

На правах рукописи

ЗОЛОТУХИН ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА ФАГОИНДИКАЦИИ И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
ИДЕНТИФИКАЦИИ *HAFNIA ALVEI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Васильев Дмитрий Аркадьевич
доктор биологических наук, доцент
Семенов Александр Михайлович

Официальные оппоненты: **Швиденко Инна Григорьевна**
доктор медицинских наук, профессор,
ГБОУ ВПО «Саратовский государственный
медицинский университет имени
В.И. Разумовского», профессор кафедры
микробиологии, вирусологии и иммунологии
Пименов Николай Васильевич
доктор биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВПО «Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии имени К.И. Скрябина»,
профессор кафедры биологии и патологии
мелких домашних, лабораторных и
экзотических животных

Ведущая организация: ФБУН «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора

Защита состоится «19» декабря 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 на базе ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» (410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» (410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335)

Автореферат разослан «__» ноября 2013 года.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл.1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ученому секретарю диссертационного совета

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы значительно возрос удельный вес заболеваний животных и человека, вызванных условно-патогенными микроорганизмами или протекающих с их участием. Одним из таких микроорганизмов является представитель семейства *Enterobacteriaceae* относящийся к роду *Hafnia* с единственным видом *Hafnia alvei*.

Несмотря на то, что бактерии вида *Hafnia alvei* известны как условно-патогенные представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и ротоглотки человека и животных, имеются данные о том, что они способны вызывать ряд заболеваний у человека, таких как менингит (Mojtabae, Siadati, 1978), диарею (Жумагельдина и др., 2006-2009; Washington et al., 1971; Albert et al., 1991), некротизирующий энтероколит (Ginsberg, Goldsmith, 1988), пневмонию (Washington et al., 1971; Frick et al., 1990), инфекции мочевыводящих путей (Fields et al., 1967), эндофтальмит (Carvalho et al., 1990) и инфекции мягких тканей (Berger et al., 1977), гастроэнтериты (Albert et al., 1991; Ratnam, 1991; Reina et al., 1993; Ridell et al., 1994).

О гафниях, как возбудителях желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных телят и поросят-сосунов, сообщает Л.С. Каврук (1999).

Имеются отдельные публикации, свидетельствующие о фактах гафниоза беспозвоночных и позвоночных животных (дождевых червей, сивучей и др.) (Шустрова, Дубровский, 1991; Литвин и соавт., 1996; Кузьмин, Святковский, 2005; Денисенко, 2006; Речкин, Евтеева, 2007).

Гафниоз пчел зарегистрирован самостоятельной нозологической единицей как заболевание этих насекомых (другое название – паратиф пчёл) (Полтев, Нешатаева, 1977).

Успех борьбы с любым инфекционным заболеванием зависит от своевременной диагностики болезни, основой которой являются лабораторные исследования. Методы микробиологической диагностики заболеваний, вызываемых *Hafnia alvei*, основаны на выделении чистой культуры возбудителя и изучении их ферментативных свойств (Сыздыков, Кузнецов, Жумагельдина, 2009). Несмотря на затраты большого количества времени, питательных сред и реактивов они не всегда дают реальную картину, достаточную для идентификации возбудителя инфекции.

Имеющиеся на вооружении бактериологов современные методы диагностики (ПЦР, ИФА, масс-спектрометрия) хотя и являются высокочувствительными и специфичными, но они далеко не всегда доступны рядовым бактериологическим лабораториям из-за высокой стоимости оборудования и расходных материалов, а также недостатка специалистов.

Поэтому, перед исследователями стоит задача изыскания более простого и доступного для лаборатории любого уровня метода индикации и идентификации бактерий *Hafnia alvei*.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время в лабораторной практике для детекции и идентификации некоторых видов бактерий успешно используют бактериофаги (Ганюшкин, 1988; Чанишвили и др., 2005;

Пожарникова, 2008; Пульчеровская и др., 2009; Караваева, 2012).

К сожалению, биологическая промышленность нашей страны не производит бактериофаги, специфичные в отношении *Hafnia alvei*, и в арсенале врачей-бактериологов отсутствуют диагностические гафниозные бактериофаги, как следствие этого нет инструктивных документов по их применению. Сложившаяся в стране выше обозначенная ситуация послужила основанием для наших исследований.

Цель работы - разработка фагоиндикации и усовершенствование идентификации *Hafnia alvei* с использованием специфического бактериофага.

Задачи исследования:

1. Выделить из паталогического материала и объектов внешней среды полевые изоляты *Hafnia alvei* и изучить их основные биологические свойства.
2. Выделить и селекционировать бактериофаги *Hafnia alvei*.
3. Изучить основные характеристики выделенных бактериофагов.
4. Определить оптимальные параметры для изготовления индикаторного бактериофага с высоким титром.
5. Разработать схему ускоренной идентификации *Hafnia alvei* с помощью изготовленного фагового препарата и оптимальные параметры фагоиндикации *Hafnia alvei* в объектах ветеринарного надзора.
6. Провести опыт фагоиндикации *Hafnia alvei* в патологическом материале из неблагополучной по гафниозу пасеки.

Научная новизна. Выделены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении *Hafnia alvei*. Впервые изучены основные биологические свойства выделенных фагов. Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоидентификации и фагоиндикации *Hafnia alvei* в объектах ветеринарно-санитарного надзора. Доказана эффективность использования селекционированного бактериофага с диагностической целью.

Теоретическая и практическая значимость. Получен штамм бактериофага, который предложено использовать для изготовления диагностического препарата. Разработаны технологические параметры получения диагностического фагового биопрепарата.

В схему бактериологического исследования при диагностике заболеваний, вызываемых *Hafnia alvei*, внесена фагоидентификация и разработана схема индикации этих микроорганизмов с помощью селекционированного бактериофага.

Создана коллекция гафниозных бактериофагов.

Разработаны «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторного бактериофага Н-1 УГСХА» и «Методические рекомендации по индикации и идентификации бактерий *Hafnia alvei* в объектах санитарного надзора с применением специфического бактериофага», одобренные Научно-техническим советом ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» и утвержденные первым проректором-проректором по научной работе В.А. Исачевым (протокол №3 от 18.06.2013 г.)

