

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВПО «УЛЬЯНОВСКАЯ ГСХА им. П.А. СТОЛЫПИНА»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ



Д.А. ВАСИЛЬЕВ, Е.Н. КОВАЛЕВА,
С.Н. ЗОЛОТУХИН

ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

УЛЬЯНОВСК
2013

УДК 579.01:578
ББК 28.4

Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н.

Листерииозные бактериофаги. Научное издание. – Ульяновск: НИИЦМиБ Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 66 с.: Ил. 9.

ISBN: 978-5-905970-16-0

Рецензенты: д.м.н. Нафеев Александр Анатольевич,
д.б.н. Семенов Александр Михайлович.

В книге приводится обзор отечественных и иностранных публикаций по тематике бактериофагов бактерий рода *Listeria*. Описаны методики выделения и изучения основных биологических свойств листерииозных бактериофагов, дана характеристика изученным фагам, приведены данные по практическому применению фагов рода *Listeria*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267от 10.08.2012).

Печатается по решению научно-технического совета Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина (протокол № 1 от 5 февраля 2013 года).

© Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н., 2013
© НИИЦМиБ Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013

MINISTRY OF AGRICULTURE OF THE RUSSIAN FEDERATION
FSBI HPE «ULYANOVSK SAA N.A. P.I. STOLYPIN»
RESEARCH-AND-DEVELOPMENT INNOVATIVE CENTER
OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

VASYLYEV D.A., KOVALEVA E.N.,
ZOLOTUKHIN S.N.

LISTERIAPHAGE

ULYANOVSK
2013

Vasylyev D.A., Kovaleva E.N., Zolotukhin S.N.
Listeriaphages. Scientific Issue. – Ulyanovsk: RDICMB USAA
n.a. P.A. Stolypin, 2013. – 66 p.: Pic. 9

Reviewer: DPhil. Nafeev Aleksandr Anatolyevitch,
DPhil. Semenov Aleksandr Mikhailovitch.

The book presents a survey of Russian and foreign scientific publications on Listeria Bacteriophages. The methods of isolation and study of the main properties of Listeria Bacteriophages are described, the characteristics of the isolated phages and the data on practical application of Listeriaphages are given.

The book is aimed at virologists, microbiologists, biologists, biophysicists, biochemists who work with bacterial viruses and also at students and postgraduates of biological and medical specialty.

The research is performed with the financial support of the government represented by the Ministry of Education and Science within the federal target program «Scientific and Scientific-Educational Personnel of Innovative Russia» for 2009-2013 (agreement № 8267 from 10.08.2012)

Printed by decision of the scientific-technical council of Ulyanovsk SAA n.a. P.A. Stolypin (report № 1 from 5, February, 2013).

© Kovaleva E.N., Vasylyev D.A., Zolotukhin S.N., 2013
© RDICMB USAA n.a. P.A. Stolypin, 2013

О ЛИСТЕРИОЗЕ И ЛИСТЕРИЯХ

Прошло более 100 лет со времени первого описания листериоза у животных. Значение этой инфекции в патологии людей и животных не только не уменьшилось, а даже возросло.

Все первые публикации связаны с обнаружением указанной болезни у кроликов (Лусе во Франции, 1892; Д. Гюльферс в Швеции, 1911) у морских свинок и кроликов (Мюррей, Уэбб и Свэнн в Англии, 1926) у крысоподобного грызуна (Г. Пири в Южной Африке, 1927). В 1931 г. Д. Джилль установил эту болезнь у овец, в 1932 г. Тен-Бритч – у птиц, в 1934 г. Джонс и Литлль – у крупного рогатого скота, в 1936 г. Т.П. Слабоспицкий – у поросят, в 1948 г. Сенкеруд – у лошадей, в 1949 г. Н.Г. Трегубова – у лисиц, в 1964 г. Н.А. Литвинов – у песцов, затем у соболей М.Е. Еремеев, у нутрий – С.Е. Сорина. Кроме того, Свинцов П.М. и другие в 1946 г. при микроскопическом исследовании крови свиней, используемых для изготовления кристалвиолет вакцины против чумы свиней, обнаруживали не известные ранее небольшие грамположительные палочки, которые в то время именовали X-палочками. Впоследствии оказалось, что это были листерии.

Первые сообщения о листериозе у людей связаны с именами Аткинсона (Австралия, 1915), Дюмонта и Котони (Франция, 1918). Вопросы таксономии и классификации были частично решены уже к 1940 году – Г. Пири дал наименование возбудителю болезни – *Listeria monocytogenes*, которое было утверждено Международной Классификационной комиссией и используется до сих пор.

Официальная регистрация болезни, как нозологической единицы, в нашей стране проводится с 1956 года у животных, а у людей с 1992 года.

С 50-х годов XX столетия началось интенсивное изучение листериоза в большинстве стран мира. Этому способствовали Международные конференции, которые стали проводиться с 1957 года регулярно каждые 4 года.

Был создан подкомитет Всемирной ассоциации микробиологических обществ по таксономии листерий и эризипелотриксосов, в который вошли наиболее видные исследователи листериоза. Особо следует отметить огромный вклад в изучение листериоза выдающегося немецкого ученого-микробиолога Х. Зеелигера (1920 – 1997), который возглавлял этот подкомитет и был вдохновителем и организатором проведения Международных симпозиумов по листериозу. В числе крупных ученых, занимавшихся этой проблемой, следует назвать Д. Джонс (Англия), Ж. Рокурт (Франция), И. Иванова (Болгария), Б. Раловича (Венгрия). Более 15 лет нашу страну представлял в Подкомитете И.А. Бакулов (СССР, РФ), затем В.М. Котляров, Д.В. Колбасов.

Дальнейшие исследования были ознаменованы выделением, идентификацией по всей планете новых штаммов листерий как следствие появлением новых видов: *Listeria grayi* (1966), *Listeria murrayi* (1971), *Listeria innocua* (1979), *Listeria welshimeri* (1983), *Listeria seeligeri* (1983), *Listeria ivanovii* (1984). В это период большое внимание было уделено разработке диагностики листериоза и, в первую очередь, выделению и изучению возбудителя. В СССР был налажен сбор всех выделенных на местах штаммов, их повторная идентификация и типизация во Всесоюзном научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГУНИиЭПУ ВНИИВВиМ). Было разработано «Наставление по лабораторной диагностике листериоза животных» (1971), затем совместные медико-ветеринарные рекомендации (1987), и, наконец, Сборник санитарных и ветеринарных правил (1996). Все это позволило резко снизить процент диагностических ошибок. Советскими исследователями были детально изучены морфология листерий, разработаны методы культивирования, предложены элективные среды, изучены биохимические особенности этих микроорганизмов (П.М. Свинцов, П.П. Сахаров, Е.И. Гудкова, П.С. Соломкин, В.В. Сливко, Н.Г. Трегубова, А.Л. Корнилова, Ю.А. Малахов, И.А. Бакулов, К.Н. Шлыгина, Н.С. Огнева, Г.В. Борисова, А.А. Триполитова, А.А. Аннагиев, В.М. Котляров,

З.Н. Меньшикова, В.Е. Белоусов, О.В. Кривоносова, А.А. Цыганова и многие другие).

Изучение серологических свойств листерий позволило разработать схему антигенной структуры листерий (Патерсон, Донкер-Вот, Зеелигер, Джонс), что значительно облегчило идентификацию и серотипизацию выделяемых штаммов. С этой же целью у нас в стране были получены групповые антигены и специфические сыворотки для серотипизации листерий, разработан непрямой метод иммунофлуоресценции для диагностики листериоза (И.А. Бакулов, В.М. Котляров, 1968). Позднее был предложен специфический антиген для постановки РСК при листериозе (И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Д.А. Васильев и др.). Предложены для диагностики листериоза методы иммуноферментного анализа (ИФА) (И.А. Бакулов, Д.А. Васильев и др.), полимеразно-цепной реакции (ПЦР) (И.Л. Обухов, Д.А. Васильев и др.).

Большое теоретическое и практическое значение имели исследования по изучению явления бактериофагии при листериозе и разработке практического применения этого феномена. Известны ранние публикации С.Р. Sword и М.Ж. Pickett (1961), М.К. Щегловой (1957 – 1970). Группой под руководством И.А. Бакулова (Н.А. Капыриной, Т.И. Кольпиковой, В.М. Котляровым (1984 – 1990), выделены, изучены листериозные бактериофаги, разработаны методы индикации и идентификации листерий с помощью бактериофага, выявления возбудителя в патологическом материале и в различных объектах внешней среды с помощью реакции нарастания титра фага.

С самого начала изучения листериоза большое внимание уделялось эпизоотологии и эпидемиологии болезни. Оба этих направления тесно связаны. Силами отечественных и зарубежных исследователей была изучена распространенность листериоза в различных странах мира, в т.ч. в СССР и в России. Помимо сельскохозяйственных и домашних животных, листерии были выделены при бактериологических исследованиях многих диких животных, представителей различных отрядов: грызунов, хищных, парнокопытных, насекомоядных, рукокрылых, воробьиных, куриных, гусиных, попугаев, сов, хищных птиц, рыб, земноводных. Были определены основные источники возбудителя инфекции, пути выделения листерий во внешнюю среду, способы зараже-

ния, пути распространения болезни, характер течения инфекции, периодичность, сезонность, повторяемость, заболеваемость, летальность. В этих исследованиях принимали участие многие отечественные ученые: И.А. Бакулов, В.М. Котляров, И.И. Гуславский, С.П. Карпов, Я.П. Лысенко, В.Л. Адамович, В.И. Гершун, Н.С. Огнева, Н.Г. Олсуфьев, Л.А. Поманская, Л.Ф. Пустовая, И.П. Волгин, И.Г. Бузмакев, Г.Г. Юрков и другие, а также многие зарубежные исследователи: О. Асахи, Р. Аа, А. Люка, Донкер-Вот, Д. Джилль, М. Грей, И. Иванов, М. Кхан, Ж. Ларсен, Х. Зеелигер, П. Дарье, К. Елизарова, Е. Кампельмахер, Д. Бленден, С. Ортель, Х. Трайн, Х.Тамм и другие.

Особая опасность листериоза возникла в конце XX века, в связи с установленной контаминацией пищевых продуктов листериями. В связи с этим листериоз получил наименование «пищевой инфекции» (И.А. Бакулов., Д.А. Васильев, 1991) и медицинские специалисты нашей страны с 1992 стали признавать его как эпидемическую инфекцию. В частности ими установлены группы риска у людей – листериоз беременных, новорожденных, пожилых и лиц, для лечения которых использовали препараты и методы, подавляющие защитные способности организма (при пересадке почек и т.д.). Этот этап изучения листериоза – как пищевой инфекции длится и в настоящее время, приобретая все большую актуальность. Был зафиксирован ряд крупных вспышек листериоза людей с высоким уровнем смертности при употреблении пищевых продуктов животного и растительного происхождения (молоко и молочные продукты, сыры, мороженое, квашеная капуста). Эти случаи акцентировали внимание общественности и подчеркнули важность контроля за производством, сбытом и употреблением пищевых продуктов в связи с возможной их контаминацией листериями. Случаи выделения листерий из пищевых продуктов были и до упомянутых вспышек, однако они рассматривались скорее как казус и медики не стремились их обобщать, систематизировать и изучать. В настоящее время листерии обнаруживаются в пищевых продуктах с постоянным нарастанием и это обусловлено не только улучшением методов индикации, но и биологическими особенностями листерий связанными с новыми технологиями приготовления и хранения пищевых продуктов. В России в связи с этим налажена система контроля за качеством

пищевых продуктов отечественного и зарубежного происхождения. Огромное внимание уделяется разработке средств и методов быстрой индикации листерий в пищевых продуктах и методы их обеззараживания.

Надо отметить, что за прошедшее время интерес к листериозу не уменьшился, а возрос. Об этом говорит значительное увеличение количества публикаций по этой проблеме, увеличение числа научных учреждений и специалистов, занимающихся изучением этой болезни, расширение числа стран, в которых стали проводить исследования по проблеме листериоза.

Листериоз привлек внимание биологов, бактериологов, эпидемиологов, эпизоотологов не только как болезнь, но и как удобная биологическая модель для решения ряда теоретических и практических вопросов иммунологии, генетики бактерий, молекулярной биологии, фармакологии и других.

Не смотря на сравнительно длительный период изучения этой болезни, многие вопросы листериоза остаются не решёнными и непонятыми. В частности, еще не в достаточной мере изучены: возбудитель болезни, его биологические характеристики, экология. Не достаточно отработано культивирование штаммов листерий, не предложены оптимальные параметры по определению патогенности листерий, и определения наличия иммунитета при использовании различных противолистерийных препаратов, не установлено полное видовое различие листерий на генетическом уровне. Не достаточно изучен механизм патогенеза болезни. Необходимо дальнейшее совершенствование диагностики болезни, индикации и идентификации возбудителя, в особенности в пищевых продуктах. Не разработана рациональная система профилактики и борьбы с листериозом животных и человека.

Многогранность проблем листериозной инфекции и самих листерий сподвигнула нас обратить внимание на такой раздел биологии бактерий *Listeria monocytogenes* как взаимодействие листериозного фага и листериозной клетки. Дальнейшее изучение данного вопроса позволяет рассмотреть не только механизмы взаимодействия двух участков генома бактерии и фага, но и подойти к пониманию вопросов вирулентности в патогенных штаммах. Многие гены, кодирующие факторы вирулентности, присутствуют в бактериофагах и способны к существованию вне

клетки, тем самым они играют определённую роль в появлении новых штаммов (или биологических видов) патогенных бактерий. В процессе фаговой конверсии гены вирулентности предположительно влияют на эволюцию бактерий и самих фагов. С подобным механизмом связаны как генетические характеристики штаммов, так и фенотипические свойства листерий, на которых основаны методы идентификации и индикации позволяющие провести мониторинг заданного штамма, установить источник контаминации пищевого продукта или заражения человека, животного.

В Ульяновске, на базе кафедры МВЭ и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии и научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии создана научная группа – включающая: д.б.н. Д.А. Васильева, к.б.н. Е.Н. Ковалеву, Е.В. Сульдину, М.А. Имамова, Ю.С. Пчелинцеву – по изучению листерий, намечены темы НИР и, в частности, по вопросу изучения фагов листерий. Материалы предлагаемого издания является первым шагом в указанном направлении.

Авторы заранее приносят благодарность всем, высказавшим свои замечания по этой работе и учтут их в своих дальнейших публикациях и предстоящих исследованиях.

ГЛАВА 1

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Sword C.P., Pickett M.J. [61] была проанализирована частота лизогении в 123 штаммах листерий, изолированных из различных источников по всему миру. Традиционные процедуры изоляции фагов оказались ненадежными в работе с *Listeria*, так как лизогенные штаммы не всегда, а посредством спонтанного лизиса, выпускали обнаружимое количество штаммов. Однако после того, как их подвергли ультрафиолетовой радиации, данные штаммы были вынуждены произвести до 10^7 PFU/ml. Некоторые штаммы, которые не выпускали фаги, произвели после облучения субстанцию предположительно аналогичную колицинам.

Для получения листериозных бактериофагов Капырина Н.А. [4] использовала методику, предусматривающую облучение культур ультрафиолетовыми лучами. В результате проведенных экспериментов латентные фаги были выявлены у подавляющего большинства листериозных культур, независимо от их биологических свойств, географического происхождения и давности выделения.

Автором при индуцировании 100 штаммов листерий фаги с большим постоянством обнаружились в 78 культурах, при этом из 71-ой культуры получены стойкие чистые линии листериозных бактериофагов (табл. 1).

