella enterica*: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*. Всё большее распространение получают штаммы с повышенной термоустойчивостью, резистентные ко многим современным антимикробным препаратам (АМП) и дезинфицирующим средствам [3].

В современном птицеводстве используют множество методов профилактики, снижающих распространение сальмонелл как среди поголовья птиц, так и на этапах переработки мясных полуфабрикатов и яиц. Для профилактики распространения бактериальных инфекций используются вакцины, пробиотики, пребиотики, синбиотики, сорбенты, фитобиотики, органические кислоты, иммуностимуляторы, АМП [4-9], дезинфицирующие средства как в отсутствии, так и в присутствии живот-

ных. Чтобы снизить микробную контаминацию мяса птицы с достаточно высоким риском инфицирования, производители зачастую используют АМП на живой здоровой птице, что при несоблюдении регламентированных нормативными ветеринарными документами сроков выведения АМП приводит к сохранению их остаточных количеств в реализуемых тушках и птицепродуктах. Это всё чаще приводит к распространению резистентных к АМП микроорганизмов. По данным службы Роспотребнадзора в 2022 году 87% выделенных изолятов сальмонелл имели резистентность как минимум к одному АМП. Доля полирезистентных изолятов (имеющих устойчивость к препаратам трёх и более классов) составила 24,9%. Широкая циркуляция антибиотикорезистентных бактерий в популяциях сельскохозяйственной птицы создаёт угрозу горизонтального переноса резистентных форм патогенов к человеку [10, 11].

В последнее время для профилактики зоонозных заболеваний всё чаще используются бактериофаги в качестве альтернативы АМП [3, 12-14]. Бактериофаги - вирусы, заражающие бактерии, реплицируясь в них, они приводят к гибели бактериальных клеток (вирулентные бактериофаги). Фаги чрезвычайно универсальны, их можно использовать в пищевых, кормовых добавках, для выпойки при лечении и профилактики заражённой птицы, для проведения фаг-опосредованной биодезинфекции с аэрозольной или спрей-обработкой помещений птичников [3, 14].

В работе использован антибактериальный коктейль, сконструированный на основе сальмонеллёзных бактериофагов, депонированных в Государственной коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и Научно-методическом центре по изучению и идентификации бактериофагов ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора. В коктейль вошли сальмонеллёзные фаги: *Salmonella* Enteritidis BF-1354, *Salmonella* Infantis BF-1355, *Salmonella* Typhimurium BF-1356.

Входящие в состав коктейля сальмонеллёзные бактериофаги обладают высокой скоростью адсорбции на штамме-хозяине (не менее  $2,5 \times 10^{-8}$  см<sup>3</sup>/мин), достигнув бактериальных клеток-мишеней (посредством таксиса), размножаются в них, при этом концентрация фаговых частиц увеличивается.

Для отработки алгоритма индивидуализированного подбора бактериофагов с целью профилактики и лечения сальмонеллёза, фаг-опосредованной биодезинфекции объектов санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора с ряда птицеводческих площадок вертикально-ориентированного агрокомплекса поступили степ-пробы, из которых выделены следующие серовары сальмонелл (*Salmonella enterica* serovar *Typhi*): *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kedougou, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis. Для достижения цели, в ходе эксперимента применены следующие методы: микробиологическим методом из степ-проб выделители бактериальные колонии сальмонелл и изолировали их. Родовую и видовую идентификацию выделенных изолятов проводили с помощью MALDI-ToF и MLST. Далее следовала постановка микробиологических методов работы с бактериофаговым коктейлем: стекающей капли, Отто (spot-test), Аппельмана и Грация.

**Актуальность.** Для каждого птицеводческого хо-

зяйства необходим индивидуальный подбор коктейля бактериофагов против персистирующих серотипов *Salmonella* так же, как это отработано в клинической практике при персонализированной терапии бактериофагами у пациентов [15]. Объектом индивидуализированного подбора в данном случае является конкретный агропромышленный холдинг, где, исходя из ранее полученного опыта, персистирует ограниченный набор штаммов сальмонелл. Полученные в ходе исследования результаты, заключающиеся в оптимальном наборе методов, выстроенных в алгоритм подбора бактериофагов, могут быть использованы в лабораторной практике клинических региональных служб Роспотребнадзора и Россельхознадзора. Птицеводческие хозяйства, на производстве которых в пробах обнаруживаются *Salmonella* spp., несут огромные финансовые потери. Ущерб складывается из-за высокой смертности молодняка, запрета поступления в продажу мяса и яиц из заражённых хозяйств, затрат на лечение и ликвидацию заболевания. Для борьбы с патогенными микроорганизмами, циркулирующими в конкретном птицеводческом хозяйстве, после подбора штаммов бактериофагов, рекомендуется использовать коктейли бактериофагов на основе этих штаммов для профилактики и лечения птицы; для биодезинфекции оборудования и помещений, в том числе в присутствии птицы; для деконтаминации продуктов убоя, полуфабрикатов из птицы и яиц перед продажей.

#### **Материал и методы.**

В работе использовали следующие материалы:

- Степ-пробы с птицеводческих хозяйств.
- Штаммы сероваров *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kedougou, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis; Штаммы *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Kedougou, *Salmonella* Infantis – выделены из степ-проб с птицеводческих хозяйств на базе ООО «НИЦ Черкизово». Штаммы *Salmonella* Enteritidis (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхознадзора, Россия), *Salmonella* Typhimurium (Biomerieux, Франция) – эталонные культуры.

Питательные среды:

- «Питательная среда для выделения и дифференциации патогенных энтеробактерий сухая» (XLD-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия);
- среда Мюллера-Хинтон сухая (агар) (МХА) (НИЦФ ООО, Россия);
- Питательный бульон для культивирования микроорганизмов, готовый к применению Мясопептонный бульон (МПБ) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия);
- Пептонная вода (буферированная); по ISO 6579 (Peptone water (buffered)); асс. То ISO 6579) (ЗПВ) (Мерк (Merck KGaA), Германия);
- 0,9% изотонический раствор NaCl (Россия).

Приготовление каждой из сред – по инструкции от производителя.

#### **Коктейль сальмонеллёзных бактериофагов.**

В коктейль вошли сальмонеллёзные фаги, депонированные в Государственной коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и Научно-методическом центре по изучению и идентификации бактериофагов ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора: *Salmonella* Enteritidis BF-1354, *Salmonella* Infantis BF-



1355, *Salmonella* Typhimurium BF-1356.

Концентрация фаговых частиц каждого бактериофага  $10^9$ - $10^{10}$  БОЕ/мл коктейля.

