

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА *Salmonella phage* BF-1356 И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ ФАГОТЕРАПИИ ПУЛЛОРОЗА КУР**А.И. ЛАИШЕВЦЕВ^{1, 2} ✉, Э.Р. ЗУЛЬКАРНЕЕВ³, Н.В. ПИМЕНОВ⁴,
И.А. КИСЕЛЕВА⁵, К.М. БАГАНДОВА⁵, Т.Э. МИЗАЕВА⁵, А.В. АЛЕШКИН⁵**

Salmonella Pullorum — редко встречающийся, но важный патоген из рода *Salmonella*, который наносит серьезный вред птицеводству и вызывает экономические потери, связанные с высокой летальностью птицы. Терапия бактериофагами активно обсуждается в последнее время как дополнительный метод лечения птицы. В представленной работе была впервые показана терапевтическая эффективность вирулентного бактериофага *Salmonella phage* BF-1356, назначенного спустя 12 ч после перорального заражения цыплят кросса Cobb 500 высоковирулентным штаммом *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ. Цель работы — характеристика бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 и его взаимодействия с бактериальным штаммом-хозяином *in vitro*, а также оценки эффективности фаготерапии пуллороза *in vivo* на модели цыплят Cobb 500. Штамм сальмонеллы (*Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ) был выделен в 2017 году на птицефабрике в Московской области. Для проведения фаготерапии использовали вирулентный бактериофаг *Salmonella phage* BF-1356 из коллекции Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Россия). Очищенный бактериофаг содержал титр не менее 10^{11} БОЕ/мл. Стерильность готового фага проверяли посредством инкубации 0,1 мл фаголизата в 5 мл тиогликолевой среды («HiMedia», Индия) при $32,5 \pm 2,5$ и $22,5 \pm 2,5$ °C в течение 14 сут. Диапазон литической активности бактериофага определяли в отношении 164 бактериальных штаммов *Salmonella enterica*, выделенных на территории РФ в 2010-2018 годы. Литическую активность оценивали визуально по появлению зоны лизиса в точках нанесения бактериофага на индикаторные чашки Петри с 1,5 % агаром Мюллера-Хинтона, которые содержали 200 мкл культуры исследуемых штаммов в середине лог-фазы (10^6 КОЕ). Оценивали адсорбцию бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 на штамме *Salmonella Typhimurium* B-1025. Латентный период и выход *Salmonella phage* BF-1356 определяли посредством мониторинга динамических изменений числа фаговых частиц в течение репликативного цикла на штамме *Salmonella Typhimurium* B-1025. Чтобы оценить влияние pH на титр бактериофагов, известные концентрации очищенных бактериофагов инкубировали в буферах при различных значениях pH. В качестве лабораторных объектов использовали не зараженных сальмонеллами 14-суточных цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500 ($n = 40$). Цыплят случайным образом разделили на группы: 10 цыплят использовали для контроля условий содержания (I контрольная группа не подвергалась заражению и фаготерапии), 20 цыплят — для определения эффективности препарата после его лечебного использования и оценки дальнейшего сальмонеллоносительства (опытная группа); 10 цыплят — как контроль заражения (II контрольная группа, инфицированная сальмонеллой, без введения бактериофага). Птицу опытной и II контрольной группы в возрасте 14 сут подвергали пероральному заражению *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ в дозе $3,8 \times 10^8$ кл., в объеме, равном 0,4 мл, что соответствовало ~ 5 LD₅₀ (острой инфицирующей дозе, гарантирующей моделирование инфекции пуллороза с полной гибелью в контрольной группе). Критерием для начала применения бактериофага служило появление симптомов инфекционного процесса. Цыплятам из опытной группы вводили бактериофаг перорально в дозе 10^{10} БОЕ/мл, в объеме 0,2 мл. Исследование на наличие фагов и сальмонелл у птицы проводили сразу после дефекации. Число фаговых частиц оценивали методом двойных агаровых слоев. Для подтверждения эффективности фаготерапии птицу из опытной группы подвергали убою, проводили патологоанатомическое вскрытие и отбор секционного материала для лабораторных исследований и идентификации культур сальмонелл из органов. В контрольной группе патологоанатомическое вскрытие проводили по мере падежа птицы. Бактериофаг *Salmonella phage* BF-1356 проявлял специфическую литическую активность в отношении распространенных сероваров сальмонелл, таких как Pullorum, Enteritidis, Typhimurium, Cholerasuis, Infantis. Латентный период для бактериофага составлял в среднем 40 мин, а среднее число высвободившихся фагов из одной клетки-мишени — 67 вирусных частиц. Бактериофаг был стабилен при pH 5-8 и незначительно снижался в титре при pH 3,6 в течение 1 ч. Однократное пероральное введение бактериофага BF-1356 в титре 10^{10} БОЕ/мл через 12 ч после заражения цыплят кросса Cobb 500 штаммом *Salmonella Pullorum* № 732 позволило обеспечить 100 % сохранность поголовья и значительно снизить последствия патологического процесса у цыплят. Гибель цыплят контрольной группы происходила в течении 2-6 сут. Структура поражений была свойственна для сальмонеллезной патологии, что подтвердилось в лабораторных условиях. Полной элиминации возбудителя из организма не было достигнуто, однако при инфицировании 5 LD₅₀ отмечали эффективное снижение выделения возбудителя из органов и тканей уже на 7-е сут. Таким образом, терапевтическая эффективность прототипа средства на основе штамма *Salmonella phage* BF-1356 в отношении цыплят кросса Cobb 500 составила 100 %, микробиологи-

ческая эффективность — 75-80 %. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективах создания лечебно-профилактического средства для птицеводства на основе изученного штамма пуллорного бактериофага и его применения в противоэпизоотической работе.

Ключевые слова: пуллороз, вирулентные бактериофаги, адсорбция, спектр литической активности, испытания *in vivo*, сальмонеллез, генерализованная форма.

Salmonella Pullorum — грамтрицательный патоген из рода *Salmonella*, который вызывает пуллороз (белый бациллярный понос) у цыплят и может передаваться вертикально из поколения в поколение от кур-несушек (1, 2). Это заболевание не только наносит серьезный вред птицеводству, вызывая огромные экономические потери, но и приводит к распространению сальмонеллы среди домашней птицы через экскременты и яйца (3-6). При остром течении инфекция чаще всего проявляется у цыплят в септической форме, при которой фиксируются серьезные системные нарушения, приводящие к летальности, достигающей до 100 % (7, 8).

Возникновение вспышки пуллороза требует карантинных мероприятий, поэтому многие производители для сдерживания эпизоотического проявления использовали широкомасштабное профилактическое применение антибиотиков. При этом эрадикации возбудителя из микроценоза птицеводческих площадок не происходило. В последние годы чрезмерное использование антибиотиков привело к появлению бактериальных штаммов со множественной лекарственной устойчивостью, ввиду чего многие страны ограничили использование антибиотиков в кормах (9, 10).

Терапия бактериофагами представляет собой один из возможных методов снижения использования антибиотиков в птицеводстве и активно обсуждается (11, 12). Положительный опыт фагопрофилактики и фаготерапии сальмонеллеза птиц накоплен при инфекциях, вызванных антибиотикорезистентными серовариантами *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* (13, 14). Попытки применения пуллорного бактериофага в прошлом веке не увенчались успехом, причиной чему было наличие профага в маточной культуре производственного штамма и недостаточная литическая активность. В настоящее время возникла необходимость вернуться к поиску высокоактивных литических пуллорных бактериофагов и разработке метода применения средства на их основе для создания эффективной системы эрадикации возбудителя.