19 культур после облучения также образовывали прозрачные лизаты. Причем в первичных посевах из этих лизатов можно было наблюдать образование очень мелких мутных бляшек, которые однако не содержали инфекционных фаговых частиц. По всей вероятности, эти культуры оказались продуцентами дефектных фагов с нарушенной воспроизводительной функцией [4], но ча-

Табл. 1. Индуцированная продукция фагов у листериозных культур [4]

№ п/п	Исследуемые штаммы	Наименование полученного фага	Наличие свободного фага		Индуцированная продукция фага		Титр фагов после пассирования	Штаммы, используемые в качестве индикаторных
			титр	В/Р*	титр	В/Р		
1.	2	L9A	–	–	7*10 ¹	2,8*10 ²	1*10 ⁹	56
2.	3	L7A	–	–	1*10 ¹	1*10 ³	1*10 ⁸	9-127
3.	7	L12A	–	–	1,4*10 ¹	1,5*10 ³	1*10 ⁹	139
4.	15	L15A	–	–	1*10 ¹	2*10 ³	6*10 ⁹	56
5.	34	L36A	–	–	3,2*10 ¹	6,2*10 ²	8*10 ⁹	56
6.	139	L10A	–	–	2*10 ²	2*10 ²	1*10 ⁹	139
7.	324	L13A	2*10 ³	5*10 ⁵	1,2*10 ²	1,7*10 ¹	1*10 ⁹	139
8.	728	L35A	–	–	2,4*10 ¹	8,7*10 ²	4*10 ⁸	9-127
9.	766	L16A	4*10 ²	1*10 ⁵	9*10 ²	2,2*10 ¹	2*10 ⁹	56
10.	1196	L11A	1,2*10 ¹	1,6*10 ⁸	3,6*10 ²	1,1*10 ²	2*10 ⁹	56
11.	1197	L12A	1*10 ²	2*10 ⁷	8,7*10 ¹	4,6*10 ²	6*10 ⁸	56
12.	1213	L18A	1*10 ³	1*10 ⁶	1*10 ³	2*10 ¹	7*10 ⁹	139
13.	1395	L20A	–	–	4,1*10 ²	5*10 ¹	4*10 ⁹	9-127
14.	1324	L19A	1,2*10 ¹	8,3*10 ⁷	1,1*10 ¹	1,8*10 ⁸	1*10 ⁹	139
15.	1472	L14A	3,5*10 ³	2,5*10 ⁵	1*10 ³	2*10 ¹	1*10 ⁹	3
16.	1611	L21A	–	–	5,4*10 ¹	3,6*10 ²	9*10 ⁹	139
17.	1621	L22A	–	–	2,1*10 ⁴	4,4*10 ¹	3*10 ⁹	56
18.	1913	L49A	4,7*10 ¹	2,1*10 ⁷	2*10 ¹	1*10 ³	2*10 ⁸	56
19.	8621	L38A	–	–	1*10 ³	2*10 ¹	5*10 ⁹	139
20.	4-40	L24A	1*10 ¹	1*10 ⁸	3,0*10 ⁴	6,6*10 ⁻¹	5*10 ⁹	9-127
21.	74-44	L25A	7*10 ¹	1,4*10 ⁷	8*10 ²	2,5*10 ¹	2*10 ⁹	9-127
22.	9-72	L6A	–	–	1*10 ²	1*10 ²	5*10 ¹⁰	56
23.	9-127	L5A	8,4*10 ²	1,2*10 ⁶	2*10 ³	1*10 ¹	1*10 ⁹	56
24.	9-128	L26A	–	–	1,6*10 ²	4*10 ¹	2*10 ⁸	56
25.	129	L27A	–	–	4*10 ²	5*10 ¹	1*10 ⁸	56
26.	9-130	L28A	–	–	1*10 ²	2*10 ²	3*10 ⁹	56
27.	15/57	L30A	–	–	4*10 ²	5*10 ¹	2*10 ⁹	9-127
28.	16/57	L31A	–	–	2*10 ³	1*10 ¹	6*10 ⁹	9-127
29.	17/57	L4A	3*10 ¹	3*10 ⁷	2*10 ²	1*10 ²	2*10 ¹⁰	9-72
30.	132/134	L32A	–	–	6*10 ²	3,3*10 ¹	4*10 ⁹	9-127
31.	246/18	L33A	–	–	6*10 ⁴	5*10 ¹	1*10 ⁹	9-127
32.	3413/86	L34A	–	–	3*10 ⁴	6,6*10 ¹	2*10 ⁹	9-127
33.	211	L40A	5*10 ¹	2*10 ⁷	2,1*10 ²	1*10 ²	4*10 ⁸	56
34.	311	L28B	1*10 ²	1*10 ⁷	1*10 ²	2*10 ²	1*10 ⁸	56
35.	911	L29A	–	–	1,1*10 ²	1,8*10 ¹	8*10 ⁷	139

36.	1411	L30B	$3 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^2$	$6,6 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	56
37.	2311	L23A	$1,2 \cdot 10^2$	$8,3 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^8$	9-127
38.	7811	L44A	$4 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$	$8,9 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^8$	9-127
39.	8011	L45A	-	-	$2,1 \cdot 10^2$	$9 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^{10}$	56
40.	17811	L46A	$1,3 \cdot 10^1$	$7,6 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	139
41.	21611	L47A	-	-	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^{-1}$	$4 \cdot 10^8$	9-127
42.	21711	L48A	-	-	$5 \cdot 10^4$	$8,3 \cdot 10^{-1}$	$4 \cdot 10^9$	9-127
43.	A	L50A	-	-	$9 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
44.	Вет	L8A	$4,2 \cdot 10^1$	$2,4 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^{10}$	56
45.	Куст	L51A	-	-	$1,7 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$3 \cdot 10^9$	9-127
46.	К-1	L52A	-	-	$7 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^9$	9-127
47.	Р	L53A	$5 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^3$	$0,3 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	3
48.	X ₁	L54A	$3,8 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^1$	$7,4 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	9-127
49.	X ₂	L19AM	$3 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	56
50.	ЗВД	L56A	-	-	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^9$	139
51.	МД	L2A	$1,5 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^3$	$0,6 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^9$	9-127
52.	Г11-4	L39A	-	-	$2,5 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^7$	9-128
53.	13МП	L58A	-	-	$1 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^7$	139
54.	МО-9	L59A	-	-	$2,7 \cdot 10^3$	$0,2 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^8$	56
55.	9	L60A	-	-	$9 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^9$	9-127
56.	L.m.750	L61A	-	-	$9 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^9$	9-127
57.	Т-1	L62A	-	-	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$8 \cdot 10^9$	9-127
58.	Т-3	L63A	-	-	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
59.	4а	L64A	-	-	10^3	$2 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^{10}$	9-127
60.	4б	L65A	-	-	$3 \cdot 10^6$	$6,6 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^9$	9-127
61.	4с	L66A	$3,1 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^9$	9-127
62.	4д	L7A	$2,4 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^9$	9-127
63.	1221	L69A	-	-	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^9$	139
64.	4686	L3A	-	-	$7 \cdot 10^2$	$2,8 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^8$	9-127
65.	grayi	L1A	-	-	$9 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^9$	9-127
66.	1Г	L68A	-	-	$6 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^9$	9-127
67.	4Г	L55A	-	-	$3 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^{-1}$	$2 \cdot 10^9$	56
68.	5Г	L70A	-	-	$1,6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^9$	9-127
69.	8Г	L71A	-	-	$7 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{10}$	9-127
70.	434	L37A	-	-	$9 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^9$	9-127
71.	39	L67A	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^1$	$1,9 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^9$	139

* В/Р – показатель отношения числа бактериальных клеток (Bacteria) к числу фаговых корпускул (Phage)

стично сохранившие способность убивать клетки гомологичного вида. Образование зон подавления роста на чувствительном штамме можно отнести за счет действия белковых субстанций, так называемых бактериоцинов, которые были обнаружены и в культуре *L.monocytogenes* [60].

М.К. Щегловой обнаружены симбиотические фаги у всех 100 % исследованных культур [14]. В публикациях С. Sword, М. Pickett [60], Н. Tubylevich [63], S. Jasinska [32] указывается на значительно меньшее число обнаруженных лизогенных штаммов. Такие различия могут быть связаны с методологическими подходами при проведении исследований. Так С. Sword, М. Pickett и Н. Tubylevich после облучения выдерживали культуры при 37°C. В то же время исследованиями М.К. Щегловой [15] с достаточной убедительностью продемонстрировано, что пониженная температура (22°C) является более благоприятной для репродукции листериозного бактериофага. Что касается S. Jasinska, то она облучала культуры, засеянные сплошным газоном на агаровую пластину. Однако доказано, что индуцирующий эффект ультрафиолетовых лучей значительно повышается, если культура во время облучения находится в безбелковой среде.

Важную роль при определении латентных фагов имеет правильный подбор индикаторных штаммов, в процессе работы Капыриной Н.А. только на 28-ми из 47-ми исследованных в качестве индикаторных штаммов было обнаружено образование негативных колоний [4].

В дальнейшем при испытании культур с соответствующими индикаторными штаммами на присутствие в них свободного фага автором было выявлено, что 26 музейных штаммов *L.monocytogenes* постоянно содержали инфекционные частицы, количество которых для различных штаммов колебалось от 10 до 1000. Появление свободных вирусных частиц, с одной стороны, может быть связано со спонтанной продукцией фагов, вследствие нарушения у небольшой части бактерий лизогенной популяции, под действием, равновесия между профагом и клеткой, сопровождающегося лизисом последней с освобождением определенного количества инфекционных корпускул фагов, активных в отношении гетерологичных штаммов одного и того же бактериального вида. С другой стороны наличие свободных фа-

гов в культуре может быть также результатом псевдолизогении или состояния носительства [4].

В исследованных культурах, содержащих свободные фаги, после облучения наблюдалось значительное увеличение инфекционных корпускул, о чем свидетельствует соотношение В/Р, которые для свободных фагов составляли $2,5 \times 10^5 - 1,6 \times 10^8$, а для индуцированных – $5 \times 10^3 - 1,8 \times 10^3$. Следовательно, присутствие свободных фаговых частиц в этих культурах явилось результатом спонтанного лизиса бактериальных клеток. Хотя нельзя полностью отрицать наличие в отдельных случаях среди исследуемых штаммов носительства, т.к. не было проведено предварительное освобождение культур от возможного присутствия в них экзогенных частиц бактериофагов.

Выделение листериозных бактериофагов методом индукции лизогенных культур сопряжено с рядом трудностей. Для достижения поставленной цели необходимо подобрать оптимальные параметры воздействия индуцирующих факторов на бактериальную клетку, определить характер взаимодействия бактериальных клеток и фаговых корпускул.

ГЛАВА 2

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

2. 1. Морфология негативных колоний

По данным Капыриной Н.А. [4] при посеве смеси фагов с индикаторными штаммами на поверхности агара наблюдалось образование негативных колоний. Чаще они выглядели мелкими мутными, реже прозрачными или мишеневидной формы – с прозрачным дном, окруженным зоной вторичного лизиса. Нередко на одних и тех же чашках образовывались смешанные формы бляшек, что в какой то мере свидетельствует о присутствии в отдельных штаммах листериозных культур нескольких типов профагов.

Из 26 штаммов листерий были выделены фаги, которые уже в первой генерации образовывали хорошо выраженные, довольно прозрачные, по сравнению с остальными, негативные колонии, размер которых составлял 1 – 1,5 мм. Вполне возможно, что в геноме профага, присутствующего в этих штаммах, наряду с индукцией, под действием ультрафиолетовых лучей возникали мутации в группе сцепления, контролируемой областью С (clear – прозрачный, Kaiser, 1957), что, вероятно, и приводило к образованию бляшек подобной морфологии [4].

Суммируя результаты наблюдений морфологии бляшек у большого числа стабилизированных бактериофагов (71 раса) Капырина Н.А. выделила 5 типов морфологически-различающихся негативных колоний, что позволило разделить фаги по этому признаку на соответствующее число групп:

1. Самую многочисленную группу (37 рас) составили фаги, образующие на газоне индикаторных штаммов (9-127, 56 и 3) довольно крупные прозрачные бляшки 1,5 – 3 мм в диаметре. У многих фагов наряду с крупными колониями на одних и тех же

чашках отмечалось незначительное количество более мелких колоний (0,5 – 0,9 мм).

2. 6 фагов на штаммах 139 и 9-72 формировали тоже прозрачные бляшки, но величина их составляла 0,5 – 1,5 мм.

3. 17 фагов на индикаторных штаммах 9-127, 56, 139 и 3 образовывали бляшки с диаметром 0,9 – 1,5 мм. Отличительной особенностью бляшек данной группы являлось наличие четкого ореола вторичного лизиса, тонкой полоской окаймляющего прозрачную часть бляшки.

4. 6 бактериофагов на штаммах-хозяевах (9-127, 56 и 139) образовывали бляшки мишеневидной формы с прозрачным дном и широкой зоной вторичного лизиса, размер этих бляшек вместе с зоной вторичного лизиса достигал 0,9 – 1,5 мм.

5. 4 фага на штамме 56 формировали равномерно мутные негативные клоны или колонии с мутным центром, представленным растущими бактериальными клетками лизогенизированной клоны и прозрачной периферической зоны. Морфологическая организация колоний подобного типа является характерной для умеренных бактериофагов.

Фаги, исследуемые Н.А. Капыриной [4] несколько отличались по данному признаку от фагов, описанных М.К. Щегловой [14], которая разделила исследуемые ею фаги на 5 типов. Большинство фагов коллекции Н.А. Капыриной образовывали довольно крупные прозрачные бляшки без видимой зоны вторичного лизиса. У 4-х фагов негативные колонии имели вид, характерный для умеренного типа бактериальных вирусов. Фаги, выделенные М.К. Щегловой, в основном, образовывали прозрачные бляшки, окруженные зоной вторичного лизиса равной или превышающей диаметр прозрачной части, и только в 4 группу вошли фаги, имеющие мелкие прозрачные бляшки без зоны вторичного лизиса. Отмечены также различия и в величине негативных колоний.

Листериезные фаги, выделенные Н.А. Капыриной [4] формировали более крупные бляшки, диаметр которых колебался в пределах 0,5 – 3 мм, на отдельных сериях сред они достигали 8 мм против 0,43 – 1,35 мм по данным М.К. Щегловой [15]. Эти различия, вероятно, связаны как с индивидуальными свойствами изучаемых бактериофагов, так и с условиями их культивирования.

Данными опытами установлено, что морфология негативных колоний при постоянных условиях является весьма стабильным признаком, чего нельзя сказать в отношении их размеров. Даже на одних и тех же чашках порой можно было наблюдать колонии, различающиеся по диаметру в два раза и более. Подобное разнообразие М. Adams [1] связывает с замедленным процессом адсорбции и развития фагов в инфицированных клетках. Это заключение вполне справедливо по отношению к медленно адсорбирующим фагам, листериозные бактериофаги не могут быть отнесены к этой группе, так как уже за 5 – 10 минут они адсорбируются на 76 – 83 %. По всей вероятности различие в размерах бляшек связано с неодинаковой фагочувствительностью отдельных клеток в микробной популяции, или же с различной активностью фаговых частиц, присутствующих в лизате [4].

2. 2. Пассирование бактериофагов

Бактериофаги, выделенные Капыриной Н.А. (1973) из облученных листериозных культур, обладали невысокой активностью. Титры их не превышали $10^1 - 6 \times 10^3$, для большинства фагов они составляли 10^3 частиц в мл. С помощью метода непрерывного пассирования были получены мутантные расы, которые отличались от исходного типа по размерам и морфологии негативных колоний, величине титров, спектру литической активности, а также по способности к лизогенизации.

Изменения фагов, образующих в первой генерации прозрачные бляшки и бляшки с прозрачным дном, окруженным зоной вторичного лизиса, шли в направлении усиления их активности, что проявлялось в увеличении размеров негативных колоний до 1,5 – 3 мм. По-иному протекал эволюционный процесс у фагов, образующих мутные бляшки. В одних случаях наблюдалось равномерное снижение от пассажа к пассажи степени мутности всех бляшек. Как считает М.К.Щеглова [14] подобные изменения связаны с многоступенчатыми мутациями, возникающими в процессе адаптации фага к штамму-хозяину. В других случаях среди мутных бляшек внезапно появились единичные прозрачные колонии, которые, по мнению автора, являются результатом скачкообразных изменений качественных особенностей наследственного материала фага.

В результате проведенной серии опытов Капыриной Н.А. [4] были получены стойкие чистые линии 71-ой расы листериозных бактериофагов. Из них 4 бактериофага, несмотря на длительное пассирование (23 пассажа), формировали на газоне индикаторного штамма равномерно мутные колонии с плотным дном, образованным лизогенизированным клоном бактериальной культуры, окруженным узкой прозрачной зоной, что свидетельствует об устойчивости данных рас умеренных бактериофагов.

У остальных фагов методом селекции материала из изолированно расположенных прозрачных бляшек получены С-мутанты, характерной особенностью которых являлась пониженная способность к лизогенизации листериозных культур. Эти фаги, как правило, на бактериальном газоне формировали прозрачные бляшки с ореолом вторичного лизиса или без него. У некоторых фагов, чаще это были расы, давшие в первой генерации смешанные формы бляшек, наблюдалось образование на одних и тех же чашках единичных мелких мутных негативных колоний, очевидно, связанное с отщеплением у этих бактериальных вирусов небольшого числа корпускул с генотипом исходного варианта.