### 1. Отбор сероваров, изоляция и культивирование

Поиск и отбор необходимых штаммов сальмонелл производился на базе ООО НИЦ «Черкизово» из потока приходящих степ-проб на детекцию на сальмонеллы. Все рабочие образцы *Salmonella* spp. культивировались на XLD-агаре. Для подтверждения результатов, выросшие колонии идентифицировали методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизацией с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-ToF MS) на приборе MALDI-ToF (массовый спектрометр microflex®) (Bruker Daltonik GmbH, Англия) согласно инструкции производителя. Времяпролетная MALDI масс-спектрометрия является новой технологией в диагностике, позволяющей проводить идентификацию микроорганизмов, определять таксономическое положение неизвестных микроорганизмов. Данный метод включает прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции лизата микробной клетки («прямое белковое профилирование»), предметом которого служат преимущественно рибосомальные белки, являющиеся консервативными в пределах вида микроорганизма. Чувствительность метода MALDI-ToF MS составляет 103-106 м.к./мл. Используя стандартизированные процедуры, разрешение MALDI-ToF MS позволяет идентифицировать на видовом уровне большинство штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, за исключением нескольких сложных штаммов, которые требуют большего внимания и дальнейшего развития метода. При этом точность микробиологической идентификации зависит от количества исследуемого материала. Специфичность видовой идентификации составляет до 97,6%. Интересующие штаммы изолированы из единичных колоний и культивировались на среде Мюллер-Хинтон (МХА). Бактериальные штаммы засеивались на плотную или жидкую питательную среду и брались в работу в фазе активного роста (18-20-ти часовая культура). Затем проводили идентификацию серотипов микроорганизмов вида *Salmonella* методом мультилокусного секвенирования по 7 генам (Achtman 7 Gene MLST), проводили на генетическом анализаторе (секвенатор) ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). MLST (англ. Multilocus sequence typing, мультилокусное секвенирование-типирование) - метод генетического типирования организ-

мов, основанный на определении последовательности нуклеотидов определённого набора их генов (локусов). Метод основан на установлении нуклеотидной последовательности небольших фрагментов (около 500 пар нуклеотидов) ряда генов и последующем сравнении соответствующих последовательностей у разных организмов. При MLST чаще всего анализируют так называемые гены домашнего хозяйства, которые являются необходимыми для протекания реакций основного метаболизма, а значит присутствуют у всех организмов. Эти гены в силу своей исключительной важности для жизнеспособности организма характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, многие из которых при этом являются селективно нейтральными. В связи с этим сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет относительно легко устанавливать степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их. Количество локусов, анализируемое в каждом конкретном исследовании, может быть разным, но чаще всего составляет 7-8. Технически MLST состоит из нескольких этапов. После сбора образцов микроорганизмов, которые должны быть проанализированы, из них выделяют ДНК и амплифицируют участки определённых генов методом ПЦР с использованием подходящих праймеров. Затем последовательность нуклеотидов амплифицированных участков анализируют с помощью автоматических секвенаторов. Полученные данные с помощью специальных программ сравнивают с имеющимися в базах данных и делают выводы о статусе конкретных генов в изучаемых популяциях. В нашем эксперименте сравнивали по локусам «*aroC*», «*dnaN*», «*hemD*», «*hisD*», «*purE*», «*sucA*», «*thrA*».

### 2. Микробиологические методы для подбора бактериофагов к выделенным сероварам сальмонелл

**Метод Ommo (spot-test):** метод заключается во внесении капли исследуемого бактериофага на засеянные сплошным газоном испытуемые бактериальные культуры с последующим термостатированием.

На плотную питательную среду Мюллера-Хинтон засеивали газоном в количестве 100  $\mu$ л бактериальную культуру, приготовленную по ОСО (42-28-85) (Россия) 10 ЕД. После того, как взвесь впиталась, на газон наносилась капля (20  $\mu$ л) коктейля сальмонеллёзных бактериофагов. Посевы инкубировались 18-20 часов при 37 °С. Фиксировали наличие или отсутствие лизиса культуры, и его степень.

Степень лизиса	Метод Отто на плотной питательной среде
++++	Полный лизис, на месте закапывания бактериофага культура не растёт
+++	Лизис с наличием единичных колоний культуры
++	Лизис в виде сливных участков с островками роста культуры
+	Лизис в виде отдельных стерильных пятен на сплошном газоне культуры
-	Сплошной рост культуры, не обнаруживается ни одного стерильного пятна

**Метод стекающей капли** - на верхний край чашки Петри со средой МХА наносили каплю коктейля сальмонеллёзных бактериофагов (200-300  $\mu$ л). Поднимали чашку под наклоном так, чтобы капля препарата

стекла к противоположному краю, давали препарату впитаться. Далее перпендикулярно наносили бактериальные культуры так, чтобы они, пересекали линию препарата. Посевы термостатировали при 37 °С 18-20

часов. Проводили учёт результатов (качественный метод) (рис. 1).

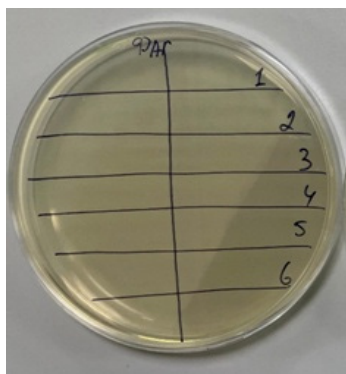


Рис. 1. Этап нанесения препарата методом «стекающей» капли.  
 1 - *Salmonella* Typhimurium, 2 - *Salmonella* Enteritidis, 3 - *Salmonella* Hadar, 4 - *Salmonella* Infantis, 5 - *Salmonella* Heidelberg, 6 - *Salmonella* Kedougou. До термостатирования.

**Метод Аппельмана** - метод определения литической активности (титра) бактериофага с подтверждением репликации фага на выделенных сероварах сальмонелл на жидких средах путём установления его максимального разведения, вызывающего полный лизис бульонной культуры бактерий.

