

7. Ратинер Ю.А., Канарейкина С.К., Бондаренко В.М. // Журнал микробиологии., № 5, 1976, с. 117-121.
8. Armstrong G.L., Hollingsworth J., Morris J.G. Persistence of Escherichia coli O157:H7 in dairy cattle and the dairu farm environment. // Epidemiol. Rev., V. 18, 1996, p. 29 - 51.
9. Tuttle J., Gomez T., Doyle M.P., Wells J.G., Zhao T., Tauxe P.V., Griffin P.M. Enterohemorrhagic Escherichia coli. // Epidemiol. and Infec., - V. 122, №2, 1999, p.185-192.

## **THE DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THE ACCELERATED IDENTIFICATION OF BACTERIA ESCHERICHIA COLI O157 WITH THE HELP OF THE REACTION OF RISE OF TITRE OF THE PHAGE**

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

**Key words:** *identification, bacteria, bacteriophages, the reaction of rise of titre of the phage.*

*The work is devoted to the development of technological parameters on the accelerated identification of bacteria of the genus Escherichia coli O157 with the help of the reaction of rise of titre of the phage.*

УДК 619:579

## **ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ АЭРОМОНАД В РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ**

*Насибуллин И.Р., соискатель,, nir72@mail.ru*  
*Горшков И.Г., научный сотрудник, i.o.gun@mail.ru*  
*Куклина Н.Г., научный сотрудник, ul\_nk@mail.ru*  
*Викторов Д.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, viktorov\_da@mail.ru*  
*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор*  
*Тел. 8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru*  
*Нафеев А.А., доктор медицинских наук, nafeev@mail.ru*

**Ключевые слова:** *Aeromonas, бактериофаги, биопрепарат, индикация, реакция нарастания титра фага.*

*Авторами выделены бактериофаги бактерий вида Aeromonas hydrophila, исследованы их основные биологические свойства и разработан диагностический биопрепарат. На основе созданного биопрепарата предложен новый метод индикации Aeromonas hydrophila с применением реакции нарастания титра фага.*

**Введение.** Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде и известны как возбудители аэромоноза – инфекционного заболевания многих видов рыб и других гидробионтов. Аэромоноз встречается повсеместно и наносит значительный экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам. Контаминированная аэромонадами рыбная продук-

ция представляет собой источник серьезных заболеваний человека и животных.

При возникновении в хозяйстве аэромоноза на него накладывают карантин, выполняют ветеринарно-санитарные и рыбоводно-мелиоративные мероприятия согласно действующей инструкции [3, 4]. Для лечения аэромоноза рыб в хозяйствах применяют антибиотики широкого спектра действия и другие антисептические средства. Согласно инструкции активно применяются такие препараты как: дибиомицин, бацилихин, ветдипасфен, хронолактон, фуразолидон, хлорная и гашенная известь. Все эти препараты накапливаются в тканях рыб и других гидробионтов и попадают в дальнейшем в пищевое сырье и продукцию.

Применение этих препаратов приводит к уничтожению полезной сапрофитной микрофлоры водоемов, микрофлоры кишечника рыб и гидробионтов, появлению антибиотикорезистентных бактерий. Меры профилактики согласно инструкции требуют от хозяйств проведения ряда сложных и затратных мероприятий, связанных с дезинфекцией бассейнов и инвентаря, созданием оптимальных зоогигиенических, гидрологических и гидрохимических условий [3].

Диагноз на аэромоноз устанавливают на основании эпизоотологических данных, клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений, а также результатов бактериологического исследования [4].

Индикация и идентификация аэромонад является трудоемким и длительным (до 120 часов) процессом. Типирование до рода *Aeromonas* требует применения сложных и дорогостоящих сред и проведения ряда узких тестов, что обуславливает недостоверность исследования. Внутривидовая идентификация из-за незначительных различий между видами сложна и может служить причиной ошибок.

В связи с этим возникла необходимость использования новых методов индикации бактерий рода *Aeromonas*, обладающих следующими критериями: кратчайшие сроки исследования, простота в применении, высокая чувствительность и специфичность. Для этих целей нами разработан биопрепарат на основе выделенного и изученного бактериофага Ф43-УГСХА и параметры его применения в схеме реакции нарастания титра фага (РНФ).