2. 3. Биология фаговых корпускул

Электронно-микроскопическое исследование семи листериозных бактериофагов, проведенное Н.А. Капыриной, показало, что они имеют головку многогранной формы и длинный гибкий хвостовой отросток в виде спирально скрученного тяжа, о чем свидетельствует поперечная испорченность этой структуры. Известно, что гексагональные очертания на плоскости имеют как икосаэдрические, так и октаэдрические многогранники. Экспериментальные данные показывают, что среди бактериальных вирусов, наряду с частицами, имеющими головку в форме икосаэдра обнаружены фаги с головками в форме октаэдра [12]. Геометрический рисунок пустых головок позволил сделать заключение о том, что листериозные бактериофаги также имеют головку в форме октаэдра [4].

При определении длины хвостовых отростков у пяти фагов (L 1А, L 2А, L 3А, L 14А и L23А) не выявлено достоверных различий в показателях этих величин, которые составляли 240 – 250 нм.

Фаг L 11A отличался по данному признаку от всех остальных рас. У него длина отростка равнялась 320 нм (рис. 1).

Фаголизат L 4A содержал корпускулы с различной длиной хвостового отростка, составлявшей для одних частиц 190 нм, а для других – 250 нм.

Количество фагов с более коротким отростком было значительно меньше, чем с длинным. Согласно предположениям А.С. Тихоненко с соавт. [12] присутствие в лизатах частиц, различающихся по размерам или морфологии, может быть следствием размножения фага на лизогенной культуре, когда вирулентный фаг, очевидно, индуцирует профаг, присутствующий в культуре-хозяине. Данная гипотеза, применительно к листериозным бактериофагам не лишена основания, поскольку индикаторный штамм для фага L A4, как было установлено, также является лизогенным [4].

По данным Н.А. Капыриной [4] в препаратах интактных фагов встречались частицы с двумя хвостовыми отростками. Аналогичные корпускулы у листериозных бактериофагов описаны М.К. Щегловой [14]. Относительно происхождения таких частиц пока еще нет единого мнения.

В результате проведенных исследований авторам не удалось выявить четкой корреляции морфологической организации листериозных бактериофагов с их биологическими свойствами. Так, фаг L 4A, резко отличающийся по биологическим свойствам от остальных рас, отнесенный в самостоятельную группу «В», имел однотипную с некоторыми фагами группы «А» (L 3A, L 1A и L

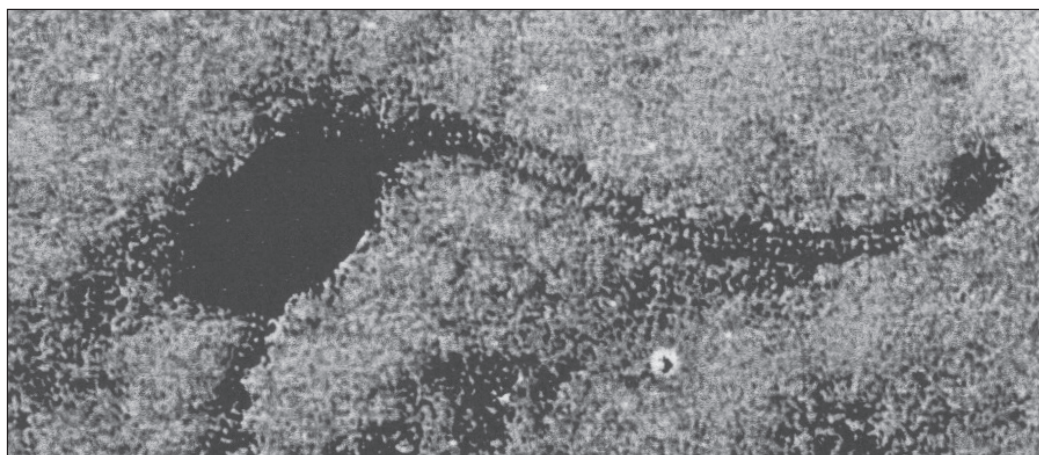


Рис. 1. Фаг L 11A с двумя хвостовыми отростками (x 150 000) [4]

Табл. 2. Результаты обработки данных электронно-микроскопического исследования семи листериозных бактериофагов [4]

Бактериофаг	Показатель	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Lim	M_0
L14A	Длина хвоста, нм	250±7,2	200-280	250-260
	Ширина хвоста, нм	8,1±0,44	-	-
	Размер головки, нм	47±1.1	43-53	45-48
L2A	Длина хвоста, нм	240±6,4	210-270	210-250
	Ширина хвоста, нм	7,2±0,42	-	-
	Размер головки, нм	46±0,8	42-50	42-50
L1A	Длина хвоста, нм	240±4,8	220-270	220-250
	Ширина хвоста, нм	6,4±0,43	-	-
	Размер головки, нм	51±0,7	45-56	47-50
L23A	Длина хвоста, нм	240±4,4	220-260	230-250
	Ширина хвоста, нм	9,2±0,6	-	-
	Размер головки, нм	44±1,1	40-50	42-45
L3A	Длина хвоста, нм	240±7,8	220-300	220-250
	Ширина хвоста, нм	7,7±0,42	-	-
	Размер головки, нм	51±0,8	48-58	50-53
L11A	Длина хвоста, нм	320±0,6	240-250	320-330
	Ширина хвоста, нм	8,3±0,5	-	-
	Размер головки, нм	55±0,7	50-60	55-60
L4A	Длина хвоста, нм	190±4,2 250±3,4	160-260	250-260
	Ширина хвоста, нм	6,7±0,4	-	-
	Размер головки, нм	44±1,2	42-55	42-50

$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ - средние арифметические значения диаметра головки, длины и ширины хвостового отростка

Lim - экстримальные значения

M_0 - модалные значения

23А) структуру базальной пластинки. В то же время фаги группы «А», обладающие рядом общих биологических свойств различались по характеру субмикроскопической организации базальной пластинки.

Zink R., Loessner M.J. [68] сравнивали набор из 22 фагов вида *Listeria* (21 умеренный и 1 вирулентный) на основе морфологической и белковой композиции. Все 22 фага имели икосаэдральные головки и либо сокращающиеся, либо несокращающиеся хвосты. Они представляли два различных морфотипа. Двадцать фагов принадлежали к семейству Siphoviridae и были различимы только по основанию длины хвоста. Два других фага были классифи-

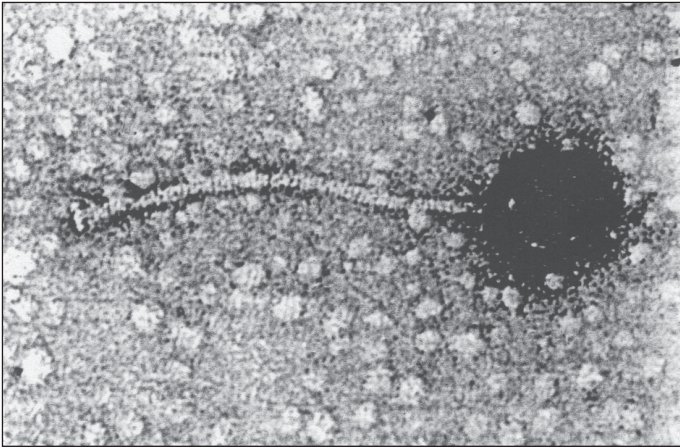


Рис. 2. Фаг L 1А с базальной пластинкой в форме пестика (x 144 000) [4]

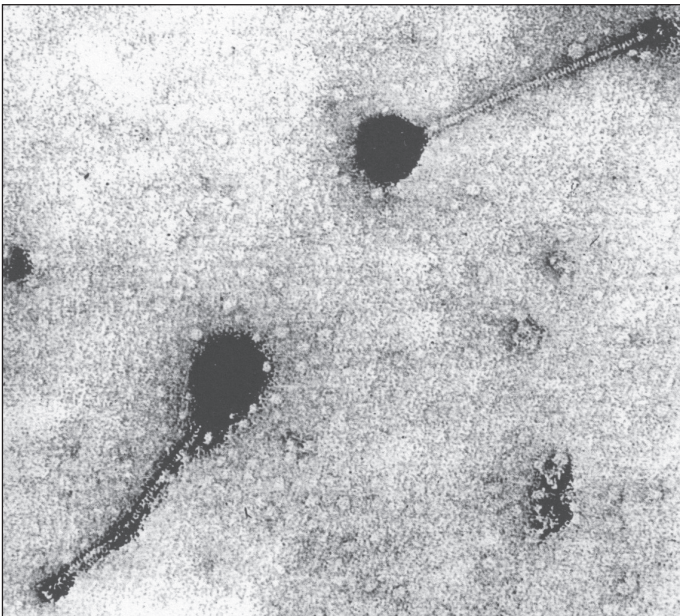


Рис. 3. Фаг L 23А, имеющий базальную пластинку в форме пестика, головки фаговых частиц более округлые (x 155 000) [4]

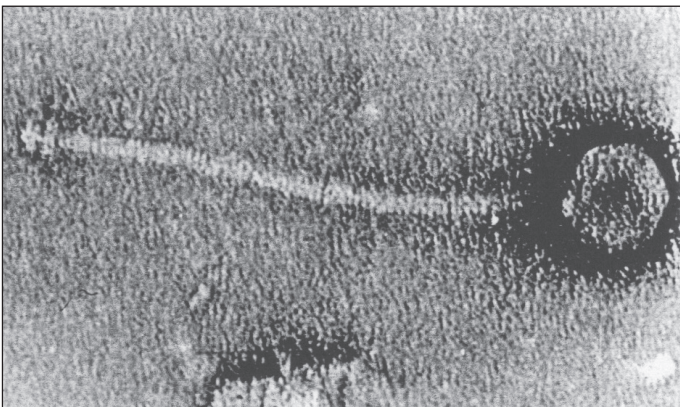


Рис. 4. Фаг L 14А с базальной пластинкой «якорьобразной» формы (x 215 000) [4]



Рис. 5. Фаг L 2A с базальной пластинкой в виде выростов (x 190 000) [4]

цированы как представители семейства Myoviridae, один из которых (A511) должен быть определен как новый вид. Оказалось, что он значительно отличается от других известных фагов листерий. Все фаги демонстрировали типичные белковые профили, которые были определены натрий-додецил-сульфат-полиакриламид гелевым электрофорезом и последующим лазерным денситометрическим анализом гелей. Затем оказалось возможным выделить восемь белковых подгрупп на основе уникальных белковых моделей (схем).

Данная классификация хорошо согласуется с предыдущими группировками на основе разновидности хозяина. Большинство фагов обнаружили два или три основных белковых диапазона от 21 до 24 kDa и от 30 до 36 kDa. Также для каждого фага наблюдается не менее 10 второстепенных белков. Результаты представленных исследований указывают на то, что основные белки являются структурными белками капсида и хвоста, а белковая зона с диапазоном от 30 до 35 kDa может ясно быть определена для белков капсида фага.

В исследовании J. Klumpp [et al.] представлен геномный анализ и молекулярная характеристика вирулентного фага *Listeria* A511 [62]. Электронная микроскопия и энзимная ферментация показали, что молекула ДНК A511 содержит линейные терминальные повторения в общем 3,125 bp, окружая девять малых мнимых ОРС. Данная структура генома объясняет, почему A511 не способен выполнять общую трансдукцию. A511 характеризуется определенной последовательностью гомологии к *Listeria* фагу P100 и другим морфологически родственными фагам, инфицирующих Firmicutes, таких как *Staphylococcus* фаг K и *Lactobacillus*

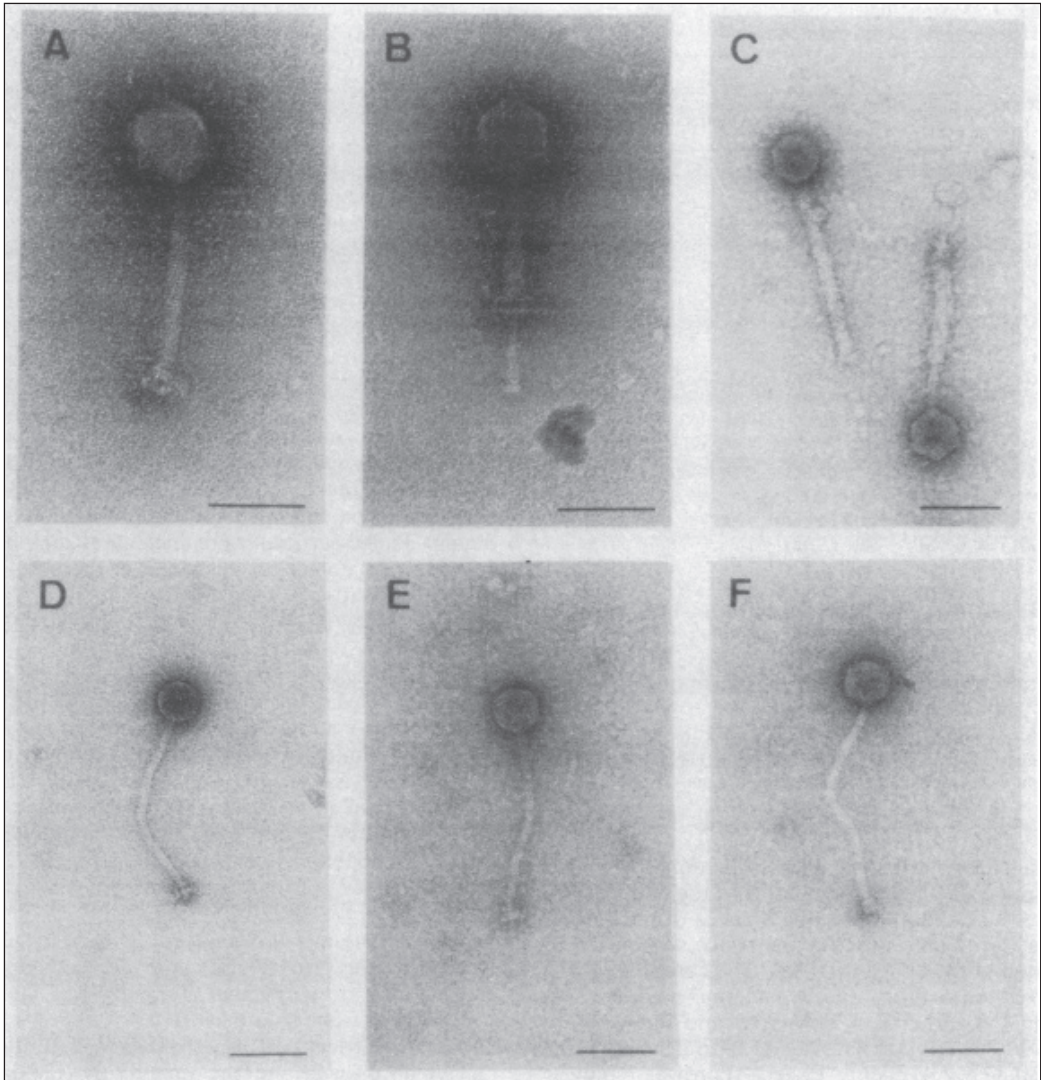


Рис. 6. Фаги (A) A511 (noncontracted tail); (B) A511 (contracted tail); (C) B054 (noncontracted tail [left] and contracted tail [right]); (D) B024; (E) C707; (F) A500 (bars = 100 nm) [68]

фаг LP65. Эквивалентные, но более экстенсивные терминальные повторы также существуют у фагов P100 (-6 kb) и K (-20 kb). Электронная микроскопия с высоким разрешением показала у этих вирусов присутствие длиннохвостых волокон, организованных в шестикратной симметрии. Массовая пептидная генетическая экспертиза, основанная на спектрометрии, позволила выделить индивидуальные белки для структурных компонентов A511. Предложена гипотеза, что SPO1-подобные элементы миовирусов характеризуются: (i) инфекцией грам-положительных бактерий с низким содержанием G+C; (ii) широким кругом хозяев вну-

три бактериального рода и чрезвычайной вирулентностью; (iii) схожей морфологией, последовательностью и коллинеарностью организации геномного фага; (iv) большим двухцепочечным геномом ДНК, демонстрирующим неперемещенные терминальные повторы различного размера.

На основании полученных данных можно сказать, что морфологический признак для таксономии листериозных бактериофагов, по-видимому, не имеет решающего значения. Однако электронно-микроскопические исследования позволяют судить о морфологической однотипности частиц, что служит косвенным доказательством генетической однородности популяции и может иметь большое значение при проведении научных исследований, а также при изготовлении препаратов для практических целей.