Результаты диссертационных исследований вошли в монографию «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека» в

соавторстве (2013), а также используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная академия имени П.А. Столыпина» и ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследования. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследований авторами были проведены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описание, измерение и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных результатов и выводов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Из 42 обследованных хозяйств Приволжского Федерального округа *Hafnia alvei* выделены в 14 (33,3%). Идентифицированные культуры были чувствительны к гентамицину, левомецитину, цефотоксину и устойчивы к тетрациклину, линкомицину, цефозалину, ампициллину, бензилпенициллину.

2. Выделенные и отселекционированные гафниозные бактериофаги имели высокую литическую активность (10^8 – 10^9), разный диапазон литической активности (в пределах 28,6% - 85,7%), обладали строгой видовой специфичностью, были термостабильны и устойчивы к действию хлороформа.

3. По морфологическим характеристикам выделенные бактериофаги было предложено отнести к отряду *Caudovirales*, семействам *Myoviridae* и *Sifoviridae*.

4. Бактериофаг Н-1 УГСХА относится к роду (филогенетической группе) Felix01- подобных бактериофагов с линейной ДНК размером 86760 п.н. имеет 118 открытых рамок считывания, кодирующих белки размером от 50 до 1400 аминокислотных остатков.

5. Разработанные параметры РНФ с целью ускоренной индикации *Hafnia alvei* позволяют обнаружить названные бактерии в концентрации 10^3 в 1 г исследуемого материала в течение 18-24 часов.

6. Разработанная схема бактериологического исследования с помощью диагностического бактериофага *Hafnia alvei* позволяет выделить и идентифицировать названные микроорганизмы за 34 часа.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина» при финансовой поддержке 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).

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены и обсуждены на 1-ой региональной студенческой научно-практической конференции по природоведению (Ульяновск, 2011), Научно-практическом семинаре с международным участием: «Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности» (Улья-

новск, 2011); 1-ом, 2-ом и 3-м этапах Всероссийского конкурса на лучшую научную работу аспирантов вузов МСХ РФ по ветеринарным наукам (Ульяновск, Казань, Москва, 2012); II-ой Международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине» (г. Покров, 2012), IV Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2012); Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 10 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованным ВАК РФ, и одна монография.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения; обзора литературы; объектов и методов исследования; результатов исследований и их обсуждений; заключения; выводов; практических предложений; перечня сокращений и условных обозначений; списка литературы и приложений. Работа содержит 30 таблиц и 14 рисунков. Список литературы составляет 179 наименований, из них 75 – зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты и методы исследования

Объекты исследований. 21 штамм бактерий *Hafnia alvei*, 5 штаммов *E.coli*, 34 штамма *Proteus spp*, 12 штаммов *Morganella spp*, 10 штаммов рода *Citrobacter spp*, 5 штаммов *Enterococcus spp*, 1 штамм *Schigella spp*, 2 штамма рода *Serratia*, и 9 штаммов *Salmonella spp*. из музея кафедры. 5 изолятов фагов *Hafnia alvei*, выделенных нами.

Все названные штаммы бактерий обладали типичными для них биологическими свойствами.

Исследуемыми объектами были также сточные воды животноводческих помещений, птицефабрик, водопроводная вода, фекалии животных, насекомые, патологический материал от больных и погибших животных, а так же мясо, искусственно контаминированное бактериями вида *Hafnia alvei*.

Для выращивания микроорганизмов и проведения бактериологических исследований в работе использовали: питательный бульон (НПО «Питательные среды», г. Махачкала); питательный агар (0,3 %, 0,7 %, 1,5 %); среды Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск); Гисса с индикатором ВР (НПО «Питательные среды» г. Махачкала); реактив Ковача (Basle, Switzerland); физиологический раствор, рН 7,2 – 7,6; 0,04 % спиртовой раствор метилового красного; водный раствор КОН; раствор α -нафтола; трихлорметан ТУ 6-09-4263-76 (СКТБ «Технолог»); 0,04 % спиртовой раствор генцианвиолета, α -СНСА, α -суано-4-гидроху cinnamic acid, ацетат уранила.

Методы: выделение и идентификацию бактерий вида *Hafnia alvei* проводили в соответствии с определителем бактерий Берги 9-е издание, «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями»,

утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года, а также использовали схему Б.С. Киселевой, В.И. Покровского, О.К. Поздеева (1999, 2007).

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенным М. Адамсом (1961), Гольдфарбом (1961). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике изложенной И.М. Габриловичем (1992).

При изучении генома бактериофага определяли его размер, последовательность и содержание ГЦ пар в ДНК. Автоматизированную аннотацию результатов секвенирования генома определяли с помощью он-лайн сервиса <https://www.basys.ca/server4/basys/cache/4edbb80507c84b04d88ebe0142a0df0b/index.html>. Последовательности белков, кодируемых фагом, сравнивали с базой данных GenBank с помощью программы blast-x (ncbi.nlm.nih.gov).

Индикацию бактерий *Hafnia alvei* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале проводили с помощью реакции нарастания титра фага по методикам, описанным В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), и успешно используемой В.Я. Ганюшкиным (1988), Н.И. Молофеевой (2005), Л.П. Пульчеровской (2005), Н.А. Феоктистовой (2006), Е.Н. Ковалевой (2009), А.Г. Шестаковым (2010), Н.П. Журавской (2010), Е.Н. Семаниной (2011), Д.А. Викторovým (2011).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistika 6.0 (for Windows; “Stat Soft Ins.”, США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Результаты исследований и их обсуждение

Выделение бактерий *Hafnia alvei* из объектов ветеринарного надзора и патологического материала

Для изучения широты распространения *Hafnia alvei* в животноводческих, птицеводческих, пчеловодческих хозяйствах и создания коллекции микроорганизмов с целью изучения биологических свойств бактериофагов мы провели бактериологические исследования проб сточных вод и патологического материала, взятых из 42 хозяйств Ульяновской, Саратовской, Самарской, Пензенской областей, республик Татарстан, Чувашия и Мордовия.