#### **Материалы и методы исследования.**

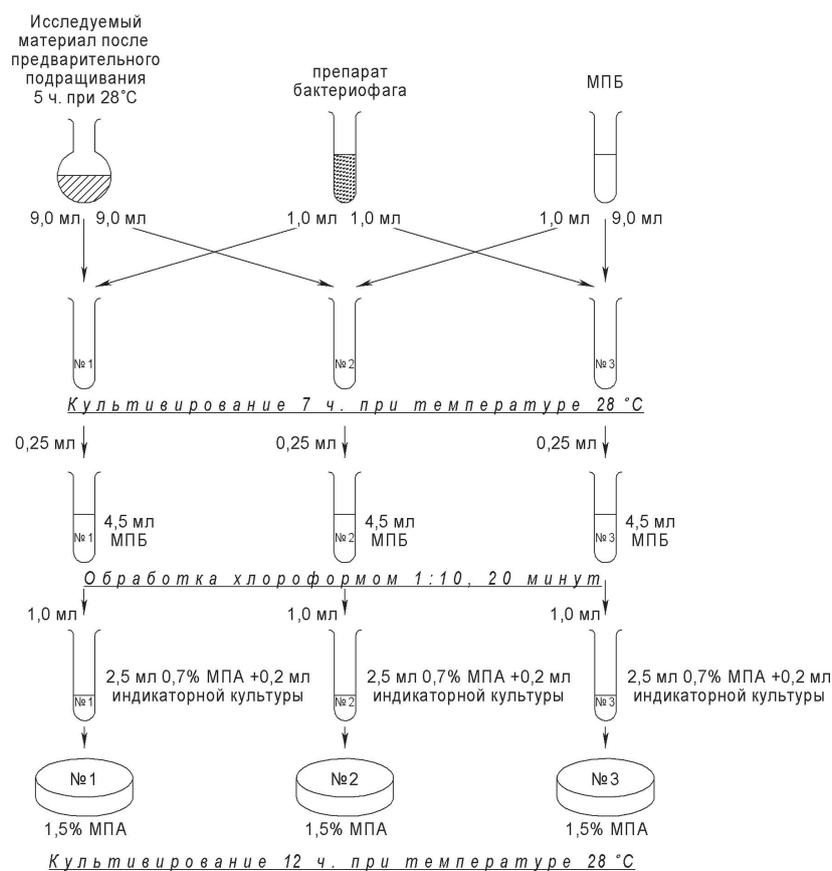
В качестве исходного материала при выделении бактериофагов были использованы 103 пробы воды водоемов Ульяновской области. В качестве индикаторной культуры использовали референс-штамм А.н.-43, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Посевы инкубировали при температуре 35 °С в течение 24-48 часов. Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам Д.М. Гольдфарба (1961), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловича (1973), С.Н. Золотухина (2007), Д.А. Викторова (2011). Для получения негативных колоний бактериофагов использовали метод агаровых слоев по Грация. Повышение литической активности проводили пассированием на индикаторной культуре. Литическую активность определяли методами Аппельмана и Грация. Для определения спектра литической активности применяли референс-штамм и выделенные нами ранее 14 полевых штаммов. Для определения специфичности использовали штаммы бактерий других родов: *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, полученные из музея кафедры. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами. Реакцию нарастания титра фага проводили по методам В.Д. Тимакова, Д.М. Гольдфарба и В.Я. Ганюшкина.

#### **Результаты исследований.**

Препарат бактериофага Ф-43 УГСХА обладает всеми необходимыми для проведения РНФ свойствами: титр бактериофага  $2 \times 10^8$ , спектр литической активности 86,7 %, строгая специфичность по отношению к бактерии *A. hydrophila*.

В результате серии исследований была разработана схема постановки РНФ с исполь-

зованием биопрепарата бактериофага Ф-43 УГСХА, представленная на рисунке № 1.