2. 4. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой

Исследуя в электронном микроскопе процесс взаимодействия листериозного бактериофага L 1A с клетками штамма 9-127, Капыриной Н.А. было отмечено, что фаговые частицы адсорбировались на клетке, в основном, при помощи хвостового отростка.

Рецепторы для бактериофагов могут иметь различное расположение на клетке. Согласно сообщениям S. Jasinska [32] рецепторы для листериозных фагов также располагаются на жгутиках чувствительных штаммов. М.К. Щеглова [14] в противоположность указанному автору, наблюдала адсорбцию корпускул фага 10 на клеточной стенке. Н.А. Капыриной [4] у частиц фага 1A отмечена способность фиксироваться только на поверхности бактерии. Специфические фаговые рецепторы в зависимости от особенностей изучаемых листериозных бактериофагов могут располагаться как на жгутиках, так и на бактериальной оболочке, но инфекционный процесс, вероятно, вызывают лишь фаги, адсорбированные на клеточной стенке.

Электронные микрофотографии, полученные Капыриной Н.А. [4], демонстрирующие этапы формирования частиц бактериального вируса в клетке свидетельствуют о том, что репродукция листериозных бактериофагов осуществляется непосредственно в зоне нуклеоида (рис. 7).

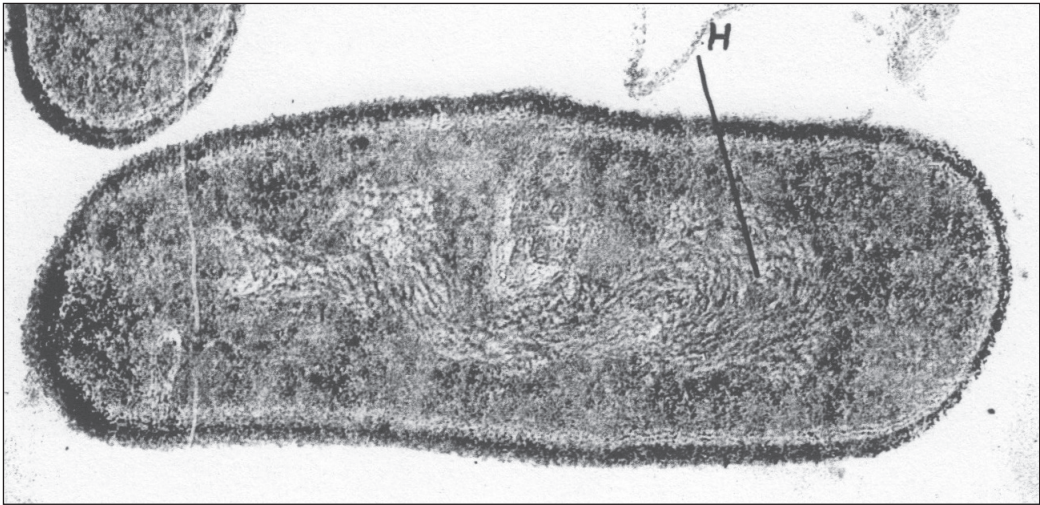


Рис. 7. Листериязная клетка через 50 минут после заражения фагом. Хорошо выражена нитевидная структура ядра, занимающего всю центральную часть цитоплазмы. Ядерные фибриллы ориентированы по длинной оси клетки [4]

Поэтому именно структура ядра претерпевает морфологические изменения в первую очередь. Сначала отмечается сильное разрыхление нуклеоида, в котором более четко, по сравнению с организацией ядра в незараженной клетке вырисовывается нитевидная структура, с ориентацией фибрилл по длинной оси микробной клетки. В дальнейшем нуклеоид зараженной клетки заполняется рыхлыми клубками, состоящими из тех же нитей, но свернутых в определенном порядке. Конденсация макромолекулы ДНК, по мнению исследователей [4, 33] сопровождается дегидратацией, в результате чего образуются плотноупакованные тельца, которые однако еще лишены инфекционных свойств. Предположения Е. Kellenberger о возможной конденсации нуклеиновой кислоты на ранних стадиях ее формирования и последующей дегидратацией конденсатов нашли подтверждение в исследованиях Капыриной Н.А.

Опытами А. Hershei [29] было установлено, что синтез фаговой ДНК и белка в клетке идет отдельно, причем фаговые антигены обнаруживаются только во второй половине латентного периода, но раньше, чем появляются зрелые частицы. Появление плотноупакованных частиц многогранной формы в исследованных нами 5-ти часовых препаратах, по-видимому, связано с началом образования белковой оболочки, так как гексагональная форма частиц указывает на появление жесткой структуры на поверх-

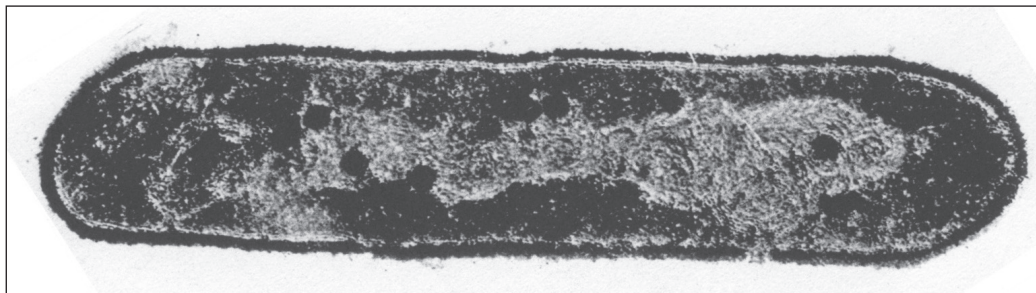


Рис. 8. Листериезная клетка через 5 часов после контакта с фагом. Появление плотноупакованных частиц. Некоторые частицы имеют гексагональную форму [4]

ности головки [2, 36], вызывая преждевременный лизис инфицированных фагом клеток, наблюдали в лизатах кольцевидные образования, состоящие на 85 % из белка и на 15 % из ДНК. Эти образования появлялись лишь при разрушении клеток незадолго до окончания латентного периода. В лизирующихся листериезных клетках Капыриной Н.А. также отмечены кольцевидные структуры, которые по мнению большинства исследователей являются пустыми оболочками фагов.

Заключительный этап созревания бактериальных вирусов – присоединение к образовавшимся головкам хвостового отростка [12] и лизис микробных клеток с освобождением потомства. Поскольку процесс созревания фагов происходит несинхронно в полуразрушенных клетках, наряду с полноценными (в морфологическом отношении) корпускулами, просматривались отдельные структурные компоненты фаговых частиц, не успевшие оформиться в зрелые вирионы.

2. 5. Спектр литической активности

Спектр литической активности во многом зависит от штамма, на котором они размножались – фаг L 4А, полученный их культуры четвертого серотипа (II серогруппа), воспитанный на культуре, также принадлежащий к 4-ому серотипу, лизировал преимущественно штаммы, относящиеся к тому же серотипу. Эти результаты подтверждают справедливость высказываний С. Sword, М. Rickett [61], которые считают, что для получения листериезных бактериофагов с ограниченным литическим действием, необходимо проводить адаптацию фагов к культурам того серотипа, из которого они выделены. Решение этого вопроса заслуживает большего внимания со стороны исследователей, поскольку бакте-

риофаги со строго дифференцированным действием могут найти широкое применение для типирования листериозных культур и явиться заменой трудоемкому и недостаточно специфическому серологическому способу. К тому же метод фаготипирования может оказать помощь при изучении эпизоотической и эпидемиологической обстановки при выявлении первичного источника возбудителя инфекции, позволяет отличать местные штаммы от занесенных извне. По утверждению ряда авторов, культуры, выделенные в одном очаге, проявляют одинаковую чувствительность к определенному набору бактериофагов [4, 16, 61].

2. 6. Специфичность

Интерес к бактериофагам как к диагностическому препарату по-прежнему не ослабевает. Основные требования, предъявляемые к диагностическим бактериофагам, это – высокая активность и строгая специфичность. В отношении листериозных бактериофагов сложилось единодушное мнение о том, что они способны реагировать только с культурами гомологичного вида.

Капыриной Н.А. [4] было проведено определение специфичности листериозных бактериофагов на 152-х штаммах гетерологических культур (табл. 3).

В число исследуемых вошли микроорганизмы, встречающиеся как сопутствующая микрофлора при листериозе (кишечные палочки, сальмонеллы, пастереллы), имеющие морфологическое сходство с *L.monocytogenes* (рожистые палочки, дифтероиды) и антигенное родство (стафилококки). В эксперименте не указаны культуры энтеропатогенных кокков, у которых также установлено серологическое родство с листериями, однако по данным С. Sword, М. Pickett [60], листериозный бактериофаг не взаимодействует с указанными микроорганизмами.

Табл. 3. Проверка специфичности действия листериозных бактериофагов

Наименование культур	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги		
		L 2A	L 3A	L 4A
<i>Staphylococcus</i>	51	–	–	–
<i>Escherichia</i>	43	–	–	–
<i>Corynebacterium</i>	20	–	–	–
<i>Salmonella</i>	12	–	–	–
<i>Erysipelothrix</i>	16	–	–	–
<i>Pausterella</i>	10	–	–	–

Проверка эффективности действия бактериофагов показала, что с помощью набора, включающего три монофага (L 2А, L 3А и L 4А), можно идентифицировать свыше 85 % листериозных культур.

Согласно результатам исследований Капыриной Н.А. [4] для идентификации препараты необходимо использовать в титре не ниже, чем 5×10^8 (для фага L 3А) и 1×10^9 (для фагов L 2А, L 4А). Применение фаголизатов в неразведенном виде значительно повышает процент выявляемых культур (с 67 до 85,9 %). Такое увеличение произошло, по-видимому, за счет культур, лизирующихся без репродукции фаговых частиц. Подобное явление обычно наблюдается при высокой множественности заражения, когда бактерии не в состоянии ликвидировать значительные дефекты клеточной стенки, образующееся в результате действия фагового лизоцима адсорбированных частиц.

При установлении принадлежности микроорганизма характер лизиса, как правило, не играет решающего значения. Большая роль в этом случае придается способности корпускул прикрепляться к клеткам только гомологичного вида. Определенную ценность имеет работа В. Watson, W. Eveland [67], в которой с помощью флуоресцирующих антител, используемых для демонстрации прикрепления фагов к клетке, доказано отсутствие у листериозных бактериофагов способности адсорбироваться на штаммах *Staphylococcus aureus* имеющих антигенное родство с листериями. В экспериментах К.Н. Шлыгиной [13] установлено, что перекрестные серологические реакции у листерий, стафилококков и энтерококков обуславливаются наличием видонеспецифического антигена Рантца, входящего у листерий в состав III-го, а также II и IV факторов. Исходя из этих данных, можно предположить, что указанный антиген не является структурным компонентом фаговых рецепторов, чем, возможно, объясняется высокая специфичность листериозных бактериофагов, по сравнению с серологическим тестом.

2. 7. Фаговары

По данным Капыриной Н.А. [4] 19 рас листериозных бактериофагов после пассирования на культурах-индикаторах приобрели способность лизировать штамм, из которых они получены,

хотя в исходной популяции ни в одном случае не наблюдалось лизиса культуры-продуцента. Это позволило автору отнести указанную группу фагов к V-мутантам (virulent mutant). Образование вирулентных мутантов может является следствием рекомбинаций, в результате гибридизации генома инфицирующего фага и профага, присутствующего в штамме-хозяине [10] или же в результате обмена генетическими маркерами между геномом профага и клетки-хозяина [26].

Проверка спектра литической активности стабилизированных фагов позволила отобрать 7 рас, с помощью которых 67 фагочувствительных культур разделены на определенное число групп. М.К.Щеглова [14], используя 20 рас бактериофагов распределила 25 музейных культур *L.monocytogenes* на 6 основных и 2 допол-

Табл. 4. Чувствительность листериозных культур с фагам [4]*

Фаговары	Исследуемые штаммы листерий	Бактериофаги						
		L 2A	L 3A	L 4A	L 1A	L 14A	L 23A	L 11A
I	9-127, Т-1, 15, 78П, <u>56, 39, 139, 52, Ауф, 1472, 1683, 5Г, 7Г, 8Г, 3, 13, 9-МО, 4ГЦ, МД, 613</u>	+	+	-	+	+	+	+
II	324, 23П, 24618, 3413/86, Куст, 132/134, 47	+	+	-	+	+	-	+
III	34, 728, 4-40	+	+	-	-	+	+	+
IV	<u>1324, 1395, 1611, 14П, 80П, 1621, 3453, P</u>	+	+	-	-	+	-	+
V	6, 7, 4Г, 750	+	+	-	-	+	+	-
VI	382, 1213, 3Г, X ₂ , 178П, 2598	+	-	-	-	-	-	-
VII	9-128 (2ст), Т-2 (2ст), 15/57 (2ст), 16/57 (2ст), 35, 468, 1383	+	-	-	+	+	-	-
VIII	A	+	-	-	+	+	+	(?)
IX	9-72 (4ст), 9-130 (4ст), 137 (4ст), 4с (4ст), 4в (4ст), 129 (4ст), 546 (2сг)	-	+	+	-	-	-	-
	К-1 (II сг), 1221 (II сг)	±	±	±	-	+	-	+
X	163 (II сг)	-	+	-	-	-	-	-
	820 (II сг, 5 ст)	+	+	-	-	-	-	-

* + - положительный результат (лизис культуры);

± - сомнительный результат (слабый или непостоянный лизис культуры);

- - отрицательный результат (отсутствие лизиса);

_ - подчеркнуты штаммы, присланные из одной местности;

() - в скобках обозначена серологическая принадлежность штамма (сг – серогруппа, ст – серотип); остальные культуры принадлежат к I серогруппе.

нительных фаговара. Автором не выявлено четкой корреляции фаго- и сероваров.

Иные результаты получены C.Sword, M.Pickett [60], которые с помощью 5 фагов распределили 127 из 149 листериозных штаммов на 8 фаговаров. Этими исследователями установлена выраженная корреляция фаго- и сероваров. В экспериментах Н.А. Капыриной [4] также получена определенная закономерность чувствительности культур к фагам в зависимости от их серологической принадлежности (табл. 4).

Так культуры, отнесенные к I серогруппе, распределены на 8 «фаговаров», а культуры II серогруппы включены в два фаговара (IX и X). Причем, учитывая некоторые особенности, культуры этих двух «фаговаров» распределены соответственно на 2 подтипа. Как правило, штаммы II серогруппы лизировались фагом L 4A или 3A и лишь в редких случаях фагом L 2A, проявляя одновременно полную инертность к остальным 4-м исследованным бактериофагам. Культуры I серогруппы оказались высокочувствительны к фагу L 2A. Отсутствие данных по развернутой антигенной формуле у большинства исследованных штаммов не позволило провести более глубокий анализ чувствительности культур в соответствии с серотипами.

2. 8. Этапы внутриклеточного развития бактериофагов

При изучении отдельных этапов взаимодействия семи рас листериозных бактериофагов, характеризующих их активность на индикаторных штаммах, выявлено, что они несколько различались между собой по скорости адсорбции – для фагов L 2A, L 3A, L 4A, L 11A, L 14A, константы скорости адсорбции составили $3,6 - 6,9 \times 10^9$, а для L 1A и L23A – $2 - 2,7 \times 10^9$; по величине латентного периода, которая равнялась 50 – 80 мин; периоду лизиса, находившемуся в пределах 50 – 70 мин; и урожаю, в среднем на одну бактериальную клетку приходилось от 25 до 10^6 корпускул. Четкой корреляции между этими признаками у данной группы фагов не выявлено. Только у фага L 23A отмечена самая низкая константа адсорбции, самый длительный латентный период и невысокий урожай, что свидетельствует о более низкой биологической активности указанного фага по сравнению с остальными расами. Бактериофаги, изученные М.К. Щегловой [14] не отличаются по ука-

занным характеристикам: К-адсорбции составляла $1,5 - 9 \times 10^9$, а урожай – $23 - 10^9$ частиц, но последние имели более длительный латентный период равный $90 - 210$ мин. Согласно указаниям автора пониженная температура ведет к удлинению латентного периода. Так как Н.А. Капырина [4] проводила исследования при $26 - 28^\circ\text{C}$, а не при $22 - 24^\circ\text{C}$, то становится понятным, почему фаги имели более короткий латентный период и период лизиса. На скорость адсорбции и урожай, судя по полученным результатам, температура в пределах $22 - 28^\circ\text{C}$ не оказывает существенного влияния, но при 22°C несколько затягивается процесс репродукции фагов. Морфологически стабильные негативные колонии при этой температуре появляются в более поздние сроки и они имеют меньшие размеры. На этом основании автор считает, что температура $26 - 28^\circ\text{C}$ является наиболее благоприятной для этапа внутриклеточного развития листериозных бактериофагов. Температура 37°C , эффективная для большинства фагов других видов, вероятно, подавляет внутриклеточный цикл развития листериозных бактериофагов [14]. Исследуемые листериозные фаги, на бактериальном газоне при 37°C не образовывали негативные колонии совсем или формировали очень мелкие бляшки, количество которых на $1 - 2$ порядка ниже, чем при $22 - 28^\circ\text{C}$.

