

8. – P. 4519 – 4526.

6. Clokie, M.R.J. Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions / M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski. – 2009, Humana Press. – 301 p.

7. Guenther, S. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses / S. Guenther, M.J. Loessner // Bacteriophage: Landes Bioscience. – 2011. – P. 94 – 100.

8. Loessner, M.J. Bacteriophage typing of *Listeria* species / M.J. Loessner, M. Busse // Appl. and Environ. Microbiol. – 1990. – 56, N 6. – P. 1912 – 1918.

9. McLauchlin, J. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967 – 1984; the use of serotyping and phage typing / J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor // J. Med. Microbiol. – 1986. – 22. – P. 367 – 377.

10. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // J. gen. Microbiol. – 1961. – 25, N 2. – P. 241 – 248.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES *LISTERIA MONOCYTOGENES*

*Kovaleva E.N., Vasiliev D.A., Suldina E.V., Imamov M.A.*

**Keywords:** *Listeria monocytogenes, the bacteriophage, food raw materials, contamination.*

*The paper discusses aspects of contamination of food products and raw materials bacterium *Listeria monocytogenes*. As a means of inactivating phages and suggested the technique of their selection by inducing factors of the lysogenic cultures. Identified some of the biological properties of the isolate.*

УДК 578.81:579.67

## РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭНТЕРОКОККОВЫХ ФАГОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

*Ковалева Е.Н., кандидат биологических наук, доцент, [elkov@pochta.ru](mailto:elkov@pochta.ru)*

*Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор*

*тел. 8(8422) 55-95-47, [fvn.zol@yandex.ru](mailto:fvn.zol@yandex.ru)*

*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

**Ключевые слова:** *биопрепарат, бактериофаг, *E.faecalis*, детекция.*

*В статье рассматриваются технологические параметры (время пассажа, множественность инфекции) создания биопрепарата на основе выделенных и изученных энтерококковых бактериофагов с целью детекции бактерий вида *E.faecalis*.*

Энтерококки в настоящее время являются одними из самых часто встречающихся возбудителей нозокомиальных инфекций. Тем не менее, наибольшую опасность вызывает не столько широкая распространенность этих микроорганизмов, сколько их устойчивость к большому спектру антибактериальных препаратов [1, 5, 6]. Поскольку из биологического материала чаще всего выделяют *Enterococcus faecalis*, то в большинстве случаев приходится иденти-

фицировать именно этот вид [1, 7].

Благодаря специфичности действия бактериофаги используются как для определения видовой принадлежности микроорганизмов, так и для детекции бактерий в объектах внешней среды [2, 3, 7].

**Целью работы** является разработка технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата энтерококковых бактериофагов для детекции бактерий вида *E.faecalis*.

**Материалы и методы**

В работе использовали 2 энтерококковых бактериофага и референс-штамм бактерий вида *E.faecalis* - № 189 и из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина.

Изучение биологических свойств фага проводили по методам, предложенным С.Н. Золотухиным [2], Э.Каттер, А. Сулаквелидзе [3].

**Результаты исследований**

На основании полученных данных были отобраны два изолята энтерококковых фагов EF – 4 и EF – 5 для конструирования биопрепарата [4].

Опытным путем определяли оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фагов. Для этого в пробирки с 4,5 мл мясопептонного бульона добавляли по 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл изучаемого бактериофага. Параллельно ставили контроль: мясопептонный бульон, засеянный индикаторной культурой без фага. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 4, 6, 8, 10 или 12 часов. После наступления лизиса пробирки с фагами обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10. Литическую активность полученных фаголизатов исследовали методами Аппельмана и Грация (табл. 1).

**Таблица 1 – Зависимость активности фагов от времени пассажа**

Фаги	Вариант	Время пассажа, часов	Литическая активность	
			по методу Аппельмана	по методу Грация
EF – 4	1	4	10 <sup>-9</sup>	2 x 10 <sup>9</sup>
	2	6	10 <sup>-10</sup>	2 x 10 <sup>10</sup>
	3	8	10 <sup>-9</sup>	4 x 10 <sup>9</sup>
	4	10	10 <sup>-9</sup>	3 x 10 <sup>9</sup>
	5	12	10 <sup>-9</sup>	3 x 10 <sup>9</sup>
EF – 5	1	4	10 <sup>-8</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>
	2	6	10 <sup>-10</sup>	1 x 10 <sup>10</sup>
	3	8	10 <sup>-10</sup>	1 x 10 <sup>10</sup>
	4	10	10 <sup>-9</sup>	3 x 10 <sup>9</sup>
	5	12	10 <sup>-9</sup>	2 x 10 <sup>9</sup>

Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 37°C для фагов EF – 4 и EF – 5 составляет 6 часов.

Опытным путем определяли, при каком варианте множественности инфекции происходит максимальное увеличение титра бактериофага в лизате. Оптимальное соотношение между количеством фага и культуры составляет 1:3, активность при этом от 4 x 10<sup>9</sup> до 1 x 10<sup>10</sup> по методу Грация (табл. 2).