В результате проведенных исследований гафнии были обнаружены в 14 хозяйствах (33,3% от числа обследованных, названия хозяйств приведены в диссертации). Всего было выделено и идентифицировано 14 штаммов *Hafnia alvei*. Результаты исследований показали что, из восьми проверенных антибиотиков лишь гентамицин, цефотоксин и левомецитин были активны в отношении всех штаммов гафний, что демонстрирует высокую устойчивость штаммов *Hafnia alvei* ко многим традиционным антибиотикам и тем самым указывает на необходимость разработки других методов защиты от этих патогенов.

При проведении бактериологических исследований нами были отмечены некоторые трудности при идентификации *Hafnia alvei*. Представители рода *Hafnia* обладали невысокой ферментативной активностью и ряд её культураль-

но-биохимических свойств схожи с другими энтеробактериями, в частности *E.coli* и *Salmonella spp.*

Выделение бактериофагов *Hafnia alvei* и селекция клонов фагов

На первом этапе исследований мы попытались выделить бактериофаги из культур *Hafnia alvei*. Обнаружить бактериофаги из культуральной жидкости имеющихся у нас штаммов гафний нам не удалось.

Вторым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *H. alvei*, из объектов внешней среды.

Исследованию подвергали сточные воды свиноводческих, птицеводческих хозяйств и молочно-товарных ферм, а так же патологического материала от животных и насекомых.

Из числа образовавшихся негативных колоний отбирали идентичную исходной и пассировали на индикаторной культуре до получения однородных бляшек 6-10 раз.

В результате проведенных исследований из объектов внешней среды нами выделено и селекционировано 5 штаммов бактериофагов активных в отношении *Hafnia alvei* (Таблица 1).

Таблица 1 - Бактериофаги *Hafnia alvei*

№ пп	Название фага	Индикаторные штаммы	Объект выделения
1	Н - 1 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 131	Сточные воды ПТФ
2	Н - 2 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 2636	Сточные воды МТФ
3	Н - 3 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 134	Сточные воды свинокомплекса
4	Н - 4 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 133	Сточные воды ПТФ
5	Н - 5 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 9(1)	Сточные воды свинокомплекса

Характеристика бактериофагов *Hafnia alvei*

Морфология негативных колоний. Образовавшиеся негативные колонии по морфологии были разделены нами на два типа. К первому типу мы отнесли округлые, прозрачные в центре негативные колонии диаметром от 2,0 до 5,5 мм и более, с зоной неполного лизиса по периферии шириной 0,5-8 мм (штамм Н-3 УГСХА). Колонии четырех других фагов (Н-1, Н-2, Н-4 и Н-5) были отнесены нами ко второму типу – округлые, прозрачные с ровными краями, диаметром до 0,5 – 2,0 мм, с отсутствием зон неполного лизиса.

*Литическая активность бактериофагов *Hafnia alvei*.* Литическая активность бактериофага оценивалась по его способности вызывать лизис индикаторной культуры в жидких и на плотных питательных средах.

Из результатов проведенных исследований нами было установлено, что все селекционированные фаги имели высокую литическую активность. По методу Аппельмана она составила от 10^{-6} до 10^{-9} и от $1,2 \times 10^8$ до $3,3 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 см^3 (по методу Грациа) (Таблица 2).

Диапазон литической активности. Для изучения диапазона литической активности бактериофагов *Hafnia alvei* мы использовали метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988). В качестве исследуемых культур использовали 21 (7 референс, полученные из музея

кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» и 14 выделенных нами) штаммов *Hafnia alvei*.

Таблица 2 – Литическая активность бактериофагов вида *Hafnia alvei*

№	Название фага	Индикаторная культура	Активность фагов	
			титр по Аппельману	титр по Грациа
1	Н-1 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 131	10^{-9}	$3,3(\pm 1,1) \times 10^9$
2	Н-2 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 2636	10^{-7}	$4,1(\pm 2,3) \times 10^8$
3	Н-3 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 134	10^{-8}	$5,5(\pm 1,5) \times 10^9$
4	Н-4 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 133	10^{-6}	$2,7(\pm 2,1) \times 10^9$
5	Н-5 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 9(1)	10^{-7}	$8,2(\pm 4,1) \times 10^8$

Параллельно методу стекающей капли мы апробировали **усовершенствованный метод определения литической активности** гафниозных бактериофагов. Накануне опыта 1,5 % МПА разливали по чашкам Петри в объеме 20-30 см³. Чашки подсушивали в термостате в течение 24 часов. 1,0 см³ фага вносили в пробирки с 2,5 см³ 0,7 % агара, предварительно расплавленного и остуженного до 46-50°C, смесь тщательно перемешивали вращением пробирки между ладонями, и выливали на поверхность 1,5 % агара, чашки для застывания оставляли на столе на 30 минут.

Далее размечали чашку на 14 секторов и на каждый сектор, тонкой бактериологической петлей, наносили по одной капле исследуемых культур. Одну чашку оставляли без нанесения культуры, в качестве контроля чистоты. Далее все чашки инкубировали при 37,5°C в течение 16 часов. Если исследуемый бактериофаг проявлял литическую активность по отношению к тому или иному штамму бактерий, то сектор, куда этот штамм вносился, оставался чист. Этот метод показался нам менее затратным, чем метод стекающей капли. Его мы использовали в дальнейшей работе.

В результате проведенных исследований нами установлено, что изученные фаги обладали разным диапазоном литической активности.

Наименьший диапазон литической активности имел фаг Н-5 УГСХА, который составил 28,6%, от числа исследуемых культур, наибольшую активность проявил изолят фага Н - 1 УГСХА, он лизировал наибольшее количество исследованных штаммов гафний (85,7%).

Температурная устойчивость бактериофагов Hafnia alvei

В результате исследований было установлено, что все бактериофаги обладали выраженной устойчивостью к температуре 60-63°C.

Нижний порог термоинактивации у фага Н-1 УГСХА составил 64-65°C; у фага Н-2 УГСХА он составил 62-63°C; у фага Н-3 УГСХА – 67°C; у фага Н-4 УГСХА – 64-65°C. При последующем повышении температуры среды титр фага понижался. При воздействии температуры выше 74°C активных корпускул фагов не обнаруживали. Таким образом, верхний порог термоинактивации для них составил 71-73°C.

