

и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск. – 2005. – С.48-51.

6. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: «Урожай», 1978. –С.20-21.

CHARACTERISTICS OF BACTERIOPHAGES OF GENUS PROVIDENCIA

Bart N.G., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A.

Key words: *bacteriophages, Providencia, lytic activity, thermoresistance, specificity.*

This article presents the results of the work on the allocation and study of some biological properties of bacteriophages Providencia. As a result of research were studied: lytic activity, thermoresistance and specificity.

УДК 578.81:579.67

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И СЕЛЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Васильева Ю.Б., кандидат ветеринарных наук, доцент
8(8422) 55-95-47, vet_yulua@mail.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Семанина Е.Н., научный сотрудник НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, выделение фагов, свойства бактериофагов

*В статье освещён вопрос по разработке методов выделения бактериофагов, активных в отношении *Bordetella bronchiseptica*. Приведены результаты собственных научных исследований биологических свойств выделенных бактериофагов: морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к действию хлороформа и изменение литической активности при хранении.*

Введение. В настоящее время отечественные и зарубежные исследователи особое внимание уделяют диагностике малоизученных инфекционных заболеваний животных и людей, характеризующихся затяжным течением, а нередко и летальным исходом. К таким инфекциям относится бордетеллёз - коклюшеподобное заболевание собак, кошек и других домашних и сельскохозяйственных животных, возбудитель которого, *Bordetella bronchiseptica*, может вызывать и у людей респираторные заболевания по типу ОРВИ [2,8,10].

Учёными НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи охарактеризованы бактериофаги микроорганизмов рода *Bordetella*, выделенные из бактерий коллекции ВОЗ и клинических штаммов, бактериофаги ВРР-1, ВМР-1 и ВІР-1 *B.bronchiseptica*. Эти данные использованы для разработки тест-систем для идентификации ДНК возбудителя коклюша и его фазовых вариантов с помощью полимеразной цепной реакции. Метод рекомендуется для диагностики коклюша у детей с симптомами затяжного кашля, а также выявления атипичных, бессимптомных форм заболе-

вания [9].

Научно-исследовательской группой НИИМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» им. П.А. Столыпина разработаны полимеразно-цепная реакция для идентификации возбудителя бордетеллёза животных и бактериологическая схема выделения *B. bronchiseptica* с применением селективно – диагностической питательной среды УГСХА BBR 57, позволяющая поставить диагноз в течение 96 часов [2,3].

Эти современные и эффективные методы диагностики также имеют и ряд недостатков в практическом применении. Для проведения генетической диагностики необходимо наличие специализированной лаборатории с дорогостоящей приборной базой и высококвалифицированными работниками. Микробиологические методы диагностики бордетеллёза достаточно трудоёмки (выделение культуры возбудителя на селективных средах, биохимическая идентификация и т.п.), дорогостоящи и малопродуктивны.

Поэтому остро встает задача создания высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики бордетеллёза не требующих больших затрат времени и труда, а также экономически выгодных.

Мы считаем, что заслуживает пристального изучения разработка методов выделения бактериофагов *B. bronchiseptica* с перспективой создания биопрепарата для диагностики бордетеллёза животных. Данное научное направление, по нашему мнению, весьма актуально, представляет научный и практический интерес.

В связи с вышесказанным целью данной научной работы явилась разработка методов выделения фагов *B. Bronchiseptica* с изучением их основных биологических свойств.

Для решения поставленной цели перед нами стояли следующие задачи:

1. Апробировать различные схемы выделения бактериофагов, активных в отношении *B. Bronchiseptica* и подобрать наиболее эффективный метод.

2. Изучить основные биологические свойства выделенных бактериофагов: морфологию негативных колоний, литическую активность и её спектр, специфичность, температурную устойчивость, устойчивость к хлороформу.

3. Провести селекцию выделенных фагов и подобрать оптимальный набор для дальнейшего конструирования на их основе нового диагностического биопрепарата.

Материалы и методы исследований. Объектами для наших исследований послужили 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica* № 1, № 7, № 214, № 22067, № 8344 и штамм *Bordetella parapertussis* № 119; 24 референс-штамма бактерий других родов (*Yersinia pseudotuberculosis* № 0630, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* № ATCC 25923, *Escherichia coli* № 4, № ATCC 25922, *Proteus mirabilis* № 1, № 523, № 491, *Salmonella typhimurium* № 82, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* № 189, *Providencia rettgeri* № 104a, № 102d, № 175, *Aeromonas hydrophila* № 01, № 02, *Pseudomonas putida* № 12633, № 901, *Enterobacter cloacae* № 1487, № 10005, *Bacillus cereus* № 2527, *Bacillus subtilis* № 6633), полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» им. П.А. Столыпина, которые, в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; 48 штаммов *B. bronchiseptica*, выделенных от собак и кошек (с клиническими проявлениями респираторных заболеваний); 8 штаммов фагов *B. bronchiseptica*.

