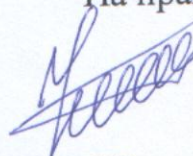


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А.СТОЛЫПИНА»

На правах рукописи



Насибуллин Ильдар Равильевич

**ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ
AEROMONAS HYDROPHILA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор
Нафеев Александр Анатольевич

Ульяновск– 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 История изучения и развитие классификации бактерий	
<i>A. hydrophila</i>	11
1.2 Биологические свойства бактерий <i>A. hydrophila</i>	16
1.2.1 Морфология	16
1.2.2 Культуральные свойства	17
1.2.3 Биохимические свойства	18
1.2.4 Дифференциация бактерий рода <i>Aeromonas</i>	20
1.2.5 Распространение и резервуар бактерий рода <i>Aeromonas</i>	25
1.2.6 Патогенность и факторы патогенности бактерий рода <i>Aeromonas</i>	27
1.2.7 Устойчивость <i>A. hydrophila</i> к физико-химическим факторам	30
1.3 Лабораторные методы идентификации бактерий <i>A. hydrophila</i> ..	32
1.3.1 Питательные среды используемые для выделения и идентификации бактерий <i>A. hydrophila</i>	38
1.4 Бактериофаги. Фагодиагностика бактерий	44
1.4.1 Взаимодействие в системе «бактериофаг-бактериальная клетка»	45
1.4.2 Выделение бактериофагов	47
1.4.3 Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>	48
1.4.4 Фагодиагностика	49
1.4.5 Реакция нарастания титра фага (РНФ)	52
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
2.1 Объекты, материалы и методы	56
2.1.1 Объекты	56
2.1.2 Материалы	56
2.1.3 Методы	57

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
2.2.1 Выделение и идентификация бактерий <i>A. hydrophila</i>	59
2.2.2 Выделение бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	64
2.2 Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	71
2.2.3.1 Морфология негативных колоний бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	71
2.2.3.2 Литическая активность бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	72
2.2.3.3 Спектр литической активности бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	79
2.2.3.4 Специфичность действия бактериофагов <i>A. hydrophila</i> ...	81
2.2.3.5 Температурная устойчивость бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	83
2.2.3.6 Устойчивость бактериофагов <i>A. hydrophila</i> к воздействию на них трихлорметана	85
2.3 Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторных бактериофагов <i>A. hydrophila</i>	87
2.3.1 Характеристика индикаторной культуры <i>A. hydrophila</i> № 43-УГСХА	88
2.3.2 Определение температурного оптимума культивирования бактериофага F-43-УГСХА	88
2.3.3 Определение оптимума количества в соотношении бактериофага F-43-УГСХА и бактерии <i>A. hydrophila</i> №43- УГСХА	89
2.3.4 Определение оптимума соотношения между временем пассажа и активностью бактериофага F-43-УГСХА	90
2.4 Разработка технологических параметров ускоренной индикации и идентификации бактерий <i>A. hydrophila</i> с помощью бактериофагов	92
2.4.1 Бактериологический метод	92

2.4.2 Фагоидентификация	94
2.5 Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага	96
2.5.1 Определение количественного показателя РНФ	96
2.5.2 Определение оптимального времени РНФ	99
2.6 Применение РНФ для индикации <i>A. hydrophila</i> в объектах ветеринарно-санитарного надзора	103
2.6.1 Исследование с помощью РНФ озерной воды, контаминированной <i>A. hydrophila</i>	103
2.6.2 Исследование с помощью РНФ органокомплекса рыб контаминированного <i>A. hydrophila</i>	105
2.6.3 Исследование с помощью РНФ сырого молока контаминированного <i>A. hydrophila</i>	106
2.7 Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага F43-УГСХА.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	129
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ...	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131
ПРИЛОЖЕНИЯ	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Насчитывающая более 100 лет история изучения бактерий рода *Aeromonas* активно продолжается и в наши дни (Janda J.M. et al., 2010). За последние 30 – 40 лет данный род пополнился новыми видами и благодаря молекулярно-генетическим исследованиям был выделен в отдельное семейство (Figueras M.J., 2000; Janda J.M. et al., 2007). Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в биосфере (Hazen T.C., 1978; Janda J.M., et al., 1998). Их активно выделяют из речной и морской воды (Holmes P., 1996; Khardori N. et al., 1988), сточных вод (Edberg S.C., 2007), гидробионтов (Щедрина Н.А., 2004), продуктов питания (Garcia F., 2009), домашних животных (Gosling P.J., 1996), птиц (Shane S.M., 1985), почвы (Singh D.V., 1992), беспозвоночных (Agger W.A., 1985; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005), насекомых (Boillard J., 1984), растений (Khardori N., 1988). Данный микроорганизм обладает широким набором факторов вирулентности обеспечивающих его патогенность и способен вызывать опасные заболевания, как у человека, так и у животных (Петровская В.Г., 1967; Nishikawa Y., 1991; Singh D.V., 1992; Zhang Y.L., 2000; von Graevenitz A., 2007). Активно размножаясь при низких температурах и вызывая порчу продуктов, бактерии *A. hydrophila* являются возбудителями пищевой инфекции (Калина Г.П., 1982; Бухарин О.В., 2000). Вызываемый данной бактерией аэромоноз рыб приводит к массовой гибели рыб и наносит тем самым экономический ущерб рыболовческим хозяйствам стран (Osborne J.A., 1989; Austin B. et al., 1996; Грищенко Л.И., 1999).

Широкая распространенность бактерий рода *Aeromonas*, полиморфизм клиники, внутривидовая схожесть требуют от лабораторий быстрой и точной индикации и идентификации данного микроорганизма (Покровский В.И., 1993; 1999). Существующие на данный момент методики индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* по разным причинам недостаточно решают эту проблему (Калина Г.П., 1977; Графова Т.И., 1982, 1985; Голубева И.В., 1985; Сидоров М.А., 1995; Блинов А.И., 1997; Методические указания 1987, 1997, 1999; Покровский В.И., Дунаевский О.А., 2001; Abbott S.L., 2003).

Одним из методов позволяющих за короткий срок без больших затрат материалов и времени произвести индикацию и идентификацию бактерий применяя бактериофаги является метод фагодиагностики (Рубашкина Б.К., 1959; Тимаков В.Д., 1962; Ревенко И.П., 1978; Ганюшкин, В.Я., 1988; Бакулов И.А., 1998; Золотухин С.Н., 2007). В нашей стране проблема выделения бактериофагов активных в отношении бактерий *A. hydrophila* и применения их для индикации и идентификации этих микроорганизмов ранее не исследовалась, исходя из этого, решение этой задачи является актуальной и представляет научный и практический интерес.

Цель исследования – разработка метода индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического бактериофага

Задачи исследования

1. Выделить из объектов ветеринарного надзора бактерии *Aeromonas hydrophila* и изучить их основные биологические свойства.
2. Выделить бактериофаги бактерий *Aeromonas hydrophila*, изучить их основные биологические и генетические свойства.
3. Селекционировать и сконструировать фаговый биопрепарат на основе выделенных бактериофагов в соответствии с требованиями, предъявляемыми к индикаторным биопрепаратам.
4. Разработать схему ускоренной индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора методом РНФ с помощью сконструированного биопрепарата.
5. Провести полногеномное секвенирование бактериофага F 43-УГСХА для определения наличия потенциальных генетических локусов патогенности.
6. Провести биоинформационный (протеомный) анализ данных секвенирования бактериофага F43-УГСХА.
7. Определить филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI.

8. Разработать схему молекулярно-генетической индикации с использованием ПЦР автономных генетических элементов *hly* в геномах бактериофагов активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

Научная новизна

Выделены новые штаммы бактериофагов активные в отношении *A. hydrophila*. Изучены основные биологические свойства выделенных фагов. На основе отобранного бактериофага F43-УГСХА сконструирован биопрепарат для индикации и идентификации *A. hydrophila*.

Предложена схема фаговой идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов ветеринарного надзора с применением созданного биопрепарата. Разработана и апробирована на объектах ветеринарного надзора схема РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* с использованием созданного фагового биопрепарата. Проведено полногеномное секвенирование бактериофага для определения наличия потенциальных генетических локусов патогенности, биоинформационный (протеомный) анализ данных секвенирования бактериофага F43-УГСХА. Определены филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI. Разработана схема молекулярно-генетической индикации с использованием ПЦР автономных генетических элементов *hly* в геномах бактериофагов активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Сконструирован биопрепарат с определенными биотехнологическими параметрами для ускоренной индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* в объектах ветеринарного надзора. Разработанные схемы фагоиндикации и фагодиагностики позволяют сократить время исследований и снизить экономические затраты. Результаты исследований биологических свойств бактериофага F43-УГСХА, методология применения фагового биопрепарата в идентификации *A. hydrophila* и схеме реакции нарастания титра фага, подтверждены актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А.Столыпина

(29.09.2020), утвержденными первым проректором-проректором по научной работе, Богдановым И.И. (29.09.2020).

По материалам диссертации разработана нормативно-техническая документация: «Методические рекомендации по изготовлению и контролю бактериофага F43-УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *A. hydrophila* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации по индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* из объектов внешней среды с помощью биопрепарата F43-УГСХА», утвержденная первым проректором-проректором по научной работе ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А.Столыпина Богдановым И.И. (протокол № 3 от 29.09.2020 года). Штаммы полученных бактериофагов вошли в музейную коллекцию вирусных и бактериальных штаммов кафедры МВЭиВСЭ УлГАУ и используются в НИР кафедры.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедре микробиологии, эпизоотологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизе ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А.Столыпина.

Методология и методы исследования

В методологии исследования использовали теоретико-методологический анализ литературы по теме работы. В ходе проведения работы над диссертацией использовали общепринятые экспериментальные, микробиологические, биотехнологические методы с последующей компьютерной обработкой данных с использованием методов статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделено и селекционировано 5 изолятов специфических бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, изучены их основные биологические и молекулярно-генетические свойства.

2. Отобран бактериофаг F43-УГСХА, отвечающий всем требованиям для индикаторных биопрепаратов и на его основе сконструирован бактериофаговый препарат.

3. Схема фагоидентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* с применением биопрепарата позволяет определить видовую принадлежность за 36-38 часов.

4. Схема фагоиндикации бактерий *Aeromonas hydrophila* с применением разработанного биопрепарата методом РНФ позволяет обнаружить данные бактерии за 19 – 24 часов в концентрации 10^3 м.к./мл.

5. Молекулярно-генетическими исследованиями бактериофага F43-УГСХА установлено в геноме фага потенциальных локусов патогенности не выявлено, наиболее близким по филогенетическому положению полного генома и большинства потенциальных фаговых белков является аннотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Степень достоверности и апробация работы

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на: Международных научно-практических конференциях Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А.Столыпина (Ульяновск 2005, 2006, 2008, 2009, 2011, 2013, 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (Москва, 2008); Международной научно-практической конференции Курганской ГСХА (Курган. 2013), Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013), Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» (Владимир ФГБУ ВНИИЗЖ, 2016), Национальной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2019).

Работа выполнена на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении микробиологических, биотехнологических, молекулярно–генетических и статистических исследований на всех этапах диссертационной работы, интерпретации результатов и участия в подготовке публикаций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, двух глав: обзора специальной литературы, собственных исследований, состоящих из объектов и методов исследований, обсуждения результатов; а также заключения, выводов, практических предложений, списка использованных литературных источников, приложений. Диссертация изложена на 176 страницах компьютерного текста, включает 34 таблицы, 23 рисунка. Список литературных источников содержит 121 отечественных и 130 зарубежных авторов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История изучения и развитие классификации бактерий рода *Aeromonas*

История изучения бактерий рода *Aeromonas* насчитывает более 100 лет (Zimmermann OER., 1890). Она находится в состоянии постоянного изменения. Номенклатура и классификация этого рода может быть разделена на 4 периода (Ali A.A., Carnahan M., 1996; Valera L., et al., 2002; Dvorikin M., et. al., 2006).

Первый период включает в себя 1890 – 1936 годы, второй период длился с 1936 по 1957 год, третий период с 1967 по 1974, четвертый с 1976 по настоящее время (Таблица 1).

Таблица 1–Периоды изучения *A. hydrophila* (Valera L., 2002).

	I.(1890-1936)	II.(1936-1957)	III.(1967-1974)	IV.(1976-по настоящее время)
семейство	таблица синонимов (табл 2)	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aeromonadaceae</i>
род		<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>
вид		<i>A.hydrophila</i> <i>A.punctata</i> <i>A.liquefaciens</i> <i>A.salmonicida</i>	<i>A.hydrophila</i> Subspecies. <i>hydrophila</i> . <i>anaerogenes</i> . <i>proteolytica</i> <i>A.salmonicida</i> . subspecies <i>salmonicida</i> . <i>achromogenes</i> . <i>masoucida</i> .	<i>A.hydrophila</i> . subspecie <i>dhakensis</i> <i>ranae</i> <i>A.caviae</i> <i>A.salmonicida</i> . subspecies <i>salmonicida</i> . <i>achromogenes</i> <i>masoucida</i> <i>smithia</i> <i>pectinolytica</i> <i>A.sobria</i> <i>A.media</i> <i>A.veronii</i> <i>biogrupo veronii</i> <i>biogrupo sobria</i> <i>A.schubertii</i> <i>A.eucrenophila</i> <i>A.ichtiosmia</i> <i>A.enteropelogenes</i> <i>A.jandaei</i> <i>A.trota</i> <i>A.allosacharophila</i> <i>A.encheleia</i>

				<i>A.bestiarum</i> <i>A.popoffii</i> <i>A.culicicola</i> <i>A.simiae</i> <i>A.molluscorum</i>
--	--	--	--	---

Впервые бактерия рода *Aeromonas* описана *Zimmermann* в 1890 году, который выделил ее из питьевого водопровода города Хемниц в Германии. Он назвал бактерию *Bacillus punctatus*, в дальнейшем идентифицированную как *Aeromonas caviae* (*Zimmermann OER.*, 1890).

В 1891 году *Sanarelli* выделил из инфицированных лягушек бактерию, названную им *Bacillus hydrophilus fuscus*, впоследствии идентифицированная как *A. hydrophila* (*Sanarelli G.*, 1891).

В 1898 году *Russell* дал подробное описание морфологических, культуральных и бактериологических свойств бактерии *Bacillus hydrophilus fuscus* (*Russell F.H.*, 1898).

В этот период были выделены и описаны и другие штаммы рода *Aeromonas*: из воды (*Beijerinck M.W.*, 1900), из молока (*Hammer B.W.*, 1917), из радужной форели (*Emmerich R.*, *Weibel C.*, 1894).

Методы, используемые в это время для характеристики и описания видов, были примитивными, но уже в это время было ясно, что это две разные группы бактерий рода *Aeromonas*. Одна группа бактерий была подвижная, хорошо росла при 37°C. Другая группа бактерий, выделенная из больных рыб *Emmerich* и *Weibel* и названная ими *Bacillus der Forellenseuche* в 1894 году, и переименованная *Lehmann* и *Neumann* в 1896 году в *Bacterium salmonicida*. Эта группа бактерий была неподвижная и не росла при 37°C и известна сегодня как *Aeromonas salmonicida* (*Lehmann K.B.*, *Neumann R.*, 1896).

В 1901 году *Bacillus hydrophilus fuscus* по предложению *Chester* была переименована в *Bacterium hydrophilus* (*Chester F.D.*, 1901).

До 1920 года бактерии рода *Aeromonas* были классифицированы в таких родах как *Bacillus*, *Bacterium*, *Aerobacter* (*Bernheim F.M.*, *Bernheim L.C.et. al.*, 1935; *Stanier R.Y.*, 1943; *Snieszko S.F.*, 1957).

После 1920 года классификация становится еще более запутанной. Отдельные виды бактерий *Aeromonas* классифицируют в такие роды как: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacterium*, *Necromonas*, *Vibrio* (Bergey D.H., 1925; Bergey D.H., 1930; Bernheim F.M., 1935) Многие из перечисленных видов были фактически синонимами (Таблица 2).

Главным вкладом А.Ж.Клувер et al. было первое использование названия рода *Aeromonas*. Название рода *Aeromonas* переводится как «выделяющий газ». В своей книге «Естественная система классификации бактерий» авторы на основе морфологических и физиологических характеристик объединяли похожие организмы в одну семью (Kluuver A.J., et al., 1936).

Их классификация была подтверждена таксономическими исследованиями Стэинера (Stanier R.Y., 1943), и в седьмом издании определителя бактерий Берджи включают этот род в семейство *Pseudomonadaceae* (Shumann H., 1988). Род *Aeromonas* в седьмом издании определителя бактерий Берджи был разделен на четыре вида: подвижные - *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. liquefaciens* и неподвижные - *A. salmonicida* (Красильников Н.А., 1949; Sniezsko S.F., 1957, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984, 2005).

В 60 – 70 годы 20 века благодаря тестам на оксидазу (Griffin P.J., 1953) и окисления – ферментации глюкозы (Hugh and Leifson ,1953) бактерии рода *Aeromonas* включены в семейство *Vibrionaceae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984; Schubert R.H.W., 1984). В восьмом издании определителя бактерий Берджи род *Aeromonas* разделен на три вида и несколько подвигов (Schubert R.H.W., 1974).

Таблица 2 – Синонимы видов рода *Aeromonas* (Dvorkin M., et. al. 2006).

Вид	Синоним	Ссылка
<i>A. hydrophila</i>	<i>Bacillus hydrophilus fuscus</i>	Sanarelli, 1891
	<i>B. ranicida. Ernst</i>	Lehman y Newmann, 1896
	<i>Aerobacter liquefaciens</i>	Beijerinck, 1900
	<i>B. hydrophilus Sanarelli</i>	Chester, 1901.
	<i>B. ichthyosmius</i>	Hammer, 1917

	<i>Proteus hydrophilus</i> Ches-	<i>Bergey y cols.</i> , 1923
	<i>ter</i>	<i>Bergey y cols.</i> , 1923
	<i>Escherichia ichthyosmius</i>	<i>Weldin y Levin</i> , 1923
	<i>Bacterium hydrophilum</i>	<i>Wohlzogen-Kühr</i> , 1932
	<i>Pseudomonas fermentans</i>	<i>Pribham</i> , 1933
	<i>Escherichia icteroides</i>	<i>Bergey y col.</i> , 1934
	<i>Proteus ichtyosmia</i> Ham-	<i>Bergey y col.</i> , 1934
	<i>mer</i>	<i>Kluyver y Van Niel</i> , 1936
	<i>Flavobacterium fermentans</i>	<i>Miles y Halnan</i> , 1937
	<i>Aeromonas liquefaciens</i>	<i>Caselitz</i> , 1955
<i>A. caviae</i>	<i>Proteus melanovógenes</i>	
	<i>Vibrio jamaicensis</i>	<i>Zimmerman</i> , 1890
		<i>Lehmann y Newmann</i> , 1896
	<i>Bacillus punctatus</i>	<i>Bergey y cols.</i> , 1934
	<i>Bacterium punctatum</i>	<i>Scherago</i> , 1936
	<i>Achromobacter punctatum</i>	<i>Breed y cols.</i> , 1948
	<i>Pseudomonas caviae</i>	<i>Crawford</i> , 1954
	<i>Pseudomonas punctata</i>	<i>Pivnick y Sabina</i> , 1957
	<i>Pseudomonas formicans</i>	<i>Schubert</i> , 1967a y b
	<i>Aeromonas formicans</i>	
<i>A. salmonicida</i>	<i>Aeromonas punctata</i>	<i>Emmerich y Weibel</i> , 1894
		<i>Lehman y Newmann</i> , 1896
	<i>Bacillus de trucha pestilen-</i>	<i>Pribham</i> , 1933
	<i>te</i>	<i>Smith</i> , 1963
	<i>Bacterium salmonicida</i>	
<i>A. eucrenophila</i>	<i>Proteus salmonicida</i>	<i>Schubert y Hegazi</i> , 1988
	<i>Necromonas achromogenes</i>	
<i>A. enteropelogenes</i>		<i>Collins y cols.</i> 1993;
	<i>A. punctata</i>	<i>Huys y cols.</i> 2002
<i>A. veronii</i>	<i>A. trota</i>	<i>Collins y cols.</i> 1993;
		<i>Huys y cols.</i> 2001
		<i>Huys y cols.</i> 2005
	<i>A. ichtiosmia, A. culicicola</i>	

Popoff и *Veron* в 1976 году провели обширное исследование, используя методы численной таксономии и благодаря их работе в определителе бакте-

рий Берджи в род *Aeromonas* включили новые виды *A. sobria*, *A. caviae* и подвиды *A. salmonicida* (Popoff M., et al., 1976; Canonica F., 1985).

В последующие годы активно развивается геносистематика, разрабатываются новые подходы к филогении микроорганизмов, активно изучается бактериальный геном (Figueras M.J., 2000; Janda J.M., et al., 2010).

В 1986 году Colwell на основе изучения ДНК-ДНК гибридизации, 16S рРНК секвенирования и 5S рРНК сравнения последовательностей предложил выделить род *Aeromonas* в собственное семейство *Aeromonadaceae* (Colwell R., 1986). Эти данные были подтверждены обширными генетическими исследованиями эталонных штаммов и в следующем издании определителя бактерий Берджи род *Aeromonas* выделяется в отдельное семейство (Martinez-Murcia A.J., 1992; Kita-Tsukamoto K, et al., 1993; Zhang Y.L., 2000).

На сегодняшний день бактерии рода *Aeromonas* имеют следующую таксономическую структуру:

царство – *Bacteria*

тип – *Proteobacteria*

класс – *Gammaproteobacteria*

порядок – *Aeromonadales*

семейство – *Aeromonadaceae*

род – *Aeromonas*

типичный представитель – *Aeromonas hydrophila*

В настоящее время род *Aeromonas* включает более 20 видов бактерий (Таблица 3) (Bergey's Manual of Systematic, 2005). Виды аэромонад разделяют на подвиды и биотипы (Brandi G., 1996). Внутри рода аэромонады разделяются на две основные группы: подвижные аэромонады (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) и неподвижные (*A. salmonicida*). Типичным представителем рода *Aeromonas* является бактерия *A. hydrophila*, открытая Chester в 1901 году. Так как классификация бактерий - динамичный и постоянно развивающийся процесс, работы по изучению различных видов аэромонад активно продолжают во

всем мире (von Graevenitz A., 1993; Moyer N.P., 2002; Edberg S.C., 2007; Janda J. M., et al., 2010).

Таблица 3 – Виды рода *Aeromonas* (Bergey's Manual of Systematic, 2005)

№	Вид	Автор и год описания
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>Stainer</i> , 1943
2	<i>A. salmonicida</i>	<i>Griffin et al.</i> , 1953
3	<i>A. sobria</i>	<i>Poppof et al.</i> , 1981
4	<i>A. media</i>	<i>Allen et al.</i> , 1983
5	<i>A. caviae</i>	<i>Schubert e Hegazi</i> , 1988
6	<i>A. veronii</i>	<i>Hickman-Brenner et al.</i> , 1987
7	<i>A. eucrenophila</i>	<i>Schubert e Hegazi</i> , 1988
8	<i>A. schubertii</i>	<i>Hickman-Brenner</i> , 1988
9	<i>A. jandaei</i>	<i>Carnahan et al.</i> , 1991a
10	<i>A. trota</i>	<i>Carnahan et al.</i> , 1991b
11	<i>A. encheleia</i>	<i>Esteve et al.</i> , 1995b
12	<i>A. bestiarum</i>	<i>Ali et al.</i> , 1996
13	<i>A. popoffii</i>	<i>A. Huys et al.</i> , 1997
14	<i>A. simiae</i>	<i>A. Harf-Monteil et al.</i> , 2004
15	<i>A. molluscorum</i>	<i>Minana-Galagis et al.</i> , 2004
16	<i>A. bivalvium</i>	<i>Milana-Galagis et al.</i> , 2007
17	<i>A. aquariorum</i>	<i>Martinez-Murcia et al.</i> , 2008
18	<i>A. tecta</i>	<i>Demarta et al.</i> , 2008
19	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>Martinez-Murcia et al.</i> , 1992b
20	<i>A. culicicola</i>	<i>Pidiyar et al.</i> , 2002
21	<i>A. sharmana</i>	Saha P., Chakrabarti T., 2006
22	<i>A. piscicola</i>	<i>Hidalgo et al.</i> , 2008
23	<i>A. fluvialis</i>	<i>Alperi et al.</i> , 2009

1.2 Биологические свойства бактерий *A. hydrophila*

1.2.1 Морфология

Бактерии *A. hydrophila* – представляют собой клетки от прямых палочек с закругленными концами до сферических, их размеры варьируются от 0,3 - 1,0 до 1,0 - 3,5 мкм в зависимости от возраста культуры и среды выращивания (Определитель бактерий Берджи, 1997). В мазках располагаются одиночно, в парах или короткими цепочками. По Граму бактерии окрашиваются отрицательно (Калина Г.П., 1977). Обладают подвижностью за счет полярного жгутика, на плотной среде молодые культуры могут образовывать перитрихальные жгутики. Аспорогенны, некоторые виды образуют капсулы (Bergey's Manual of Systematic, 2005; Dvorkin M., et. al., 2006).

1.2.2 Культуральные свойства

Бактерии *A. hydrophila* – факультативные анаэробы, мезофилы, с диапазоном роста от 0 до +41°C, оптимальная температура роста от +22 до +37°C, при этом клинические изоляты инкубируют при +37°C, экологические изоляты при +22 - 30°C (Colaco C., 1982; Popoff M., Lallier R., 1984; Определитель бактерий Берджи, 1997). В зависимости от температуры бактерии *A. hydrophila* могут изменять биохимические свойства (Ali A., 1996; Погорелова Н.П., 1999; Бухарин О.В., 2000). Водородный показатель среды для данного микроорганизма составляет от 5,5 до 9,0, оптимальный рост данная бактерия показывает при *pH* 7,2 - 7,4 (Palumbo S.A., 1985; Majeed K.N., 1993; Stagnaro S.M., 2000). Данный микроорганизм образует биопленки, содержание натрия хлорида для оптимального роста находится в пределах 0 - 4% (Abbott S.L., 2003; Bergey's Manual, 2005; Stagnaro S.M., 2000). Бактерии *A. hydrophila* хемоорганотрофы, обладающие бродильным и дыхательным типом метаболизма (Определитель бактерий Берджи, 1997). Бактерии *A. hydrophila* при росте на МПА образуют колонии 1 - 3 мм в диаметре, гладкие, округлые, полупрозрачные с беловато-желтым оттенком, через 48 часов инкубации может появиться зеленоватое окрашивание и более сильный запах (Лабинская Ф.С., 1979). При росте в МПБ бактерии *A. hydrophila* вызывают равномерное помутнение среды и образуют серовато-

серебристую поверхностную пленку, и выпадает хлопьевидный осадок белого цвета (Сидоров М.А., 1995; Покровский В.И., 1999).

На дифференциально-диагностической среде А-2 бактерия *A. hydrophila* образует крупные, с вишневым центром и узким бесцветным ободком колонии (Калина Г.П., 1977). На триптон – кровяном агаре колонии бактерий *A. hydrophila* вырастают в виде круглых, серых, с зоной гемолиза вокруг (Boxmié E.R., 1998). На триптон – соевом агаре данный микроорганизм образует круглые, серовато-желтого цвета, полупрозрачные колонии (Soler L., 2003). На среде Шмита – Шантелье колонии бактерий *A. hydrophila* черного цвета (Сидоров М.А., 1995). На агаре Эндо с молоком колонии матовые, выпуклые, с зоной просветления (Грищенко Л.И., 1999, Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов от 27.09.99). На среде TCBS колонии в диаметре 3-5 мм, блестящие, бледно-коричневого цвета (Bergey's Manual, 2005). На среде УГСХА-2 через 24 часа наблюдается рост округлых, с ровным краем, выпуклых, светло-бежевых, блестящих колоний, до 3 мм в диаметре (Канаева Т.И., 2009). В качестве ингибиторов роста бактерий *A. hydrophila* возможно использовать много веществ, как химической, так и биологической природы. Наиболее активно применяют ампициллин, ацетамид, цетримид, возможно использование красителей (Калина Г.П., 1984; Castro-Escarpulli G., 2003). Для хранения бактерий данного вида применяют полужидкий 0,3% агар, в условиях холодильника при температуре 4 - 6°C, с периодичностью пересева 1 раз в 3 - 4 месяца (Герхардт Ф., 1984; Лабинская А.С., 2004).

1.2.3 Биохимические свойства

Бактерии *A. hydrophila*, являясь типичными представителями рода *Aeromonas*, проявляют следующие биохимические свойства: оксидазо - и каталазоположительные; восстанавливают нитраты до нитритов; образуют индол, образуют газ и кислоту из Д-глюкозы; образуют сероводород; гидролизуют желатин, эскулин; образуют кислоту из L-арабинозы, Д-галактозы, глицерола, мальтозы, Д-маннитола, салицина, сахарозы, трегалозы; выделяют аргининдигидрогеназу; продуцируют ДНК-азу, фосфатазу; не ферментируют инозит, ксилозу,

мочевину, адонит, дульцит; не образуют пигмент (Abbott S.L., 2003). Не все штаммы используют цитрат, образуют кислоту из лактозы, используют ацетат, липазу. Основные биохимические свойства бактерий *A. hydrophila* представлены в Таблице 4 (Bergey's Manual, 2005; Janda J.M., et al., 2010).

Таблица 4-Биохимические свойства бактерий *A. hydrophila*

Биохимическое свойство	Свойства штаммов <i>A. hydrophila</i>
Подвижность	+
Оксидаза	+
Каталаза	+
Образование индола	+
Использование цитрата (среда Симмонса)	<i>d</i>
Реакция Фогеса-Проскауэра	+
Проба с метиловым красным	+
Образование H_2S	+
Гидролиз желатина	-
Использование малоната	-
Рост в присутствии <i>KCN</i>	+
Гидролиз мочевины	-
Фенилаланиндезаминаза	-
Орнитиндекарбоксилаза	-
Аргининдигидролаза	+
Лизиндекарбоксилаза	-
Образование газа из Д-глюкозы	+
Образование кислоты из Д-глюкозы	+
Гидролиз эскулина	+
Использование ацетата	<i>d</i>
ДНК-аза	+
Восстановление нитрата	+
Липаза	<i>d</i>
Тартрат (среда Джорданса)	-
Мукаг, кислота	-
Цитрат (среда Кристенсена)	-
Просветление среды с тирозином	+
Коричневый растворимый пигмент	-
Чувствительность к 0/129	-
Рост в присутствии <i>NaCl</i>	+
Образование кислоты из:	
Сахарозы	+

Д-ксилазы	-
Трегалозы	+
Д-сорбитола	-
Салицина	+
Раффинозы	-
L-рамнозы	-
Д-маннозы	+
Мелибиозы	-
Д-маннитола	+
Лактозы	<i>d</i>
Мальтозы	+
Мио-инозитола	-
Глицерола	+
Адонитола	-
Д-арбитола	-
L-арабинозы	+
Целлобиозы	-
Эритритола	-
Дульцитола	-
Д-галактозы	+
Гемолизис	+
Уреаза	-
Пиразинамидаза	-

Примечание – «-» – 0 – 10% штаммов положительные;

«*d*» – 26 – 75% штаммов положительные;

«+» – 90 – 100% штаммов положительные.

1.2.4 Дифференциация бактерий *A. hydrophila* от бактерий других родов

При микробиологическом исследовании бактерии рода *Aeromonas* необходимо дифференцировать от бактерий других родов (Лабинская А.С., 2004). Основные признаки рода *Aeromonas* для дифференциации от сходных микроорганизмов:

- 1) определение оксидазы; типа расщепления глюкозы;
- 2) установление протеологических свойств, уреазной активности;

3) выявление декарбоксилазы, лизина и орнитина; дигидролазы, аргинина (Таблица 5) (Millership S.E.,1984,1996; Bergey's Manual, 2005; Janda J.M et al., 2010).

Таблица 5 – Дифференциация рода *Aeromonas* от сходных родов

Тест	род			
	<i>Aeromonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
Подвижность	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+
Желатин	+	+	-	+
Пигмент	+ (-)	-	-	+ (-)
Индол	+	+	- (+)	-
Лизин	-	+	+	-
Орнитин	-	+	+	-
Аргинин	+	-	+ (-)	+
<i>NaCl</i>	-	+	-	-
Чувствительность к 0/129	-	+	+	+
Расщепление мио-инозитола	-	-	+	-
Расщепление Д-маннитола	+	+	-	-
Расщепление сахарозы	+	+	-	-
О/Ф	+/+	+/+	+/+	+ (-)
Газ из глюкозы	+	-	-	-
Рост на <i>TCBS</i>	-	+	-	-

Примечание – «+» реакция положительная; «-» – реакция отрицательная; «+ (-)» – большинство видов положительная реакция; «- (+)» – большинство видов отрицательная реакция; О/Ф – оксидация – ферментация.

У применяемого также для дифференциации вибриостатика 0/129 (2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридина), по сообщению некоторых авторов, стала появляться резистентность не только у бактерий рода *Aeromonas*, но и у бактерий рода *Vibrio* (Ramamurthy T.A., 1992). Для ускоренной дифференциации бактерий родов *Aeromonas* и *Vibrio* применяют трихлоруксусную кислоту (Андрусенко И.Т., 2007).

Внутривидовая дифференциация бактерий рода *Aeromonas* сложна из-за появления новых видов рода, схожести их биохимических тестов. Для внутривидового разделения бактерий рода *Aeromonas* используют тесты, представленные в Таблицах 6, 7 (Abbott S.L., 1992; 2003).

Таким образом, дифференциация внутри рода затруднительна из-за многочисленности и сложности тестов, вариабельности получаемых данных, что еще раз доказывает цели нашей работы (Altwegg M., 1986; Блинов А.И., 1997; Dvorkin M.et. al., 2006; Канаева Т.И., 2009).

Таблица 6 – Внутриродовая дифференциация подвижных *Aeromonas*

Признак	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. allosac-</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. media</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. trola</i>	<i>A. veronii biovar</i>	<i>A. veronii biovar</i>
Подвижность	+	+	+	<i>d</i>	+	+	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	-	+	+	+
Индол	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>D</i>	+	-	+	+	+	+
Уреаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ОНПГ	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>D</i>	+	<i>d</i>	+	+	+	+
Цитрат	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+	-	-	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>
Ацетат	+	+	+	+	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>D</i>	+	<i>d</i>	+	+	+	+
Малонат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN	+	-	<i>d</i>	+	+	+	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>D</i>	<i>d</i>	-	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	-	<i>d</i>	-	-	-	<i>d</i>	-	<i>D</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	-	<i>d</i>	<i>d</i>
Желатин	+	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	+	<i>d</i>	-	+	+	+
Лизин	+	+	<i>d</i>	-	-	-	+	-	-	<i>d</i>	<i>d</i>	+	+	+	+
Аргинин	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	-	+	-	+
Орнитин	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Фенилаланиндезалиназа	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>D</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	+	+	+	+

ДНКаза	+	-	<i>d</i>	+	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>D</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	+	<i>d</i>	<i>d</i>
Липаза	+	+	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	+	+	+	-	+	+
Д-глюкоза	+	+	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	+	-	+	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>
<i>L</i> -арабиноза	<i>d</i>	<i>d</i>	+	+	-	<i>d</i>	-	+	<i>D</i>	+	-	-	-	-	<i>d</i>
<i>L</i> -рамноза	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Д-ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Целлобиоза	-	+	<i>d</i>	+	-	<i>d</i>	<i>d</i>	+	-	<i>d</i>	-	+	+	<i>d</i>	<i>d</i>
Лактоза	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	+	-	-	-	<i>d</i>	<i>d</i>
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+	<i>d</i>	<i>d</i>	-	+	-	+	-	+	<i>d</i>	+	+
Д-трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Д-раффиноза	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Адонитол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Дульцитол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Эритритол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глицерол	+	+	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	<i>d</i>	+	+	-	+	<i>d</i>	+	+
Инозитол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Д-маннитол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>d</i>	+	+
Д-сорбитол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-
α -метил-Д-глюкозид	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	<i>d</i>	-	+	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	+	<i>d</i>
Салицин	<i>d</i>	-	<i>d</i>	+	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	+	-
Мелибиоза	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Д-амигдалин	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Д-арабитол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S - GCF	+	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	+	<i>d</i>	-	+	-	<i>d</i>	<i>d</i>

Окисление глюкозы	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	<i>d</i>
Эластаза	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-
Аскорбат	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>d</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	-	<i>d</i>	-	<i>n</i>	-	-	<i>n</i>	-	-	<i>n</i>
Гидролиз эскулина	+	<i>d</i>	+	+	+	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	-	+	-
Рост в 0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост в 3% NaCl	+	+	+	+	+	<i>d</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Гемолиз	+	<i>d</i>	+	-	<i>d</i>	<i>d</i>	+	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	+	+
Ампициллин	-	-	-	-	<i>n</i>	-	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	+	-	-
Цефалотин	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	+	-	<i>d</i>	+
0/129	+	+	+	+	+	<i>d</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пиразинамидаза	-	<i>n</i>	-	<i>d</i>	<i>n</i>	+	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	-	<i>d</i>	-	<i>d</i>
Манноза	+	<i>n</i>	+	<i>d</i>	<i>n</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Стафолизин	<i>d</i>	-	<i>d</i>	-	<i>n</i>	-	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Полипектат (25°C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>d</i>	-	-	-	-	-
Мукат	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание – «+» – более 90%; «-» – менее 10%; «*d*» – 11 - 89% положительных с инкубацией при 35°C в течение 7 дней, кроме *A. popoffii* и *A. sobria*, которые инкубировали при 25°C; «*nd*» – не определено

Таблица 7–Внутривидовая дифференциация неподвижных *Aeromonas*

Признак	<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. achromogenes</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. masoucida</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. smithia</i>	<i>Atypical</i> <i>A. salmonicida</i>
Подвижность	-	- (100%)	-	-	-	- (100%)
β-гемолизис	+	+	-	+	-	- (100%)
Оксидаза	+	+	+	+	+	+
Коричневый пигмент	+	+	+	-	-	+
Гидролиз эскулина	+	+	-	+	-	- (97%)
Индол	-	- (100%)	+	+	-	+
Аргинин	-	- (100%)	+	+	-	<i>nd</i>
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	<i>nd</i>	-	+	-	<i>nd</i>
Газ из Д-глюкозы	+	+	+	+	+	+
Ферментация Д-глюкозы	+	+	-	+	-	- (97%)
Сукроза	-	- (100%)	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Салицин	+	+	-	-	-	- (100%)
Арбутин	+	+	-	-	-	- (100%)
Д-галактоза	+	+	+	+	-	+
Д-маннитол	+	+	-	+	-	+
<i>L</i> -арабиноза	+	+	-	+	-	- (100%)
<i>i</i> -инозитол	-	- (100%)	-	-	-	- (100%)
<i>N</i> -ацетил глюкозамин	+	+	-	-	+	+

1.2.5 Распространение и резервуар бактерий рода *Aeromonas*

Бактерии *A. hydrophila* имеют широкое распространение в биосфере. Данный микроорганизм может быть выделен практически из всех экологических ниш, где существуют бактериальные экосистемы (Janda J.M., et al., 2010). К этим экосистемам относятся: водная среда обитания (Khardori N., 1988; Holmes P., 1996), гидробионты (Погорелова Н.П., 1999; Castro-Escarpulli, 2003; Щедрина Н.А., 2004), продукты питания (Palumbo S.A., 1996 1996; Sha J., 2002; Garcia F., 2009), домашние животные (Hazen T.C., 1978; Gosling P.J., 1996; Palumbo S., 1999), птицы (Shane S.M., 1985), насекомые (Boillard J., 1984), беспозвоночные (Agger W.A., 1985; Holmes P., 1996), растения (Khardori N., 1988). Бактерии рода *Aeromonas* на сегодняшний день являются практически синонимом к слову «вода», так как выделяются из воды практически везде (Janda J.M., et al., 2010). Данные бактерии характеризуются экологической толерантностью, хорошей модификационной изменчивостью и адаптацией к условиям среды обитания (Калина Г.П., 1984; Бухарин О.В., 1998). Бактерии рода *Aeromonas* были признаны патогенными для человека и животных (Графова Т.И., 1982; Калина Г.П., 1982,1984; Altwegg M., 1986; Чайка Н.А., 1987; Блинов А.И., 1997; Покровский. В.И., 1993). Наиболее опасен данный микроорганизм для детей до 7 лет и людей с ослабленным иммунитетом (Burke V., 1983; Carnahan A.M., 1991; Burgos A.,1992). Большое количество людей являются микробоносителями данной бактерии, мужчины по статистике страдают чаще, чем женщины (Blatz D., 1979).

Содержание бактерий рода *Aeromonas* в воде варьируется в зависимости от сезона, температуры окружающей среды, проточности и солености воды, сопутствующей микрофлоры и многих других факторов (Burke V. et al., 1983; Misra S., 1990; Fiorentini C., 1998; Granum P.E., 1998; Biscardi D., 2002).

Данный микроорганизм вызывает заболевания многих видов рыб, обуславливая их падеж и гибель, в результате чего рыбоводческие хозяйства мно-

гих стран несут огромные экономические потери (Osborne J.A., 1989; Joseph S.W., 1994; Грищенко Л.И., 1999).

ВОЗ внесла бактерии рода *Aeromonas* в списки для определения качества питьевой воды (Fernandez M.C., 2000; USEPA, 1998, 2005; Guidelines for drinking-water quality, 2011).

Бактерии рода *Aeromonas* как вызывают заболевания практически у всех видов животных, так и являются частыми обитателями их организмов, являясь при этом резервуаром данной инфекции (Moyer N.P., 1987; Thorton S.M., 1994; Ceylan E., 2009).

При увеличении времени и температуры хранения контаминированных бактериями *A. hydrophila* продуктов, количество данных бактерий растет. По этой причине бактерии рода *Aeromonas* могут быть включены в перечень микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления (Калина Г.П., 1977, 1982; Kirrov S.M., 1993; Borrell N., 1998).

Человек активно ведет народно-хозяйственную деятельность, употребляет контаминированные бактериями продукты в пищу, поэтому основными путями заражения бактериями рода *Aeromonas* являются: кишечный и контактный (Martin-Carnahan A., 2005; Janda J.M., et al., 2010).

Точное количество инфекций, вызванных бактериями рода *Aeromonas*, неизвестно. В связи с возможностью передачи инфекции через воду и продукты питания, данный микроорганизм представляет серьезную угрозу для здоровья людей (Томэску В., 1982; Хмелевская Г.В., 1990; Покровский В.И., 1996, 1999; Figueras M.J., 2005; Krzymińska S., Kaznowski A., et al., 2008; Хомякова Т.И., 2009).

1.2.6 Патогенность и факторы патогенности *A. hydrophila*

Патогенность бактерий *A. hydrophila*

Способность бактерий вызывать патологические изменения в организме теплокровных животных во многом зависит от наличия у них факторов патогенности. *A. hydrophila* обладает широким набором факторов, обеспечивающих

ее патогенность, и является этиологическим агентом, который способен вызывать достаточно опасные инфекционные процессы, как у человека, так и у животных (Poroff M., Davaine Y., 1971; Бухарин О.В., 1998; Chopra A.K., 1999).

Вне организма человека в окружающей среде бактерии *A. hydrophila* обладают факторами агрессии и инвазии, характерными для возбудителей инфекций (Петровская В.Г., 1967; Janda J.M., et al., 2010). Для проявления патогенных свойств не требуется пассирования штаммов, выделенных из внешней среды, через организм теплокровных животных (Бухарин О.В., 1998). Аэромонады широко распространены в воде, субстрате, предельно обедненном питательными веществами, но при их проникновении в организм человека, они проявляют способность не только к выживанию в новых условиях, но и к реализации комплекса факторов патогенности, инициирующей инфекционный процесс (Петровская В.Г., 1963; Janda J.M., et al., 2010). К основным патогенным свойствам бактерий *A. hydrophila* относятся:

- токсичная активность (образование цитотоксина и энтеротоксина),
- энтероинвазивная способность (способность преодолевать защитные приспособления организма и размножаться в нем) (Janda J.M., et al., 2010),
- наличие у многих штаммов факторов колонизации (адгезии) (Nishikawa Y., 1991; Janda J.M., et al., 1998).

Факторы патогенности бактерий *A. hydrophila*.

Инвазивная способность *Aeromonas hydrophila* осуществляется целым арсеналом средств - поверхностными структурами, защищающими от фагоцитоза (капсулы, поверхностные антигены), разнообразными продуктами бактериальной клетки ферментной природы (факторы распространения), а также особенностями метаболизма бактерий *A. hydrophila*, обуславливающими их способность выживать в изменяющейся среде *in vivo* (Петровская В.Г., 1967).