Индикаторная культура *Hafnia alvei* погибала при 58-60°C через 10-15

минут.

Определение чувствительности бактериофагов к хлороформу проводили методом обработки этим веществом фаговой суспензии в течение 10, 15, 20, 25, 30, 40 минут. Контролем служила суспензия фага без обработки хлороформом. Количество фаговых корпускул в 1,0 см³ исследовали методом агаровых слоев (по Грациа).

В результате исследований было обнаружено что, обработка бактериофагов Н-1, Н-2, Н-3 и Н-4 серии УГСХА хлороформом, выявила выраженную устойчивость к воздействию данного агента в течение 40 минут.

Изменение литической активности гафниозных бактериофагов при хранении. Хранение селекционированных гафниозных бактериофагов серии УГСХА в условиях холодильника при 2-4°С в течение 6 месяцев (срок наблюдения) не снизило их литическую активность.

*Специфичность действия бактериофагов рода *Hafnia alvei**

Специфичность характеризуется наличием или отсутствием литической активности бактериофагов в отношении гетерологичных бактерий.

Изучение специфичности бактериофагов Н - 1 УГСХА, Н - 2 УГСХА, Н - 3 УГСХА и Н - 4 УГСХА проводили по отношению к следующим микроорганизмам: *E.coli*, *Proteus spp*, *Morganella spp*, *Citrobacter spp*, *Enterococcus spp*, *Schigella spp*, *Serratia spp* и *Salmonella spp*. Результаты исследования показали, что ни один из изучаемых фагов не был активен в отношении гетерологичных штаммов микроорганизмов.

*Морфология фаговых корпускул бактериофагов *H. alvei*.* Электронную микроскопию гафниозных бактериофагов проводили на микроскопе JEOL – 100СХ. Подготовленные препараты просматривали при увеличении 80 тыс. раз (напряжение 80 кВольт).



Рисунок 1 – Бактериофаг Н -1



Рисунок 2 – Бактериофаг Н – 2

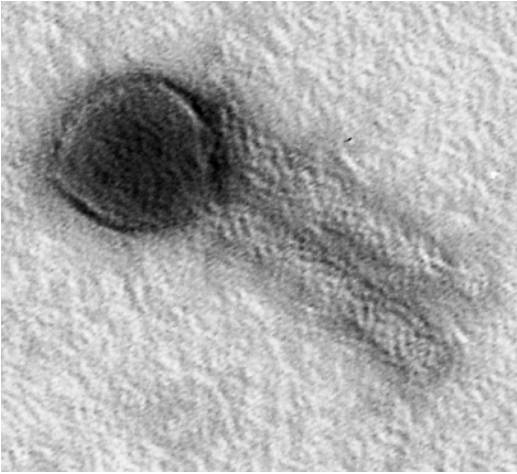


Рисунок 3 – Бактериофаг Н- 3

Рисунок 4 – Бактериофаг Н -4

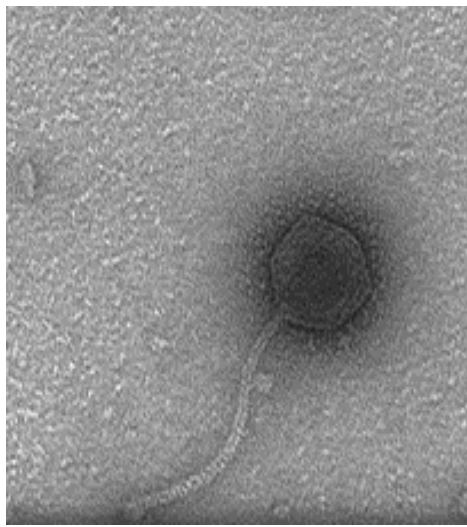


Рисунок 5 – Бактериофаг Н- 5

Из результатов электронной микроскопии изучаемых бактериофагов стало очевидно, что представленные изученные фаги являются хвостатыми фагами, относящиеся к отряду *Caudovirales*.

По морфологическим признакам, бактериофаги Н – 1, Н – 2, Н – 3 и Н - 4 были отнесены нами к семейству *Myoviridae*, с сократимыми хвостами, состоящими из оболочки и центральной трубки (Рисунки 1 – 4), а фаг Н – 5 отнесен нами к семейству *Sifoviridae* – бактериофаг с несокращающимся отростком (Рисунок 5).

По результатам изучения биологических свойств было установлено, что бактериофаг Н-1 УГСХА обладает наибольшим спектром литической активности, является строго специфичными в отношении бактерий рода *Hafnia*, оказался устойчивым к воздействию хлороформа и обладал более высоким порогом термоинактивации, чем для бактерий. Эти показатели биологических свойств соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов.

При изучении генома бактериофага Н-1 УГСХА, как у перспективного производственного штамма, была обнаружена линейная ДНК, размер генома составил 86760 п.н. Содержание ГЦ пар в ДНК было распределено по геному

равномерно. При автоматической аннотации результатов секвенирования в геноме обнаружено 118 открытых рамок считывания, кодирующих белки размером от 50 до 1400 аминокислотных остатков, наиболее представленные размерные классы белков 100 и 150 остатков. Обнаружены многочисленные гомологии с белками различных бактериофагов, принадлежащих к семейству *Myoviridae*. На основании полученных данных можно заключить, что бактериофаг Н-1 УГСХА относится к роду (филогенетической группе) Felix01-подобных бактериофагов.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторного бактериофага *Hafnia alvei* Н-1 УГСХА

Индикаторная культура бактерий *Hafnia alvei* 131 хранили в полужидком питательном агаре (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % агара при температуре 2-3°C, которую пересевали каждые 3-4 месяца.

Штамм гафний имел типичные для *Hafnia alvei* свойства, которые соответствовали паспортным данным.

