

ФАГОТИПИРОВАНИЕ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУР ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

ЧЕРЕПУШКИНА В.С., ЛИТВИНА, Л.А., АФОНЮШКИН В.Н.

Новосибирский государственный аграрный университет, Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

За последние годы эпизоотическое состояние по отношению к *Salmonella* spp нарастает как в пищевой промышленности, так и в птицеводстве и животноводстве. В данной статье рассматривается значение и роль фаготипирования для подбора эффективных фагов с целью лизирования представителей патогенных энтеробактерий, в том числе сальмонелл, наносящих значительный урон промышленному птицеводству. На основе проведенного эксперимента с различными фагами были найдены фаги, эффективно уничтожающие два штамма возбудителя сальмонеллеза, а также фаг для кишечной палочки. **Ключевые слова:** бактериофаги, общие свойства, фаготипирование, титрование фага, эксперимент с энтеробактериями, штаммы *Salmonella* spp. и *E. coli*-Tulc.

PHAGOTYPING ON THE EXAMPLE OF ENTEROBACTERIA CULTURES

CHEREPUSHKINA V.S., LITVINA, L.A., AFONYUSHKIN V.N.

Novosibirsk State Agrarian University, Siberian Federal Research Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

In recent years, the epizootic state in relation to *Salmonella* spp. has been increasing both in the food industry and in poultry farming, animal husbandry. This article discusses the importance and role of phagotyping for the selection of effective phages for the purpose of lysing representatives of pathogenic enterobacteria, including salmonella, causing significant damage to industrial poultry farming, based on the conducted experiment with various phages. Phages were found that effectively destroy two strains of the causative agent of salmonellosis, as well as a phage for *E. coli*. **Keywords:** bacteriophages, general properties, phagotyping, phage titration, experiment with enterobacteria, strains *Salmonella* spp. and *E. coli*-Tulc.

Введение. Среди различных видов энтеробактерий, многие из которых являются представителями нормальной микрофлоры толстого кишечника теплокровных, например, *E. coli*, встречаются и патогенные штаммы. Сейчас выявлены энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные, энтероадгезивные, энтерогемморагические варианты кишечной палочки, вызывающие различные патологии. Серотип O157:H7 может быть причиной тяжелых пищевых отравлений у людей и животных. По-прежнему распространены в промышленном птицеводстве и животноводстве сальмонеллы, для борьбы с которыми нужно быстрое и эффективное лечение. На фоне широко распространившейся резистентности бактерий к антибиотикам тема фаготипирования и использования бактериофагов для защиты от патогенных энтеробактерий имеет большое практическое значение для ветеринарии и медицины [1-3].

Фаготипирование – один из чувствительных методов фагодиагностики патогенных бактерий, используемый для идентификации и подразделения бактерий внутри вида или серотипа с помощью набора специфических бактериофагов. Метод используется в эпидемиологии для расшифровки связей между эпидемическими вспышками и разрозненными заболеваниями, а также в исследованиях для установления идентичности различных штаммов бактерий. Фагами типировать бактерии родов *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, и др. Фаготипирование существует для всех видов бактерий, ее реализация зависит от вариабельности рецепторов типовых фагов, особенностей генетического фонда штаммов бактерий [11].

Материалы и методы. Для работы были выбраны два штамма сальмонелл и кишечная палочка. Сальмонеллы (*Salmonella*) – систематическое положение Тип: Протеобактерии, Класс: Гамма-протеобактерии, Порядок: Enterobacterales, Семейство: *Enterobacteriaceae*, под *Salmonella*. Определение культур сальмонелл № 527, 529 проводили микробиологическим методом с подтверждением ПЦР. Грамотрицательные, факультативно-анаэробные бактерии, подвижные за счет жгутиков, расположенных по всей поверхности бактерий [8]. Кишечная палочка (*Escherichia coli*-Tulc.) – генетически модифицированная палочка, оптимальный рост этой культуры достигается в присутствии антибиотика ампициллина при температуре 37°C [4].

Для фаготипирования использовали БТН-агар, предназначенный для культивирования микроорганизмов широкого спектра. Представляет собой мелкодисперсный гомогенный, гигроскопичный,

светочувствительный порошок светло-кремового цвета фирмы Биотехновация; Натрия хлорид 0.09% , 0.7% агар для смешивания с культурами (культуры *Salmonella spp.*, № 527,529, *Ecoli –Tulc.*). Бактериофаги двух видов с условными номерами 9694 и 26313 [10].