**Таблица 2 – Зависимость активности фагов от множественности инфекции**

Фаги	Вариант	Количество мл		Активность фагов, количество активных корпускул в 1 мл
		Фага	Культуры	
EF – 4	1	0,2	0,2	2 x 10 <sup>9</sup>
	2	0,2	0,4	3 x 10 <sup>9</sup>
	3	0,2	0,6	4 x 10 <sup>9</sup>
	4	0,2	0,8	3 x 10 <sup>9</sup>
	5	0,2	1,0	2 x 10 <sup>9</sup>
EF – 5	1	0,2	0,2	2 x 10 <sup>9</sup>
	2	0,2	0,4	3 x 10 <sup>9</sup>
	3	0,2	0,6	1 x 10 <sup>10</sup>
	4	0,2	0,8	2 x 10 <sup>9</sup>
	5	0,2	1,0	2 x 10 <sup>9</sup>

Для приготовления индикаторных фагов использовали фаголизаты EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА после 5 пассажей. В качестве индикаторной культуры для обоих бактериофагов использовали штамм *E.faecalis* № 189.

Из полученного объема отбирали пробу каждого фага по 5 мл для определения чистоты физических свойств, титра фага по отношению к эталонной культуре, спектра литической активности и специфичности. Исследования показали эффективность применения бактериофагов EF – 4 и EF – 5 для детекции бактерий вида *E.faecalis*.

### **Выводы**

Таким образом, оптимальными технологическими параметрами для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью являются: соотношение количества фаговых корпускул к количеству бактериальных клеток индикаторного штамма бактерий вида *E.faecalis* 1:3, время инкубации при температуре 37°C – 6 часов. Для освобождения фаголизатов от жизнеспособных бактерий необходимо применение хлороформа (соотношение 1:10 в течение 30 минут).

### **Библиографический список**

1. Дехнич, А.В. Современные методы идентификации энтерококков / А.В. Дехнич, Р.С. Козлов, О.У. Стецюк // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – т. 41. – № 3. – С.32 – 39.
2. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
3. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
4. Ковалева, Е.Н. Биопрепарат энтерококковых бактериофагов / Е.Н. Ковалева // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых «Роль молодых ученых в развитии АПК». – М., 2011. – С. 165 – 169.
5. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin / E. Hershberger [et al.] // J. of Antimicrob. Chemother. – 2005. – 55, № 1. – P. 127 – 130.
6. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis* / Sh.M. McBride [et al.] // J. of Bacteriol. – 2009. – 191, № 10. – P. 3392 – 3402.

7. Identification and analysis of recombinering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages / S. Datta [et al.] // PNAS. – 2008. – 105, № 5. – P. 1626 – 1631.

## THE DEVELOPMENT OF BIOPREPARATION BASED OF THE ENTEROCOCCAL PHAGES TO DETECT ENTEROCOCCUS FAECALIS

*Kovaleva E.N., Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A.*

**Keywords:** *biopreparation, bacteriophage, E.faecalis, detection.*

*The article deals with the technological parameters (time of the passage, the multiplicity of the infection) the biopreparation based on the isolation and study of the enterococcal bacteriophages with the purpose of the detecting bacterium E.faecalis.*

УДК 615.453.6/615.014.21/581.81

## РАЗРАБОТКА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНЫХ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

*Ковязина Н.А., кандидат фармацевтических наук*

*Казьянин А.В., доктор медицинских наук, профессор*

*Николаева А.М., доктор биологических наук*

*Функнер Е.В., кандидат медицинских наук*

*Филиал ФГУП «НПО Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед»,*

*г.Пермь.*

*тел. (342)262-32-75, a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru*

**Ключевые слова:** *бактериофаг, биодоступность, капсулы, конструирование, литическая активность, таблетки, фармакокинетика.*

*Статья посвящена разработке твердых лекарственных форм бактериофагов. Выявлена высокая биодоступность оригинального состава таблеток и капсул в сравнении с жидким препаратом. В результате проведенных исследований разработан алгоритм конструирования твердых лекарственных форм бактериофагов: сумма предложенных конструктивных подходов и технологических схем позволит расширить ассортимент отечественных, высокоэффективных, экологически безопасных антибактериальных препаратов.*

**Введение.** В условиях возрастания антибиотикорезистентности микроорганизмов бактериофаги начинают занимать все большее место в лечебной практике [2]. Совершенствование способов получения бактериофагов, особенно выпуск их поливалентных и комбинированных разновидностей, способствует существенному расширению диапазона их литической активности и стимулирует разработку разнообразных лекарственных форм. Однако, не смотря на это, традиционной формой выпуска бактериофагов остается жидкий препарат во флаконах, за исключением таблетированных фагов кишечной группы. Переход на выпуск таблетированных