

KMV- и фKZ-подобных фагов, составляющих основное содержание терапевтических смесей.

Заключение: На основе обобщенных геномных данных создана унифицированная ПЦР-система, которая позволяет определять групповую принадлежность бактериофагов *P. aeruginosa*, выделенных *de novo* и находящихся в плохо охарактеризованных коллекциях без проведения длительных культуральных работ, электронной микроскопии и полной расшифровки последовательностей геномов. Определение таксономической принадлежности бактериофагов *P.aeruginosa* позволяет оценить возможность использования этих фагов в терапевтических препаратах

PCR SYSTEM FOR GENOTYPING OF THERAPEUTIC *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES

Miroshnikov K.A., Sykilinda N.N., Kulikov E.E., Durmanova Z.V., Tsyganova M.R., Darbeeva O.S.

Keywords: *bacteriophages, Pseudomonas aeruginosa, phage therapy, genotyping, polymerase chain reaction*

The goal of the present work is the design of PCR-testing system directed for taxonomic determination of P.aeruginosa bacteriophages for use in therapeutic preparations.

УДК 619:579

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ УСКОРЕННОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* O157 С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422) 55-95-47, fvt.zol@yandex.ru

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

Ключевые слова: *индикация, бактерии, бактериофаги, реакция нарастания титра фага.*

*Работа посвящена разработке технологических параметров по ускоренной идентификации бактерий рода *Escherichia coli* O157 с помощью реакции нарастания титра фага.*

Введение. *Escherichia coli* являются распространенными возбудителями инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта у животных и человека [5, 6].

В научной литературе имеется большое число сообщений о заболевании людей, протекающих в тяжелой форме, вызванных *E. coli* сероваром O157, который образует шиггеподобный вероцитотоксин [5, 7]. Вспышки этой инфекции, зарегистрированы во многих странах Северной и Южной Америки, Австралии, Европы, Азии, Африки и в нашей стране. Эшерихии

серогруппы O157 вызывают у молодняка животных диарею, геморрагический энтероколит и отечную болезнь у поросят [6]. Так как основным резервуаром инфекции является крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, реже лошади, олени, птица, то особенно опасны для людей пищевые продукты, полученные от этих животных [8], а также растительные продукты, выращенные на полях, куда мог вывозиться, необеззараженный навоз, от животных-носителей этого серовара эшерихий. По данным J. Tuttle (1999) в ноябре 1992 года - феврале 1993 года наблюдалась вспышка (более 700 случаев) на Западе США, вызванная *Escherichia coli* O157, связанная с гамбургерами, приготавливаемых в ресторанах. Исследования показали, что для заражения человека достаточна инфицирующая доза не превышающая 700 бактерий.

В последнее время совершенствованию методов лабораторной диагностике инфекций, вызываемых *Escherichia coli* O157 уделяется большое внимание. Современные методы иммунодиагностики (ПЦР и ИФА), предлагаемые для индикации этих бактерий, хотя и являются высокоспецифичными и чувствительными, но сложность методик, высокая стоимость оборудования и реактивов, делает их пока недоступными для большинства лабораторий. В лабораторной практике для ускоренного обнаружения микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды, а также для их быстрого типирования, предложены индикаторные бактериофаги [2, 3, 4]. Методы фагодиагностики просты в постановке, специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны.

Цель и задачи исследования. Разработка параметров и технологических приёмов по индикации и идентификации *E.coli* серогруппы O157 с помощью реакции нарастания титра фагов (РНФ). В связи с этим при выполнении работы решались следующие задачи: выделить и изучить основные биологические свойства (морфология негативных колоний, литическая активность и ее диапазон, специфичность, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу) селекционированных изолятов, активные в отношении штаммов *E. coli* O157 и разработать схему ускоренной индикации бактерий *E.coli* O157 в объектах ветеринарного надзора с помощью РНФ и использованием созданного биопрепарата.