В ряд стерильных пробирок вносили по 4,5 мл питательной среды ЗПВ или МПБ. В первую пробирку ряда вносили 0,5 мл испытуемого фага. Готовили серийные десятикратные разведения (8 пробирок). Перемешивание предыдущего разведения осуществляли пипетированием до 10 раз полученной смесью. Во все пробирки вносили 100-200  $\mu$ л 18-часовой бульонной культуры бактерий и слегка встряхивали. В качестве контроля использована жидкая питательная среда и культура (без фага), питательная среда (контроль

стерильности). Пробирки инкубировались в термостате при 37 °С в течение 3-4 часов или при комнатной температуре 18-20 часов. Литическую активность фага, выраженную в титре, устанавливали по последней пробирке, в которой отсутствовала мутность или осадок. Титр бактериофага по методу Аппельмана выражался максимальным разведением фага, при котором произошёл полный лизис соответствующей культуры: например, титр бактериофага, давшего лизис в первых 7 пробирках ряда, равен  $10^{-7}$  (рис. 2). Этот метод даёт качественную характеристику исследуемого фага. Предложена модификация метода – проверка титра не только по мутности питательной среды. После инкубации ряда пробирок с десятикратным разведением из этих пробирок делали посев на чашки Петри со средой МХА (100  $\mu$ л) для подтверждения роста или отсутствия бактерий.

Количество оставшихся микроорганизмов *Salmonella* spp. в пробирках с десятикратным разведением коктейля бактериофагов по методу Аппельмана определяли методом наиболее вероятного числа с применением анализатора автоматического бактериологического Tempo filler (BioMerieux Italia S.p.A.). Определение общего микробного числа основано на способности микроорганизмов продуцировать внеклеточные ферменты. В состав питательной среды входит специфический субстрат, меченный 4-метилумбеллифероном. Во время роста микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость ферменты, расщепляющие субстрат, в результате чего освобождается свободный 4-метилумбеллиферон, обладающий флуоресцентной способностью. Количество продуктов реакции прямо пропорционально численности популяции микроорганизмов. Наличие флуоресцентного сигнала считывается и фиксируется в автоматическом режиме ридером. В зависимости от количества и объёма положительных лунок, разведения производится подсчёт общего числа микроорганизмов в исходном образце методом наиболее вероятного числа в автоматическом режиме.

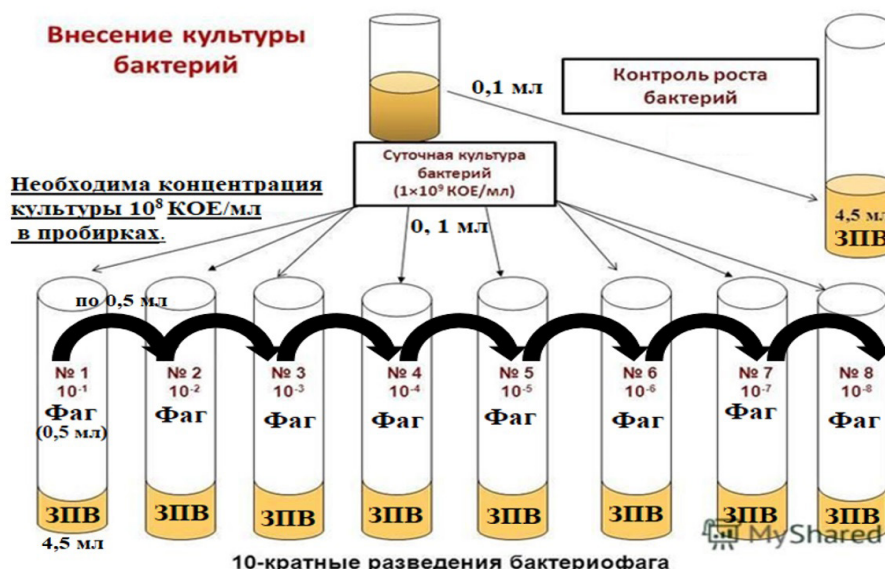


Рис. 2. Схема постановки метода Аппельмана.

**Метод Грациа** - позволяет подтвердить, что бактериофаги, входящие в сконструированный сальмонеллезный коктейль, могут реплицироваться на выделенных сероварах сальмонелл и определить до какого титра размножается на них бактериофаг. Для начала делается ряд разведений бактериофага также, как и в методе Аппельмана (на питательной среде или в физиологическом растворе). Сущность метода состоит в том, что в агар низкой (0,6%) концентрации («мягкий агар», «полужидкий агар» (ПЖА)) вносили 1 мл определенного разведения коктейля бактериофага, перемешивали, затем добавляли 0,2 мл бульонной 18-часовой культуры исследуемого серовара сальмонелл. Перемешивали и наслаивали эту смесь на поверхность ранее подготовленного 1,5 % питательного агара (МПА, МХА и т.д.) в чашке Петри. При этом ПЖА растапливали и разливали непосредственно перед применением в пробирки по 2,5 мл. Во время эксперимента ПЖА на-

ходился в водяной бане при температуре 48–50 °С. При инкубации бактерии размножались внутри верхнего «мягкого» слоя агара в виде множества колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5% питательного агара, который применялся в качестве подложки. Низкая концентрация агара в верхнем слое создавала пониженную вязкость, что способствовало хорошей диффузии фаговых частиц и инфицированию ими бактериальных клеток. Инфицированные бактерии подвергались лизису, в результате чего появлялось потомство фага, которое вновь заражало находящиеся в непосредственной близости с ними бактерии. Образование негативной колонии для фагов Т-группы вызвано одной частицей бактериофага и, следовательно, число негативных колоний служит количественным показателем содержания бляшкообразующих единиц в исследуемом образце (БОЕ/мл). Общая схема постановки классического метода Грациа представлена на рис 3.

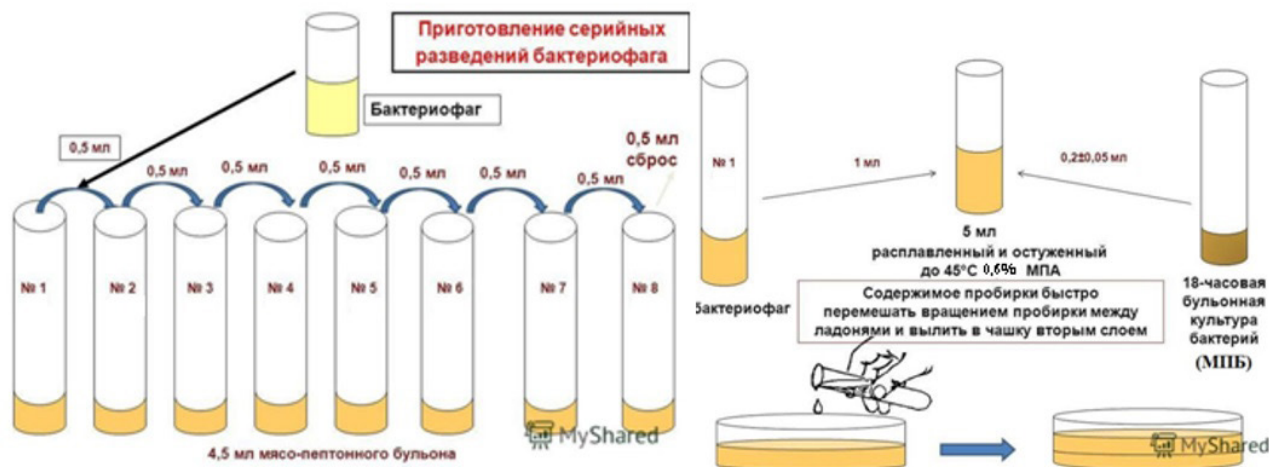


Рис. 3. Метод агаровых слоев по Грациа.