Степень вирулентности штаммов *A. hydrophila* регулируется высокоаффинной железо-хелатирующей системой, названной амонобактин (Bergey's Manual 2005; Janda J.M., et al., 2010).

Процессы адгезии и аутогезии обеспечивают белки наружной мембраны, фибриллы и липополисахаридные цепи (ЛПС) (Janda J.M., et al., 2010).

Фактором патогенности с токсичной функцией являются ЛПС - один из компонентов клеточной стенки аэромонадного микроба (Bergey's Manual, 2005). Основные патогенные свойства *A. hydrophila* определяются экзотоксинами белковой природы (энтеротоксин и цитотоксин). *H. Shumann* и *H. Tschape* обнаружили энтеротоксин, серологически родственный холерному, его действием на эпителий слизистой оболочки тонкой кишки и обусловлена потеря жидкости организмом (то есть данный токсин вызывает понос за счет активации внутриклеточных ферментов, приводящих к секреции жидкости в просвет кишки) (Shane S.M., Gifford D.H., 1985). Энтеротоксин относительно термостабилен и не теряет своей активности после 10 – 20 минут прогрева при 56°C, однако прогрев в течение 20 минут при 60 – 65°C или же 15 минут при 80°C приводит к полной его инактивации (Chopra A.K., 1999; Dvorkin M., et. al., 2006; Chien C.C., 2008).

Некоторые штаммы *A. hydrophila* синтезируют особый цитоксин белковой природы с *ph* 3,5, вызывающий дермонекротическую реакцию в коже и слизистых оболочках, и оказывающий цитопатогенное действие на культуру диплоидных фибропластов. Фактор этот термолабилен и после 10 – минутного прогрева при 56°C полностью разрушается (Singh D.V., 1992).

Способность к образованию гемолитических зон при росте на кровяном агаре редко регистрируется у бактерий *A. hydrophila*. При культивировании *in vitro* некоторые штаммы *A. hydrophila* активно секретируют гемолизин в среду, в то время как у других штаммов он накапливается в виде связанного с клетками неактивного предшественника, а в жидкую фазу попадает лишь после аутолиза. *A. W. Bernheimer* (1935) предложил секретлируемый гемолизин обозначать словом «аэролизин», а название «гемолизин» оставить за токсином, связанным с микробными клетками. Данные токсины способны к повреждению мембраны гликопротеинов и образованию пор. Гемолизин и аэролизин - термолабильные

белки, теряющие активность через 20 минут прогрева при 50°C (Zhang Y.L., 2000).

Все перечисленные факторы патогенности в естественных условиях действуют одновременно, в совокупности создавая инфекционный процесс. Таким образом, бактерии *A. hydrophila* выделяют сильные токсины, обладают множеством вирулентных факторов и способны вызывать опасные инфекционные процессы, как у человека, так и у животных (Cahill M.M., 1990; Janda J.M., et al. 2010).

Клинические проявления, вызываемые бактериями *A. hydrophila*, отличаются многообразием. При алиментарном и водном пути заражения ведущими симптомами будут жидкий стул, рвота, желудочные боли, общая интоксикация (Altwegg M., 1986; Janda J.M., et al., 2010). В случае контактного пути заражения будет наблюдаться диффузное воспаление кожи, подкожной клетчатки, может развиваться лимфангит и лимфаденопатия, повышается температура тела, появляется боль в месте внедрения микроба в организм (Colwell R., 1986).

При генерализации процесса может развиваться септицемия, поражение мозга, костей, почек, глаз; может развиваться менингит, пневмония, остиомиелит, гангренозные поражения кожи, артриты (Janda J.M., et al., 2010).

У животных, как теплокровных, так и хладнокровных, аэромонады вызывают серьезные заболевания, такие как язвенные стоматиты у змей и ящериц (Shane S.M., 1985; Janda J.M., et al., 2010), сепсис у собак (Gosling P.J., 1996), септический артрит у телят (Bergey's Manual, 2005; Janda J.M., et al., 2010), семенной везикулит у быков (Moro E.M., 1999) и множество других инфекций (Gosling P.J., 1996; Janda J.M., et al., 2010).

1.2.7 Устойчивость бактерий *A. hydrophila* к физико-химическим факторам

Оптимальная температура роста бактерий *A. hydrophila* от 10 до 42°C (Блинов А.И., 1997), при этом данные бактерии способны сохраняться в конта-

минированных ими продуктах в условиях бытовых холодильников при 0 - 10°C (Графова Т.И., 1982; Colaco C., 1982).

При температуре 55 - 65°C бактерии *A. hydrophila* полностью инактивируются, это подтверждает необходимость поддержания температуры в системах горячего водоснабжения не ниже 60°C (Voxmie E.R., 1998; Spinks A.T., 2006).

Температура бытовых холодильников благоприятствует размножению и продуцированию факторов вирулентности у бактерий *A. hydrophila* (Графова Т.И., 1982).

Исследование продуктов, контаминированных бактериями *A. hydrophila* после воздействия на них обработкой в микроволновой печи показало, что большинство бактерий выживает (Щедрина Н.А., 2004). Таким образом, бактерии *A. hydrophila* обладают эвритемностью и большими адаптационными возможностями (Бухарин О.В., 1998; Бухарин О.В., 2000; Janda J.M., et al., 2010).

Диапазон для роста бактерий *A. hydrophila* находится между 4,5 и 9,0 pH и концентрацией *NaCl* от 0 до 4% (Stagnaro S.M., 2000; Bergey's Manual, 2005). В воде бактерия *A. hydrophila* выживает до 60 дней (Burke V. et al., 1983).

Для хранения бактерий *A. hydrophila* используют лиофилизацию, замораживание в *TSB* бульоне с 15% глицерином при -20°C на месяцы или *TSB* бульоне с 20% глицерином при -70°C на годы. Для кратковременного хранения бактерий *A. hydrophila* засевают на полужидкий 0,3% агар и хранят при 4°C и периодически пересевают каждые 2-3 недели (Лабинская, А.С. 2004; Dvorkin M., et al., 2006).

Исследование *B. Statnera* в 1988 году показало, что температура 37°C является оптимальной для кинетики роста и синтеза белка у бактерий *A. hydrophila* (Statner B., 1988).

Бактерии *A. hydrophila* способны образовывать биопленки, что повышает их устойчивость к воздействию хлора, используемого для дезинфекции питьевой воды (Stagnaro S.M., 2000; Gibbs A., 2008).

Бактерии *A. hydrophila* чувствительны к гипохлориту натрия, к четвертичным аммониевым соединениям, йодоформу, 2 – хлорфенолу и глутаралальдегиду (Balsalobre L.C., 1980; Turnidge J.D., 2003; Libisch B.C., 2008). Бактерии рода *Aeromonas* имеют относительно невысокую резистентность к антимикробным веществам. Исследования по изучению антибиотикоустойчивости бактерий рода *Aeromonas*, проведенные в 2000–2010 годах показали, что устойчивость бактерий рода *Aeromonas* существенно не изменилась в сравнении с исследованиями 1980–90 годов (Motyl M.R., 1985; Turnidge J.D., 2003). Для практических целей с целью изучения антибиотикоустойчивости бактерий рода *Aeromonas* Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам (CLSI) были разработаны единые стандарты (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2006). Исследования антибиотикоустойчивости бактерий *A. hydrophila* (Fainstein V.S., Weaver, 1982; Janda J.M., et al., 1985; Jorgensen J.H. et al., 2007; Hernould M., 2008; Max Aravena-Román, 2012) показали, что данная бактерия обладает типичной антибиотикорезистентностью, характерной для рода *Aeromonas*. Turnidge с коллегами (2003) провели 5-летнее исследование по изучению антибиотикоустойчивости бактерий рода *Aeromonas*. В исследовании участвовали 57 лабораторий из 25 стран мира, исследовалось 258 штаммов рода *Aeromonas*, в том числе 149 штаммов *Aeromonas hydrophila* (Turnidge J.D., 2003). Активное использование антибиотиков в рыбной и пищевой промышленности, в лечении людей и животных приводит к увеличению устойчивости бактерий *A. hydrophila* к антимикробным веществам (Overman T.L., 1980; Motyl M.R., et al., 1985; Robinson J.J, et al., 1986).

1.3. Лабораторные методы идентификации *A. hydrophila*

В настоящее время лабораторная идентификация бактерий рода *Aeromonas* в ветеринарной практике основывается на бактериологических методах исследования. Это исследование состоит в выделении чистой культуры возбудителя из объектов окружающей среды и клинического материала на питательные среды, микроскопии по Граму и идентификации выделенной культуры по

культуральным и биохимическим свойствам (Калина Г.П., 1977; von Graevenitz A., 1985; Покровский В.И., 1999; Лабинская А.С., 2004).

В последние годы бактерии рода *Aeromonas* вызывают повышенный интерес как возможный этиологический агент заболеваний человека и животных. Для идентификации бактерий важным условием является наличие утвержденных стандартов на проводимые исследования (Покровский В.И., 2001). Выделение бактерий *A. hydrophila* из клинических и экологических образцов, где они присутствуют в малом количестве, может потребовать применения метода обогащения (Janda J.M., et al., 2010). Применение неселективных сред накопления при исследовании образцов не даст эффективного результата для выделения бактерий *A. hydrophila*. Использование селективных сред накопления, таких как *TSBA*, *APW* значительно увеличивает количество бактерий *A. hydrophila* в исследуемых образцах (Moyer N.P., 1996; Bergey's Manual, 2005). После процедуры накопления и обогащения бактерии пересевают с жидких сред на плотные питательные среды для изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств, по результатам которых определяется видовая принадлежность исследуемых микроорганизмов (Покровский В.И., 2001; Лабинская А.С., 2004; Bergey's Manual, 2005). При выделении аэромонад из проб окружающей среды рекомендуется использовать метод 1605 (*USEPA* 2001) – метод мембранных фильтров (*USEPA.*, 2001; Method 1605). Для этого образцы воды фильтруют через фильтры с размером пор 0,45 мкм и мембраны помещают или в бульон обогащения *APW* или сразу на дифференциальную среду *ADA-V* и культивируют при 35°C в течение 24–28 часов. Для изоляции аэромонад из пищи рекомендуется крахмал-ампициллиновый агар (*SAA*), *BIBG* -агар, с предварительным обогащением в *APW* бульоне или *TSB* бульоне с содержанием ампициллина 30 мг/л (Popoff M., et al., 1984; Janda J.M., et al., 2010).

При выделении аэромонад из клинических образцов рекомендуется использовать *MacConkey* агар, *CIN* агар, триптон-кровяной агар с добавлением 5% дефибринированной крови, *ASBA-30* агар, *DNase* – толуидин синий агар, *MAT*-агар (Burgos A., 1991; Bergey's Manual, 2005; Andelova A.I., 2006).

После культивирования на дифференциально-диагностических средах для дальнейшей идентификации бактерий до рода рекомендуется провести окраску по Граму и микроскопию мазков (Федоров Р.В., 1995; Покровский В.И., 1999; Лабинская А.С. 2004). При нахождении в мазках грамотрицательных палочек проводят тест на оксидазу. При положительном тесте на оксидазу исключаются гемолитические штаммы энтеробактерий, но не исключаются бактерии рода *Vibrio*, *Plesiomonas* (Adams D., 1982; Dvorkin M., et al., 2006; Janda J.M., et al., 2010).

Внутривидовая идентификация бактерий рода *Aeromonas* представляет собой сложную проблему для рядовых лабораторий (Ho A.S., 1990; Moyer N.P., 1996; Saavedra M.J., 2006).

В 1991 году А. Carnahan с коллегами разработали ключ для идентификации бактерий рода *Aeromonas* (Carnahan A.M., Behram S. Et al., 1991b). Основными тестами ключа были гидролиз эскулина, образование газа из глюкозы, образование кислоты из арабинозы, образование кислоты из сахарозы, устойчивость к цефалотину, образование индола, положительная реакция Фогеса – Проскауэра (Bergey's Manual, 2005).

Дальнейшее увеличение количества видов бактерий в роде *Aeromonas* привело к путанице в интерпретации биохимических тестов и увеличению количества проводимых тестов (Burgos A., 1991; Borrell N., 1998; Janda J.M., et al., 2010).

Abott и *Janda* провели исследование в 2003 году, результатом работы стала разработка схемы идентификации бактерий рода *Aeromonas* до групп и дальнейшая идентификация по подгруппам. Эта идентификация опирается на результаты реакций *Moeller*, где бактерии *Aeromonas hydrophila* входят во вторую группу, являясь положительными по аргинину и лизину. Далее род *Aeromonas*, используя биохимические тесты, разделяется на 3 комплекса (Таблица 8), (Janda J.M., et al., 2003).

Таблица 8–Биохимические тесты для идентификации бактерий рода *Aeromonas* по подгруппам (% положительных)

Биохимический тест	<i>A. hydrophila</i> группа (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. salmonicida</i>)	<i>A. caviae</i> группа (<i>A. caviae</i> , <i>A. media</i> , <i>A. eucrenophila</i>)	<i>A. sobria</i> группа (<i>A. veronii</i> , <i>A. jandaei</i> , <i>A. schubertii</i> , <i>A. trota</i>)
Эскулин	87 (32, 81, 85)	71 (76, 55, 78)	0
Реакция Фогеса – Проскауэра	74 (88, 63, 62)	0	54 (88, 87, 17, 0)
Газ из глюкозы	81 (92, 69, 77)	16 (0, 0, 78)	87 (92, 100, 0, 63)
<i>L</i> - арабиноза	33 (84, 100, 100)	96, (100, 100, 78)	4 (12, 0, 0, 0)

Для идентификации в пределах группы *A. hydrophila* предложены следующие биохимические реакции (Таблица 9), (Bergey's Manual, 2005).

Таблица 9–Биохимические тесты для разделения группы *A. hydrophila* (% положительных)

Биохимический тест	<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
Цитрат	32	38	85
<i>DL</i> -лактат	84	0	0
Кислота уроканиковая	16	94	100
Глюконат	64	13	0
Целлобиоза	4	38	69
Лактоза	64	13	92
<i>L</i> -рамноза	24	69	0
Д-сорбитол	0	0	85

В России для выделения и идентификации бактерий рода *Aeromonas* существуют следующие нормативные документы: методические рекомендации «Методы исследования объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные в Московском НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана в 1980 году. Схема (Рисунок 1) предлагаемая авторами в этих рекомендациях, предполагает использование 5 многокомпонентных дифференциально-диагностических сред, что усложняет задачу по идентификации бактерий

A. hydrophila. Методические указания по санитарно-бактериальной оценке рыбохозяйственных водоемов, утвержденные Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ, предлагают идентификацию бактерий *Aeromonas* только до рода. Инструкция по выделению и идентификации бактерий *A. hydrophila* (Рисунок 2) разработанная Т.И. Канаевой в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина», предполагает использование сред УГСХА-1 и УГСХА-2 и затрачивает до 96 часов на бактериологическое исследование (Канаева Т.И., 2009).

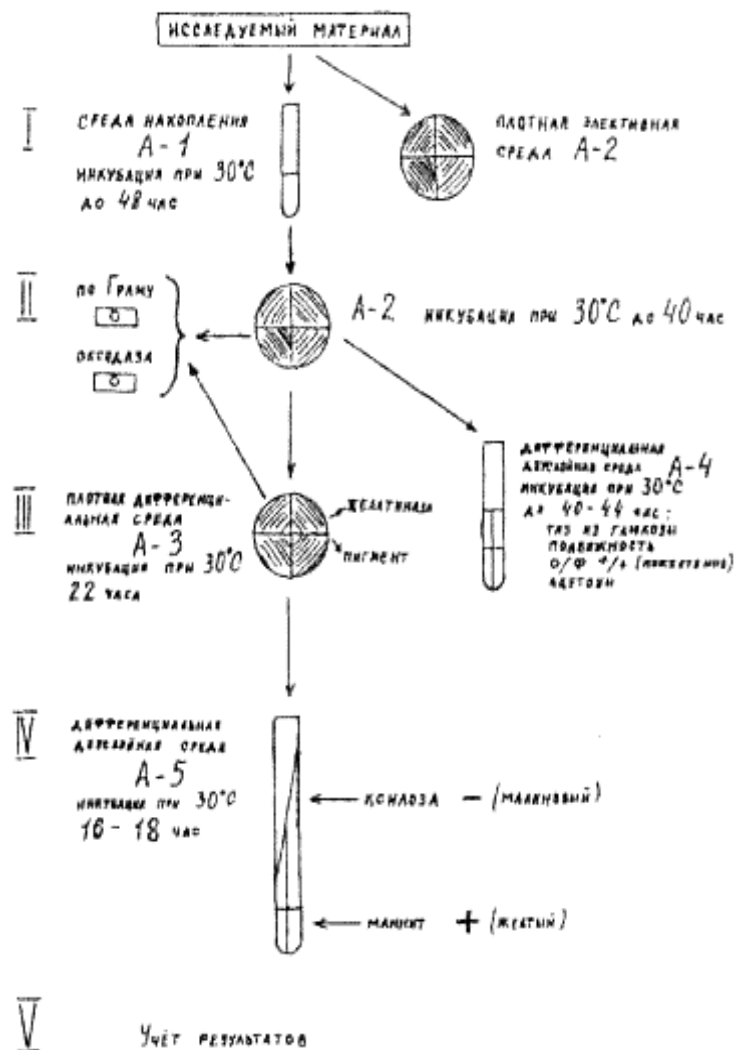


Рисунок 1–Схема выделения *A. hydrophila* разработанная Московским НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (1980)

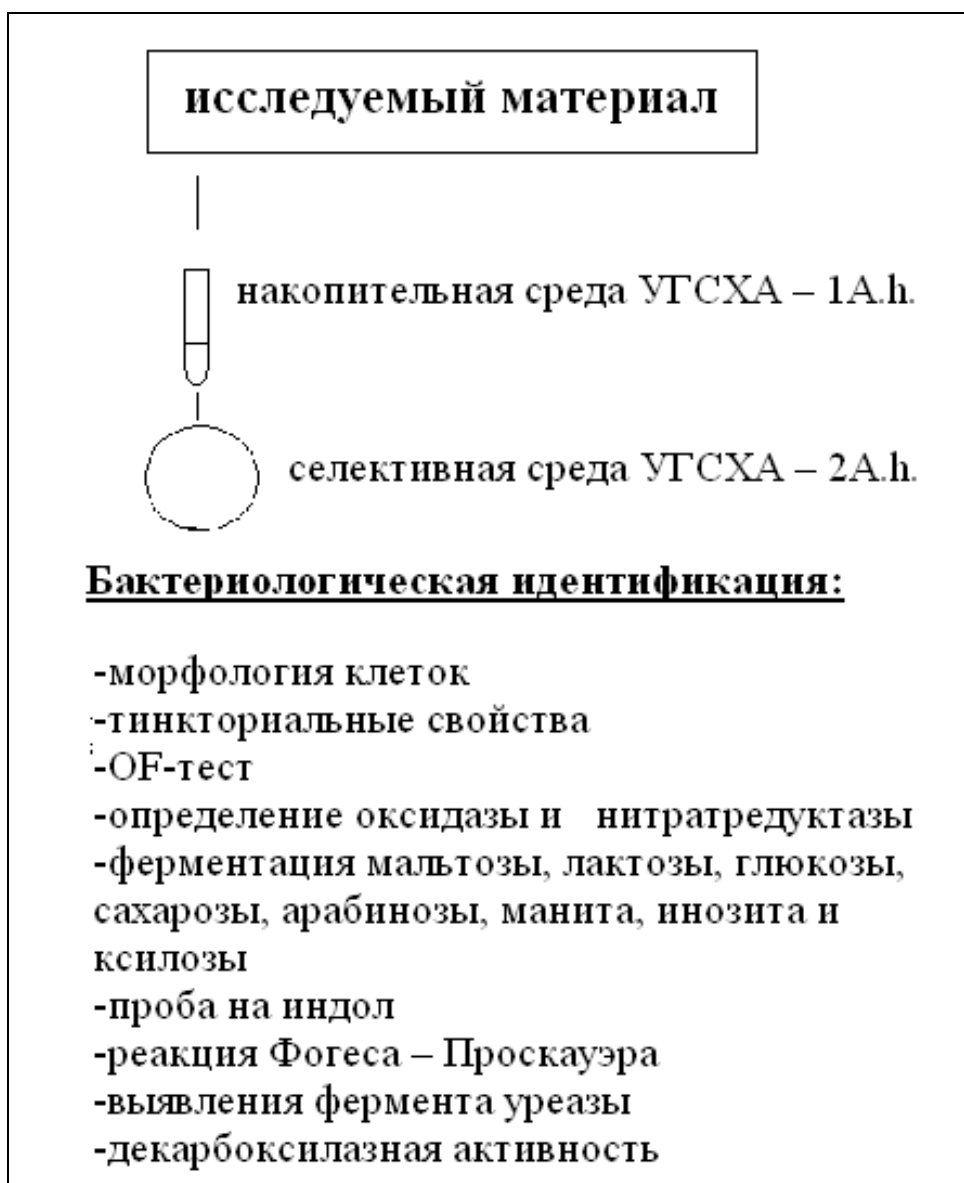


Рисунок 2–Схема выделения *A. hydrophila* предложенная Канаевой Т.И.

Идентификация бактерий рода *Aeromonas* коммерческими системами часто приводит к ошибочной диагностике (Carson J.T., 2001; O'Hara C.M., 2006). Наиболее часто используют такие системы как *API*, *Vitex*, *BBL Crystal*, *Phoenix 100*, *MicroScan* (Park T.S., 2003; Soler L.F., 2003).

Таким образом, из приведенных данных мы видим, что не существует единой схемы и среды для быстрой и точной идентификации бактерий *A. hydrophila*, что требует разработки эффективных и быстрых методов индикации и

идентификации указанных микроорганизмов, и доказывает актуальность нашей работы.

1.3.1 Питательные среды, используемые для выделения и идентификации аэромонад

1. Желчный агар с инозитом и бриллиантовым зеленым.

Состав:

Ингредиенты	грамм/литр
Протеозопептон	10,00
Мясной экстракт	5,00
М-инозит	10,00
Желчные кислоты, смесь	8,50
Натрия хлорид	5,00
Бриллиантовый зеленый	0,00033
Нейтральный красный	0,025
Агар-агар	13,5
Конечное значение pH (при 25°C)	7,2 ± 0,2

Приготовление: тщательно размешать 52,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, прокипятить до полного растворения частиц, стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121°C) в течение 15 минут. *A. hydrophila*–рост обильный, цвет колоний–бесцветные (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et. al., 2006).

2. ADA–агар.

Состав: пептон (из казеина)–10 г, мясной экстракт–3,0 г, декстрин–15,0 г, сульфат натрия–1,6 г, фуксин–0,25 г, фосфат натрия ($NaHPO_4$)–7,75 г, агар–13 г, вода–1 литр, pH доводят до 7,5±0,2

Приготовление: растворить ингредиенты в воде и варить до полного растворения, автоклавировать при 121°C в течение 15 минут, остудить до 40–45°C и разлить в стерильные чашки Петри. *A. hydrophila*–колонии красного цвета (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et. al., 2006).

3. Среда Rimler–Shott.

Состав:

Ингредиенты	грамм/литр
Дрожжевой экстракт	3,00
Мальтоза	3,50
Z-цистеина гидрохлорид	0,30

Z-лизина гидрохлорид	5,00
Z-орнитина гидрохлорид	6,50
Натрия тиосульфат	6,80
Железа аммонийного цитрат	0,80
Натрия дезоксихолат	1,00
Натрия хлорид	5,00
Бромтимоловый синий	0,03
Агар-агар	13,5
Конечное значение <i>pH</i> (при 25°C) 7,0 ± 0,2	

Приготовление: размешать 45,43 г порошка в 990 мл дистиллированной воды. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Не автоклавировать среду. Остудить до 40–45°C и асептично добавить растворенное в воде содержимое флакончика с добавкой *FD096*. Тщательно перемешать и разлить среду в стерильные чашки Петри (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et. al., 2006).

Культуральные свойства: *A. hydrophila*–мальтоза «+», лизин/орнитин (декарбоксилирование) «-», сероводород «-».

Состав *FD096*: новобиоцин–5,00 мг (Равилов А.З. 1999; Dvorkin M., et. al., 2006).

4. Основа среды для выделения аэромонад.

Состав:

Ингредиенты	грамм/литр
Пептон (спец.)	5,00
Дрожжевой экстракт	3,00
Z-лизина гидрохлорид	3,50
Z-аргинина гидрохлорид	2,00
Инозит	2,50
Лактоза	1,50
Сорбоза	3,00
Ксилоза	3,75
Соли желчных кислот	3,00
Натрия тиосульфат	10,67
Натрия хлорид	5,00
Железа аммонийного цитрат	0,80
Бромтимоловый синий	0,04
Тимоловый синий	0,04
Агар-агар	12,50
Конечное значение <i>pH</i> (при 25°C) 8,0 ± 0,2	

Приготовление: размешать 28,15 г порошка в 500 мл дистиллированной воды. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Не автоклавировать среду. Остудить до 50°C и добавить растворенное в воде содержимое пу-

зырька с селективной добавкой для аэромонад *FD 039*. Тщательно перемешать и разлить в пробирки или чашки Петри.

Культуральные свойства: *A. hydrophila*—рост обильный, колонии—темно-зеленые непрозрачные с темным центром.

Добавка *FD039*: ампициллин—2,5 мг (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et al., 2006).

5. Кровяной агар с ампициллином.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Триптико-соевый агар	40 г
Дистиллированная вода	950 мл
Овечья кровь	50 мл
Ампициллин	10 мг

Приготовление: триптико-соевый агар растворить в воде и довести до кипения до полного растворения частиц. Автоклавировать до 121°C в течение 15 минут, охладить до 40–45°C и добавить овечью кровь и ампициллин, разлить в чашки Петри (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et al., 2006).

6. Агар для теста на ДНКазу с толуидиновым синим.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
ДНКазы тест агар	42 г
Раствор толуидинового синего (1%)	10 мл
Дистиллированная вода	990 мл
Ампициллин	30 мг

Приготовление: растворить ДНКазу тест агар в дистиллированной воде, добавить раствор толуидинового синего, подогреть до кипения для растворения частиц. Автоклавировать при 121°C в течение 15 минут, охладить до 40–45°C, асептически добавить ампициллин в растворе, разлить в чашки Петри.

Культуральные свойства: *A. hydrophila* образуют на чашках большие розовые колонии с зоной гемолиза вокруг. Цвет зоны гемолиза лилово-розовый (Равилов А.З. 1999; Dvorkin M., et al., 2006).

7. Агар Мак-Конки с ампициллином и Твин-80.

Эта среда состоит из агара Мак-Конки с добавлением ампициллина и Твин-80. *A. hydrophila* растут с непрозрачной зоной вокруг них.

8. РХА – агар.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Агар питательный	8,0
Д-ксилоза	10,0 г
Фенол красный	0,025 г
Ампициллин	30 мг
<i>Pril</i>	0,2 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Приготовление: все компоненты смешиваем в 1000 мл дистиллированной воды, доводим до кипения до полного растворения частиц. Автоклавируем 15 минут при 121°C, разливаем в чашки Петри (Равилов А.З., 1999; Dvorkin M., et al., 2006).

Культуральные свойства: *A. hydrophila* – бесцветные колонии.

9. Жидкая среда накопления А-1.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Вода дистиллированная	100,0 мл
Сульфат магния	0,02 г
Фосфат калия двузамещенный	0,1 г
Хлористый натрий	0,5 г
Желатин	1,0 г
Крахмал растворимый	0,2 г

Приготовление: после стерилизации (0,5 атм. 15 минут) добавить 2 мл 0.01% водного раствора кристаллвиолета. Установить *ph* 7,2–7,4 добавлением 10%-ного водного раствора едкого натра (но не углекислых солей) (Блинов А.И., Глушанова Н.А., 1997).

10. Плотная селективная среда А-2.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Вода дистиллированная	100,0 мл
Агар-агар	2,0 г
Сульфат магния	0,02 г
Фосфат калия двузамещенный	0,1 г
Хлористый натрий	0,5 г
Крахмал растворимый	0,5 г
Желатин	5,0 г

Приготовление: после стерилизации (0,5 атм. 15 минут) добавить в 2 мл 0,01% водного раствора кристаллвиолета и 0,2 мл 10% водного раствора три-

фенилтетразолия хлорида. Установить ph 7,4 – 7,6 добавлением 10%-ного водного раствора едкого натра. Разлить в чашки Петри. К среде можно добавить пенициллин из расчета 400 ЕД/мл для ингибирования псевдомонад. После затвердевания агара залить поверхность среды тонким слоем 2% агара на дистиллированной воде (10 мл на чашку) (Блинов А.И., Глушанова Н.А., 1997).

11. Плотная дифференциальная среда А-3.

Состав:

Ингредиенты	г/мл
2% питательный агар	100,0 мл
Желатин	5,0 г

Приготовление: после стерилизации (0,5 атм. 15 минут) добавить в 2,0 мл 0,01% водного раствора кристаллвиолета. Разлить в чашки, после затвердевания среды залить поверхность 10 мл 2% агара на дистиллированной воде (Блинов А.И., Глушанова Н.А., 1997).

12. Дифференциальная двухслойная среда А-4 в пробирке.

Нижний слой – состав:

Ингредиенты	г/мл
Дистиллированная вода	100,0 мл
Пептон	1,0 г
Хлористый натрий	0,5 г
Агар-агар	0,4 г
Глюкоза	0,5 г
Фосфат калия двузамещенный	0,2 г
1,6% водно-щелочной раствор бромти-	0,2 мл

Компоненты растворить на кипящей водяной бане, разлить по 3–4 мл в пробирки. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 минут, остудить столбиком.

Верхний слой: среда такого же состава, но с добавлением 0,2% агар-агара, после стерилизации наслаивается по 2 – 2,5 мл столбиком поверх нижнего слоя (Блинов А.И., Глушанова Н.А., 1997).

13. Дифференциальная двухслойная среда А-5 в пробирке.

Нижний слой – состав:

Ингредиенты	г/мл
Вода дистиллированная	100,0 мл
Агар-агар	210 г
Пептон	0,5 г

Хлористый натрий	0,5 г
Фосфат калия двузамещенный	0,1 г
Маннит	0,1 г
1,6% водно-щелочной раствор бромти-	0,5 мл

Приготовление: после растворения компонентов на кипящей водяной бане, разлить в пробирки по 4–5 мл. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 минут. Охладить столбиком.

Верхний слой: среда такого же состава, но вместо маннита добавить 1,0 г ксилозы, а вместо фосфата калия двузамещенного добавить 0,04 г фосфата калия однозамещенного. После стерилизации наслаивается поверх нижнего слоя и скашивается с небольшим столбиком (Блинов А.И., Глушанова Н.А., 1997).

14. УГСХА-1 А. *h.*

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Вода дистиллированная	1000 мл
Мальтоза	3,5 г
$MgSO_4$	5,0 г
Желатин	10,0 г
Дрожжевой экстракт	4,0 г
K_2HPO_4	2,0 г
Конго-рот	3,0 г
Кристаллический фиолетовый	0,1 г

Приготовление: ингредиенты кипятим до растворения частиц, разливаем в пробирки по 5 мл, стерилизуем при 110°C 30 минут (Канаева Т.И., 2009).

15. УГСХА-2 А. *h.*

Состав:

Ингредиенты	г/мл
Вода дистиллированная	1000 мл
Агар-агар	15,0 г
Мальтоза	3,5 г
Дрожжевой экстракт	4,0 г
K_2HPO_4	2,0 г
Конго-рот	3,0 г
$MgSO_4$	5,0 г
Кристаллический фиолетовый	0,1 г

Приготовление: все ингредиенты кипятим до растворения частиц, разливаем в чашки Петри. Стерилизуем при 110°C 30 минут (Канаева Т.И., 2009).

1.4 Бактериофаги. Фагодиагностика бактерий

Бактериофаги—это вирусы, способные заражать бактериальную клетку, воспроизводиться в ней, образуя бесчисленное потомство, и вызывать ее лизис или лизогению (Гольдфарб, Д.М., 1961; Д'Эррель, 1926).

Бактериофаги были открыты независимо друг от друга Ф.Туортом в 1915 году и Ф.Дэреллем в 1917 году (Каттер Э., 2012).

Бактериофаг состоит из белковой оболочки, называемой капсид и находящегося внутри нее генома фага, состоящего из одноцепочечной или двуцепочечной нуклеиновой кислоты (ДНК или реже РНК) (Висконти Р., 1956). Некоторые фаги содержат липиды, фосфолипиды, полисахариды, гликопротеины, полиамины (Адамс.М., 1961; Габрилович И.М., 1973).

Согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов (Edited M.N., 2000) бактериофаги в зависимости от типа нуклеиновой кислоты подразделяются на ДНК- и РНК-содержащие. По морфологическим признакам бактериофаги выделены в 1 отряд (*Caudovirales*), 13 семейств и 31 род содержащие более 5000 видов фагов (Каттер Э., 2012). Изученные на данный момент бактериофаги *A. hydrophila* являются ДНК-содержащими и относятся к семейству *Myoviridae* (Mitchell S., CHOW M.A., ROUF, 1983).

В первой половине 20 века бактериофаги активно применяли при инфекционных заболеваниях человека и животных, но после открытия антибиотиков интерес к ним как к терапевтическим препаратам в западных странах стал убывать. В Советском Союзе работы по применению бактериофагов в медицине и ветеринарии не прекращались, были открыты институты в Тбилиси, Горьком (ныне Нижний Новгород), налажено производство препаратов в Алма-Ате, Уфе, Волгограде, Перми. После распада СССР, в России продолжают создавать и производить лечебные фаговые препараты (Каттер Э., 2012; Алешкин А.В., 2016). Многосторонние изучения фагов, выполненные в последние годы, позволили использовать фаги для решения многих проблем в микробиологии, ви-

русологии, биохимии, биофизике, генетике, радиобиологии, иммунологии и других направлениях исследований в биологии. Находят свое применение бактериофаги в промышленной микробиологии и биотехнологиях, возможно применение фагов в экологии и охране окружающей среды (Адельсон Л.И., 1958; Бакулов И.А., 1998; Натидзе Л., 2005). Современная концепция применения бактериофагов в комплексе санитарно-эпидемиологических мероприятий включает в себя: фаговый биопроектинг, бактериофаг-опосредованный биоконтроль, профилактический прием бактериофагов для снижения риска развития пищевых инфекций и фагоидентификация бактерий (Goodridge D.L., 2011).

1.4.1 Взаимодействие в системе «бактериофаг + бактериальная клетка»

Процесс взаимодействия фага с клеткой в настоящее время хорошо изучен благодаря достижениям электронной микроскопии и исследованиям с применением меченых атомов (Тихоненко А.С., 1968; Ревенко И.П., 1978). Чувствительность клеток к бактериофагу определяется тремя факторами:

- 1) наличием в клеточной оболочке и цитоплазме ферментов, улучшающих проникновение нуклеиновой кислоты;
- 2) наличием рецепторов, на которых возможна фиксация вируса;
- 3) наличием в клетке ферментов, энергетических запасов и материалов, обеспечивающих синтез компонентов бактериофага и сборку вирионов (Тиманов В.Д., 1958; Покровский В.П., 1986).

В процессе взаимодействия фага с бактериальной клеткой различают 2 основных типа:

- 1) продуктивной инфекции - свойственен вирулентным фагам;
- 2) лизогения - вызываемая умеренными фагами.

При лизогении фаг не вызывает гибель бактериальной клетки, генетический материал бактериофага встраивается в хромосомы бактерий и не мешает развитию и размножению клеток. При воздействии внешних и внутренних факторов на клетки происходит превращение профага в фаг и развивается лизис

бактериальной клетки (Кривиский А.С., 1962; Лурия С., 1970; Габрилович И.М., 1973; Летаров А.В., 1998).

Продуктивный тип инфекции бактерии фагом заканчивается лизисом и увеличением количества фага. В этом типе взаимодействия различают четыре стадии, постепенно переходящие друг в друга: адсорбция бактериофагов на клетках бактерий; проникновение в клетку активного содержимого фага; латентный период внутриклеточного развития фага; разрушение клетки и выход из нее новообразованного потомства фага (Крылова М.Д., 1961; Гольдфарб Д.М., 1961; Ревенко, И.П., 1978).

Адсорбция фага на клетках зависит от физических и химических свойств среды, температуры, физиологического состояния бактерий, природы фага, антигенной структуры клеток (Габрилович И.М., 1973). Адсорбция состоит из 2 фаз: обратимой и необратимой. Обратимая фаза происходит в результате взаимодействия фаговых корпускул и клеток и возникновения в результате этого электростатических связей между карбоксильными группами оболочки клетки и аминокетильными группами отростка фага. Необратимая фаза обусловлена образованием более тесной связи между рецепторным аппаратом фага и рецепторами бактериальной клетки. Эта фаза отличается высокой энергией связывания характерной для реакции с образованием ковалентных связей (Стент Г., 1965; Габрилович И.М., 1973; Катгер Э., 2012).

Стадия адсорбции фага на рецепторах бактериальной клетки сменяется стадией проникновения, осуществляемой в следующие фазы:

- лизис стенки бактерии, происходящий с помощью фермента, изодинамического лизоцима;
- распространение импульса, повышающего проницаемость клеточной стенки;
- диссоциация фага на белковую часть и ДНК или РНК; внедрение генома бактериофага в клетку;
- большая часть капсидных белков остается снаружи;

- реакция восстановления проницаемости, сопровождающаяся устойчивостью к последующему литическому действию (Габрилович И.М., 1973; Каттер Э., 2012).

Период внутриклеточного роста (латентный период) начинается с момента проникновения фагового генома в клетку и длится до полного созревания фаговых корпускул в ней. Процесс развития вирионов протекает в зоне нуклеоида. Через 10 – 15 минут после инфицирования бактериофагом происходят структурные изменения, проявляющиеся в исчезновении четкой границы между цитоплазмой и ядерной. Затем происходит накопление фонда фаговых ДНК, ее «конденсация» с образованием лабильных, дискретных структур с последующим их уплотнением. После достижения определенного уровня количества молекул фаговой ДНК инициируется синтез белков капсида и формирование предшественника головки, в которую затем инкапсидируется ДНК бактериофага (Хэйс У., 1965; Габрилович И.М., 1973; Каттер Э., 2012).

Финальная фаза внутриклеточного развития бактериофага характеризуется самосборкой фаговых частиц, разрывом клеточной стенки изнутри и лизисом бактерий, высвобождением вирионов. Разрыв клеточной стенки и лизис бактерии, вероятно, связан с действием фаг-индуцируемыми ферментами (Габрилович И.М., 1973; Каттер Э., 2012).

Продолжительность латентного периода при постоянных условиях опыта характерна для каждой конкретной системы фаг – бактериальная клетка (Гольдфарб Д.М., 1965; Каттер Э., 2012).

Зрелый фаг, вышедший из клетки, достаточно устойчив к воздействиям и может длительное время сохраняться на гомологичных бактериях и осуществлять новый цикл развития (Габрилович И.М., 1973; Каттер Э., 2012).

1.4.2 Выделение бактериофагов

Активному использованию бактериофагов в качестве индикаторных или лечебно-профилактических препаратов предшествует вопрос выделения их из объектов внешней среды и изучение основных биологических свойств (Дома-радский И.В., 1957; Адамс М., 1961; Байгулина Ф.А., 1998; Каттер Э., 2012).

Выделить бактериофаг возможно из различных материалов, где были или в данный момент находятся бактерии – хозяева фагов, либо из лизогенных бактериальных культур. Выделение фагов основывается на обнаружении их литического действия в отношении соответствующих микробных культур, называемых индикаторными или тест–культурами (Гольдфарб Д.М., 1961; Каттер Э., 2012)

Для выделения бактериофагов, как правило, используют два метода (Ганюшкин, В.Я., 1988; Семанина Е.Н., 2012). Первый метод состоит в том, что исследуемый материал фильтруют через бактериальные фильтры и полученный фильтрат высевают с индикаторной культурой в питательный бульон, инкубируют в термостате при 37°C в течении 16–18 часов. Вторым методом заключается в том, что исследуемый материал помещают в жидкую питательную среду совместно с индикаторной культурой, после этого субстрат фильтруют через бактериальные фильтры. Полученные фильтраты в обоих случаях после инкубации исследуют на присутствие фага методом посева на плотные и жидкие питательные среды (Ганюшкин В.Я., 1988; Каттер Э., 2012). Выделить бактериофаги из бактериальных штаммов возможно воздействием на них индуцирующими факторами, такими как ультрафиолетовое облучение, обработка трихлорметаном или воздействие высокой температуры. В случае терморезистентности и неустойчивости бактерий к трихлорметану используется метод фильтрации через бактериальные фильтры (Ревенко И.П., 1978; Каттер Э., 2012).

Выделенные фаги чаще являются смесью фагов. Для дальнейшей работы с ними необходимо выделить «чистые линии» фагов. Для этого проводят селекцию клона фага методом многократного пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отбивкой негативной колонии в питательный бульон с гомологичной культурой (Габрилович И.М., 1973; Золотухин С.Н., 2007).

1.4.3 Бактериофаги *A. hydrophila*

В 1983 году учеными Висконсинского университета *S. Mitchell, CHOW* и *M.A. ROUF* были выделены 2 бактериофага бактерии *A. hydrophila* и изучены их

основные биологические свойства. Оба фага состояли из головки и сокращающегося хвостика и по морфологическим свойствам принадлежали к группе фагов А по Бредли. На индикаторной культуре фаги образовывали: фаг А1 – маленькие чистые блестяшки от 0,5 до 1 мм в диаметре; фаг А2 – мутные блестяшки диаметром от 0,8 до 1,8 мм. Оба фага были неустойчивы к воздействию на них трихлорметаном в течении 10 минут и высокой температурой до 60°C. Латентный период фага А1 был 39 минут, фага А2 – 52 минуты. Урожайность фага А1 – 17, фага А2 – 92 (Mitchell S., Chow M., Rouf A., 1983).

1.4.4 Фагодиагностика

Фагодиагностика – это специальные методы диагностики инфекционных болезней животных, растений и человека с применением бактериофагов (Ревенко И.П., 1978). Эти методы основаны на специфической особенности бактериофагов взаимодействовать с определенными видами или типами бактерий, вследствие чего осуществляется их лизис и размножение бактериофага. В связи с этим фагодиагностика включает два основных направления:

1. Обнаружение лизиса бактерий в чистой культуре с целью определения ее вида (идентификация) или определения в пределах вида особых групп или типов бактерий, чувствительных к соответствующим фагам (фаготипирование бактерий).

2. Выявление или индикация бактерий непосредственно в исследуемом субстрате без выделения чистой культуры по нарастанию титра индикаторного фага.

Фагоидентификация бактерий. Возможность фагоиндикации следует из специфичности действия бактериофагов, которая может быть выражена, в такой степени что допускает дифференцировку не только отдельных видов бактерий, но и серологически неразличимых штаммов одного и того же вида (Килессо В.А., 1960; Капырина, Н.А., 1972; Бакулов И.А., 1980).

Из исследуемой культуры делают посев на плотную питательную среду и наносят каплю известного диагностического фага. Фаголизис исследуемой культуры свидетельствует о соответствии ее взятому индикаторному фа-

гу. Это значительно ускоряет идентификацию бактерий по сравнению с культурально - биохимическими методами исследования. Диагностические фаги, применяемые для идентификации бактерий, должны иметь точно известный диапазон литического действия. В случае отсутствия фаголизиса исследуемой культуры, в силу лизогенного состояния, необходимо проводить дополнительные исследования для ее идентификации.

В ветеринарии одним из первых фагоидентификацию применил К.И. Цветков (1941), при паратифозном аборте у кобыл. Об успешном использовании дизентерийного бактериофага при массовых исследованиях сообщают В.Н. Кузнецов, М.И. Хазанов, Т.Н. Ремова (1960) которые идентифицировали 576 культур из 630.

Н.И. Николаенко, И.К. Тутов (1970) отмечают перспективность применения бактериофага, вызывающего лизис *Salmonella abortus ovis* и сокращающего срок диагностики до 4 – 6 часов.

Наборы листериозных бактериофагов, позволяют идентифицировать свыше 85 % культур листерий (Капырина Н.А., Бакулов И.А., 1972). По мнению вышеназванных авторов, реакция с бактериофагом, в силу своей специфичности и избирательности действия, будет наиболее достоверным методом идентификации инфекционных болезней животных и человека из доступных рядовым лабораториям.