Поддержание индикаторного бактериофага Н-1 УГСХА. Исходный штамм фага поддерживали на индикаторной культуре *Hafnia alvei* 131 в питательном бульоне. При хранении штамма в холодильнике (2-4°C) пересев фагов проводили через 6 месяцев. Перед пересевом фаги пассировали по следующей схеме: к 4,5 см³ питательного бульона добавляли 0,2 см³ фага, исследованного предварительно по методу Грациа, и 0,2 см³ 18 часовой бульонную культуру индикаторного штамма. Контроль: к 4,5 см³ питательного бульона добавляли 0,2 см³ индикаторной бульонной культуры. Смеси инкубировали в течение 4 часов при температуре 37°C. После наступления лизиса бактерий и просветления среды пробирки с фагами прогревали при температуре 58-60°C в течение 30 минут. Далее 0,2 см³ прогретых фаголизатов вносили в пробирки, с 4,5 см³ питательного стерильного бульона и добавляли по 0,2 см³ индикаторных культур (второй пассаж). Так проводили до четырех пассажей фагов. Последующее поддержание фагов в лаборатории проводили путем систематического пассирования на индикаторной культуре через каждые 6 месяцев.

Определение оптимального соотношения количества фаговых корпускул и бактериальных клеток для получения фага с высоким титром.

Для получения фагов с высокой литической активностью нами была установлена множественность инфекции, выраженная в соотношении между количеством фаговых корпускул и количеством микробных клеток индикаторной культуры.

В результате проведенных исследований установлено, что для штамма фага Н-1 УГСХА множественность инфекции составила 3,17 корпускул фага на 1 бактериальную клетку. Оптимальная экспозиция пассажа при 37,5°C составила 4 часа.

Приготовление суспензии маточного фага. Для приготовления маточного фага Н – 1 УГСХА использовали исходный фаг 4-го пассажа на индикаторной культуре *Hafnia alvei* 131. Маточный фаг готовили на питательном бульоне (рН 7,4-7,6). Фаги с титром не ниже 10⁹ корпускул в 1 см³ в объеме 2 см³ вносили в

колбы с 45 см³ питательного бульона (рН 7,4 – 7,6). В колбы добавляли по 2 см³ суточных бульонных культур.

Контроль: в пробирки с 4,5 см³ питательного бульона добавляли по 0,2 см³ суточных бульонных культур. Смеси инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Через 4 часа бульон в колбе становился прозрачным, а в контрольных пробирках наблюдался рост культур. Полученные фаги прогревали дважды с интервалом в одни сутки при температуре 58- 60°C в течение 30 минут.

Затем маточные фаги с титром не ниже 10⁸ корпускул в 1 см³, в объеме 20 см³ добавляли в колбы с 450 см³ питательного бульона. В те же колбы добавляли по 20 см³ суточную бульонную культуру индикаторного штамма гафний. Контроль: в пробирки с 4,5 см³ питательного бульона добавляли 0,2 см³ суточной бульонной культуры *Hafnia alvei* 131. Смеси инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Полученные фаги прогревали дважды с интервалом в 1 сутки при температуре 58- 60°C в течение 30 минут.

Контроль фагового препарата. Из полученного объема отбирали пробу каждого фага для определения чистоты, стерильности, литической активности по отношению к индикаторной культуре, реакцию нарастания титра фага в питательном бульоне, искусственно контаминированном индикаторной культурой, диапазон литической активности и специфичность.

Контроль по всем показателям проводили до разлива фага во флаконы.

Изготовленный нами индикаторный бактериофаг Н-1 УГСХА опытной серии представляет собой прозрачную жидкость желтоватого цвета (цвет незасеянной среды), без посторонних примесей и осадка, имеет титр не ниже 10⁹. Дату изготовления серии исчисляли со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофага при температуре 2 – 4 °С 6 месяцев. По истечении этого срока следует проверить литическую активность.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода *Hafnia*

Учитывая строгую специфичность отобранных бактериофага Н-1 УГСХА по отношению к штаммам гафний, мы разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов (Рисунок 6).

Подготовку и посев проб материала, подлежащего исследованию, проводили в соответствии с ГОСТами «Методы бактериологического анализа». В качестве материала для исследований использовали воду, трупы пчел и фекалии поросят, контаминированные бактериями рода *Hafnia* в концентрациях 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ м.к. в 1 см³.

Таким образом, схема фагоидентификации в сравнении с традиционной схемой, изложенной в вышеупомянутых методических указаниях, позволяла сократить сроки исследования с 96 до 34 часов с меньшими затратами посуды и реактивов.