**Результаты.** При разработке алгоритма подбора бактериофагов был задействован коктейль, состоящий из стерильных очищенных фильтратов фаголизатов бактерий *Salmonella*: *Salmonella* Enteritidis BF-1354, *Salmonella* Infantis BF-1355, *Salmonella* Typhimurium BF-1356. Из степ-проб, полученных с птицеводческих хозяйств, выделены чистые линии сальмонелл. С помощью метода MALDI-TOF (рис. 4) и MLST-секвенирования установлена их родовая и видовая принадлежность. Для дальнейшей работы отобрано 6 сероваров *Salmonella* spp. (*S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Kedougou*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*).

В таблице 1 и на рис. 5,6 представлены данные по определению силы литической активности фагов, входящих в сальмонеллезный коктейль методом Отто (spot-test).

В таблице 2 и на рис. 7 представлены данные по определению литической активности фагов, входящих в сальмонеллезный коктейль методом стекающей капли.

В результате проведения двух методов, можно сде-

лать вывод о том, что методом Отто сальмонеллезные фаги *Salmonella* Enteritidis BF-1354, *Salmonella* Infantis BF-1355, *Salmonella* Typhimurium BF-1356 лизировали 100% исследуемых сероваров изолятов сальмонелл и 83% - методом стекающей капли.

Для отработки алгоритмов подбора бактериофагов для конкретного птицеводческого хозяйства поставлены методы Аппельмана и Грациа. Эти методы позволяют подтвердить, что выбранные бактериофаги могут реплицироваться на выделенных сероварах бактерий, и ветеринары могут подобрать дозы и курсы профилактической обработки, зная титры *Salmonell*, высеваемых с объектов санитарного и ветеринарно-санитарного надзора.

КОЕ бактериальных культур, которые остались нелизованными бактериофагом при большом разведении последнего, при проведении эксперимента по методу Аппельмана, установлены с помощью анализатора автоматического бактериологического Tempo filler и представлены в табл. 3.



Можно сделать вывод о том, что штаммы бактериофагов, входящих в испытуемый коктейль, могли реплицироваться на выделенных сероварах сальмонелл и имели титр на этих сероварах -  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ , за исключением серовара *S. Nadar*: просветления среды не произошло. С помощью анализатора автоматического бактериологического Tempro filler установлено,

что концентрация бактериальных клеток после взаимодействия, как с коктейлем бактериофагов, так и с бактериофагами по отдельности, в разведении (в среднем до  $10^{-5}$ ) уменьшилась в среднем на 5-6 порядков, по отношению к контролю. Результаты эксперимента по методу Аппельмана представлены на рисунках 8, 9 и в табл. 3, 4.

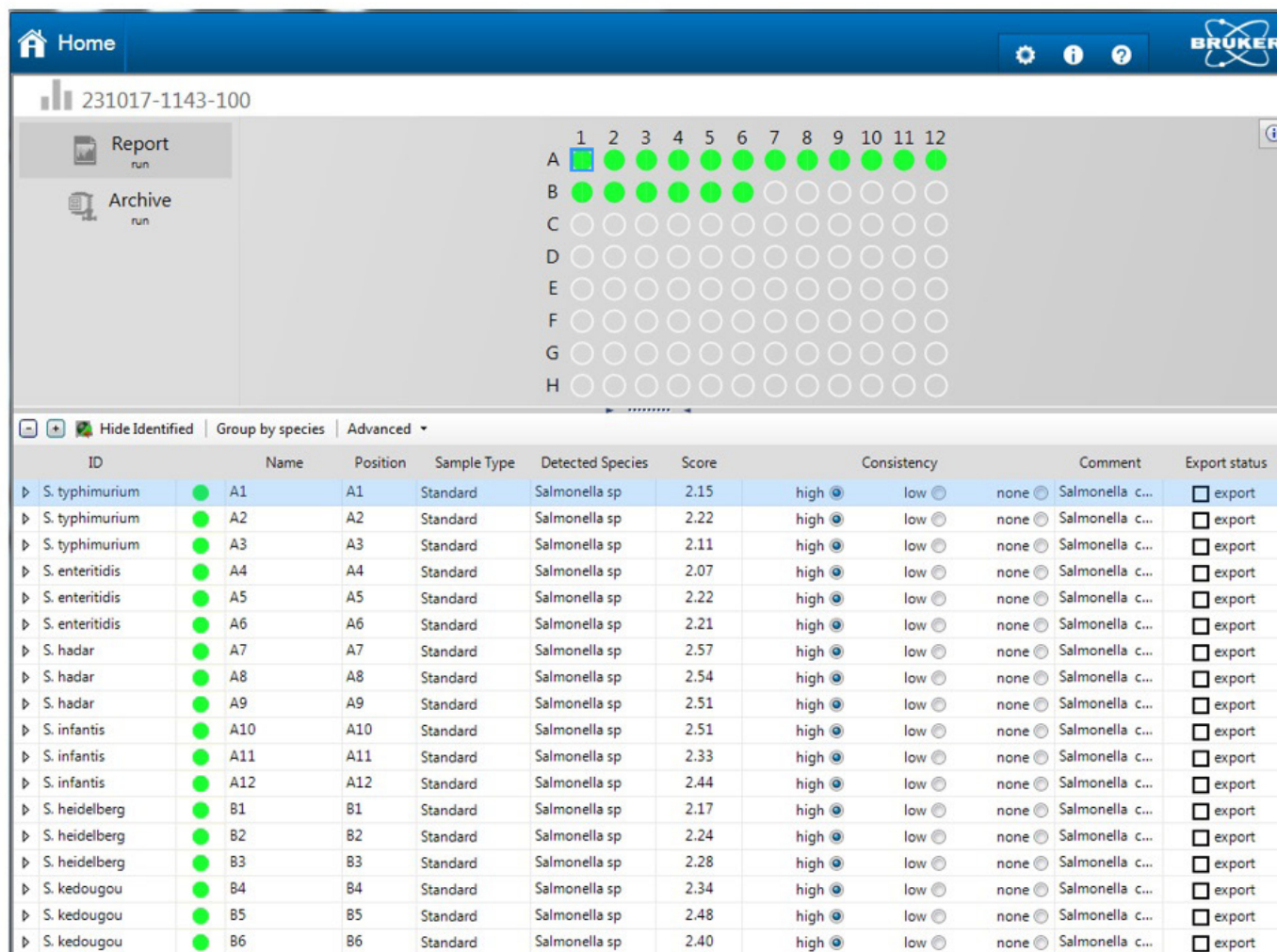


Рис. 4. Результат идентификации используемых штаммов методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизацией с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS).