Фаготипирование. Высокая специфичность действия некоторых штаммов бактериофагов в отношении соответствующих культур патогенных бактерий позволяет использовать такие фаги не просто для определения вида микроба, но и для разведения его на отдельные группы или фаготипы. Как указывают В.Б. Аврех (1954), М.Д. Крылова (1963), фаготип бактерий выявляет тонкое антигенное строение бактерий, которое не выявляется серологическими реакциями и может быть определен только при помощи бактериофагов. Определение этих тонких различий дает возможность установить эпидемиолого - эпизоотологические связи (Крылова, М.Д., 1974).

Метод фаготипирования помогает при эпидемиологическом обследовании очагов, подтверждая или опровергая предположение о едином источнике заболевания, помогает установить общий источник при рассеянных, не связанных друг с другом случаях заболеваний (Крылова М.Д., 1963).

Фаготипирование бактерий, возможно, провести двумя методами. Первый метод наиболее часто применяемый в практике, основан на установлении чувствительности исследуемой культуры к стандартным препаратам специфических бактериофагов, применяемых в определенном разведении. Вторым методом заключается в дифференциации их на группы по характеристикам выделяемых из культур умеренных фагов. В медицине и в ветеринарии этот метод применяется редко (Ганюшкин В.Я., 1988).

Первыми метод фаготипирования предложили Иен и Креджи (1938) для дифференцирования бактерий возбудителей брюшного тифа.

В ветеринарии первыми применили фаготипирование Т.А.Давыденко (1972), Н.М.Никитюк (1970), И.И.Архангельский (1966), Б.А.Степанов (1966), А.И. Ивашура (1967), Б.А.Байрак (1970), Л.И. Петрушина (1967).

Созданы схемы типирования в отношении широкого спектра возбудителей: брюшнотифозных и паратифозных бактерий, палочек Бреслау (Craigie J. et al., 1938). Наборы диагностических бактериофагов (типовые тифозные и паратифозные А и В, Vi-брюшнотифозные, колифаги, стафилококковые и др.) рекомендуют использовать для внутривидовой дифференциации бактерий Л.Я. Кац-Чернохвостова (1947), М.Д. Крылова (1963), С.Н. Нурызгалиев (1978), Т.Г. Чинашвили (1968).

И.П. Ревенко (1978), использовал метод фаготипирования в эпизоотологической практике для установления связи между отдельными случаями рожистого воспаления у различных животных и человека.

Для ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий различных родов и видов в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды созданы активные специфические бактериофаги (Золотухин С.Н., 2007).

1.4.5 Реакция нарастания титра фага

Фагоиндикация и фаготипирование основываются на фиксации лизиса выделяемых культур, вызванного бактериофагом с определенным диапазоном литического действия. В этом случае бактериофаг будет являться индикатором, устанавливающим типовую или видовую принадлежность бактерии, выделенной из исследуемого субстрата при помощи обычных методов диагностики. Также бактериофаг может быть применен для индикации бактерии без выделения чистых культур. Ряд авторов применяли специфические бактериофаги для индикации патогенных бактерий. Ф. Сергиенко (1936), пытался применять этот принцип учета нарастания титра бактериофага при посеве субстрата в определенные разведения бактериофага для индикации возбудителей брюшного тифа и дизентерии; К.И. Цветков (1941), для индикации возбудителя сальмонеллезного аборта у кобыл; Н. Katzhelson, M.D. Sutton (1951), - для индикации бактерий в семенах бобов; J. Sechter (1998), - для индикации возбудителя брюшного тифа.

В.Д. Тимаков и Д.М. Гольдфарб (1962), базируясь на избирательности действия бактериофага и сравнительной доступности количественного его учета, теоретически доказали и экспериментально создали новый метод для индикации бактерий - реакция нарастания титра фага (в дальнейшем РНФ). Этот метод в отличие от других методов фагодиагностики, дает возможность проводить индикацию возбудителя непосредственно в исследуемом субстрате без выделения чистой культуры.

Особенно важными явились разработанные этими авторами общие положения об индикаторных фагах (1958).

Определяющим моментом РНФ является взаимодействие точно измеренного количества индикаторного бактериофага с исследуемым субстратом, содержащим устанавливаемую бактерию. Если после термостатирования этой смеси, проведение РНФ указывает на увеличение титра индикаторного бакте-

риофага в сравнении с контролем, то это свидетельствует о присутствии в исследуемом субстрате устанавливаемой бактерии (Ревенко И.П., 1978).

Схема РНФ, как доказывают В.Л. Тимаков и Д.М. Гольдфарб (1962), по методике проведения является доступным, рациональным, высокочувствительным и специфическим методом диагностики, дающим возможность за относительно короткий срок (11–22 часа) обнаружить дизентерийные или брюшнотифозные бактерии в различных исследуемых субстратах, при наличии сопутствующей микрофлоры, без выделения чистых культур бактерий. При этом РНФ характеризуется высокой чувствительностью и дает возможность определять сравнительно небольшие количества возбудителя ($10^3 - 10^2$ м.к./мл), когда индикация его другими методами диагностики затруднена (Арский В.Г., 1961; Земцова И.Н., 1965; Попхадзе М.З., 1968).

С помощью РНФ Д.М. Гольдфарб и З.С. Островская (1961), смогли обнаружить в 1 мл водопроводной воды от 75 до 750 брюшнотифозных бактерий, в речной и колодезной - от 10 до 100 бактерий при продолжительности опыта 22 часа. При этом бактериологическое исследование показало отрицательный результат.

РНФ для обнаружения брюшнотифозных бактерий в воде, молоке, молочных продуктах испытывали и другие исследователи (Рубашкина Б.К., 1959; Воронцова А.В., 1961; Кременчук Г.А., 1961).

Л.И. Мац (1965), указывает на широкую возможность применения РНФ при обнаружении в воде и почве возбудителей тифа, сальмонеллеза и дизентерии. При этом, как отмечает автор, получение положительных результатов исследований при помощи РНФ, является основанием для проведения профилактических мероприятий.

По данным П.И. Камбаратова (1963), у больных с клинической дизентерией результаты РНФ были положительными в 41 случае, а при бактериологическом методе диагностики возбудители дизентерии были выделены только в 19 случаях.

В.И. Лебедев (1963), указывает на применение РНФ при обследовании детских учреждений. По РНФ случаев обнаружения палочек дизентерии оказалось на 13,7 % больше, чем при бактериологическом исследовании.

И.В. Домарадский с соавт. (1957), З.И. Быкова (1964), с успехом использовали РНФ для обнаружения возбудителя чумы. С помощью РНФ можно обнаружить чумные бактерии в количестве от 2000 до 4000 м.т./г органа. Это позволяет отнести РНФ к высокочувствительным методам ускоренной индикации чумных бактерий. Довольно эффективной РНФ оказалась при обнаружении возбудителя холеры (Домарадский И.В., 1957).

И.Н. Земцова (1965), И.П. Павлова (1971), применили РНФ для обнаружения спор сибирской язвы в искусственно зараженной почве. Им удалось выявлять споры в концентрации 20000 и больше м.к./г почвы при инкубации материала с бактериофагом в течение 3 часов. Удлинение срока инкубации материала до 6 - 7 часов повышало чувствительность реакции: в 1 г почвы удавалось обнаружить 10 000 спор.

Л. Натидзе с соавторами (2005), разработан метод РНФ при диагностике сибирской язвы, пуллороза птиц, сальмонеллеза свиней. Описанная методика позволяет диагностировать заболевание в течение 18 - 36 часов без выделения чистых культур возбудителя.

Индикаторные бактериофаги созданы и применяются для диагностики паратифа (Понявин Б.Я., 1960), листериоза (Кольпикова Т.И., 1990), сальмонеллеза (Ганюшкин В.Я., 1988), бруцеллеза (Островская Н.Н., 1961).

Большая работа по выделению и применению бактериофагов для индикации методом РНФ проведена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизе ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им.П.А.Столыпина». В разные годы были опубликованы работы по исследованию бактериофагов активных в отношении бактерий *Escherichia coli* (Молофеева Н.И., 2004), *Morganella morganii* (Золотухин С.Н., 1994), *Klebsiella pneumonia* (Бульканова Е.А., 2006), *Proteus mirabilis* (Феоктистова Н.А., 2006), *Citrobacter freundii* (Пульчеровская Л.П., 2004), *En-*

terobacter cloacae (Пожарникова Е.Н., 2006), *Yersinia euterocolitica* (Катмакова Н.П., 2010), *Yersinia pseudotuberculosis* (Коритняк Б.М., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Шестаков А.Г., 2010), *Pseudomonas putida* (Викторов Д.А., 2011), *Enterococcus faecalis* (Ковалева Е.Н., 2009), *Bordetella bronchiseptica* (Семанина Е.Н., 2012).

Таким образом, многими авторами доказано, что РНФ является высокочувствительным методом ускоренной индикации бактерий в различных субстратах не только в малых количествах, но и, что важно, в присутствии сопутствующей микрофлоры, без выделения чистой культуры.

При этом отсутствуют научные данные о возможности использовании бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* из-за отсутствия в нашей стране инструктивных документов и стандартных наборов аэромонадных бактериофагов, что подтверждает актуальность поставленной проблемы.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты, материалы и методы

2.1.1 Объекты

В работе объектами исследований были: вода из открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), сточные воды, гидробионты. Штаммы бактерий, полученные из музея кафедры МВЭиВСЭ при ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А. Столыпина»: референс-штамм бактерии *A. hydrophila* ATCC 49140; *A. sobria* ATCC9071, *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. caveae* ATCC 12633; *E. coli* №4, *Kl. pneumonia* №4463, *C. freundii*, *B. cereus* №2527, *B. subtilis* №6633, *E. faecalis* №189, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* №0630, *Ps. aeruginosa* №128, *Pr. rettgeri* №175, *Ps. putida* №12633, *P. mirabilis* №523, 14 полевых штаммов *A. hydrophila*, 5 изолятов бактериофагов *A. hydrophila*, выделенных из объектов внешней среды. Все перечисленные штаммы бактерий обладают типичными видовыми биологическими свойствами.

2.1.2 Материалы

Питательные среды и реактивы

Мясопептонный бульон (ФГУП НПО «Микроген-питательные среды», Республика Дагестан г. Махачкала); мясопептонный агар (ФГУП НПО «Микроген-питательные среды», Республика Дагестан, г. Махачкала); среда Эндо (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск), среда Клиглера (ФГУП НИИ питательных сред, Республика Дагестан, г. Махачкала); среда Кларка (ФГУП НПО «Микроген-питательные среды», Республика Дагестан, г. Махачкала); среда Симмонса (ФГУП НПО «Микроген-питательные среды», Республика Дагестан, г. Махачкала); среда УГСХА-1 и УГСХА-2 (пропись по инструкциям УГСХА); среды Гисса с индикатором ВР (ФГУП НПО «Микроген-питательные среды», Республика Дагестан, г. Махачкала); экстракт дрожжевой (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск, 3% раствор перекиси водорода (ООО Химмед, г. Санкт-Петербург); трихлорметан ТУ 6-09-4263-76 (СКБ «Технолог»), 0,04% спиртовой раствор ген-

цианвиолета (ООО Химмед, г. Санкт-Петербург), желатин, набор для окраски по Граму (ЗАО НИЦФ, г. Санкт-Петербург), нитрат калия; хлорид натрия; 0,04% спиртовой раствор метилового красного; раствор α – нафтола; водный раствор КОН (ООО Химмед, г. Санкт-Петербург), DNase I (NEB, США), набора K-Corb (ООО «НПФ Синтол», набора реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США), набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3.

Оборудование и лабораторная посуда

Холодильники бытовые и минусовые; автоклав ГК-100-3, термостат ТС-80М-2; шкаф стерилизационно-сушильный ШСС-80п; дистиллятор, лабораторные центрифуги ОПН-8УХЛ 4.2, ЦСЛ-3, СМ-6М с баккет и угловыми роторами; водяная баня; установка вакуумной фильтрации (фирма «Millipore - Millivac» USA); шприц-насадки для стерилизующей фильтрации типа «Swinnex» (фирма «Millipore» USA); мембранные фильтры диаметром 0,22 и 0,45 мкм (фирма «Millipore» USA); термометр лабораторный ртутный; микроскоп с подсветкой «Биомед-6» с фотовидеонасадкой; комплект лабораторной посуды для бактериологии, прибор Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Бельгия), прибор Bioanalyzer 2100, секвенатор Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, США).

2.1.3 Методы

Выделение, индикацию и идентификацию бактерий *A. hydrophila* проводили в соответствии с «Инструкцией по выделению и идентификацией бактерий *A. hydrophila*», разработанной в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина» Т.И. Канаевой (2009). Морфологические, биохимические и культуральные свойства бактерий *A. hydrophila* определяли по тестам, указанным в Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 2005.

Окраску мазков, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили согласно ГОСТ ISO 1113-1-2011. Приготовление суспензий и разведений - ГОСТ Р 51426-99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Подготовку и отбор лабораторных проб проводили по ГОСТ Р 26669-85, ГОСТ

31861-2012, ГОСТ 31942-2012. Контроль питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08.

Выделение бактериофагов проводили согласно методам, предложенным М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), С.Лурия, Д. Дарнел (1970), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловичем (1973), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007), Е.Н. Семаниной (2012), Э.Каттер (2012). Изучение основных биологических свойств фагов проводили по методикам Д.М. Гольдфарба (1961), А.С. Тихоненко (1968), И.М. Габрилович (1973), И.П. Ревенко (1978), С.Н. Золотухина (2007), Д.А. Викторова (2011), Н.А. Феоктистовой (2011). Специфичность выделенных фагов определяли методами Отто («стекающая капля»), методом Фишера (Шах Махмуд Р.с соавт., 2013), методом Фюрта. Селекцию бактериофагов проводили по методикам С.Н. Золотухина (2006), Д.А.Викторова (2011).

Индикацию бактерий *A. hydrophila* в объектах внешней среды при помощи реакции нарастания титра фага проводили по методикам Д.М. Гольдфарба (1961), В.Д. Тимакова (1962), В.Я. Ганюшкина (1988), С.Н. Золотухина (2007), Д.А. Викторова (2011).

Для получения полногеномных нуклеотидных последовательностей выделенных бактериофагов и подтверждения отсутствия лизогении штамма хозяина использовали метод метагеномного секвенирования вирусов.

Статистическую обработку исследовательских результатов осуществляли по стандартным методикам с использованием специальных компьютерных программ *Statistica 12.0, Microsoft Office Exsel 2010*.

Общая схема научных исследований по теме диссертационной работы приведена на Рисунке 3.

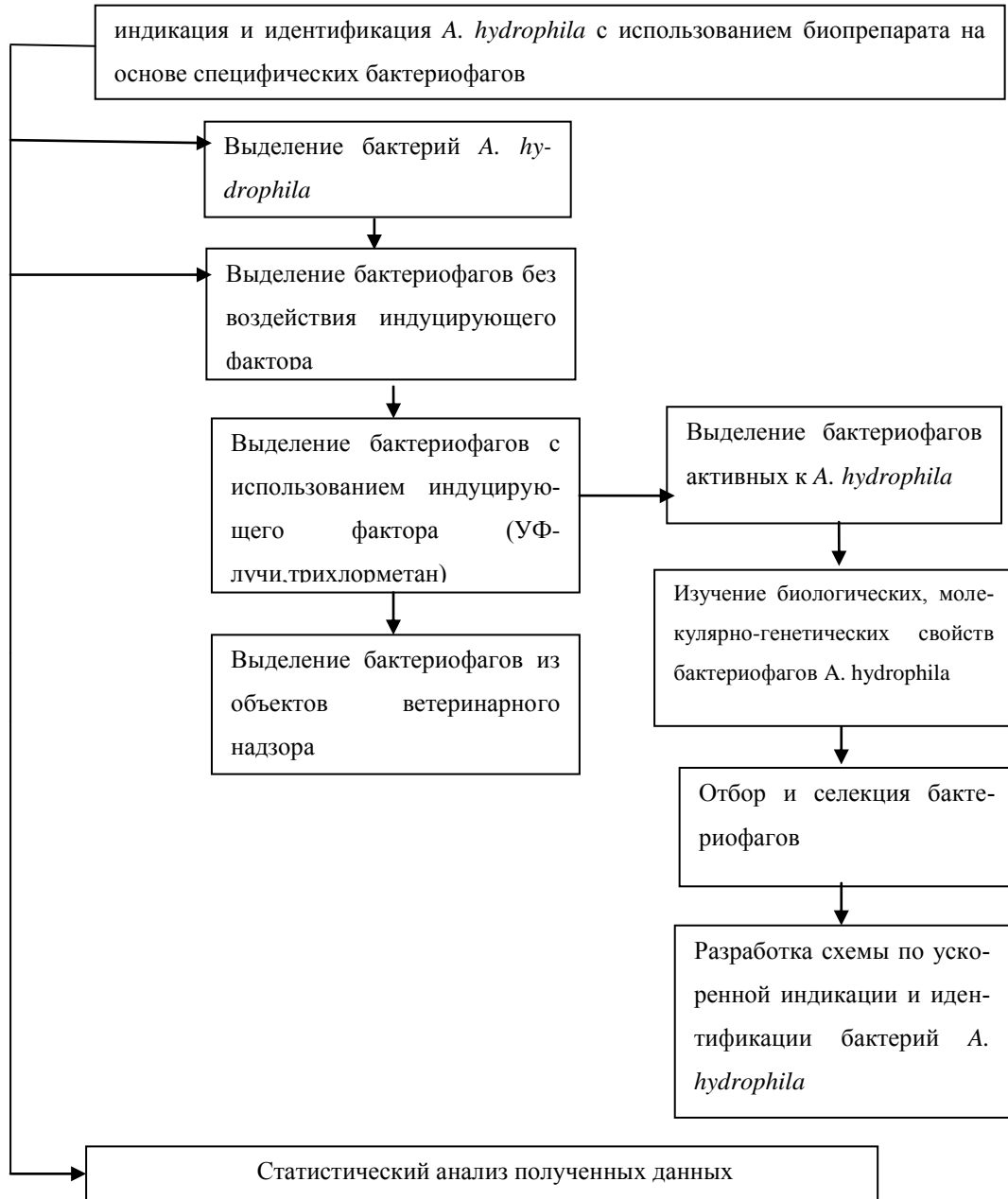


Рисунок 3- Общая схема научных исследований

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Выделение и идентификация бактерий *A. hydrophila*

Первым этапом наших исследований стало выделение и идентификация бактерий *A. hydrophila* из объектов ветеринарного надзора. Объектами исследования в серии наших опытов стали: вода открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), сточные воды, гидробионты (рыбы, пиявки, органо-комплекс рыб). Отбор проб осуществляли в соответствии с требованиями нормативно-технической документации. Всего проведено исследований более 130 проб из объектов ветеринарного надзора.

Посев образцов проб производили на накопительную среду УГСХА-1, инкубировали в термостате 24 часа при температуре 37°C. По окончании инкубации при помутнении среды и разжижении желатина делали посевы на плотную селективную среду УГСХА-2. Чашки со средой УГСХА-2 инкубировали в термостате 24 часа при температуре 37°C. После инкубации на чашках наблюдали рост округлых, выпуклых, светло-бежевых, блестящих колоний 2 – 3 мм в диаметре. Данные колонии по 4 – 6 штук пересеивали в пробирки с МПБ и инкубировали в термостате 24 часа при температуре 37°C (Рисунок 2).

После инкубации проводили микроскопию и окрашивание по Граму. При обнаружении в мазках грамотрицательных прямых палочек с закругленными концами, располагающихся поодиночке или небольшими цепочками, проводили дальнейшую идентификацию культур на основе определения культурально-морфологических и биохимических свойств (Васильев Д.А., 2004; Лабинская А.С., 2004; Bergey's Manual, 2005).

Было выделено 33 штамма бактерий, которые по тинкториальным и морфологическим свойствам сходны с бактериями *A. hydrophila*.

Дальнейшую идентификацию выделенных штаммов бактерий проводили по следующим тестам: определение подвижности методом «висячая капля» и посев «уколом» в 0,3% МПА, тест на оксидазу, тест на каталазу, образование индола, реакция с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра, образование серо-

OF-тест	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Аргинин	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Лизин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Орнитин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Образование цитрата	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение урокаиновой кислоты	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Окисление глюконата	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Усвоение DL-лактата	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Образование кислоты из:																		
Целлобиозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-арабинозы	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Лактозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
L-рамнозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Маннита	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Д-сорбитола	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Сахарозы	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Эластазы	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+

Примечание – « + » – положительная реакция, « - » – отрицательная реакция.

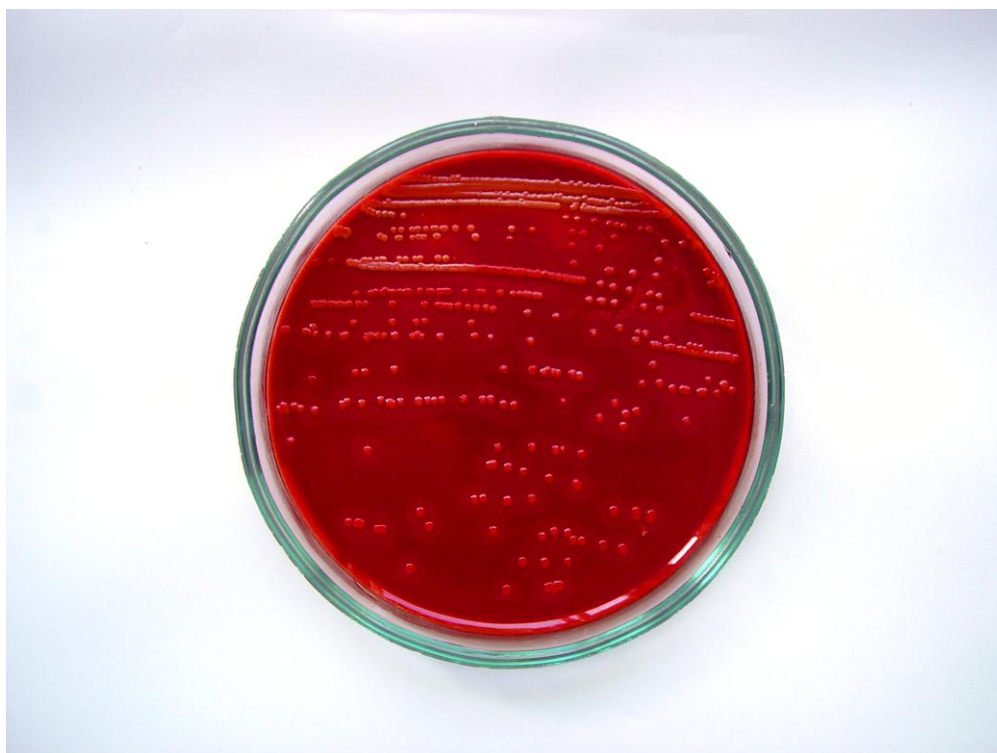


Рисунок 4–Рост бактерий *A. hydrophila* штамм №43-УГСХА на среде УГСХА - 2 через 24 часа культивирования при 37°C.

Источники выделения бактерий *A. hydrophila* представлены в Таблице 11

Таблица 11 – Источники выделения бактерий *A. hydrophila*

№ п/п	Источник выделения	Количество образцов	Количество выделенных штаммов <i>A. hydrophila</i>
1	Вода открытых водоемов (реки, озера, пруды Ульяновской области)	55	9
2	Водопроводная вода (г. Ульяновск)	12	-
3	Пищевые продукты (речная и морская рыба, органокомплекс рыб, молоко)	16	1
4	Сточные воды производственных помещений (свиноводческое подворье Чердаклинского района Ульяновской области)	12	1
5	Бытовые сточные воды (канализация Заволжского, Ленинского районов г. Ульяновска, промзона г. Ульяновск,	17	1

	бытовые фильтры очистки воды)		
6	Патологический материал (пиявки кафедре паразитологии УГСХА, речная рыба Заволжский рынок г. Ульяновск)	18	2
Итого		130	14

Из 33 штаммов изученных бактерий, 14 штаммов проявили культуральные и биохимические свойства характерные для бактерий *A. hydrophila*.

Эти штаммы бактерий *A. hydrophila* мы и будем использовать в дальнейшей работе.

2.2.2 Выделение бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Вторым этапом нашей работы было изучение 15 штаммов *A. hydrophila* как потенциально лизогенных по методике С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г.Шестакова (2009). Для этого в первой серии опытов выделение бактериофагов из бактерий проводили без воздействия на них индуцирующего фактора по методике предложенной Д.М. Гольдфарбом (1961), дополненной С.Н. Золотухиным (2006). Для этого в литровую колбу содержащую 0,5 литра стерильного МПБ вносили по 1 мл 24 часовых бульонных культур всех 15 штаммов бактерий *A. hydrophila* имеющихся у нас в наличии. Колбу с содержимым термостатировали при температуре 37°C в течение 24 часов. По истечении 24 часов содержимое колбы центрифугировали при 3000 об/мин в течении 30 минут. Надосадочную жидкость с целью инактивации нелизированных бактерий прогревали в водяной бане в течение 30 минут при температуре 58-60°C и исследовали на присутствие бактериофага методом агаровых слоев по Грациа. Для этого 1,5% МПА с добавленным в него 0,04% раствором генцианвиолетта из расчета 0,01 мл на 1 л среды для предохранения среды от грамположительной флоры разливали в чашки Петри по 25 - 30 мл (первый слой). Чашки с разлитым агаром сушили под бактерицидной лампой в течении часа и ставили в термостат при 37°C на несколько часов для полной сухости чашек. В предвари-

тельно разлитый в пробирку по 2,5 мл стерильный МПА, расплавленный и остуженный на водяной бане до 45°C вносили 1 мл исследуемой надосадочной жидкости и 0,2 мл 24-часовой культуры бактерии *A. hydrophila* пробирки перемешивали между ладонями и выливали вторым слоем на чашку с первым слоем. Чашки ставли на горизонтальную поверхность для полного застывания агара, после чего чашки термостатировали при 37°C в течении 24 часов. Наличие негативных колоний или зон лизиса на поверхности агара в чашках – положительный результат опытов, их отсутствие – отрицательный результат. Данная серия опытов не выявила лизогенных свойств у 15 исследуемых штаммов бактерий *A. hydrophila*.

Вторая серия опытов предусматривала воздействие на исследуемые штаммы бактерий *A. hydrophila* индуцирующего фактора, в качестве которого использовали ультрафиолетовое излучение (Лурия С., Дарнелл Д., 1970), трихлорметан (Гольдфарб Д.М., 1961). По методике описанной С. Лурия, Д. Дарнелл 24-часовую бульонную культуру бактерии *A. hydrophila* облучали ультрафиолетовыми лучами на протяжении 10,20,30,40,50 минут при помощи прибора «Изольда» с ртутной лампой ДРБ-8. Параллельно данные культуры обрабатывали трихлорметаном в соотношении 1:10. После обработки бульонную культуру бактерий центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут надосадочную жидкость исследовали методом агаровых слоев на присутствие бактериофага. Также использовали усовершенствованную схему воздействия ультрафиолетового излучения на бактерии, описанную Е.Н. Семаниной (2012).

1 день: посев газоном 24 часовой бульонной культуры *A. hydrophila* на МПА, подсушивали в термостате 10-15 мин, облучали бактерии УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиционировали 5-7 мин. Далее термостатировали чашки в течение 24 часов при температуре 37°C.

2 день: распределяли шпателем выросшие колонии бактерий по поверхности агара, облучали бактерии УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиционировали 7-10 минут. Далее термостатировали чашки при температуре 37°C в течении 24 часов.

3 день: распределяли шпателем выросшие колонии бактерий по поверхности агара, облучали бактерии УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 0,5 м, экспозиционировали 7-10 минут. Далее термостатировали при температуре 37°C в течении 24 часов.

4 день: смывали выросшие колонии МПБ с чашек Петри, помещали в пробирку со штаммами бактерий *A. hydrophila*. Культивировали в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C.

5 день: обрабатывали трихлорметаном 1 часть трихлорметана и 10 частей фаголизата в течение 15 минут, центрифугировали при 3000 об/мин – 15 мин. Снимали надосадочную жидкость в стерильную пробирку и исследовали на наличие бактериофагов методом агаровых слоев

6 день: учет результатов. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса.

Данная серия опытов показала, что воздействие ультрафиолетового излучения и трихлорметана в качестве индуцирующего фактора на бактерии *A. hydrophila* не привела к выделению бактериофагов и проявлению лизогенных свойств данными бактериями.

Следующим этапом нашей исследовательской работы стало выделение бактериофагов активных в отношении бактерий *A. hydrophila* из объектов ветеринарного надзора.

Нами было исследовано более 130 проб. Для выделения бактериофагов использовали сточные воды, воду открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), органокомплекс рыб, пиявки.

Материал для исследований фильтровали через бумажный фильтр для очистки от механических примесей. Затем в колбу с 100 мл стерильного концентрированного МПБ вносили 50 мл фильтрата исследуемого материала и по 1 мл 24-часовой бульонной культуре 15 штаммов бактерий *A. hydrophila*. Смесь термостатировали в течении 24-48 часов при температуре 37°C. После термостатирования смесь разливали в условиях бокса в стерильные пробирки. Одну пробирку обрабатывали трихлорметаном в соотношении 1:10, затем центрифугу-

гировали при 3000 об/мин в течение 30 минут, другую пробирку со смесью прогревали на водяной бане при температуре 45-57°C в течении 30 минут. Данная обработка позволяет выделить бактериофаги устойчивые к обработке трихлорметаном и термоустойчивые фаги. Полученные фильтраты исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Данная методика не позволила нам выделить бактериофаги активные по отношению к бактериям *A. hydrophila*. Можно предположить, что это связано с неустойчивостью белков входящих в состав бактериофагов данных бактерий к высокой температуре и присутствием у них липидсодержащих везикул инактивирующихся трихлорметаном. Поэтому в дальнейшей исследовательской работе мы будем использовать метод мембранной фильтрации на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадку типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV.

Дальнейшее выделение бактериофагов проводили по схеме, представленной на Рисунке 5.

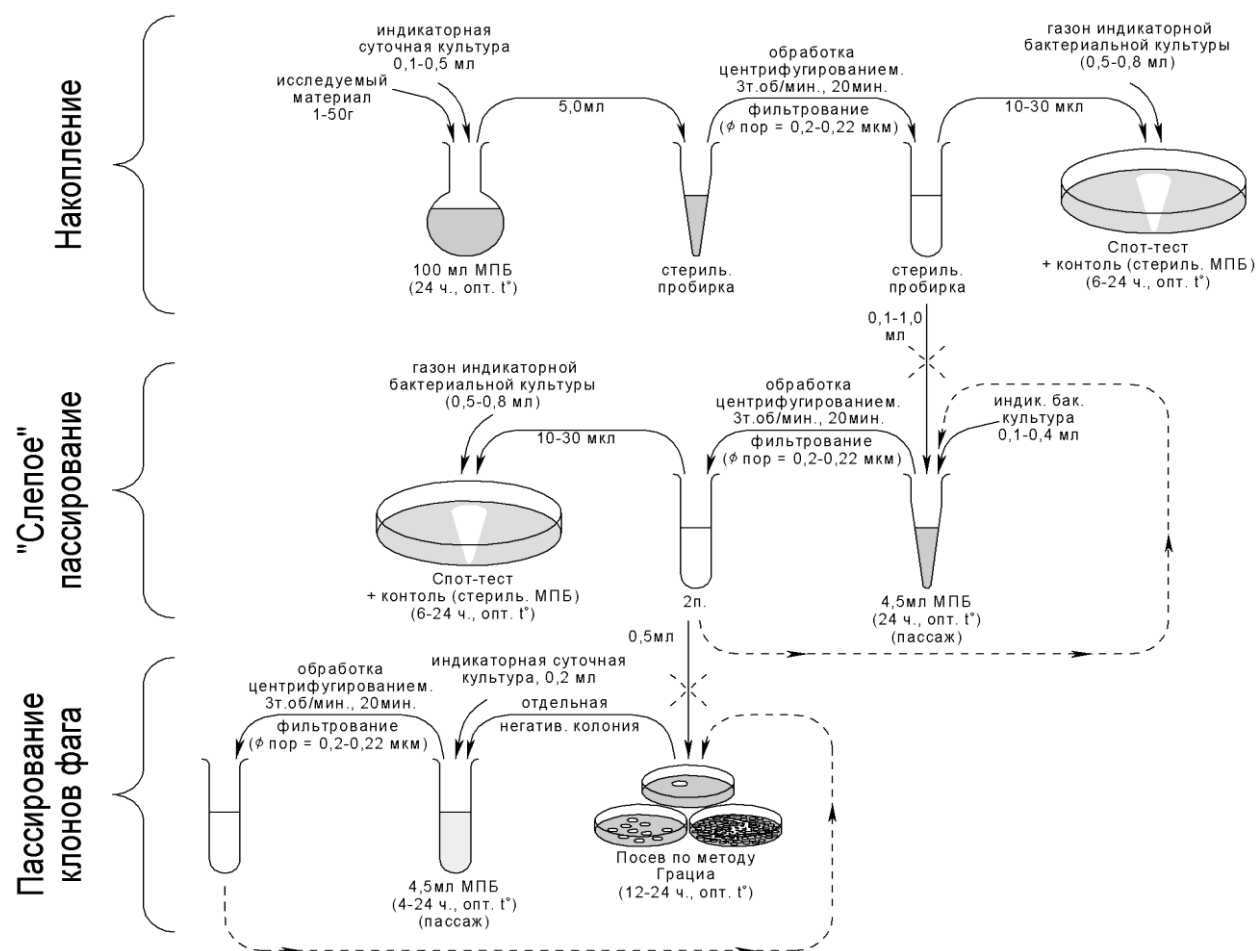


Рисунок 5 – Схема выделения бактериофагов *A. hydrophila* предложенная Д.А.Викторовым 2011

Исследуемый биоматериал подвергали фильтрации через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. В колбу объемом 0,5 литра содержащей 100 мл стерильного концентрированного МПБ вносили 50,0 мл фильтрата исследуемого материала и по 1,0 мл 24-часовых бульонных культур всех 15 имеющихся у нас штаммов бактерий *A. hydrophila*. Колбу термостатировали в течение 24 - 48 часов при температуре 37°C. По истечении срока инкубации содержимое колбы дозировали в стерильные пробирки по 5 мл. Одну из пробирок центрифугировали в течение 20 минут при 3000 об/мин. Полученный супернатант фильтровали методом фильтрации на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor», или использовали шприц - насадку типа «Swinlex» с диаметром пор 0,22 μm GV. Полученный фильтрат исследовали по технологии агаровых слоев по Грациа, на наличие бактериофага гомологичного бактерии *A. hydrophila*. Для этого 1,5% МПА с добавленным в него 0,04% пиритовым раствором генцианвиолетта из расчета 0,01 мл на 1 л среды для предохранения среды от грамположительной флоры разливали в чашки Петри по 25 - 30 мл (первый слой). Чашки с разлитым агаром сушили под бактерицидной лампой в течении часа и ставили в термостат при 37°C на несколько часов для полной сухости чашек. В предварительно разлитый в пробирку по 2,5 мл стерильный МПА, расплавленный на водяной бане и остуженный до 45°C вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл 24 часовой бульонной культуры бактерий *A. hydrophila*, пробирки перемешивали между ладонями и выливали вторым слоем на чашку с первым слоем. Чашки ставили на горизонтальную поверхность для полного застывания агара, после чего чашки термостатировали при 37°C в течении 24 часов.

Для контроля индикаторную культуру бактерии *A. hydrophila* засекали по технологии агаровых слоев с 1 мл стерильного МПБ.

После инкубации в термостате хорошо видимые на непрозрачном фоне глубинного роста бактерий, прозрачные негативные колонии или зоны лизиса

которые свидетельствуют о присутствии в исследуемом материале бактериофагов.

При получении положительного результата негативные колонии или участки лизиса для выделения чистых линий фага пересевали с помощью бактериологической петли в МПБ с индикаторной культурой *A. hydrophila*. Для этого в 2 пробирки по 4,5 мл стерильного МПБ добавляли стерильной пипеткой по 0,2 мл суточной индикаторной бульонной культуры *A. hydrophila*, в одну из которых пересевали негативную колонию, вторая пробирка являлась контролем. Посевы термостатировали при температуре 37°C в течение 10 - 12 часов. Коротким моментом являлось просветление бульона в опытной пробирке и выраженное замутнение среды в контроле. Затем содержимое опытной пробирки с целью удаления бактерий фильтровали через мембранный фильтр на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадке типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV. Полученный фаголизат применяли для проведения пассирования фага.

Повышение литической активности и селекцию выделенных бактериофагов проводили по методике, описанной в трудах И.М. Габриловича и (1973), С.Н.Золотухина (2006). Для этого приготовили разведения фага в МПБ от 10^{-1} до 10^{-10} . Затем фаги засеивали по методу агаровых слоев на 3 чашки по 1 мл из разведений от 10^{-7} до 10^{-9} для получения на питательной среде отдельных негативных колоний после термостатирования при температуре 37°C в течении 18-24 часов. Негативную колонию, расположенную от других колоний не менее 10 мм, переносили при помощи бактериологической петли в стерильный МПБ, стерильной пипеткой добавляли 0,2 мл индикаторной 18 - 24 часовой бульонной культуры *A. hydrophila*. Одновременно ставился контроль: МПБ засеянный индикаторной культурой без фага. Опытные пробирки термостатировали при 37°C в течении 4 - 7 часов. За этот промежуток времени опытная пробирка с фагом просветлялась, а контрольная без фага становилась мутной. Содержимое опытной пробирки фильтровали через мембранный фильтр на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадке типа «Swinnex» с диа-

метром пор 0,22 μm GV, фильтрат исследовали по технологии агаровых слоев, снова пересеивая негативную колонию тождественную исходной, с которой проводили такой же процесс. По этой методике проводили до 7-10 пассирований выделенных клонов фагов до получения однородных популяций фага с одинаковыми негативными колониями.

В результате проведенных экспериментов нами были выделены и селекционированы 5 штаммов бактериофагов бактерий *A. hydrophila* (Таблица 12).

Таблица 12–Биообъекты выделения бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

№ п/п	Название фага	Источник выделения
1	F43-УГСХА	Озеро, п. Октябрьский, Чердаклинского района, Ульяновской области
2	1р-УГСХА	Р. Волга, Заволжский район города Ульяновска
3	F43g-УГСХА	Озеро, р.п. Чердаклы, Ульяновской области
4	13а-УГСХА	Сточные воды очистных сооружений города Ульяновска, Заволжский район
5	<i>Ahd</i> -УГСХА	Озеро, п. Мирный, Чердаклинского района, Ульяновской области

2.2.3 Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *A. hydrophila*

Для конструирования биопрепарата на основе полученных бактериофагов необходимо было изучить их основные биологические характеристики, поэтому дальнейшим этапом наших исследований явилось детальное изучение следующих биологических свойств:

- морфология негативных колоний;
- литическая активность;
- спектр литической активности;

- специфичность действия;
- температурная устойчивость;
- чувствительность к воздействию трихлорметана;
- морфология фаговых корпускул.

Для изучения основных биологических свойств использовали методики, изложенные: М. Адамсом (1961); Д.М. Гольдфарбом (1961); И.П. Ревенко (1978); В.Я. Ганюшкиным (1988); С.Н. Золотухиным (2007); Д.А. Викторовым (2012); Э. Катгер (2012).

2.2.3.1 Морфология негативных колоний бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Для изучения морфологии колоний бактериофагов использовали метод агаровых слоев. Фаг в разведении 10^{-7} - 10^{-9} в количестве 1 мл и 0,2 мл 18-24-часовой индикаторной бульонной культуры бактерий *A. hydrophila* вносили в пробирку с расплавленным на водяной бане и остуженным до 45°- 47°С 0,7% МПА. Пробирку тщательно перемешивали и выливали на чашку с 1,5% МПА. Ставили на горизонтальную поверхность для застывания. Затем чашки с застывшим агаром инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 18 - 24 часов. По истечении срока инкубации производили изучение морфологии негативных колоний бактериофагов. Морфологическими признаками явились: - размер негативных колоний,

- прозрачность,
- наличие зон неполного лизиса,
- характер края,
- рост культур вокруг колоний (Таблица 13).

Таблица 13–Морфология негативных колоний фагов бактерий *A. hydrophila*

Фаги	Морфология негативных колоний фагов
F43-	прозрачные, округлые, диаметр 1 - 2 мм
1р-	прозрачные, округлые, диаметр 0,5 - 1 мм

43g-	прозрачные, округлые, диаметр 0,2 - 0,5 мм
13a-	полупрозрачные, округлые, диаметр 0,1 - 0,3 мм
<i>AhD-</i>	прозрачные, округлые, диаметр 0,5 - 0,7 мм

Выделенные бактериофаги формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса и диаметром от 0,1 до 2 мм (Рисунки 6, 7, 8, 9, 10).

2.2.3.2 Литическая активность бактериофагов бактерий

Aeromonas hydrophila

Литическая активность бактериофага – это свойство фага вызывать лизис бактериальной культуры на плотной или жидкой питательной среде, выражается максимальным разведением фага, проявляющего литическое действие. Для более достоверной оценки литической активности фага определяли количество БОЕ фага в единице объема. На литическую активность фага оказывали большое влияние физические свойства среды, особенности биологии клетки бактерии и другие факторы. Все это требовало определять литическую активность фага в строго стандартных условиях. Для определения литической активности выделенных и селекционированных бактериофагов бактерий *A. hydrophila* использовали методы Аппельмана и Грациа (М. Адамс, 1961).

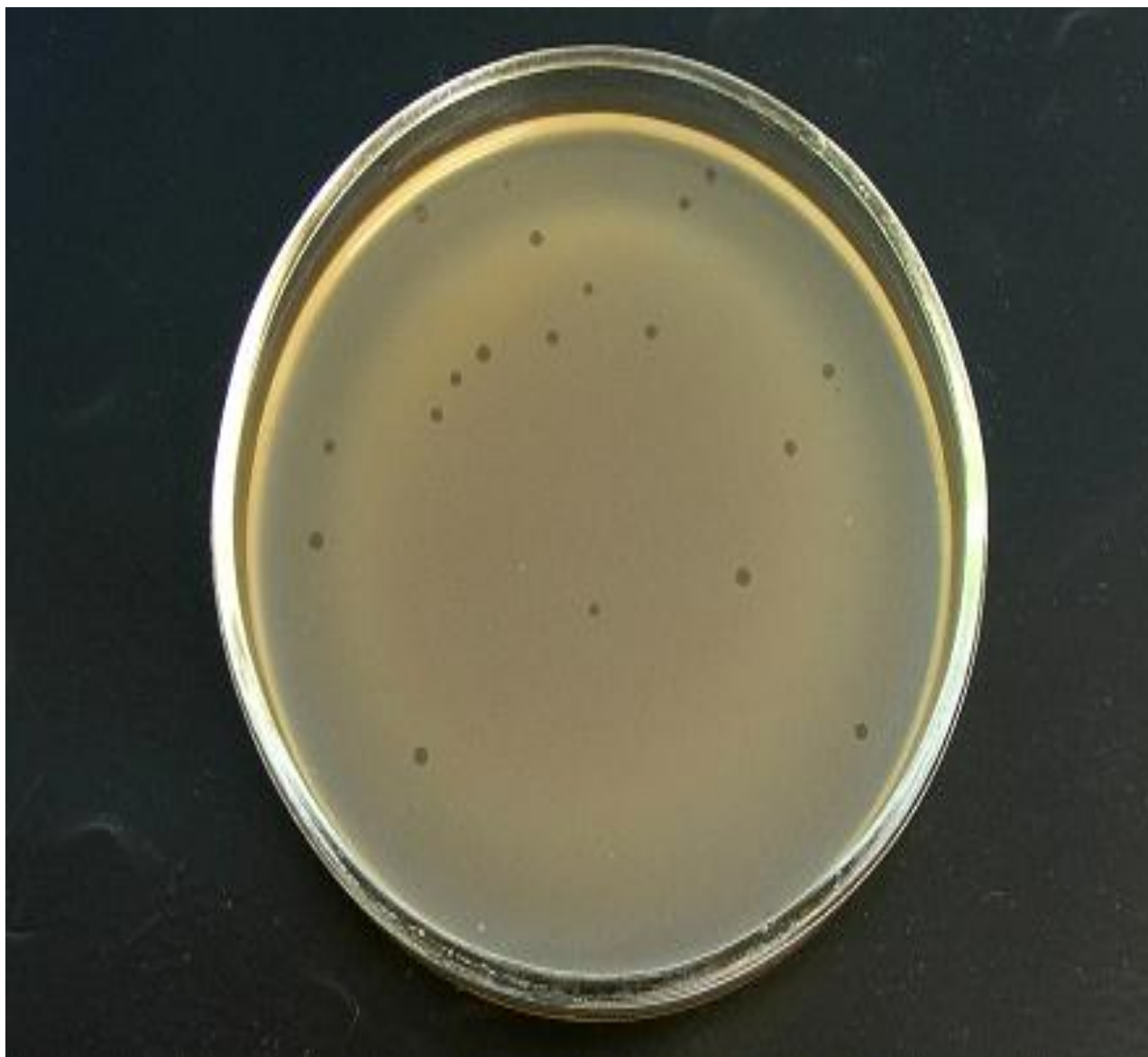


Рисунок 6–Морфология негативных колоний бактериофага F43-УГСХА, индикаторный штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА, термостатирование 24 часа при 37°С на МПА.



