

мл суточной культуры, все быстро перемешивали и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности агара. Для получения четких результатов чашки необходимо ставить на ровную горизонтальную поверхность во избежания стекания агара в сторону. Чашки для затвердевания агара оставляли на столе на 1 - 1,5 часа, после чего инкубировали в термостате при температуре 37°C. Параллельно ставили контроль чистоты исследуемого материала на бактериальную загрязненность (в 2,5 мл МПА добавляли 1 мл материала и 0,2 мл МПБ), и контроль культуры (в 2,5 мл МПА вносили 1 мл МПБ и 0,2 мл культуры). Наличие негативных колоний на опытных чашках говорит о присутствии бактериофага в исследуемом материале. Результаты учитывали на следующий день. Далее мы отщипывали бактериологической петлей негативную колонию, помещали ее в пробирку со стерильным МПБ (4,5 мл), добавляли 0,2 мл суточной культуры и инкубировали при температуре 37°C. Оптимальное время инкубации бактериофагов рода *Klebsiella* - 4 часа, что связано с характером роста культур. После чего сравнивали мутность опытной пробирки с контролем (в 4,5 мл МПБ добавляли 0,2 мл культуры). Просветление опытной пробирки свидетельствовало о лизисе бактериальных клеток клебсиелл бактериофагом. Опытные пробирки прогревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 минут. Затем мы проводили пассажи (вносили 0,2 мл фаголизата и 0,2 мл суточной культуры в 4,5 мл МПБ, выдерживали в термостате при 37°C, 4-6 часов), для повышения активности фага, добиваясь абсолютной прозрачности опытных пробирок после инкубации фага с культурой по сравнению с контролем.

В результате проведенных исследований нами были выделены 6 бактериофагов, которые лизировали эталонные штаммы бактерий рода *Klebsiella* (К.р. 4463, К.р. 265, К.р. у).

Литература

1. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М., 1961.
2. Красноголовец В.Н., Киселёва Б.С. Клебсиеллёзные инфекции. – М., 1996. – 256с.

УДК 619 : 579

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЦИТРОБАКТЕРНОГО БАКТЕРИОФАГА

С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Л.П. Пульчеровская
А.П. Пономарев (Всероссийский научно-исследовательский институт
защиты животных)

Многочисленные литературные данные отечественных и зарубежных исследователей свидетельствуют о возрастании этиологической роли патогенных штаммов рода *Citrobacter* в патологии животных и человека.

Бактериофаги патогенных микроорганизмов привлекают к себе внимание микробиологов как возможный материал для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

О фагах цитробактера до 80-х годов имелись лишь отрывочные сведения. Более подробно в нашей стране они были изучены и описаны Т.А. Хакешевой с соавт. (1981, 1982, 1983, 1984, 1985).

Одной из важных характеристик бактериофагов являются морфологические признаки. Результаты электронной микроскопии, проведенные авторами, показали, что выделенные ими фаги по морфологии фаговых корпускул принадлежали к I группе, по D.Reanney и H.W.Askermann (1982) или морфологической группе V, по А.С. Тихоненко (1968). Корпускулы фагов имели головку гексагональной формы диаметром 50 ± 2 нм и прямым отростком длиной 112-152 нм с сокращающимся чехлом. По длине отростка фаги были распределены авторами на две группы (с коротким и длинным).

Задачей наших исследований явилось изучение морфологии специфического бактериофага, лизирующего патогенных представителей рода *Citrobacter*.

Материалы и методы исследований

Электронно-микроскопические исследования проводили во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты животных. В качестве исследуемого материала использовали лизат бульонной культуры цитробактера фагом Cit 502. Титр бактериофага был равен 2.3×10^9 фаговых корпускул в 1 мл среды (по Грациа).

Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкосортного центрифугирования. В процессе центрифугирования вирусосодержащей суспензии происходит образование новой фазы – осадка из белковых макромолекул. захват осадком вирусных частиц которые сами по себе в данных условиях осадков не образуют, характеризуется как метод концентрирования за счет соосаждения.

С этой целью суспензии фага в объеме 1 мл предварительно осветляли на центрифуге при 500 g течение 10 мин. затем надосадочную водную фазу повторно центрифугировали при 2000 g в течение 30 мин. Из пробирки полностью сливали жидкость, а образовавшийся осадок ресуспендировали в 30-50 мкл буферного раствора pH 7,3-7,5. Вирусные частицы, соосаждаясь с белковыми макромолекулами, в данном режиме центрифугирования образуют концентрированную суспензию в 10-20 раз. Данная методика отработана для работы с вирусами животных и успешно применяется при подготовке препаратов для электронной микроскопии (Пономарев А.П., Андреева О.Г., Артамонова Т.Н., 2002).