В представленной работе была впервые показана терапевтическая эффективность вирулентного бактериофага *Salmonella phage* BF-1356, назначенного спустя 12 ч после перорального заражения цыплят кросса Cobb 500 высоковирулентным штаммом *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ.

Цель работы — охарактеризовать бактериофаг *Salmonella phage* BF-1356 и его взаимодействия с бактериальным штаммом-хозяином *in vitro*, а также оценить эффективности фаготерапии пуллороза *in vivo* на модели цыплят Cobb 500.

Методика. Штамм сальмонеллы (*Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ), полученный во Всероссийском институте экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, г. Москва, Россия), был выделен в 2017 году на птицефабрике в Московской области. Культуру засеивали штрихами на селективный ксилозо-лизинный дезоксихолатный агар (XLD) («HiMedia», Индия). Полученные единичные колонии пересеивали в бульон LB («HiMedia», Индия) и инкубировали при 37 °С на шейкере PSU-20i («BioSan», Латвия, 170 об/мин) до середины логарифмической фазы роста ($OD_{600} = 0,6$), что соответствовало $\sim 4 \times 10^9$ кл/мл. Титр бульонной культуры определяли методом 10-кратных серийных разведений в физиологическом растворе с высевом по методу

Коха по 0,1 мл из соответствующего разведения на агар Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия) для последующего культивирования при 37 °С в течение 24 ч. LD₅₀ штамма — $7,6 \times 10^7$ микробных клеток, заражающая доза составляла 5 LD₅₀ — $3,8 \times 10^8$ микробных клеток.

Для фаготерапии использовали вирулентный бактериофаг *Salmonella phage* BF-1356 (*Myoviridae*; GenBank accession no.: MF370225.1) из коллекции Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (г. Москва, Россия).

Для приготовления стоков бактериофага применяли метод твердой агаровой среды с небольшими модификациями (15). Свежую ночную бульонную культуру штамма-хозяина *Salmonella* Typhimurium В-1025 инокулировали поверх твердого агара Мюллера-Хинтона внутри колб Ру. После 3,5 ч инкубации при 37 °С избыток жидкости сливали из колб, бактериофаг инокулировали поверх предварительно сформированного газона для выращивания и колбы инкубировали в течение 15 ч при 37 °С. Размноженные бактериофаги отмывали с поверхности МХ агара 5-10 мл 0,9 % раствора NaCl и центрифугировали (центрифуга ОПн-8, ОАО ТНК «Дастан», Киргизия) при 6000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант собирали и фильтровали через мембрану из полиэфирсульфона 0,22 мкм («Merck Millipore», Германия) для удаления бактериальных остатков.

Исходные фаги концентрировали и очищали с использованием ультрафильтрационных установок Vivaspin 20 с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа («Sartorius AG», Германия). После стадии конечного концентрирования очищенные бактериофаги ресуспендировали в стерильном 0,9 % растворе NaCl. Очистку фаголизата от бактериальных эндотоксинов проводили на хроматографической колонке EndoTrap HD («LIONEX GmbH», Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Очищенные бактериофаги титровали методом двойных агаровых слоев (16) и хранили при температуре 4 °С. Очищенный бактериофаг содержал титр не менее 10^{11} БОЕ/мл. Стерильность готового фагового препарата проверяли посредством инкубации 0,1 мл фаголизата в 5 мл тиогликолевой среды («HiMedia», Индия) при $32,5 \pm 2,5$ °С и $22,5 \pm 2,5$ °С в течение 14 сут. Посевы просматривали на протяжении всего времени инкубации. При отсутствии помутнения среды исследуемый фаголизат считался стерильным.

Диапазон литической активности бактериофага определяли, используя 164 бактериальных штамма *Salmonella enterica*, выделенных на территории РФ в 2010-2018 годы: Infantis ($n = 54$), Enteritidis ($n = 28$), Typhimurium ($n = 76$), Choleraesuis ($n = 2$), Pullorum ($n = 4$). Круг хозяев определяли с помощью прямого нанесения бактериофага, как описано ранее, с некоторыми модификациями (17). Исследуемый лизат фага (10 мкл) с титром 10^{10} БОЕ/мл наносили на индикаторные чашки Петри с 1,5 % агаром Мюллера-Хинтона, которые содержали 200 мкл культуры исследуемых штаммов середины лог-фазы (10^6 КОЕ). Чашки подсушивали в течение 10 мин при комнатной температуре, затем инкубировали в течение ночи при 37 °С. Литическую активность оценивали визуально по появлению зоны лизиса в точках нанесения бактериофага.

Адсорбцию бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 на штамме *Salmonella* Typhimurium В-1025 оценивали следующим образом: экспоненциально растущие бактериальные клетки смешивали с бактериофагом (MOI = 0,001) и инкубировали при комнатной температуре. Аликвоты (по 100 мкл) отбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 мин, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. Затем образцы центрифугировали

(центрифуга ВКС-МН20-В, «Biobase», Китай) при 7000 g в течение 5 мин при 4 °С. Титр фага оценивали методом двойных агаровых слоев по числу БОЕ для 100 мкл супернатанта. Титр фага в нулевой момент времени принимали за 100 % относительного титра фага.

Латентный период и выход *Salmonella phage* BF-1356 определяли на основе динамических изменений числа фаговых частиц в течение репликативного цикла на штамме *Salmonella* Typhimurium В-1025. Бактериальные клетки (5 мл) инкубировали при 37 °С до середины экспоненциальной фазы роста ($OD_{600} = 0,3$), далее 5 мл полученной жидкой бактериальной культуры центрифугировали (центрифуга ВКС-МН20-В, «Biobase», Китай) 5 мин при 4 °С и 7000 g. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл свежего бульона ГМФ (гидролизат мясного фарша) и смешивали с бактериофагом до $MOI = 0,01-0,005$.

Смесь бактериофага и бактериальных клеток инкубировали 5 мин при 37 °С. Неадсорбированные фаги удаляли центрифугированием в течение 2 мин при 13000 g. Осадок ресуспендировали в 10 мл предварительно подогретого LB. Образцы отбирали через 5-10-минутные интервалы в течение 2 ч и немедленно титровали. Выход бактериофага определяли, как отношение максимального числа высвободившихся фаговых частиц (максимального числа негативных колоний) в конце размножения к числу инфицированных бактериальных клеток (к числу негативных колоний) во время латентного периода.

Влияние pH на титр бактериофагов оценивали, как было описано ранее, с некоторыми модификациями (18, 19). Известные концентрации очищенных бактериофагов инкубировали в буферах при различных значениях pH. Использовали 0,1 М цитратный буфер (pH 3,61), 0,1 М цитратный буфер (pH 5,2) и SM буфер (pH 8,0) в качестве контроля. К 0,9 мл буфера добавляли 0,1 мл испытуемого фаголизата, инкубировали 15 мин, 1 ч, 24 ч при 37 °С. Затем 100 мкл отбирали для 10-кратных разведений и определяли титр фагов методом двойных агаровых слоев.