В представленных исследованиях J.-W. Kim, S. Kathariou [35] выявлено, что фаги, взаимодействовали с *Listeria monocytogenes* epidemic clone II (ЕСII), выращенных при 37°C , но не в тех случаях, когда бактерии выращивали при более низких температурах (30°C и ниже). ЕСII явился причиной двух широкомасштабных вспышек в США в 1998 – 1999 и 2002, в которые были вовлечены контаминированные готовые к употреблению мясные продукты (хот-доги и деликатесы из индюшатины соответственно). Штаммы ЕСII, выращенные при более низких температурах, были резистентными к фагам независимо от температуры во время инфицирования и последующей инкубации. Напротив, восприимчивость к фагам других проверенных штаммов серотипа 4b (включая эпидемический клон I) и штаммов других серотипов и *Listeria species* не зависела от роста температуры бактерий. Температурно-зависимая фаговосприимчивость бактерий ЕСII единообразно наблюдалась во всех подвергаемых исследованию штаммах ЕСII из места вспышек или из фабрик не зависимо от присутствия или отсутствия кадмий-

резистентных плазмид. Фаги адсорбировали одинаково на бактериях ЕСII, выращенных при 25°C и 37°C, что дает возможность предположить, что сопротивляемость штаммов ЕСII при 25°C не была вызвана неспособностью фага к адсорбции. Даже хотя данные механизмы остаются ясными, температурно-зависимая фагосопротивляемость может представлять важную экологическую адаптацию *L.monocytogenes* ЕСII в переработанных хранящихся при низких температурах пищевых продуктах в среде фабрик, где преобладают сравнительно низкие температуры.

2. 9. Антигенное родство

Ряд работ, в которых нашло отражение изучение вопроса антигенного родства, свидетельствует о том, что фаги различных видов могут в значительной степени отличаться по антигенной активности [1, 3]. Листерийные бактериофаги обладают невысокой антигенной активностью и близки по этому свойству к чумным и псевдотуберкулезным фагам. Согласно данным М.К. Щегловой [14, 15] К-скорости нейтрализации листерийных антифаговых сывороток составили 42,4 – 165,4 мин⁻¹, в опытах Н.А. Капыриной [4] эти величины находились в пределах 30 – 135 мин⁻¹. Сыворотки, полученные S. Jasinska [32], нейтрализовали гомологичные фаги в разведениях 1:50 – 1:400.

Проверка антифаговых сывороток по данным Капыриной Н.А. [4] в перекрестной РН с гетерологичными фагами показала, что по характеру антигенных комплексов исследуемые фаги могут быть расположены на две четко различающиеся группы. У фагов, включенных в группу А, отмечено выраженное антигенное родство. Они нейтрализовались гетерологическими сыворотками в 57 – 97 %. Фаг L 4A отнесен в группу В, поскольку он не снижал своей активности в присутствии сывороток, нейтрализующих фаги первой группы. Антифаговая сыворотка к фагу L 4A также не обладала выраженной активностью в отношении остальных 6 рас. Можно предположить, что фаг L 4A обладает специфическими белковыми структурами, которые, по всей вероятности, комплементарны антигенным комплексам бактериальных клеток, относящихся ко II-й серологической группе. Белки фагов L 2A, L 11A, L 23A и L 1A более специфичны в отношении бактериальных антигенов I-ой серогруппы. Фаги L 3A, L 14A занима-

ют как бы промежуточное положение между двумя специфическими группами. Указанные результаты [4] являются еще одним подтверждением того, что у листериозных бактериофагов, возможно, существует определенная связь активности фагов с антигенной структурой бактериальных клеток.

Деление фагов на 2-е группы по антигенным свойствам произошло в соответствии с показателями их чувствительности к температуре 58°C. Серологически родственные фаги группы А обладали повышенной чувствительностью к температуре. За 20 мин. они теряли активность 85 – 98 %. К-инактивации у данных фагов находились в пределах 0,1 – 0,2 мин⁻¹. Для фага L 4А величина К составляла 0,02 мин⁻¹. Статистическая обработка результатов позволила автору установить достоверность различий показателей термоинактивации фага L 4А по сравнению с остальными 6-ю расами, но таковой не установлено среди фагов группы А. Если учесть, что термоинактивация связана, в основном, с денатурацией белков [1], то полученные результаты являются еще одним подтверждением качественного отличия структуры белковых компонентов фагов этих двух групп. Бактериофаг L 4А, кроме того, имел самый короткий латентный период, на газоне индикаторного штамма образовывал более мелкие негативные колонии и отличался от остальных фагов по спектру активности, лизируя только культуры II серогруппы.

В отношении фагов L 2А, L 3А, L 11А, L 14А и L 23А отмечено, что они родственны, но не идентичны, поскольку среди них выявлены различия в морфологии негативных колоний, спектре литической активности, а также в показателях биологических свойств [4].

Основываясь на результатах проведенных рядом авторов исследований можно сделать вывод, что для листериозных бактериофагов в качестве основных таксономических критериев могут быть использованы такие признаки, как антигенные свойства, чувствительность к повышенной температуре, а дополняющие их – спектр литической активности и морфология негативных колоний. Последний признак будет иметь большую ценность при выделении чистых линий бактериальных вирусов, а также в качестве ориентировочного критерия оценки активности фагов в отношении индикаторного штамма.

ГЛАВА 3

БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ФАГОВ ЛИСТЕРИЙ

3. 1. Моно/смесь фагов

Серия наблюдений показала, что диагностические бактериофаги лучше использовать по отдельности. При проверке действия фагов в смеси наблюдалось отсутствие или резкое снижение их активности. Некоторые авторы подобный депрессионный эффект связывают с явлением интерференции между представителями серологически неродственных групп. В опытах Н.А. Капыриной [4] отсутствие реакции наблюдалось обычно на культурах, лизирующихся серологически родственными фагами (L 2А, L 3А), поэтому механизм подавляющего действия у них должен быть иным. Как известно бактериофаги L 2А и L 3А представляют собой мутанты умеренных фагов с пониженной лизогенизирующей способностью. По всей вероятности, для этих фагов характерным является локализация изменений в различных участках группы сцепления С. Не исключено, что у одного фага они затронули детерминанты, контролирующие процессы, связанные с ранними функциями, осуществляющие лизогенизацию, а у другого – с поздними. Смешанное заражение в таких случаях может привести к образованию рекомбинантов с исходным генотипом, обуславливающим редуцированную реакцию.

Предлагаемый Капыриной Н.А. набор бактериофагов способен выявлять культуры, различающиеся по антигенным свойствам независимо от сроков и источника выделения. Находящиеся среди исследуемых листериозных культур легко диссоциирующиеся штаммы в большинстве своем также оказались высоко чувствительными к некоторым из испытываемых бактериофагов.

3. 2. Хранение биопрепарата

Проверке некоторых свойств высушенных препаратов показала, что листериозные бактериофаги одинаково хорошо переносят лиофилизацию при использовании в качестве стабилизирующего материала желатин-сахарозной среды и сухого обезжиренного молока. В указанных средах 86 % фагов снизили титр не более чем на 1 lg, 5,6 % не потеряли активности совсем и только 8,4 % снизили ее на 2 lg. У подавляющего большинства фагов снижение титров обычно имело место в процессе высушивания. Последующее хранение фагов на протяжении 12 мес. (срок наблюдения) при +4°C не оказало существенного влияния на величину титров большинства фагов, лишь у 6-ти из 71-ого фага отмечено дополнительное снижение активности за этот период. На примере фага L 8A, находившегося после высушивания в различных температурных условиях (+4°C, +22°C и +37°C), показано, что высушенные препараты могут также храниться и при комнатной температуре. У высушенных бактериофагов при хранении не выявлено различий в спектре литической активности. На основании полученных данных можно заключить, что метод лиофилизации вполне пригоден для сохранения матричного клона листериозных бактериофагов, но для стабилизации свойств фагов, предназначенных для практического использования.

Дальнейшие исследования в направлении поисков более эффективных стабилизаторов и проверки действия на фаги различных режимов высушивания, возможно, позволяет выявить оптимальные условия, при которых число инактивированных фаговых корпускул в процессе сушки будет сокращено до минимума.

ГЛАВА 4

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Специфическое взаимодействие бактериофагов с бактериальной клеткой-хозяином дает возможность использовать их для идентификации бактерий. В отличие от искусственно созданных систем для определения и дифференциации различных структур бактериальных клеток, основанных на использовании антител или на амплификации нуклеиновых кислот, система бактерия-бактериофаг естественно возникла в ходе эволюции, когда бактериофаг распознает рецепторы и адсорбируется исключительно на клетках своего хозяина [5].

Взаимодействие используется в целом ряде различных методик специфического определения и дифференциации штаммов бактерий. Одной из первых методик практического применения стала фагоидентификация – метод, в котором фаги используются для выявления их способности лизировать гомологичные бактериальные культуры и образовывать хорошо видимые на матовом фоне глубинного роста бактерий бляшки.

По выполнению метод фагоидентификации не представляет особых трудностей. Для постановки пробы с бактериофагом используются общедоступные питательные среды (агар и бульон Мартена).

Четко выраженная положительная реакция освобождает практических специалистов от проведения трудоемкого бактериологического исследования, требующего до 8 – 14 суток, который к тому же не всегда дает положительный результат. Получение сомнительного или отрицательного результата при испытании культур с бактериофагом требует проведения полного бактериологического исследования штаммов.

Набор листериозных бактериофагов (авторы – Капырина Н.А., Бакулов И.А.), включающий три монофага (L 2А, L 3А, и L 4А) рекомендован в практику работы диагностических лабораторий в качестве вспомогательного теста, позволяющего за довольно короткий срок (не более 24 часов) установить принадлежность возбудителя к роду *Listeria*.

По данным Estela L.A. и Sofos J.N. [25] из 225 изолятов *Listeria* 199 имели одинаковые бактериофаговые модели как традиционные [42], так и более простые для применения «реверсивные» [38] процедуры фагоидентификации. Пять имели различные фаговые реакции, а остальные 21 изолята были нетипируемыми. Общий уровень типированности данного исследования составил 90,7 %, 97,6 % из типизируемых изолятов показали одинаковые фаговые модели посредством обеих процедур.

Для идентификации листерий M.J. Loessner была предложена модифицированная техника [40], названная реверсивной процедурой фагоидентификации. Готовые к использованию чашки для типирования были подготовлены посредством предварительного внесения суспензии фагов на пластины трипозного агара. Новая процедура предлагает ряд значительных преимуществ по сравнению с традиционным методом, будучи более надежной, эффективной и удобной для использования. Более 1000 штаммов *Listeria* было типировано при помощи указанного метода, посредством применения расширенного ряда 21 родоспецифчных бактериофагов. Общая способность идентификации штаммов составила 89,5 %.

Mee-Marquet N. van der, Loessner M., Audurier A. [43] оценили семь экспериментальных фагов для включения в международный свод фагов для подтипирования *Listeria monocytogenes*. Результаты показали, что включение пяти фагов из экспериментальных внесло существенный вклад в типированность и уровень дифференциальности системы.

При использовании идентичных фагов результаты фагоидентификации хорошо воспроизводятся в лабораториях любого уровня. Простота применения и дешевизна метода способствуют тому, что по настоящее время он остается в числе самых широко используемых методов идентификации бактерий.

ГЛАВА 5

ФАГОТИПИРОВАНИЕ

Для облегчения эпидемиологической работы по обнаружению и слежению за листериозными инфекциями необходимо знать маркеры штаммов *Listeria*. Одной из возможностей является фаготипирование *Listeria* [9, 51].

А. Audurier и соавторы [43] описали систему для фаготипирования штаммов *L.monocytogenes* с использованием 15 фагов, выделенных из лизогенных штаммов. С помощью такого набора фагов 238 из 350 штаммов (68 %) можно было классифицировать на 22 типа. В то же время они опубликовали кодовую систему для оценки результатов фаготипирования. Этот «октальный код» не только рациональный, но и полезный метод, облегчающий сравнение изучаемых штаммов с помощью компьютера.

Те же авторы [44] исследовали 823 штамма *Listeria*, полученные во Франции, с помощью 20 фагов. Смогли провести типирование 645 из всех штаммов (78,4 %). 131 штамм принадлежал к серотипу 1/2, 499 к серотипу 4, 5 к серотипу 5 и 10 к другим серотипам. Удалось лизотипировать 57,7 % штаммов серотипа 1/2, 88 % штаммов серотипа 4, все штаммы серотипа 5 и менее половины других серотипов (10 из 24 штаммов).

Для оценки пригодности этого метода В. Ralovich [51] исследовал литическую модель 247 штаммов *Listeria*, выделенных из разных источников – людей, животных, воды – в Венгрии. Было типировано 39,6 % всех штаммов. Такой результат несколько низок, поэтому для использования этого метода требуется больше фагов. В последующих исследованиях использовались 27 фагов *Listeria* и определили 34 литические модели (табл. 5).

Было типировано 36 (40,9 %) из 88 штаммов *Listeria* серотипа 1/2 а, а остальные представляли 14 типов фагов. 77,7 % из 18 штаммов были отнесены к серотипу 4. Они принадлежали к 10 типам фа-

гов. 3 штамма *L.monocytogenes* серотипа 5 можно было разделить на 2 типа фагов, 2 из них с одной и той же литической моделью были выделены в Венгрии, третий с другим типом фага выделен в Болгарии. 36 штаммов принадлежали к серотипу ба и бв.

Литическую модель можно было определить у 20 штаммов, 16 штаммов остались нетипируемыми. 20 штаммов можно было распределить на 10 типов фагов. Кроме того, были исследованы

Табл. 5. Связь между серотипом и фаговым типом штаммов [51]

Серотип, серовар или субсеровар	Тип фага	Количество штаммов
I / 2a I, II, /III/	77 100 0000	1
	74 000 0000	2
	73 100 0000	1
	54 000 0000	1
	41 000 0000	2
	40 000 0000	8
	34 000 0000	1
	33 000 0000	1
	20 000 0000	2
	13 000 0000	6
	10 000 0000	3
	04 000 0000	1
	02 000 0000	3
	01 000 0000	4
нетипируемый	5	
4 ab /III/, V, VI, VII, IX	00 000 0400	1
	00 605 0040	1
	00 400 0004	1
	00 253 0000	2
	00 211 0000	1
4 /III/, /V/, VI, VII	00 201 4000	1
	00 201 0000	4
	00 200 0000	1
	00 001 0004	4
	00 001 0000	1
	нетипируемый	2
5 /III/, /V/, VI, VIII, X	00 000 3737	2
	00 000 3714	1
	00 060 0004	1
	00 000 3232	1
	00 000 2737	1
	00 000 2707	1
	00 000 0040	2
	00 000 0004	3
	нетипируемый	7
	00 000 2737	1
	00 000 2004	2

6b*	00 000 0420	2
	00 000 0200	1
	00 000 0010	3
	00 000 0004	2
	нетипируемый	9
V, VI, XIV, XV**	00 000 0040	2
	00 000 0004	2
	нетипируемый	10
V, VI, IX, XIV, XV**	00 000 0040	1
V, VI, IX, X**	00 000 0420	1
V, VI, X, XIV*	00 000 0004	1

* - штаммы с антигенами, предложенными Seeliger, Schoofs (1979), принадлежат к серотипу 6a и 6b

** - невалифицированные серовары (субсеровары)

еще 18 других штаммов *Listeria*. Не было определено к каким серотипам, сероварам они принадлежали. Можно было определить литическую модель 7-ми из всех штаммов.

Результаты свидетельствуют о том, что между антигенной структурой и фаговым типом данного штамма *Listeria* существует специфическая связь.

Когда данные типирования фагов венгерских штаммов *Listeria* сравнивают с таковыми французских штаммов, оказывается, что соотношение типизируемых и нетипизируемых штаммов различно в двух странах (табл. 6).

Эти результаты позволяют допустить, что между штаммами *Listeria* могут существовать небольшие различия в разных странах, чему можно приписать патологические и эпидемиологические различия.