Материалы и методы исследований

Штаммы. В работе использованы гомологичные - 6 штаммов *E. coli* O157, так и гетерологичные - 67 штаммов *E.coli*, в том числе 12 штаммов получены из лаборатории ООИ центра санэпиднадзора Ульяновской обл, 56 штаммов *E.coli* выделены нами из хозяйств Московской, Ульяновской и Самарской области. Помимо этого, при определении специфичности бактериофагов использовались 71 штамм других видов бактерий – представители родов: *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, полученные из музея кафедры. Они обладали типичными для данных культур биологическими свойствами. Объектами исследования явились фаги *E coli* O157, выделенные нами из объектов внешней среды хозяйств Ульяновской и Самарской областей.

Питательные среды и реактивы. Мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА); полужидкий агар, пептонная вода.

Приборы и оборудование. Термостаты ТС-80М-2; микроскопы МБИ-3, лупа биноклярная МБС-9, ультратермостаты УТ-15У4,2; вакуумный насос Mezmolnice (Чехословакия), центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3; аппарат ультрафиолетового облучателя крови «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8-1; холодильники бытовые, колбы мерные, пипетки пастеровские, пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 см³, чашки Петри, пробирки, стандарты мутности на 0,5 и 1,0 млрд. микробных клеток.

Методы. При работе с бактериями все посеы инкубировались при температуре 37°C в течение 24-48 часов, а при работе с бактериофагами в течение 16-20 часов. Методические указания «по методам выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки

E. coli O157:H7», МУК 4.2.992-00. Исследования фагов проводили общепринятыми методами Грания [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Для выполнения цели исследований необходимо было первоначально выделить и изучить искомый бактериофаг, поэтому первым этапом нашей работы была попытка выделить бактериофаги *E. coli* O157 из имеющихся у нас штаммов бактерий *E. coli* O157. Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к патогенным штаммам *E. coli* O157 мы разработали схему выделения и ускоренной идентификации этих микроорганизмов

При разработке оптимальных условий постановки РНФ необходимо прежде всего: а) иметь биопрепарат из штаммов бактериофагов, обладающих строгой специфичностью и наибольшим совместным спектром литической активности; в) определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение; с) определить оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Нами было установлено, что спектр активности бактериофагов Е-61 и Е-67 УГСХА равен 100%, они обладают высокой литической активностью по Аппельману 10^{-7} и по Грания от $1,5 \times 10^9$ до $3,2 \times 10^9$, а также высокой температурной устойчивостью до $80^{\circ}C$ и проявили 100 % устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут.

Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методу, предложенному Гольдфарбом [3]. Проведены эксперименты с использованием МПБ контаминированного 18 часовыми референс культурами *E. coli* O157 штамм РЛ для фага Е-61 УГСХА и *E. coli* O157 штамм №51659 для фага Е-67 УГСХА различным числом (от 101 до 1×10^5 м.к./мл). В качестве контроля использовали интактный МПБ.

Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, выросших на питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Оценку РНФ проводили согласно таблицы 1. В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения.

Таблица 1 - Показатели увеличения титра фага в РНФ

Увеличение количества частиц бактериофага в опытной по отношению к его контролю	Оценка результатов
Увеличение до 2.5 раз	Отрицательная
Увеличение до 5 раз	Сомнительная
Увеличение в 5 и более раз	Положительная

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага. По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации МПБ *E. coli* O157 в концентрации 10^3 микробных клеток эшерихий в 1 мл МПБ.

Для установления оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями, необходимо было провести эксперименты на тест- объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикатора

торной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37°C;

- в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 С.

Для изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени подращивания МПБ контаминировали бактериями *E.coli O157* в контаминации 10^1 - 10^5 м.к/м и инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 5, 16 и 24 часов. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала, контаминированного *E.coli O157*

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество эшерихий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бак. метод	РНФ	бак. метод
		часы	МПБ	МПБ	МПБ
E-61	5	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о
E-67	5	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о

Установлено, что при подращивании материала в течение 5-ти часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл. При подращивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к/мл. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество эшерихий обнаружить не удавалось. При подращивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к/мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный *E.coli O157* штаммами РЛ и №51659 от 10^1 до 10^5 м.к./мл не подращивали, а увеличивали время контакта материала с фагом до 10, 16, 24 часов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом E-61 УГСХА