**Рис. 1 - Схема реакции нарастания титра фага для индикации *Aeromonas hydrophila*.**

Исследуемый материал весом 5 г растирается в фарфоровой ступке и вносится в колбы, содержащие по 50 мл питательного бульона (МПБ). Содержимое колб культивируется в течении 5 часов при 28 °С для предварительного подрашивания бактерий. На каждую исследуемую пробу отводится три пробирки: №1- предназначена для опытной пробы, №2- является контролем на свободный фаг, №3- контроль титра индикаторного фага. Исследуемый материал разливается по 9 мл в пробирки №1 и №2, пробирки №3 содержат 9 мл МПБ. В пробирки №1 и №2 добавляется по 1 мл бактериофага Ф43- УГСХА в рабочем разведении (титр бактериофага  $10^4$ ), а пробирки №2-1 мл МПБ. Все пробы инкубируются в термостате при температуре 28 °С 7 часов. Параллельно ставится контроль стерильности сред. После инкубации из пробирок берутся пробы по 0.25 мл, вносятся в пробирки с 4,5 мл МПБ и обрабатываются фильтрованием через бактериальные фильтры или хлороформом 1:10 в течении 20 минут. Далее содержимое пробирок исследуется методом агаровых слоев по Грации. Чашки инкубируют 12 часов при 28 °С.

Реакция считается положительной при нарастании титра фага в 5 и более раз.

#### **Заключение.**

Таким образом, разработанная схема РНФ с использованием биопрепарата бактериофага Ф-43 УГСХА позволяет проводить индикацию *Aeromonas hydrophila* в различных объектах количестве от  $10^3$  м.к./мл в течении 24 часов.

Метод РНФ с использованием биопрепарата бактериофага Ф-43 УГСХА имеет ряд существенных преимуществ: время на исследование сокращается до 24 часов, реакция обладает

высокой чувствительностью, высокой специфичностью, не требует выделения культуры чистой культуры возбудителя, не требует дорогостоящего оборудования и материалов, методика достаточно проста.

Все перечисленное позволяет судить о высокой экономической эффективности метода РНФ в сравнении с существующими методами индикации аэромонад [2].

#### **Библиографический список**

1. Викторов, Д.А. Разработка методов диагностики, лечения и профилактики псевдомоноза рыб с использованием биопрепарата на основе бактериофагов / Д.А. Викторов, О.А. Тен, И.И. Богданов // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии: Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых учёных Молодёжь и наука XXI века, Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С. 6-8.

2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги и их применение в ветеринарии.- Ульяновск, 1988, с.45.

3. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромоназом карповых рыб, Минсельхоз-прод России, Департамент ветеринарии, 1998.

4. Методические указания по лабораторной диагностике аэроманоза карпов, Госагропром СССР, М.,1986.

## **APPLICATION OF THE METHOD OF REACTION OF RISE OF TITRE OF PHAGE TO DISPLAY AEROMONADS IN FISH PRODUCTS**

*Nasibullin I.R., Gorshkov I.G., Kuklina N.G., Viktorov D.A., Vasilev D.A., Nafeev A.A.*

**Key words:** *Aeromonas, bacteriophages, biological product, indication, response phage titer rise.*

*The authors identified bacteriophages of bacteria species Aeromonas hydrophila, investigated their basic biological properties and developed diagnostic biopreparation. On the basis of created preparation a new method of indication of Aeromonas hydrophila with the use of the reaction of rise of titre of the phage was suggested.*

УДК 619:616-07

## **ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОНЕНТОВ КОММЕРЧЕСКИХ КОРМОВ**

*Перельгин В.В., кандидат биологических наук, снс,  
тел. 8 (4967) 36-00-27, Perelygin@obolensk.org*

*Светоч Э.А., доктор ветеринарных наук, профессор,  
ГНЦ ПМБ, тел. 8(4967) 36-00-79, Svetoch@obolensk.org*

*Похиленко В.Д., доктор технических наук,*

*Веревкин В.О. кандидат медицинских наук,*

*Воложанцев Н.В. кандидат биологических наук, nikvol@obolensk.org*