Рисунок 7–Морфология негативных колоний бактериофага *AhD*-УГСХА, индикаторный штамм *A. hydrophila-Ahd*, термостатирование 24 часа при 37 °С на МПА

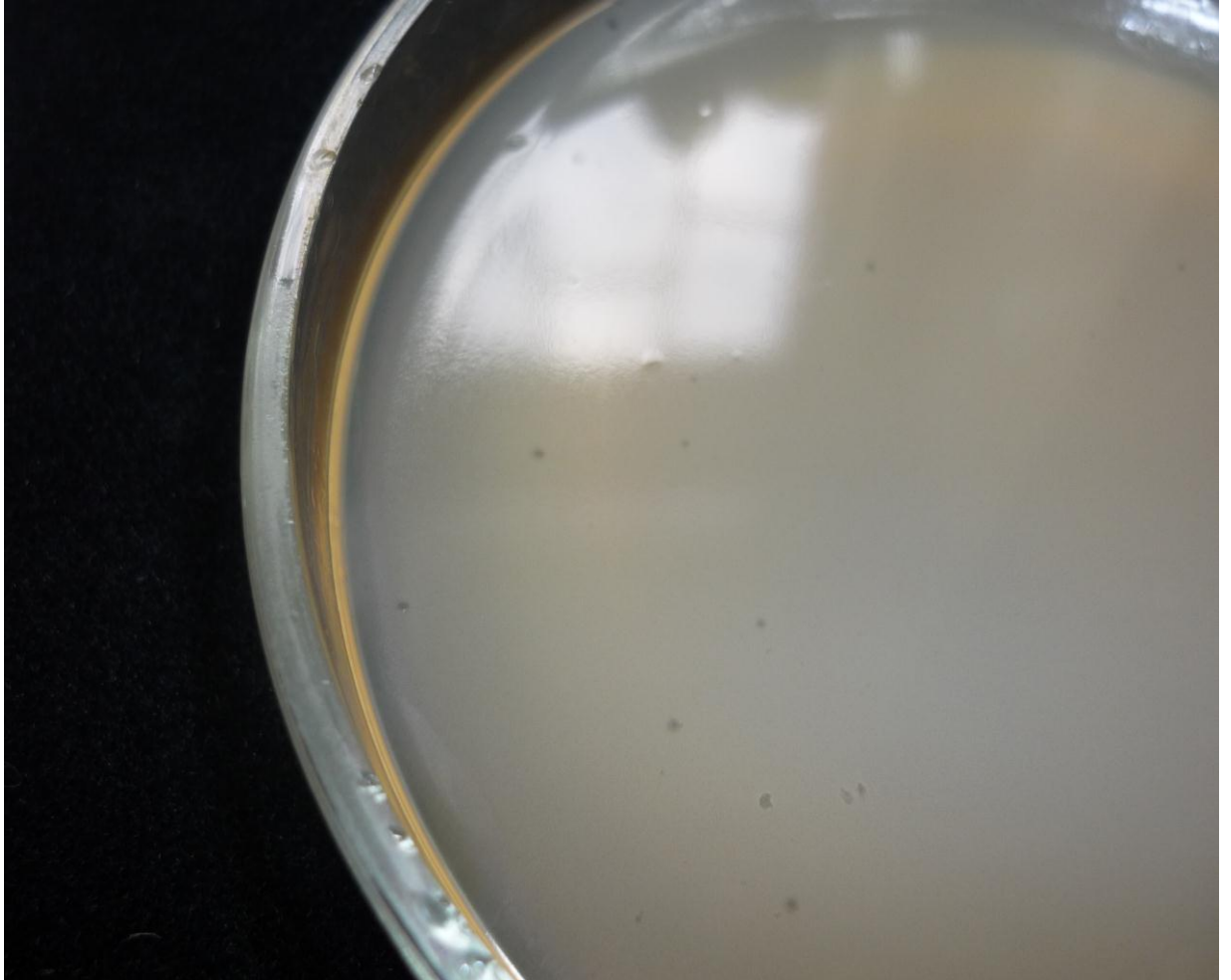


Рисунок 8–Морфология негативных колоний бактериофага F43g-УГСХА, индикаторный штамм *A. hydrophila* 43g–УГСХА, термостатирование 24 часа при температуре 37°C на МПА

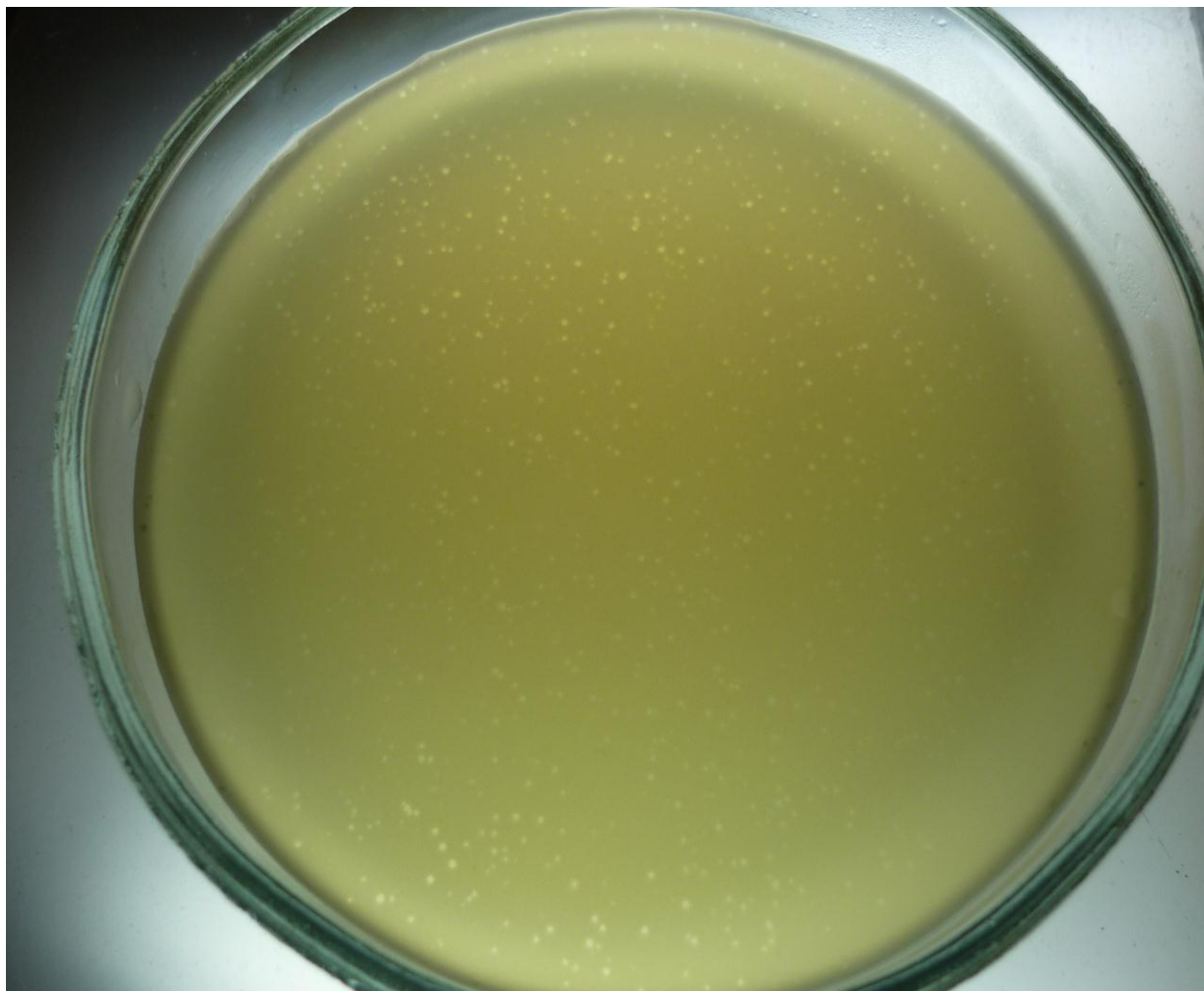


Рисунок 9 – Морфология негативных колоний бактериофага 1р-УГСХА, индикаторный штамм *A. hydrophila* 1р-УГСХА, термостатирование 24 часа при температуре 37°C на МПА



Рисунок 10–Морфология негативных колоний бактериофага 13а-УГСХА, индикаторный штамм *A. hydrophila* 13а–УГСХА, термостатирование 24 часа при температуре 37°С на МПА

Метод Аппельмана: в штатив в один ряд ставил 12 пробирок, которые содержат по 4,5 мл стерильного МПБ. В первую пробирку стерильной пипеткой вносил 0,5 мл изучаемого фага, тщательно перемешивал. Вслед за этим делал последовательные разведения, стерильными пипетками, переносил из пробирки в пробирку 0,5 мл смеси. Из десятой пробирки 0,5 мл смеси выливал. Одиннадцатая пробирка - контроль роста бактериальной культуры без добавки фага, двенадцатая пробирка - контроль стерильности МПБ. В результате получил в 10 пробирках разведение бактериофага от 10^{-1} до 10^{-10} . В каждую пробирку изготовленного ряда разведений добавил по 0,1 - 0,2 мл 18-24-часовой бульонной индикаторной культуры бактерий *A. hydrophila*. Штатив с 12 пробирками инкубировал в термостате при температуре 37°С 8 - 10 часов. Последняя пробирка в

ряду, бульон которой остался прозрачным, являлся показателем стерильности МПБ.

Метод Грация: накануне опыта в чашки Петри разливал 25 - 30 мл 1,5% МПА с добавлением 0,01 мл генцианового фиолетового. Чашки Петри тщательно подсушивал. В день опыта из фаголизатов готовил ряд разведений (10^{-1} до 10^{-10}) в пробирках со стерильным МПБ. В пробирках с 2,5 мл 0,7% МПА, расплавленного на водяной бане и остуженного до 45° - 47°C , готовил смесь из 1 мл фага каждого разведения и 0,2 мл 18-24-часовой бульонной индикаторной культуры бактерий *A. hydrophila*. Смесь в пробирках тщательно перемешивал вращением между ладонями и осторожно выливал на чашки с тщательно подсушенным 1,5% МПА. После затвердения среды чашки на горизонтальной поверхности, чашки в перевернутом виде инкубировал в термостате при температуре 37°C в течение 18 - 24 часов. Для установления титра фага подсчитывал число БОЕ и умножал на степень разведения.

Таблица 14–Литическая активность бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

№	Штамм фага	Титр по Аппельману	Титр по Грация, БОЕ/мл
1	Фаг F43-УГСХА	10^{-8}	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
2	Фаг 1р-УГСХА	10^{-6}	$4,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
3	Фаг F43g-УГСХА	10^{-7}	$3,7 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
4	Фаг 13а-УГСХА	10^{-5}	$0,58 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
5	Фаг Ahd-УГСХА	10^{-8}	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

Литическая активность изучаемых бактериофагов составила:

- по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} ;

- по Грация от $0,58 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл (Таблица 14).

2.2.3.3 Спектр литической активности бактериофагов *A. hydrophila*

Спектр литической активности бактериофагов – это диапазон лизиса гомологичных к фагу бактерий. Этот диапазон является характерной чертой бактериофагов и его применяют для их идентификации (Д.М. Гольдфарб, 1961; Э. Каттер, 2012). Для определения диапазона литической активности фагов мы использовали метод нанесения фага на газон роста индикаторных культур (Золотухин С.Н., 2007). В своих исследованиях мы использовали 1 референс-штамм и 14 полевых штаммов бактерий *A. hydrophila*.

В чашку Петри с подсушенным агаром пипеткой наносил 3 - 4 капли 18-24-часовой бульонной культуры, стерильным шпателем равномерно растирали, инкубировали для подсушивания в термостате 20 - 30 минут. Затем на подсушенную среду пипеткой наносил 1 каплю бактериофага и наклоняли чашку, чтобы капля стекла. В контроле использовал каплю стерильного МПБ. После подсушивания чашки в перевернутом виде инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 18 - 24 часов (Рисунок 11).

Положительный результат – появление прозрачной зоны лизиса на газоне тотального роста культуры. Все изучаемые фаги показали различные спектры литической активности (Таблица 15).

Таблица 15–Спектр литической активности бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>	Количество испытанных штаммов <i>A. hydrophila</i> шт.	Количество лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i> шт.	Процент лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i> , %
F43-УГСХА	15	13	86,7

1p-УГСХА	15	4	26,6
F43g-УГСХА	15	8	53,3
13a- УГСХА	15	5	33,3
AhD-УГСХА	15	2	13,3

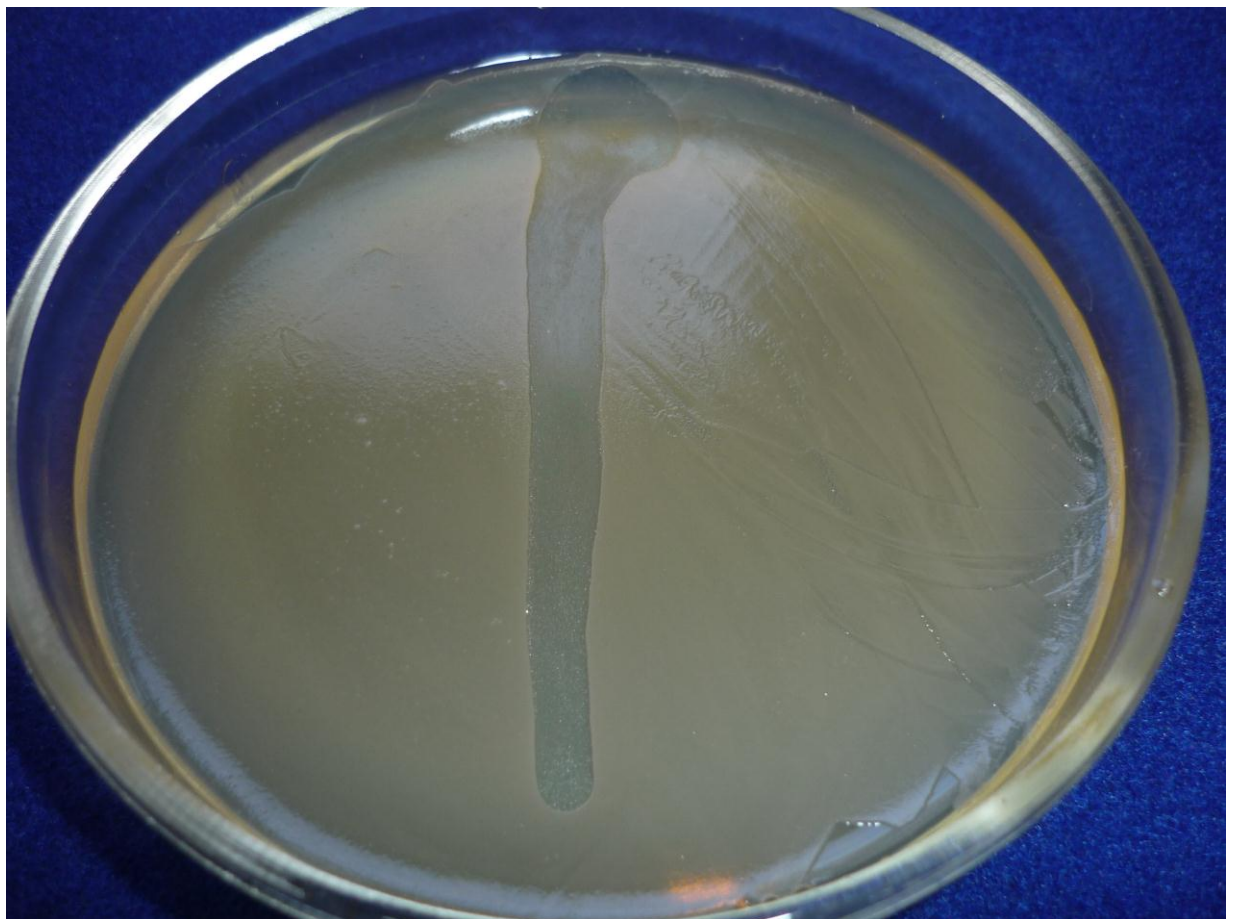


Рисунок 11-Лизис бактериофагом F43-УГСХА бактериального газона бактерии *A. hydrophila*, штамм №43-УГСХА через 24 часа культивирования при 37°C.

2.2.3.4 Специфичность действия бактериофагов

бактерий *A. hydrophila*

Для диагностики и идентификации бактерий важным условием является отсутствие у бактериофагов исследуемых микроорганизмов литической активности в отношении гетерологичных бактерий.

В нашем исследовании для изучения специфичности бактериофагов бактерий *A. hydrophila* мы использовали следующие гетерологичные и гомологичные культуры: референс-штамм бактерии *A. hydrophila* ATCC 7966; *A. sobria* ATCC9071, *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. caveae* ATCC 12633; *E. coli* №4, *Kl. pneumonia* №4463, *C. freundii*, *B. cereus* №2527, *B. subtilis* №6633, *E. faecalis* №189, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* №0630, *Ps. aeruginosa* №128, *Pr. rettgeri* №175, *Ps. putida* №12633, *P. mirabilis* №523. 14 полевых штаммов *A. Hydrophila*.

Изучение специфичности исследуемых фагов проводили следующим образом: 0,3 мл 18-24-часовой бульонной исследуемой культуры наносили на поверхность подсушенного 1,5% МПА, тщательно распределяли шпателем, подсушивали в термостате, дно чашек делили карандашом на сектора; на каждый сектор пастеровской пипеткой наносили каплю бактериофагов, для контроля наносили стерильный МПБ. Чашки подсушивали и в перевернутом виде инкубировали в термостате в течение 18 - 24 часов при температуре 37°C. При положительном результате на газоне сплошного роста штамма культуры на месте нанесения капли бактериофага четко видна зона лизиса.

В ходе исследования установили, что исследуемые фаги не лизировали представителей других видов и родов бактерий, и являются строго специфичными по отношению к бактериям *A. hydrophila* (Таблица 16).

Таблица 16–Специфичность бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

№ п/ п	Вид бактерий	Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>					Контроль МП Б
		F43- УГСХ А	1p- УГСХ А	F43g- УГСХ А	13a- УГС ХА	AhD- УГСХ А	
1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-
2	<i>Aeromonas sobria</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	-	-	-	-
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
6	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
9	<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-
11	<i>Yersinia pseudotuberc.</i>	-	-	-	-	-	-
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
13	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-
14	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-
15	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
16	<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	-

Примечание – «-» – отсутствие лизиса, «+» – лизис культуры

2.2.3.5 Температурная устойчивость выделенных бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Использование высокой температуры для инактивации фаголизатов от бактерий имеет огромное практическое и теоретическое значение и является важным технологическим параметром для отбора бактериофагов для индикации и идентификации бактерий.

Методика по изучению температурной устойчивости, используемая в наших исследованиях, заключается в следующем: ряд пробирок в разведении 1:10 с МПБ каждого исследуемого фага прогревали на водяной бане в течение 30 минут при температуре от 45°C до 57°C с интервалом 2°C. Контрольные пробирки не прогревали. После воздействия высокой температуры активность ис-

следуемых фагов определяли по методу агаровых слоев Грация. В ходе исследований установили, что при температуре 53°C - 55°C фаголизаты значительно снизили свою активность. Повышение температуры выше 55°C приводило к полной инактивации фагов (Рисунок 12). Индикаторный штамм бактерии *A. hydrophila* №43-УГСХА значительно снизил свою активность при температуре выше 53°C. В результате исследования мы определили, что использование высокой температуры не гарантирует полное освобождение фаголизатов от жизнеспособных бактерий в вышеуказанных режимах и объясняет невозможность выделения бактериофагов из смеси фаги + бактерии (Таблица 17).

Таблица 17–Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

Температурный режим, °С	Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГСХА	Ahd-УГСХА
45	2,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	2,0x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸	3,0x10 ⁶ ±0,6x10 ⁶	2,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	4,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵	3,0x10 ⁷ ±0,4x10 ⁷
47	1,0x10 ⁷ ±0,3x10 ⁷	1,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	1,0x10 ⁵ ±0,7x10 ⁵	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,4x10 ⁴	1,0x10 ⁶ ±0,5x10 ⁶
49	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	3,0x10 ⁶ ±0,4x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	2,0x10 ⁵ ±0,6x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	2,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵
51	1,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	1,0x10 ⁴ ±0,3x10 ⁴
53	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	-	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³
55	-	1,0x10 ³ ±0,2x10 ³	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-

Контроль	$4,0 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$ $\pm 0,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$	$0,58 \times 10^6$ $\pm 0,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$
----------	--	--	--	--	---	--

Примечание – «иш»–индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА

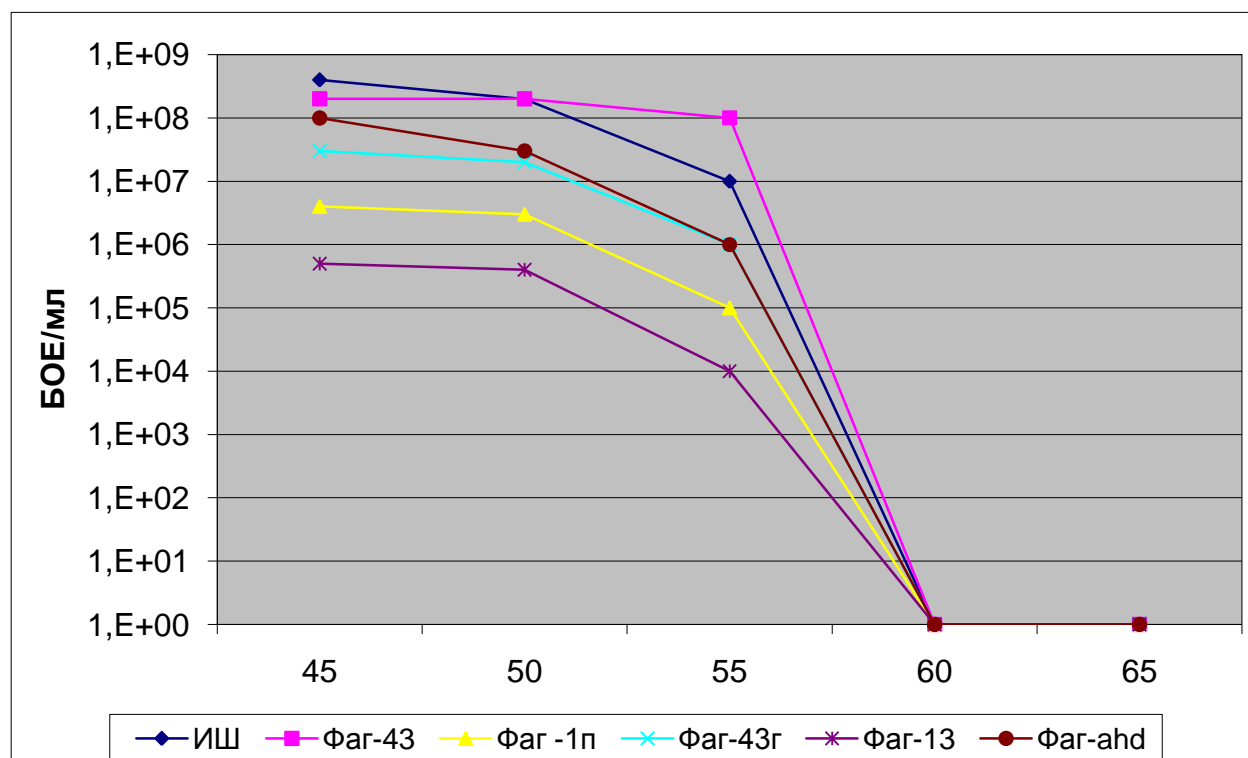


Рисунок 12–График температурной устойчивости бактериофагов *A. hydrophila*

2.2.3.6 Устойчивость исследуемых бактериофагов бактерий *A. hydrophila* к воздействию трихлорметана

Трихлорметан–как химический агент используется для таксономии и инактивации фаголизатов от бактерий, ввиду того, что бактериофаги более устойчивы к его воздействию, чем бактерии (М. Адамс., 1961; Э. Каттер, 2012).

В своих исследованиях для определения чувствительности исследуемых бактериофагов мы использовали следующую методику: разведение фагов 1:10 с МПБ обрабатывали трихлорметаном в концентрации 1:10 при постоянном перемешивании в течение 15 – 45 минут. Контрольную пробирку не обрабатывали трихлорметаном. Активность бактериофагов после воздействия трихлорметана определяли по методу агаровых слоев Грациа.

В результате опытов было установлено, что активность исследуемых фагов после воздействия трихлорметана значительно снижалась, после проведения нескольких пассажей активность восстанавливалась до исходных параметров (Таблица 18).

Таблица 18–Устойчивость бактериофагов *A. hydrophila* к воздействию трихлорметана

Время воздействия трихлорметана, мин	Активность штаммов подвергнутых обработке хлороформом, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГСХА	Ahd-УГСХА
15	$2,0 \times 10^3$ $\pm 0,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^5$ $\pm 0,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$ $\pm 0,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$ $\pm 0,3 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$ $\pm 0,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$ $\pm 0,5 \times 10^4$
30	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
Контроль	$4,0 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$ $\pm 0,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$	$0,58 \times 10^6$ $\pm 0,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$

Примечание – «иш»–индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА

Результаты исследований показали, что трихлорметан невозможно использовать в качестве химического фактора для инактивации бактерий в исследуемых фаголизатах (Рисунок 13).

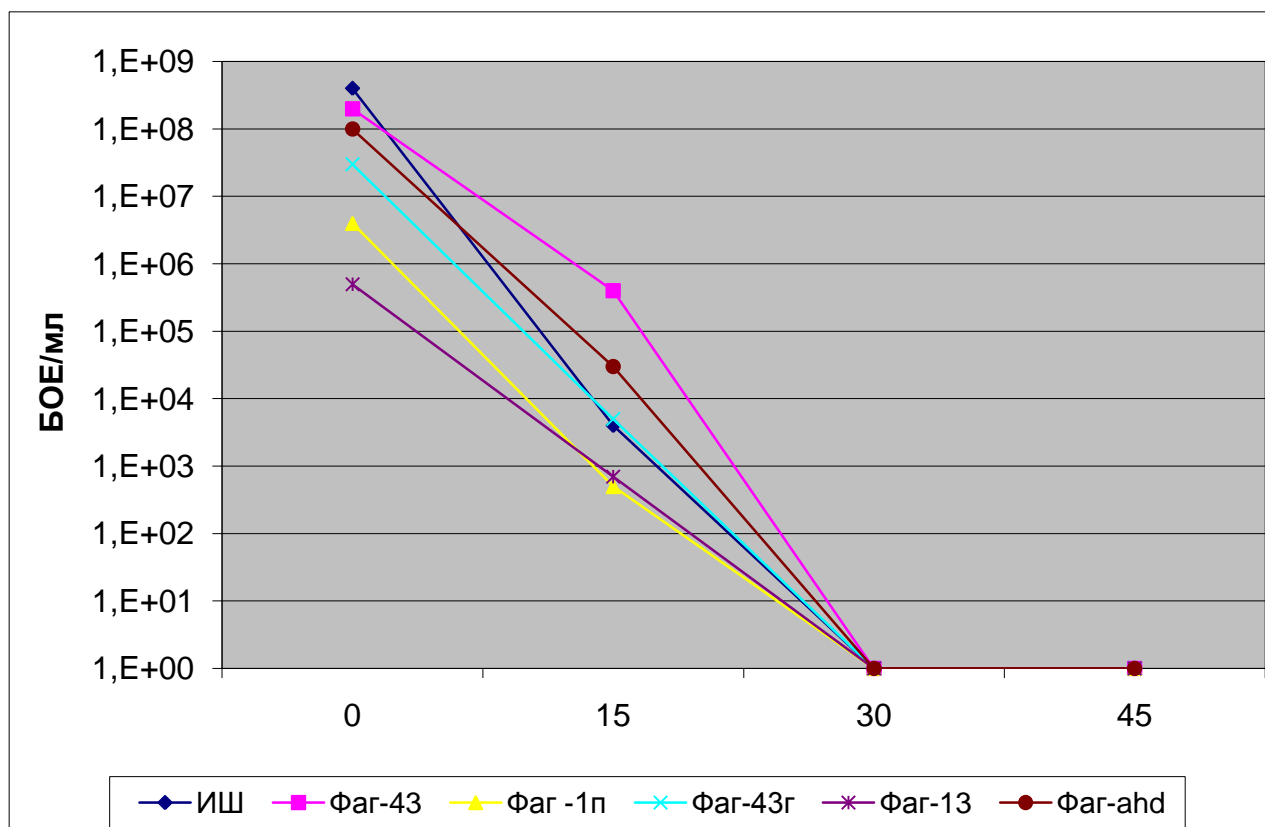


Рисунок 13—График устойчивости исследуемых бактериофагов к воздействию трихлорметана

Вывод: в связи с неустойчивостью бактериофагов к воздействию на них высокой температуры и трихлорметана для дальнейших исследований мы будем использовать метод мембранной фильтрации.

2.3 Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторных бактериофагов *A. hydrophila*

После изучения основных биологических свойств выделенных штаммов бактериофагов бактерий *A. hydrophila* для изготовления диагностического био-препарата был отобран штамм фага F43-УГСХА. Данный фаг:

- формирует на плотной среде в чашках прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, диаметром 1 - 2 мм;
- имеет спектр литической активности 86,7%;
- не лизирует бактерии других видов и родов;
- имеет литическую активность по Аппельману 10^{-8} , по Грациа $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл;
- не устойчив к воздействию трихлорметаном и температурой.

2.3.1 Характеристика индикаторной культуры

A. hydrophila №43-УГСХА

Штамм фага F43- УГСХА культивировали в МПБ (pH 7,4 - 7,6) с индикаторной культурой бактерий *A. hydrophila*, в качестве которой использовали штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА.

Бактерия *A. hydrophila* №43-УГСХА представляет собой грамотрицательную палочку, не образующую спор и капсул. Подвижная, не образующая пигмент, на среде УГСХА-2 образуют выпуклые округлые блестящие светло-бежевые колонии диаметром 2–3 мм. Бактерии являются оксидазоположительными, образуют индол, расщепляют глюкозу по типу ферментации, образуют сероводород, разжижают желатин, ферментируют сахарозу, маннит, арабинозу, не ферментируют ксилозу, инозит, положительны в реакции на аргинин, отрицательны по лизину и орнитину, то есть обладают характерными морфологическими, культуральными и биохимическими признаками, присущими бактериям *A. hydrophila*.

2.3.2 Определение температурного оптимума культивирования бактериофага F43-УГСХА

Для определения температурного оптимума культивирования бактериофага F43- УГСХА готовили разведение фага от 10^{-1} до 10^{-10} в стерильном МПБ. Разведения фага от 10^{-5} до 10^{-10} засеивали на чашке методом агаровых слоев по Грациа, подсушивали, ставили в термостат при температурных режимах от 32 до 48°C, инкубировали от 18 до 24 часов. Для учета результатов подсчитывали БОЕ (Таблица 19).

Таблица 19–Зависимость литической активности бактериофага F43-УГСХА от температуры культивирования

Температурный режим, °С	Литическая активность фага F43-УГСХА по Грациа
32 - 34	$1,2 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
34 - 36	$3,1 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
36 - 38	$1,5 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8$
38 - 40	$3,2 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
40 - 42	$4,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
42 - 44	$6,1 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
44 - 46	$1,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$
46 - 48	$2,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$

Полученные данные показывают, что температура 36-38°С является оптимальной для культивирования бактериофага F43-УГСХА.

2.3.3 Определение оптимума количества в соотношении фага

F43-УГСХА и бактерии *A. hydrophila* №43-УГСХА

То количество фаголизата, которое необходимо добавить к культуре бактерий, чтобы произошло наиболее оптимальное взаимодействие фага и культуры, называется множественностью фаговой инфекции. Для определения множественности в пробирку со стерильным МПБ в объеме 4,5 мл добавляли 0,2 мл фага F43-УГСХА и туда же добавляли 18-24-часовую бульонную культуру штамма *A. hydrophila* №43-УГСХА в количестве от 0,2 до 1 мл с интервалом по 0,2 мл. Пробирки культивировали в термостате при температуре 37°С. Затем содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц-насадку типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV и исследовали методом агаровых слоев.

Таблица 20—Зависимость литической активности бактериофага F43-УГСХА от множественности инфекции

Количество, мл		Литическая активность фагов (БОЕ/1 мл)
Фага	Культуры	
0,2	0,2	$1,4 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$
0,2	0,4	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
0,2	0,6	$4,4 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
0,2	0,8	$2,3 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$
0,2	1,0	$1,5 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$

Проведенными исследованиями было установлено, что оптимальным соотношением фага F43-УГСХА и бактерии *A. hydrophila* будет соотношение 1:2, или 0,2 мл фага к 0,4 мл культуры (Таблица 20).

2.3.4 Определение оптимума соотношения между временем пассажа и активностью бактериофага F-43-УГСХА

Для определения оптимума соотношения между временем пассажа и активностью бактериофага 0,2 мл 18-24-часовой бульонной культуры бактерии *A. hydrophila* №43-УГСХА и 0,2 мл бактериофага F43-УГСХА смешивали в пробирке с 4,5 мл стерильного МПБ, перемешивали, инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 4, 6, 8, 10, 12 часов. Затем содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. В результате опытов определили, что оптимальным временем пассажа для фага F43-УГСХА будет 8 часов (Таблица 21).

Таблица 21–Зависимость литической активности бактериофага F43-УГСХА от времени пассажа

Вариант опыта с фагом	Время пассажа, часы	Литическая активность фага F43-УГСХА по Грациа(БОЕ/мл)
1	4	$1,5 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$

2	6	$4,5 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$
3	8	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
4	10	$1,2 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$
5	12	$1,1 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$

Литическую активность при хранении бактериофага F43–УГСХА в холодильнике при температуре 2-4°C изучали определением титра фага по истечении 3,6,9,12,24,36 месяцев по методу Грациа на индикаторной культуре *A. hydrophila* №43-УГСХА (Таблица 22).

Таблица 22–Изменение литической активности бактериофага F43-УГСХА при хранении в течении 36 месяцев

Фаг	Срок хранения	Литическая активность, БОЕ/мл
F43-УГСХА	Момент укупоривания	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	3 месяца	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	6 месяцев	$4,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
	9 месяцев	$3,7 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	12 месяцев	$3,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	24 месяца	$3,6 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
	36 месяцев	$3,2 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$

Опытным путем установили литическую активность бактериофага F43-УГСХА через 3,6,9,12,24,36 месяцев, количество активных корпускул в 1мл препарата бактериофага снизилось с $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ на момент укупоривания до $3,2 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ спустя 36 месяцев, что согласно литературным данным является допустимым при создании биопрепарата (Николаенко Н.И., 1970; Золотухин С.Н., 2007; Каттер Э., 2012).

Таким образом, нами в основу фагового биопрепарата положен бактериофаг F43-УГСХА. Образец биопрепарата представляет собой герметично за-

крытый флакон объемом 5 мл прозрачный, светло-желтого цвета, со сроком использования (по результатам наблюдения) 2,5 года.

2.4. Разработка технологических параметров ускоренной индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* с помощью бактериофагов

Выделенные и селекционированные бактериофаги обладают видовой специфичностью, что используется нами в разработанной схеме выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila* (Рисунок 14).

Для подготовки проб и посева материала, выделения культур *A. hydrophila* использовали:

- ГОСТ «Методы бактериологического анализа»,
- «Инструкция по выделению и идентификации *A. hydrophila*» (Канаева Т.И., 2009).

Для исследования использовали воду из открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), органокомплекс рыб, контаминированные бактериями рода *Aeromonas* в концентрации 10^1 до 10^5 м. к. в 1 мл.

Посевы производили на среду накопления УГСХА-1, инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов. Затем делали посев на среду УГСХА-2, на которой через 24 часа при инкубации в термостате вырастали крупные вишневые колонии. Делали мазки, которые окрашивали по Граму и микроскопировали. При наличии в мазках подвижных грамтрицательных одиночных или короткими цепочками палочек подвергали дальнейшей идентификации бактериологическим методом и методом фагоидентификации.

2.4.1 Бактериологический метод

Для определения родовой и видовой принадлежности культур провели тесты на оксидазу, каталазу; реакции на наличие орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы, аргинингидролазы; тесты на индол, уреазу, триптофан; *OF*-тест; тесты на углеводы; использовали дополнительные тесты, изложенные в определителе бактерий Берджи (2005). Результаты исследования по определению родовой принадлежности представлены в Таблице 23.

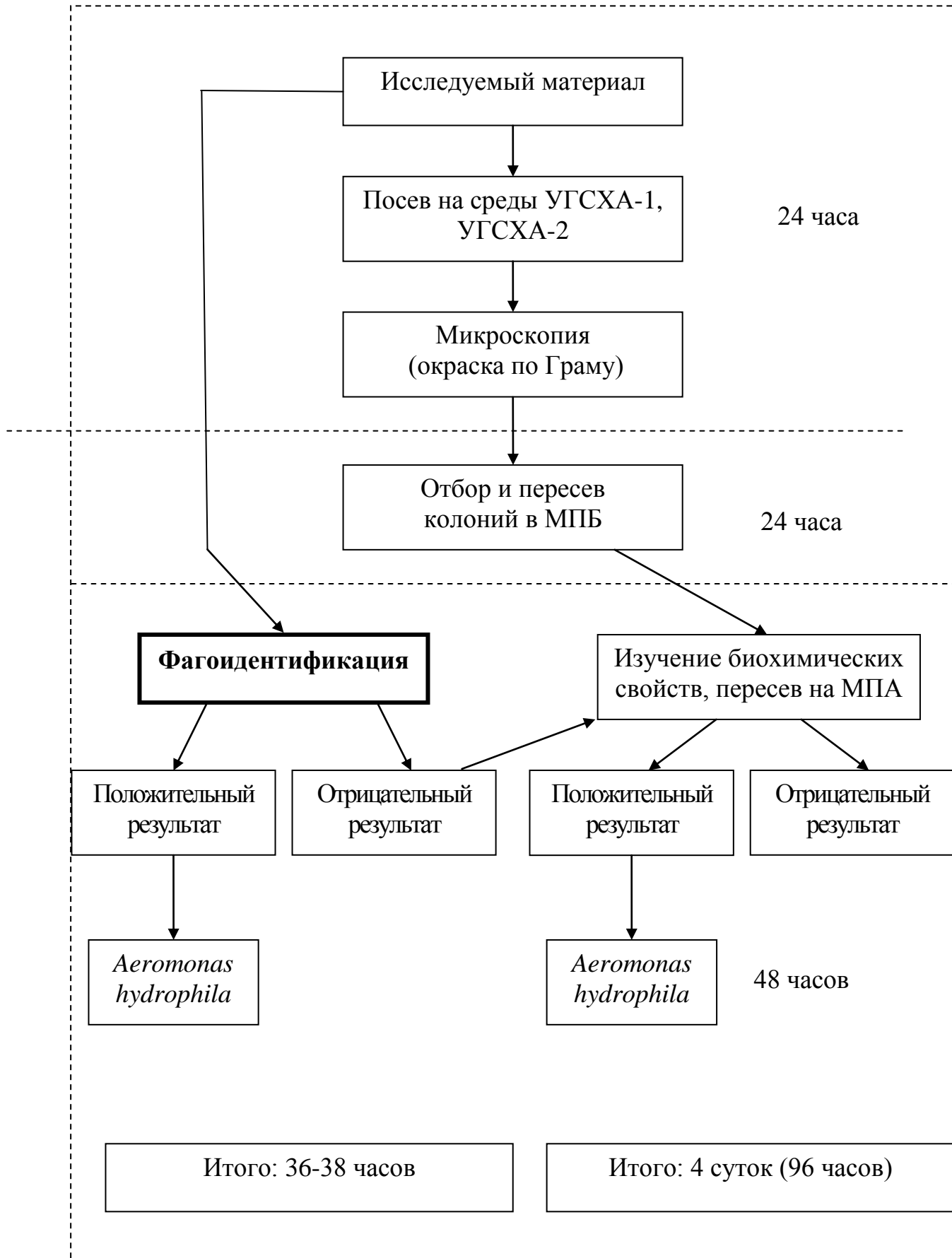


Рисунок 14—Сравнение схем бактериологического исследования и ускоренной

идентификации при помощи бактериофагов *A. hydrophila*

Таблица 23–Бактериологический метод идентификации выделенных штаммов

Объект исследования	Признаки или тесты																Результаты
	Вариант	Подвижность при 37°C	Газообразование	Оксидаза	Каталаза	Желатин	Индол	Лизин	Аргинин	Орнитин	Глюкоза	Сахароза	Инозит	H ₂ S	Арабиноза	Маннит	
Вода	1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>Plesiomonas</i>
	2	+	+	+	+	+	+	-	+		+	+	-	+	+	+	<i>Aeromonas</i>
	3	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	В	В	В	<i>Pseudomonas</i>
Пат. материал	1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>Plesiomonas</i>
	2	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	В	В	В	<i>Pseudomonas</i>
	3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Aeromonas</i>

Примечание – «-» –отрицательный,«+» – положительный, «В» – вариабельный

2.4.2 Фагоидентификация

После 18-20 часового культивирования на среде УГСХА-2 и отбора негативных колоний, в пробирки с 0,7%-ым МПА (остуженный до 46°C) вносили 0,3-0,5 мл 18-20 часовой бульонной культуры исследуемых бактерий. Смесь интенсивно перемещивали и выливали на поверхность 1,5% МПА при этом равномерно распределяя жидкость по поверхности агара. Дно каждой чашки

разделяли на сектора. В первый сектор пастеровской пипеткой наносили индикаторный бактериофаг F-43 УГСХА, во второй сектор наносили стерильный МПБ. Чашки инкубировали в условиях термостата при температуре 37°C в течении 24 часов. Результаты исследования в Таблице 24.

Таблица 24–Фагоидентификационный метод выделенных штаммов

Объект исследования	Вариант	Фагоидентификация	Результат (наличие негативных колоний)	Результат бактериологической идентификации не менее 15 тестов
Вода	1	-	-	<i>Plesiomonas</i>
	2	+	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>
	3	-	-	<i>Pseudomonas</i>
Паг. материал	1	-	-	<i>Plesiomonas</i>
	2	-	-	<i>Pseudomonas</i>
	3	+	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>
Время, затраченное на исследование, суток			2	4

При наличии на газоне роста культуры прозрачных зон лизиса результат исследования положительный, при отсутствии зон лизиса отрицательный.

Таким образом, метод фагоидентификации позволяет значительно сократить сроки исследования, уменьшает расход реактивов, посуды, строго специфичен.

2.5 Разработка оптимальных условий постановки реакции

нарастания титра фага

Технология постановки реакции нарастания титра фага требует определить:

- количественный показатель реакции, обладающий диагностическим значением;
- оптимальное время, гарантирующее полное взаимодействие фага с бактериями.

2.5.1 Определение количественного показателя РНФ

Количественный показатель РНФ – это время взаимодействия исследуемого материала с фагом, обеспечивающим индикацию 10^3 микробных клеток в 1 мл. В работе использовали методические указания, предложенные В.Я. Ганюшкиным (1988); С.Н. Золотухиным (2007); Э.Каттер, (2012).

В ходе работы МПБ контаминировали штаммом *A. hydrophila* №43-УГСХА в концентрации микробных клеток от 10^5 до 10^1 м. кл./мл. Бактериофаг F43-УГСХА применяли в разведении 10^3 корпускул в 1 мл. Индикаторную культуру *A. hydrophila* по 1 мл в концентрации 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 м. к./мл вносили в предварительно приготовленные колбы с 50 мл стерильного МПБ. Каждую колбу тщательно перемешивают в течение 10 минут. Для каждого разведения контроля и культуры приготовили по 3 широкие пробирки. Реакцию проводили по схеме, представленной на Рисунке 15. В ходе разведений, проводимых по схеме, получали:

- пробирка №1 – опытная, содержит 9 мл исследуемого материала из колбы и 1 мл бактериофага;
- пробирка №2 – контроль на присутствие свободного фага, содержит 9 мл из колбы с разведением культуры на 1 мл стерильного МПБ;
- пробирка №3 – контроль титра индикаторного фага, содержит 1 мл бактериофага и 9 мл стерильного МПБ.