В качестве лабораторных объектов использовали не зараженных сальмонеллами цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500, приобретенных на благополучном по инфекционным болезням предприятии. Цыплят содержали в условиях вивария ФНЦ Всероссийского института экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН в клетках на расстоянии 1 м от пола, в условиях, удовлетворяющих критериям аналоговых: влажность воздуха — 30-70 %, температура — 27-28 °С, освещенность — 70 лк. Корм и воду давали ad libitum. Птицу содержали изолированно по группам с исключением контакта и соблюдением требований биологической безопасности.

Перед проведением опыта цыплят тестировали на наличие сальмонелл посредством обогащения проб фекалий бульоном Rappaport-Vassiliadis («Oxoid», Великобритания) с последующим посевом на XLD агар.

В опыте были использованы 14-суточные цыплята ($n = 40$). Цыплят случайным образом разделили на группы: 10 особей использовали для контроля условий содержания (I контрольная группа, которая не подвергалась заражению и фаготерапии), 20 цыплят — для определения эффективности препарата после его использования с лечебной целью и оценки дальнейшего сальмонеллоносительства (опытная группа); 10 цыплят — как контроль заражения (II контрольная группа, инфицированная сальмонеллой без введения бактериофага).

Птицу опытной и II контрольной группы в возрасте 14 сут подвергали пероральному заражению *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ в дозе

$3,8 \times 10^8$ кл., как описано выше, в объеме, равном 0,4 мл, что соответствовало ~ 5 LD₅₀ (острой инфицирующей дозе, гарантирующей моделирование инфекции пуллороза с полной гибелью птицы из контрольной группы). Инокуляцию заражающей суспензии проводили индивидуально с использованием шприца с катетером. С целью моделирования идентичных условий, связанных со стрессовым воздействием от манипуляции инфицирования опытных цыплят, I контрольной группе перорально вводили стерильный 0,9 % изотонический раствор NaCl в объеме 0,4 мл.

Критерием для начала применения бактериофага служило появление симптомов инфекционного процесса. Особым из опытной группы вводили бактериофаг перорально в дозе 10^{10} БОЕ/мл в объеме 0,2 мл. Бактериофаг вводили индивидуально с использованием шприца с катетером.

За цыплятами опытной группы было установлено наблюдение до момента начала развития первых клинических проявлений сальмонеллеза, а за II контрольной группой — до момента их гибели. Во время проведения эксперимента антибиотика не применялись.

С целью подтверждения эффективности действия фаготерапии птица опытной группы была подвергнута убою для проведения патологоанатомического вскрытия и отбора секционного материала. В контрольной группе (зараженная, но без лечения) патологоанатомическое вскрытие проводили по мере падежа птицы.

Макроскопическое исследование органов и тканей выполняли в соответствии с общепринятыми рекомендациями (20). Вскрытие павшей и вынужденно убитой птицы осуществляли с полной эвисцерацией.

Исследование птицы на наличие фагов проводили сразу после дефекации. Образцы гомогенизировали в 0,9 % растворе NaCl в соотношении 1:10. К полученному образцу добавляли $1/10$ часть хлороформа, инкубировали на шейкере 10 мин при комнатной температуре и 170 об/мин, затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин и титровали супернатант. Число фаговых частиц оценивали методом двойных агаровых слоев.

Сальмонеллу в образцах фекалий и паренхиматозных органах детектировали классическими бактериологическими методами (21). Видовую идентификацию выделенных изолятов сальмонелл, дополнительно проводили на микробиологическом анализаторе VactoSCREEN (НПФ «Литех», Россия).

Исследования *in vivo* были одобрены и разрешены этической комиссией ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (№ 441/22 от 03.04.2019). Все процедуры содержания животных и отбора проб соответствовали принципам «Руководства по уходу и использованию сельскохозяйственных животных в сельскохозяйственных исследованиях и обучении» (22).

Статистическую обработку результатов проводили в программе BioStat 2009 («AnalystSoft, Inc.», США). Результаты представляли как средний титр фага (среднее из трех повторностей и стандартное отклонение, $M \pm SEM$), выход фага рассчитывали, как отношение среднего максимального числа высвободившихся частиц в конце размножения к среднему числу фаговых частиц во время латентного периода.

Результаты. Перед началом эксперимента было проведено несколько подготовительных этапов, в частности определение восприимчивости *Salmonella enterica* к бактериофагу *Salmonella phage* BF-1356, а также определение литической активности на штаммах сальмонелл из коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Учет результатов проводили посредством оценки зоны лизиса бактериальной культуры в месте нанесения капли бактериофага: «+» соответствовал чистой зоне лизиса, «-» — отсутствию зоны

лизиса (табл. 1).

1. Литическая активность бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 по отношению к различным штаммам *Salmonella enterica*

Серотип	Зона лизиса	Серотип	Зона лизиса
Infantis 4633	-	Infantis PLGL7	-
Infantis 4632	-	Infantis GLV8	-
Infantis KAB-2	-	Infantis SP6	+
Infantis KZ3	-	Infantis UTL4	-
Infantis 2511 (VIEV)	+	Infantis RT 1	-
Infantis KZ2	-	Infantis SZ2	+
Infantis KZ1	-	Infantis TR66	-
Infantis 26	+	Infantis GF1	+
Infantis 47	-	Enteritidis № 7	+
Infantis51	-	Enteritidis 14-2 (1)	-
Infantis 57	-	Enteritidis 14-2 (4)	+
Infantis 62	-	Enteritidis Kaluga	-
Infantis GRZ	-	Enteritidis 4B	-
Infantis SVN	-	Infantis UTL17	+
Infantis 7079	-	Infantis PTCH B8(3)	-
Enteritidis 25	+	Infantis PTCH П-3 (4)	+
Enteritidis VIEV	-	Infantis UTC SM8	-
Enteritidis SV6	-	Infantis 7372(6)	-
Enteritidis NV4	-	Infantis PFK PRD (7)	-
Enteritidis R-6	-	Infantis PFK PRD (8)	+
Enteritidis CLS9	+	Infantis 22	-
Enteritidis QP5	-	Infantis 32	+
Enteritidis MZ (8)	+	Infantis 23	-
Enteritidis OKR3(5)	-	Infantis NZ	-
Enteritidis PLGL (4)	-	Infantis 1808	-
Enteritidis KL2	+	Infantis 1841	-
Enteritidis EV77	-	Infantis 1810	-
Enteritidis XZ19(6)	+	Infantis 1830	+
Enteritidis GF1(3)	+	Infantis 1845	-
Enteritidis SRN13	+	Infantis PG17	-
Enteritidis KPZ	+	Infantis OKR3	-
Enteritidis FRCH1	+	Infantis FRSH50	-
Enteritidis SVR21	+	Infantis XZ19	-
Enteritidis PK6	+	Infantis ZBL13	-
Enteritidis PK7	-	Infantis AV22	-
Enteritidis YZ7	-	Infantis KL21	-
Enteritidis WS	+	Infantis TM3	-
Enteritidis Pg3	-	Infantis TM	+
Typhimurium 3	+	Infantis EV4	-
Typhimurium 415	+	Infantis OG6	-
Typhimurium B/N	+	Infantis IAN7	+
Typhimurium STM Ufa	+	Infantis AN	+
Typhimurium Lipetsk	+	Pullorum 732	+
Typhimurium Ant (8)	+	Pullorum 1062	+
Typhimurium fit6	+	Pullorum 16	+
Typhimurium Q33	+	Pullorum b/n	+
Typhimurium SVN12	+	Infantis NGR9	+
Typhimurium AB3	+	Choleraesuis UVR55	+
Typhimurium 55	+	Typhimurium TF6	+
Typhimurium 4668	-	Typhimurium G6	+
Typhimurium GT5	+	Typhimurium 74	-
Typhimurium GT7	+	Typhimurium BN9	+
Typhimurium VR8	+	Typhimurium BB7	+
Typhimurium ZV5	+	Typhimurium PRV1	+
Typhimurium XQ9	-	Typhimurium VV1	+
Typhimurium PLT9	+	Typhimurium UY22	-
Typhimurium VIEV55	-	Typhimurium BC4	+
Typhimurium Cc6	-	Typhimurium HH8	+
Typhimurium 8787	-	Typhimurium NU1	+
Typhimurium 53	-	Typhimurium NE12	+
Typhimurium GC5	-	Typhimurium GQ2	-
Typhimurium TR3	+	Typhimurium 73	+
Typhimurium YD5	+	Typhimurium 19	+
Typhimurium PY	-	Typhimurium 3234	-
Typhimurium GL02	+	Typhimurium TTF3	+
Typhimurium VIEV56	+	Typhimurium TFR6	+
Typhimurium LM7	-	Typhimurium LW31	+
Typhimurium EV2	+	Typhimurium ZT1	+