Подготовка к фаготипированию

1. В каждую пробирку на 15 мл вносим 2 мл натрия хлорида 0.09%
2. В эти пробирки вносим испытуемые культуры бактерий(суточная культура)
3. Впробирки доливаем 0.7% агар (температура не выше 40⁰С)
4. Перемешиваем и быстро пока агар не застыл,выливаем тонким слоем стерильные чашки Петри с БТН агаром .

5. Помещаем в термостат на 60 мин. при температуре 37⁰С.

Подготовка бактериофага к фаготипированию

1.В планшет с 96 лунками вносим по 180 мкл натрия хлорида 0.09% с веру в низ по 8 лунок таких столбиков, равное количеству культур бактериофагов,в нашем случае их 2.

2. В первые лунки вносим концентрированный бактериофаг в объеме 20 мкл.

Титруем шагом 1:10; бактериофаг готов к фаготипированию

Фаготипирование

1. На чашках с БТН агаром и внесенными культурами снаружи рисуем 8 равных квадратов для обозначения нашего раститрованного бактериофага.

2 . Вносим раститрованный бактериофаг в каждый, начиная с самой низкой концентрацией к самой высокой концентрации по 3 мкл, ждем, пока впитается жидкость,ставим в термостат на 24 часа при температуре 37⁰С.

Концентрация фаговых частиц в исходном растворе высчитывается по следующей формуле: количество бляшек*10⁴степень соответствующего разведения (например, 190*3.33*100 = 1,9*10¹⁰ БОЕ/мл). Умножение на 3.33 производится из-за того, что на чашку было добавлено 3 мкл разведения, а значит количество бляшек, посчитанное на этой чашке, указывает на концентрацию фагов в 3 раза больше, чем в 1 мл данного разведения.

Результаты собственных исследований

Таблица 1 - Концентрация фаговых частиц в исходном растворе

<i>Salmonella spp.</i> , № 529,		<i>Salmonella sph.</i> , № 527,		<i>Ecoli –Tulc.</i>	
Бактериофаг 9694	Бактериофаг 26313	Бактериофаг 9694	Бактериофаг 26313	Бактериофаг 9694	Бактериофаг 26313
16 бляшек – 10 ⁻²	5 бляшек - 10 ⁻⁴	6 бляшек - 10 ⁻³	4 бляшки - 10 ⁻⁴	Более 20 бляшек 10 ⁻³	Более 20 бляшек 10 ⁻⁴
1,6*3,33*100= 5,328 *10 ⁻⁴ (БОЕ/мл).	5*3,33*100=16,65* 10 ⁻⁵ (БОЕ/мл)	6*3,33*100=19,38 *10 ⁻⁴ в(БОЕ/мл).	4*3.33*100=13,32* 10 ⁵ (БОЕ/мл)	20*3,33*100=66,6 *10 ⁵ (БОЕ/мл).	20*3,33*100=66,6 *10 ⁶ (БОЕ/мл).

Закключение. В результате нашего фаготипирования для *Salmonella spp.*, № 527, 529 и *Ecoli –Tulc.* был подобран следующий бактериофаг –26313, так как его степень лизирования показала наибольшее количество фаговых бляшек в отношении всех наших исследуемых культур. Получается, что генномодифицированная культура *Ecoli –Tulc.* Оказаласьуязвима для данного бактериофага.По мере расширения коллекций бактериофагов можно будет выявлять новые целевые патогены, расширять спектр заболеваний, при которых фаги могут применяться как в режиме монотерапии, так и в составе комплексных схем лечения.

Литература. 1. Бактериофаги – антибактериальные препараты будущего: сб. статей. – М., 2009. – 66 с. 2. «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» / Материалы международной научно-практической конференции.– Ульяновск:, ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013, т. II – 182 с. 3. Вирусология: Методические рекомендации к лабораторным занятиям / Авт.-сост. А.Н. Евтушенко, Р.А. Желдакова, О.Б. Русь, А.М. Ходосовская. – Мн.: БГУ, 2006. – 50 с.4. Дроздова, О. М., Брусина, Е. Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 5. – С. 20–24. 5. Габрилович, И. М. Основы бактериофагии. – Минск: Вышэйшая школа, 1973.