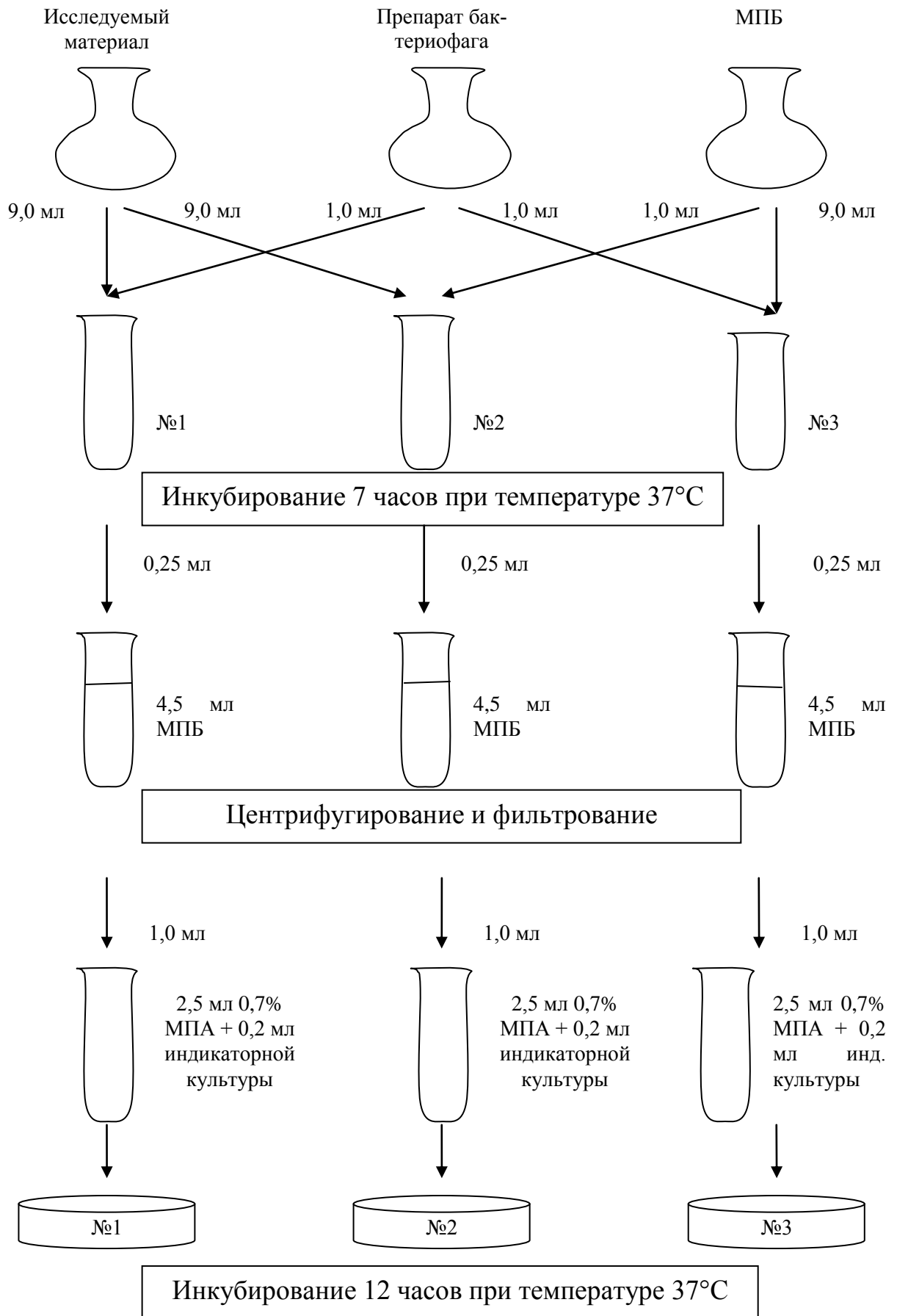


Рисунок 15—Схема индикации бактерий *A. hydrophila* при помощи РНФ
 Одновременно проводим контроль стерильности сред. Пробирки культи-

вируем в термостате в течение 5 часов при температуре 37°C. По окончании инкубирования в пробирки добавляем стерильный МПБ.

Содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinpex» с диаметром пор 0,22 μm GV, для удаления бактерий. Для определения числа корпускул бактериофага F43-УГСХА использовали метод агаровых слоев по Грациа. Учет результатов производили подсчитыванием числа негативных колоний, появившихся на чашках Петри после инкубирования их в термостате при 37°C в течение 12 часов. Для подсчета титра нарастания фага необходимо сравнить число колоний на чашке №1 (опытная) и чашке №3 (контроль титра фага). При лизисе культуры в чашке №2 реакция не учитывается.

Результаты исследований производим согласно показателям, разработанным Д.М. Гольдфарбом, В.Д. Тимаковым, (1962); С.Н. Золотухиным, (2007); (Таблица 25).

Таблица 25–Критерии анализа показателей реакции нарастания титра фага

Возрастание количества корпускул индикаторного бактериофага в соотношении с контролем	Оценка показателя
Возрастание в 2,5 раза	Сомнительная
Возрастание от 3 до 5 раз	Слабоположительная
Возрастание свыше 5 раз	Положительная
Возрастание более чем в 10 раз	Резко положительная

После проведения опыта и оценке результата по Таблице 25, реакция РНФ положительная (Таблица 26).

Таблица 26–Результаты РНФ бактериофага F43-УГСХА

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, шт.			Наращение титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10^1	10	-	8	-	-
10^2	20	-	10	2	-
10^3	98	-	12	более 5	+
10^4	лизис	-	18	более 20	+
10^5	лизис	-	20	более 20	+

РНФ – положительная, так как нарастание корпускул фага F43- УГСХА более чем 5 раз, при контаминации МПБ бактериями *A. hydrophila* в концентрации 10^3 м. к./мл.

2.5.2 Определение оптимального времени РНФ

Оптимальное время РНФ – это время выдержки исследуемого материала с бактериофагом, позволяющее обеспечить индикацию бактерий в концентрации 10^3 м. к./мл.

Для решения технологической задачи по определению более эффективного режима взаимодействия бактериофага F43-УГСХА и бактерий *A. hydrophila* опыты проводились с сохранением других параметров постановки РНФ. Выбор оптимума времени экспозиции делали из следующих параметров:

- предварительное подрачивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C, с последующим, после добавления бактериофага, инкубированием смеси в термостате в течение 5 часов при температуре 37°C;

- увеличение времени экспозиции бактериофага и опытного материала до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37°C.

Метод РНФ с предварительным подрачиванием материала: колбы с 50 мл стерильного МПБ контаминируют бактериями *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл; тщательно перемешивают в течение 10 минут и инкубируют в термостате 5, 16, 24 часа при температуре 37°C. По окончании инкубации проводится РНФ по схеме (Рисунок-15). Для каждой опытной пробы по 3 пробирки:

- №1 – опытная,
- №2 – контроль на свободный фаг,
- №3 – контроль титра индикаторного фага.

Пробирки инкубируются в термостате при температуре 37°C в течение 5 часов. После инкубации смесь из пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV для удаления бактерий, и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 часов в перевернутом виде. Одновременно делали контроль стерильности сред. Результаты представлены в Таблице 27.

Таблица 27–Чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подрачивания опытного материала при дальнейшей 5-часовой экспозицией с бактериофагом F43-УГСХА

Время подрачивания, часов	Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл					Общее время исследований, час
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
5	-	-	+	+	+	22
16	-	+	+	+	+	33

24	-	+	+	+	+	41
----	---	---	---	---	---	----

В ходе опытов установили чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подращивания опытного материала при температуре 37°C в течение 5, 16, 24 часов и последующего инкубирования с бактериофагом F43-УГСХА в течение 5 часов. Инкубация агаровых слоев для подсчитывания негативных колоний 12 часов. В итоге, время, необходимое для проведения опытов с помощью РНФ, составляет 22, 33, 41 час. Бактерии *A. hydrophila* были обнаружены в концентрации 10^3 м. к./мл. Предварительная инкубация в течение 16 часов увеличила чувствительность РНФ до 10^2 м. к./мл. 24-часовая экспозиция подращивания кардинально не влияет на результаты РНФ.

Бактериологический метод потребовал 96 часов и обнаружил бактерии вида *A. hydrophila* в концентрации 10^4 м. к./мл.

Следующим этапом наших исследований стало изучение чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования опытного материала с бактериофагом. Для этого индикаторную культуру бактерии *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл, не инкубируя в термостате, помещали в пробирке и исследовали методом РНФ по схеме на Рисунке 15. На каждую опытную пробу необходимо 3 пробирки:

- пробирка №1 содержит 1,0 мл бактериофага и 9,0 мл опытного материала и является опытной;
- пробирка №2 содержит 9,0 мл опытного материала и 1 мл стерильного МПБ и является контролем на свободный фаг;
- пробирка №3 содержит 1,0 мл бактериофага и 9,0 мл стерильного МПБ и служит контролем титра индикаторного бактериофага.

Пробирки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 5, 7, 10, 16, 24 часов. По завершению инкубации из пробирок отбирали по 0,25 мл опытного материала и помещали в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ. Содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке ва-

куумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки с материалом инкубировали в термостате при 37°C в течение 12 часов. В результате, время, необходимое для осуществления опыта с помощью РНФ, составило 19, 22, 28 и 36 часов соответственно.

Проведенные нами исследования показали, что при инкубировании опытного материала в течение 7 часов бактерии *A. hydrophila* были обнаружены при постановке РНФ в концентрации 10^3 м. к./мл за 19 часов (Таблица 28). Инкубация опытного материала с бактериофагом F43-УГСХА в течение 10 часов также обнаружила бактерии *A. hydrophila* в концентрации 10^3 м. к./мл. Инкубация 16 и 24-часовая увеличили чувствительность реакции до концентрации 10^2 м. к./мл, но и увеличили время, необходимое для постановки РНФ.

Таблица 28—Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования опытного материала с бактериофагом F43-УГСХА без предварительного подрачивания исследуемого материала

Время инкубации, час	Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл					Общее время исследований, час
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
5	-	-	-	-	+	17
7	-	-	+	+	+	19
10	-	-	+	+	+	22
16	-	+	+	+	+	28
24	-	+	+	+	+	36

Полученные данные экспериментов дают нам право считать, что наиболее оптимальным будет режим РНФ при 7-часовой экспозиции опытного материала с бактериофагами без предварительного подращивания ввиду того, что получается провести индикацию бактерий *A. hydrophila* в количестве 10^3 м. к./мл опытного материала и затрачивать 19-24 часа. Этот режим мы и будем использовать в дальнейшей работе.

2.6 Применение РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* в объектах ветеринарно-санитарного надзора

Объекты внешней среды зачастую являются источником инфекции у животных и людей. Поэтому разработка надежных и простых методов индикации бактерий в объектах внешней среды не теряет своей актуальности и в настоящее время, и ей уделяется большое внимание многих исследователей. С целью выявления возможности применения РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* в объектах внешней среды мы исследовали пробы озерной воды, патологического материала из рыб, молоко.

2.6.1 Исследование с помощью РНФ озерной воды, контаминированной бактериями *A. hydrophila*

Пробы озерной воды в объеме 5,0 мл вносили в колбы со стерильным МПБ (50 мл) и контаминировали штаммом *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл. Контроль – колба с озерной водой, не контаминированная бактериями *A. hydrophila*. Постановку РНФ проводили по схеме (Рисунок 15) для всех разведений культуры. На каждую пробу использовали 3 пробирки:

- №1 – опытная,
- №2 – контроль на свободный фаг,
- №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Содержимое каждой колбы по 9,0 мл разливали в пробирки №1 и №2, в пробирке №3 находилось 9,0 мл МПБ. В пробирки №1 и №3 добавляли по 1,0 мл индикаторного бактериофага F43-УГСХА в рабочем разведении; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Все пробирки ставили в термостат и

инкубировали 7 часов, при температуре 37°C. Параллельно делали контроль стерильности. По окончании инкубации 0,25 содержимого пробирок вносили в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ и фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV, фильтрат исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 часов.

Таблица 29–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при исследовании озерной воды, контаминированной бактериями *A. hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10^1	5	-	6	-	-
10^2	20	-	8	2	-
10^3	70	-	10	7	+
10^4	150	-	11	более 20	+
10^5	лизис	-		более 20	+
Контроль	6	-	8	-	-

В результате исследования установили, что увеличение титра бактериофага F43-УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий *A. hydrophila* 10^3 м. к./мл (Таблица 29).

2.6.2 Исследование с помощью РНФ органокомплекса рыб, контаминированного бактериями *A. hydrophila*

Пробы внутренних органов рыб весом 5 г растирали в фарфоровой ступке и помещали в колбы с 50 мл МПБ, контаминировали бактериями *A. hydrophila* в

концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл.

Реакцию проводили по схеме (Рисунок 15). На каждую пробу использовали 3 пробирки:

- пробирка №1 – опытная,
- пробирка №2 – контроль свободного фага,
- пробирка №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Содержимое каждой колбы разливали по 9,0 мл по пробиркам №1 и №2; в пробирку №3 наливали 9,0 мл стерильного МПБ. Бактериофаг в рабочем разведении вносили по 1,0 мл в пробирки №1 и №3; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Пробирки инкубировали в термостате в течение 7 часов, при температуре 37°C. После инкубации 0,25 опытного материала из пробирок добавляли в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ. Для удаления бактерий опытный материал фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV и засеивали по методу агаровых слоев по Грациа. Инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 часов. Результаты опыта в Таблице 30.

Таблица 30–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при изучении патологического материала из рыб, контаминированного бактериями *A. hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10^1	10	-	8	-	-
10^2	18	-	12	-	-
10^3	90	-	15	более 5	+
10^4	лизис	-	10	более 20	+
10^5	лизис	-	14	более 20	+
Контроль	6	-	9	-	-

В ходе исследований установили, что в паренхиматозных органах из рыб,

контаминированных бактериями *A. hydrophila* при помощи реакции РНФ, получили положительный результат при концентрации бактерий в количестве 10^3 м. к./мл, без выделения чистой культуры, в присутствии посторонней микрофлоры.

2.6.3 Исследование при помощи РНФ сырого молока, контаминированного бактериями *A. hydrophila*

Пробы сырого молока в объеме 5 мл добавляли в колбы, содержащие 50 мл стерильного МПБ и контаминировали бактериями *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл, тщательно перемешивали в течение 10 минут. Контролем служила колба с пробой сырого молока без контаминации бактериями *A. hydrophila*.

Реакцию делали по схеме (Рисунок 15), для каждого разведения культуры. На каждую пробу готовили по 3 пробирки:

- пробирка №1 – опытная,
- пробирка №2 – контроль свободного фага,
- пробирка №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Из каждой колбы в пробирки №1 и №2 добавляли по 9,0 мл опытного содержимого; в пробирку №3 добавляли 9,0 мл стерильного МПБ. Индикаторный бактериофаг F43-УГСХА по 1,0 мл добавляли в пробирки №1 и №3; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Одновременно делали контроль сред. Опытные образцы в пробирках помещали в термостат при температуре 37°C на 7 часов. После инкубации 0,25 мл из каждой опытной пробирки добавляли в пробирку с 4,5 мл МПБ, фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор $0,22 \mu\text{m}$ GV, для удаления бактерий и исследовали методом агаровых слоев. Чашки инкубировали в условиях термостата при температуре 37°C в течение 12 - 16 часов.

Увеличение титра фага в 5 и более раз при исследовании сырого молока установлено в образцах, контаминированных бактериями *A. hydrophila* при концентрации 10^3 м. к./мл, результат РНФ положительный. Результаты опыта в

Таблице 31.

Таблица 31–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при изучении сырого молока, контаминированного бактериями *A. hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10^1	6	-	7	-	-
10^2	10	-	10	-	-
10^3	60	-	8	более 5	+
10^4	лизис	-	12	более 20	+
10^5	лизис	-	3	более 20	+
Контроль	4	-	9	-	-

В результате экспериментов по изучению методом РНФ объектов внешней среды (озерная вода, сырое молоко, органокомплекс рыб) при помощи бактериофага F43-УГСХА нами обнаружены бактерии *A. hydrophila* при концентрации 10^3 м. к./мл в указанных объектах, без выделения чистой культуры за 19 - 24 часа. При бактериологическом методе исследования указанных объектов внешней среды затрачивается не менее 4-х суток, и индикация бактерий *A. hydrophila* в случае положительного результата составляет не менее 10^4 м. к./мл.

2.7 Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага

F43- УГСХА.

Секвенирование ДНК бактериофагов

Для получения полногеномных нуклеотидных последовательностей выделенных бактериофагов и подтверждения отсутствия лизогении штамма хозяина использовали метод метагеномного секвенирования вирусов.

Использованный метод включал в себя следующие этапы:

1. очистка фаголизата от бактериальной ДНК;
2. выделение ДНК бактериофага;
3. создание библиотек случайных фрагментов (фрагментация ДНК, выбор фракции фрагментов необходимой длины и лигирование адаптерных последовательностей);
4. клональная амплификация библиотек;
5. непосредственно секвенирование;
6. анализ данных методами биоинформатики. Получение препаратов ДНК бактериофагов

Фаголизаты, содержащие исследуемые бактериофаги в титре не ниже 10^9 БОЕ/мл, пропускали через стерильную фильтрующую шприцевую насадку Millex-GP с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США), после чего обрабатывали ферментом DNase I (NEB, США). Выделение ДНК бактериофагов проводили при помощи набора К-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя.

Подготовка к секвенированию и непосредственно секвенирование.

Нуклеотидные последовательности исследуемых бактериофагов проводили при помощи одного из методов секвенирования второго поколения, а именно полупроводникового секвенирования на платформе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США). Метод полупроводникового секвенирования основан на связи химической и цифровой информации (pN секвенирование). Процесс ос-

нован на детекции протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что можно детектировать и таким образом различать нуклеотиды.

Как и другие методы высокопроизводительного секвенирования (highthroughput sequencing; в англоязычной литературе чаще употребляется термин «next generation sequencing», сокращенно NGS), данный метод позволяет секвенировать несколько образцов ДНК одновременно. Поэтому для секвенирования ДНК, выделенной из каждого фаголизата, готовили баркодированные библиотеки случайных фрагментов. Выделенную ДНК предварительно фрагментировали ультразвуком при помощи прибора Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Бельгия). Библиотеки случайных фрагментов для последующего секвенирования готовили при помощи набора реагентов NEBNext (NEB, США) согласно протоколу производителя с использованием стандартных баркодов Ion Xpress™ Barcode Adaptors Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Все работы по получению ДНК бактериофагов и приготовлению баркодированных библиотек случайных фрагментов проводили с использованием методических подходов, исключающих перекрестную контаминацию образцов. Оценку распределения длин фрагментов библиотек и их концентрацию проводили с использованием прибора Bioanalyzer 2100 и набора реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США) согласно протоколу производителя.

Клональную амплификацию библиотек, которые были предварительно эквимолярно пулированы, проводили с использованием набора Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Непосредственно секвенирование проводили при помощи набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 на чипе Ion PI Chip Kit v2 секвенатора Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей бактериофагов

В ходе биоинформатического анализа проводили фильтрацию качества прочтений. Для сборки фаговых геномов *de novo* использовали риды с качеством прочтения нуклеотидов не ниже Q20 и длиной не менее 50 оснований. Сборку геномов осуществляли с использованием программного обеспечения Newbler (Roche/454 GS-FLX). Сравнение собранных геномов бактериофагов с геномами известных аннотированных бактериофагов проводили при помощи алгоритма blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных нуклеотидных последовательностей NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США). Визуализацию выравнивания собранных нами геномов с известными проводили с использованием программного обеспечения BLAST Ring Image Generator (BRIG).

Поиск открытых рамок считывания проводили при помощи программного обеспечения UGENE (Унипро, Россия). Подтверждение вирулентности или определение потенциально умеренного бактериофага проводили в ходе определения соответственно отсутствия или наличия генов, кодирующих известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи при помощи алгоритма blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Визуализацию аннотированного генома проводили с использованием программного обеспечения BASys version 1.0 (<https://www.basys.ca>).

Следующим этапом работы с изолированным штаммом бактериофага явилась его молекулярно-генетическая характеристика, включающая в себя определение размера фагового генома, процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами, проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и других нежелательных локусов. Изучение данных характеристик позволяет подтвердить оригинальность и вирулентную природу исследуемого бактериофага.

Для получения полноразмерной нуклеотидной последовательности генома бактериофага было использовано полногеномное секвенирование ДНК второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Исследуемый штамм бактериофага был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секве-

нирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. На Рисунке 16 представлено сравнение полученного секвенированного генома с известными ДНК бактериофагов, депонированных в GenBank NCBI для определения кодирующих областей геномов.

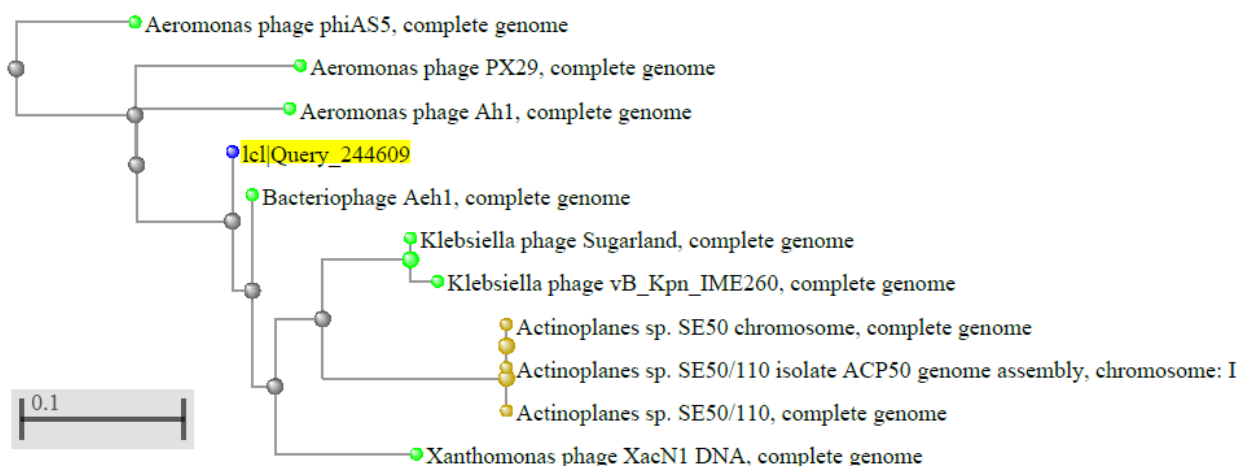
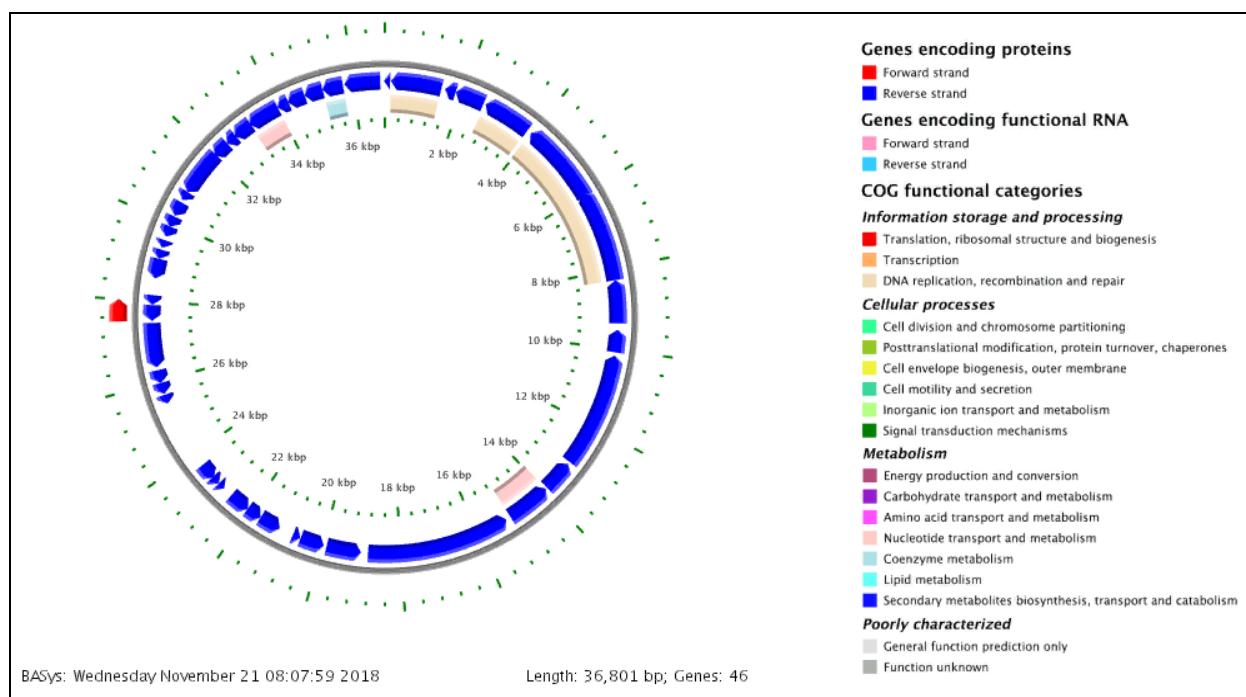


Рисунок 16—Филогенетическое дерево бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА

Наиболее близким по филогенетическому положению является аннотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

В результате проведенных исследований была составлена карта линейных ДНК бактериофага. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, не имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемого бактериального вида. На Рисунке 17-22 и в Таблице 32-33 представлен биоинформационный анализ соответствия

открытых рамок считывания (ORF) с данными секвенирования изучаемого бактериофага.



Рисунок–17 Карта линейной ДНК бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА с расшифровкой кодирующих областей генома

Таблица 32–Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными сиквенирования бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСА

Start	End	Strand	Accession	Gene	COG	rotein Function
1436	153	-	BASYS00001	-	COG0305	Conserved Hypothetical Protein
1807	1535	-	BASYS00002	-	-	Hypothetical Protein BASYS00002
2565	1816	-	BASYS00003	-	-	Hypothetical Protein BASYS00003
3856	2621	-	BASYS00004	recA [H]	COG0468	Protein RecA [H]
6058	3965	-	BASYS00005	polB [C]	COG0417	DNA Polymerase B Region
8273	5955	-	BASYS00006	sbcC [C]	COG0419	Hypothetical Protein sbcC
9349	8273	-	BASYS00007	-	-	Hypothetical Protein BASYS00007
10070	9507	-	BASYS00008	-	-	Hypothetical Protein BASYS00008
13046	10152	-	BASYS00009	-	-	Hypothetical Protein BASYS00009
13901	13110	-	BASYS00010	-	-	Hypothetical Protein BASYS00010
15072	13942	-	BASYS00011	nrdB [H]	COG0208	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta [H]
18827	15192	-	BASYS00012	-	-	Hypothetical Protein BASYS00012
19883	19002	-	BASYS00013	-	-	ADP-Ribosylglycohydrolase
20570	19953	-	BASYS00014	-	-	Hypothetical Protein BASYS00014
20777	20580	-	BASYS00015	-	-	Hypothetical Protein BASYS00015
21695	21147	-	BASYS00016	-	-	Hypothetical Protein BASYS00016
22085	21699	-	BASYS00017	-	-	Hypothetical Protein BASYS00017
22618	22082	-	BASYS00018	-	-	Hypothetical Protein BASYS00018
23046	22867	-	BASYS00019	-	-	Hypothetical Protein BASYS00019
23263	23054	-	BASYS00020	-	-	Hypothetical Protein BASYS00020
23660	23238	-	BASYS00021	-	-	Hypothetical Protein BASYS00021
25649	25425	-	BASYS00022	-	-	Hypothetical Protein BASYS00022
25962	25675	-	BASYS00023	-	-	Hypothetical Protein BASYS00023
26285	25959	-	BASYS00024	-	-	Hypothetical Protein BASYS00024
27464	26361	-	BASYS00025	-	-	Hypothetical Protein BASYS00025
27906	27517	-	BASYS00026	-	-	Hypothetical Protein BASYS00026
27514	28002	+	BASYS00027	-	-	Hypothetical Protein BASYS00027
28152	27916	-	BASYS00028	-	-	Hypothetical Protein BASYS00028
29067	28573	-	BASYS00029	-	-	Hypothetical Protein BASYS00029

29300	29067	-	<u>BASYS00030</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00030
29552	29355	-	<u>BASYS00031</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00031
29916	29650	-	<u>BASYS00032</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00032
30185	29910	-	<u>BASYS00033</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00033
30577	30212	-	<u>BASYS00034</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00034
30876	30643	-	<u>BASYS00035</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00035
32045	30876	-	<u>BASYS00036</u>	-	-	RNA Ligase
32445	32008	-	<u>BASYS00037</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00037
32726	32442	-	<u>BASYS00038</u>	-	-	Hypothetical Protein ESA
33204	32701	-	<u>BASYS00039</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00039
34001	33168	-	<u>BASYS00040</u>	thyA [H]	COG0207	Thymidylate synthase [H]
34297	33998	-	<u>BASYS00041</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00041
34737	34288	-	<u>BASYS00042</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00042
35210	34737	-	<u>BASYS00043</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00043
35734	35207	-	<u>BASYS00044</u>	-	COG0262	Hypothetical Protein BASYS00044
36684	35776	-	<u>BASYS00045</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00045
119	36791	-	<u>BASYS00046</u>	-	-	Hypothetical Protein BASYS00046

Таблица 33– Биоинформационный анализ основных свойств потенциальных протеинов бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСА

Accession	Protein Function	Molecular Weight [Daltons]	Theoretical pI
<u>BASYS00046</u>	Hypothetical Protein BASYS00046	4644	9,08
<u>BASYS00019</u>	Hypothetical Protein BASYS00019	6710	4,58
<u>BASYS00031</u>	Hypothetical Protein BASYS00031	7238	11,07
<u>BASYS00015</u>	Hypothetical Protein BASYS00015	7580	10,05
<u>BASYS00020</u>	Hypothetical Protein BASYS00020	7931	4,23
<u>BASYS00022</u>	Hypothetical Protein BASYS00022	8452	6,51
<u>BASYS00030</u>	Hypothetical Protein BASYS00030	8600	4,14
<u>BASYS00028</u>	Hypothetical Protein BASYS00028	8628	4,63
<u>BASYS00035</u>	Hypothetical Protein BASYS00035	8777	5,02
<u>BASYS00032</u>	Hypothetical Protein BASYS00032	10179	8,91
<u>BASYS00033</u>	Hypothetical Protein BASYS00033	10349	4,64
<u>BASYS00002</u>	Hypothetical Protein BASYS00002	10391	5,51
<u>BASYS00023</u>	Hypothetical Protein BASYS00023	10683	8,97
<u>BASYS00038</u>	Hypothetical Protein ESA	10747	8,35

<u>BASYS00041</u>	Hypothetical Protein BASYS00041	11257	4,21
<u>BASYS00024</u>	Hypothetical Protein BASYS00024	12520	4,13
<u>BASYS00034</u>	Hypothetical Protein BASYS00034	13493	8,75
<u>BASYS00026</u>	Hypothetical Protein BASYS00026	14324	7,6
<u>BASYS00017</u>	Hypothetical Protein BASYS00017	15121	5,77
<u>BASYS00021</u>	Hypothetical Protein BASYS00021	16011	4,74
<u>BASYS00042</u>	Hypothetical Protein BASYS00042	16942	7,8
<u>BASYS00037</u>	Hypothetical Protein BASYS00037	16957	10,19
<u>BASYS00043</u>	Hypothetical Protein BASYS00043	18087	6,26
<u>BASYS00027</u>	Hypothetical Protein BASYS00027	18706	4,85
<u>BASYS00029</u>	Hypothetical Protein BASYS00029	19069	8,2
<u>BASYS00039</u>	Hypothetical Protein BASYS00039	19400	6,36
<u>BASYS00044</u>	Hypothetical Protein BASYS00044	19638	6,26
<u>BASYS00018</u>	Hypothetical Protein BASYS00018	20327	5,99
<u>BASYS00016</u>	Hypothetical Protein BASYS00016	20344	6,29
<u>BASYS00008</u>	Hypothetical Protein BASYS00008	21772	8,17
<u>BASYS00014</u>	Hypothetical Protein BASYS00014	23326	7,65
<u>BASYS00010</u>	Hypothetical Protein BASYS00010	27156	6,51
<u>BASYS00003</u>	Hypothetical Protein BASYS00003	29721	9,45
<u>BASYS00040</u>	Thymidylate synthase [H]	31538	6,51
<u>BASYS00013</u>	ADP-Ribosylglycohydrolase	33302	6,78
<u>BASYS00045</u>	Hypothetical Protein BASYS00045	34056	4,66
<u>BASYS00007</u>	Hypothetical Protein BASYS00007	41316	4,72
<u>BASYS00025</u>	Hypothetical Protein BASYS00025	42405	4,94
<u>BASYS00011</u>	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta [H]	43168	4,78
<u>BASYS00036</u>	RNA Ligase	45731	4,88
<u>BASYS00004</u>	Protein RecA [H]	45764	4,62
<u>BASYS00001</u>	Conserved Hypothetical Protein	47330	5,23
<u>BASYS00005</u>	DNA Polymerase B Region	80408	7,58
<u>BASYS00006</u>	Hypothetical Protein sbcC	88223	4,97
<u>BASYS00009</u>	Hypothetical Protein BASYS00009	105198	5,14
<u>BASYS00012</u>	Hypothetical Protein BASYS00012	137637	6,08

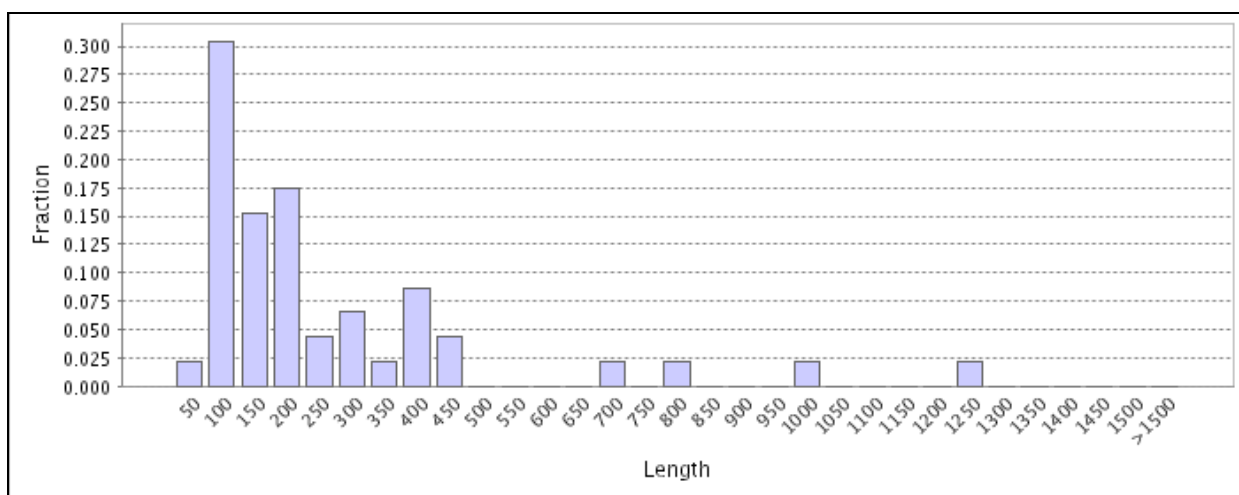


Рисунок 18—Распределение белков бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА по длине аминокислотного остова

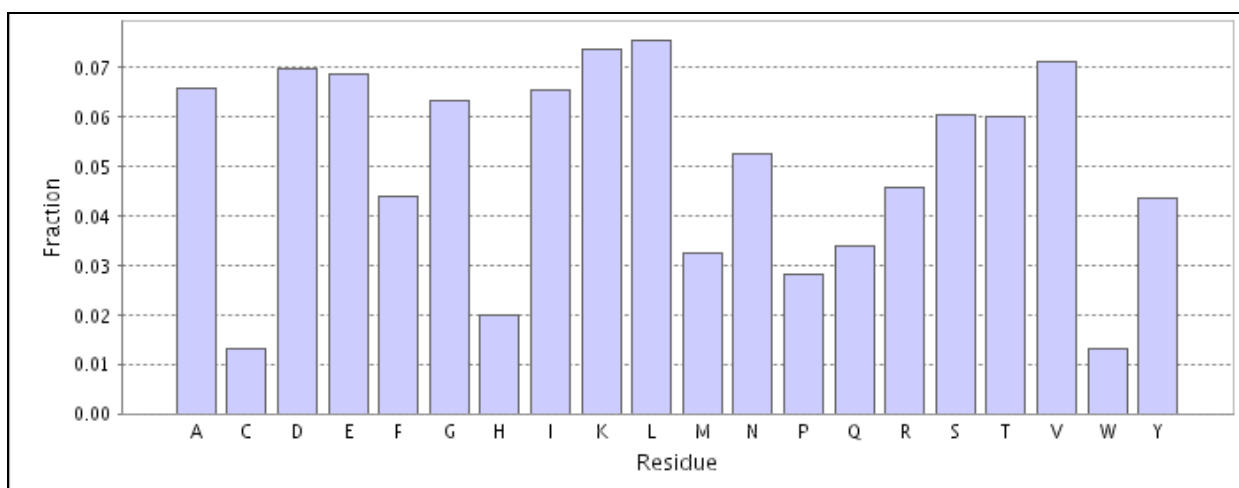


Рисунок 19—Распределение белков бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА по количественному составу аминокислот

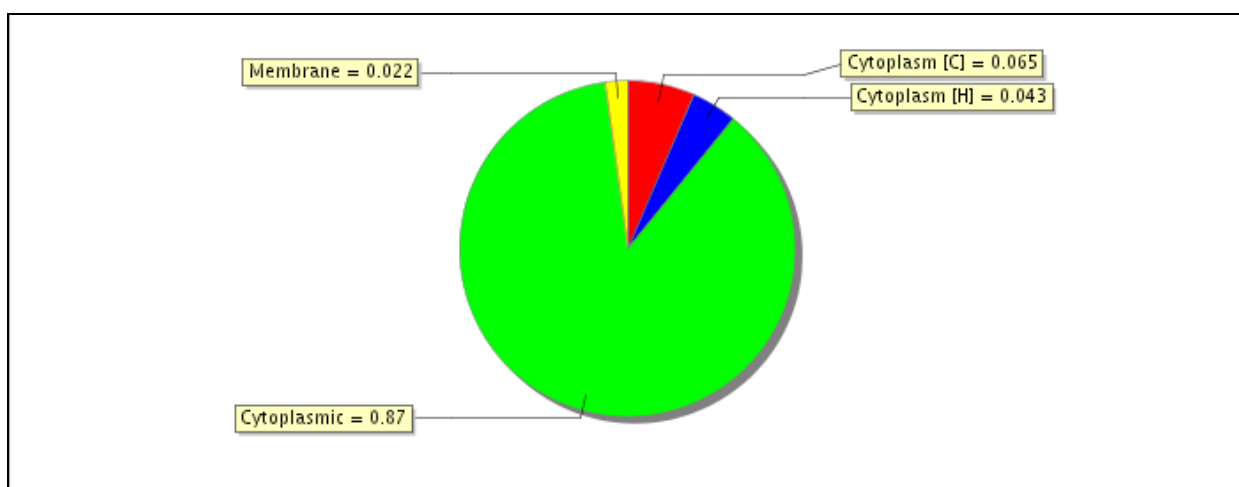
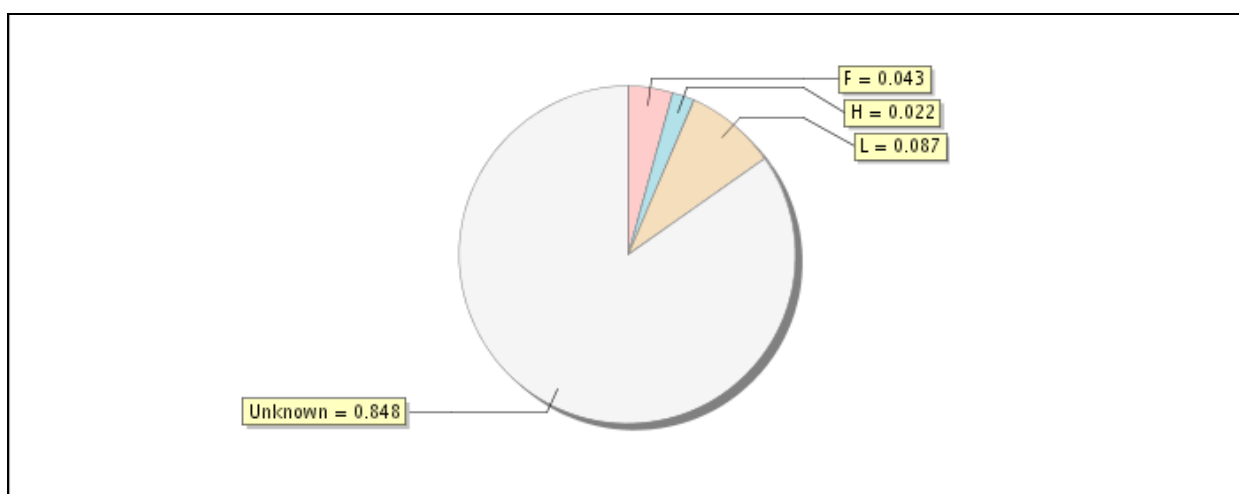


Рисунок 20—Распределение белков бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА по локализации



Letters refer to COG functional categories. F - Nucleotide transport and metabolism; H - Coenzyme metabolism; L - DNA replication, recombination and repair.

Рисунок 21—Распределение белков бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА по функциональному значению

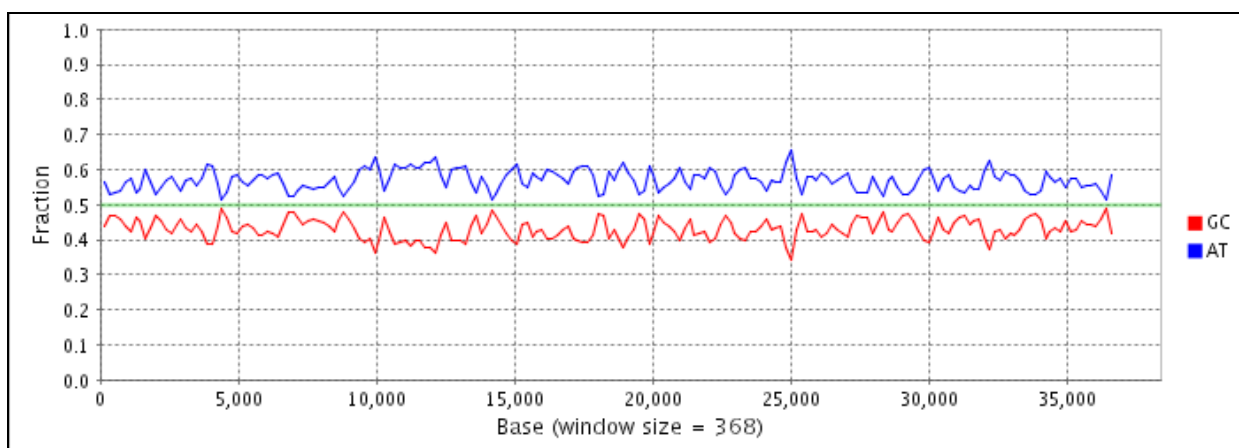


Рисунок 22—Распределение генома бактериофага *Aeromonas hydrophila* F43-УГСХА по нуклеотидному составу

В результате проведенного исследования фрагментов генома являющихся локусами патогенности не выявлено. Наиболее близким по филогенетическому положению большинства потенциальных фаговых белков также является аннотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*. Наиболее близким по филогенетическому положению является ан-

нотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

В результате проведенных исследований была составлена карта линейных ДНК бактериофага. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, не имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемого бактериального вида. На Рисунке 17-22 и в Таблице 32-33 представлен биоинформационный анализ соответствия открытых рамок считывания (ORF) с данными секвенирования изучаемого бактериофага.

Для целей быстрого выявления локусов патогенности в геномах выделяемых бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, а также при невозможности проведения их сиквенсовых исследований в данной работе предложен метод их индикации с помощью ПЦР.

На первом этапе в библиотеке баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) была определена уникальность гена-кандидата *hly*, кодирующего гемолизин (аэролизин) *Aeromonas hydrophila*.

После анализа в библиотеках баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) нуклеотидных последовательностей всех вышеуказанных генов, они были просканированы системой Blast базы данных GeneBank (США) на предмет совпадения с последовательностями ДНК известных микроорганизмов. Установлено, что данные генетические последо-

вательности являются уникальными для *Aeromonas hydrophila* и не имеют совпадений с другими видами микроорганизмов.