Таблица 1

Результаты постановки метода Отто (spot-test)

№ п/п	МЕТОД ОТТО (spot-test)	Коктейль сальмонеллезных бактериофагов	Степень лизиса при разведении бактериофага							
			Степень лизиса	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
1	<i>S. Typhimurium</i>	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
2	<i>S. Enteritidis</i>	++++	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-
3	<i>S. Heidelberg</i>	++++	+++	+++	++	+	+	+	-	-
4	<i>S. Kedougou</i>	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-
5	<i>S. Hadar</i>	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
6	<i>S. Infantis</i>	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
7	Микс из 6 сероваров	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

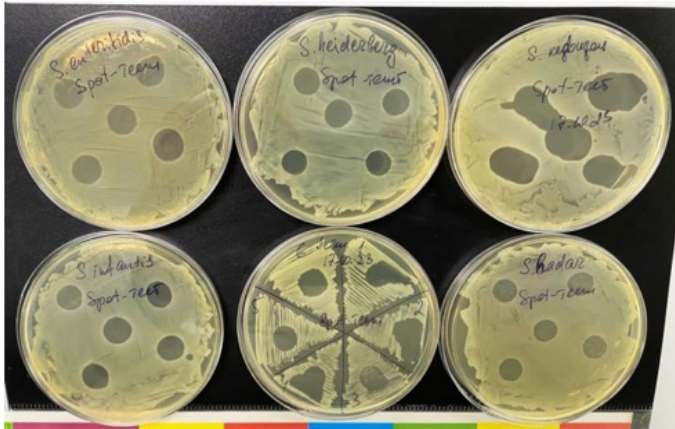


Рис. 5. Spot-test (по каждому штамму отдельно, без разведения фага).

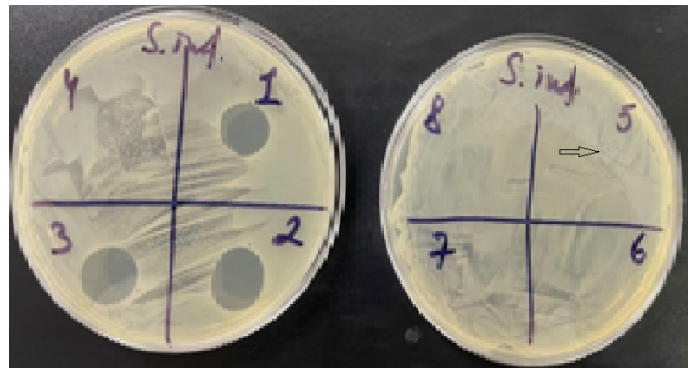


Рис. 6. Spot- test при разведении, где 1, 2, 3, 4 и т.д. – степени разведения бактериофага (на примере *S. Infantis*);  $10^1$  – максимальное количество вирусных частиц,  $10^8$  – минимальное. Отдельные негативные колонии в секторах 5 и 6.

Таблица 2

Результаты постановки метода стекающей капли

№	Метод стекающей капли	Степень лизиса		
		Коктейль сальмонеллезных бактериофагов Чашка 1	Коктейль сальмонеллезных бактериофагов Чашка 2	Коктейль сальмонеллезных бактериофагов Чашка 3
1	<i>S. Typhimurium</i>	++++	++++	++++
2	<i>S. Enteritidis</i>	++++	++++	++++
3	<i>S. Hadar</i>	+	+	+
4	<i>S. Kedougou</i>	++++	++++	++++
5	<i>S. Heidelberg</i>	++	++	+++
6	<i>S. Infantis</i>	++++	++++	++++
7	Микс из 6 сероваров	++	++++	+++



Рис. 7. Результаты метода стекающей капли.  
 1 - *S. Typhimurium*, 2 - *S. Enteritidis*, 3 - *S. Hadar*, 4 - *S. Infantis*, 5 - *S. Heidelberg*, 6 - *S. Kedougou*.

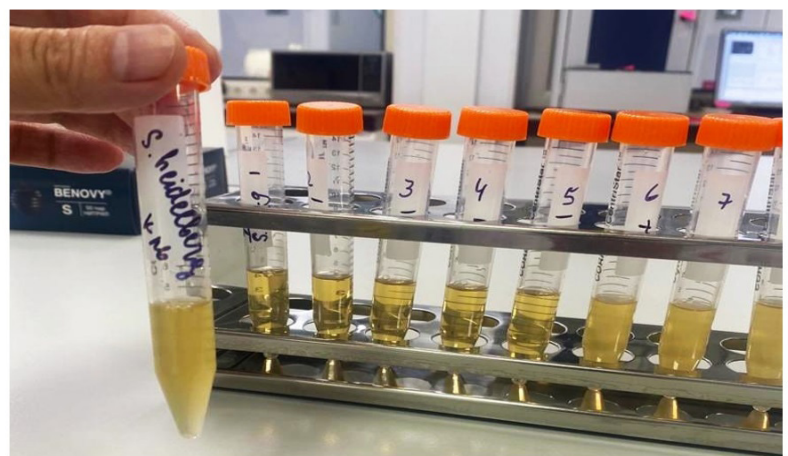


Рис. 8. Ряд Аппельмана после инкубации (4 часа) в термостате (на примере *S. Heidelberg*).