– 224 с. 6. Зинченко, А. И., Паруль, Д. А. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии. – Минск: Вышэйшая школа, 2005. – 214 с. 7. Дарбеева, О. С., Майская, Л. М., Перепанова, Т. С. Опыт использования адаптированных препаратов бактериофагов // Биопрепараты. – 2002. – № 1. – С. 13–17. 8. Основы вирусологии: учебное пособие / С. А. Павлович. – Минск: Вышэйшая школа, 2001. – 192 с. 9. Кюттер, Э. Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики / Э. Кюттер. – СПб.: НИИ детских инфекций, 2001. – 41 с. 10. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А. Сулакулидзе // М: «Научный мир». – 2012. – 640 с. 11. Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» / – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – т. II – 182 с.

ДИАГНОСТИКА И ЭФФЕКТИВНОЕ ЛЕЧЕНИЕ АССОЦИАТИВНОГО ТЕЧЕНИЯ КОЛИБАКТЕРИОЗА И ПУЛЛОРОЗА У КУР

ШАПУЛАТОВА З.Ж., КУРБАНОВ Ж.Х., ДЖАЙНАРОВ Б., АЛЛАЗОВ А.С.

Самаркандский государственный университет ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологий, г. Самарканд, Республика Узбекистан

*В статье приводятся данные проведенных опытов по диагностике и лечению ассоциативного колибактериоза и пуллороза у кур. Описаны эпизоотологические, клинические и патологоанатомические данные при этой ассоциации на птицеферме "Даргом Парранда Файз". Лабораторным исследованием была определена эффективность лечения колибактериоза и сальмонеллеза у кур разными антибиотиками. Установлено наиболее эффективное средство для лечения. Сделаны соответствующие выводы и заключения. **Ключевые слова:** колибактериоз, пуллороз, птица, эпизоотология, клинические признаки, патологоанатомические изменения, МПА, антибиотик.*

DIAGNOSIS AND EFFECTIVE TREATMENT OF ASSOCIATIVE COURSE OF COLIBACTERIOSIS AND PULLOROSIS IN CHICKENS

SHAPULATOVA Z.J., SARUXANYAN G.D., JAINAROV B.B., KURBANOV J.KH., ALLAZOV A.S.

Samarkand Statr University of Veterinary Medicine, Animal Husbandry and biotexnology, Samarkand, Republic of Uzbekistan

*The article presents data from experiments on the diagnosis and treatment of mixed infections (colibacillosis and pullorosis). Epizootological, clinical and pathoanatomical data are described for this combined infection on the poultry farm "Dargom Parranda Fayz". Laboratory studi determined the effectiveness of the treatment of colibacillosis and salmonellosis with various antibiotics. The most effective remedy for treatment has been established. Appropriate conclusions and conclusions are made. **Keywords:** colibacillosis, pullorosis, poultry, epizootology, clinical signs, pathoanatomical changes, MPA, antibiotic.*

Введение. Птицеводства имеет значительную роль в обеспечении продовольственных потребностей населения Республики. Инфекционные болезни птиц, в том числе пуллороз и колибактериоз является большим препятствием в успешной реализации важной задачи, стремительного развития птицеводства.

Болезни распространены на некоторых птицефабрик нашей республики и наносят значительный экономический ущерб птицеводству. Поэтому своевременное проведение ветеринарно-санитарных мероприятий в хозяйствах является неотъемлемой частью производственного успеха. Наряду с ежедневными ветеринарно-санитарными мероприятиями на птицеводческих фабриках и специализированных птицеводческих фермах следует проводить общие и частные профилактические меры против инфекционных заболеваний. Чрезвычайно важно установить своевременный и правильный диагноз при профилактике заболеваний.

Материалы и методы исследований. Для изучения степени распространения колибактериоза и пуллороза проводили эпизоотологические, клинические и патологоанатомические исследование. Исследования были проведены на 8030 головах кур птицефермы "Даргом Парранда Файз" Самаркандской области. Для оценки эпизоотического состояния по колибактериозу и пуллорозу определяли влияние на степень распространения инфекций следующие показатели: кормление и