

УДК 578.4; 579.678; 579.62

UDC 578.4; 579.678; 579.62

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ
БОРЬБЫ С КОЛИБАКТЕРИОЗОМ И
КАМПИЛОБАКТЕРИОЗОМ В
ПТИЦЕВОДСТВЕ**

**THE APPLICATION OF THE
BACTERIOPHAGES TO COMBAT
COLIBACILLOSIS AND
CAMPYLOBACTERIOSIS IN POULTRY**

Зимин Андрей Антонович
к. б. н.
AuthorID: 81249
dr.zimin8@yandex.ru

Zimin Andrei Antonovich
Cand. Biol. Sci.
AuthorID: 81249
dr.zimin8@yandex.ru

Кочетков Филипп Владимирович
kochetkov-f@bk.ru
*Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.
Пушchino, Московской обл., Россия
Пушчинский естественно-научный институт, г.
Пушchino, Московской обл., Россия*

Kochetkov Philip Vladimirovich
kochetkov-f@bk.ru
*Institute of Biochemistry and Physiology of
Microorganisms of Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow reg., Russia
Pushchino State Institute of Natural Sciences,
Pushchino, Moscow region, Russia*

Кононенко Сергей Иванович
д. с.-х. н., доцент
SPIN-код: 8188-4599
AuthorID: 349808
kononenko-62@mail.ru

Kononenko Sergei Ivanovich
Dr. Sci.Agr., Associate Professor
SPIN-code: 8188-4599
AuthorID: 349808
kononenko-62@mail.ru

Осепчук Денис Васильевич
д. с.-х. н.
SPIN-код: 6769-9879

Osepchuk Denis Vasilievich
Dr. Sci. Agr.
SPIN-code: 6769-9879

Скобликов Николай Эдуардович
к. мед. н.
SPIN-код: 6591-8710
*Северо-Кавказский научно-исследовательский
институт животноводства, Краснодар, Россия*

Skoblikov Nikolai Eduardovich
Cand. Med. Sci.
SPIN-code: 6591-8710
*North-Caucasus Research Institute of Husbandry,
Krasnodar, Russia*

Миниобзор посвящен задачам и методам фаговой терапии двух бактериальных инфекций сельскохозяйственных птиц. В обзоре рассматривается применение бактериофагов от времени их открытия до настоящих дней. Обсуждается актуальность таких заболеваний как кампилобактериоз и колибактериоз, передающихся от птиц к человеку, рассказывается о способах применения бактериофагов и их эффективности на моделях взрослых птиц и цыплят. В том числе приводятся сведения об экспериментальном исследовании фаговой терапии на птицеферме. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ по проектам №16-44-230855-p_a и №13-04-00991a в рамках научного проекта № 16-44-230855-p_a

This work considers the needs and methods of phage therapy of two bacterial infections in poultry. The review examines the use of bacteriophages, from the moment of their discovery to the present day. We discuss the relevance of such diseases as campylobacteriosis and colibacteriosis transmitted from birds to humans, we show how to use bacteriophages and their efficacy in models of adult birds and chickens, including information provided on the pilot study of phage therapy at a poultry farm. The reported study was partially supported by RFBR, research projects No. 16-44-230855 and No. 13-04-00991 and № 16-44-230855-p_a