Typhimurium HT3	+	Typhimurium KZN8	-
Typhimurium BG1	+	Typhimurium UTL32	+
Typhimurium FRS5	+	Typhimurium ML34	+
Typhimurium KR4	-	Typhimurium VLD12	+
Typhimurium KLS	+	Typhimurium BDR14	+
Typhimurium D7	+	Typhimurium PVJ88	+
Typhimurium VTD	+	Typhimurium KLM61	+
Typhimurium YJ9	-	Typhimurium V21	+
Typhimurium JK7	+	Typhimurium BLT3	+
Typhimurium IM3	+	Typhimurium TTFR67	+
Typhimurium IM5	+	Typhimurium XP5	-
Typhimurium IM7	-	Typhimurium SAW4	+
Typhimurium AV4	+	Typhimurium TTR2	+
Infantis AZ	-	Choleraesuis UTT6	+

Примечание. «+» — чистая зона лизиса, «-» — отсутствие зоны лизиса.

Доля восприимчивых к бактериофагу *Salmonella phage* BF-1356 штаммов *Salmonella enterica* составила 56 %, при этом активность в отношении *Salmonella Pullorum* была 100 % (все 4 штамма из коллекции выражено лизировались бактериофагом). В среднем 88 % бактериофагов адсорбировались на бактериальном штамме *Salmonella* Typhimurium B-1025 в течение первых 5 мин (рис. 1).

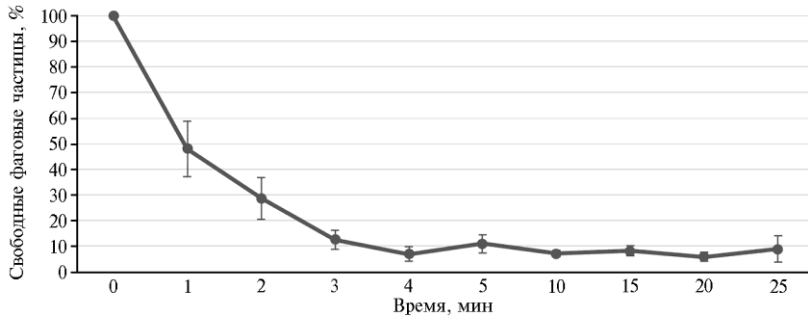


Рис. 1. Скорость адсорбции бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 на штамме *Salmonella* Typhimurium B-1025 ($n = 3$, $M \pm SEM$).

Латентный период для бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 составлял в среднем 40 мин. В течение латентного периода среднее число фагов, высвободившихся из одной клетки-мишени, составило 67 вирусных частиц (рис. 2).

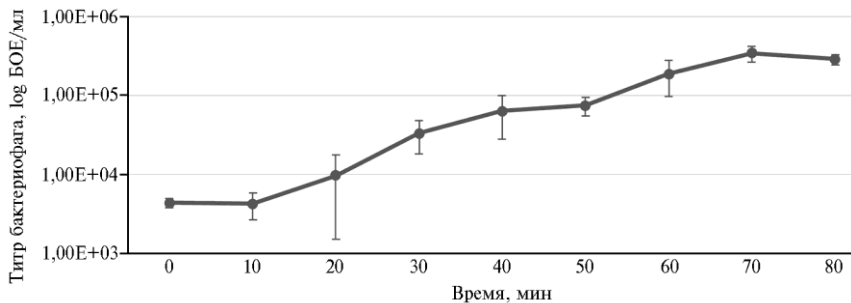


Рис. 2. Одноступенчатая кривая роста бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 на штамме *Salmonella* Typhimurium B-1025 ($n = 3$, $M \pm SEM$).

Стабильность биологических свойств фагов при воздействии на них различных физических и химических агентов служит значимой характеристикой вирусных частиц. Для оценки эффективности прохождения через кислую среду желудка и достижения клеток-мишеней фаги проверяли на устойчивость к различным значениям pH (рис. 3). Бактериофаг *Salmonella*

phage BF-1356 был стабилен при значениях pH в диапазоне от 3,6 до 8 в течение 1 ч. Однако через 24 ч при pH 3,6 наблюдалось снижение титра на 2 логарифмические единицы. Как мы предполагаем, этого было достаточно для того, чтобы фаг успешно преодолел агрессивную среду желудочно-кишечного тракта и достиг клеток-мишеней. Однако его эффективность снижалась при продолжительном воздействии кислой среды.

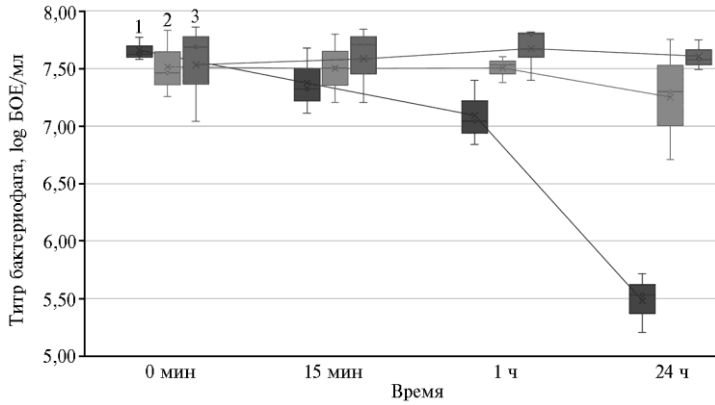


Рис. 3. Изменение титра бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 при pH 3,6 (1), pH 5,2 (2) и pH 8 (3) ($n = 3$, $M \pm SEM$).