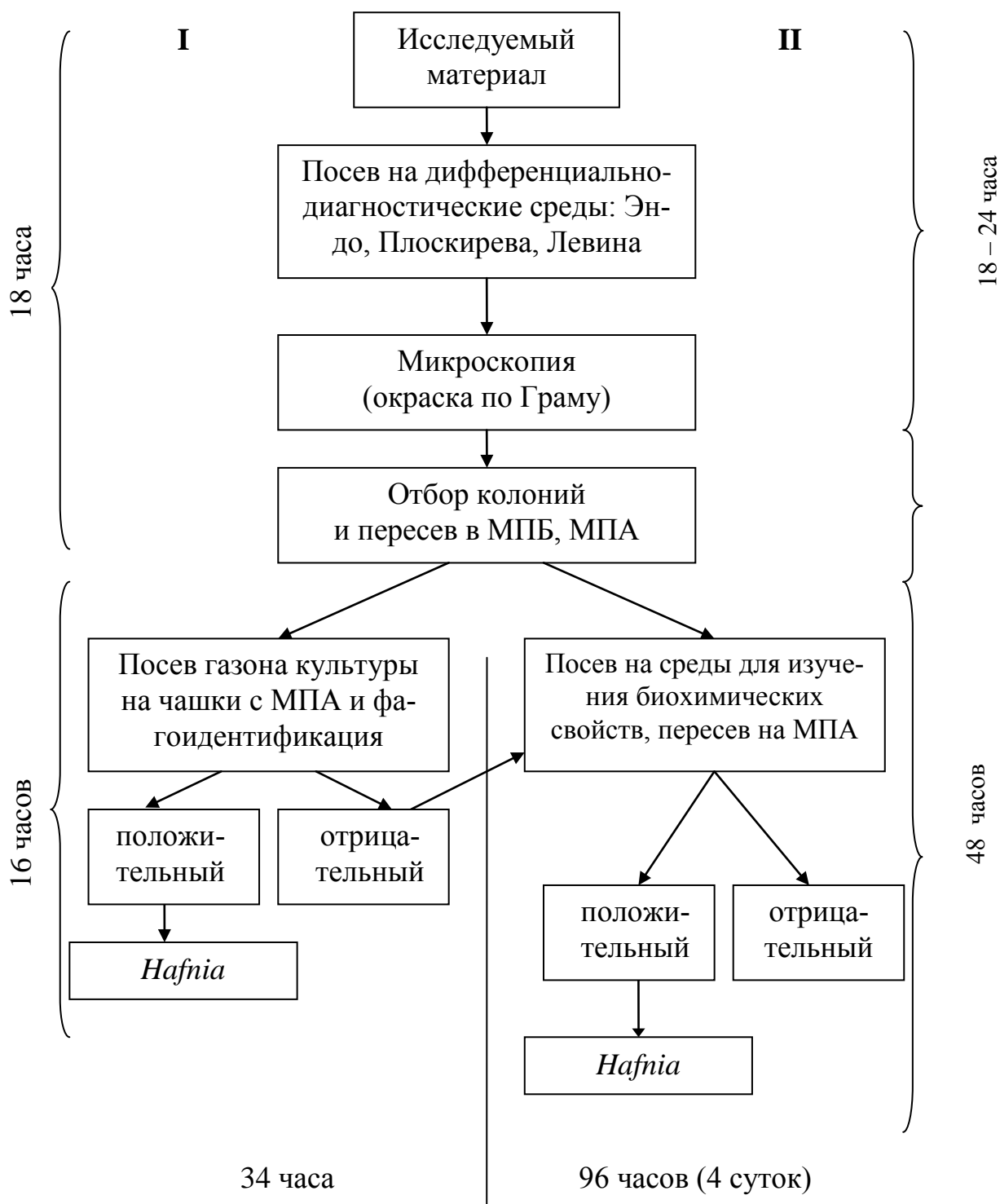


Рисунок 6 – Выделение и ускоренная идентификация бактерий рода *Hafnia* с помощью бактериофагов (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования, изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» (II)

Таблица 3 - Результаты фагоидентификации и идентификации по результатам изучения ферментативных свойств выделенных лактозоотрицательных штаммов грамотрицательных бактерий

Исследуемый объект	Обозначение пробы	Результат фагоидентификации фагом Н-1 УГСХА	Результаты идентификации по биохимическим свойствам
Вода	1 в	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	2 в	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Мясо	1м	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Фекалии	1 ф	– <i>Hafnia alvei</i>	<i>Proteus spp</i> <i>Hafnia alvei</i>
	2 ф	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	3 ф	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	1 ф	– <i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella spp</i> <i>Hafnia alvei</i>
	2 ф	<i>Hafnia alvei</i> –	<i>Hafnia alvei</i> <i>Yersinia spp</i>
	3 ф	– <i>Hafnia alvei</i>	<i>Morganella spp</i> <i>Hafnia alvei</i>
Трупы пчел	1 п	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	2п	- <i>Hafnia alvei</i>	<i>Providencia spp</i> <i>Hafnia alvei</i>
	3п	- <i>Hafnia alvei</i>	<i>Edwardsiella spp</i> <i>Hafnia alvei</i>
	4п	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
	5п	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Время, затраченное на исследование, час		34	96

Идентификация бактерий *Hafnia alvei* масс-спектрометрическим методом. В лаборатории вирусов микроорганизмов института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН мы производили идентификацию гафний масс-спектрометрическим методом (MALDI – TOF). Этот метод заключается в идентификации молекул путем измерения отношения их массы к заряду (m / z) в ионизированном состоянии.

В ходе выполнения исследований нами было установлено, что из 31 исследованных штамма, отнесенных к виду *Hafnia alvei* по ферментативным тестам, 4 штамма бактерий (из восьми) не чувствительных к гафниозному бактериофагу по результатам исследования методом MALDI TOF масс-спектрометра были идентифицированы как *Salmonella spp* и *Escherichia coli* (Таблица 4).

Таблица 4 - Сравнительная идентификация *Hafnia alvei*

№ Пп	Штаммы изучаемых микроорганизмов	Результаты идентификации		
		Ферментативные тесты	Метод фагоидентификации	Масспектрометрический метод
1	Haf 1	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
2	Haf 2	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
3	Haf 3	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
4	Haf 4	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Hafnia alvei</i>
5	Haf 5	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
6	Haf 6	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
7	Haf 7	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
8	Haf 8	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
9	Haf 10	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Hafnia alvei</i>
10	Haf 11	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
11	Haf 12	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
12	Haf 13	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
13	Haf 14	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Hafnia alvei</i>
14	Haf 18	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
15	Haf 3168	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
16	Haf 131	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
17	Haf 132	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
18	Haf 133	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
19	Haf 134	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
20	Haf 2636	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
21	Haf 9 (1)	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>
22	Haf 130	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>E. coli</i>
23	Haf 923	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>E. coli</i>
24	Haf 432	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Salmonella spp</i>
25	Haf 861	<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Salmonella spp</i>

Примечание – «-» отрицательный результат фагоидентификации.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ

Определение количественного показателя РНФ, имеющего диагностическое значение. Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, при разной заражающей концентрации, исследования проводили по методике, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988), с использованием питательного бульона, контаминированного 17 часовой индикаторной культурой *Hafnia alvei* 131 в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./см³.

В результате проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц в опыте более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации питательного бульона бактериями ро-

да *Hafnia* в концентрации 10^3 м.к./см³.

Установление оптимального времени, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Для решения поставленной задачи необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 см³) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали питательный бульон, контаминированный *Hafnia alvei*.

Установлено, что с помощью исследуемых бактериофагов в РНФ при подращивании материала в течение 5 часов позволяет обнаружить гафнии в концентрации 10^3 м.к./см³. Увеличение времени подращивания материала до 16 часов не повышало чувствительности реакции, а при подращивании исследуемой смеси в течение 24 часов позволило обнаружить искомые микроорганизмы в концентрации 10^2 м.к./см³. Но длительность исследования увеличилось с 22 до 41 часа.

Бактериологическим методом обнаруживали *Hafnia alvei* в концентрации 10^4 м.к./см³, при этом на исследование затрачивалось 96 часов: выделение возбудителя (48 часов), изучение биохимических свойств (48 часов).