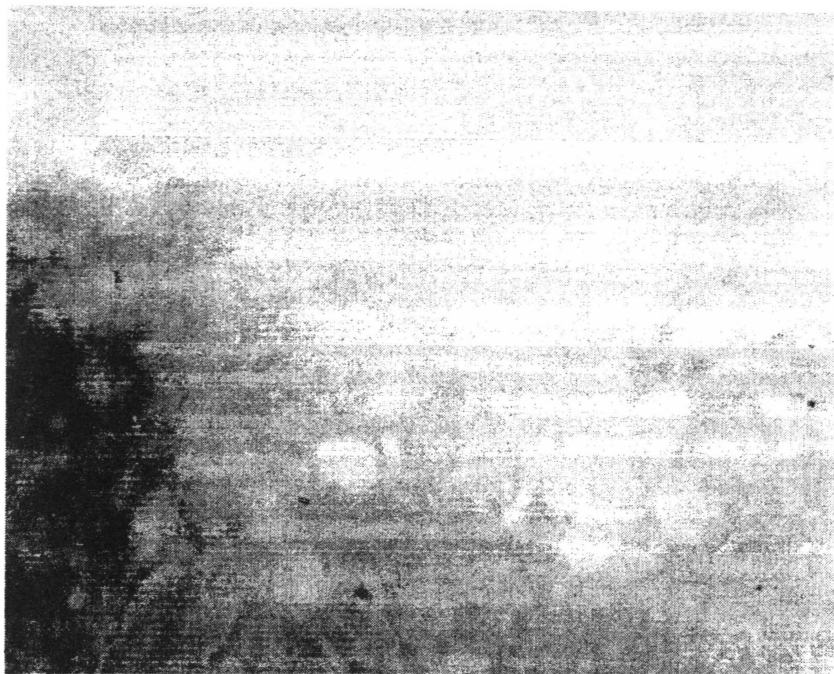
Для электронно-микроскопических исследований вирусные препараты наносили на поддерживающие угольно-парлодионовые пленки-подложки. Контрастирование варионов проводили с использованием 4 % раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 6,8. Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100B (Япония). Размеры варионов определяли на измерительном микроскопе МИР-12т непосредственно с негативных фотопластинок.

Результаты исследований

Результаты проведенных исследований изображены на микрофотографиях (фото 1 и 2), на которых видно, что изучаемый бактериофаг имеет корпускулы, состоящие из головки в форме растянутого многогранника с отростком. У основной массы вирионов чехол находится в растянутом состоянии, что характерно для интактных частиц. Чехол отростка на всем протяжении прямой и имеет цилиндрическую форму. Вирусные частицы имеют следующие размеры: диаметр головки 100 нм и длина отростка - 135 нм. Соотношение высоты головки к ее диаметру равно 1,28.



Фото 1 Корпускулы бактериофага СИ 502 и разрушенная клетка бактерий(увеличение в 87 000 раз)



**Фото 2 Морфология вирусных корпускул бактериофага Си: 502.
(увеличение в 87000раз)**

Выводы

Вирусные частицы выделенного нами бактериофага имеют форму аналогичную фагам, изученным Т.А. Хакешевой с соавт. (1985), хотя диаметр голов-си у фага Cit 502 в два раза больше.

Таким образом, в соответствии с морфологическими параметрами изучаемый нами фаг Cit 502, согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов, относится к семейству Myoviride (F.A. Murphy и др., 1995), а по классификации А.С.Тихоненко - к V морфологической группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению» (А.С. Тихоненко, 1968).

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского). – М., 1961. – 521с.
2. Анцупова А.С. Трофимова Н.М., Елифанова Н.В., Троицкая М.В. Электронно-микроскопическая диагностика вирусных заболеваний.// Вопросы вирусологии. 1984.- №3.

3. Белянко Л.В. Электронная микроскопия - как экспресс-метод диагностики вирусных гастроэнтеритов новорожденных телят и поросят. // Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка сельскохозяйственных животных. -Минск, 1990.
4. Бритова С.В., Каврук Л.С. Смешанная кишечная инфекция молодняка сельскохозяйственных животных, протекающая с участием *Morganella morganii*. // Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней общих для человека и животных. / Материалы Всесоюзной конференции. - Львов. -1988.-С.343-344.
5. Гайдамович С.Я. Классификация вирусов.// Общая и частная вирусология. -1982. -Т.1. -С.26-60.
6. Кузнецов В.И., Саненко В.И., Бахарева Л.П. Этиологическая структура острых кишечных инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. // Лабораторное дело. -1991. -№4. с.62-64.
7. Пономарев А.П., Андреева О.Г., Артамонова Т.Н. Электронно-микроскопическое выявление вирусов животных в неконцентрированных вирусосодержащих суспензиях // Вестник РАСХН 2002. - №2.-с. 74-77.
8. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. // М., Наука. - 1968. -153 с.
9. Murphy F.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. // Springer Verlag Wien New York, 1995. - 586 с.

УДК 619:579

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PROTEUS*, ИЛИ ПРОТЕКАЮЩИХ С ИХ УЧАСТИЕМ

Н.А. ФЕОКТИСТОВА, Д.А.ВАСИЛЬЕВ, С.Н.ЗОЛОТУХИН

Энтеробактерии рода *Proteus* привлекают к себе исследователей как возбудители внутрибольничных инфекций, энтеритов у детей и взрослых людей, воспалительных процессов мочевыводящих путей, раневых инфекций, послеоперационных и ожоговых осложнений, сепсиса, дисбактериоза, токсикоинфекций и др.

Протеи вызывают маститы, эндометриты, раневые инфекции и желудочно-кишечные заболевания у животных.

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременной диагностики болезни, поэтому усовершенствованию методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами, уделяется большое внимание.

Лабораторная диагностика направлена на обнаружение возбудителя болезни в том или ином патологическом материале и может быть при-