В опытах на цыплятах кросса Cobb 500 спустя 12 ч с момента инфицирования у большинства особей из опытной группы и II контрольной группы начали проявляться признаки инфекционного процесса (дрожь, одышка, профузный понос, дегидратация и т.д.). Для подтверждения участия сальмонеллы в патогенезе заболевания были проведены бактериологические исследования фекалий, собранные от птицы до применения бактериофага (табл. 2).

2. Встречаемость *Salmonella* spp. в фекалиях цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500 через 12 ч после заражения (опыт в виварии)

Группа	Выделение <i>Salmonella</i> , n положительных/всего	Доля положительных, %
Опытная группа	19/20	95
I контрольная группа	0/10	0
II контрольная группа	10/10	100

П р и м е ч а н и е. Описание групп см. в разделе «Методика».

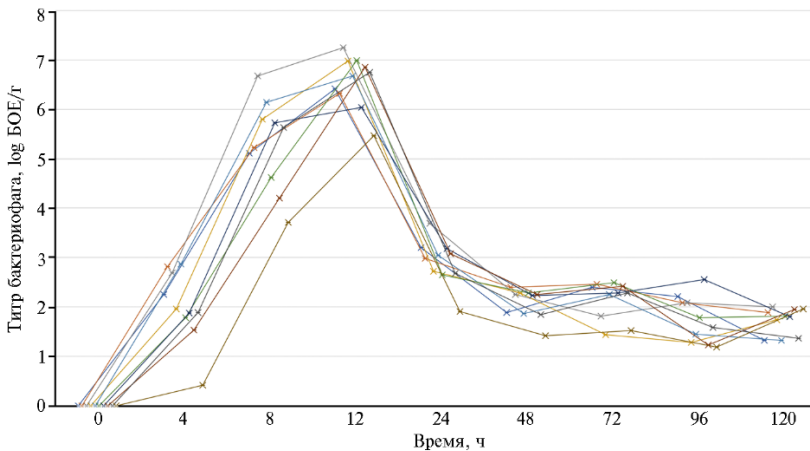


Рис. 4. Динамика титра бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 в фекалиях цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500, зараженных *Salmonella* Typhimurium B-1025, в зависимости от времени после введения бактериофага (опыт в виварии).

Фаг выпаивали, начиная с 12 ч после инфицирования, когда проявились клинические признаки сальмонеллезной инфекции. Эффективность использования препарата для терапии оценивали по улучшению клинического состояния птицы (по прекращению профузного поноса), а также на основании сохранности цыплят, терапевтической и микробиологической эффективности бактериофага. В фекалиях птицы из опытной группы максимальная концентрация фаговых частиц достигалась в интервале от 8 до 12 ч с момента введения бактериофага (рис. 4). Концентрация фага значительно снижалась спустя 24 ч после фаготерапии, но полностью бактериофаг не элиминировался из организма птицы. На протяжении дальнейшего эксперимента у птицы детектировался бактериофаг, концентрацию которого подтверждали методом двойных агаровых слоев.

Использование бактериофагов в опытной группе уменьшало негативные последствия патологического процесса у цыплят (рис. 5).

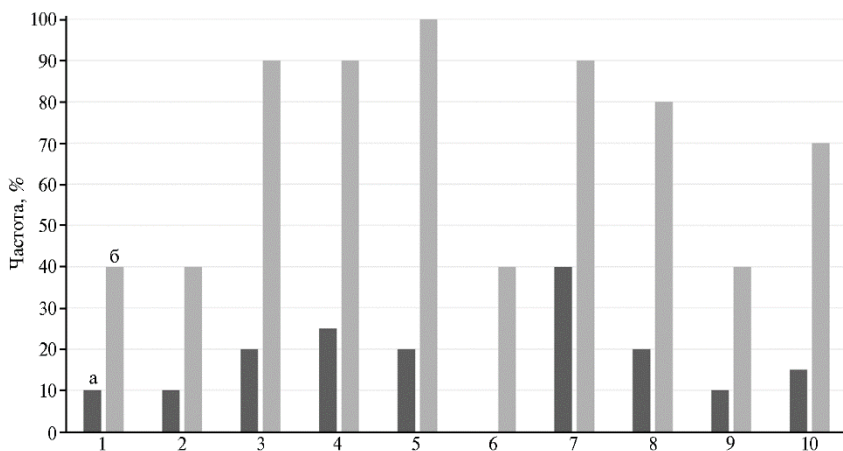


Рис. 5. Патологоанатомические изменения у цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500 из опытной и контрольной групп, зараженных *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ, после фаготерапии (а) и в контроле (б): 1 — некротические очаги в легких, 2 — гнойно-фибринозный перикардит, 3 — слизь в просвете тонкой кишки, 4 — гиперемия и кровоизлияния в тонкой кишке, 5 — петехии и эрозии на слизистых оболочках толстого отдела кишечника, 6 — казеозные массы в слепой кишке, 7 — увеличение селезенки и повышенное кровенаполнение пульпы, 8 — коричнево-бурый цвет печени, 9 — фибрин в желчном пузыре, 10 — некротические очаги под капсулой печени (опыт в виварии).

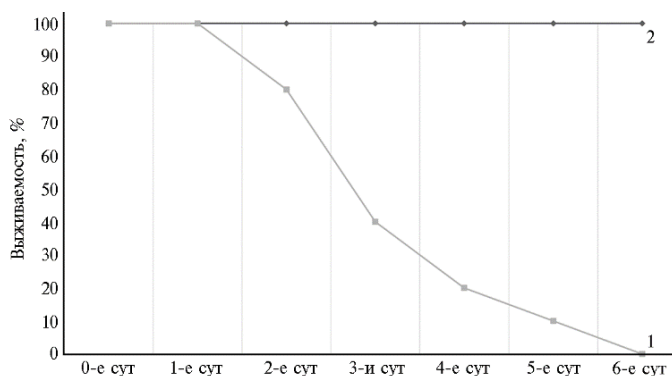


Рис. 6. Терапевтическая эффективность бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 при сальмонеллезной инфекции, вызванной *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ, у цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Cobb 500 в контрольной (1) и опытной (2) группах (опыт в виварии).

Однократное введение бактериофага в титре 10^{10} БОЕ/мл опытной группе птицы позволило обеспечить 100 % сохранность поголовья, в то

время как цыплята II контрольной группы (без выпойки бактериофагом) умирали от инфекции в течение 2-6 сут (рис. 6).

Из секционного материала от опытной и контрольной групп была выделена ранее введенная культура сальмонеллы (табл. 3).

3. Результаты бактериологического исследования на наличие *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ в органах и тканях цыплят (*Gallus gallus L.*) кросса Cobb 500 после фаготерапии и в контроле (опыт в виварии)

Образец	Опытная группа, n положительных/всего	II контрольная группа, n положительных/всего
Мышечная ткань грудки с сердечной мышцей	0/20	5/10
Печень	2/20	8/10
Селезенка	1/20	6/10
Тонкий отдел кишечника	4/20	9/10
Толстый отдел кишечника	3/20	7/10

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

Наблюдалось выраженное снижение выделения возбудителя из органов и грудной мышцы цыплят из опытной группы, подвергнутых фаготерапии. Терапевтическая эффективность прототипа средства на основе штамма *Salmonella phage* BF-1356 составила 100 %, микробиологическая эффективность — 75-80 %.

