

рование листерий. /Ветеринария. -№6. -1990. -С.31-32.

11. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов. // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии/ Материалы научной конференции ВНИИВиМ. -Покров. -1992. -Часть 11. -С.211-212.
12. Мнацаканов С.Т. Выделение энтеротоксигенных энтеробактерий на свиноводческих комплексах. // Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных/ Материалы Всесоюзной конференции. -Львов. -1988. -С.300-301.

УДК 619:576.8 + 615

## РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

*С.Н.ЗОЛОТУХИН, Н.И.МОЛОФЕЕВА, Д.А.ВАСИЛЬЕВ*

В последние годы благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей установлено, что штаммы *E. coli* серологического варианта O157: H7 способны вызывать у людей тяжело протекающие вспышки гастроэнтерита (Малов В.А., Пак С.Г., 1996; Ратинер Ю.А. и др., 1998; Т.А. Попова и др., 2000; L.W. Riley et al., 1983; В.Р. Bell et al., 1994; P.N. Goldwater, K.A. Bettelheim, 1994; M. Brotman et al., 1995; Y. Anderson, de Jong B, 1996; Shinoda S. et al., 1997; L. Easton, 1997).

В настоящее время также установлена этиологическая роль серогруппы O157 (серовары O157:H7 и O157H-) в возникновении диареи у молодняка животных с признаками геморрагического гастроэнтерита.

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременности диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики указанной инфекции уделяется большое внимание. Для микробиологической практики отечественными и зарубежными учеными разработаны питательные среды для выделения указанного серовара эшерихий (З.С. Султанов, Э.Д. Степанова, Е.А. Какулина, 2000). Но метод их выделения и идентификации с использованием пред-

лагаемых сред сравнительно трудоемко, не достаточно чувствителен и требует много времени (4-5 суток). Поэтому перед нами была поставлена цель – изыскание более простого и доступного для любых лабораторий метода индикации и идентификации названных микроорганизмов.

В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги (Д.М. Гольдфарб, 1961; В.Я. Ганюшкин, 1988; В.М. Русалиев, 1990; Хайруллин И.Н., 1990; Т.И. Кольпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров, 1990, 1992). Метод индикации и идентификации патогенных микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичен, не требует больших затрат времени, материалов и общедоступен.

В связи с отсутствием сообщений в научной литературе об использовании бактериофагов *E. coli* O157:H7 возникла необходимость изыскания индикаторных эшерихиозных бактериофагов для ускоренного обнаружения серологического варианта O157 в объектах внешней среды, патологическом материале, пищевых продуктах и кормах, а также для ускоренного типирования полевых штаммов возбудителя болезни.

На первом этапе работы целью наших исследований была разработка оптимальной схемы выделения фагов *E.coli* O157.

### **Материалы и методы исследований**

В основу метода для поиска фагов положена схема, предложенная Грациа (1936). Исследуемый материал (сточные воды) засеивали вместе с бактериями *E.coli* на МПБ. Бульон инкубировали при 37°C в течение 14-18 часов, затем фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подогревали при 60°C в течение 30 минут для освобождения от бактерий. Наличие фага в фильтрате выявляли путем посева на плотные питательные среды (1,5% мясо-пептонный агар) методом агаровых слоев.

Сущность метода заключается в следующем: 1,5% мясопептонный агар с генцианвиолетом накануне опыта разлили по чашкам в количестве 25-30 мл. Чашки, прикрытые стерильной бумагой, высушивали под бактерицидной лампой в течение не-

скольких часов, затем закрывали крышками и в перевернутом виде оставляли на ночь при комнатной температуре для полного высушивания агара в чашках, так как малейшее увлажнение может исказить результаты опыта. Предварительно разлитый в пробирку 0,7% агар в количестве 2,5 мл расплавляли и остужали до 46-47°C. 1мл исследуемого фильтрата вносили в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры E.coli, вращая пробирку, все быстро перемешивали и выливали на поверхность агара. В качестве индикаторной культуры использовали штамм E.coli сероваров O157 H7 и O157H-.

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

### Результаты исследований, их обсуждение

По указанной схеме нами было исследовано 12 проб сточных вод, взятых из животноводческих ферм и общественных туалетов разных населенных пунктов Ульяновской и Самарской областей. Из трех проб было выделено 4 штамма фага.

#### Морфология негативных колоний селекционированных колифагов

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

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

чения расы колифага с однородными негативными колониями.

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

### Литература

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) //-М., - 1961. -521 С.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии// Учебное пособие -Ульяновск. -1988. -45 С.
3. Ганюшкин В.Я. Обследование свиней на носительство сальмонелл и фагопрофилактика.// Вопросы ветеринарной микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы.-Ульяновск.-1990. -С.20-28.
4. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// -М.: Медгиз. -1961. - 297С.
5. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Фаготипирование листерий. /Ветеринария. -1990. -№6. -С.31-32.
6. Кольпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов.// Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии./ Материалы научной конференции ВНИИВиМ. -Покров. -1992. -Часть 11. -С.211-212.
7. Потапова Т.А. и др. О выделении E. coli O157:H7 – возбудителя ОКИ с гемолитико-уремическим синдромом в Тульской области // ЖМЭИ, 2000, №5, с. 115-116.
8. Ратинер Ю.А., Бондаренко В.М.// Микробиология. – 1998 - №2, - с.87-56.
9. Султанова З.С. и др. //ЖМЭИ – 2000 - №1 – с. 48-50.
10. Малов В.А., Пак С.Г.// ЖМЭИ - 1996 - №2 -с. 50-53.
11. Boyce T.G., Swerdlov D.L., Griffin P.M.// New Engl. J. Med. – 1995. V. 333. –Р.364-368.