После выбора специфичного гена-кандидата для молекулярно-генетической идентификации «островка патогенности», носителем которого могут быть бактериофаги, активные в отношении *Aeromonas hydrophila*, были определены наиболее консервативные участки выбранных мишеней, путем их сравнения у различных штаммов *Aeromonas hydrophila* в базе данных GeneBank. На эти консервативные участки приложением Primer BLAST этой базы данных в режиме on-line были положены праймеры, отвечающие некоторым условиям, определенным нами: длина праймеров должна составлять 18–24 пары нуклеотидов, температура плавления праймера должна быть 60–70°C, размер фланкируемого праймерами участка гена должна составлять не менее 100 и не более 1000 п.о.

После определения праймеров, они были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно. В окончанном варианте праймеры, теоретическая специфичность и фрагменты амплифицируемых участков представлены на Рисунке 23 и в Таблице 34.

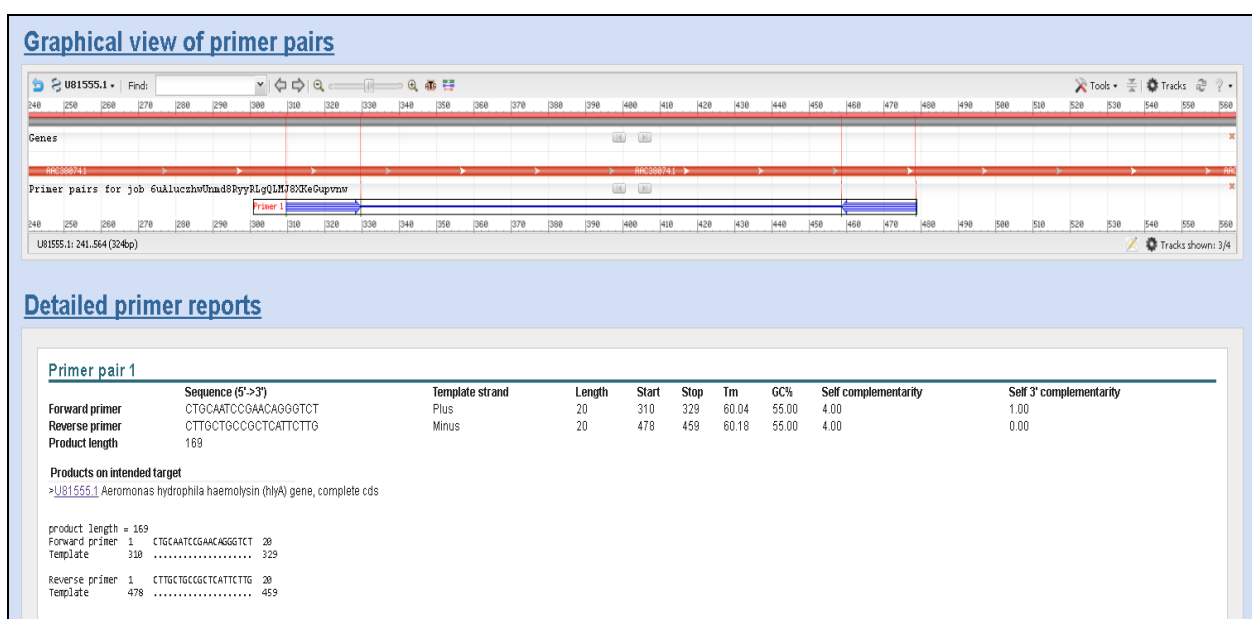


Рисунок 23 – Варианты праймерных систем для амплификации гена *hly* генома фагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

Таблица 34 – Характеристика праймеров к участкам гена *hly* генома фагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

Параметр	Характеристика
<i>участок гена hly</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	CTGCAATCCGAACAGGGTCT
Обратный праймер (r) 5'-3'	CTTGCTGCCGCTCATTTCTTG
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	60,0°C
Теоретическая специфичность	<i>Aeromonas hydrophila hemolysin gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	169

Для оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях со штаммами *Aeromonas hydrophila*, выделенными из клинических образцов был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *hly* культур *Aeromonas hydrophila* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на Рисунке 24.

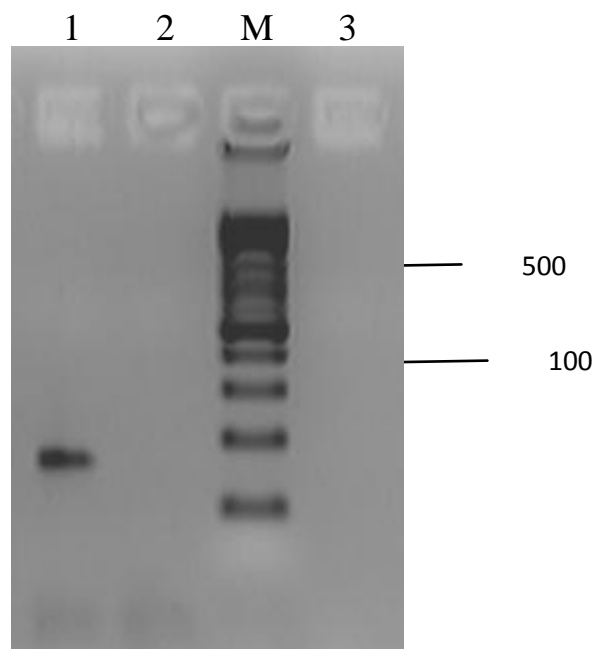


Рисунок 24 – Индикация фрагмента гена *hly* культур *Aeromonas hydrophila*.

М – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3 – ДНК бактериофага *A.h. F 43-УГСХА*, специфичного в отношении *Aeromonas hydrophila*

В результате проведенных экспериментов разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии *A. hydrophila* широко распространены в окружающей среде (Hazen T.C. 1978, Janda J.M., et al., 1998; Khardori N., et al., 1988). Наиболее часто они выделяются из открытых водоемов (Khardori N., et al., 1988; Holmes P. L., 1996), сточных вод (Edberg S.C., 2007), гидробионтов (Khardori N., et al., 1988, Janda J.M., et al., 1998; Щедрина Н.А., 2004), пищевых продуктов (Garcia F., 2009, Palumbo S.A., 1996). Исследования последних лет подтверждают, что бактерии *A. hydrophila* служат источником инфекции для человека, животных и гидробионтов (Петровская В.Г., 1967, Shumann Н. 1988, Nishikawa Y., 1991, Singh D.V. 1992, Zhang, Y.L. 2000; von Graevenitz A., 2007), также они являются потенциальным источником порчи продуктов (Калина Г.П., 1982; Бухарин О.В., 2000). Данный микроорганизм обладает способностью активно размножаться в системах очистки сточных вод, трубопроводах, резервуарах хранения воды, распределителях и внутридомовой сети, вызывая тем самым органолептическую порчу воды (Ali A., 1996; Holmes P.L., 1996; Joseph S.W., et al., 1994). Нерациональное применение антибиотиков в пищевой промышленности, рыболовстве, лечении животных и людей приводят к появлению антибиотикорезистентных штаммов многих микроорганизмов, в том числе и аэромонад (Overman T.L., 1980; Motyl M.R., 1985; Robinson J., 1986). За последние 25-30 лет бактерии рода *Aeromonas* в результате многочисленных исследований были выделены в отдельную таксономическую группу, сам род был значительно расширен за счет открытия новых видов (Colwell R., 1986; Bergey's Manual, 2005; Joseph S.W., et al., 1994). Выделение и идентификация по существующим схемам становится все более затруднительной, а применение иммунологических и генетических методов связано с их сложностью и высокой стоимостью (Исхакова Х.И., 1979; Голубева И.В., 1985; Графова Т.И., 1985; Сидоров М.А., 1995; Блинов А.И., 1997; Покровский В.И., 2001; Abbott S.L., 2003; Janda, J.M., et al., 2007). В России целенаправленного поиска бактерий рода *Aeromonas* не проводят ни в медицине, ни в ветеринарии, из-за отсутствия нормативных документов и недостаточно эффективных существующих методических схем по

выделению данного микроорганизма. Поэтому задача по выделению и идентификации бактерий рода *Aeromonas* из объектов окружающей среды и пищевых продуктов является актуальной (Калина Г.П., 1977,1982,1984; Канаева Т.И., 2009). Ключевой целью нашей работы явилось выделение бактериофагов бактерий *A. hydrophila*, изучение их основных биологических свойств и разработка на их основе биопрепарата для ускоренной индикации данного микроорганизма в объектах окружающей среды, пищевых продуктов, патологическом материале с применением реакции нарастания титра фага. РНФ для лабораторной диагностики инфекционных болезней с успехом применяют многие исследователи в последние 50 - 60 лет (Рубашкина Б.К., 1959; Ревенко И.П., 1978; Ганюшкин В.Я., 1988; Бакулов И.А., 1998; Золотухин С.Н., 2007).

Первым этапом нашей работы было выделение бактериофагов из объектов окружающей среды. Ввиду того, что бактерии *A. hydrophila* имеют большое распространение в водной среде, для выделения их бактериофагов было решено использовать пробы воды из озер и рек Ульяновской области. Было исследовано более 130 проб воды и выделено 5 изолятов бактериофагов бактерий *A. hydrophila*.

Одним из ключевых этапов создания биопрепарата для индикации и идентификации микроорганизмов является изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов. Поэтому мы изучили такие свойства выделенных бактериофагов как:

- 1) морфология негативных колоний;
- 2) литическая активность выделенных фагов;
- 3) специфичность действия;
- 4) диапазон литической активности;
- 5) устойчивость к воздействию температурного фактора;
- 6) Устойчивость к трихлорметану.

Колонии, образуемые выделенными бактериофагами, были округлой формы, имели ровные края, их диаметр варьировал от 0,1 до 3 мм, они были прозрачные, с зоной лизиса и без вторичного роста.

Литическая активность выделенных бактериофагов по Аппельману составляла от 10^{-5} до 10^{-8} , по Грациа от $0,58 \times 10^6 (\pm 0,1) \times 10^6$ до $2,5 (\pm 0,2) \times 10^8$ БОЕ в 1 мл среды.

Диапазон лизиса изучаемых бактериофагов при их воздействии на все имеющиеся у нас бактерии *A. hydrophila* находился в границах от 13,3 до 86,7%.

Видовая специфичность выделенных бактериофагов изучалась на гетерологичных штаммах бактерий, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина». Были использованы бактерии следующих родов: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*. Опыты показали, что изучаемые фаги не лизировали данные микроорганизмы и были специфичными по отношению к бактериям *A. hydrophila*.

Все выделенные нами бактериофаги проявили восприимчивость к воздействию температурного фактора. Температура выше 55°C существенно снижает их активность, а температура больше 57°C полностью прекращает их активность.

Серия опытов по изучению воздействия трихлорметана на выделенные бактериофаги в течение 15 – 45 минут в концентрации 1:10 продемонстрировала их неустойчивость к воздействию этого химического вещества. Инактивация бактерий *A. hydrophila* в тех же параметрах происходила тоже полностью.

После анализа проведенных исследований по изучению основных биологических свойств выделенных бактериофагов, для приготовления индикаторного биопрепарата, мы отобрали фаг F43-УГСХА. Для производства биопрепарата на основе бактериофага F43-УГСХА мы разработали наиболее оптимальные технологические параметры: пропорция корпускул фага и бактериальных клеток бактерий *A. hydrophila* 1:2, длительность инкубации при температуре 37°C – 8 часов, инактивацию фаголизатов проводили методом мембранной фильтрации на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» или шприц - насадки типа «Swinnex» с диаметром пор $0,22 \mu\text{m GV}$.

Нами предложена схема ускоренной индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila* с применением бактериофага F43-УГСХА. Применение этой схемы снижает затраты сред, реактивов, посуды и времени. На сегодняшний день результативность РНФ подтверждается работами многих исследователей, ведутся активные поиски индикаторных бактериофагов (Понявин Б.Я., 1960; Ганюшкин В.Я., 1984; Молофеева Н.И., 2004; Пульчеровская Л.П., 2004; Коритняк Б.М., 2005; Феоктистова Н.А., 2006; Пожарникова Е.Н., 2006; Булькинова Е.А., 2006; Золотухин С.Н., 2007; Ковалева Е.Н., 2009; Катмакова Н.П., 2010; Шестаков А.Г., 2010; Викторов Д.А., 2011; Семанина Е.Н., 2012; Барт Н.Г., 2012).

Экспериментально был установлен количественный показатель РНФ бактериофага F43-УГСХА— 10^3 м. к./мл.

Временной показатель эффективного взаимодействия бактериофага F43-УГСХА и индикаторного штамма производили из следующих технологических параметров:

- предварительное подращивание опытного материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C , с последующим, после внесения бактериофагов инкубированием смеси при температуре 37°C в течение 5 часов;

- увеличение времени взаимодействия бактериофага и опытного материала до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37°C .

Предварительное подращивание опытного материала в течение 5 часов по данным наших экспериментов позволяет обнаружить бактерии *A. hydrophila* в концентрации 10^3 м. к./мл. 16-часовая предварительная инкубация позволяет обнаружить бактерии *A. hydrophila* в концентрации 10^2 м. к./мл.

При взаимодействии бактериофага F43-УГСХА и индикаторной культуры в течение 7 часов без предварительного подращивания, бактерии *A. hydrophila* были обнаружены в концентрации 10^3 м. к./мл.

При предварительном подращивании опытного материала на РНФ затрачивается 22 - 28 часов, без него—19-22 часа. Таким образом, оптимальным будет режим РНФ 7-часового воздействия бактериофага и опытного материала

без предварительного подращивания. В своей работе мы провели серию опытов по использованию РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* в объектах окружающей среды, без выделения бактерий в чистом виде. При исследовании молока, воды из открытых водоемов и патологического материала рыб обнаружили бактерии *A. hydrophila* в концентрациях 10^3 м. к./мл за 19–22 часа. В результате наших исследований разработан фаговый биопрепарат F43-УГСХА для индикации и идентификации бактерий *A. hydrophila*.

ВЫВОДЫ

1. Выделены и идентифицированы по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам 14 штаммов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

2. Выделено 5 изолятов бактериофагов активных в отношении *Aeromonas hydrophila*. Изучены их основные биологические свойства: они образуют однородные негативные колонии с ровными краями, диаметром от 0,1 до 2,0 мм; литическая активность бактериофагов варьировала в диапазоне: по методу Аппельмана от 10^{-5} до 10^{-8} , по методу Грациа от $0,58 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^8$; спектр литической активности бактериофагов составил от 13,3 до 86,7%; все выделенные изоляты бактериофагов строго специфичны по отношению к *Aeromonas hydrophila* и не лизируют бактерии других видов и родов.

3. Отобран бактериофаг F43-УГСХА, имеющий наиболее оптимальные характеристики для создания биопрепарата (литическая активность по Аппельману – 10^{-8} , по Грациа $2,5 \times 10^8$; спектр литической активности 86,7%, строго специфичен для *Aeromonas hydrophila*). Установлены оптимальные технологические параметры изготовления специфического биопрепарата бактериофага F43-УГСХА: время инкубирования бактериофага F43-УГСХА в термостате при 37°C – 8 часов; соотношение количества бактериофага к количеству бактериальных клеток *Aeromonas hydrophila* 1:2.

4. Хранение готового биопрепарата бактериофага F43-УГСХА бактерий *Aeromonas hydrophila* в герметичных флаконах в объеме 5 мл до 2,5 лет при температуре $4 - 6^{\circ}\text{C}$ показало отсутствие снижения показателей его активности.

5. Определены параметры постановки РНФ с применением биопрепарата на основе бактериофага F43-УГСХА для ускоренной индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* позволяющие обнаружить в опытном материале названные микроорганизмы в концентрации от 10^3 м. к./мл за 19 – 24 часа. Разработана схема идентификации *Aeromonas hydrophila* с помощью сконструированного биопрепарата позволяющая идентифицировать данную бактерию за 36-38 часа.

6. Полногеномным секвенированием бактериофага установлено, что размер исследуемого бактериофагового генома составляет – 36801 п.н., потенциальных

локусов патогенности не выявлено.

7. Методом биоинформационного (протеомного) анализа секвенирования бактериофага F43-УГСХА выявлено 46 потенциальных белков с молекулярной массой 4,6-137,6 кДа, имеющих свое место локализации в фаговом геноме.

8. Определено филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI - наиболее близким по филогенетическому положению полного генома и большинства потенциальных фаговых белков является аннотированный бактериофаг F43-УГСХА, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

9. Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) - *hly* в геномах бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. По результатам диссертационной работы предложен штамм бактериофага F43-УГСХА, данный фаг обладает высокой литической активностью, широким диапазоном литической активности, строгой видовой специфичностью.

2. Индикацию *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора предлагаем проводить с помощью биопрепарата бактериофага F43-УГСХА, согласно «Методическим рекомендациям по ускоренной индикации методом РНФ *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора».

3. Для фагоидентификации *Aeromonas hydrophila* с помощью биопрепарата на основе бактериофага F43-УГСХА рекомендовано использовать «Методические рекомендации по выделению и идентификации *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарного надзора с применением диагностического бактериофага F43-УГСХА».

4. Контроль и изготовление диагностического бактериофага F43-УГСХА проводить согласно «Инструкции по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофага F43-УГСХА».

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В дальнейшем перспектива исследований будет направлена на конструирование диагностических биопрепаратов, в том числе с другими представителями бактерий рода *Aeromonas*, организацию производства и широкое применение данных бактериофаговых препаратов для диагностики заболеваний, терапии и биопроцессинга.

Список условных сокращений

- БОЕ** – бляшкообразующие единицы
- ВАК** – Высшая Аттестационная Комиссия
- ВСЭ** – ветеринарно-санитарная экспертиза
- КОЕ** – колониеобразующие единицы
- м.к./мл** – количество микробных клеток в 1 мл
- м.к./г** – количество микробных клеток в 1 грамме
- МПА** – мясопептонный агар
- МПБ** – мясопептонный бульон
- НПО** – научно-производственное объединение
- ОКИ** – острая кишечная инфекция
- О/Ф** – окисление/ферментация
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- РНФ** – реакция нарастания титра фага
- ТХУ** – трихлоруксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврех, В.В. О применении бактериофагов в диагностике сальмонеллезов / В.В. Аврех // ЖМЭИ. – 1954. – № 7. – С. 93-96.
2. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс // Москва: Медгиз, 1961. – 521 с.
3. Адельсон, Л.И. Современное состояние проблемы теории бактериофага и его практическое применение / Л.И. Адельсон, В.Д. Гуторова, Г.Г. Ключарева // Тезисы докладов юбилейной научной сессии Ленинградского сан-гиг. мед. ун-та. – Ленинград, 1958. – С. 34.
4. Андрусенко, И.Т. Поиск новых методов лечения холеры / И.Т. Андрусенко, И.Д. Бардых, Л.С. Подосинникова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2007. – №5. – С. 49-52.
5. Арский, В.Г. Применение реакции нарастания титра фага для диагностики хронической дизентерии / В.Г. Арский, З.З. Ахметов, А.В. Ясенский // Здравеохранение Таджикистана. – 1961. – № 2. – С. 5-11.
6. Архангельский, И.И. Фаготипирование патогенных стафилококков, выделенных из молока коров / И.И. Архангельский, Б.А. Степанов // Ветеринария. – 1966. – №3. – С. 27.
7. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // Ленинград: Медицина, 1962.–145 с.
8. Байгулина, Ф.А. Способы выделения бактериофагов: патент 2109055 / Ф.А. Байгулина, А.Г.Исрафилов, Н.Л.Киняпина // Вирусология. – 1998. – №12. – С. 115.
9. Байрак, В.А. Тесты патогенности и фаготипы стафилококков, выделенных при мастите коров: Автореферат дис... канд. биол. наук: 16.00.03 / В.А. Байрак.– Москва, 1970.–19 с.
10. Бакулов, И.А. Практическое применение листериозных фагов: уч. пособие / И.А. Бакулов [и др.] // Ульяновск, 1998. – 66 с.

11. Бакулов, И.А. Обнаружение возбудителя листериоза в объектах внешней среды / И.А. Бакулов, Т.И. Кольпикова, В.М. Котляров, // Ветеринария. – 1980. – №12. – С. 61-62.
12. Бакулов, И.А. О специфичности листериозных бактериофагов / И.А. Бакулов, Т.И. Колпикова, А.И. Капырина // Ветеринария. – 1990. – №7. – С. 26-27.
13. Бейли, Н. Математика в биологии и медицине / Н. Бейли. – Москва: Мир. 1970. – 326 с.
14. Белова, Т.Н. Применение поливалентного сальмонеллезного бактериофага групп АВСДЕ для профилактики сальмонеллеза в лечебных учреждениях / Т.Н. Белова, Н.И. Адуев, А.Б. Тебекин [и др.]// Острые кишечные инфекции. Республиканский сборник. – Медицина, 1982. – С. 69-70.
15. Беркли, Р., Определитель бактерий Берджи / Под редакцией Дж. Холта, [и др.] // Москва: Мир, 1997 – 432 с.
16. Блинов, А.И. Аэромонады: выделение, идентификация и дифференциация / А.И. Блинов, Н.А. Глушанова // Учебно-методические рекомендации. – Новокузнецк. – 1997.
17. Бульканова, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.03 / Бульканова Елена Анатольевна // Саратов, 2006. – 20 с.
18. Бухарин, О.В. Факторы персистенции и патогенности вибрионов и аэромонад различной экотопической принадлежности / О.В. Бухарин, А.В. Бойко, Л.А. Журавлева // Микробиология. – 1998. – №5. – С. 30-33.
19. Бухарин, О.В. Экологическая детерминированность внутривидового разнообразия патогенных бактерий / О.В. Бухарин, В.А. Гриценко // Микробиология. – 2000. – № 1. – С. 103-106.
20. Быкова, З.И. Некоторые свойства чумных фагов / З.И. Быкова // Труды Армянской противочумной станции. – 1964. – №3. – С. 171-175.

21. Васильев, Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Ульяновск, 2004. – 151 с.
22. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.03 / Викторов Денис Александрович // Саратов, 2011. – 22 с.
23. Висконти, Р. Генетика бактериофага / Р. Висконти В кн.: Онтогенез вирусов // Москва: Медицина, 1956. – 141 с.
24. Воронцова, А.В. Применение метода реакции нарастания титра фага при эпидемиологическом и санитарном обследовании / А.В. Воронцова // Тез. докл. на межинстит. конф. по проблеме «Кишечные инфекции». – Медицина.-1961. – С. 127-128.
25. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск: Высшая школа, 1973. – С. 5-24.
26. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск, 1988. – 45 с.
27. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги *Salmonella choleraesuis*, сравнительная характеристика и практическое применение: Автореф. дис. ... докт. вет. наук: 06.02.02 / Ганюшкин В.Я.-Ульяновск, 1984. – 84 с.
28. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии / Ф.Герхардт. // Москва: Мир, 1984. – 378 с.
29. Голубева, И.В. Энтеробактерии / И.В. Голубева. // Москва: Медицина, 1985. – 298 с.
30. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб; под ред. и с предисл. проф. В.Д. Тимакова. // Москва: Медгиз, 1961. – 299 с.
31. Графова, Т.И. К методике выделения аэромонад от людей с кишечным синдромом /Т.И. Графова/ Методы индикации бактерий и вирусов в объектах окружающей среды // Сборник научных трудов–Москва, 1982. – С. 56-58.
32. Графова, Т.И. Методы индикации биоценоза патогенных и потенциально патогенных микроорганизмов / Т.И. Графова // Сборник научных трудов. – Москва, 1985. – С. 120-123.

33. Грищенко, Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства. / Л.И. Грищенко, М.Ш. Акбаев, Г.В. Васильков // Москва: Колос, 1999. — 448 с.

34. Давиденко, Т.А. Фаготипирование *S. typhimurium*, выделенных в Киеве в 1966 – 1970 г.г / Т.А. Давиденко, А.М. Зарицкий // В книге: Кишечные инфекции. – Киев, 1972. – В. 5. – С. 41.

35. Домарадский, И.В. Методика быстрого обнаружения чумного микроба при помощи бактериофага / И.В. Домарадский, О.Н. Мосолова, Л.К. Денисенко // Иркутск. – 1957. – С. 44-51.

36. Земцова, И.Н. Применение реакции нарастания титра специфического бактериофага для индикации спор сибиреязвенных бактерий в почве / И.Н. Земцова // Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций: сб. научн. работ противочумных учрежд. – Саратов, 1965. – С. 171.

37. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *M. morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят: Автореферат дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Золотухин Сергей Николаевич – Ульяновск, 1994. – 23с.

38. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин // Ульяновск. – 2004. – С. 64-75.

39. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов, на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.03 / Золотухин Сергей НиколаевичС // Ульяновск, 2007. – 39 с.

40. Ивашура, А.И. Патогенные бактерии в молоке здоровых и больных маститом коров и методы их индикации: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.03 / Ивашура А.И. // Москва, 1967. – 20 с.

41. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб. – Утверждена Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ от 17 августа 1998 г. № 13-4-2/1366.

42. Исхакова, Х.И. Неферментирующие грамотрицательные бактерии и их дифференциация от *Pseudomonas aeruginosa* / Х.И. Исхакова // Микробиология. – 1979. - № 6. – С. 11.

43. Калина, Г.П. Аэромонады: методы обнаружения, количественного учета и идентификации / Г.П. Калина // Сборник научных трудов НИИ Гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана.– Москва, 1977.- С. 91-103.

44. Калина, Г.П. Условно-патогенные микроорганизмы / Г.П. Калина // Микробиология. – 1984. – № 10. – С. 30-35.

45. Калина, Г.П. Условно-патогенные микроорганизмы – возбудители пищевых токсикоинфекций и острых кишечных заболеваний / Г.П. Калина, Н.С. Харитонов // Микробиология. – 1982. – № 11. – С. 82-86.

46. Калина, Г.П. Факультативные методы бактериологических исследований при пищевых токсикоинфекциях / Г.П. Калина // Сборник научных трудов НИИ Гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Москва. – 1977. – С. 76-94.

47. Канаева, Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерий *A. hydrophila*: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.03 / Канаева Татьяна Ивановна // Саратов, 2009.– 23 с.

48. Камбаратов, П.И. Клиническая оценка РНФ как метода лабораторной диагностики острой дизентерии / П.И. Камбаратов // ЖМЭИ. – 1963. – №4. – С. 76-78.

49. Катмакова, Н.П. Разработка и применение диагностического биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Катмакова Надежда Петровна // Ульяновск, 2010 – 24 с.

50. Капырина, Н.А. Идентификация возбудителя листериоза с помощью бактериофага / Н.А. Капырина, И.А. Бакулов // Профилактика и меры борьбы с лептоспирозом и листериозом с/х животных: симп. – Новочеркасск, 1972. – С.76-78.

51. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э.Каттер, А. Сулаквелидзе // Пер. с англ., науч. ред. А.В. Летаров. – Москва; Научный мир, 2012. –640 с.

52. Кац-Чернохвостова, Л.Я. Проблема фаготипирования брюшнотифозных и паратифозных микробов и ее эпидемиологическое значение / Л.Я. Кац-Чернохвостова // ЖМЭИ. – 1947. – № 8. – С. 312-315.

53. Квеситадзе, И.Ф. Фаготерапия и фагопрофилактика при колипаратифозных заболеваниях телят /И.Ф. Квеситадзе// Бактериофагия в ветеринарной практике. – Медицина, 1947. – С. 28.

54. Килессо, В.А. Идентификация сальмонеллезных культур с помощью О-бактериофага / В.А. Килессо // Тез. докл. конф. Таллин. науч.-иссл. ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены. – Таллин. – 1960. – С. 5.

55. Килессо, В.А. Род *Salmonella*. Энтеробактерии: В.А. Килессо// Руководство для врачей. – Медицина, 1985.

56. Ковалева, Е.Н. Создание биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Enterococcus faecalis*: Автореферат дисс...канд. биол. наук: 03.02.03 / Ковалева Елена Николаевна // – Саратов, 2009. – 20 с.

57. Кольпикова, Т.И. Фаготипирование листерий / Т.И. Кольпикова, И. А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 31-32.

58. Коритняк, Б.М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Yersinia enterocolitica*, разработка технологических параметров по их применению: Автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.02.03 / Коритняк Богдан Михайлович // – Саратов, 2005. – 20 с.

59. Красильников, Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов / Н.А. Красильников // Медицина: Изд-во АН СССР,–1949.- – 830 с.

60. Кременчук, Г.А. Применение реакции нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Г.А. Кременчук, М.А. Гицевич, К.П. Бояршинова // ЖМЭИ. – 1961. – № 7. – С.124.

61. Кривиский, А.С. Вирусы против микробов / А.С. Кривиский // – Медицина,1962. – 162 с.

62. Крылова, М.Д. Перспективы и возможности метода фаготипирования бактерий / М.Д. Крылова // Материалы симп., посвящен. 50-летию Тбилисского НИИВС. – Тбилиси. –1974. – С. 276-280.

63. Крылова, М.Д. Применение бактериофагов для типирования бактерий / М.Д. Крылова // В кн.: Бактериофагия. – Москва: Медгиз, 1961. – С. 220-257.

64. Крылова, М.Д. Фаготипы бактерий/ М.Д. Крылова // Москва: Медгиз, 1963. – 162 с.

65. Кузнецова, В.Н. Применение реакции нарастания титра фага для индикации дизентерийных бактерий в условиях внешней среды / В.Н. Кузнецова, М.И. Хазанов, Т.Н. Ремова // ЖМЭИ. – 1960. – № 6. – С. 59

66. Лебедев, В.И. Опыт применения РНФ в эпидемиологической практике / В.И. Лебедев // ЖМЭИ. – 1963. – № 12. – С. 29.

67. Ленев, С.В. Способ выделения и свойства бактериофагов / С.В. Ленев // Сб. науч. трудов Всеросс. научн. ин-та вет. препаратов. – Москва, 1991. – С.24.

68. Летаров, А.В. Реконструкция возможных путей происхождения и морфологии эволюции бактериофагов / А.В. Летаров // Генетика. – 1998. – № 11. – С. 14.

69. Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия, Д. Дарнелл. // Москва: Мир, 1970. – 397 с.

70. Мац, Л.И. Вопросы санитарной бактериологии и вирусологии / Л.И. Мац – Москва: Медицина. – 1965. – С. 44-59.

71. Мейпариани, А.Н. Современные принципы производства и применения сухих лечебно-профилактических дизентерийных и брюшнотифозных бактериофагов: Автореф. дис. ...докт. мед. наук: 14.00.05. / Мейпариани А.Н. - Тбилиси. – 1971. – 45 с.

72. Методические указания по лабораторной диагностике аэромоназа карпов. – Москва: Госагропром СССР, 1986.

73. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности. – Утверждена Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ от 9 декабря 1997 года.

74. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов от 27.09.99 г. №13-4-2/1742.

75. Методические рекомендации. «Методы исследования объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады» – Москва, 1980. – 20 с.

76. Молофеева, Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *E. coli* O 157 и их применение в диагностике: Автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.02.03 / Н.И. Молофеева Надежда Ивановна //– Саратов, 2004. – 20 с.

77. Натидзе, Л. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами / Л. Натидзе // матер. междунар. семинара. – Тбилиси, 2005. – С. 21.

78. Никитюк, Н.М., фаготипирование *S. typhimurium*, выделенных на различных территориях СССР / Н.М. Никитюк // ЖМЭИ. – 1970. – №1. – С. 53.

79. Николаенко, Н.И. Изучение активности бактериофага *Salmonella abortus ovis* после длительного его хранения / Н.И. Николаенко, И.К. Тутов // Диагностика, лечение, профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных: Тр. Ставропольск. с/х ин-та. – 1970. – Т. XXXIII, №4. – С. 221-224.

80. Нурызгалиев, С.Н. Фаготипирование стафилококков, выделенных от больных гнойными инфекциями / С.Н. Нурызгалиев // Материалы 10-го научн. сем. Алма-Атинского гос. мед. ин-та. – Алма-Ата, 1978. – С. 55-57.

81. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / под редакцией А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной // Москва: Медицина, 2004. – 576 с.

82. Островская, Н.Н. Ускоренный метод диагностики брюшного тифа Ви-фагом / Н.Н. Островская, Б.Н. Папкина // ЖМЭИ. – 1951. - №2. – С. 37-40.

83. Островская, Н.Н. К использованию метода нарастания титра фага для выявления бруцелл во внешней среде / Н.Н. Островская, Д.М. Гольдфарб // ЖМЭИ. – 1961. - №5. – С. 145.

84. Павлова, И.П. Изучение морфологии и биологических свойств фагов *Vac. anthracis* и *Vac. cereus* / И.П. Павлова // ЖМЭИ. – 1971. – № 7. – С.147.

85. Петрушина, Л.И. Фаготипирование стафилококков, выделенных у больных маститом коров / Л.И. Петрушина // ЖМЭИ. – 1967. – №5. – С. 128.

86. Петровская, В.Г. Проблема вирулентности бактерий / В.Г. Петровская // Ленинград: Медицина, 1967. – 320 с.

87. Погорелова, Н.П. Микробиологическая оценка загрязнения водных объектов дельты Волги / Н.П. Погорелова, Л.А. Журавлева, Ф.Х. Ибрагимов // Микробиология. – 1999. – № 4. – С. 62-66.

88. Пожарникова, Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Е.Н. Пожарникова Елена Николаевна – Саратов, 2006. – С. 4-20.

89. Покровский, В.И. Проблемы внутрибольничных инфекций /В.И. Покровский// Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1996. – № 2. – С. 4.

90. Покровский, В.И. Современные принципы и методы диагностики инфекционных болезней / В.И. Покровский, О.А. Дунаевский // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 4. – С. 5-7.

91. Покровский, В.И., Медицинская микробиология/ В.И. Покровский, О.К. Поздеев// – Москва: Медицина, 1999. – 1200 с.

92. Понявин, Б.Я. Изучение реакции нарастания титра фага в условиях практической лаборатории/ Б.Я. Понявин // ЖМЭИ. – 1960. – №6. – С. 135.

93. Попхадзе, М.З. Использование бруцеллезного фага для диагностики бруцелл / М.З. Попхадзе // ЖМЭИ. – 1968. – №2. – С. 119-124.

94. Пульчеровская, Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Пульчеровская Лидия Петровна // – Саратов, 2004. – 21 с.

95. Равилов, А.З. Микробиологические среды / А.З. Равилов, Р.Я. Гильмутдинов, М.Ш. Хусаинов// Казань: Академкнига, 1999. – 189 с.

96. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко// Киев: Урожай, 1978. – С. 88.

97. Рубашкина, Б.К. Применение метода нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Б.К. Рубашкина, С.Ф. Казакова // ЖМЭИ. – 1959. – №6. – С.110-112.

98. Покровский, В.И. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. / Под ред. В.И. Покровского // Москва: Медицина, 1993. – С. 61-78.

99. Русалеев, В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – №8. – С. 29.

100. Самойленко, В.И. Современное состояние изученности фагов фитопатогенных бактерий / В.И. Самойленко // Бактериальные болезни бактерий. – Москва: Колос, 1981. – С. 27-42.

101. Семанина, Е.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и разработка на их основе биопрепарата для индикации и идентификации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Семанина Екатерина Николаевна -Саратов, 2012. – 21 с.

102. Сергиенко, Ф.Е. Новый метод бактериологично діагностики за допомогою бактеріофага / Ф.Е. Сергиенко // Мікробіол. журн. АН УССР. – 1936. – №1. – С. 85-112.

103. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. Справочник. / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, В.Б. Федотов // Москва: Колос, 1995. – 320 с.

104. Стент, Г. Молекулярная биология вирусов бактерий / Г. Стент // Москва: Мир, 1965. – 452 с.

105. Тимаков, В.Д. Об условиях взаимодействия фага и бактериальной клетки / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Вестник АМН СССР. – 1958. – №2. – С. 37.
106. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Москва: Мир, 1962. – 320 с.
107. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко // Москва: Наука, 1968. – С. 89-168.
108. Томэску, В Зоонозы / В. Томэску, И. Гавриле, Д. Гавриле // Москва: Колос, 1982. – 319 с.
109. Федоров, Р.В. Схемы бактериологических исследований / Р.В. Федоров // Москва: Медицина, 1995. – 47 с.
110. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03/ Феоктистова Наталья Александровна– Саратов, 2006. – 22 с.
111. Чинашвили, Т.Г. К механизму образования фагоустойчивых форм микроорганизмов/ Т.Г. Чинашвили В кн.: Вопросы молекулярной генетики микроорганизмов // Москва: Медицина, 1968. – С. 225.
112. Золотухин, С.Н. Чувствительность патогенных энтеробактерий, выделенных при диареях молодняка животных к антибиотикам и специфическим бактериофагам / С.Н. Золотухин [и др.] //Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: матер. междунар. научн. конф. – Ульяновск, 2006. – С. 233-236.
113. Шаханина, И.Л. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / И.Л. Шаханина // Москва: Медицина, 1993. – Т. 1. – 161 с.
114. Шестаков, А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Шестаков Андрей Геннадьевич – Саратов, 2010 – 22 с.

115. Хмелевская, Г.В. Факторы патогенности некоторых условно-патогенных бактерий, вызывающих диареи / Г.В. Хмелевская, Л.В. Девтерова, Э.А. Яговкин // Микробиология. – 1990. – № 4. – С. 97-102.

116. Хомякова, Т.И. Иммуноморфология инфекционного процесса при экспериментальном инфицировании бактерий *Aeromonas hydrophila*/ Т.И. Хомякова, О.В. Макарова, Ю.Е. Козловский // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2009. – № 15. – С. 57-63.

117. Хэйс, У. Генетика бактерий и бактериофагов / У. Хэйс; пер. с англ. К.Н. Гринберга [и др.]; под ред. и с предисл. С.Н. Алиханяна // Москва: Мир, 1965. – 368 с.

118. Цветков, К.И. Применение специфического бактериофага для диагностики паратифозного аборта кобыл / К.И. Цветков // Ветеринария. – 1941. – № 6. – С. 4-6.

119. Чайка, Н.А. Аэромонадная инфекция. Библиографический указатель отечественной и зарубежной литературы / Н.А. Чайка, О.И. Семенова // Ленинград 1987. – 34 с.

120. Щедрина, Н.А. Состояние и перспективы создания отечественной техники переработки гидробионтов / Н.А. Щедрина, В.В. Карцев // Санкт-Петербург: Пищевая промышленность, 2004. – 87 с.

121. Д'Эррель Бактериофаг и его значение для иммунитета/ Д'Эррель// Москва: Госиздат, 1926. – С. 223.

122. Abbott, S.L. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes / S.L. Abbott, W.K.W. Cheung and J.M. Janda // J. Clin. Microbiol. – 2003. – N. 41 – P. 2348-2357.

123. Adams, D. *A. hydrophila* typing scheme based on patterns of agglutination with erythrocytes and yeast cells / D. Adams, H.M. Atkinson, W.H. Woods // Journal Clinical Microbiology. – 1982. – N. 17. – P. 422-427

124. Agger, W.A. Clinical and microbiological features of *A. hydrophila*- associated diarrhea / W.A. Agger, J.D. McCormick, M.J. Gurwith // Journal of Clinical Microbiology. – 1985. – V 21. – №6. – P. 909-913.

125. Ali, A. In Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB / A. Ali, A. Carnahan, M. Altwegg, List No. 59. Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996b N. 46. – P. 1189-1190.
126. Altwegg, M. Isolation of *Aeromonas* spp. from human faeces /M. Altwegg// Experientia. – 1986. – V 42, – №1. – P. 107.
127. Altwegg, M., *Aeromonas* as a human pathogen / M. Altwegg [et al.] // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1989. – N.16. –P. 253-286.
128. Ascencio, F. Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins / F. Ascencio [et. al.] // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 1998. – N. 20. – P. 219-229.
129. Andelova, A. Correspondence. *Aeromonas* agar is useful selective medium for isolating *aeromonads* from faecal samples / A. Andelova, I. Porazilova // Med. Microbiol. – 2006. – N. 55. – P.1605-1606.
130. Austin, B. The genus *Aeromonas* /B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling, and S. Joseph [ed.] // John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England. – Fish pathogens. – 1996. – P. 197-243
131. Balsalobre, L.C. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *A. hydrophila* and *Aeromonas jandaei* / L.C. Balsalobre, M . Dropa, N. Lincopan // Amer. Med. Technol. – 1980. – P. 179-181.
132. Baumann, P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / P. Baumann P. and R.H. W. Schubert //Family II Vibrionaceae. In Krieg Holt [Editor], 1st Ed., Vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore – 1984. – P. 516-517.
133. Beijerinck, M.W. /Schwefelwasserstoffbildung in den stadtgräben und austellung der gattung Aërobacter // M.W. Beijerinck Centralb. Bakt. – 1900.- II Abt. N.7. – P. 193-206.
134. Bergey, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / D.H. Bergey, F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. //1st Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore – 1923. – P. 1-442.

135. Bergey, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / D.H. Bergey D., F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. //2nd ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore – 1925. – P. 1-462.
136. Bergey, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology / D.H. Bergey, F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. // 3rd edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore – 1930. – P. 1-589.
137. Garrity, G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition V. Two Part B. / G.M. Garrity, Don Brenner, Noel Krieg // Staley. – 2005.
138. Bernheim, F. Oxidation of certain amino acids by "resting" *Bacillus proteus* / F. Bernheim, M.L.C. Bernheim // J. Biol. Chem. – 1935. – N.110. – P.165-172.
139. Biscardi, D., The occurrence of cytotoxic *A. hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters /D. Biscardi, D., A. Castaldo, O. Gualillo //Science of the Total Environment. – 2002. – N. 292 (3). – P. 255-263.
140. Blatz, D. Open fracture of the tibia and fibula complicated by infection with *A. hydrophila* / D. Blatz // J. Bone Joint Surg. – 1979. – N. 61. – P. 790-791.
141. Boillard, J. Septicemia *A. hydrophila* chez une malade / J. Boillard, Y. Droumaguet // Quest. Med. – 1984. – V. 37, N. 11. – P. 631-634.
142. Borrell, N. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources / N. Borrell, M. J. Figueras // Can. J. Microbiol. – 1998. – N. 44. –P. 103-108.
143. Boxmie, E.R. Methods isolation and identification *A. hydrophila* / E.R. Boxmie, A.J.G. Okaend // Microbiology Laboratory Guidebook. – 1998. – N. 3. –P. 31-34.
144. Brandi, G., Survival of *A. hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil / G. Brandi, G.M. Sisti, G.F. Schiavano // Journal of Applied Bacteriology – 1996. – N. 81(4). – P. 439-444.
145. Burgos, A. Identifying clinical *Aeromonas* species / A. Burgos, P. Rojo, G. Quindos // 5 Eur. Congr. Clin. Microbiol, and Infect. Diseases., Sept. 9-11, – 1991 – Oslo. – P. 14.

146. Burke, V. The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents / V. Burke, M. Gracey, J. Robinson // J. Infect. Dis. – 1983. – V. 148, N. 1. – P. 68-74.
147. Cahill, M.M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species / M.M. Cahill // Journal of Applied Bacteriology – 1990. – N.69. – P. 1-16.
148. Canonica, F. Identification of hydroxy fatty acids in *A. hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* / F. Canonica, M. Pisano // Journal of Clinical Microbiology. – 1985. – V. 22, N. 6. – P. 1061-1062.
149. Carnahan, A.M. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species / A.M. Carnahan, S. Behram, S.W. Joseph // Journal of Clinical Microbiology – 1991b.N. 29(12). – P. 2843-2849.
150. Carson, J. 2001. Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix / J. Carson, T. Wagner, T. Wilson, L. Donachie // Journal of Applied Microbiology – 2001. – N. 90(2) – P. 190-200.
151. Castro-Escarpulli, G. Characterisation of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico / G. Castro-Escarpulli // International journal of food microbiology. – 2003. – N. 84. – P. 41-49.
152. Ceylan, E. The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock / E. Ceylan, M. Berktas, Z. Ağaoğlu // Trop. Anim. Health Prod. – 2009. – N.41. – P. 199-204.
153. Chester, F.D. Manual of determinative bacteriology/ F.D. Chester // NY The Macmillan Co., 1901. – P. 250.
154. Chien, C.C. Polyhydroxyalkanoates production from carbohydrates by a genetic recombinant *Aeromonas spp.* / C.C. Chien, L.Y. Ho // Letters in Applied Microbiology – 2008. – V. 47, N. 6. – P. 587-593.
155. Chopra, A.K. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis / A.K., and C. W. Houston // Microbes Infect. – 1999. – N. 1. – P. 1129-1137.
156. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria.