Ключевые слова: БАКТЕРИОФАГИ, САМПУЛОБАКТЕР, *E. COLI*, КОЛИБАКТЕРИОЗ, КАМПИЛОБАКТЕРИОЗ, ФАГОТЕРАПИЯ

Keywords: BACTERIOPHAGES, CAMPYLOBACTER, *E. COLI*, COLIBACILLOSIS, CAMPYLOBACTERIOSIS, PHAGE THERAPY

В 1898 году Н.Ф. Гамалея обнаружил и выделил фильтрующийся через антибактериальные фильтры агент, который лизировал клетки бактерий сибирской язвы, а сам терял эти свойства при нагревании [1]. Н.Ф. Гамалея предположил, что это бактериолизин – фермент. Анализ этих экспериментов показывает, что он первым выделил бактериофаг и исследовал его природу. В 1915 году Twort [2], сообщил об открытии агента, проходящего через антибактериальные фильтры и инфекционности этого агента по отношению к бактериям. При этом Творт первым заявил о вирусной природе этого агента. В 1917 году Д'Эрель получил подобные результаты при лизисе *Shigella* и *Salmonella* [3]. Он также обнаружил, что во время клинического развития дизентерии у больных удается выделить бактериофаги. Д'Эрель сделал первый доклад о профилактике с помощью бактериофагов. Он предполагал использовать культуру «анти-микроба» для "иммунизации" кроликов от заражения "Шига бациллами". Фаги перестали применять в Западной медицине, и они были заменены антибиотиками и сульфаниламидными препаратами, но в России (СССР) и в Восточной Европе клиническое применение бактериофагов продолжается, не прерываясь, до сегодняшнего дня. С опытов Смита и его группы по фаговой терапии у мышей и у сельскохозяйственных животных началось возрождение всемирного интереса к фаговой терапии [4,5]. Ключевой особенностью результатов Смита и его коллег было доказательство размножения бактериофагов в организме животного, а если бактериофаги размножаются в макроорганизме, то бактериальные клетки при этом были убиты за счет лизиса. В настоящее время активно развиваются подходы к фаговой антибактериальной терапии многих животных, как маленьких домашних, так и сельскохозяйственных. Много внимания уделяется и перспективам фаговой терапии человека. За прошедшие со времени начала изучения фагов 120 лет ученые постепенно получают углубленное понимание биологии фагов. В том числе

исследуют, какие характеристики фагов возможно использовать для контроля инфекций, вызываемых бактериями [6,7]. В этом обзоре литературы мы рассматриваем перспективы применения бактериофагов для терапии и профилактики бактериозов в птицеводстве.

Кампилобактериоз в птицеводстве. Бактерии рода *Campylobacter* являются одними из самых часто встречающихся возбудителей пищевых бактериальных инфекций во всем мире. Использование в пище полусырого (недоваренного) или плохо обработанного продукта из мяса птицы является основным путем распространения этой инфекции у людей. Возможность использования фагов, специфичных к этим бактериям, изучается уже более двадцати лет [8 – 13]. В настоящее время разрабатываются схемы контроля этой инфекции у сельскохозяйственной птицы [8 – 10]. Существенными моментами являются методы выделения фагов, специфичных к различным патогенным бактериям рода *Campylobacter*, а также методы их применения, необходимые для достижения успешного результата бактериофаговой терапии. Изучение применения бактериофагов для защиты бройлерного поголовья от кампилобактериоза должно привести к разработке эффективных схем фаговой профилактики и терапии этой инфекции. Бактерии рода *Campylobacter* вызывают бактериальный энтерит. Это наиболее часто встречающееся зоонозное заболевание на птицеводческих производствах. Кампилобактериоз является весьма существенным и для человека. Например, в США он по оценкам затрагивает более чем два миллиона человек ежегодно [9] *Campylobacter jejuni* вместе с патогенной *E.coli* играют главную роль в большинстве случаев возникновения диареи. Развитие птицеводческой промышленности сопровождается увеличением поголовья птицы и повышением опасности появления зоонозных и антропонозных заболеваний. Таким образом, изучение возможности применения бактериофагов для лечения и профилактики инфекций,

вызванных бактериями рода *Campylobacter* и патогенной *E.coli* является актуальной прикладной задачей пищевой экологии человека.

Исследование использования фагов в терапии инфекций, вызванных бактериями рода *Campylobacter* у птицы. К настоящему времени было проведено несколько исследований для того, чтобы оценить потенциал бактериофагов для снижения кампилобактерий в кишечнике и на кожном покрове бройлеров. Также было проведено исследование кампилофагов на бройлерной ферме. В большинстве этих исследований титр кампилобактерий снижался на два порядка. При этом были использованы как одиночные фаги, так и фаговые коктейли, состоящие из нескольких фагов. Для исследований по терапии кампилобактериоза использовали только литические бактериофаги. Все использованные бактериофаги принадлежали к отряду *Caudovirales* [8].