S. Ortel [46] тоже использовал систему типирования фагов и обнаружил, что эпидемиологическая ситуация и литическая модель штаммов *Listeria*, выделенных в течение 1957 – 1979 гг. в Германии, изменилось. Кроме того, ежегодно менялась частота обнаружения *Listeria* с одним и тем же типом фага.

McLauchlin J., Audurier A., Taylor A.G. [41] исследовали штаммы *Listeria monocytogenes*, выделенные в период 1967 – 1984 от 475 человек, зараженных листериозом, отнесенные к одной из трех серогрупп (1/2, 3 или 4). Штаммы были фаготипированы при помощи 28 фагов для выявления трех аспектов эпидемиологии листериоза. У троих пациентов страдающих листериозом, от 3 месяцев до 2 лет, были обнаружены штаммы одной и той же серогруппы, неразличимые типированием. Имело место десять случаев возможной перекрестной инфекции между парами новорожденных в одной боль-

нице; первый ребенок заболел в день рождения или на следующий день после него, а второй ребенок заболел через 8 – 12 дней после контакта с первым. В каждой паре *L.monocytogenes* принадлежали к одной серогруппе и были неразличимы типированием.

Три группы случаев, возможно, были вызваны типичным источником инфекции. Штаммы *L.monocytogenes* в 10 из 11 случаев листериоза в области Карлайл в июле – декабре 1981 принадлежали к одной серогруппе; девять штаммов являлись нетипируемыми. Вторая группа случаев включала взрослых людей, находившихся в больнице, и третью пару – новорожденных детей, которые заболели вскоре после рождения. В каждой группе штаммы принадлежали к одной серогруппе и были неразличимы типированием. Авторы предполагают возможность общего источника инфекции, т.к. два последних случая зафиксированы в короткий временной период, когда было выделено необычайно высокое количество штаммов листерий, которые не различались фаготипированием.

М. J. Loessner, M. Busse [38] была создана схема типирования бактериофагов для выделения изолятов *Listeria* из молочных и других пищевых продуктов. Для типирования было использовано 16 изолятов фагов выделенных из природных источников и из лизогенных штаммов. Согласно их литическим спектрам, изоляты были разделены на четыре группы. До сих пор наблюдалась 41 четкая модель (структура) лизиса, когда данный набор был использован в типировании 57 определенных эталонных штаммов, представляющих пять утвержденных видов и 16 серогрупп в дополнение к 454 изолятам *Listeria* преимущественно пищевого происхождения. В целом, типлируемость составляла 84,5 %; т.е., штамм был лизирован не менее чем одним фагом при 100 % типовом тестовом спаде. Штаммы, принадлежащие к серовару 3, были в основном сопротивляемы к лизису внесенных фагов. Результаты оказались высоко воспроизводимыми, что было подтверждено посредством ретипирования несколько недель спустя. Некоторые фаги, изолированные из природных источников, показали более широкий литический спектр чем фаги, изолированные из лизогенных штаммов. В соответствии с этим, фаги были обнаружены в различных кластерах в созданной компьютером карте систем связи. Видовая специфичность и сероварная специфичность литической реакции не была выявлена. Ни один из

Табл. 6. Соотношение типизируемых и нетипизируемых штаммов листерий в двух странах [51]

Серотип	Страна	Типизируемые штаммы (коэффиц.)	Нетипизируемые штаммы	Всего
1/2	Венгрия	36 (10,40*)	52	88
	Франция	131 (10,57**)	96	237
4	Венгрия	14 (10,77*)	4	18
	Франция	499 (10,88**)	68	567
5	Венгрия	2	–	2
	Франция	5	–	5
Другие	Венгрия	27 (10,47)	30	57
	Франция	10 (10,41)	14	24

* - разница значительна, ** - разница незначительна; $\chi^2=7,186$ $p<0,01$

фагов не был способен лизировать штаммы *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* или *Jonesia denitrificans*. Система фаготипирования может предоставить важную информацию для способов обнаружения и устранения источников контаминации вида *Listeria* в оборудовании молочных заводов.

Система типирования J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor [42] для штаммов *Listeria monocytogenes* основывается на литических способностях 28 фагов и была проанализирована при помощи ряда штаммов изолированных в Соединенном Королевстве и проверены на «слепом эксперименте». Система оказалась высоко воспроизводимой и избирательной. 64 % из проверенных штаммов удалось типировать.

Комбинированный анализ, проведенный N. van der Meer-Marquet, A. Audurier [44] 5179 фаговых реакций 20 штаммов *Listeria monocytogenes* на протяжении 14 лет и результаты фаготипирования 2659 и более штаммов *L.monocytogenes* позволил оценить специфичность литического спектра и разнообразие литических реакций 35 фагов. Данное исследование включало 26 фагов, рекомендованных для международного метода типирования фагов, разработанного в 1985 году J. Roscourt [et al]. Авторами внесены предложения для модификации системы с целью производства оптимального набора бактериофагов для рутинного использования.

Таким образом, метод фаготипирования позволяет проводить более глубокий эпидемиологический анализ вспышек, может оказать неоценимую помощь при установлении связи между отдельными вспышками и спорадическими случаями болезни, а также при выявлении источника возбудителя инфекции.

ГЛАВА 6 ДЕТЕКЦИЯ

Впервые теоретическое и экспериментальное обоснование методу индикации бактерий с помощью реакции нарастания тира фага (РНФ) дали В.Д. Тимаков и Д.М. Гольдфарб в 1955 году (рис. 9).

Полученные результаты по изучению специфичности бактериофагов L 2А и L 4А позволили перейти к разработке оптимальных условий постановки РНФ для обнаружения возбудителя листериоза в различных субстратах.

При разработке оптимальных условий проведения РНФ необходимо наиболее точно подобрать следующие параметры:

- подобрать питательную среду, температуру и условия инкубирования при постановке РНФ;
- определить количественный показатель, имеющий диагностическое значение;
- определить оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями.

В первую очередь для постановки РНФ Т.И. Кольпиковой [6] были испытаны различные питательные среды. На основании этих экспериментов было показано, что среда, содержащая 0,5 % глюкозы обеспечивает лучшую репродукцию фаговых корпускул и позволяет учитывать результаты РНФ на 6 часов раньше, чем на средах без содержания глюкозы.

Указанные выводы о зависимости эффективности в проведении РНФ от используемой питательной среды совпадают с данными Н.А. Капыриной [4]. Она считает, что инкубирование листерий зараженных фагом, в обогащенной среде, к числу которых относится и бульон Мартена с глюкозой, способствует не только интенсификации внутриклеточного цикла развития вирусных

частиц, но и повышает количественное содержание вновь образовавшихся потомков фага в клетке.

Использование при постановке РНФ таких, общедоступных для любой бактериологической лаборатории, питательных сред как: МПБ 1,5 и 0,7 % МПА с 0,5 % глюкозой значительно упрощает и облегчает применение РНФ в сравнении с методами бактериологического исследования.

В последующих опытах Т.И. Кольпикова [6] определяла количественный показатель листериозного фага, имеющий диагностическое значение. Из литературных источников [11] известно, что при обнаружении бактерий РНФ считают отрицательной, если увеличение количества фага в опытной пробе по сравнению с контрольной составляет до 3 раз. Увеличение количества фага от 3 до 5 раз учитывается как слабо положительная реакция; от 5 до 10 раз – положительная, свыше 10 – резко положительная.

Для определения количества фага, имеющего диагностическое значение при обнаружении возбудителя листериоза, было проведено более 200 исследований различных субстратов (МПБ, вода, почва) контрольных и инфицируемых культурой листерий обеих серогрупп в концентрации от 10^1 до 10^8 м.к. в мл.

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ положительна в случае, если количество «стерильных пятен» на чашках Петри, засеянных из опытных проб, было в 5 раз больше по сравнению с контролями титра фагов.

Выбранный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании, при которых возможно выявление невысокой степени увеличения количества фага. Достоверность РНФ определяли путём выделения возбудителя листериоза бактериологическим методом исследования и специфичностью РНФ с контрольными пробами.

Выбрав питательную среду для постановки РНФ и определив количество фага, имеющее диагностическое значение при обнаружении возбудителя листериоза в исследуемых субстратах, Кольпиковой Т.И. [6] были начаты исследования по разработке режима РНФ. Для этой цели были поставлены эксперименты с использованием двух основных модификаций, заключающихся в

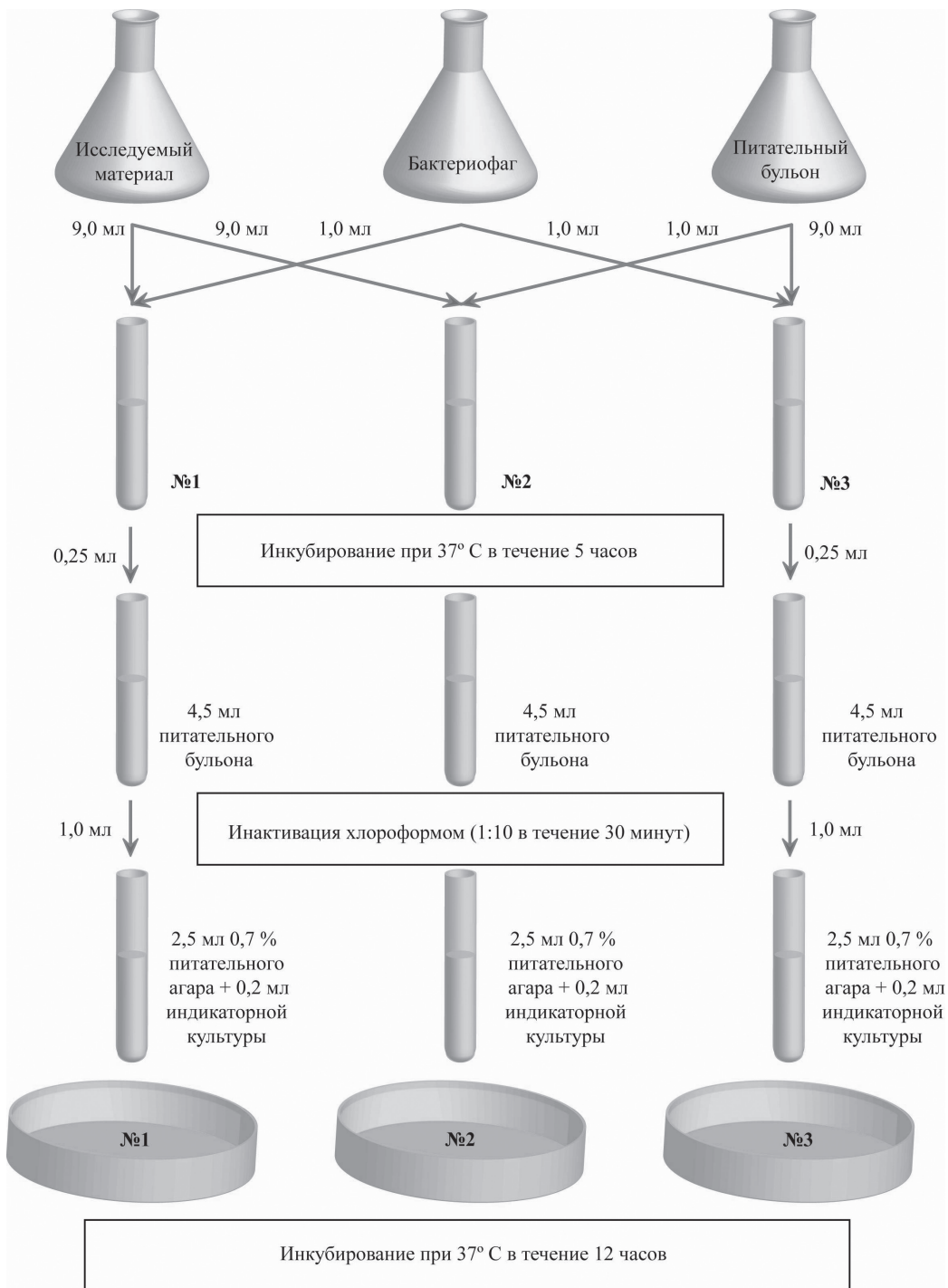


Рис. 9. Схема постановки реакции нарастания титра фага [11]

предварительном проращивании или увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом.

При отработке вопросов предварительного подращивания исследуемого материала использовали 7 режимов, различающихся по времени данного процесса (1, 2, 3, 4, 16 часов) и условиям аэрации (шуттелирование). После предварительного подращивания к исследуемому субстрату добавляли определённое количество фага и смесь выдерживали при температуре 28°C в течение 8 часов. В результате этих исследований было показано, что при подращивании изучаемого материала в течение 16 часов при температуре 37°C РНФ оказалась менее чувствительной, так как позволяла обнаруживать 10^5 м.к. в мл. Вероятно, при столь длительной экспозиции (16 часов) культивирования при температуре 37°C сильно развивается посторонняя микрофлора, которая оказывает антагонистическое действие на листерии.

При подращивании исследуемого материала в течение 2-х часов при шуттелировании или 3 – 4 часа без шуттелирования при температуре 37°C, листерии обнаруживались в исследуемом материале в количестве 10^3 м.к./мл. Таким образом, эти режимы подращивания были выбраны как оптимальные. Для выяснения оптимального времени контакта исследуемого материала с фагом было испытано 5 параметров. В результате этих исследований установлено, что при культивировании исследуемого субстрата с фагом в течение 6 часов при температуре 28°C заметное нарастание количества листериозного фага наблюдается при концентрации гомологичных бактерий не менее 10^5 в мл. Удлинение сроков инкубации (16 – 24 часа) дало возможность получить увеличение количества фага в пределах, имеющих диагностическое значение уже при концентрации листерий 10^2 до 10^3 м.к. в мл.

Исходя из выше изложенного можно предположить, что значение инкубации смесей в течение 16 – 24 часов при температуре 22°C или 28°C сводится к тому, что за это время бактерии, находящиеся в исследуемом субстрате в очень малых количествах, размножаются. В результате этого между добавленным индикаторным фагом и бактериями устанавливаются такие количественные соотношения, при которых вероятность встречи между ними повышается, и бактерии инфицируются фагом. Отсюда вытекает, что исход реакции зависит не только от свойств ин-

дикаторного фага, но и от биологических особенностей данного возбудителя, обнаруживаемого с помощью РНФ.

В.А. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом [11] было показано, что чувствительность реакции является функцией времени и концентрации бактерий. Из этого следует, что, как и при выявлении других микроорганизмов, чувствительность РНФ при экспериментальном листериозе является функцией времени и концентрации бактерий. Удлинение срока контакта исследуемого субстрата с фагом способствует выявлению бактерий при незначительном содержании их в объекте исследования. Таким образом, из числа испытанных режимов наиболее быстрым, но менее чувствительным, является подращивание исследуемого материала в течение 3 часов при температуре 37°C с последующим контактом исследуемого материала с фагом при температуре 28°C в течение 8 часов. Учёт результатов проводят в этом случае через 24 часа. Бактерии удается обнаружить в количестве 10^3 м.к./мл /г/.

Наиболее чувствительным, но более длительным, методом является выдерживание исследуемого материала с фагом (без предварительного подращивания) в течение 24 часов при комнатной температуре или температуре 28°C. При данном режиме выявляются листерии в концентрации 10^2 м.к./мл/г, на проведение РНФ затрачивается не более 48 часов. Этот метод наиболее удобен в практических условиях лаборатории.

Проведённые исследования в процессе изучения возможности использования РНФ для обнаружения листерий в органах и объектах внешней среды показывают следующее:

Во-первых – РНФ как метод диагностики чувствительней бактериологического исследования при обнаружении возбудителя листериоза в различных субстратах. Это выражается в большей частоте положительных результатов РНФ по сравнению с бактериологическим методом исследования. Положительные результаты появляются при наличии такого количества листерий, которое бактериологическими исследованиями не выявляется.

Во-вторых – РНФ является ускоренным методом диагностики. Она позволяет за относительно короткий срок (24 – 48 часов) обнаружить возбудителя листериоза в присутствия посторонней микрофлоры.

В-третьих, при помощи РНФ можно определить серогрупповую принадлежность листерий, которыми вызвана вспышка заболевания, без выделения культуры в чистом виде.

Указанная методика постановки РНФ даёт положительные результаты с использованием листериозных монофагов L2A и L4A.