Таблица 3

Результаты постановки на системе TEMPO® после метода Аппельмана (4 часа роста при 37 °С, за исключением изолята *S. hadar*)

TEMPO 5.5.2.16

### TEST RESULTS REPORT

**Filter on Tests & Samples**  
 Display tests with or without final result  
 Display tests validated or not

**Incomplete list: 53 items printed out of 762.**

Sample	Test	Dilution	Mode	Prepared on	By	Result	Status	Annotations	Validated
S.enter.1	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:08	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/2e	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:08	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/3e	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:08	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/4e	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:08	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/5e	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:09	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6e	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:10	labadmin	= 7,3 E5 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6e	AC	1/4,0 E4	40-48h	2023/10/18 17:10	labadmin	= 3,0 E5 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/7e	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:11	labadmin	= 2,1 E6 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/7e	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:11	labadmin	= 2,1 E5 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/8e	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:12	labadmin	= 1,0 E6 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/8e	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:12	labadmin	< 1,0 E7 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/9e контроль среды	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:13	labadmin	< 0,25 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/10e контрольн ый	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:15	labadmin	= 2,1 E6 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/10e контрольн ый	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:15	labadmin	= 5,7 E7 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓

TEMPO 5.5.2.16

Sample	Test	Dilution	Mode	Prepared on	By	Result	Status	Annotations	Validated
S.tm.1	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/2t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/3t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/4t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/5t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6t	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	= 4,9 E8 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6t	AC	1/4,0 E4	40-48h	2023/10/18 17:38	labadmin	> 4,9 E7 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/7t	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,5 E9 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/7t	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,6 E7 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/8t	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	> 4,9 E9 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/8t	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,5 E10 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/9t контроль	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	> 4,9 E9 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/9t контроль	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:42	labadmin	= 6,8 E9 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
S.kedogou. 1	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/2k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/3k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/4k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/5k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6k	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	= 3,6 E7 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓
/6k	AC	1/4,0 E4	40-48h	2023/10/18 17:58	labadmin	= 9,1 E6 CFU/g	<input type="checkbox"/>		✓



TEMPO 5.5.2.16

Sample	Test	Dilution	Mode	Prepared on	By	Result	✳	Status	Annotations	Validated
S.tm.1	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/2t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/3t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:35	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/4t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/5t	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/6t	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:36	labadmin	= 4,9 E8 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/6t	AC	1/4,0 E4	40-48h	2023/10/18 17:38	labadmin	> 4,9 E7 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/7t	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,5 E9 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/7t	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,6 E7 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/8t	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	> 4,9 E9 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/8t	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	= 1,5 E10 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/9t контроль	AC	1/4,0 E6	40-48h	2023/10/18 17:39	labadmin	> 4,9 E9 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/9t контроль	AC	1/4,0 E7	40-48h	2023/10/18 17:42	labadmin	= 6,8 E9 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
S.kedogou. 1	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/2k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/3k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/4k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/5k	AC	1/1	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	> 1,2 E3 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/6k	AC	1/4,0 E5	40-48h	2023/10/18 17:56	labadmin	= 3,6 E7 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓
/6k	AC	1/4,0 E4	40-48h	2023/10/18 17:58	labadmin	= 9,1 E6 CFU/g		<input type="checkbox"/>		✓



Результаты эксперимента по методу Аппельмана

№ п/п, наименова- ние культуры	Описание помутнение среды					
	Степень разведения фага				Контроль 1 Пробирка без фага (контроль роста культуры)	Контроль 2 Пробирка со средой (контроль стерильности среды)
	[10 <sup>-1</sup> ] Пробирка 1	[10 <sup>-2</sup> ] Пробирка 2	[10 <sup>-2</sup> ] Пробирка 3	[10 <sup>-4</sup> ] Пробирка 4		
<i>S. Typhimurium</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Enteritidis</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Heidelberg</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Kedougou</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Частичное помут- нение	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Hadar</i>	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Infantis</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная
Микс сероваров*	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Прозрачная
№ п/п, наименовани е культуры	[10 <sup>-5</sup> ] Пробирка 5	[10 <sup>-6</sup> ] Пробирка 6	[10 <sup>-7</sup> ] Пробирка 7	[10 <sup>-8</sup> ] Пробирка 8	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Typhimurium</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Enteritidis</i>	Прозрачная	Прозрачная	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Heidelberg</i>	Прозрачная	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Kedougou</i>	Частичное по- мутнение	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Hadar</i>	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
<i>S. Infantis</i>	Прозрачная	Частичное по- мутнение	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная
Микс сероваров*	Прозрачная	Частичное по- мутнение	Помутнение среды	Помутнение среды	Помутнение среды	Прозрачная

Примечание. \* - микс 5-ти сероваров (без *S. Hadar*).

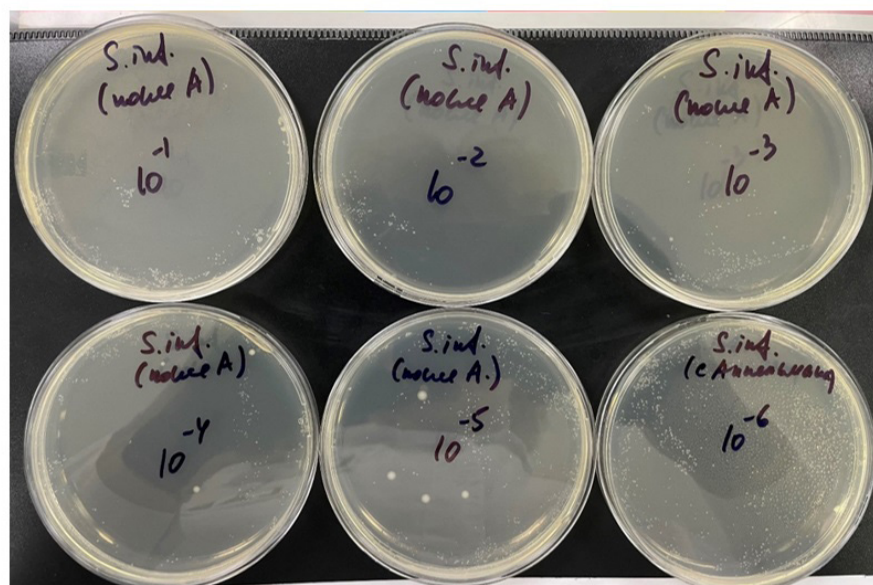


Рис. 9. Посевы на чашки Петри из прозрачных пробирок после постановки метода Аппельмана (на примере *S. Infantis*).

Из пробирок, в которых среда была прозрачная после инкубирования, сделали посев на чашки Петри со средой МХА. После инкубации высевов наблюдались колонии двух типов (крупные и мелкие), которые идентифицировались методом MALDI-ToF MS. Все колонии принадлежали роду *Salmonella*.

При определении литического действия коктейля бактериофагов методом Грация подтверждена репли-

кация бактериофагов на всех испытуемых серотипах сальмонелл. Титры бактериофагов, на серотипах *S. Heidelberg*, *S. Kedougou*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* достигали  $10^8$  БОЕ/мл. Титр бактериофагов на серотипе *Salmonella* Hadar составил  $4 \times 10^5$  БОЕ/мл. Серотипы *S. Heidelberg*, *S. Kedougou*, *S. Hadar* не являлись штаммами-хозяевами бактериофагов, входящих в разработанный коктейль (рис.10; табл.5).