Были проведены исследования по экспериментальной терапии птиц. В этих работах изучался потенциал фагов для профилактики и контроля *Campylobacter* в кишечнике экспериментально зараженных птиц. Сначала было проведено применение одного кампилофага на бройлерах [12]. Эти авторы также проверили эффект лечения парой фагов. Они предположили, что добавление второго фага может уменьшить скорость появления фагоустойчивых мутантов, хотя присутствие таких мутантов не было обнаружено. При этом было показано, что эффективность комбинации двух фагов сопоставима с их индивидуальным применением, которые исследовали *in vitro*, чтобы определить наличие возможного антагонистического эффекта [12]. Другая группа ученых изучала действие двух бактериофагов (CP8 и CP34) в модельных условиях, на основе исследования эффективности *in vitro* [9 – 11]. Птиц заранее заражали двумя различными штаммами *Campylobacter* дикого типа, что приводило к различным результатам после того, как добавили фаг CP8. Было замечено значительное падение титра *C. jejuni* ГПС8, в течение первого дня лечения,

по сравнению с относительно устойчивым ростом другого штамма НРС5. Проводилось сравнение лечения фагами CP34 и CP8 при их применении против *C. coli* НРС5 в слепой кишке, где концентрация этих бактерий ниже. Было показано, что применение фага CP34 не приводило к полной элиминации бактерии в течение 5 дней [9 – 11].

Результаты, полученные при испытаниях на птицеводческой ферме, сильно расходились с результатами, полученными *in vitro* [29]. В естественных условиях способность фага CP8 к эффективному лизису *C. coli* НРС5 *in vitro* не воспроизводилась при терапии цыплят. Скорее всего, это было вызвано различиями в среде кишечника у взрослой курицы и цыпленка. Аналогичные исследования в естественных условиях были проведены с *C. coli* дикого типа – OR12, который был использован для заражения птиц и лечения теми же дозами фагов. Только высокая доза 10^9 БОЕ фага на голову птицы привела к снижению титра *C. coli* в слепой кишке птиц на второй день [8]. Была также проверена эффективность фагового коктейля на цыплятах, зараженных *C. jejuni* или *C. coli* [10]. Лечение фагом проводили путем добавления фагового препарата в корм. Этим способом было достигнуто большее снижение титра патогенной бактерии *C. jejuni*, по сравнению экспериментами по введению фагового препарата через желудочный зонд. Для определения титра кампилобактерий во время терапии был использован помет птиц, взятых для эксперимента, и мазки-отпечатки клоак. Была исследована скорость возникновения устойчивости к фагу, использованному при экспериментальной терапии. Оказалось, что 6% изолятов кампилобактерий, прошедших через куриный кишечник, были устойчивы к фагу, независимо от дозировки фагового препарата [10]. По мнению авторов данного обзора, это может говорить о возможности использования и меньшей концентрации фагов для терапии, а необходимость повышения титра была связана с использованием

одиноким фага и высоким процентом появившихся устойчивых штаммов в этих условиях.

Исследование применения фагов для контроля колибактериоза у кур. Существует насущная необходимость найти подходы без применения антибиотиков для профилактики и лечения бактериальных заболеваний, вызванных патогенными штаммами *Escherichia coli* (*E. coli*), в связи с широким распространением устойчивости к антибиотикам, а также снизить использование антибиотиков в птицеводстве. Колибактериоз вызывается кишечной палочкой *E. coli*, – бактерией, которая присутствует в пищеварительном тракте всех животных. Существует целый ряд штаммов этой бактерии, специфичных для различных видов животных. Далеко не все штаммы патогенны. У птиц патогенные штаммы *E. coli* вызывают септицемию, респираторные заболевания, синовит, перикардит и сальпингит. Колибактериоз имеет широкое распространение у сельскохозяйственных животных. В птицеводстве наибольшую опасность колибактериоз представляет для молодых птиц в первый месяц жизни, а также в период яйценоскости. Колибактериоз является одной из основных по своему значению для экономики и здоровья человека инфекционных патологий. Это заболевание вызывает около 50 – 60 % падежа птицы, вызванного условно-патогенными микроорганизмами [14 – 20]. Основной причиной этого явления является широкое распространение штаммов колибактерий, имеющих множественную устойчивость к антибиотикам. Это нарушает микробиоценоз и повышает заболеваемость птиц, приводит к снижению продуктивности хозяйств [21]. Поэтому постоянный контроль бактериального фона, контроль качества кормов и дезинфекции объектов внешней среды, своевременное проведение лечебных и профилактических мероприятий – это необходимость и залог успеха в получении доброкачественной и безопасной продукции [18 – 20].