Раздельное применение монофагов вызывает ряд затруднений технического характера связанных, в частности, с объемом исследований и необходимостью расхода большого количества лабораторной посуды реактивов и питательных сред. В связи с этим, с целью сокращения объёма исследований и одновременного выявления листерий 1 и 2 серогрупп рекомендуем использовать технику постановки РНФ смешанными листериозными фагами. Исходя из того, что листериозные монофаги L 2A и L 4A строго специфичны, они не интерферировали. При использовании смеси фагов в РНФ для обнаружения возбудителя листериоза были проведены исследования МПБ, инфицированного отдельно культурами листерий 1 и 2 серогруппы, *E.coli*, *Streptococcus albus* и *Staphylococcus aureus*, а так же почвы песчаной и воды водопроводной, инфицированных культурой листерий 1-й серогруппы (штамм 9-127) в концентрации $8 \times 10^2 - 8 \times 10^7$ м.к./мл /г/ и культурой листерий и 2-й серогруппы (штамм – 9-72) в концентрации $10^2 - 10^8$ м.к. на мл/г. Параллельно для исследования этих проб использовали РНФ с монофагами.

Проведенные Кольпиковой Т.И [6] исследования позволили установить, что листериозные бактерии могут быть выявлены при постановке РНФ как с монофагами, так и со смесью фагов. Кроме того, использование смеси фагов позволяло определять листерий как 1, так и 2 серогрупп. Тогда как с помощью монофагов выявляли листерии по серогруппам.

При использовании монофагов и их смеси в РНФ при исследовании с гетерологическими бактериальными культурами ни в одном случае не было увеличения количества фага, что указывает на высокую специфичность данных биологических агентов и методики их использования.

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является разработка новых подходов для детекции бактерий с помощью бактериофагов [48, 56, 66].

Одним из таких является метод детекции клеток *Listeria* в смешанной бактериальной культуре с участием кодируемых бактери-

офагами гидролаз пептидогликана (эндолизинов) с применением флуоресцентной микроскопии. Эндолизины бактериофагов A118 и A500 карбоксиконцевых доменов клеточной стенки (cell wall-binding domains, CBDs) *Listeria* были генетически объединены с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein, GFP). При их взаимодействии с бактериальными клетками *Listeria* уже через 30 секунд образуется устойчивый комплекс, который делает возможным идентификацию патогенов [59, 22].

Rees С.Е. and Dodd С.Е. [53] разработали чувствительный метод для индикации клеток *Listeria* в смешанном образце. Для детекции использовали фаги, вызывающие лизис бактерий, затем с помощью биолюминесценции измеряли АТФ лизированных бактерий. Предел определяемых клеток составил 10^3 клеток в 0,1 мл образца.

Бактериофаг A511 является вирулентным миовирусом, инфицирующим около 95 % всех используемых в исследовании штаммов *Listeria monocytogenes* [54]. Использование люциферазного репортерного фага, созданного на основе A511, позволило осуществлять детекцию *Listeria monocytogenes* за 24 часа, что значительно быстрее по сравнению с классическим чашечным методом [55].

Paoli G.C. с соавт. [47] применяли библиотеку Griffin.1 для получения набора бактериофагов, взаимодействующих с целыми клетками *Listeria monocytogenes*. С помощью данного метода была доказана возможность детекции различных серотипов бактерий *Listeria monocytogenes*.

Антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, успешно используются для идентификации бактерий [47, 50].

Система New England Biolabs 12-mer фагового дисплея была использована для получения пептидов, соответствующих бактериям вида *Listeria monocytogenes* [31].

Другие исследования показывают возможность применения фрагментов антител, произведенных с помощью библиотеки фагового дисплея, для иммуно-электрохимической детекции клеток *Listeria monocytogenes* [52].

Несмотря на сравнительно большое количество работ, посвященных детекции микробных клеток с помощью бактериофагов, дальнейшая их разработка и усовершенствование остается одной из актуальных проблем в современной микробиологии и биотехнологии.

ГЛАВА 7 ФАГОВЫЙ БИОПРОЦЕССИНГ

Бактериофаги представляют собой хороший способ борьбы с пищевыми патогенами без влияния на качество продукта.

Guenther S., Loessner M.J. [28] использовали широкий спектр листериозных штаммов, вирулентные фаги *Listeria* A511 для контроля за *L.monocytogenes* во время фазы производства и созревания обоих видов мягких сыров – белый сыр с плесенью (типа камамбер) и рассольный сыр с красной поверхностью (типа лимбургерского). Поверхность молодого незрелого сыра была инокулирована 10^1 – 10^3 CFU/cm² штаммами *L.monocytogenes* Scott A (серовар 4b) или CNL 103/2005 (серовар 1/2a). После этого был внесен фаг в определенное время единичными или повторяющимися обработками при 3×10^8 или 1×10^9 PFU/cm². При помощи Scott A (103 CFU/cm²) и единичной дозы A511 (3×10^8 PFU/cm²) на сыре типа камамбер к концу 21 дня периода созревания количество жизнеспособных колоний уменьшилось в 2,5 раза. Повторное применение фагов не ингибировало бактерии, в то время как единичная более высокая дозировка (1×10^9 PFU/cm²) оказалась более эффективной. На рассольном сыре, зреющем 22 дня, сумма клеток листерий уменьшилась в более чем 3 раза. Повторное применение A511 позже отсрочило повторный рост *Listeria*, но не повлияло на сумму бактерий после 22 дней. С более низкой изначальной контаминацией *Listeria* (10^1 – 10^2 CFU/cm²) количество жизнеспособных клеток выпало ниже границы определения, соответствуя более чем 6 уровням понижения в сравнении с контрольными. Результаты исследований ясно показывают потенциал использования бактериофагов в биоконтроле *L.monocytogenes* в мягком сыре.

Индустрия свежесрезанной продукции является самой быстрорастущей на рынке розничной продажи, обеспечивая покупателя питательной пищей. Однако свежесрезанные фрукты и овощи вызывают опасения по поводу безопасности, так как уязвимая материя может гораздо легче быть колонизирована патогенными бактериями по сравнению с неповрежденными (целостными) продуктами. Это вызвано более высокой доступностью питательных веществ на срезанной поверхности и более высоким потенциалом для контаминации из-за возросшего количества обращения.

V. Leverentz [et al.] определили [20], что внесенные культуры *Listeria monocytogenes* выживали и возрастали только незначительно на свежесрезанных яблоках Red Delicious, которые хранились при температуре 10°C, и значительно возрастали на свежесрезанных сладких дынях, которые хранились при 10°C более 7 дней. В дополнение были проведены исследования по изучению эффективности литичных *L.monocytogenes* посредством двух методов применения фагов, распылением и внесением пипеткой на популяции *L.monocytogenes* на искусственно контаминированных свежесрезанных дынях и яблоках. Смесь фагов сократила популяции *L. monocytogenes* до 2,0 к 4,6 lg на дынях. На яблоках сокращение составило 0,4 lg. В комбинации с низином (бактериоцин), фаг сократил популяции *L.monocytogenes* вплоть до 5,7 lg на кусках дыни и до 2,3 lg на яблоках по сравнению с контрольными. Применение одного низина сократило популяции *L.monocytogenes* до 3,2 lg на дынях и до 2,0 на яблоках в сравнении с контрольной группой. Титр фага был стабилен на дынях, но быстро снижался на яблоках. Применение распыления фагов и фагов вместе с низином сократило бактериальное число не меньше, чем пипеточное внесение. Эффективность фагового лечения также зависела от изначальной концентрации *L.monocytogenes*.

Те же авторы [45] вносили на куски сладкой дыни коктейль из фагов за 1, 0,5, и 0 часов до их контаминирования штаммом *L.monocytogenes* LCDC 81-861 и через 0,5, 1, 2, и 4 часа после контаминации. Внесение фагов оказалось более эффективным, когда осуществлялось за 1, 0,5, или 0 часов до контаминации *L.monocytogenes*, сокращая патогенные популяции вплоть до 6,8 log-элементов после 7 дней выдержки. Это указывает на то,

что в коммерческих условиях, если контаминация имеет место во время разрезания, фаг должен быть внесен как можно скорее после того, как было осуществлено разрезание продукта. Однако все добавления фагов, имевшие место от одного часа до времени контаминации до 4 часов после, и все концентрации фагов от 10^4 до 10^8 PFU/ml сокращали бактериальные популяции на кусках дыни. Более высокие концентрации фагов оказались более эффективным в сокращении патогенных популяций. Концентрация фагов примерно 10^8 PFU/ml оказалась необходимой для сокращения патогенных популяций до уровней, где они не поддаются обнаружению сразу после лечения. Рост патогенов был сокращен концентрацией фагов $10^6 - 10^8$ на протяжении 7-дневного периода при 10°C . для того, чтобы усилить эффективность смеси фагов на фруктах с низким рН, таких как яблоки, фаги вносились в комбинации с MnCl_2 . Эта комбинация, однако, не усилила эффективность фагов на ткани яблок. Результаты исследования указывают на то, что эффективность внесения фагов на куски сладкой дыни может быть оптимизирована за счет применения фаговой концентрации не менее 10^8 PFU/ml, вносимой до 1 часа после переработки дыни.

Способность фагов особым образом взаимодействовать с бактерией-хозяином и вызывать ее лизис делает их идеальными антибактериальными агентами. Ряд вариантов применения бактериофагов может быть расширен посредством их фиксации на нейтральных (или инертных) поверхностях.

Н. Anany [et al.] разработали новый метод для направленной фиксации бактериофагов [19]. Данный метод основывается на различиях заряда у бактериальной головы (которая демонстрирует в целом отрицательный результирующий заряд) и хвостового волокна (которое обладает, в целом, положительным результирующим зарядом). Следовательно, более вероятно, что голова будет прикрепляться к положительно-заряженным поверхностям, а хвосты останутся свободными и смогут захватить и лизировать бактерию. В качестве основы для фиксации фага использовались целлюлозные мембраны, которые были изменены так, что заряд их поверхности являлся положительным. Было выявлено, что количество контагиозных фагов, зафиксированных на положительно-заряженных целлюлозных мембранах

было значительно выше, чем на неизменных мембранах. Оказалось, что коктейль из активных против *Listeria* или *Escherichia coli* фагов, зафиксированных на этих мембранах, эффективно контролировал рост *L.monocytogenes* и *E.coli* O157:H7 в готовом к употреблению и сыром мясе, соответственно, при разной температуре хранения и условиях упаковки. Авторы изучили стабильность хранения фагов в целях последующего расширения их промышленного применения. Исследование показало, что в качестве метода по просушиванию фагов может быть применена лиофилизация для сохранения эффективности фагов на новых биоактивных материалах. Отмечено, что использование различных заряда голов и хвостов фагов обеспечило простую технику направленной фиксации подходящую для широкого ряда фагов и позволяющую сохранять их эффективность.

A511:luxAB является рекомбинированной производной от бактериофага, специфичного для рода *Listeria* и характеризующегося широким кругом хозяев, преобразующей бактериальную биOLUMИнесценцию в инфицированные клетки. В исследовании M.J. Loessner, M. Rudolf, S. Scherer [39] была проанализирована его значимость для быстрой и легкой проверки контаминированных пищевых продуктов и природных примеров на наличие присутствия жизнеспособных клеток *Listeria* в сравнении со стандартным чашечным методом. За короткий период до обогащения, длившийся 20 часов, система была способна выявить очень низкий показатель изначальной контаминации в различных пищевых продуктах, искусственно контаминированных клетками *L.monocytogenes*. В сыре рикотта, шоколадном пудинге и капусте менее одной клетки на грамм продукта могло быть ясно идентифицировано посредством сравнения легкой эмиссии фаго-инфицированных образцов с контрольной группой, не содержащей lux фаг. В продуктах, имеющих большой и сложный набор микробной флоры, таких как мясной фарш и мягкий сыр, не менее 10 клеток на грамм требовалось, чтобы произвести положительный биOLUMИнесцентный сигнал. Из 348 потенциально контаминированных естественных пищевых продуктов и природных источников 55 оказались *Listeria* положительными согласно lux-фаговому методу. Стандартный чашечный метод выявил 57 положительных образцов. Наблюдались некоторые различия от-

носителем частных образцов, а именно, lux-фаговая процедура выявила больше положительных образцов среди молочных продуктов и природных образцов, в то время как чашечный метод показал больше контаминированных образцов мяса и птицы. В целом, оба метода продемонстрировали сходство, а именно оказались одинаково чувствительными. Однако минимум времени, требуемый для выявления *Listeria* посредством люциферазо-фаговому анализу составил 24 часа, что гораздо меньше, чем 4 дня, требующиеся для чашечного метода. Описывается количественная техника с тремя параллелями, основанными на использовании A511:luxAB для определения положительных и отрицательных трубок. Метод позволяет быстрее подсчитывать низкие уровни клеток *Listeria* в различных пищевых продуктах на фоне сопутствующей микрофлоры.

По данным A. Holck, J. Berg [30] защитные культуры могут быть использованы в качестве дополнительного барьера вместе с фагами для сокращения роста *Listeria monocytogenes* на разрезанной вареной ветчине. Внесение фагов способствовало в результате быстрой 10 кратной редукции *L.monocytogenes*. После хранения в течение срока от 14 до 28 дней, наблюдалась 100-кратная редукция в образцах с фагами и защитной культурой по сравнению с образцами, которые содержали только фаги.

Были осуществлены исследования [58] по оцениванию безопасности и эффективности Listex™ P100. для удаления контаминации *Listeria monocytogenes* с сырой рыбы. Listex™ не должен представлять токсикологических проблем, так как бактериофаг P100, используемый как активный элемент, не считается вредным ни для потребителей, ни для каких-либо организмов кроме *Listeria spp*, а также в связи с тем, что параметры производства не подразумевают ничего, что может повредить безопасности. Данные исследований показывают, что Listex™ P100 является листерицидным на инокулированных образцах зубатки и лосося, но не предоставляют определенных заключений по поводу эффективности удаления колоний *L.monocytogenes* на сырой рыбе или по поводу роли Listex™ P100 в уровне контаминации *L.monocytogenes* на переработанных продуктах. Оказалось невозможным оценить потенциальное снижение риска листериоза посредством внесения Listex™ P100 в сырую рыбу. Данные оказа-

лись недостаточными для того, чтобы сделать точное заключение о стойкости или активности P100 в находящейся на хранении рыбе. Маловероятно, что предполагаемое использование Listex™ P100 приведет к сокращению восприимчивости к биоцидам и/или сопротивляемости к ключевым терапевтическим противомикробным препаратам. Однако данное заключение нуждается в доказательстве. В наличии нет информации по выживаемости P100 в переработке сточной воды или в окружающей среде, или о потенциальной аккумуляции природных P100-резистентных вариантов *L.monocytogenes*. Пилотные исследования и исследования производственного масштаба должны рассмотреть параметры влияющие на эффективность деконтаминации, а также должны доказать, что применение на сырой рыбе влияет на снижение контаминации *L.monocytogenes* в конечном продукте. Во время хранения рыбы необходимо оценивать выносливость или активность P100, как и потенциальные изменения в численности *L.monocytogenes*. Рекомендуются тесты для изучения потенциального развития сопротивляемости или сокращения восприимчивости к биоцидам и ключевым противомикробным препаратам после применения Listex™ P100. Необходимо отследить и зафиксировать продолжительную эффективность Listex™ P100 против *L.monocytogenes* и потенциал для отбора и доминирования штаммов, естественно-резистивных к P100 .

В значительном количестве экспериментов S. Guenther [et. al.] были оценены вирулентные фаги A511 и P100, обладающие широким кругом хозяев для контроля штаммов *L.monocytogenes* Scott A (серовар 4b) и WSLC 1001 (серовар 1/2a) в различных пищевых продуктах готовых к употреблению, которые известны как частые переносчики патогенна [65]. Образцы пищи были заселены бактериями (1×10^3 CFU/g), затем внесен фаг (3×10^6 до 3×10^8 PFU/g). Образцы хранились при 6°C в течение 6 дней. В жидких продуктах питания, таких как шоколадное молоко и сыр моцарелла, количество бактерий стремительно падало ниже уровня определяемости. На твердых продуктах (хот-доги, резаная индюшати́на, копченый лосось, морепродукты, резаная капуста и салат) фаги могли сокращать число бактерий до 5 lg. Различия экспериментальных условий (продолженное хранение более 13 дней или хранение при 20°C) дали схожие результаты. В целом,

применение больших фаговых частиц (3×10^8 PFU/g) оказалось более эффективным чем более низкие дозы. Внесенные фаги сохраняли большую степень эффективности во время хранения в пище животного происхождения, в то время как растительный материал вызывал инактивацию более чем $1 \log_{10}$. В заключении отметим, что приведенные данные демонстрируют, что вирулентные фаги широкого круга хозяев, такие как A511 и P100, могут быть очень эффективными для специфического биоконтроля *L.monocytogenes* в чувствительных к контаминации готовых к употреблению пищевых продуктах.