Одним из наиболее важных критериев, которые следует учитывать при выборе перспективного фага для эффективной фаговой терапии, считается литическая активность в отношении бактерии-мишени. Скрининг литической активности фагов *in vitro* обеспечивает строгую оценку их способности к лизису бактериальной клетки. Вирулентный штамм *Salmonella Typhimurium* В-1025, использованный в опыте для заражения, был восприимчив к бактериофагу *Salmonella phage* BF-1356. Бактериофаг мог размножаться, и его концентрация увеличивалась *in situ* в присутствии клеток-мишеней.

Также мы определили литическую активность бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 в отношении штаммов сальмонелл из коллекции ВИЭВ РАН, выделенных на территории Российской Федерации в 2010-2018 годах. Установлено, что 100 % коллекционных штаммов *Salmonella Pullorum* были чувствительны к бактериофагу *Salmonella phage* BF-1356, а 88 (56 %) штаммов других серовариантов *Salmonella enterica*, нозологически и санитарно значимых в птицеводстве, оказались в разной степени восприимчивы к бактериофагу, что позволяет сделать вывод о перспективной универсализации прототипа средства для терапии и профилактики сальмонеллеза кур. Описанные биологические свойства *Salmonella phage* BF-1356 позволили расценивать его как штамм-кандидат и продолжить исследования по другим важным характеристикам с оценкой эффективности фаготерапии на зараженной птице. Этот порядок согласуется с методологией селекции штаммов бактериофагов в качестве производственно перспективных (11-14).

Еще одна немаловажная характеристика — отношение бактериофагов к внешним агрессивным факторам, с которыми бактериофаги могут столкнуться на пути к клеткам-мишеням. Для эффективной фаготерапии домашней птицы фагам необходимо выдержать кислый pH желудка и войти в контакт с бактериальной популяцией с определенным соотношением MOI. В этой связи бактериофаги, более устойчивые к агрессивной pH желудочного сока, имеют преимущества. Кислотность и среднее время прохождения кормов по различным сегментам пищеварительного тракта у птицы сильно варьируется. Так, в проventрикулозе и мышечном желудке, где значения pH самые низкие (от 2,5 до 3,5), время прохождения колеблется от 30 до 90 мин (23). Титр фага *Salmonella phage* BF-1356 в нашем опыте снижался менее

чем на 1 log БОЕ при pH 3,6 и инкубации 1 ч, что свидетельствует о достаточной доставке бактериофага в очаг инфекции. Возможным вариантом решения проблемы кислой среды желудка может быть подщелачивание pH желудка перед выпаиванием бактериофага, однако на крупных предприятиях это не представляется возможным. Поэтому для массового применения будет оптимальным отбирать фаги, более устойчивые к кислой среде.

R.J. Payne с соавт. (24) разработали математическую модель лечения бактериальных инфекций *in vivo* с помощью бактериофагов, в которой они утверждают, что введение терапевтического фага должно быть тщательно рассчитано по времени, чтобы совпадать с достаточно плотной бактериальной популяцией (24), а для поддержания пролиферации фага необходимая плотность бактериальных клеток должна составлять примерно 10^4 КОЕ/мл, что также подтверждено L.M. Kasman с соавт. (25). Основываясь на математической модели, согласно которой для эффективного инфицирования 99,99 % бактериальных клеток плотность популяции бактерий должна быть достаточной для пролиферации фага, мы подтверждали наличие сальмонеллы в кишечнике у подопытной птицы посредством бактериологического исследования фекалий, собранных от цыплят до назначения фаготерапии (см. табл. 2).

Острый опыт на цыплятах кросса Cobb 500 проводили с использованием модельной инфекции высоковирулентным штаммом *Salmonella Pullorum* № 732-ВИЭВ. Для оценки эффективности фаготерапии были использованы показатели микробиологической и терапевтической эффективности. При этом учитывался минимальный порог выживаемости в опытной группе, который составлял 80 %. Падеж в контрольной группе при аналогичном инфицировании в дозе 5 LD₅₀ принимали за точку отсчета (13).

Гибель цыплят II контрольной группы произошла в течение 2-6 сут. Зафиксированные патологоанатомические изменения (см. рис. 5) были свойственны для сальмонеллезной патологии, что подтвердилось при лабораторном исследовании проб секционного материала, полученных от павших цыплят. Индикация культуры заражающего штамма подтвердила воспроизводимость модельной инфекции, гибель в контроле составила 100 % к 7-м сут после инфицирования, что соответствует вирулентным свойствам контрольного штамма сальмонеллы.

В проведенном эксперименте были получены результаты, свидетельствующие о том, что фаготерапия пуллороза цыплят не обеспечила полную элиминацию сальмонелл, что вполне коррелируется с результатами, опубликованными зарубежными коллегами (26, 27). При этом в нашем исследовании в опытной группе выживаемость составила 100 % и наблюдалось морфологическое улучшение внешнего состояния органов, что объективно указывает на терапевтическую эффективность. Исходя из полученных данных, мы можем утверждать, что в организме птицы продолжалась циркуляция фаговых частиц, которые в случае увеличения числа клеток сальмонелл и контакта с ними способны их лизировать.

Развитие генерализованной формы сальмонеллеза, безусловно, осложняет проведение фаготерапии. Именно поэтому эффективное использование фагов в большей степени зависит от того, насколько быстро будет назначен препарат. Это позволит полностью лизировать клетки возбудителя в желудочно-кишечном тракте до проникновения его в другие органы и кровеносное русло.

Результаты нашего исследования показали возможность эффективного снижения падежа среди молодых цыплят кросса Cobb 500 с помощью фаготерапии бактериофагом *Salmonella phage* BF-1356, что может суще-

ственно уменьшить потери хозяйств, сталкивающихся с этим возбудителем. Дальнейший поиск, отработка способа и кратности применения средства на основе штамма *Salmonella phage* BF-1356 перспективны для повышения его микробиологической эффективности. Тем не менее применение фаготерапии на стадиях инкубационного периода, а также профилактика в зонах риска имеют важное значение для предотвращения эпизоотии при пуллорозе и могут помочь избежать серьезных карантинных последствий для хозяйства.

Таким образом, штамм бактериофага *Salmonella phage* BF-1356 обладает высокой литической активностью и спектром литического действия, включающим гомологичный серовариант *Salmonella Pullorum* — возбудителя пуллороза кур, а также других нозологически и санитарно значимых в птицеводстве сальмонелл. Биологические свойства штамма *Salmonella phage* BF-1356 характеризуют его как потенциальный штамм-кандидат для создания лечебно-профилактических средств. Он стабильно лизирует гомологичные бактериальные клетки, обладает достаточно коротким латентным периодом и высоким выходом вирусных частиц при размножении в клетке-мишени, устойчивостью к действию физических факторов, в частности pH, что важно при пероральном применении. Терапевтическая эффективность прототипа средства на основе штамма *Salmonella phage* BF-1356 в отношении цыплят кросса Cobb 500 составила 100 %, микробиологическая эффективность — 75-80 %. Полученные данные указывают на перспективность создания лечебно-профилактического средства для птицеводства на основе изученного штамма пуллорного бактериофага и его применения в противо-эпизоотической работе.