В условиях широкого распространения антибиотикоустойчивых штаммов колибактерий в птицеводстве необходима разработка альтернативных антибактериальных препаратов, оказывающих минимальный эффект на организм хозяина. Одной из таких возможностей является использование бактериофагов для контроля колибактериоза. Несколько исследований показали, что бактериофаги могут быть использованы для предотвращения и лечения колибактериоза у домашней птицы.

Для терапии использовали два бактериофага названные SPR2 и DAF6. Они были выделены из сточных вод и отобраны по величине и прозрачности бляшек. Первая работа этой группы авторов была посвящена введению птицам смеси патогенной *E.coli* и одного бактериофага для предотвращения колибактериоза [27]. На седьмой день жизни птицам вводили в легкие патогенную *E.coli* в дозе 10^3 КОЕ/мл (здесь и далее все дозы приведены из расчета на голову птицы) или *E.coli*, смешанную с бактериофагом SPR2, в дозе 10^3 или 10^6 БОЕ/мл. Другим группам птиц вводили патогенную *E.coli* в дозе 10^4 КОЕ/мл и этот же штамм *E.coli*, смешанный с фагом в дозах 10^4 БОЕ/мл и 10^8 БОЕ/мл. Этот эксперимент был закончен, когда птицы достигали возраста трех недель. Смертность птиц снижалась, но оставалась до 80% у птиц, которые получали только 10^3 КОЕ/мл культуры патогенной *E.coli*, и до 25% или 5% у птиц, которые получали дополнительно бактериофаг в дозах 10^3 КОЕ/мл и 10^6 КОЕ/мл, соответственно. Гибель птиц существенно снизилась от 85% в контрольной группе зараженных *E.coli* птиц до 35% при добавлении 10^4 БОЕ/мл фага. Добавление 10^8 БОЕ/мл фага приводило к полному предотвращению гибели птиц.

Бактериофаг может быть использован профилактически для предотвращения бактериальной инфекции. Для того, чтобы изучить профилактический потенциал бактериофага авторы предприняли

несколько экспериментов [26]. Другим подходом было применение бактериофага в виде аэрозоля перед введением птицам патогенной *E.coli*. Гибель птиц в опыте с использованием аэрозоля была 40% в контроле при использовании буфера и 27% при применении аэрозоля, содержащего фаги. При увеличении концентрации бактериофага гибель птиц была 40% и 3%, при разбрызгивании буфера и бактериофагов, соответственно.

Исследователи продолжили свои эксперименты с целью определения эффективности бактериофагов в лечении бактериальной инфекции у цыплят [24, 25]. Основным подходом было заражение птиц *E.coli* и применение после этого бактериофагов в виде аэрозольного спрея или внутримышечной инъекции. Хотя аэрозольный спрей проявил себя эффективно в предотвращении колибактериоза, он не давал хороших результатов, когда инфекция уже приобрела системный характер. Внутримышечная инъекция бактериофага оказалась очень эффективным методом борьбы с колибактериозом у цыплят. Авторы также обнаружили, что многократное введение бактериофага внутримышечно приводит к лучшему терапевтическому эффекту, чем однократное введение [24, 25]. Интересные результаты эффективного применения бактериофагов против колибактериоза были получены на модели однодневных цыплят [23].

Исследование возможностей бактериофагов в терапии в настоящее время необходимо на современном уровне знаний. Способы применения бактериофагов при этом могут различаться, так как эффективность каждого фага или коктейля фагов сильно зависит от конкретной системы взаимоотношений фага и его хозяина.

Научные исследования последних десятилетий показывают существенный прогресс в изучении способов и схем контроля таких заболеваний как колибактериоз и кампилобактериоз у птиц с помощью бактериофагов. В настоящее время именно эти бактерии (а также сальмонеллы) наносят основной урон птицеводству и, возможно, фаги

станут весьма эффективным средством в условиях распространения штаммов патогенных бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам, и ограничения использования антибиотиков со стороны регулирующих органов.

Список литературы.