По результатам исследования метод подращивания по диагностической чувствительности не уступает методу экспозиции исследуемого материала с фагом, однако недостаток заключается в увеличении затрачиваемого времени на исследование.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что наиболее оптимальным является режим РНФ при 5-6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 микробных клеток в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 18 часов. Данный режим использовали в дальнейших исследованиях.

Исследование водопроводной воды, контаминированной Hafnia alvei с помощью РНФ. Пробы водопроводной воды в объеме 5 см³ вносили в колбы и контаминировали *Hafnia alvei* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./см³, заливали питательным бульоном из расчета 10 см³ бульона на 1 см³ воды и ставили контроль – колбу с пробой воды, неконтаминированной *Hafnia alvei*.

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов Н - 1 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий рода *Hafnia alvei* 10^3 микробных клеток в 1 см³ водопроводной воды.

Исследование паталогического материала, контаминированного Hafnia alvei с помощью РНФ. Трупы пчел массой 5 г помещали в стерильную фарфоровую ступку, добавляли 5 см³ дистиллированной воды и растирали до образования однородной жидкой массы. Далее полученную суспензию добавляли в стерильные колбы объемом 100 см³, заливали стерильным питательным бульоном из расчета 10 см³ бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные штаммы *Hafnia alvei* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 см³. Одновременно ставили контроль – колба с не контаминированными трупами пчел.

В результате проведенного опыта, увеличение титра фагов Н-1 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации *Hafnia alvei* 10^3 м.к./г паталогического материала, при наличии посторонней микрофлоры.

При исследовании пробы паталогического материала бактериологическим методом были выделены *Hafnia alvei* в концентрации 10^4 м.к./мл за 96 часов.

Исследование фекалий, контаминированных Hafnia alvei с помощью РНФ

Пробы фекалий поросенка весом 5 г помещали в стерильные колбы объемом 100 см^3 , заливали стерильным питательным бульоном из расчета 10 см^3 бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные штаммы бактерий *Hafnia alvei* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./г. Одновременно ставили контроль – колбы с неконтаминированной пробой фекалий.

Из результатов опыта видно, что увеличение титра фагов Н-1 УГСХА более чем в 5 раза произошло при концентрации *Hafnia alvei* 10^3 микробных клеток в 1 г фекалий. Бактериологическим методом обнаружили гафний только в концентрации 10^5 м.к./г.

Исследование мяса, контаминированного Hafnia alvei с помощью РНФ

Кусочки свинины массой 5 г растирали в стерильной фарфоровой ступке и помещали в колбы объемом 100 см^3 , заливали стерильным питательным бульоном из расчета 10 см^3 бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные штаммы *Hafnia alvei* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./ см^3 . Одновременно ставили контроль – колба с не контаминированной пробой мяса.

Увеличение титра фага Н-1 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации *Hafnia alvei* 10^3 м.к./г мяса.

Полученные данные при исследовании воды, паталогического материала и мяса подтверждают увеличение титра фагов более чем в 5 раз при минимальной концентрации *Hafnia alvei* 10^3 м.к./ см^3 . При исследовании фекалий *Hafnia alvei* обнаруживали в концентрации 10^4 м.к./г, а с увеличением инкубации бактериофагов с материалом до 12 часов обнаруживали данные бактерии в концентрации 10^3 м.к./г за 24 часа.

В результате проведенных исследований по обнаружению *Hafnia alvei* в контаминированных указанными микроорганизмами объектах ветеринарного надзора, можно утверждать об успешном применении метода фагоиндикации – РНФ, диагностическая чувствительность которого позволяет обнаруживать *Hafnia alvei* в минимальной концентрации $10^3 - 10^4$ м.к./ см^3 за 18 – 24 часа. Из чего следует, что РНФ является высокочувствительным методом, позволяющим обнаружить бактерии рода *Hafnia alvei* даже в случаях, когда выделение культуры в чистом виде практически невозможно из-за наличия большого количества посторонней микрофлоры.

Исследование трупов пчел в неблагополучной по гафниозу пасеке на присутствие бактерий *Hafnia alvei* с использованием РНФ

Оценивая эффективность реакции нарастания титра фага в условиях производства, мы провели исследования по фагодиагностике гафниоза пчел. Пчелы принадлежали ИП Молчанову А.В., п. Новая Майна, Ульяновская область. Нами было осмотрено 12 ульев, отобрано 8 проб трупов пчел.

Отбор материала осуществляли в соответствии с правилами, изложенными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года.

Обнаружение бактерий *Hafnia alvei* проводили с помощью реакции нарастания титра фага и бактериологическим методом. Результаты исследований представлены в таблице 5. Бактериологическое исследование осуществляли в соответствии с методическими указаниями, изложенными выше. Методика постановки РНФ представлена ранее.

Результат реакции учитывали по количеству образовавшихся негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках. Положительная реакция характеризовалась увеличением количества корпускул хотя бы одного штамма фага по сравнению с контролем в 5 и более раз.

В результате исследований трупов пчел при помощи РНФ с индикаторным бактериофагом положительный результат отмечали в 50% случаях (4 пробы). Время индикации при этом составило 22 часа. Бактериологическим методом, были обнаружены *Hafnia alvei* в 37,5% случаях (3 пробы) с затратой времени – 96 часов (4 суток).

Таблица 5 – Сравнение бактериологического метода и РНФ при исследовании трупов пчел на предмет обнаружения бактерий *Hafnia alvei*

Всего проб	Методы исследований			
	РНФ		бактериологический	
	количество положительных проб	%	количество положительных проб	%
8	4	50	3	37,5

В таблице 5 отображены результаты в условиях производства, которые доказывают высокую чувствительность РНФ при обнаружении энтеробактерий *Hafnia alvei* в трупах пчел сравнении с бактериологическим методом исследования с меньшей затратой времени, реактивов и посуды.

Выводы

1. Из 42 обследованных хозяйств Ульяновской, Самарской, Саратовской, Пензенской областей, республик Татарстан, Мордовия и Чувашия гафнии обнаружили в 14 (33,3%). Выделенные культуры были чувствительны к гентамицину, левомецитину и цефотоксину и были устойчивы к тетрациклину, линкомицину, цефозалину, ампициллину, бензилпенициллину.