Данные ряда авторов [17, 49, 27] подтверждают потенциальную возможность использования бактериофагов для контроля за распространением *L.monocytogenes* в макроорганизме без вреда для комменсальной микрофлоры. Для того чтобы изучить эффективность воздействия бактериофагов на сокращение количества патогенов, мышей кормили через зонд смесью фагов *Listeria monocytogenes* (ListShield) перед пероральным инфицированием *L.monocytogenes*. Лечение при помощи фагов и при помощи антибиотиков было одинаково эффективным в сокращении уровня *L.monocytogenes* во внутренних органах инфицированных мышей. Однако отмечалась значительная потеря веса у мышей из контрольной группы и группы, подвергаемой лечению антибиотиками, которая не наблюдалась у группы, обработанной ListShield. Долговременное (90 дней) лечение ListShield не показало определенных изменений в микрофлоре их кишечника или отрицательного эффекта, наносимого их здоровью.

Исследование R.M. Carlto [et al.] [18] представляет всесторонний подход к характеристике и оцениванию вирулентного фага P100, обладающего широким рядом хозяев и способного инактивировать большинство штаммов *Listeria monocytogenes*. В начале эксперимента была определена полная нуклеотидная последовательность генома P100, прогнозировано кодировать 174 генных продукта и 18 транспортных РНК. Анализ посредством биоинформатики выявил, что ни один из предполагаемых фаговых белков не имеет гомологии с генами или протеинами *Listeria* или какими-либо другими бактериями, которые известны в качестве токсинов или предположительно являются токсинами, являются патогенными факторами, указывают на сопротивляемость к

антибиотикам или известны как аллергены. Затем несколько раз крысам давали оральные токсины, что не произвело каких-либо особых гистологических изменений, не вызвало заболеваемость или смертность. Таким образом, не было выявлено никакого возможного риска, связанного с применением P100 в качестве добавки к пище. В качестве доказательства и для определения параметров применения P100 для пищевых продуктов, чувствительных к контаминации *Listeria*, был произведен рассольный сыр. Сыры были контаминированы низким содержанием *L.monocytogenes* в начале периода созревания, а P100 был внесен на поверхность во время вымачивания. В зависимости от временных точек, частотности и дозы фагов, авторам удалось проследить значительное снижение (не мене 3,5 единиц) или полное уничтожение жизнеспособных клеток *Listeria* соответственно. Не было зафиксировано свидетельств фагового сопротивления изолятам *Listeria* полученным из образцов.

*Результаты многочисленных исследований указывают на то, что бактериофаги могут обеспечить эффективные и безопасные меры для контроля за контаминацией *Listeria* в пищевых продуктах и на оборудовании.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии *Listeria monocytogenes* являются серьезной угрозой для человеческого здоровья. Листерииоз представляет собой значительную проблему не только как классическая нозологическая единица заболевания животных, но и как пищевая инфекция. Листерииозу подвержены 104 вида животных и рыб, в том числе сельскохозяйственные животные, а так же человек. Вспышки листериоза среди сельскохозяйственных животных сопровождаются значительным экономическим потерям, связанным с падежом, лечением больных животных, ограничениями в реализации продуктов животноводства, полученных от больных животных, противоэпизоотическими и противоэпидемическими мероприятиями. Контаминация патогенными листериями продуктов питания (мясных, молочных, рыбных продуктов, а так же овощей и фруктов), обуславливает возникновение вспышек пищевой инфекции, сопровождающихся тяжелыми последствиями зачастую с фатальным исходом у людей с первой группы риска.

Стационарность и широкое распространение возбудителя листериоза обусловлены двумя основными факторами:

- сапронозной природой листерий, у которых естественным резервуаром в природе являются грызуны (в т.ч. синантропные) и почва,

- способностью активно существовать и размножаться не только при температуре тела животного и человека, но и при пониженных температурах (4-20°C) в режимах хранения продуктов питания, в условиях холодильников.

Основными средствами диагностики листериоза в России остаются микробиологические методы, требующие значительных трудовых и временных затрат (выделение культуры возбу-

дителя на селективных средах, биохимическая идентификация и т.п.), достаточно дорогостоящи, малопроизводительны. Поэтому остро встает задача создания современных экспрессных высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики листериоза.

Многие публикации предоставляют список преимуществ и недостатков, связанных с использованием бактериофагов. Что касается «фактов за», например, фаги могут являться бактерицидными, могут увеличивать численность в процессе лечения, только минимально нарушая нормальную флору, являются одинаково эффективными против чувствительных к антибиотикам и нечувствительных к антибиотикам бактерий, часто легко обнаружимы, способны разрушать бактериальные биопленки и могут иметь низкую присущую им токсичность. «Факты против» использования фагов в качестве диагностических и (или) антибактериальных агентов являются относительно минимальными.

Необходимо отметить, что, несмотря на успехи, достигнутые в изучении листериозных бактериофагов, они все еще относятся к числу малоизученных объектов. Поскольку бактериофаги могут оказать большую помощь при диагностировании листериозной инфекции, возникает необходимость более углубленного и всестороннего изучения бактериальных вирусов этого рода (включая бактериофаги других видов *Listeria*: *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*, *L.grayi*, *L.ivanovii*) с применением современных методов исследования, чем и обусловлен выбор дальнейшего направления наших исследований.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Беспалова, И.А. Электронно-микроскопическое изучение развития вирусов бактерий в клетке-хозяине / И.А. Беспалова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1967. – 22 с.
3. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
4. Капырина, Н.А. Изучение листериозного бактериофага и использование его для идентификации возбудителя болезни / Н.А. Капырина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 1973. – 22 с.
5. 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.
6. Кольпикова, Т.И. Использование реакции нарастания титра фага для обнаружения листериоза / Т.А. Кольпикова // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Покров, 1981. – 19 с.
7. Кольпикова, Т.И. Фаготипирование листерий / Т.И. Кольпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 31 – 32.
8. Крылова, М.Д. Фаготипы бактерий / М.Д. Крылова. – М., 1963.
9. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.
10. Раутенштейн, Я.И. Лизогения культур *Bacillus cereus* var. *galleriae* и особенности содержащихся в них фагов / Я.И. Раутенштейн, Н.Г. Мисурева, Л.С. Хачатрян // Микробиология. – 1964. № 33 (6). – С. 1011 – 1018.
11. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – 32 с.
12. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Наука, 1968 – С. 89.
13. Шлыгина, К.Н. Сравнительное изучение лабораторных методов диагностики листериоза / К.Н. Шлыгина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1970. – 21 с.
14. Щеглова, М.К. Листерийный фаг и перспективы его использования / М.К. Щеглова // Автореф. дис. ... докт. медиц. наук. – Саратов, 1969. – 23 с.
15. Щеглова, М.К. Некоторые свойства листериозного бактериофага / М.К. Щеглова // ЖМЭИ. – 1962. № 1.
16. Щеглова, М.К. Фаготипы и серотипы листерий / М.К. Щеглова // Ветеринария. – 1968. № 5.
17. Bacteriophage administration reduces the concentration of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice/ M. Volker [et al.] // *Inter. J. of Microbiol.* – 2010. – P.1 – 6.
18. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R.M. Carlotto [et al.] // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2005. – Vol. 43. – P. 301 – 312.
19. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes / H. Anany [et al.] // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77, N 18. – P. 6379 – 6387.
20. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin / V. Leverentz [et al.] // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, N 8. – P. 4519 – 4526.
21. 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.
22. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes* / R. Henry [et al.] // *Cell Microbiol.* – 2006. – Vol. 8. – P. 107 – 119.
23. Dupuis, M. Genome organization and characterization of the virulent lactococcal phage 1358 and its similarities to *Listeria* phages / M. Dupuis, S. Moineau // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76, N 5. – P. 1623 – 1632.
24. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2012; 10(3):2615, p. 43.

25. Estela, L.A. Comparison of conventional and reversed phage typing procedures for identification of *Listeria* spp. / L.A. Estela, J.N. Sofos // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59, N 2. – P. 617 – 619.
26. Fraser, D.K. Host range mutants and semi-temperature mutants of bacteriophage / D.K. Fraser // *Virology.* – 1957. – Vol. 3, N 3. – P. 527 – 553.
27. Greer, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria / G.G. Greer // *J. Food Prot.* – 2005. – Vol. 68, N 5. – P. 1102 – 1111.
28. Guenther, S. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses / S. Guenther, M.J. Loessner // *Bacteriophage.* – 2011. – Vol. 1, N 2. – P. 94 – 100.
29. Hershey, A.D. Conservation of nucleic acids during bacterial growth / A.D. Hershey // *J. Gen. Physiol.* – 1954. – Vol. 38, N 2. – P. 145 – 148.
30. Holck, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures / A. Holck, J. Berg // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, N 21. – P. 6944 – 6946.
31. Identification of the insulin-like growth II receptor as a novel receptor for binding and invasion by *Listeria monocytogenes* / U. Gasanov [et al.] // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74. – P. 566 – 577.
32. Jasinska, S. Bacteriophage of lysogenic strains of *Listeria monocytogenes* / S. Jasinska // *Acta Microbiol. Polon.* – 1964. – Vol. 13, N 1. – P. 29 – 43.
33. Kellenberger, E. Vegetative bacteriophage and the maturation of virus particles / E. Kellenberger // *Advance Virus. Res.* – 1961. – N 3. – P. 1 – 61.
34. Kim, J.-W. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States / J.-W. Kim, R.M. Siletsky, S.Kathariou // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74, N 21. – P. 6623 – 6630.
35. Kim, J.-W. Temperature-Dependent Phage Resistance of *Listeria monocytogenes* Epidemic Clone II / J.-W. Kim, S. Kathariou // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, N 8. – P. 2433 – 2438.
36. Levinthal, C. The structural development of a bacterial virus / C. Levinthal, H. Fischer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1952. – Vol. 9, N 4. – P. 419 – 429.
37. Loc-Carrillo, C. Pros and cons of phage therapy / C. Loc-Carrillo, S.T. Abedon // *Bacteriophage.* – 2011. – Vol. 1, N 2. – P. 111 – 114.
38. Loessner, M.J. Bacteriophage typing of *Listeria* species / M.J. Loessner, M. Busse // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56, N 6. – P. 1912 – 1918.
39. Loessner, M.J. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511: luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods / M.J. Loessner, M. Rudolf, S. Scherer // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 8. – P. 2961 – 2965.
40. Loessner, M.J. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages / M.J. Loessner // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – Vol. 57, N 3. – P. 882 – 884.
41. 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. – Vol. 22. – P. 367 – 377.
42. McLauchlin, J. The evaluation of a phage-typing system for *Listeria monocytogenes* for use in epidemiological studies / J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor // *J. Med. Microbiol.* – 1986. – Vol. 22 – P. 357 – 365.
43. Mee-Marquet, N. Evaluation of seven experimental phages for inclusion in the international phage set for the epidemiological typing of *Listeria monocytogenes* / N. van der Mee-Marquet, M. Loessner, A. Audurier // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 9. – P. 3374 – 3377.
44. Mee-Marquet, N. Proposals for optimization of the international phage typing system for *Listeria monocytogenes*: combined analysis of phage lytic spectrum and variability of typing results / N. van der Mee-Marquet, A. Audurier // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61, N 1. – P. 303 – 309.
45. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* honeydew melon tissue / B. Leverentz [et al.] // *J. Food Prot.* – 2004. – Vol. 67, N 8. – P. 1682–1686.
46. Ortel, S. Fine structure of *Listeria monocytogenes* under the effect of ampicillin / S. Ortel // *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* – 1972. – N 19. – P. 311 – 323.
47. Paoli, G.C. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes* / G.C. Paoli, C.Y. Chen, J.D. Brewster // *J. Immunol. Methods.* – 2004. – Vol. 289. – P. 147 – 155.
48. Pathogen detection using engineered bacteriophages / A.E. Smart [et al.] // *Anal Bional Chem.* – 2012. – Vol. 402, N 10. – P. 3127 – 3146.
49. Peek, R. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products / R. Peek, K. R. Reddy // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 131. – P. 1370 – 1372.
50. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption / V.Nanduri [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2007. – Vol. 22. – P. 986 – 992.
51. Ralovich, B. Listeriosis research. Present situation and perspective / B. Ralovich. – Budapest, 1984. – 222 p.
52. Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors / I. Benhar [et al.] // *Talanta.* – 2001. – Vol. 55. – P. 899 – 907.
53. Rees, C.E. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food / C.E. Rees, C.E. Dodd // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59. – P. 159 – 186.

54. Ripp, S. Bacteriophage-based pathogen detection / S. Ripp // *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 118. – P. 65 – 84.
55. Schmelcher, M. Bacteriophage: powerful tools for the detection of bacterial pathogens: Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and Microsystems / M. Schmelcher, M. Loessner // Edited by M. Zourob et al. – Springer Science+Business Media, LLC. – 2008. – P. 731 – 754.
56. Schofield, D.A. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens / D.A. Schofield, N.J. Sharp, C. Westwater // *Bacteriophage.* – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 105 – 283.
57. Schultz, E.W. Listerella infections, areview / E.W. Schultz // *Sanford med. Bull.* – 1945. – Vol. 3. – P. 135 – 151.
58. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish / EFSA // *EFSA Journal.* – Vol. 10, N 3. – 43 p.
59. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis / L.L. Lenz [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences, US*, 2003. – Vol. 100. – P. 12432 – 12437.
60. Sword, C.P. Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // *Bacteriol.* – 1958. – Vol. 1. – P. 38 – 40.
61. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophage from *L.monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // *Gen. microbial.* – 1961. – Vol. 25, N 2. – P. 241 – 248.
62. The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-Like Myoviruses of gram-positive bacteria / J. Klumpp [et al.] // *J. of Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, N 17. – P. 5753 – 5765.
63. Tubylewicz, H. Studies on the lysogeny of *Listeria monocytogenes* strains / H. Tubylewicz // *Bull. de L. Academie Pol. Des Sci.* – 1963. – Vol. 1, N 11. – P. 515 – 518.
64. US FDA. Department of health and Human services Food and Drug Administration, 21 CFR Part 172 [Docket No. 2002F-0316 (formerly 02F-0316)], Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation. Agency: Food and Drug Administration, HHS. Action: Final rule. Federal Register Vol. 71, N 160, Rules and Regulations. – P.47729 – 47732.
65. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods / S. Guenther [et. al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75, N 1. – P. 93 – 100.
66. Wang, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria / Y. Wang, Z. Ye, Y. Ying // *Sensors (Basel).* – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 3449 – 3471.
67. Watson, B.B. The application of the phage-fluorescent antiphage staining system in specific identification of *Listeria monocytogenes* / B.B. Watson, W.C. Eveland // *J. Infect. Diseases.* – 1965. – Vol. 115, N 4. – P. 363 – 369.
68. Zink, R. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis / R. Zink, M.J. Loessner // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58, N 1. – P. 296 – 302.
69. www.intralytix.com. Сайт компании Intralytix.
70. www.micreos.com. Сайт компании Micreos.

СОДЕРЖАНИЕ

ВЕДЕНИЕ. О листериозе и листериях	5
ГЛАВА 1	
Выделение листериозных бактериофагов	11
ГЛАВА 2	
Биологические свойства листериозных бактериофагов	16
ГЛАВА 3	
Биопрепарат на основе фагов листерий.	35
ГЛАВА 4	
Идентификация.	37
ГЛАВА 5	
Фаготипирование	39
ГЛАВА 6	
Детекция	44
ГЛАВА 7	
Фаговый биопроцессинг	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.	62

CONTENTS

INTRODUCTION. Some words about Listeria and Listeriosis	5
CHAPTER 1	
Isolation of Listeria Phages.	11
CHAPTER 2	
Biological Properties of Listeria Phages	16
CHAPTER 3	
Biopreparation based on phages	35
CHAPTER 4	
Phage identification	37
CHAPTER 5	
Phage typing.	39
CHAPTER 6	
Phage detection	44
CHAPTER 7	
Phage biopressing	51
CONCLUSION.	59
REFERENCES	62

**ВАСИЛЬЕВ Д.А., КОВАЛЕВА Е.Н.,
ЗОЛОТУХИН С.Н.**

ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

Художественное оформление и компьютерное обеспечение Василькиной М.Н.

Отпечатано в типографии ООО "Колор-Принт"
г.Ульяновск, ул. Ленина, д.75
тел.: (8422)42-28-45, т/ф 41-82-23
www.color73.ru