1. Гамалея Н.Ф. Бактериолизины ферменты, разрушающие бактерии. Русский архив патологии, клинической медицины и бактериологии. - 1898. - № 6. - С. 607-613.
2. Twort F. An investigation of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 2, 1241–1243 (1915).
3. D’Herelle F. [On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli.] *Comptes. Rendus. Acad. Sci.* 165, 373–375 (1917).
4. Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 128, 307–318 (1982).
5. Smith HW, Huggins MB. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2659–2675 (1983).
6. Sulakvelidze, A., and P. Barrow. Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335-380. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
7. Sulakvelidze, A., and E. Kutter. Bacteriophage therapy in humans, p. 381-436. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
8. El-Shibiny A, Scott A, Timms A, Metawea Y, Connerton P, Connerton I. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J Food Prot.* 2009 Apr;72(4):733-40.
9. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):6554-63. PMID: 16269681
10. Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, Azeredo J. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol.* 2010
11. Carvalho C, Susano M, Fernandes E, Santos S, Gannon B, Nicolau A, Gibbs P, Teixeira P, Azeredo J. Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains. *Lett Appl Microbiol.* 2010 Feb;50(2):192-7.
12. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol.* 2005 Aug 30;109(3-4):275-83.
13. Jens A. Hammerl, Claudia Jaackel, Thomas Alter, Pawel Janzcyk, Kerstin Stingl, Marie Theres Knuver, Stefan Hertwig (2014) Reduction of *Campylobacter jejuni* in Broiler Chicken by Successive Application of Group II and Group III Phages DOI:10.1371/journal.pone.0114785 9.12. 2014
14. Яковлев С.С. Эпизоотическая ситуация в птицеводстве России. *Ветеринария.* 2000. - №9. - С. 3-4.
15. Яременко Н.А., Яковлев С.С. Задачи по созданию эпизоотического благополучия птицеводства России. *Ветеринария.* 1998. - №12. - С. 3-7.

16. Венгеренко, Л.А. Эпизоотическое состояние на российских птицеводческих предприятиях. Ветеринарный консультант. 2003. - № 7. - С. 13-17.
17. Виноходов, В.О. Биотехнология профилактики колибактериоза птиц СПб., 2000. - С. 598.
18. Борисенкова, А.Н. Проблемы бактериальных болезней птиц в промышленном птицеводстве / Юбилейный сборник РАСХН, посвященный 190-летию ветеринарного образования в России и 100-летию ветеринарной науки. М., 1998,- С. 42-44.
19. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. Бактериальные болезни птиц, вызываемые зоопатогенными и эпидемиологически опасными микроорганизмами / Материалы Всероссийского ветеринарно конгресса. Москва, 2004. - С. 34-37.
20. Борисенкова А.Н., Рождественская Т.Н., Новикова О.Б. Методика выделения кампилобактерий и другой микрофлоры из групповых проб помета / . СПб., 2003. - С. 25.
21. Тараканов Б.В., Николичева Т.А. Новые препараты для ветеринарии / Ветеринария. 2000. - №7. - С. 45-50.
22. El-Gohary FA, Huff WE, Huff GR, Rath NC, Zhou ZY, Donoghue AM. Environmental augmentation with bacteriophage prevents colibacillosis in broiler chickens. *Poult Sci.* 2014 Nov;93(11):2788-92. doi: 10.3382/ps.2014-04282. PubMed PMID: 25214555.
23. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Method of administration affects the ability of bacteriophage to prevent colibacillosis in 1-day-old broiler chickens. *Poult Sci.* 2013 Apr;92(4):930-4..
24. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis.*2003 Oct-Dec;47(4):1399-405.
25. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult Sci.* 2003 Jul;82(7):1108-12.
26. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poult Sci.*2002 Oct;81(10):1486-91.
27. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Xie H, Moore PA Jr, Donoghue AM. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poult Sci.* 2002 Apr;81(4):437-41.
28. Summers, W. C. Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven, CT: Yale University Press, 1999. 230 p.
29. Newell, D.G., Elvers, K.T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Gittins, J., Stern, N.J., Davies, R., Connerton, I., Pearson, D., Salvat, G., Allen, V.M., (2011). Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8605–8614.

References

1. Gamaleja N.F. Bakterioliziny fermenty, razrushajushhie bakterii. *Russkij arhiv patologii, klinicheskoi mediciny i bakteriologii.* - 1898. - № 6. -S. 607-613. [In Russian]
2. Twort F. An investigation of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 2, 1241–1243 (1915).
3. D'Herelle F. [On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli.] *Comptes. Rendus. Acad. Sci.*165, 373–375 (1917).
4. Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 128, 307–318 (1982).

