

**Библиографический список**

1. Ющук Н.Д. Иерсиниозы /Н.Д.Ющук, Г.Я.Ценева, К.Н.Кареткина и др. –М., 2003, 206с.
2. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза /Ю.В.Демина, Г.Я.Ценева, Е.А.Воскресенская и др. //Методические указания. – М., 2009, 66с.
3. Проценко С.Л. Биологические свойства возбудителя кишечного иерсиниоза из очагов чумы Кавказа и Закавказья //Автореф. дисс...канд. мед. наук. – Саратов, 1990.
4. Дарсавелидзе М.А., Капанадзе Ж.С., Чанишвили Т.Г. Биологические свойства бактериофагов, активных в отношении *Yersinia enterocolitica*//Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 2004, №6, с.10-13.
5. Адамс М. Бактериофаги: Пер. с англ. – М., 1961, 527с.
6. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М., 1968, 89с.

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF PHAGES PATHOGENIC *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AND *YERSINIA ENTEROCOLITICA***

*Makedonskaya L.D, Kudryakova T.A., Kachkina G.V., Gaevskaya N.E.*

**Key words:** *bacteriophages *Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*, detection, properties*  
*4 indicator pseudo-tubercular and 5 kischechnoiersiniozny strains are selected at application of which 12 pseudo-tubercular and 9 kischechnoiersiniozny phages are allocated. At identification of bacteriophages specificity of an anti-gene structure, distinction in morphology of negative colonies and fagovy particles, on the range of lytic activity is established. Sensitivity to phages can be used in laboratory diagnostics of strains *Y.pseudotuberculosis* u *Y.enterocolitica*.*

УДК 619:579

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОВ *ESCHERICHIA COLI* O157 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**

*Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент*

*8(8422) 55-95-47, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)*

*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор*

*8(8422) 55-95-47, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)*

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

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

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

**Ключевые слова:** *Бактерии, бактериофаги, энтеробактерии, литическая активность, специфичность.*

*Работа посвящена выделению и изучению основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Escherichia coli* O157. При проведении исследований авторами выделено 3 штамма фага и изучены их биологические свойства.*

**Введение.** В последние годы установлено, что штаммы *E. coli* серологического варианта 0157 способны вызывать у людей тяжело протекающие вспышки гастроэнтерита [7, 8, 9, 13, 14], а и у молодняка животных диареи с признаками геморрагического гастроэнтерита [11].

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременности диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики указанной инфекции уделяется большое внимание. Для бактериологической диагностики разработаны питательные среды для выделения указанного серовара эшерихий [10]. Но метод их выделения и идентификации с использованием предлагаемых сред сравнительно трудоемок, не достаточно чувствителен и требует много времени (4-5 суток). 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, для постановки этих реакций, делает их пока недоступными для большинства лабораторий. Поэтому перед нами была поставлена цель - изыскание более простого и доступного для любых лабораторий метода индикации и идентификации названных микроорганизмов.

В микробиологической практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги [3, 5, 6] Метод индикации и идентификации патогенных микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичен, не требует больших затрат времени, материалов и общедоступен.

В связи с отсутствием сообщений в научной литературе об использовании бактериофагов *E. coli* O157 возникла необходимость изыскания индикаторных эшерихиозных бактериофагов для ускоренного обнаружения серологического варианта 0157 в объектах внешней среды, патологическом материале, пищевых продуктах и кормах, а также для ускоренного типирования полевых штаммов возбудителя болезни.

**Материалы и методы исследований.** Материалом для исследований служили сточные воды, взятых из животноводческих ферм и общественных туалетов разных населенных пунктов Ульяновской и Самарской областей. Использовались бактериологические, вирусологические методы исследования. Методы выделения бактериофагов и работы с ними [1, 2, 4]. Методы селекции бактериофагов.

**Результаты исследований и их обсуждение.** На первом этапе работы целью наших исследований была разработка оптимальной схемы выделения фагов *E. coli* 0157.