Объекты внешней среды: сточные воды, смывы с глотки больных животных, патологический материал от больных и павших животных.

Питательные среды и реактивы: мясопептонный бульон, мясопептонный агар, среда Эндо, казеиново-угольный агар, бордетелл-агар, кровяной агар и среда Борде-Жангу, среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой, маннитом, биохимические тест-системы для ускоренной идентификации микроорганизмов, агар-агар, натрий хлорид, мочевины, перекись водорода, желатин, среда УГСХА BBR 57.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения и идентификации бактерий [4].

Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов проводили с помощью методов, предложенных М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), И.М. Габриловичем (1973), С.Н. Золотухиным (2006) [1,4,5,6,7]. Постановку РНФ для индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961) [6].

Результаты исследований и их обсуждение. На первом этапе исследований штаммов *B. bronchiseptica* на наличие профага нами установлено, что культуры без воздействия на них индуцирующего фактора не проявили лизогенных свойств. Проведено 17 опытов, без положительных результатов.

Вторым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *B. bronchiseptica* из объектов внешней среды и от животных. Всего нами исследовано 104 пробы, бактериофаги среди них не обнаружены.

В третьей серии опытов на культуры *B. bronchiseptica* воздействовали индуцирующим фактором (ультрафиолетовыми лучами).

Опыты по облучению бактерий УФЛ проводили с изменением параметров экспозиции в минутах и расстояния до объекта в см. В результате исследований по выделению профага из бактериальных клеток наиболее эффективной показала себя следующая схема:

1 день: посев газонимной суточной культуры *B. bronchiseptica* на мясопептонный агар, подсушивание в термостате 10-15 мин, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 5-7 мин. Далее инкубирование чашек Петри с обработанными бактериями в термостате при 37°C в течение суток.

2 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°C) на сутки.

3 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 0,5 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°C) на сутки.

4 день: смыв выросших колоний мясопептонным бульоном с чашек Петри, помещение в пробирку со штаммами бордетелл. Культивирование в термостате в течение суток.

5 день: обработка хлороформом 1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата в течение 15 минут, центрифугирование при 3000 об/мин – 15 мин. Снятие надосадочной жидкости в стерильную пробирку.

6 день: учет результатов. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса.

После выделения бактериофаги пассировали для повышения их литической активности. В процессе работы по выделению бактериофагов с применением УФЛ в общей сложности нами было проведено 29 экспериментов. Описанным выше методом нам удалось выделить 8 фагов *B. bronchiseptica* из 14 штаммов бактерий. 6 штаммов бактерий *B. bronchiseptica* не проявили лизогенных свойств.

Далее мы изучили биологические свойства выделенных бактериофагов.

Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и величине колоний мы разделили на два типа. К первому типу отнесли негативные колонии круглые, прозрачные, диаметром более 3 мм, с зоной неполного лизиса по периферии 0,5 – 4 мм или без неё: В.br. – 7 УГСХА, В.br. –22067 УГСХА, В.br. – 214 УГСХА. Ко второму типу причислили круглые, прозрачные или полупрозрачные колонии, с ровными краями, диаметром до 2 мм: В.br. – 1 УГСХА, В.br. – 10 УГСХА, В.br. – 11 УГСХА, В.br. – 13 УГСХА и В.br. – 8344 УГСХА.

Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от $5,3 \times 10^7$ до $4,3 \times$

10⁹. По исследованным параметрам для конструирования диагностического набора фагов отобранны наиболее активные из них: *B. bronchiseptica* - 1 УГСХА по Аппельману 10⁻⁷, по Грациа 3,1 x 10⁸ и *B. bronchiseptica* - 7 УГСХА по Аппельману 10⁻⁸, по Грациа 4,3 x 10⁹.

Для изучения спектра литического действия выделенных фагов мы использовали 53 культуры бактерий *B. bronchiseptica*.

По результатам исследований наибольшим совместным спектром литического действия обладали бактериофаги *B. bronchiseptica* - 1 УГСХА и *B. bronchiseptica* - 7 УГСХА. Они лизировали 92,5 % имеющихся штаммов.

