

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

А. Фуныгин - 5 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель – ассистент Н.П. Катмакова

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии

Псевдотуберкулез – широко распространенная инфекция человека и животных, вызываемая *Yersinia pseudotuberculosis*. Заболевание характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и определенной цикличностью. Иерсинии способны сохраняться в условиях низкой температуры и накапливаться в различных объектах внешней среды, что и определяет эпидемиологическую и эпизоотологическую значимость псевдотуберкулезных бактерий. [8, 9].

Основная часть *Y.pseudotuberculosis*, циркулирующих в России – это высоковирулентные штаммы, продуцирующие суперантиген, который вызывает у людей генерализованую инфекцию с характерными клиническими симптомами (лихорадка, сыпь, артралгии, увеличение печени и селезенки и т.д.) [6]. Животные и птицы являются скрытыми бактерионосителями инфекции.

Использование для диагностики псевдотуберкулеза современных лабораторных методов (тест-системы с использованием моноклональных антител к *Y.pseudotuberculosis*, метод иммуноблотинга, ПЦР) сдерживается высокой стоимостью технического оборудования и необходимостью создания в лабораториях определенных, постоянно поддерживаемых условий. Разработка более простых и недорогих в использовании методов индикации возбудителя является актуальной задачей многих специалистов.

Бактериофаги давно применяются в лабораторно-диагностической практике для идентификации и фаготипирования бактерий, а также ускоренной индикации возбудителей бактериальных инфекций в различных субстратах. Методы фагодиагностики являются высокочувствительными, специфичными, позволяют в достаточно краткие сроки обнаружить возбудитель заболевания. [1, 2, 7]. В ветеринарной практике для ускоренной индикации возбудителей некоторых бактериальных инфекций в различных субстратах предложены индикаторные бактериофаги [4, 5].

В настоящее время практическое применение псевдотуберкулезных фагов в ветеринарии является малоизученным, поэтому возникает необходимость разработки схемы для индикации бактерий вида *Y.pseudotuberculosis* в объектах внешней среды с помощью специфических бактериофагов.

Цель исследований – освоить методику выделения фагов бактерий вида *Y.pseudotuberculosis*.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использовали сточные воды хозяйств Ульяновской области. Индикаторными культурами служили штаммы бактерий вида *Y.pseudotuberculosis*.

Необходимые питательные среды: мясопептонный бульон, 0,7 %, 1,5% мясопептонный агар.

Для проведения опыта использовали 18-часовые бульонные культуры бактерий вида *Y.pseudotuberculosis*, которые получали методом культивирования на мясопептонном бульоне в термостате при 37 °С в течение 18 часов.

В колбу с 200 мл стерильного бульона вносили исследуемый материал в объеме 50 мл, добавляли по 1,0 мл 18-часовых культур *Y.pseudotuberculosis*. Содержимое колбы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 – 48 часов, после чего фильтровали. Исследуемый фильтрат в объеме 10 мл переносили в две стерильные пробирки. Для инактивации посторонней микрофлоры содержимое пробирки № 1 обрабатывали хлороформом в разведении 1:10, материал в пробирке № 2 прогревали на водяной бане в течение 30 мин при температуре 58 – 60 °С.

Выделение бактериофагов проводили методом агаровых слоев [3].

Для этого 1,5 % мясопептонный агар разливали в чашки Петри в количестве 25 – 30 мл. В целях подавления грамположительной микрофлоры в колбу с агаром добавляли раствор генцианвиолета. Чашки подсушивали в термостате при 37 °С в течение нескольких часов. В пробирку с 2,5 мл 0,7 % мясопептонного агара, заранее расплавленного и остуженного до 45 – 47 °С, вносили по 1,0 мл исследуемого фильтрата и 0,1 – 0,2 мл 18-часовой культуры бактерий *Y.pseudotuberculosis*. Содержимое пробирок быстро перемешивали и выливали на поверхность агара в чашках. После застывания среды чашки переворачивали и ставили в термостат при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 12 – 18 часов. Наличие прозрачных пятен на газоне роста культуры указывало на присутствие бактериофага.