2. Из объектов внешней среды выделены и селекционированы 5 бактериофагов, активных в отношении бактерий вида *Hafnia alvei*. Бактериофаги имели высокую литическую активность в пределах $10^8 - 10^9$ на плотных и $10^8 - 10^9$ в жидких питательных средах, диапазон литической активности составил от 28,6 до 85,7%, фаги обладали строгой видовой специфичностью, были устойчивы к температуре 60°C и действию хлороформа в течение 40 минут.

3. Изучаемые бактериофаги по морфологии фаговых корпускул были отнесены нами к отряду *Caudovirales*. Фаги Н-1, Н-2, Н-3 и Н-4 - к семейству

Myoviridae, с сокращающимися хвостовыми отростками, а фаг Н- 5 – к семейству *Sifoviridae* – бактериофаг с несокращающимся отростком. Отобран наиболее активный изолят Н-1 УГСХА, диапазон литической активности которого составил 85,7%.

4. При анализе генома бактериофага Н-1 УГСХА было установлено, что он относится к роду (филогенетической группе) *Felix01*- подобных бактериофагов с линейной ДНК размером 86760 п.н. Автоматическая аннотация результатов секвенирования генома показала 118 открытых рамок считывания, кодирующих белки размером от 50 до 1400 аминокислотных остатков, которые имеют многочисленные гомологии с белками бактериофагов, принадлежащих к семейству *Myoviridae*.

5. Оптимальными параметрами для изготовления фагового биопрепарата с высоким титром является соотношение 3,17 корпускул фага Н-1 УГСХА на 1 бактериальную клетку *Hafnia alvei* 131 при времени экспозиции пассажа 4 часа в условия 37°C.

6. Оптимальные параметры РНФ с целью фагоиндикации *Hafnia alvei* позволяют обнаружить названные бактерии в концентрации 10^3 в течение 18-24 часов. Включение в схему бактериологического исследования фагоидентификацию *Hafnia alvei* с помощью изготовленного бактериофага позволяет выделить и идентифицировать названные микроорганизмы за 34 часа.

7. Результаты исследований трупов пчел из неблагополучной по гафниозу пасеки показали более высокую чувствительность РНФ при обнаружении энтеробактерий *Hafnia alvei* в сравнении с бактериологическим методом. В результате исследований патологического материала при помощи РНФ положительный результат отмечали в 50% случаев. Время индикации при этом составило 22 часа, бактериологическим методом названные бактерии были обнаружены в 37,5% случаев за 96 часов.

Практические предложения

1. Для изготовления индикаторного гафниозного бактериофага предлагаем использовать штамм фага Н-1 УГСХА и индикаторную культуру *Hafnia alvei* 131.

2. Индикаторный бактериофаг *Hafnia alvei* рекомендуем получать в соответствии с «Временной инструкцией по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторного бактериофага Н-1 УГСХА» одобренной Научно-техническим советом ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» и утвержденной первым проректором-проректором по научной работе В.А. Исайчевым (протокол №3 от 18.06.2013 г.).

3. Диагностические исследования для выявления *Hafnia alvei* рекомендуем проводить в соответствии с «Методическими рекомендациями по индикации и идентификации бактерий *Hafnia alvei* в объектах санитарного надзора с применением специфического бактериофага», одобренными Научно-техническим советом ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» и утвержденными первым проректором-проректором по научной работе В.А. Исайчевым (протокол №3 от 18.06. 2013 г.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов *Hafnia alvei* / Д.С. Золотухин, Д.А. Васильев, А.М. Семенов [и др.] // **Вестник ветеринарии**. – 2013. – № 1. – С. 68-70.
2. Золотухин Д.С. Этиология смешанных кишечных инфекций у поросят-сосунов / А.С. Мелехин, Д.С. Золотухин, С.Н. Золотухин // **Вестник ветеринарии**. – 2011. – Т. 59, № 4. – С. 75-77.
3. Золотухин Д.С. Биологические свойства энтеробактерий рода *Hafnia* и их роль в патологии животных и человека / Д.С. Золотухин, А.С. Мелехин // **Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения. Актуальные проблемы заразных болезней животных, микробиологии, биотехнологии и ветеринарно-санитарной экспертизы: материалы международной научно-практической конференции**. – Ульяновск, 2011. – С. 90-97.
4. Золотухин Д.С. Характеристика энтеробактерий рода *Hafnia* / Д.С. Золотухин // **Материалы 1-ой региональной студенческой научно-практической конференции по природоведению**. – Ульяновск, 2011. – С. 73-75.
5. Золотухин Д.С. Энтеробактерии рода *Hafnia* / Д.С. Золотухин, Д.А. Васильев // **Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности: научно-практический семинар с международным участием**. – Ульяновск, 2011. – С. 29-32.
6. Золотухин Д.С. Выделение бактериофагов *Hafnia alvei* и изучение их биологических свойств / Д.С. Золотухин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // **Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: материалы II Международная научная конференция молодых ученых**. – Покров, 2012. – С. 39-43.
7. Золотухин Д.С. Фагопрофилактика смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов, вызываемой патогенными энтеробактериями / А.С. Мелехин, Д.А. Васильев, Д.С. Золотухин // **Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IV Международной научно-практической конференции**. – Ульяновск, 2012 – Т. 1. – С. 262-267.
8. Золотухин Д.С. Выделение бактериофагов энтеробактерий рода *Hafnia* и изучение их литической активности / Д.С. Золотухин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // **Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IV Международной научно-практической конференции**. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2012. – Т. 1. – С. 257-262.
9. О специфичности бактериофагов *Hafnia alvei* / Д.С. Золотухин, Д.А. Васильев, А.М. Семенов [и др.] // **Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции**. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2013. – Т.1. – С. 63-66.
10. Бактериофаги микроорганизмов, значимых для животных, растений и человека / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Д.С. Золотухин [и др.] // **Монография**. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2013. – 313 с.

Подписано в печать 13.11.2013 г.
Формат 60×84/16
Бумага офсетная. Печать
Усл. печ.л. 1,0 Заказ 90 Тираж 100 экз.

Типография ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1