Учитывая литическую активность и спектр литического действия бактериофагов *B. bronchiseptica* для дальнейших исследований нами было отобрано 2 фага – *B. bronchiseptica* – 1 УГСХА и *B. bronchiseptica* – 7 УГСХА.

При изучении специфичности действия исследуемых фагов *B. Bronchiseptica* в качестве гетерологичных культур использовали микроорганизмы указанные в материалах и методах. Нами было установлено, что бактериофаги *B. br.* - 1 УГСХА и *B. br.* - 7 УГСХА не вызывали лизис ни одной из испытываемых культур других видов бактерий.

В результате исследований температурной устойчивости было установлено, что прогревание фагов *B. br.* – 1 УГСХА и *B. br.* – 7 УГСХА при температуре 60°С в течении 30 минут не оказало влияния на активность фагов, бактерии погибали при данной температуре. Нагревание бактериофагов свыше 65°С приводило к потере их активности.

В результате проведенных исследований по изучению устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформом установлено, что бактерии инактивируются при 10 минутной обработке. Бактериофаги *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* - 7 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут. Наблюдалось снижение активности фагов при обработке хлороформом свыше 30 минут с 2,2 x 10⁸ до 3,2 x 10⁷ у *B.br.* – 1 УГСХА и с 2,1 x 10⁹ до 5,3 x 10⁷ у *B.br.* - 7 УГСХА по методу Грациа. Активность бактериофагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА восстанавливалась после одного пассажа.

Затем мы провели селекцию выделенных бактериофагов по основным биологическим свойствам для дальнейшего использования в конструировании диагностического биопрепарата. Отобранные фаги имели прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 0,5-4,0 мм, литическую активность более 10⁻⁶ по Аппельману, и 5,3 x 10⁷ по Грациа корпускул в 1 мл фаголизата.

Заключение. Мы рекомендуем к применению разработанный нами метод выделения фагов *B. bronchiseptica* путём многократного воздействия ультрафиолетовыми лучами на бактериальную клетку по схеме: 1 день: t = 5-7 мин; l = 1м. 2 день: t = 7-10 мин; l = 1м. 3 день: t = 7-10 мин; l = 0,5м), где t – экспозиция, l – расстояние от лампы до объекта. По данной схеме нами было выделено 8 штаммов бактериофагов *B. bronchiseptica* со следующими свойствами: литической активностью от 10⁻⁶ до 10⁻⁹ по методу Аппельмана и от 5,3 x 10⁷ до 4,3 x 10⁹ по методу Грациа, спектром литического действия от 20,8 % до 81,1%. Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к *B. Bronchiseptica*, не лизировали бактерии других видов и родов; проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в течение 30 минут и выдерживали 30 минутное нагревание при 60°С.

Проведённая селекция выделенных фагов позволила отобрать бактериофаги *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой литической активностью по Аппельману 10⁻⁷ – 10⁻⁸, по Грациа 3,1 x 10⁸ – 4,3 x 10⁹ активных корпускул в 1 мл. Результаты исследований могут быть рекомендованы для дальнейшего конструирования диагностического биопрепарата.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Васильева Ю.Б. Применение по-

лимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных. // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 230-232.

3. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 233-235.

4. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии. -Ульяновск, 1998. – 151 с.

5. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.

6. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.

7. Золотухин С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.

8. Bjornstad O.N. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Narvill // Trends Microbiol. – 2005. – N 13. – P. 355-359.

9. Karataev G.I., Lapajeva I.A., Ryabinina O.P., Mebel S. Detection of a new bacteriophage in *Bordetella*.//FEMS- symposium Pertussis. Berlin, GDR.- 1988.- p.20.

10. Mattoo S. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response / S. Mattoo, J.F. Miller, P.A. Cotter // Infect. Immun. – 2000. – N 68. – P. 2024-2033.

DEVELOPMENT OF METHODS OF ALLOCATION AND SELECTION OF BACTERIOPHAGES *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Vasileva Y.B., Vasilev D.A., Semanina E.N.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*, allocation of phages, properties of bacteriophages

*The article considers the question on the development of methods of allocation of bacteriophages, active in respect of *Bordetella bronchiseptica*. There are the results of own scientific researches of biological properties of the selected bacteriophages: morphology negative colonies, lytic activity, the spectrum of lytic action, the specificity of action, thermal stability, resistance to the action of the chloroform and the change of lytic activity during storage.*

УДК 619:616

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ УМЕРЕННЫХ И ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

*Викторов Д.А., кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,*

Тел. 9084775573, viktorov_da@mail.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

Тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор

Тел. 9272703480, fvm.zol@yandex.ru

Гринева Т.А., соискатель,