¹ООО «ЦБО Микроэкологии»,
143026 Россия, г. Москва, территория Инновационного центра «Сколково», Большой бульвар, 42, корп. 1, эт/пом/раб 0/157/5,
e-mail: a-laishevtsev@bk.ru ✉;

²ФГБНУ ФНЦ Всероссийский институт
экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина
и Я.Р. Коваленко РАН,

109428 Россия, г. Москва, Рязанский проспект, 24, корп. 1;

³ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора,
119435 Россия, г. Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 4,
e-mail: elzz89@mail.ru;

⁴ФГБОУ ВО Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА им. К.И. Скрябина,

109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru;

⁵ФБУН Московский НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора,

125212 Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
e-mail: irina6804@mail.ru, kallybagandova@mail.ru,
toita.mizaeva@bk.ru, andreialeshkin@googlegmail.com

Поступила в редакцию
30 марта 2023 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2024, V. 59, № 4, pp. 799-813

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE *Salmonella phage* BF-1356 STRAIN AND ITS EFFECTIVENESS IN PHAGE THERAPY OF CHICKEN PULLOROSIS

A.I. Laishevtsev¹, ²✉, E.R. Zulkarneev³, N.V. Pimenov⁴, I.A. Kiseleva⁵, K.M. Bagandova⁵,
T.E. Mizaeva⁵, A.V. Aleshkin⁵

¹TsBO *Microecologiya*, 42/1, Bolshoi Bulvar, territory of Skolkovo Innovation Centre, Moscow, 143026 Russia,
e-mail a-laishevtsev@bk.ru (✉ corresponding author);

²Federal Scientific Centre Skryabin and Kovalenko All-Russian Institute of Experimental Veterinary RAS, 24/1, Ryazan-sky prospect, Moscow, 109428 Russia;

³Plague Control Center of Rospotrebnadzor, 10/4, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119435 Russia, e-mail elzz89@mail.ru;

⁴Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail pimenov-nikolai@yandex.ru;

⁵Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10, ul. Admirala Makarova, Moscow, 125212 Russia, e-mail irina6804@mail.ru, kallybagandova@mail.ru, toita.mizaeva@bk.ru, andreialeshkin@googlemail.com

ORCID:

Laishevsev A.I. orcid.org/0000-0002-5050-2274

Zulkarneev E.R. orcid.org/0000-0002-5920-8098

Pimenov N.V. orcid.org/0000-0003-1658-1949

Kiseleva I.A. orcid.org/0000-0001-7206-4220

The authors declare no conflict of interests

Final revision received March 30, 2023

Accepted June 20, 2023

Bagandova K.M. orcid.org/0000-0001-5166-9677

Mizaeva T.E. orcid.org/0000-0002-0046-9226

Aleshkin A.V. orcid.org/0000-0002-0532-1378

doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.799eng

Abstract

Salmonella Pullorum is a rare but significant pathogen of the genus *Salmonella*, responsible for considerable damage to the poultry industry and economic losses due to high poultry mortality. The potential use of bacteriophage therapy as an adjunctive treatment for poultry has been the subject of considerable debate in recent times. This study demonstrates, for the first time, the therapeutic efficacy of virulent bacteriophage *Salmonella* phage BF-1356 administered 12 hours after oral infection of cross Cobb 500 chickens (*Gallus gallus* L.) with a highly virulent strain *Salmonella* Pullorum № 732-VIEV. The objective of this study was twofold: firstly, to characterize *Salmonella* phage BF-1356 and its interaction with the host bacterial strain in vitro; secondly, to evaluate the efficacy of phage therapy for pullorosis in vivo on the Cobb 500 chicken model. *Salmonella* strain (*Salmonella* Pullorum № 732-VIEV) was isolated in 2017 at a poultry farm in the Moscow region. The virulent bacteriophage *Salmonella* phage BF-1356 from the collection of the Gabrichesky Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia), was used for phage therapy. The purified bacteriophage exhibited a titer of at least 10^{11} PFU/ml. The sterility of the phage preparation was verified through the incubation of 0.1 ml of phage lysate in 5 ml of fluid thioglycollate medium (HiMedia, India) at 32.5 ± 2.5 and 22.5 ± 2.5 °C for 14 days. The host range of bacteriophage lytic activity was determined using 164 bacterial strains of *Salmonella enterica* isolated in the Russian Federation between 2010 and 2018. The lytic activity was evaluated visually by a lysis zone at the points of bacteriophage application on indicator Petri dishes with 1.5 % Mueller-Hinton agar which contained 200 µl of a mid-log-phase culture of the tested strains (10^6 CFU). The adsorption of *Salmonella* phage BF-1356 on *Salmonella* Typhimurium strain B-1025 was evaluated. The latent period and burst size of *Salmonella* phage BF-1356 were determined by monitoring the dynamic changes in the number of phage particles during the replicative cycle on *Salmonella* Typhimurium B-1025. In order to evaluate the effect of pH on bacteriophage titer, known concentrations of purified bacteriophages were incubated in buffers at different pH values. *Salmonella*-free 14-day-old chickens of cross Cobb 500 ($n = 40$) were used as laboratory objects. The chickens were randomly divided into three groups. Ten chickens were used to control housing conditions (I control group not exposed to infection and phage therapy), 20 chickens were used to determine the efficacy of the phage after its use for therapeutic purposes and to assess further *Salmonella* carriage (experimental group), and 10 chickens were used as infection control (II control group infected with *Salmonella* without bacteriophage administration). The 14 day-old chicks in the experimental and II control groups were orally infected with *Salmonella* Pullorum № 732-VIEV at a dose of 3.8×10^8 cells in 0.4 ml which corresponded to approximately 5 LD₅₀ (the acute infectious dose that guaranteed the modelling of pullorosis infection with the complete death of control group subjects). The administration of bacteriophage was initiated upon the onset of symptoms indicative of the infectious process. The chicks in the experimental group were administered bacteriophage orally at a dose of 10^{10} PFU/ml in 0.2 ml. The presence of phages and *Salmonella* cells was promptly identified following the act of defecation. The quantity of phage particles was subsequently determined by the double-layer agar method. To confirm the efficacy of phage therapy, the birds in the experimental group were slaughtered for pathological and anatomical autopsy and collection of sectional material for laboratory studies and the identification of *Salmonella* cultures from organs. In the control group, pathological autopsy were conducted as the birds died. *Salmonella* phage BF-1356 demonstrated specific lytic activity against common *Salmonella* serovars, including Pullorum, Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis and Infantis. The mean latent period for bacteriophage was 40 minutes, with an average of 67 viral particles released per cell. The bacteriophage demonstrated stability at pH levels between 5 and 8, with a slight decrease in titer observed at pH 3.6 within the first hour. A single oral administration of bacteriophage BF-1356 in a titer of 10^{10} PFU/ml 12 hours after infection of Cobb 500 chickens with *Salmonella* Pullorum strain № 732 resulted in 0 % mortality in the population and a significant reduction in the consequences of the pathological process in the chickens after phage therapy. The chickens in the control group exhibited mortality within a period of 2-6 days. The structure of the pathological lesions was consistent with that observed in salmonellosis, a diagnosis that was subsequently confirmed in laboratory conditions. Despite the absence of a complete elimination of the pathogen from the organism, a notable reduction in the isolation of the pathogen from organs and

tissues occurred on day 7, particularly under the infection with 5 LD₅₀. Therefore, the prototype agent based on *Salmonella phage* BF-1356 demonstrated 100 % therapeutic efficacy and 75-80 % microbiological efficacy. The data obtained indicate the potential of the studied bacteriophage strain for the creation of therapeutic and prophylactic means against pullorosis to be used in poultry farming and in the epizootic control.