Approved guideline M45-A./ Clinical and Laboratory Standards Institute // Wayne: PA, 2006.

157. Merino, S.A. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas sp.* Serogroup 0:34 / S.A. Merino [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – N. 67. – P. 4008-4013.

158. Colaco, C.A. *hydrophila* liver abscess / C. Colaco // Lancet – 1982. – N. 1. – P. 680.

159. Colwell, R. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* / R. Colwell, M. McDonell, J. DeLey // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – V. 36, N. 3. – P. 473-477.

160. Figueras, M.J. Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study / M.J. Figueras [et al.] // Journal of medical microbiology. – 2007. – V. 56, N7. – P. 996-998.

161. Burke, V. Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas spp* / V. Burke [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1983. – N. 18. – P. 1196-1200.

162. Craigie, J. Demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparations of type II V_i - phage: principles and techniques / J. Craigie, C. Yen // Canad. publ. Hlth. J. – 1938. – N. 29. – P. 448-463.

163. Edberg, S.C. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model / S.C. Edberg, F.A. Browne, M.J. Allen // Crit. Rev. Microbiol. – 2007. – N. 33 – P. 89-100.

164. Emmerich, R. Über eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen / R. Emmerich, C. Weibel // Arch. Hyg. – 1894. N. 21 – P. 1-21.

165. Fainstein, V In vitro susceptibilities of *A. hydrophila* against new antibiotics / V. Fainstein, S. Weaver, G.P. Bodey // Antimicrob. Agents Chemother. – 1982. – N. 22. – P. 513-514.

166. Fernandez, M. C *A. hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentina / M. C. Fernandez [et al.] Genetica. – 2000. – N. 108(1) – P. 35-40.

167. Figueras, M.J. Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas spp.* / M.J.

Figueras, J. Guarro, A.J. Martinez-Murcia // Journal of clinical microbiology. – 2000. – V. 38, N. 5. – P. 2023-2025.

168. Figueras, M.J. Clinical relevance of *Aeromonas* sM503 / M. J. Figueras // Rev. Med. Microbiol. – 2005. – N. 16 – P. 145-153.

169. Fiorentini, C. Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea / C.E. Fiorentini [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 1998. – N. 85 – P. 501-511.

170. Garcia, F. Challenge of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets supplemented with vitamins C and E by *A. hydrophila* under different temperature / F. Garcia, F.R. Moraes, M.L. Martins // Arq. brasil. Med. veter. Zootech.–2009.–T. 61.–N. 2.–P. 378-385.

171. Gibbs, A. Evaluation of the inhibition of culturable *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, or *Aeromonas hydrophilia* by an existing drinking water biofilm / A. Gibbs, G. Shawn, C. Mark // Journal of Environmental Engineering and Science. – 2008. – V. 7, N6. – P. 559-568.

172. Gosling, P.J. *Aeromonas* species in disease of animals / P.J. Gosling, S. Joseph [ed al.], The genus *Aeromonas*. John Wiley & Sons Ltd.- West Sussex, England – 1996. – P. 175-95.

173. Granum, P.E. Possible virulence factors of *Aeromonas spp.* From food and water / P.E. Granum, K. O'Sullivan, J.M. Tomas // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1998. – N. 21. – P. 131-137.

174. Griffin, P.J. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida* / P.J. Griffin, S.F. Sniezsko, S.B. Friddle // Transactions of the American Fisheries Society – 1953. – N. 82. – P. 129-138.

175. Hazen, T.C. Prevalence and distribution of *A. hydrophila* in the United States / T.C. Hazen, C.B. Fliermans, R.P. Hirsch // Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – N. 36. – P. 731-738.

176. Hammer, B.W. Fishiness in evaporated milk / B.W. Hammer // Res. Bull. Iowa Agricult. Exp. Sta. – 1917. – N. 38. – P. 233-246.

177. Hernould, M. Role of the AheABC Efflux Pump in *A. hydrophila* Intrinsic Multidrug Resistance / M.S. Hernould, M. Fournier, C. Quentin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – N. 52(4) – P. 1559-1563.

178. Ho, A.S. The pili of *A. hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin" / A.S. Ho, T.A. Mietzner, A.J. Smith // *Journal of Experimental Medicine.* – 1990. – N. 172(3) – P. 795-806.

179. Holmes, P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment / P.J. Gosling, and S. Joseph [ed al.] // *The genus Aeromonas.* John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England. – 1996. – P. 127-150.

180. Janda, J.M. Cephalothin susceptibility as a potential marker for the *Aeromonas sobria* group / J.M. Janda, M.R. Motyl // *J. Clin. Microbiol.* – 1985. – N. 22. – P. 854-855.

181. Janda, J.M. Mesophilic *aeromonads* in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum / J.M. Janda, and P. S // *Rev. Infect. Dis.* – 1988. –N. 10. –P. 980-997.

182. Janda, J.M. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentation, and unanswered questions / J.M. Janda, S.L. Abbott // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – N. 27 – P. 332-344.

183. Janda, J.M. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls / J.M. Janda, S.L. Abbott // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – N. 45 – P. 2761-2764.

184. Janda, J.M. The Genus *Aeromonas*: Taxonomi, Pathogenicity, and Infection / J.M. Janda, S.L. Abbott // *Clin. Microbiol.* – 2010. N. 23 – P. 35 – 73.

185. Jorgensen, J.H. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria / J.H. Jorgensen, J.F. Hindler // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – N. 44. – P. 280-286.

186. Joseph, S.W. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species / S.W. Joseph, A. Carnahan // *Annu. Rev. Fish Dis.* – 1994. – N 4. – P. 315-343.

187. Kutter, E. Bacteriophages: biology and application / E. Kutter, A. Sulakvelidze // A – Crc press – 2004.
188. Katznelson, H. A rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed / H. Katznelson, Sutton M.A // J. Bact. – 1951. – V. 61. – N.1. – P. 689.
189. Khardori, N. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents / N. Khardori, V. Fainstein // Annu. Rev. Microbiol. – 1988. – N. 42. – P. 395-419.
190. Kirov, S.M. The public health significance of *Aeromonas spp.* in foods. Int. / S.M. Kirov // J. Food Microbiol. – 1993. – N. 20. – P. 179-198.
191. Kita-Tsukamoto, K. “Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences” / K. Kita-Tsukamoto, H. Oyaizu, K. Nanba, U. Simidu // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1993. – N. 43. – P. 8-19.
192. Kluyver, A.J. “Prospects for a natural system of classification of bacteria” / A.J. Kluyver, C.B. van Niel // Zentralblatt für Bakteriologie Origin. – 1936. – N. 94. – P. 369-403.
193. Krzywińska, S.A. Interaction of *Aeromonas spp.* Human isolates with murine macrophages / S.A. Krzywińska, A. Kaznowski, M. Puk // New Microbiol. – 2008. – N. 31. – P.481-488.
194. Lehmann, J.F. Familie II. *Bacteriaceae*. Stäbchenbakterien. 181-315. In: Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Teil II. / J.F. Lehmann // München. – 1896. – P. 181-315.
195. Libisch, B. Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *A. hydrophila* strain / B. Libisch, C.G. Giske, B. Kovács // J. Clin. Microbiol. – 2008. – N.46. – P. 1878-1880.
196. Majeed, K.N. Probe for detection of *Aeromonas spp.* / K.N. Majeed, I.C. MacRae // Microbios. – 1993. – V. 73, N 297. – P. 281-288.
197. Martin-Carnahan, A. Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213AL, P. 557-578. In D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, [ed al.], Bergey's manual of systematic

bacteriology / A. Martin-Carnahan 2nd ed., vol. 2, part B. Springer, New York, NY. – 2005.

198. Martinez-Murcia, A.J. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int. / A.J. Martinez-Murcia, S. Benlloch, M. D. Collins // J. Syst. Bacteriol. – 1992. – N. 42. – P. 412-421.

199. Max Aravena-Román, Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents / Max Aravena-Román, J Chang // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – N. 56 (2). – P. 1110.

200. Millership, S.E. Identification. In Austin, Altwegg, Gosling and Joseph [Editors], The Genus *Aeromonas* / S.E. Millership // John Wiley and Sons, Ltd., Chichester. – 1996. – P. 85-108.

201. Millership, S.E. Methods for the isolation of *A. hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* from faeces / S.E. Millership, B. Chattopadhyay // J. Hyg. – 1984. – N. 92. – P. 145-152.

202. Misra, S. Enteropathogenicity of *A. hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* / S. Misra, S. Sarkar // Zentralbl. Hyg. und Umweltmed. – 1990. – V. 190, N. 95. – P. 434.

203. Mitchell, S. Isolation and Partial Characterization of Two *A. hydrophila* Bacteriophages / S. Mitchell Chow, M.A. Rouf // Applied and Environmental Microbiology, – 1983. – N. 45. – P. 1670-1676.

204. Moro, E.M.P. *A. hydrophila* isolated from cases of bovine seminal vesiculitis in south Brazil / E.M.P Moro, R.D.N. Weiss [et al.]// J. Vet. Diagn. Invest. – 1999. – N. 11. – P. 189-191.

205. Motyl, M.R. In vitro susceptibilities of *A. hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents / M.R. Motyl, G. McKinley, J.M. Janda // Antimicrob. Agents Chemother. – 1985. – N. 28. – P. 151-153.

206. Moyer, N.P. Clinical significance of *Aeromonas* Species Isolated from Patients with Diarrhea / N.P. Moyer // Journal of Clinical Microbiology. – 1987. – N. 25(11). – P. 2044-2048.
207. Moyer, N.P. Isolation and enumeration of *aeromonads*. In: B. Austin, M. Altwegg, S.W. Joseph [ed al.] The Genus *Aeromonas* / N.P. Moyer // John Wiley & Sons, New York, NY. – 1996. – P. 39-76.
208. Moyer, N.P. The quest for understanding: A history of *Aeromonas* Research / N.P. Moyer // 7th International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas*, Orihuela, Spain. – 2002.
209. Nishikawa, Y. Distribution and characterization of hemolytic, and enteropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment / Y. Nishikawa, T. Kimura, T. Kishi // Epidemiol, and Infec. – 1991. – V. 107, N. 21. – P. 171-179.
210. O'Hara, C.M. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli / C.M. O'Hara // J. Clin. Microbiol. – 2006. – N. 44. – P. 928-933.
211. Osborne, J.A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish / J.A. Osborne, G.E. Fensch, J.F. Charba // Fla Sci. – 1989. – N. 3. – P. 171-177.
212. Overman, T.L. Antimicrobial susceptibility of *A. Hydrophila* / T.L. Overman // Antimicrob. Agents Chemother. – 1980. – N. 17. – P. 612–614.
213. Palumbo, S.A. The *A. hydrophila* group in food. In Austin, Altwegg, Gosling, Joseph. [Editors], The Genus *Aeromonas* / S.A. Palumbo John Wiley and Sons, Ltd., Chichester. – 1996. – P. 287-310.
214. Palumbo, S.M. Identification of motile *Aeromonas spp.* Isolated from a swine slaughter plant. 6th International *Aeromonas Plesiomonas* / S.M. Palumbo, Golden, L. Yu, C. Briggs // Symposium, Chicago, Illinois – 1999. – P. 13.
215. Palumbo, S.A. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *A. Hydrophila* / S.A. Palumbo, F. Maxino, A.C. Williams, R.L. // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – N. 50. – P. 1027-1030.

216. Palumbo, S.A. Influence of temperature, sodium chloride and pH on the growth of *A. Hydrophila* / S.A. Palumbo, D.R. Morgan, R.L. Buchanan // J. Food Sci. – 1985b. – N. 50. – P. 1417-1421.

217. Park, T.S.M. Identification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. Lett. / T.S. M. Park, S.H. Oh [et al.] // Appl. Microbiol. – 2003. – N. 37. – P. 349-353.

218. Popoff, M.A. taxonomic study of the *A. hydrophila*-*Aeromonas punctata* group / M. Popoff, M. Véron // J. Gen. Microbiol. – 1976. – N. 94. – P. 11-25.

219. Popoff, M. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas* / M. Popoff, R. Lallier // Methods in Microbiology. – 1984. – N. 16. – P. 127-145.

220. Popoff, M. Facteurs de résistance transférables chez *Aeromonas salmonicida* / M. Popoff, Y. Davaine // Ann. Inst. Pasteur [Paris] – 1971. N. 121. – P. 337-342.

221. Ramamurthy, T. Taxonomical implications of the emergence of high frequency of occurrence of 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine-resistant strains of *Vibrio cholerae* from clinical cases of cholera in Calcutta, India / T. Ramamurthy, A. Pal, S.C. Pal, G. B Nair // J. Clin. Microbiol. – 1992. – N. 30. – P. 742-743.

222. Rahim, Z. Isolation of enterotoxigenic haemolytic and antibiotic-resistant *Aeromonas* spp. / Z. Rahim, K. Aziz // First International Workshop on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. London: PHLS. – 1986. – P. 29.

223. Robinson, J. Comparison of direct plating with the use of enrichment culture for isolation of *Aeromonas* spp. from faeces / J. Robinson, J. Beaman, L. Wagener, V. Burke // J. Med. Microbiol. – 1986. – N. 22. – P. 315-317.

224. Ruimy, R. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences / R. Ruimy, V. Breittmayer, P. Elbaze [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – N. 44. – P. 416-426.

225. Russell, F.H. An epidemic, septicemic disease among frogs due to the *Bacillus hydrophilus* fuscus / F.N. Russell // JAMA. – 1898. – N. 80. – P. 1442-1449.

226. Saavedra, M.J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas* / M.J. Saavedra, M.J. Figueras, A.J. Martinez-Murcia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – N. 56. – P. 2481 - 2487.
227. Sanarelli, G. “Über einen neuen mikroorganismus des wassers, welcher für thiere mit veränderlicher und konstanter temperatur pathogen ist” / G. Sanarelli // Zentralblatt für Bakteriologie Origin. – 1891. – P. 189 - 199, P. 222-228.
228. Schubert, R.H.W. Genus II. *Aeromonas*. In Buchanan and Gibbons [Editors], Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. / R.H.W. Schubert // The Williams and Wilkins Co., Baltimore. – 1974. – P. 345-348.
229. Schubert, R.H.W. Genus IV. *Plesiomonas*. In Krieg and Holt [Editors], Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st Ed., Vol. 1 / R.H.W. Schubert // Williams and Wilkins, Baltimore. – 1984. – P. 548-550.
230. Sha, J. Role of various enterotoxins in *A. hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity / J. Sha, E.V. Kozlova, A.K. Chopra // Infect Immun. – 2002. – N. 70. – P. 1924-1935.
231. Shane, S.M. Prevalence and pathogenicity of *A. Hydrophila* / S.M. Shane, D.H. Gifford // Avian Dis. – 1985. – T. 29, N. 3. – P. 681-689.
232. Shumann, H. Ausbreitung und Eigenschaften von Epidemiestämmen / H. Shuman, H. Tschape // Y. Militäy-med. – 1988. – V. 29, N. 3. – P. 158-161.
233. Singh, D.V. Production of hemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas spp.* / D.V. Singh, S.C. Sanyal // J. Med. Microbiol. – 1992. – N. 37. – P. 262-267.
234. Sniezsko, S.F. The genus *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936. – P. 189 – 193. R.S. Breed, E.D.G. Murray, N.R. Smith [ed al.] / S.F. Sniezsko // Bergey's manual of determinative bacteriology. – 1957. – 7th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
235. Spinks, A.T. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures / A.T. Spinks, [et al.] // Water Res. – 2006. N. 40. – P. 1326-1332.

236. Soler, L. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas spp.* / L. Soler, F. Marco, J. Vila [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – N. 41. – P. 5732-5734.

237. Stagnaro, S.M. *A. hydrophila* and its relation with drinking water indicators of microbiological quality in Argentina / S.M. Stagnaro, C. Chiale, H. Frade // Genetica. — 2000. — V. 108, N.91. – P. 35-40.

238. Stanier, R.Y. A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus* / R.Y. Stanier // J. Bacteriol. – 1943. – N. 46. – P. 213-214.

239. Tena, D. Surgical site infection due to *Aeromonas* species: report of nine cases and literature review. Scand / D. Tena, C. Aspíroz [et al.] // J. Infect. Dis. – 2009. – N. 41. – P. 164-170.

240. Dworkin, M. The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. [Vol. 6] / M. Dworkin, [et. al.] // Springer – 2006.

241. Thorton, S.M. Bacterial isolates from California sea lions *Zalophus californicus*, harbor seals *Phoca vitulina*, and northern elephant seals *Mirounga angustirostri*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994-1995 / S.M. Thorton, S. Nolan, F.M. Gulland // J. Zoo. Wildl. Med. – 1998. – N. 29. – P. 171-176.

242. Turnidge, J.D. Resistances in *Aeromonas* species from the SENTRY global surveillance program. SENTRY / J.D. Turnidge, J.M. Bell, R.N. Jones // Antimicrobial surveillance – 2003. – Chicago.

243. USEPA, Method 1605: *Aeromonas* in Finished Water by Membrane filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V) / USEPA // Washington, D. C. – 2005.

244. Valera, L. Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas* / L. Valera, and C. Esteve J. // Appl. Microbiol. – 2002. – N. 93. – P. 77-95.

245. von Graevenitz, A. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, p. 278 – 281. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical mi-

crobiology, 4th ed / A. von Graevenitz // American Society for Microbiology, Washington, D. C. – 1985.

246. von Graevenitz, A. Introduction and historical perspectives / A. von Graevenitz // Med. Microbiol. Lett. – 1993. – N. 2. – P. 192-194.

247. von Graevenitz, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review / A. von Graevenitz // Infection. – 2007. N. 35 – P. 59-64.

248. von Graevenitz, A. The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature. N. Engl. / A. von Graevenitz, A.H. Mensch // J. Med. – 1968. – N. 278. – P. 245-249.

249. Zhang, Y.L. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *A. hydrophila* isolated from diseased fish / Y.L. Zhang, C.T. Ong, K.Y. Leung // Microbiology. – 2000.– N. 146. – P. 999-1009.

250. Zhiyong, Z., *A. hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options / Z. Zhiyong, L. Xiaoju, G. Yanyu // Rev. Med. Microbiol. – 2002.– N. 13. – P. 12.

251. Zimmermann, OER. “Die Bakterien unserer trink-und Nutzwässer” / Zimmermann // Part I. Bert Naturw. Ges. Chemnitz. –1890. – N.1. – P. 38-39.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И.И. Богданов
« 29 » сентября 2020 г.

**ПРОГРАММА КОМИССИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ**

Изучение биологических свойств бактериофага F-43 УГСХА бактерий
Aeromonas hydrophila

Авторы разработки :

соискатель И. Р. Насибуллин

д.б.н., профессор Д.А. Васильев

Ульяновск -2020

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И.И. Богданов
«29» сентября 2020 г.



АКТ КОМИССИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ

Изучение биологических свойств бактериофага F-43УГСХА бактерий
Aeromonas hydrophila

Ульяновск – 2020

Приложение 3



УТВЕРЖДАЮ:
Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И.И. Богданов
«29» сентября 2020 г.

ПРОГРАММА КОМИССИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ

Изучение возможности применения бактериофага F-43-УГСХА в
реакции нарастания титра фага для индикации (выявления) бактерий

Aeromonas hydrophila

Авторы разработки:

соискатель И.Р.Насибуллин

д.б.н., профессор Д.А. Васильев

Ульяновск – 2020

Приложение 4

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И. И. Богданов
«29 сентября» 2020 г.

**АКТ КОМИССИОННЫХ ИСПЫТАНИЙ**

Изучение возможности применения бактериофага F-43УГСХА в реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Ульяновск-2020

Приложение 5

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
 проректор по научной работе
 ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
 И.И. Богданов

« 29 » сентября 2020 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ИЗГОТОВЛЕНИЮ И КОНТРОЛЮ БАКТЕРИОФАГА F -43-УГСХА

Ульяновск – 2020

Приложение 6

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И.И. Богданов
«29» сентября 2020 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA* ИЗ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, КОРМОВ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА F-43-УГСХА.

Ульяновск 2020

Приложение 7**УТВЕРЖДАЮ:**

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
И.И. Богданов
« 29 сентября » 2020 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

ПО УСКОРЕННОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA* МЕТОДОМ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Ульяновск – 2020

Приложение 8

Результаты секвенирования генома бактериофага F 43-УГСХА

>Aeh_f43_phage_genome

ACATTGCCTTGATCGTCAATGATACCTAGCTTATGCGCTTCCCACTTAGAGAATGATTTCCCAAGT
 AAAGTCGCTAAACGGTATGCATATACCGCATCCATGATCGTTTTTGCCTCATAACACCTCCAAAATCTTA
 TTTATGAAAAGGGGATTAATCCCCCAATCAACCGCGTCGCTTGCATCACCCATCGCGGAGAGTTGATCC
 ATCTTGTTTTCGAGTGCTCAGATCTTTAGCTTTTCGCCACATTATCTTTGTGCGTCGCTTGCATACGGTCATTT
 GCATCATTACAGATTACCACCAAAATTACCATCCGGTTCATGCCAACGCTGCTTGCCTTGTCAACGCATAG
 ATTAAGCGTGAAAACCTTGTTCTTGTGCGCCATAACGGGACTTGATCTGCTTCATCAGTTGTTGACCGATTT
 CGGCGAGTTCGTCTGTTTCCATAGCAGCAAGAATAAAGTTCGGCAGTAGCAGCAAGACCAGCAGATTCTGC
 AATGTCTGACATACTGATATCAGAACTATCCAGCCACCACGAGTTGTTTTCGCGCAGCAGACCACACAACA
 ACGTTATGCTCTACCGCAAAGCCACGCAGCTCCTCGGCGATTGCTTTAACGAGTGTATAGCTATTCTCAGA
 ATAAGCAGTCATACGCTTGGAGCATGATACCGAGATAATCCACGATAACGATATCTGGCTTGAACCCT
 TTCTTGATCTGCAAATCTGCCATCAAGTTGTTCAAGTGGTTGACGTTAGCCGCACCAGTTGGGAATTGCTT
 GACAACGAGCTTACCGCAGTTTTTCTGTTTCAGTGCGCCAAATCGACGCATAAAATCAGACTCGGAGATC
 AAGCCGTCATCGATATCATCCAAGCTAACATCAAGCAAGTTGGCATCGATACGTTTACCACATACTTCTTC
 GCCATTTCCATGGACACGTAAGCACGTTATAACCCGTGTAACAGATACTCACAAGCTAAGTGACACAGA
 CCCAGAGACTTACCGACGTTAACACCAGCAAGAATCAAGTTTAGTGTTTTACGCTCGACCCACCTTTGGT
 GATTGTATTCAGAATCTTTGTCAAGAAGGAAATCTTCTTAGTTTTTATTCTATAGCTTTGAAAACGGGATT
 CTACATCATCAAAGTAATCGTGGCCGATTGCAATGTTAAATGCTACGGCAAGCGGTTTTTTCATCAAATCA
 GGAATCGCACCGATATCGGAAATCCGCTTGTCTCGTTCATCAAGTGGTTTAGCGTGATTCTCTTGAATCCG
 AATCGCTTCGGACAAAGCGTTGTGCATCGCCCTTTCTTGACAATATTTCTCAGTTTCAGCAAGCAGCCAGG
 CGAGATCTTCTGGTACACCAGTGAGTTTCGGCAATACCGGAATAGGCTTCATCAAACCTCAACTTGCGCGAT
 ACCGGAGCGTTTTCTCTAGTGCAATCACCAGC

CGGTTGTGAGTTCGGGATAGTCTTGTATTGTTGTAATGCTTTTGAATCAGTTCGAAAATGATCCGA
 ATCGGTCCCCTCGGAAAATACTCCGATTTTCAGGAATGGGAAGACTTGGCGAAAAGTATTCCTCAGAAACAA
 GGAGATTCGTGAGAATAGATTGTTTCGATTGACATTTCTTTGCCTTCTGTGATTTGCGCTTGTATAGCGGCTT
 GAACATGTTTAAATAATTCATCTTTTATTATCTTCTTCTTCACTATGAGGAGTAGACCAGTCTATATGGACTT
 GTCCGTCTTTGTACGTGAGTTCGTGAATATACGCTAGAAAGGGCTCGCCGTCAACTAGATAACAAGCTC
 TTGTTTTACGTCCCTCAACGCTTCTTCTAAAACGCTCTCGATAATTTCTTTCTTTGGCTTCCATTGGTGTCTCC
 GTTTGCTCTGATATTTCCAGCTCTTTTCAACAGATCGACCTGCATTGTCCACCAAGCTTCGCGATGCATG
 AAAGCATCTACCAGATCGTTACGACGAATTTGCGGAACGGGGATATCGCACCCACGGCTCAAGACACTGAT
 CATAGATACCGTCGTCGTAATACTCCATATCCAGCTCGCGCTCATAATCGCTATAGCTGAGGTCTTGGCTTG
 CGCTTCGATTCAGTATAGGCAAAAGAACTTACCAAAAATGTGACGATTGCGGCTACCATAAGCATGTTTAC
 GAGCGCCACGATCATTCCACTGTCGAGTCTTTGGCTTAACTTGTGTTGTCGTATTCACGCAAGATCAGAACA
 GGGTCAACAACCTTTGTCCATGTGCGCTAGAATGATACCAGCGCAGGTAATAAACCCCTTGAAAATATCAA
 ACCAGCTTTCTCGTCCAGAATAGTTACACTTAGCATGAACAAACCCAGTCAGACGATATCCGTTGTGAAT
 GTGAAATCCGTTTTTATCGATGCCGTCGCGAATCTCGTGGTAATG

CTTAGAGTAAGTACCAACATGCATACTTGTTCGAACTTCCACAAGCGATTTGTAGACTTAACCA
 GATTGATAAGCTTATCATCGCGACGCTCGCCGTTTGCAAACACCGCAGTGTGAACTTTTTGCAGATCGATT
 TTCATAATCTCTCCTTGATAAGATAGCACCAGATTATCAGAGTCTTACATAAAAGTAAAGAGGGCTTTCGC

CCTCTTTTGTGTTTTAGTCTAGATTAGCGAACAGTTCGTCGGAATCAGAGCCTTCTACGTCCACTTCTTCCA
 GTTGATCGATTTCTTCTTGATCAGCGGTATCAAGTTTTCGTCCATGTTAACAGGCATTTTCAGCTTCACCGC
 TAAACAGTTCATCAACTTCATCAAAAACCTTCGTCTTTGACTGCAACTGATTTTCAGTTTAAACATGTCGGAA
 CATGCTGTCTTGAACGGCTGGTGCGCAAACATAGGCTTCCAGAATTCCAGACAGTTTGTGTGCAGCACGAC
 GCCACTTGCGATCTTCTTCAACCAGCTCGCCGGTTTCTTCGTCCAAGAATGCACGACTAAACCACCCGTTA
 GACGGTTTAAACAACGAAACCAACTTCCAGTGCAATGTCAAGCATAACCGGAGTATGTGTTAATACCACCTT
 GGAAAGTCACTTCTAGCGGCAGTTTGCTTTGCTCTTTGACGAAACGGGATTTCTCCATGTTTCAGCACAAAG
 TTATAACCCAGCAGTTCCTTTGCCGCTTTTCTTCTTGTGACGACCGATAATGATAACGGTGTTCGGAAGAGTA
 AGTTATACCAGTACCACCGGAAACGACTTTCTTGGAGTACATTTCTTGGGTATCGTAGGTATGTGCAACCA
 TGATCGCAGGAATATCATTACTGTCAAGTAAGGAGTCATCATTTCGTGTCAAAGACTTGATCTGTTTTGCG
 CGAGTCATATCCGATACAGATTTTTTCGTCAATCGCATCGTCAATCTCTTTCTTAGAAGCAGCGTTGCCAAT
 TGAGTCAACAAACACGATAACACGGTCACCGCGCTCAATCGCTTCCAGCTTCTTGACGATATCGAATTTT
 AATTCTTCGATGTTCTTGAACGGACAATGAATAACACGGGAGATATCTACGCCCTGCGATTCAAATAAC
 CAGGAGTTGAGCCGAATTCGTTATCAAAGAAAATACATAACCGCGTCTGGATATTTGCGCAGATAAGCAGC
 GACGAATACCAGAGACAGGTTAGATTTAAAGTGCTTTGATGGACCAGCTAATACAGTCAATCCGGGGGTA
 AGACCACCGTCCAATTCACCGCTCATTGCCAAGTTAAGCAATGGAACCTCGGGTTCGAACACAATCTTTAT
 CATTGAAGAATTTACTATCTGCCAGAACAGAACTCATTTTATTACTTGAGGTGCCTGCCAGTTTAGACATC
 AGACTTCTAAGTTACCGGTTTTTCGCAGTTTTAATACCTTTTCGCCATTTTTTCAGTTTTGCCTCTTGTACGA
 TTTTAGATTTTATAACAATCATTTTTATTCTCTCACCTACTAATATGGGGCTATTATCTCATAGCCCCTCT
 GATTTATAAACTTACATGTCGCCAAAAAGATCAGACAGACTAGCTACTTTCTCGGTTTTCCAGCCAATCGC
 ACTACAGATATTTTCGAGCGGTTTCAGGTAATGTTTTTGATACATGCCCATGAAATCGAGATATTTAGACA
 AATCAAGATTGAAATCATCTGGAATCTTATCACCCTCGGGAAAGCAAGCACAGGTGAATGAATATGATT
 CGGCTCTTTTCAGCATCACGATCTGAATTTTTTACCCTTCGAATCATGTCAAGGTTTCGCTGCTCGGCTAC
 TTTGTTGTAAGCGAGTGCTCCCTTGATGTGACCTGGACAACCTTTGACTGGTACCCAGTTGTTGTGGTTCTT
 TTCGATGTTGTTTGCCTCGACACACTAGCAATATCTCGGTAATCGCGCTTGGGATACTCGGCCTTGACTT
 CCTAACGTAGTCTTGCATTGCCTGTTACCCTTGGTCAGGATTAGCTTGATACTCTTCTCCAGCGATTTGC
 CAGCGAATACCGGGTACTCGAACGTTGAGTTTCAATGCCCATGATCTTCAACTTCGGAACAACGTTACC
 GTGTTTCGTCAAGCTTTCGCTTACCTTCTGAGTCCCACACATTAGCAGCGTACCGCTTTTTTCGCAGTCCAGA
 AAGCAGTATCAGCGATGATTTCTCGGTCCATGAACAGCTTGTGATCATAAACTGGACATATTCTGCGAG
 TTCGCGATAGCTCTGATCGATATACGGCTCGCACTTCTCTTTAGCAAACCTTGGACAGAAAATCTACCCAAC
 GAATAGTTTCAATGTCACCGACTTGAATACCCTTCTTCGCTGCCATGATATTGACGAACTTTTCAAACGTC
 AGATAAATGGAGTCAGTATCGCCGTAACGACATAATCCACATCTTTGGTCTGACACAGTGCATTTCATAT
 ATTCATTTCATCTTCTCATGATCCAGCGAATCGCAAATTGACCCTCATGGTAATCGCTTCTGCATTTTCA
 ACGTCATAATAACGGAAGTGTTTCGTTGCCAATGCGCCATAAAGTGAGTTGATAAGTACCTTACGAGCTT
 GTTGGTTAACGTTTTTCGAGTTTCTCCATGAATCGGCAGTAATCGACGATGCCATGTAGAGATTCGTTGTTG
 AACGTTTTTCAGATTCGCGATGAAATTATCAAACGTTTCTCCCTTGATAGAGAGATCAATGCCGTGTGCGTC
 GAAATCAATATCGGTATCTGCGATGTTATTATCTTTGCGGTCAACGATTGTATCCCAAGCGA

TTGTCGCGATCTTATCTGCTGTAAACTCTGCATTCTTCGCGGCTTTACGTTGCAAGAACACCTTTTC
 GATTTTCAGTGGGGATAATGCCACGTTTCTTTCTGGTATAACGCATCCCGTTAGCAGCGAATGAAAGATCGT
 CATTCCGTAATTGGAATTGTTTGTCAACGAGTCCCATGCCAACGATATCTGGTACCATGCGGTCTTTACG
 AACACGCGAGGAACATCATAGCAATCAATAATCGTCTCTGGGCTAATGTTCCAACCCATGATCAAATGTG
 GATACAGGGATGTTAAGTCGAAACTCAGAATCCAGCGATAAAATGCCGTAACCTGGGTCTTTAACAACCGC

GCCTGCATACTTGACTTTTTGATGTACGCTTGTTTTCTGGTACAACAATGCCTTGCACAATCAGACTGTTAT
GGATGATCGCGTCCCAAGTCTTCAAGGGACTAAAGGTGTTGTTATAGTTGATCTTTGCGTAATAGCTTACG
CTAGTAATCAGCGCCATCAACGACAAACGAGCGTCAAGTTTAACCAACAAATCAACGTCTCGGATAAGAT
AGTCGATATATTTTTGCGGATTCTTCTGACTGAATGCCAAGTATGTTTTCTCGGTAAGTAAGTGTCTTCAC
CAAATCTAGCTACCAACTGACTATACGTGACTTTGATCTCGTGGTCAATCCCTTTGTTTGATAGTACCCAG
AATTCTACCTCTGGGTACACTTCGTTTATGTTATCGAACATTCTCCACCATCGTAGTAAAGCGACCTTGCTT
ATGCATACGAATGTGGCGATTGAAACTGTCATCCATAGCGTCTTTACGATGCGAGATAACAATTATGTTG
GACTTCATACTATCCAGCATTTTTGTTGATTCCAACGATACCCATTTTCATCACAGGATCCGTGCAACACTTC
GTCCATGCATAGCAGGTTAATATTAACACCACTAATCATACTGCTAACGTGCGGCCATGTAAACAACAAA
CTGAGGTTGATCCGTGCTTTCTCACCTTCGGAGAAGGAAGCATAACAGAAATCTTCTCTACCACGAGATTT
GATTGATTCATTGAATCCTTCATCAAGCGCAAACACATAATCGGCACCCAATGCTTTCAAATACTCGTTGA
TCTTCTTGTTAAAGACAGGGATATACCGCTTAAACAATGTGCGCTTTCACGCCATTATCTTTCAGCATATCA
GCAACAATCGAACGGTGATGAAGTTCAAGAACAATCTTCGCGATCTCTTCTTCAACTCATTAGCTCTTTG
AATTGCTGCATCAACTTGAGAACGATCATACTCGGTAGCTTTCAAGTCGTCAATCTGTTTTTTCAAGTTTCT
AGCGTTGTCAGCGGTAGTCTCATAGGACTCGGTACCAGTAGCGATACTAGCTTTCAATGCTTCCACATTGCG
CTTTGTATTGTGCAACATCCAGGTTGTGTTTTGCAACACGTTCCGACTTCAACCGCTCTACCTCGTCTTCCA
ACTGAGACAGACGATCTTCCAGTTCGGCTTTGTTGTCTTTGAAACTGTCAATAGCCCAACGCTTCTCGTCT
TCGAGAGTTCGCATATTGCGATCATACTCGATTACCTGAGTGGCGTGATTCAATCGCATTTCCTCGATCTC
TCGATCAATGCGACGGATCTCGGCTTCGTGGTGTTCGCTAATCATGCGGCACTGATATGCATAATCATTGCG
TCTGTTTTCTGTACTCGCGACGCTTTCGCTCGTTTTTCGTAACAGTTGCCCGATATGTCTTGAGATCAGTTT
CGTATTGCTGTTCCCTGTGCAGTCAGACCGGAAATAATCTGGTCTGCTCAGATATTTTAAACATCAAACTA
GCGATCTCGTTATCGATTCAGCAATGCGATCATGCGAGTGATTAGAGCAATCTGTGCCGCAAGTCGGAC
ACTCACACCCTTCTCAAAAATTCGCGACGTCCAACGAGCTGGCGCTTATCCAGTTCGAATGCCATCTTT
AGCTGATTGGCTAGTTTCAGTTCTTCGCGAACGTTCCACCACAGTCGGTTCAGACGCTTCTACATATACCGG
TTCATTGGGAATAACAACGGCAGCAGTTTTAGCGATCAGATCTTCTGAGTTGGCTTAGACTCTTCCAACA
TCATTTGTCGTGAACTAACGCGCAATCGTGTGGTTGATCCAAACGCAACATAGCGATCTTGGATTGAATC
TCGTCCAACCTTCTTGTGAGAAGATTCAAGTTCATCAATCTGTGAATTCAGATTATCGCGTTTGTCTTCC
ACTTCTTGCAGTCATCTTGTCAAGATACACAGGCTCAACGAGAGAATCAAGCTCATTTTGATTTTTTCGC
GGCACTTTCTTAAACGCTTTCGCTGATCTACCAGCGCACGGAAGTTCGTGGTAAACATAGCGATCATGT
TATCAGTTTGTCTGTTGTGCTGCAATTGAAGCTTCGGCAGTTTGCTGTTTCGCTTTCGCGGAAGTCAATT
TCACACGCAACAGATCAAGCTCGCCCTTCTTCTCTTTGATGATACCCCTTGTTGATCTTGTCCATGTCACCGA
TAACGGAAACATCCAGCAGATCTTCAACGAGTTCGCGACGCTTACCAGCAGGCAGTTCATGAACGGCTT
ATAGCCAGCAGTACCAAGTACGATGATTTGTTTGAACACTATCGTAACTGATACCAAGCAGCTCAGTTTCA
AAATACGATTGGTATTAGTGGCACTAGCAACTTCTTTCAGAGGCTCGCCGTTCTTGGTGATTTTCAGAAT
GTTCCGTTTTGATACCGCGCTCGATGTGATAGCGATCTTTACCAACGCTCAATTCT

CCCTCAACATGGAGACCCTTCTTGTCTGAGAGTTCACCAGTTGCGCTTTTGTTACATCACGAAAC
GCTTTGCCATAAAGCAGGAAAGTAAGTGCTTCGATAAACGTAGACTTACCAGCACCGTTAGTGCCAGTGA
CAAGCGTTTTCTTGTGTTTCGTC AAGAGTGACGCGAACCGCCTTCGCGCCAACCTGACATAAATTTCTGGTAT
TTTACCCAGTGAAATGAAATATCCATTATGCTCCCTTACCGGAGTTTGCAACTGCATATAGATCCTGAACA
TACGCACCAACTGACTTTTTATCGTCATCGTCCAGTGCCAGCCCAGTAACGTAGTCTTTCATTTGCTCAAT
GACTTTTTTCGTATCGGTGATATCCTCAACATCGGAAGAGAAATTATACACCTGCTTCTGACGGAACCTCAT
AGCACACATTTTCGAATTGTGCCATAACTGCATCGAGCTTGTTCATCGAACTCATAGATTATCAATTCTACG

ATCTTGCCCTTGCACCTTGCAATGACTTTGGGATCAAATCTTCTTGTAGTCGATTTCGCAGATGCCAGAT
 ATCTGGGTTAGCGATGAATTCCAGCTCTTTTGTATCAGTATCGAACACCCAAAAGCCACGAATCTCGTTGC
 AATCGCCCATAGTCAGGGTATACGGTGTGCCGGTATAACAACACATTGCCTTTACGGCTAGATGTGTGATA
 GTGGCCACTGATAACTTGCTTGTAGTTGCTCAGGAAGTCAATCGCCTCACCGGTAGACGGGATGCCCTTGT
 AGAACTCAAATCCGTCAAGTCCCAGTGTCCAACGCAGTATTTCGGAATCAGTAGATTTCGGCGTATTTCTCG
 ATTGCTTCTTTGTTTTCCGCGCACTTCCACGGATACAGATCCCATAGAGTATCACCAAACGCAACGGTAGT
 CGGCTTGTCTATGATATGAATTCCAGGTACATCATGGAACATTTTCGGTAATCGAGTTTCGGCATGATCTTGT
 CTTTGACATGCATATCGTGGTTGCCAATCAACTTGTAGCGATCAACGAATGCATCCTCATAACATTGGATT
 AAGCACTCGCGCTGAAATTTTCATCGTCTCTTGAGACAACCCAGCACGGACGTCAAACCAGTCACCAGTCT
 GAATGTATGCAGTTATACCATGCTTCTTAGCGTAGTCGCACAAAACTTGGAAACCCAGATAGATAGCGTT
 TTGCATGTACTCGCTATCTTTTTGCGTCCCAACATGCTTATCGCCTTCAATGATAAGTTTCATATTGTTTTCC
 TTGTGAATAAGTATAGCCATGATACATCAAGATCATCAAGTAGTCAACATGTGCGCAGCACTTCGAGCGC
 AGCGAGACAAAACAAAATCTCTTATAGATCTTTAATGAGAATCTATTTTGTCTTCTTAAGGTAATCAATG
 AGTTAGCTTCGCAGTGGCAAGCCACTACCATACGAAAAGCCACCCGAAGGTGGCTCAAATGTCAAGCGT
 CTTAGCTTTGATGTATCCAGTTTGTTCGATGTACTGTTCTAACTCTTCCCTTCGTCCACCGCTCTTTGTCAAG
 AGAAAGCACTTCCCTTGATCTTTTTCTGATACTTTGTTCCTATTGCGTCATAATCTTTACCGCATCGATTTTC
 ATAACGCTGTCTGGCCAACGATTCATCAATAGGAAATTCTACCATAACGAAATCATATTTCAATCGCTTGT
 ACTCAATAACAGGTTTGTGTCCGTCTAAAATAACGTATTCATACCCCATAGACTCAAGCTGTTGTAGTGAG
 TGCTGCAACGCGCTGTAAATTGTAAGTACTGCCGGAGTAGTCTCGAAACAATGGTATGTGTGATTTGAACTCCT
 ACATTTCTTATTTTCGATCATATGCCCGATTGCGCAGATTTTATCATTAAACTTGGTATAACTAACTGTTGT
 TCCTTTAGGAGAAGGACAATCAATTTTATTTCTTGCATCCGGATTGAATTTATCTACCAGCGAATACATAT
 AGGTAGTTTTTCCCTGCACCAGGAATACCTAATAGCATTATTACTCTCATATTACCTCTTTAGTTTTTTCATAA
 CCTAATTATGGCATACTTTATTTGCAAAGTAAACATAAAGGCTCCCGAAGGAGCCTTTATTACGCAAGTTCT
 AATCTGTGAGGTAGATATTGCAGTGCAGGCGCTGCACCCGATATCAAGTTATTATCGGTTGTTGCTGTACC
 AGAAGCGAATCCAGTTGCCGATATCAACTTGGGCAATTCAACCGCACCAGCGGTTTGCCATGTGTTTGCT
 GTTGTGTAATATTTGATTCCGAATGATCCGGTTGCACCGGCAGCGGCACCATCAAGATAATAAACAGTAA
 CAGGTACAAACCAGATATTACCAGCAGCATCTTTGCCTAATATCAATTTGTAATATTTCGGTCCGGCAGGTT
 GCTGCTGCGACTGGGTCAACGTCACCTTGTCCACCGGTATATATATTATTACGATAAACCCAGCGTTATT
 CAACGTGCTTTGTTTATTAGTTTCAAACCTGAACTCCAGCAAATGCACCATCAAAGAATGTATCATTATCCG
 TACCGCCACAACAGCACCAAATTTCTGAATTA AAAACCAGAATCTAGCTCGTTTCTCTGGGTCAGTTGA
 ACCACATCGCAACGCAATATCACTGGCTGGTAGTGTATTACATACGATTGGAAATAGAAATCAACTACG
 TGCTTTGTAGGACTATAAACGTTTGTGTATCTCTTGTAAACGAAGTTCTTTGGATCACCAACTCCGGTATTA
 ACGACTTCTGTTACAACCTTTAGAACTTCCAATCTGACGAATCATCGCATAACTTGAACCT

AATGAGTTGTCATCGCCATAAATTGTATGTCCACCACCGGTATCATAAGTAACTCGAACTTTTACC
 TGCATATCAGCCGTAGGTGTTACAATTGATCTAGCGATGGACTGTGTGCTAAAGTTTTCCGTTGATGTTGC
 TGCAACTTTACCTCCATATGTACCCGTAATCTGTTATTAGCAGAATCAACCCAGGTATATGCAAATCGTC
 CATTGCCCCAAGTGAAGTAAACACATCACAACCTAACTCATACGTCTTATTTGCTTTTCAGAGTAAACACA
 CCGTTATTATTAACAACCTTCTCCAATCGAAGTCACATTAACGCAAATGGCAAATCAAATTGTGTGTTGGT
 ACCAGCAGCAGAATATCCAGTTGTGAATCTAGCAAGCAAGAAATCAGTTCTGTGCGCTTCTAATATAACA
 GTAGATCTATTATCAACAATATTTGAACCGTCAATTTCTTCTACCAGAATCCAAGTATCACCGCCATCATT
 AGAGTTCTCGCCTCCAGCAACAATATTATGATTCTGTCCGGAATAAGCACAACGAAGACTGATCATATTA
 TTTTCTGTTGGAGTAATATATGCAATTCCAACCGGAGTATTTGTGTATGCAGTAGATCCCCAGATACTAGC