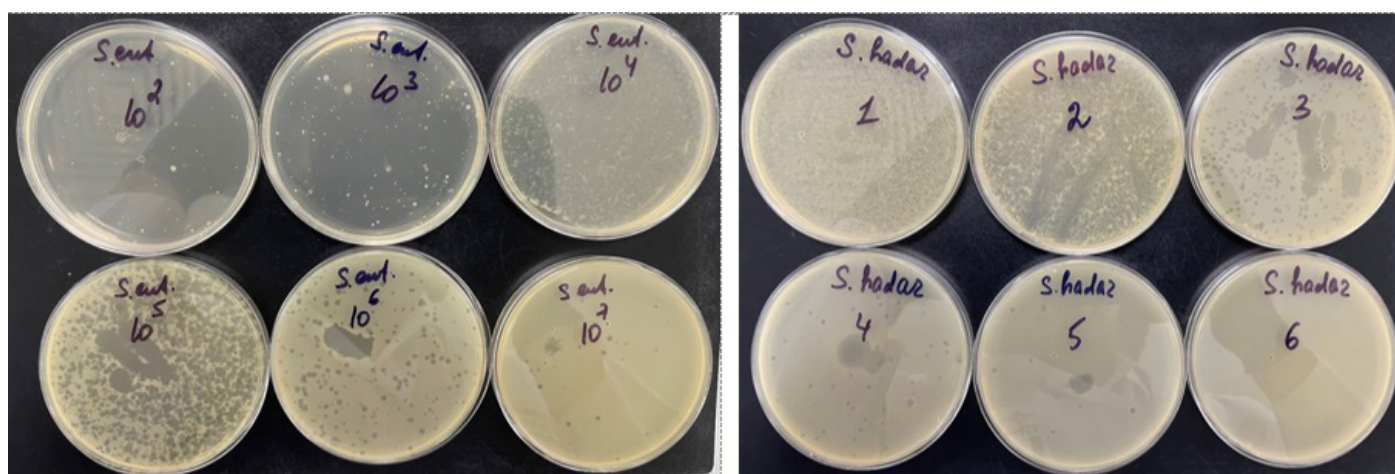


Рис. 10. Метод Грация (на примере *S. Enteritidis* и *S. Hadar*).

Таблица 5

Результаты исследования по методу Грация.

№ п/п, наименование культуры	Титр фага							
	Количество негативных колоний на чашках							
	Пробирка 1 10 <sup>1</sup> БОЕ/мл	Пробирка 2 10 <sup>2</sup> БОЕ/мл	Пробирка 3 10 <sup>3</sup> БОЕ/мл	Пробирка 4 10 <sup>4</sup> БОЕ/мл	Пробирка 5 10 <sup>5</sup> БОЕ/мл	Пробирка 6 10 <sup>6</sup> БОЕ/мл	Пробирка 7 10 <sup>7</sup> БОЕ/мл	Пробирка 8 10 <sup>8</sup> БОЕ/мл
<i>S. Typhimurium</i>	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	>800	≈400	≈95	13	1
<i>S. Enteritidis</i>	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	>1000	≈800	≈240	35	3
<i>S. Heidelberg</i>	Сливной лизис	Сливной лизис	>1000	1000	≈900	140	15	1
<i>S. Kedougou</i>	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	≈1000	≈1000	≈300	40
<i>S. Hadar</i>	>1000	1000	≈00	35	4	–	–	–
<i>S. Infantis</i>	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	Сливной лизис	≈1000	368	47	4

По результатам исследования, представленным в табл.5, можно сделать вывод - какие штаммы бактериофагов реплицируются на микроорганизмах, к которым подбирается коктейль бактериофага.

**Обсуждение.** При отработке алгоритма индивидуализированного подбора, удалось сконструировать коктейль на основе сальмонеллезных фагов высокоэффективный, по данным *in vitro* исследований, не только в отношении широко распространённых ранее серотипов *Salmonella enterica*: *Infantis*, *Enteritidis*, *Typhimurium*, но и против приобретающих в настоящее время особую актуальность для вертикально ориентированных агропромышленных холдингов серотипов *Heidelberg*, *Kedougou*, *Hadar*.

При разработке алгоритма подбора коктейля бактериофагов для борьбы с проблемными для конкретного птицеводческого хозяйства патогенами можно сделать вывод, что методы Отто (spot-test) и стекающей капли подходят исключительно для экспресс анализа, поскольку не могут доказать, что бактериофаги будут реплицироваться на выделенных штаммах. Для эффективного подбора бактериофагов необходимо использовать методы Аппельмана с постановкой на анализаторе автоматическом бактериологическом Tempo filler и Грация. Эти методы *in vitro* показывают, что выбранный коктейль бактериофагов реплицируется на полевых изолятах микроорганизмов, выделенных из определённого хозяйства и можно с уверенностью сказать, что *in vivo* данные

бактериофаги будут лизировать бактерии на площадке, с которой предоставлены образцы на исследование. При исследовании титров бактериофагов методом Грация, можно подобрать эффективный титр бактериофагов, который в дальнейшем будут использованы на птицеводческом хозяйстве. Метод Аппельмана показывает, что бактериофаг реплицируется на исследуемом микроорганизме, но ранее, при визуальной оценке прозрачности или помутнения среды, в лаборатории могли допустить ошибки при учёте результатов. Для автоматизации учёта результатов при использовании этого метода предложено использовать постановку на анализаторе автоматического бактериологического Tempo filler.