В основу метода для поиска фагов положена схема, предложенная Грация, адаптированная к изучаемым видам бактерий. 1,5% МПА с генцианвиолетом накануне опыта разлили по чашкам в количестве 25-30 мл. Чашки, прикрытые стерильной бумагой, высушивали под бактерицидной лампой в течение нескольких часов, затем закрывали крышками и в перевернутом виде оставляли на ночь при комнатной температуре для полного высушивания агара в чашках, так как малейшее увлажнение искажает результаты. Предварительно разлитый в пробирку 0,7% агар в количестве 2,5 мл доводили до 46-47°C и 1 мл исследуемого фильтрата вносили в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры *E. coli*, вращая пробирку для быстрого перемешивания все быстро перемешивали и выливали на поверхность агара. В качестве индикаторной культуры использовали штаммы *E. coli* 0157.

Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности 1,5% агара, для затвердения оставляли на столе в течение 30 минут, а затем выдерживали в термостате при 37°C в течение 20-24 часов. При наличии фага на чашках обнаруживали негативные колонии или зоны лизиса.

По указанной схеме нами было исследовано 56 проб сточных вод, взятых из животноводческих ферм и общественных туалетов разных населенных пунктов Ульяновской и Самарской областей. Из трех проб было выделено 3 штамма фага, которые дифференцировали по

морфологии негативных колоний (таблица 1).

**Таблица 1 - Морфология негативных колоний фагов**

№ штамма фага	Морфология негативных колоний
№1	D=1 мм, с ровными краями, прозрачные
№2	D=1-1,5мм, с ровными краями, прозрачные
№3	D=1-2 мм, с ровными краями, прозрачные

Для селекции клонов фагов отвивали одну негативную колонию и помещали в пробирку с МПБ и индикаторной культурой эшерихий. Пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 5-6 часов, прогревали при 60°C и полученный фаголизат вновь исследовали методом агаровых слоев. Каждый штамм пассировали 7-10 раз до получения рассы колифага с однородными негативными колониями.

Селекционированные бактериофаги имели прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 1,0-2,0 мм.

Биологические свойства этих фагов были изучены по ряду показателей, в том числе активности и специфичности.

Литическую активность селекционированных фагов мы определяли на плотных и жидких питательных средах на индикаторных культурах *E.coli* по следующей методике: в ряд пробирок из нейтрального стекла одинакового диаметра наливали по 4,5 мл МПБ. В первую вносили 0,5 мл испытуемого фага. Затем делали последовательные разведения 1:10. Обычно использовали 10 пробирок. Затем во все пробирки вносили по 0,2 мл 18-часовой индикаторной бульонной культуры *E.coli* 0157, причем 11-я и 12-я пробирки являются контрольными, в первой из них находится МПБ и культура (без фага), во второй - один МПБ (контроль на стерильность). Все пробирки помещали в термостат при 37°C на 18 часов. Титр фага устанавливали по конечному разведению.

При использовании метода агаровых слоев определены качественные показатели фагов. Для опыта брали по 1 мл фага в разведениях 10<sup>6</sup> до 10<sup>10</sup> (без культуры) и вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7% агара, расплавленного и остуженного до 46-47°C, туда же вносили 0,2 мл культуры *E.coli*, содержимое пробирки перемешивали и выливали на поверхность 1,5% агара. Чашки оставляли на столе для затвердения агара, затем их выдерживали в термостате при 37°C в течение 20 часов. Активность определяли по количеству негативных колоний на газоне роста индикаторных культур.

**Таблица 2 - Результаты изучения литической активности эшерихиозных фагов**

Литическая активность	ФАГИ		
	№1	№2	№3
По Аппельману	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>
По Грациа	8x10 <sup>9</sup>	3,2x10 <sup>9</sup>	8x10 <sup>9</sup>

Для изучения специфичности фагов нами были использованы 6 штаммов бактерий *E.coli* гетерологичных серологических групп, в том числе 3 штамма, относящиеся к серогруппе O157, *Citrobacter* - 2 штамма, *M.morganii* - 2 штамма, *Klebsiella* - 1 штамм.

**Таблица 3 - Специфичность фагов**

Штаммы бактерий	Фаг №1	Фаг №2	Фаг №3
E.coli O157№1	+	+	++
E.coli O157№2	+	+	++
E.coli O157№3	+	+	++
E.coli O26	-	-	--
E.coli 0111	-	-	--
E.coli 0126	-	-	--
M.morganii	-	-	--
Citrobacter	-	-	--
Klebsiella	-	-	--

«+» полный лизис; «-» отсутствие лизиса.