При положительном результате негативные колонии фага или участок лизиса отвивали в пробирку с бульоном, добавляли 0,2 мл индикаторной культуры бактерий *Y.pseudotuberculosis*. Засеянные пробирки ставили в термостат при 37°С на 4 – 6 часов. Одновременно ставили контроль – пробирки с бульоном и культурой без фага. После просветления бульона в опытной пробирке и помутнения в контроле, фаголизат обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10, надсадок переносили в стерильную пробирку.

Повышение литической активности выделенных фагов проводили путем многократного пассирования на индикаторных культурах с последующим пересевом типичных для каждого изолята негативных колоний.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований выделено 3 штамма бактериофагов *Y.pseudotuberculosis*, устойчивых к обработке хлороформом, образующих четкие, прозрачные негативные колонии, диаметром от 2,0 до 4,5 мм.

Выводы. Возможность использования выделенных и селекционированных фагов для индикации бактерий вида *Y.pseudotuberculosis* будет определяться дальнейшим изучением их биологических свойств.

Литература

1. Бакулов И.А., Кольпикова Т.И., Васильев Д.А., Меркулов А.В., Котляров В.М. Практическое применение листериозных фагов: Учебное пособие. – Ульяновск, 1998, 66 с.
2. Габрилович И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* // ЖМЭИ, 1992, № 6, с. 10-12.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – 297 с.
4. Золотухин С.Н., Коритняк Б.М. и др. Методические рекомендации по ускоренной идентификации энтеробактерий вида *Y. enterocolitica* с применением специфического бактериофага. – Москва, 2006.
5. Золотухин С.Н., Бульканова Е.А. и др. Методические рекомендации по ускоренной идентификации энтеробактерий рода *Klebsiella* с применением специфических бактериофагов. – Москва, 2006.
6. Кокорина Г.И., Ценева Г.Я., Воскресенская Е.А. Сравнительная оценка вирулентности *Y. pseudotuberculosis* с разным набором факторов патогенности в опытах *in vivo*. Инфекции, обусловленные иерсиниями // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции. – СПб. НИИЭМ им. Пастера, 2006.-153 с.
7. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978, 88 с.
8. Учайкин В.Ф., Гордеец А.В., Бениова С.Н. Иерсиниозы у детей. М.: "ГЭОТАР-Медиа", 2008.- 143 с.
9. Ющук Н.Д., Ценева Г.Я., Кареткина Г.Н., Бродов Л.Е. Иерсиниозы. – М.: Медицина, 2003, 208 с.: ил. – ISBN 5-225-04652-5.

**ВЫДЕЛЕНИЕ ФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА PROVIDENCIA ИЗ
ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО
МАТЕРИАЛА**

Д.Ю. Акимов - 3 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель: ассистент Н.Г. Барт

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии

Бактерии рода *Providencia* относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. Бактерии данного рода ранее относились к одному из видов рода *Proteus*. Самостоятельное название род *Providencia* он получил лишь в 1963 году на основе Международной классификации *Enterobacteriaceae*, в которой входящие в него бактерии группы *Proteus* – *Providencia*, так же, как и в классификационных схемах Ф.Кауфмана 1959 и 1963 гг., подразделялись на 4 рода: *Proteus*, *Morganella*, *Retgerella*, и *Providencia*.

Позднее таксономическое положение некоторых представителей группы *Proteus* – *Providencia* было пересмотрено с включением в род *Providencia* нескольких видов бактерий.

В 9-ом издании «Определителя бактерий Берджи» (1994) род *Providencia* представлен 5 видами: *P.agalifaciens*, *P.rettgeri*, *P.stuartii*, *P.heimbachae*, *P.rustiginii*, отличающиеся друг от друга некоторыми биохимическими свойствами.

Бактерии рода *Providencia* выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Некоторые штаммы, вероятно входят в состав нормальной микрофлоры кишечника. Однако встречаются и патогенные