### Выводы

Для эффективного подбора *in vitro* продукта на основе коктейля бактериофагов к полевым изолятам *Salmonella* spp., выделенным из образцов определенного птицеводческого хозяйства, рекомендуется использовать следующий алгоритм:

Выделить изоляты бактерий из степ-проб, клоакальных смывов, помёта и слепых отростков павшей и вынужденно убитой слабой птицы;

Идентифицировать выделенные бактерии и определить их родовую и видовую принадлежность с помощью методов MALDI-ToF и MLST;

В качестве экспресс метода использовать метод Отто (spot-test) или рекающей капли;

Подтвердить репликацию выбранных бактериофагов на изолятах микроорганизмов с помощью методов Аппельмана с постановкой на системе ТЕМПО® и/или Грация.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bao H., Wang S., Zhao J.H., Liu S.L. Salmonella secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research*. 2020; 241: 126591. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126591.
2. Khan M. A. S., Rahman S. R. Use of phages to treat antimicrobial-resistant Salmonella infections in poultry. *Veterinary Sciences*. 2022; 9(8): 438. DOI: 10.3390/vetsci9080438.
3. Алешкин В.А., Воложанцев Н. В., Светоч Э. А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Борзилов А.И. и др. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов. *Астраханский медицинский журнал*. 2012; 7 (3): 31-9.
4. Лыско С.Б. Альтернативный способ обработки инкубационных яиц. *Птицеводство*. 2014; 5: 34-8.
5. Лебедева И.А., Невская А.А. Влияние антибиотика и пробиотика на качество мяса и субпродуктов цыплят-бройлеров. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2014; 11: 37-40.
6. Лыско С.Б. Профилактика бактериальных болезней птиц без антибиотиков. *Эффективное животноводство*. 2022; 4(179): 55-7.
7. Зеленкова Г. А., Устьянцев Д. А., Пахомова А. А., Зеленков А. П. Эффективность различных способов вакцинации птицы в условиях промышленного птицеводства. *Ветеринарная патология*. 2023; 3(85): 17-24. DOI: 10.23947/2949-4826-2023-22-3-17-24.
8. Криушичева Я. Г., Шацких Е. В. Эффективность использования органических кислот в птицеводстве. *Молодежь и наука*. 2021; 9.
9. Бутакова Н. Ю. Перспективы применения иммуностимуляторов в птицеводстве. *Вестник научных конференций*. 2017; 4-3(20): 32-3.
10. Панин А.Н., Комаров А.А., Куликовский А.В., Макаров Д.А. Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2017; 5: 18-24.
11. Анганова Е.В., Аблов А.М., Батомункуев А.С., Плиски А.А. Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней животных и птиц. *Вестник АПК Ставрополя*. 2017;

2(26): 55-8.

12. Абдуллаева А. М., Блинова Л. П., Уша Б. В., Удавлиев Д.И., Першина Т.А., Пахомов Ю.Д. Анализ использования бактериофагов в качестве безопасных средств микробной деконтаминации пищевых продуктов. *Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2020; 2(34): 220-7. DOI: 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202002016.
13. Алешкин А.В., Зулкарнеев Э.Р., Ларина Ю.В., Рубальский О.В., Киселева И.А., Рубальский Е.О. и др. Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов. *Астраханский медицинский журнал*. 2015; 10 (4): 40-8.
14. Лаишевцев А. И., Шастин П. Н., Зулкарнеев Э. Р., Савинов В.А., Хабарова А.В., Капустин А.В. Клиническое исследование комбинированного коли-сальмонеллезного бактериофага на индейках. *Ветеринария и кормление*. 2022; 6: 51-4. DOI: 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2022-6-13/
15. Алешкин А. В., Селькова Е. П., Ершова О. Н., Савин И.А., Шкода А.С., Бочкарева С.С. и др. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018; 3 (2): 66-74.

### REFERENCES

1. Bao H., Wang S., Zhao J.H., Liu S.L. Salmonella secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research*. 2020; 241: 126591. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126591.
2. Khan M. A. S., Rahman S. R. Use of Phages to Treat Antimicrobial-Resistant Salmonella Infections in Poultry. *Veterinary Sciences*. 2022; 9 (8): 438. DOI: 10.3390/vetsci9080438..
3. Aleshkin A.V., Borzilov A.I. et al. Bacteriophages as probiotics and food decontamination agents. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 7 (3): 31-9. (in Russian)
4. Lysko S.B. An alternative method of processing incubation eggs. *Ptitsevodstvo*. 2014; 5: 34-8. (in Russian)
5. Lebedeva I.A., Nevskaya A.A. The effect of an antibiotic and probiotic on the quality of meat and offal of broiler chickens. *Veterinariya selskokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 2014; 11: 37-40. (in Russian)
6. Lysko S.B. Prevention of bacterial diseases of birds without antibiotics. *Effektivnoye zhivotnovodstvo*. 2022; 4(179): 55-7. (in Russian)
7. Zelenkova G.A., Ustyantsev D.A., Pakhomova A.A., Zelenkov A.P. The effectiveness of various methods of poultry vaccination in industrial poultry farming. *Veterinarnaya patologiya*. 2023; 3(85):17-24. DOI: 10.23947/2949-4826-2023-22-3-17-24. (in Russian)
8. Kriushicheva Ya. G., Shatskikh E. V. Efficiency of the use of organic acids in poultry farming. *Molodezh` i nauka*. 2021; 9. (in Russian)
9. Butakova N. Y. Prospects for the use of immunostimulants in poultry farming. *Vestnik nauchnykh konferentsiy*. 2017; 4-3(20): 32-3. (in Russian)
10. Panin A.N., Komarov A.A., Kulikovskiy A.V., Makarov D.A. The problem of antibiotic resistance of pathogens common to humans and animals. *Veterinary medicine, animal science and biotechnology*. 2017; 5: 18-24. (in Russian)
11. Anganova E.V., Ablov A.M., Batomunkuyev A.S., Pliska A.A. The problem of antibiotic resistance of pathogens of infectious diseases of animals and birds. *Veterinariya. zootekhnika i biotekhnologiya*. 2017; 2(26): 55-8. (in Russian)
12. Abdullaeva A.M., Blinkova L.P., Usha B.V., Udavliev D.I., Pershina T.A., Pakhomov Yu.D. Analysis of the use of bacteriophages as safe means of microbial decontamination of food products. *Rossiyskiy zhurnal Problemy veterinarnoy sanitarii. gigiyeny i ekologii*. 2020; 2(34): 220-7. (in Russian)
13. Aleshkin A.V., Zulkarneyev E.R., Larina Yu.V., Rubalskiy O.V., Kiseleva I.A., Rubalskiy E.O. et al. Bio decontamination and prolongation of shelf life of meat and fish semi-finished products using bacteriophages. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 10 (4): 40-8. DOI: 10.36871/vet.san.hyг.ecol.202002016. (in Russian)
14. Laishetsev A. I., Shastin P. N., Zulkarneyev E. R., Savinov V.A., Khabarova A.V., Kapustin A.V. A clinical study of a combined coli-



- salmonella bacteriophage on turkeys. *Veterinariya i kormleniye*. 2022; 6:51-4. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2022-6-13. (in Russian)
15. Aleshkin A. V., Selkova E. P., Ershova O. N., Savin I.A., Shkoda A.S., Bochkareva S.S. et al. The concept of personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from infections related to medical care. *Fundamentalnaya i klinicheskaya meditsina*. 2018; 3 (2): 66-74. (in Russian)