**Заключение.** Анализируя результаты проведенных исследований по изучению литической активности и специфичности, селекционированные нами фаги обладают высоким спектром литической активности по Аппельману -  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ ; по Грациа – от  $3,2 \times 10^9$  до  $8 \times 10^9$  и являются специфичными по отношению к бактериям *Escherichia coli O157*. Селекционированные бактериофаги являются новыми объектами, дальнейшее изучение которых представляет определенный интерес.

#### **Библиографический список**

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с англ.)//М., 1961.-521 С.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии// Учебное пособие , Ульяновск. -1988. -45 С.
3. Ганюшкин В.Я. Обследование свиней на носительство сальмонелл и фагопрофилактика.// Вопросы ветеринарной микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Ульяновск.-1990. с. 20-28.
4. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// М.: Медгиз., 1961. -297С.
- 5.Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. Бактерии рода *Citrobacter* и их бактериофаги // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных трудов. Ульяновск. – 2000, с..53-58.
- 6.Кольпикова Т.Н., Бакулов И.А., Котляров В.М. Фаготипирование листерий. /Ветеринария. №6, 1990, с. 31-32.
7. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов.//Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии./ Материалы научной конференции ВНИИВиМ. Покров. Часть 11, 1992, с. 211-212.
8. Потапова Т.А. и др. О выделении *E. coli O157:H7* -возбудителя ОКИ с гемолитико-уремическим синдромом в Тульской области // ЖМЭИ, №5, 2000, с. 115-116.
9. Ратинер Ю.А., Бондаренко В.М.// Микробиология. №2, 1998, с.87-56.
10. Султанова З.С. и др. //ЖМЭИ , №1, 2000, с. 48-50.
11. Малов В.А., Пак С.Г.// ЖМЭИ, №2, 1996, с. 50-53.
12. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А.

Васильев [и др.] // Вестник УГСХА. – 2011. - №1(13) – С. 79-84

13. Boyce T.G., Swerdlow D.L., Griffin P.M. // New Engl. J. Med., V. 333, 1995, p. 364-368.

14. <http://www.ecdc.europa.eu>.

## BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PHAGES *ESCHERICHIA COLI* O157 TO CREATE DIAGNOSTIC PREPARATION

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

**Key words:** *Bacteria, bacteriophages, enterobacteria, lytic activity and specificity.*

*The work is devoted to the allocation and study of the basic biological properties of bacteriophages of bacteria Escherichia coli O157. During the research the authors allocated 3 strain of phage and studied their biological properties.*

УДК 578.81

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГА AP22, СПЕЦИФИЧЕСКИ ИНФИЦИРУЮЩЕГО ШИРОКИЙ СПЕКТР ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

*Попова А.В., кандидат биологических наук, [popova\\_nastya86@mail.ru](mailto:popova_nastya86@mail.ru)*

*Мякинина В.П.,*

*Богун А.Г., кандидат биологических наук, [bogun62@mail.ru](mailto:bogun62@mail.ru)*

*Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук, [nikvol@obolensk.org](mailto:nikvol@obolensk.org)*

*ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора*

**Ключевые слова:** *бактериофаг, Acinetobacter baumannii, геномный анализ.*

*Данная работа посвящена микробиологической и молекулярно-генетической характеристике вирулентного бактериофага, специфически инфицирующего и лизирующего широкий спектр клинических штаммов *A. baumannii*.*

**Введение.** Одним из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире является представитель группы неферментирующих грамотрицательных аэробных бактерий – *Acinetobacter baumannii*, который характеризуется резистентностью к большинству доступных на сегодняшний день антибиотиков, дезинфектантов, устойчивостью к УФ-облучению и высушиванию, способностью к образованию биопленок на различных биотических и абиотических поверхностях. Инфекции, вызываемые *A. baumannii*, представляют серьезную терапевтическую проблему, особенно у иммунокомпрометированных больных ожоговых отделений, отделений реанимации и интенсивной терапии, где *A. baumannii* часто становится причиной развития госпитальных пневмоний, раневых инфекций, постхирургических осложнений, бактериемий, септицемий, сепсиса (Peleg et al., 2008; Towner, 2009).

В связи с этим существует острая проблема поиска и разработки новых антибактери-