5. Smith HW, Huggins MB. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2659–2675 (1983).
6. Sulakvelidze, A., and P. Barrow. Phage therapy in animals and agribusiness, p. 335-380. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
7. Sulakvelidze, A., and E. Kutter. Bacteriophage therapy in humans, p. 381-436. In E. Kutter and A. Sulakvelidze (ed.), *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2005. 513 p.
8. El-Shibiny A, Scott A, Timms A, Metawea Y, Connerton P, Connerton I. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J Food Prot.* 2009 Apr;72(4):733-40.
9. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):6554-63. PMID: 16269681
10. Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, Azeredo J. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiol.* 2010
11. Carvalho C, Susano M, Fernandes E, Santos S, Gannon B, Nicolau A, Gibbs P, Teixeira P, Azeredo J. Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains. *Lett Appl Microbiol.* 2010 Feb;50(2):192-7.
12. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol.* 2005 Aug 30;109(3-4):275-83.
13. Jens A. Hammerl, Claudia Jaackel, Thomas Alter, Pawel Janzcyk, Kerstin Stingl, Marie Theres Knuver, Stefan Hertwig (2014) Reduction of *Campylobacter jejuni* in Broiler Chicken by Successive Application of Group II and Group III Phages DOI:10.1371/journal.pone.0114785 9.12. 2014
14. Jakovlev S.S. Jepizooticheskaja situacija v pticevodstve Rossii. *Veterinarija.* 2000. - №9. - S. 3-4. [In Russian]
15. Jaremenko N.A., Jakovlev S.S. Zadachi po sozdaniju jepizooticheskogo blagopoluchija pticevodstva Rossii. *Veterinarija.* 1998. - №12. - S. 3-7. [In Russian]
16. Vengerenko, L.A. Jepizooticheskoe sostojanie na rossijskih pticevodcheskih predpriyatijah. *Veterinarnyj konsult'ant.* 2003. - № 7. - S. 13-17. [In Russian]
17. Vinohodov, V.O. Biotehnologija profilaktiki kolibakterioza ptic SPb., 2000. - S. 598. [In Russian]
18. Borisenkova, A.N. Problemy bakterial'nyh boleznej ptic v promyshlennom pticevodstve / Jubilejnyj sbornik RASHN, posvjashhennyj 190-letiju veterinarnogo obrazovanija v Rossii i 100-letiju veterinarnoj nauki. M., 1998,- S. 42-44. [In Russian]
19. Borisenkova A.N., Rozhdestvenskaja T.N., Novikova O.B. Bakterial'nye bolezni ptic, vyzyvaemye zoopatogennymi i jepidemiologieski opasnymi mikroorganizmami / Materialy Vsrossijskogo veterinarno kongressa. Moskva, 2004. - S. 34-37. [In Russian]
20. Borisenkova A.N., Rozhdestvenskaja T.N., Novikova O.B. Metodika vydelenija kampilobakterij i drugoj mikroflory iz gruppovyh prob pometa / . SPb., 2003. - S. 25. [In Russian]
21. Tarakanov B.V., Nikolicheva T.A. Novye preparaty dlja veterinarii / *Veterinarija.* 2000. - №7. - S. 45-50. [In Russian]
22. El-Gohary FA, Huff WE, Huff GR, Rath NC, Zhou ZY, Donoghue AM. Environmental

- augmentation with bacteriophage prevents colibacillosis in broiler chickens. *Poult Sci.* 2014 Nov;93(11):2788-92. doi: 10.3382/ps.2014-04282. PubMed PMID: 25214555.
23. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Method of administration affects the ability of bacteriophage to prevent colibacillosis in 1-day-old broiler chickens. *Poult Sci.* 2013 Apr;92(4):930-4..
24. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 2003 Oct-Dec;47(4):1399-405.
25. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult Sci.* 2003 Jul;82(7):1108-12.
26. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poult Sci.* 2002 Oct;81(10):1486-91.
27. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Xie H, Moore PA Jr, Donoghue AM. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poult Sci.* 2002 Apr;81(4):437-41.
28. Summers, W. C. Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven, CT: Yale University Press, 1999. 230 p.
29. Newell, D.G., Elvers, K.T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Gittins, J., Stern, N.J., Davies, R., Connerton, I., Pearson, D., Salvat, G., Allen, V.M., (2011). Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8605–8614.