Keywords: pullorosis, virulent bacteriophages, adsorption, spectrum of lytic activity, in vivo tests, salmonellosis, generalized form.

REFERENCES

1. Pimenov N.V., Laishevtev A.I. *Rossiyskiy zhurnal sel'skokhozyaystvennykh i sotsial'no-ekonomicheskikh nauk*, 2017, 4(64): 257-269 (doi: 10.18551/rjoas.2017-04.33) (in Russ.).
2. Pimenov N.V., Laishevtev A.I. Pimenova V.V. *Rossiyskiy zhurnal sel'skokhozyaystvennykh i sotsial'no-ekonomicheskikh nauk*, 2017, 2(62): 282-289 (doi: 10.18551/rjoas.2017-02.33) (in Russ.).
3. Barrow P.A., Freitas Neto O.C. Pullorum disease and fowl typhoid — new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 2011, 40(1): 1-13 (doi: 10.1080/03079457.2010.542575).
4. Allen H.K., Levine U.Y., Looft T., Bandrick M., Casey T.A. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends in Microbiology*, 2013, 21(3): 114-119 (doi: 10.1016/j.tim.2012.11.001).
5. Chen C., Li J., Zhang H., Xie Y., Xiong L., Liu H., Wang F. Effects of a probiotic on the growth performance, intestinal flora, and immune function of chicks infected with *Salmonella pullorum*. *Poultry Science*, 2020, 99(11): 5316-5323 (doi: 10.1016/j.psj.2020.07.017).
6. Zhang Y., Ding Y., Li W., Zhu W., Wang J., Wang X. Application of a novel lytic podoviridae phage Pu20 for biological control of drug-resistant *Salmonella* in liquid eggs. *Pathogens*, 2021, 10(1): 34 (doi: 10.3390/pathogens10010034).
7. Le Bouquin S., Bonifait L., Thépault A., Ledein T., Guillon F., Rouxel S., Souillard R., Chemaly M. Epidemiological and bacteriological investigations using whole-genome sequencing in a recurrent outbreak of pullorum disease on a quail farm in France. *Animals*, 2021, 11(1): 29. (doi: 10.3390/ani11010029).
8. Li X., Nie C., Liu Y., Chen Y., Lv X., Wang L., Zhang J., Yang W., Li K., Zheng C., Jia Y., Ning Z., Qu L. The genetic architecture of early body temperature and its correlation with *Salmonella Pullorum* resistance in three chicken breeds. *Frontiers in Genetics*, 2020, 10: 1287 (doi: 10.3389/fgene.2019.01287).
9. Pan Z.M., Wang X.Q., Zhang X.M., Geng S.Z., Chen X., Pan W.J., Cong Q.X., Liu X.X., Jiao X.N., Liu X.F. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Pullorum isolates in China from 1962 to 2007. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136(3-4): 387-392 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.015).
10. Gao P., Ma C., Sun Z., Wang L.F., Huang S., Su X.Q., Xu J., Zhang H.P. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 2017, 5: 91 (doi: 10.1186/s40168-017-0315-1).
11. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris Jr. J.G. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(3): 649-659 (doi: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001).
12. Summers W.C. Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 437-451 (doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.437).
13. Pimenov N.V., Laishevtev A.I. *Sovremennye aspekty bor'by s sal'monelleznoy infektsiey v pitsevodstve* [Modern aspects of the fight against salmonella infection in poultry farming]. Moscow, 2017 (in Russ.).
14. Pimenov N.V. *Rossiyskiy zhurnal sel'skokhozyaystvennykh i sotsial'no-ekonomicheskikh nauk*, 2013, 23(11): 16-23 (in Russ.).
15. Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Kiseleva I.A., Rubal'sky E.O., Afanas'ev S.S., Borzilov A.I., Zatevalov A.M., Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N., Zeigarnik M.V., Galimzyanov Kh.M., Rubal'sky O.V. Bacteriophages as probiotics: phage-based probiotic dietary supplement in prophylaxis against foodborne infections. *Infekc. Bolezni (Infectious Diseases)*, 2016, 14(2): 31-40 (doi: 10.20953/1729-9225-2016-2-31-40).
16. Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: *Bacteriophages. Methods in molecular biology*, vol. 501. M.R. Clokie, A.M. Kropinski (eds.). Humana Press, 2009: 69-76 (doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7).
17. Haines M.E., Hodges F.E., Nale J.Y., Mahony J., van Sinderen D., Kaczorowska J., Alrashid B., Akter M., Brown N., Sauvageau D., Sicheritz-Pontén T., Thanki A.M., Millard A.D., Edouard E., Galyov E.E., Clokie M.R. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 613529 (doi: 10.3389/fmicb.2021.613529).

18. Pajunen M., Kiljunen S., Skurnik M. Bacteriophage ϕ YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (18): 5114-5120 (doi: 10.1128/jb.182.18.5114-5120.2000).
19. Capra M.L., Quiberoni A., Reinheimer J. Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*: response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(2): 334-342 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02767.x).
20. *Metodicheskie ukazaniya po patomorfologicheskoy diagnostike bolezney zhivotnykh, ptits i ryb v veterinarnykh laboratoriyakh* [Guidelines for pathomorphological diagnostics of diseases of animals, birds and fish in veterinary laboratories]. Moscow, 2000 (in Russ.).
21. *Metodicheskie ukazaniya 4.2.2723-10. Laboratornaya diagnostika sal'monellozov, obnaruzhenie sal'monell v pishchevykh produktakh i ob'ektakh okruzhayushchey sredy* [Guidelines 4.2.2723-10. Laboratory diagnostics of salmonellosis, detection of salmonella in food products and environmental objects]. Moscow, 2010 (in Russ.).
22. Federation of Animal Science Societies. *Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching* (4th ed.). American Dairy Science Association, 2010.
23. Ravindran V. Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. *Journal of Applied Poultry Research*, 2013, 22(3): 628-636 (doi: 10.3382/japr.2013-00739).
24. Payne R.J., Jansen V.A. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *Journal of Theoretical Biology*, 2001, 208(1): 37-48 (doi: 10.1006/jtbi.2000.2198).
25. Kasman L.M., Kasman A., Westwater C., Dolan J., Schmidt M.G., Norris J.S. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *Journal of Virology*, 2002, 76(11): 5557-5564 (doi: 10.1128/JVI.76.11.5557-5564.2002).
26. Atterbury R.J., Van Bergen M.A.P., Ortiz F., Lovell M.A., Harris J.A., De Boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M., Barrow P.A. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(14): 4543-4549 (doi: 10.1128/AEM.00049-07).
27. Gonçalves G.A.M., Donato T.C., Baptista A.A.S., de Oliveira Corrêa I.M., Garcia K.C.O.D., Andreatti Filho R.L. Bacteriophage-induced reduction in *Salmonella* Enteritidis counts in the crop of broiler chickens undergoing preslaughter feed withdrawal. *Poultry Science*, 2014, 93(1): 216-220 (doi: 10.3382/ps.2013-03360).