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество эшерихий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подрачивания исследуемого материала	РНФ	бак. метод	РНФ	бак. метод
		часы	МПБ	МПБ	МПБ
E-61	10	10 ³	10 ⁴	22	96
	16	10 ²	н.о	32	н.о
	24	10 ²	н.о	40	н.о
E-67	10	10 ³	10 ⁴	22	96
	16	10 ²	н.о	32	н.о
	24	10 ²	н.о	40	н.о

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что увеличение времени до 10-ти часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью РНФ в концентрации 10³ м.к./мл. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 часов чувствительность реакции повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10² м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество эшерихий обнаружить не удавалось. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10² м.к./мл.. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов. Бактериологическим методом *E.coli O157* удавалось обнаружить в концентрации 10⁴ м.к./мл, на проведение исследования затрачивается 96 часов.

На основании наших данных, считаем, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удается провести индикацию бактерий в количестве 10³ в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 16-18 часов, поэтому данный режим используем в дальнейших исследованиях, хотя наиболее эффективным по чувствительности является инкубирование исследуемого материала с фагом в течение 16 часов на которое затрачивается до 32 часов.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с англ.)//М., 1961.-521 С.
2. Ганюшкин В.Я. Реакция нарастания титра фага при диагностике паратифа поросят. // Ветеринария. № 3, 1967, с. 69-71.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// М.: Медгиз., 1961, -297С.
4. Ляшенко Е.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Разработка и применение фагового биопрепарата для диагностики клебсиеллезной инфекции // Вестник ветеринарии, Том 59, Ставрополь, 2011 с. 90-92.
5. Покровский В.И., Полоцкий Ю.Е., Ющук Н.Д., Бондаренко В.М. // Журн. микробиол., № 4, 1989, с. 80-87.
6. Тугаринов О.А., М.К.Пирожков, Ю.А.Малахов Сборник научных трудов. //М.:ВГНКИ, Т.62, 2001, с. 68-75.

7. Ратинер Ю.А., Канарейкина С.К., Бондаренко В.М. // Журнал микробиологии., № 5, 1976, с. 117-121.
8. Armstrong G.L., Hollingsworth J., Morris J.G. Persistence of Escherichia coli O157:H7 in dairy cattle and the dairu farm environment. // Epidemiol. Rev., V. 18, 1996, p. 29 - 51.
9. Tuttle J., Gomez T., Doyle M.P., Wells J.G., Zhao T., Tauxe P.V., Griffin P.M. Enterohemorrhagic Escherichia coli. // Epidemiol. and Infec., - V. 122, №2, 1999, p.185-192.

THE DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THE ACCELERATED IDENTIFICATION OF BACTERIA ESCHERICHIA COLI O157 WITH THE HELP OF THE REACTION OF RISE OF TITRE OF THE PHAGE

Molofeeva N.I., Vasilev D.A., Zolotukhin S.N.

Key words: *identification, bacteria, bacteriophages, the reaction of rise of titre of the phage.*

The work is devoted to the development of technological parameters on the accelerated identification of bacteria of the genus Escherichia coli O157 with the help of the reaction of rise of titre of the phage.

УДК 619:579

ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ АЭРОМОНАД В РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ

Насибуллин И.Р., соискатель,, nir72@mail.ru
Горшков И.Г., научный сотрудник, i.o.gun@mail.ru
Куклина Н.Г., научный сотрудник, ul_nk@mail.ru
Викторов Д.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, viktorov_da@mail.ru
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
Тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru
Нафеев А.А., доктор медицинских наук, nafeev@mail.ru

Ключевые слова: *Aeromonas, бактериофаги, биопрепарат, индикация, реакция на-растания титра фага.*

Авторами выделены бактериофаги бактерий вида Aeromonas hydrophila, исследованы их основные биологические свойства и разработан диагностический биопрепарат. На основе созданного биопрепарата предложен новый метод индикации Aeromonas hydrophila с применением реакции нарастания титра фага.

Введение. Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде и известны как возбудители аэромоноза – инфекционного заболевания многих видов рыб и других гидробионтов. Аэромоноз встречается повсеместно и наносит значительный экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам. Контаминированная аэромонадами рыбная продук-