GTACATCTGATCCGCTGGCCAAGACGCAGTTGTATCATTAACACACCCCATCTAGCCCAACTTGTTCCCTA
ATCCAGAAGCAGATATGTTATAAGTGATCTTATATGTATATCCAGATCTCAATGCAATTTGTGTTCCATTG
CCTCTTGCAATATTATCGCCAACGCTTCTAACTGTCGTCAGTGATAATATCGAGTTTAATGTTTGTGCCAA
TGCGGTAGCAGATAATTTAGCAAACATATGTCCACGAGCTGTGCCAGTTGCAGATGATGAAGTTAATTTTC
CAGTATCTAGTAGCAAGCACAACTGATAACTATTACCAATGGGTGAGGTATAAGTTGCATTGTTGCTG
GATTACTTGGGAACGTGATTGTTTCCATTTTGCCATCATAATCTGCCCATGAGTTATCCGGACGATGTAAT
AGAACTTGATTCAAGTTCATATCAAAGTAAATCTTAACTCCGAATGTTGGTACACTATACGAATTTGTCAA
TCTATAGCTTGTGTATGACTGATTCATATCGACTGTGCCAAGTCTTACCCATTCTTTTCCAGCATTGAATAT
TTGACCAGGCGACACGTTTTTGGTACAAATATAAACTGCTTCCGCTAGTCCATATCTGACTAGATCTCCAG
TATAATATTGACGGTCGATTTCAAATCCAACAATATTCAATGGCTCAAGTTTAGATAGATAATTCTGTAGA
CCGAATGCTGGCACATTACCAACCAACGGCATCCATTTTGTTCATATCCAGTTTGATTGTGTTTGTGAATT
CAAAGTCTGAGTCGAAATAACATAGCACATATAAAGTGTAATATCAGAATCATTCAACGCAATAACATCA
CCGAATGTATAGTTAGTATTAACAGCGGGAACAACCTCTCCACACTGGTTGATATCTACCACCATTTCAG
TACCGGTCTGAATGTCTGTGTGTTACCAGAACCCACGCGAAATTCGTACCAGCGACGATGGCCGCGTTG
GCCTGCGCAATGATACCCTGATAAGATACAATCGCATTAGCATCGTATGAAAGACTGGTACTGAACACTG
GTGCAGTTTTAAAGCCAGTCAGTTTTGTGAAGTAATTCAGTTCCGTAATTGCTTTGCCAACGCTAGTAATA
CTCGCACGATACAGATCTGTCTGTAATAGAACATATCACCTTGGCAATAACACGATCTAGTAGCGGGT
TAATTTTCATCCCAATCCGGTACGTTAGTAATTTCTGCCGCTGTTGTTAACTCTTTCCAGTTAGTTGATAATG
TACCAACTACGAATGGAGTATCATACGGCATATCACCATTTGCGCGATATACTTTATTATCACGGTAACAT
AGATCGTCTTTGATCCAACCTTCTTTGTTGTTTCCAATCCGGTACGTTTGTCTGTTAATGCGGCTTCTGGCAAT
TGTGATTCCAGAATCTTACCATCGCTATCTGTAATAACGATATGAGTGGAAGAAGCATCAGCCCAACGTC
CATCATTCCACACTTTCCGAATGTTATCTTTGATTGGCTGTGTAACATAATGGTATTCTTTCTGCCATTTTGT
CAATCCTCTTGTTATATTGATTATTTAGAGAAAAGCCACCCGAAGGTGGCTTATTATATTATGACATTTTT
GTGATTTTCCACCACATTCTATTAGATGATGGAGCGGCATTGCTCCATTACCAACGGTAACATCAATTTT
TAACTTGATGTCTCCTGCGGCTGTATTTGATACCAACGCACATCCAACAGAAGCGTCGCCATCTTTCCAAG
ATGATGATGTAGGCCAGAACTAATAGTTTGTATGCCTCCAGTTAATGTGGCATTACTAACACTACCTAAT
GTTGAGTAGTAGTATCCATCTGCAATAGATCCATTTGACATTGCCATTGCCATTCAAAAATATATTTCCC
AGCGGGAAGAGTTAACGTTGATGTACCAACACCACTGACACCAATTGAGTCTATCAATGAACTGAATATT
GCTGAATATCCCGTGCTTGCGCCGGTGTGGAGAATGTTCCCATTGCCATCTTCGGACTAACATACGCGGC
AACCGCTCCGCTGTTTAGTGTAGTGACATCAAATCCAATCCCCCTAATCCAAGCGTATTACCTCCCCCGA
CTGTTAGCGTCAACGGCAATGCAGGTAATACTCCTATTTGAAGCCATACTAAGTTGTTAGTTGGTCCATTT
GCAACGTAAGTTCCGGTAACGGATCCGGCTACCCAACTCCGACATAATCTCCGATTTTAACTTGTGAAC
CGGGAGAAACGGAAGTAGTTCCACTCGCAAATGTTGTTGTGCTAACGAGATCAAACCTACCACCAGTGCT
AAAAGAACTTTCCCATGGTGTATTCCTCTCGTTTCGATGTGTCCATATTAGCAGATCAATACCATGTGTCA
ACTCTTTTGGAAAATAAAAATCCGCCCCAAGGCGGATTCTATTAACTTCTAATTCTTCAAAGAATGTTTC
ATCGAGAGTCGAATCAACTTGTCCGATCAGATAGCTAGACAACCTCAGCCTCTTGGGCAGCGACTTGAACG
GAATCGCTGTTAAGCCACTTGCGAATCCACGGCAGAGGGTGTTCATACCGATGTTTCACTTCTTCTGGCGC
GGGGAGACCAGCAGATCGCATAACGGCTTACAGTCAGATAATCGATGTAATCCAACATACTGGACAGACTC
AAGCCGGGAATAGTCACATTACCAAGCAAGTCTCTTGCCCATCTTTCTCTTGTTCAGCAACTTCCAAGAA
GATTTGCACCGCTTTATGTTTCGAGGCGTTTGGCGATCTCGTACATTTCCGAATCATCTTCTGCATTCTGCCA
AGCACGAATCAGATACTGGGTGCCTTTCAGGTGAAGCTGTTTCATCCCGCGCAATCAGACGCATGATCTTA
GCGTTGCCTTCCATGATACCACGCTCACCGAATGAGAACGTGCAAGCAAAGCTAACATAGAAACGAATCG

CTTCCAAAGCGTTTACGGCGTGCATTGCGAGATATAACGCTTCTTTTACTTTAGTCAGTTGTGCAACTCGC
 AACTCCGGAGAGAATACAGATTGAGTCAACAGATCATAAGTTTTTCAGCTCTTTGATCAGATTGTCATAAT
 ACTGAGTTACAGAAGTGGCACGTGCCATAATCTTACTGTCAAGCAGAATCCTATCAAACACAGCAGACGG
 ATCAACATAGAGATTCCGCATGATGTGGGTATAAGAACGGCTATGAATTGTCTCACTGAAACTCCATGTG
 GTGATCCAAGTTTCAAGCGCGACATCAGATACGATTGGCAAGAATACCAAGTTAGGTGCGCGACCTTGTA
 CCGAGTCAAGCAGACTTTGATATTTCAAGTTTTGAGTGAAAACATGTTGTTTCGGCTTCACTCAGTTGATTA
 TAGTCGATTGCATCCTTAGACAAATCCACTTCTTCGGGACGCCAGAAAAATGAAAGTTGCTTTTCTGTAAG
 CTTATCAATTGCCGGATGTTTTACTGTTTCATATCGAGCCAATCCCATTGCTTCGCCAAGAACAGAGGGC
 CTTTCATATGATCAACTACATTTTTATTAAATACGGTATCCATTTTTATTCCCTTGTTAAAAGGGGACGAATC
 CCCTTATCAGTTATGTTGTTTCGATGTGGACATCATAACAGGCTGATTTTTGATGTCAACAAAAAAGGCAC
 CCGAAGGTGCCTTTTATTTTTAAAGCTGTTTCAGTGAGTTTCAGATAATCTTCAACTCTTTCCTTTTCAGCT
 TCTTACATGCTGAATACTCGCGGTATTCTGTGCGCTTGGCAGGGATGTAGACACGAACGTATCCGTCATCC
 TCGTTGCCGCCTTCGATCTTGATTCCCGCAGGGAAATCAACTTTCTTGGGTTCCACGTACTCAAGACGACC
 GTTCTTCCATCTTGGCAATTCGCCATCACGGAAAGAATAAACGATGTAATCTTGAACACTAGAACGCTTG
 GCTTCGGTAAGCATTTCACCGAACTTCATTGTTTTACTTTCTTCCAACGTTCCCTTCATTTCTGCTTGATAC
 GCTTTGAACTTGTCGTGGCGGTTTAGCTCGACTTCATAGCATTTTAGAATTCGCAGTTGTTTTTCTGGATTA

AACTGCCCATTCCGGACTGATTACGTTTGATTTTGATGTTGCGTTAGGCACACCAGCAGAACG
 ATAATCTTTAATAGGCTGACCCAGAATAGATTCCATTTTCGAAAACATATCCCTTTGTTCCAGCTTGACGTC
 CATAACCGGAGTTACCAACGTACTGCAAGATCTTATCAATCTTGTACTAAAGTAAATACCGTCACCTAGC
 ATACGTCCAACAACAGATGCATCCTTACTAGGAATGATCTTAAAGCCGTAGCGTAAAATCATGTTAGCAG
 CGATACCACCAGTTCCGTGAAAACATGGAACAACCTTGCTCAAGTTTACCAGCGTCGATTTGCTCTTGCATG
 AACTTTTTGAATTCACCGTCAGGGAAACTCACGGTCATACTACGCAGAATTAGCGGATAAACATTGCCGT
 GTTACCAGCGTAATAGTTGTGCGATCAAATGCTTACCAATCAGGTATTTCTGTTTCGTTGGTAATATTGTCG
 TTCGTCGCTTTAACTTTCCGGAACAACACCGTCACCCTTCGCAGCTTCTGCCTTACTCGCTTGATATAATCG
 GTGAATTTCTCATTCTTACCGAGTTTGAGCTTCGCTTGTTTACCAACTCAGTTGGGTTAATCTCGTTAAAC
 TCAAACATCTGTTTAAACACGACGACGATCAAGCTTATCGAACAAGTTAATTGGACCTTCAAGAACTTGTC
 CGTAAACAAACTTGATTGCAGCCAATTGATCACGAACTTACCAGATAATATGTTTCCAAGTTATCAA
 GAACAAGTCGGTAACAGTCGGGTCGGTTTCTACGGCGTCGGTCATAATGTCAACCAATGATTGCTGCATA
 CCTGTTTGTGATCGCGAACGCTAATTGATTTACCGTTCTCAGCGTTAAAGAACTGAATCCGTTCTTAAAC
 TTCAAGCTTCATGAATTCTACAGCATCTTCTCCCTCGAAATCATAG

TATTTCAAGAAAGCAGAATAAAGATTGTCAAACCTTGCTTGAGGTAATACCAAGACTAGAAAGAT
 CCAGATTTTTCCCAATACGCTATAAGCACCTAGGAAAATCTTCTGTCTGTGTTCTGGCATTGTGCCGCGA
 TTTGACATCAACAAAATGCGAGTCTTTCCGTATGAGTTAGGTGTACCTTGAATCTTGCTCATAACGTATTC
 CGCACCAGCTTTAACGTCCTTTTACCATGAATGAAAATAGCAGACAATAATGCCCGTTCTTGTCTTCCC
 ATGGAACACCGGCGCTAGTGTCTTTCGTGATATAAGCGTCCAACGCATCCTTAAACGCGCTGCTTCATGCTC
 GGTACCATGTTTACTGCCATTTTCGTTTACGCGATTTGGGAAGATAACTCCGATTTCAAGAGCACGAATAAC
 GCACTTAGCAATCATGATCACATCAGCGGTATCCATACGCTCAAGCGGAAACTCGACGGAA

GTCTTGATGCGTCATTAACCTTCAGCATGACATTTTTAAATTCTTCATCATCCAGCGCAAAAACCT
 TTGGACCAATGTAGATTAACGAAACCGAAATCCGCATTTGTTTTGTTATCCGGATTCAACAAGAACCTCCAT
 GCCATAGCGACACATAGTTAACTTGCTTTGATCGTTCCAAGCACTCCAACGATACGGAGGATAAAAATCT
 TTGTACTTGTGCGTAACATAGTTAACGACTTGATCCCAACCAATCATATCAGCAAACGGACCAGTAAACA
 ACAATTTCTTTGTAACCATCAGTCAGATACGAAGAATAGGACATCATATAAACGTAAGCGGGTTTGATTAC

TTCCAACAGACAGTTGAAATACATTTGGCGAATCATTGGACTCATTTCACGCATATTGCCCATGATGCCGA
 TAACAATGCTATTCCCGTTCGTTCCCTTATAGTGATTACCATATCTTGGCCGATTTTGCCATTTGTCATTT
 CAAAGGCAACATCAATGCTATTGAATCCAAAGAGCCAGCAAGTCGGGTACGTTTTTCATATTACTAAACGC
 CATTGCCATTGTCTGATAACCGGTATATCCAATTCATCACCGAGAATGCTATATTTTTCTTTTAATCCACG
 GAAGAAGGAAATGTGTTTACGCAAGAATTCAACGTTTTTCAATTCCATTGCTTCTTCAATCGCATAAACGC
 TATTTGAGTTATCACCAAGCATATAATGACTGATACGTTTGGCCATTTCTGAAAGCTGGGTAATAGTAGCA
 GAGTATCGGGTACGGTACTTGTCTGCATTTCGGATTGCGCTTCATCGTTCAGATCGAATTCGAATCCAGT
 TACCATTTCCCGTACTTACTCACAATAGGATATGCAGTTTGAGCCAACCCATATAGACCTTTCAGACCGG
 TACTTGTGTTAACACACTCTTCAATCTGCTTGAAATGAATTGG

AGCAATCCCGCGTCATGATCATATGTCTGATAGTCTGGTTGAACAGGAACAGCTACAGGCTCGTC
 CTGGACGACCGGAGCGACGTCATCGGCAACGTCATCGACATCAGGAGACGCATGGACTTGTGCCAAGTTA
 TCGTTTTTGTCTGTCATCATCGTCTCCGGTATTTGATGTAACACCAGCACCAGCAGTACCAACAGT
 TACGGTACTCACACCAGCAAGACGCGCATATTTAACATACTACTCACGGTCCACAGATCTTACCTGCTT
 CTGGGAATTTTTGATTACGCGACGCAATTCCTTGGAAGTATCAATCAGACTAATAGCACCTGTCTTAAAC
 TTGTTTCATCAGATCACGAAGCTTTGGATGCAAATTCATCAATGCGGTAGATTTAATGTTTGTACCCAACC
 ACGAACGATATCATCATCAACGGTGTTAATAACTCCGGCTTTCATTAACTAGGAAGCGGGTCATTTCCG
 TTACCTTAGCGTCGCTGATAAACATTTTCTTATCAGTCATTAGTTTCAGTACCAGGGAAATGTTGTTGTTAT
 CGTCTCCGATATTCTTCAACATCAATTGGCCGTCACTCTTAAAATAACGCTCATACTTGCAGGCTAGAT
 AGATGATTCATCTGGCGTGCAGCGTTGAAACTACCCAGAATACCGATGAAGTTGAACATGAACGCATTCA
 TGATCGCGGTTTCGTCATCCACGAAAGTCGCTTTGTTTGCGGCATCATAGAGGGTATTTTCTGCCAAGAAG
 CGTTGGTAATCCTCTTCTTCTTGACGCTCGAATAATTGTTTGGTTGTTAACATTTATGTTCTCATTGGTGA
 ACTTAATTTACTGTATTTAGTGCGTCCAGCACTGCGGGCGTAAGCCGCTAGATCAGAAAAGACAAAATAAA
 ATCTCTTATAGATCTTTAATGATAATCTATTTTGTCTTCCCTAAGGTAATCAATGAGTTAGCTTCGCAGTCG
 CTGGCGCGACATCTACAACCTGGTCAACTATTGAACAAACAACCTCGGTGCGTGAACCTCGTTAACAATGCT
 ATCGATTATATCTTGTCTGTTGATATTTTCGATCAGCCAAGGAGTAAACTCTTGATTTTTGTTCTGGACAGT
 TGTATATGCGCCAATCATTGATCCATAGATACTTGGCATTGTATCGCTATCTAATCCCATGTTTGTATGA
 GAAAAATCCATACTCTTTGTGTTTGAACCTCTAGGAACACTCTCCAAGCGATTGTGAGTGAGTCCTTAACA
 TAGCCAGTAGGCAAACATGAGTCTTCATCGAAATACGCTCCAATTCGGTACGAAGCGTCTTTTGTTTAC
 TCCGTGCAATATCCGATGCATGATACGAACATAACAATAGAGTAATGCAAACACAACGGAACCGGATG
 GGTAACCTCCGTCATGTATTTAACGATA

CGTTCGATATCTTCTTGACTTCTGCCGTAAGTGGCAATTGCGACTGGATACATACGCATGAGCGC
 ACCATTACCAGCTCCCTTAGTTGGGTCAGTGACCGCTTGTTCGCGAGTATAGCATAGGCAGTACCTGTGC
 CAACATCAAAGCACTCGCCTGTGGAAGAAAACGCACCTTGCTCGATCCAGCGCGTCATATCACGCTTAAT
 TGCGGGCACATTGAACTCGCCATTTTTGAAATTGCGCATAGTGATCAGCGCACAAAGTGGTATCGTCTGTG
 AAGTTACCATACTTATTGTGAAAAACATCGCGATCTGTTTTCAGCAGATTCATGTCCACTTTGCGAAGTTT
 TTTCTTGCCTTTGGTGGCGAAATTGAATTCGTTGAATGCGCCAACACAATCGCCAATGATAGCAGATTGCG
 TGGTATTTTTGATAATGTGATCATGATATCTCATAAATGAAAAAGGGTCTATACTCGATAGACCCATAT
 TGACTTCTTTATTGATTTGAAATCAACGACGATGTGGAATAATTGATTCAGATAGTTGTTGACATAGAC
 AACATCACCAGCAACACGTTGCAGATTACAATCTTGTGTTTCGGTTTTGACGGAGTGAATACAACCTTGAT
 CTTTGCTATCGTCTTTGCTGATAATTTTTCAGCAGGATGTATTCTTGCATCGGGTCGATCATAGGCTCGC
 CGCCATTTTCAGAACTTCCAATCGAGTACCCTGTTGCGGTACAATTCGATCATGTGCGCTTCGGTGATA
 GCACGACCGGAAATCAGACCAGGATTGGTTACTTTTCGGGTTTTGTGTGAATAGAAGCCACCGGTTTCA

CCCATCCCATAGTACCAACTTCGATACTTTCATTGGTGATACCAAAGTTAACTTTGTTGACTCGGGTAATC
AGCGCGTTCCTCGTTAACGATGCGCATAGAAACACGTTTCGTGCTCGCTTCCAGATTGTATACCGGTTTCGAC
GTTGGTGCCAGTTCGCTCGATGTTTCAGCAGAACATAAGAACGATCTTTGATGTTCGATGGAGTCGCCCCGT
TTCATGTTCGATCAGTCGAACATAATTGATATCGATATTCGGCATAGCCACTTGATGTTTCAGATAATAAGC
CATGATAATTCCTTAGTGTGTGATTTTCGTTGATGCGGGTTTCGTAAACTTTGATCTTGCTGCGGAACAGAT
CCATGTTTTCTTTGTGTTCCATGATAACAGCTTGTGACAGTGCAGCGTTGTGCGAATGCATGAGATTTCGATC
AACACATCTTTCTCAGTAGCGTAGCCACGTTTAGCGCGTTTTGCTTTCAGTTCGGCGGTAGTCATCATGAT
TTGTTCCCTCAGTTCGTTTTGATGTAGCTATATTAACAGATCTGGATTTGCTGTCAATCGATTCTAGGAATTAT
TTTCACATAAATCTGAAAATGTCCTCTCGCGTGACGTTTCGCGATTGAAACTCTCGACAAAATCCTCGTTAT
CAATGCAACTCAACTCCGGACAAAGCTTGTCAAATAGCCAATAGGTATCGCTCTTGAAATCTGCGAATTC
TTGGGATTCTGCTATCTTTTTTTGATCTAGGATAGTAGTTGTTTCAGAACGTTAAGCAGATACAGGAGACGAT
TCCGCAGAACTGGATGCGTAATATAGTGACGGGTTTCATATGATTTTCATCTTTATCTCCAAAAAGGGCCCC
AAGGCCCTTGATCAAATTCGTTATCTTGCTCATAACAGCTCAACAAAGCCGAGTCCGTGTGCATCCAGAG
CGCCTTCGTGCTTCTTACGGATAAGAATAGTCTTACCTTTAGAATCACTCAAACAACAGCATCGGGAGT
GATCAACAGAACACTGCATTTCCCGTTCCGACTTTCAACTTCATCGGCGATAGAAAGAGGGCTCACCAACA
CCGATTTCGATATGCTGCTTTCTCAACAAACAGGCCGTTTGAACCTTGATTTACGAGCGATTCCAAGTGGCTT
CATTTGCTGACGAGTTACGCTATAAGTTTTGGAATCTTTATATACTCGGGTAATCTCTACCTCATAACGCAC
CGAACAGTCGGAAAGTAAGTTCGGTCTTGCCGTCTTCGGATTCAGCACGATAGAATGGAGAATATACTCC
AGACCCATTACTTACTCCATATCGAGTGAACATAACCAAACCTTGATGTTATTTGCTTCATCAACGAACGGCT
TACCCGCGAGGTGAATTTCTACAAGTTCACCCGGAACGTCTTTGATATTTTCGTTATGATAAAACATCTTT
TATCCTTTTGATTTGTAATAACCGGATTTGACTCGTTCGCGATACGCTCGACGTTGTTCTAAAGTCAAACC
ATCTTTCATCAGTGTTACCAGCTTATACGGTTTCGGCATTTCGGTCAACTGCAAATACAGATTTGTTTCACG
CGGAGCACCTGGACGTTTCTCAGATTCGTAAAGCAACGCCTTTCCGATGATTTACAATCTTTCGAATGGA
GATCTTTTGAGTAAAGAACTCAATCGGAGGCGAGCATAATCCAGTTACATCACGATCTTCTGCCTGATCT
CGCAGCTTATCAAACCTCTCTTTGTTGACTTCCACGTAATCGTGAGTTATTTCTCCGACGTCACAATATTCG
TCGTGTTCTCGAATTCTTTCAATTCTCATGATTTGAATCCGTAGTATTTGAAATCGACGTAATTACCAACAT
ACATGCCAGTCATATCTTGATAGATTATAGTCTGTGTTTCTCGGTCTTGCAACATCGGACTAGCCTTAGTT
ACATCAATTGATACCATATCCACGTTATCAAACAAGCAGGAGTTTTCCCGTCTTTCGACTTTACATCACG
ATCTTTCAGATTTTCAGCGACAGTCGACGAGTTACACCTTTGGACTTACGAATCACTTGAATAGTGAAA
ATAACATCGATTTTCGTGAACAGCTTCAATTCGCTTGATGTATGAGCGCAGTTTCTCCAGTCGATCTTCGGT
ACCGTTGAAATCAGCATAACCGGAGAAGTCTAAAACAACAACGTCGATTTTACGCTCTCTTCCAAGCTCT
ACCGCAGCGTTGCCAGAATAACAGATACCGAGGCAATAATCAACCATTTCGGTTGCAAAGAGATTTAACCA
ACAACAAACTACTCTCATTGTATGTCGTGTTGGAAGCACTTCTCAGATCGTCCGTGGTAAACATCACGCGC
CCCGTCTGAGCCTAATCTATTGCTTTTTTATAGCCTATCGCCACGCAACAAGTATATGGCCTATTGCTTGA
CTCGACTATTTGGTACGCCGCCCGGGACTCGAACCCGGAACCTATCGGTTAAAAGCCGATTGCTCTAAAC
CATTGAGCTAACAGCGCATTGTTTGGCAGGGGATGTAAGAATCGAACTCACGTCAACGGATTTGGAATCC
GCCGCATAACCATTTTGCTAATCCCCTATATTCTTACCAGCTATCAAATCCGTAATGGGAACACTCTTTG
CTCCATCTTTGACAGCTTTTGCACCTAACACAGTACCGATTGATCCGCTTTCGATTCAACATCAATCAGA
TTCGTTTCGTGCATCTGCATGAGTTCCATCATAACGCTGAATCTCAAGCATTGTAAACCTTACTTTATTCAAT
TTTCACCTACAGAATAGGACTTTTCGATTGTGACGTCAAGAACGGAATAATACGTGCTGTATTCCGAACCC
ATGTCGTGTAATGTGCGCGAACTTTACTTTTCGGCATCGTCTATGTCTTCGCTTCTACCAATTTAATGGTA
TCGAATGACTTGGATGATCCCATGTATTCGCTTTTCATATAACGTATCTTAGCAAGAAACAACATCGTTGT

CAACCTTTAACGTATAGATTTTTCGAAGTGTGTCCAGTCATAGGCTGAACTCCGCAAATTTCTCAGCAATC
 AGCTTGGAACAAATCTAGGAACAACGTGTGAGTCTATCGAAAATCGCTTGATTTCTTTATCCCAGTTCTG
 TTGTCTTTTGATCGCCGCAATCTGTGTTGACTTGATATCAAGTTCTTCCGCTTTCAGAAGCTCGAATTCTAA
 GTCATTGCTATAGGTAACACCATACGCGATTACGATATCAAAGTCAATAGGACATTCAGGCGTTTCGGTA
 TATCTAATGATCTGTCTCAGTGTTTGAACATCATCTTGAAACCAACCGCAGTTGATAAAGCATTGTCCGAC
 ACGTTCGCCGTTCTTCATGAACAGCGCCCAACTAGGTGCGCTCATACTTTATTTCTCAATAGAGTGAATCA
 CAGATAATAGTGAGGCAAGAAGTACATCCGTTAGGATGGCATGTTGCCGTTCTATCATCACAAATAAAAA
 CAACAGGAATTAATACCATATTAGCTTTTCATTTTTATTTCCTTGTATTGGAGTACCGGATCTGATTTGAAC
 AGACGTAAAAGTGATTTGCAATCACTTGCCTTACCGCTTGGCTACCGGCACGTTAATCTGGAGCCTCATTC
 GGAATCGAACCCGACACTACGACTTGAAGGACGGTATGTGACCACTACACCAATGAGGCATTTCTGAG
 TAGTCGAGCCGACTTATCCGTATTCTTTCAACGGTGAGCTGATAGCTACTCTAAACTTTAAATTTGGTGGA
 GAAAATGGGACTCGAACCCACGACCCCGCTTGCAAGGCTAGTGCTCTCCCATCTGAGCTATTTCCCA
 AATTCTAATA

GATACTCGCAAGTATACATTAGAATAGGCACTTTATGCAAGTACCTACGCAAGTCTTCGGATTCA
 CATACGGGAGCGGTGACTAACCCGCGTTACTTTTATATGCTGTTCCCTCTCAGCCGCACATCCAACCTACCG
 AAGCAAAGGAGTGCTATCCATTAATAGTAGAGTTTTGTTTTTGTATTGATTGCAGAAGTGAATCCATGCAA
 TTTCAAAGAGCAATTGAACTACTGTCCGGTAAGTTCATTTCTGCTAGGCAGAACTGGTGGAGAAGAC
 TAGCTTCGATTCTAGTAAGGCTTGTAAGCGGGCCATCACGAGGACCTGAGACTCTTTATCTCTTACTTC
 TCCATAAACTGGCGGTGCATACGGGAATCGAACCCGTATCTTGTGATAGACAGTCACGAATAATAGCCA
 TTATACTAATGCACCTAAATTTGGTAGTCCCGAATGGTATCGAACCATCCACATCCGCGTTA

TCAGCACGGCGCTCTACCTCTGAGCTACGGGACTAAAGACTGAAAGACTTTTTAACTGCCACCTG
 GACTCTTGTGCTAGAGAGTTGAGGAATCGAACCTCACCGTTTTCTTAAAATAGAAAAGTTATATTGATTGC
 TGAAATCTTCTTAGCACGGTAAATCATTATTGCGGAGGAGGTTGGACTCGAACCAACATAGGGTTATTA
 CCCGCAGATTAACAGTCTGCCGCTCAACCTTTGAGCCACACCTCCGCAATAATGACTTGCAAATAAGAAA
 CGGAATGAACTTTTTAAGGCTATTTCAAATAATGGCTTTTTAAGTTAGTTGCTGAACTATTCTTCTTTGT
 TACTATACTACTATTTAGTGACTGTAAACAAAGCATCTTAAATTTTTGACAGGCTCACTTTTTGATTTCT
 ATCCGCAGAAAAGTTTTGATTGCTGAACGGAGCCTTATAAAGATTGTATCACGTTTTATC

AACGTTGTAACTATCTTTTATTTATGCTCTACTTTAAGAGCATGTGATAATGATAGCATAACGGTT
 CATAGAGTGTAACATTCTTTATCACGATATCCCAACATTGCTTCATGCTACTGCCGGTTGAGTCCGAAGA
 CCGACTAAGGGTTCACTTCCGCTTTAGATTTACGGCATAACCGTGATAAAGACAGTCCGCATCGCAAATTG
 GACACAACGGCATCGCAATCTGCCACTAATGTTATTTAGTGTCTACTGTCAATCAGCTTTGGGTGGGTGCT
 GATTCCGTCCCACGAGCGTGAGCCACCGATACAGCTCGGAAAGATCTTACGGTTTTATCGAATTTCTTTACT
 TGTCGTAATAATACGGCTTACATTGACCTTCGAACTTGGTTTTACCGCCGAAGAATCCAGTACGATTCTCG
 CCATATGTATCTTGTGCATTTTCTTCCGCGACTTTCAGCGCGGCTCTGCACTCTGCTTCGGTGTCAAACCTC
 TCAATTGCGTGACTATGTGAGCCCCAATTAGTACCGAAGTTAACGAACAACGAAGTAATCAACAAGAACT
 TAATCATAACATCACCTATTGGTATAGTAACTTATTTAGTATCGCAGGAATACACTTCTTTACGCGGAGT
 AACAGAACGTTTGGTAACGTTGATCGAACTACCCTGATACCAGCGAGACTCTGAATCCAGCACTTTGTCA
 ACAACTGCCTCCGATTTGGGTAGAATAGCGTCGAAACAGGTTTTACCCATACTGTCTTTTCATGTGTGACCA
 GATAGACAGTGAGAAACGTTTCGATCTTGTACAGACTTTTACCTTGCACATTTCTTCGGACTGAGACCAA
 AAGACAACAGCGCAAGCAGAATTACAGCAGCTTTTCATTCTTCGATCTCCACAACCTGCACCGGTTTTATA
 AGATGATCCACAACCTTTTGATAAGAGATCGAGTGATCTTCTTTTCGTTACAGCAGGAACAACCTTGCTC
 ATAGTACACAGTGATCCAATTCATGTCAAGCTTATAACCGCAGCCATAGAAATGACGACTGCCGTGACTC

GGTTTACCCAGTTCATAGTTGACGACATCTTCCAGAGCGTTATCAATACCGTCAGAGTCGATGAAGTCTTC
CGGTGCGTCTTGTTTACGCAAAGCGTCCATAAAGTCAAACAGATTATCAATTTGCATTTTATTTTCCTCATT
AGCCATAGTAATACGTTATCGCATTAAATATGGCGGCTCTTTCGAGCCACCTCTTAGAAATCAGGCCATTTCG
TCTTTCACGATTAGACCTCCTTGAACTCCACGATACTTGAAATCTCGTTGAACTCGCCGATTTTCTTCATTG
ATGGAACAAGATTTCCGTTCTCGCCATGAATCAGATCTGGGTTTTCTTCCACTTATTAGCTGATACGTATT
CTTGACAGCTTTTCGTGTCCAAGTCAACAATAATTTTCGGACTAATTTTCAGTGGATATTCGCGAGTCCGA
TCATTCTCCGCACCAGCTACCACGATTTCGAGTCATCAGATCGGCATGATACAGATGATCGTTGTCCTGACT
GCCGTATTGTTGTGGGTTAAACTCGATGTTGAGTTCACACAACATACTAACAACTTACGAAGTCCGATAT
GCAGCTCTGCATTAGCGGCAGTGAGTTTAAATAACACGGTTTGTCAAGTTGTTTTTAGAGTAGGGACCCATT
CCTACATTGACAACACTATCGTATTCCCAAGAGAATCCCATACTGAGATATTCGTTGAACAGATCTTTTGT
CAGTCTTTCGCGAATGATCTCGGGCGCTTTCTGAATTTCTTCCATTCTGAACGCGAGTCTTCTTTAGTCAA
GCGTTTTTATCCGGATCTCGAAGTTCTAGTTTGGCGAACTTTCGCGGATCTTTTTGTGCGACTCAATAAC
GTATTCTTTGTTCCAAGAGTGTCAAACGTGCGTCTGATTCTGCTACCATCAGATCATATACTTTTCGCTT
GATTACCATGAACATAACCTGAGATTTCTTACCGCCCATAAACGATGAGGCTGGTTGAATATACAAAGCT
TCCTCATGCATTAAGTCTTGATATGACAGCTTGTTCAGATCGAATAGATCGTCGATGTTAACATTGCGATC
TTCGTACAGACGATATGAGTCTTACCATGTCTTGAACGCTTGGTATGCGGCATTATCTTCGATCTCGA
AGTTACCATAGTCGTCATACGTCGCATAAATGGAAGATGCAGTGCAAGCTGGTATCGATCCCAGTTATA
GCAACCAGGTGCGGCTGGGATAGTTTCTCCGTGACAAACGAGTGCCAGTAAAACAACCGGCTCGCCACA
AGTAACGATATGACGACTAACGCCACAAATAGTATTGAAAGAACCACGATATTTTCCTTTTGGTTACAA
AAAAGCCCCAGTTAAGGGGCTTTCGAATTGTTAAGCGATAGCTTCCAGGACAGCTTCCAGAGATTCTTCG
ATCATGACGCGATTCCGGTACGTCATACTCGGAAGTGCGGAACTCAACAGAACTTCACCATGGATGTTCT
CATGCAGACCAACGATCTTGTGACGACCAACTACGAACTTCTCGATACCGCGGTGTTCAACCGGAGTAAC
AACGGCGCGCTTGAGGTAGCAATCTTTCAGTTTCAGTGCCAGATCTTCGAAACGTTCAGAAACGGTATAC
ACAGTCGGCAGTTGACCGTCAACTTTTACAGTCAGCAGGGTCTTACCAGAGCGCAGCTTACCAGGCCAA
CAACTTTCTCGGAGTTGACTACAAAACGGGTGATGTTACCAGCTACCGGGGATACAACAAAACGGGACAT
TTTAGTTCCTTAAACAGTGATAGAAAATACATACTGGTCATTCTGAATGATTCCAGCGTTGTTGTCAACGA
AAATTTTGAATTCATTTCTTTGACGTTTCGATGTGAGCTTTCGAGCTTCTAATGCTACTACACTCGGGT
ATTCATGTCTAGCACCCGCGAAAATACAGATGCCGTTTAAACCATAGACTCGGCCACTAAAGCTTCCGTC
TTCATCTTGGTCTAGTATACAGATTAATTTCAACGTGTCAATCTTTTTATTTGGTGCAGTGGTGAGGATC
GAACTCACATGGCGGTTAGCACCGGCAAATTTAAGTCTGCTGCCTATACCGATTCCGGCTACACTCGCA
ATTCTGGTGGGAGTAGTGGGATTGCAACCCACACGACTATTGTCAACAAGTTTGGAGCTTGCCCTGTATG
CCAGTTCCAGCATACTCCCAAAAATAATGCCAGTCCGGATCTTCTCTCGTATAAATTGGACTTTATGGGAT
TTGTCAGATCCGACTGGACTTTTTCTTTTGTGTA AAAACACATTGTCCGGGTGGCGGGACTCGAACCACAA
CCCCTGCTTCTTCTGTACTCTCGTTAGAAAGCACAGGAGAAGGCAGATGCGCTATCCTGTTGCGCCACAC
CCGGACAATGTGTTCTAATAGACTGGAATCAAGGACTCCAGTCAAAATTTAAATCTTCCGTGTATTCTTCA
AGTATACACAGCTTGTAAATCGATTGTAAGCTTTTTGGCAAACAAAATCAGGACCAACATCATAACTAG
CGGTAATGTGTGGATGATAGTCAGGATAATCATGAGTTGCCCCATGCTTTTCTCTGATCTCTTTGTGTCTA
GCACCAAACCATGGGTCCGTCAACTTGAGCACAAGAGCACGTTTGCCGCTTTGAGTTTCAAAGATATCAG
GTATCATGACTCCTTGCAACACTTTATCGATCTTACCCTTGCTTGAACTCAGGCAAGTATTTTCTTGAGT
AGACCAACGTGGTATGCATTTTGTTCATAGGGGACAAGATTAGGTATCCCCATTTCTCTGCATCTTCGAACA
ATTGCCATTGCAGTGCGCGGCTTATACCGTACTGCTACGTAAGTGCCGCGCGTGTCTTGCTTAGTCGCTTC
TGTGAATTCAGAAAACGACTTTAACATTACTCGGTTACCAGCTCGCCGTCAACTGCTTTTCGGAGCTTTCAG

ATCAGCGATTGCTTTCAGATAAGCTTCCGGTTGAGAAGCGTCTTCGCCTACCAGGCCAGTTCTTTAGCCA
 GTTGAGCAAAGAAACCCTGATAAAACTCAGTTTCTTGAGTACGGGCTTCTTGGGCATCAAACAGACGAAC
 TTTTCAGGGTGTTCAGTTGCGCTTGCAGTTGTTGAACTTGTTCCTTGCATTTCAATTCCTTATATGTTGTTAAT
 ACTTGATCACTAAGTGCCGCTAATGTCGCGTCATTGTGTGGTACCGCGCTTGATACCAGCGAACTTGACTT
 CCAGATCAGCGGCGATTTGAGCTTTAACAGCTTCGCGGCCTTGTCTACCCAGCGACCGACAGTGGCGGA
 GAAACTTCCAGTTCACGGGCAACTTGGGCCTTGGTGACGTTTTTACGAACTACAGAAACATAAGCTTGGA
 TTTGAACGTTTTTTCATGATGTATTCCCTCAGAGTTTTGTGTGAATCGCGTCTCGCGTTTTCGATGTAGCTATA
 ATAACAGGACTGAATTACCGTGCAAGCACTTTTTAAATTTTTTACCAAGAAATTTTCAGATAGTCTCCGGT
 AGTAGATCGATGATCAGTTTCAACTACAAATTCCACTTCGTATCCGTGTTTGGTAATCTCGTTGATTACTTC
 GGAACGAATGTCGGAAGCCACATCATATACATAAGTAACGCGCTTTCCCTGTACCGATGCCGACTCGATT
 CGCTTGCTTATGTTGTTGATAAGATCGTTCATTCTGAGAGCGCGATCAAACCTTTAGATTTTCTCTTGCTTTA
 GATGCTGGAATCATTTTTACCACTCAATTTTCAGTTGCATTAGATTGCCGTCTCGTGGATCATTGAAACGTT
 CTACATCGACATTATATCCAACCCGTGATAATTCTTCCGAGATCAGACTTGCGATTGTTTCGCCATTAACC
 CAATAAGAAATGGATGTTTTCGCCACATACTGAACGAATTGCCGTTCGAATTTGCTTATCGATTTTTGAAAT
 ATGTTCCGATACGACCGTATCGGAGTTTTGAAACTGTTCTTTTCTTGCATCAGCGGCACAAATCATAATTT
 TCTCCAAATAGAGGGCCGAAGCCCTCAGTTAGTTTAGCCTACACGGATGATGTGATACGCAGGATACCA
 TCACAAACATCAGCACAAACACGGATGTCATTCTTACCAACTCGCAGAGTCA

TACCAGCTTGTGACCTTCTACCATGTCGTTGAACTTGATTTCTTCGTTGTTTCAGACACAGATTAG
 CTTTTTCAGAGAAAGCGAACTCGCCTTCTTGAGAGCTTTCTTACCAGAGTCTTGACAGAAGCACAACT
 TTGCCGGTGCAGTTCGCGGCGGTTGTGTTCAAACGTTACAAGCACTCATTCCGAAGTAAGT
 CAGTTTGTAACCGGTTGGGCCGTACATGTTTCATGATGTTTTCTCAGTGTTCGTTTCGATGTGGTCATAAT
 AACAGAACTGGATTATCGTACAAGCTTTTTCTAAAAAAATCCACCCGAAGGTGGATTCTTATTAGTAGT
 GACCAAGCTCATTAGCTCTTGCTTTGATTTGTTTCGTCGGTAAGAGCTTGTGATTTTTGATGGTTTTCGTCAT
 ATTCGAACACACCATCGGGAGAAATCAACACGTAATCGCTCGTTCCCGTCTCCGGATTTCCGGGTCATTGCT
 AACCCGAGTGGATGTAAACTTGGTCATTGATACGCTTGATAAGTCCAGAGAGGACATATCGTTCCAAT
 CTATCTTTTTTATTAGTAGCCTTTCGGGATGAAAGTCTTCGGATACTTCTTGATCACTGCCACGATTTTCGTC
 TGTCATGCTGAAATCAGGACGTTGTGCGAACATCTGCATGGCGATGTTAAACCAATGACGCTCGTTTTTGA
 AATCGTTGTTTCATGTTGATCGCGTAATCACGACGCTCCATGCCACGATACTTTTCATAAGCTTCGGTGAGC
 TTCTTCATTGCATCCATAACAACGTCACGGAAGTGATTATCGAAGATCTCGATCTTTTGCAGGCTGTTTTC
 ATCGTCACGGAACATCTGACGCAGATCGTCAGTGCAGTTTTTCGGCACATGCGTAGATCAGTCGCTCGCTG
 TTGTTGATACTGTCTTTGGTGTGATGCAGCGCAACATAACAGTCCGTTTTTCAGCTTGAACATTTGATAATC
 TTCCATGACTACCACGAAGCCTTCGATGCCAGTCATTTGATAGACTTCATCGATCCAAGCTTTGCCGTCGC
 CAGGAACTTCAAAGAAGTCAGCAGCGTATTTGACGAAAGTCGGATCTTTTTGCAGTTCGCCGAAATCAAC
 GTATTCGCCGTTTTCGTTATGACGGATGTTCAGAATACGGAGCTGGTGTTCATTGTAGCACAGAACGATTT
 GATTGTGAGGAGCAGTCCACTCCATATTCACAGTAAAACCGTTTTCTGCATATGCCGTACAGAACTCAAG
 CAGATCCTTATGATCTTCTTGATAACAGCCAAACACTGGCATCATTTCGCTTGATTGCTACGAATGGACGCTT
 TGGATTTTCAGAAGCAGATTCTTGATCTCGCCGCTGATATCGAGATAGGTAGAGATCAGGGAGCCGTCGCG
 CTGTCGATAACATAAGCGATCTTGTTTCAGATCTGGCATTTCATGTTACCAGCAGTTTCGAGTTTTTCCCA
 GCCGATAACTTCGCTGTAGTTGAAGAACTTGTCCATCGGACGGCTCATGATACGCACCGGGATTTACCG
 TTCATTTTCGAACATGATAACACGAGAAGCCATAGCGTCTGGACGAATCCAATCATTATAACCGGCAACGT
 GATAATCAAAGATGCGAACTTTGGTACCCAGACTGGTAACCGTTTTTCAGCGAAATAAACTTGGTGTGTC
 GTCAACACACAGGTTAATAAGATTTTTGGTACAGCTCTTTGATACTTTGCATAATGTTTATTCCATTCAGGG

TTAAAGTGTGTTGATTACTTTGGGTTCTTCCAAGTGCATGGATGTTACTGTTATCGCTTTAGAATTGCTACCG
 ATAAAAAACGTGCGGCATTCTTTAACATACAATTCAACGCCGGTTTTGGCAATCGTCTTTTCGAGTAAATC
 CGTTTTGATTTGATTTCGACACAAACGCATTCTTCCAATTTTTGGAATTTCCGGTATGTATCGAATCTCTTCCA
 AAGATCATTTCGTCTTGCCGATGTAATGAACAACACCGTTAACAACGAAAGCATAACAGGACAAACGTCATC
 TGTTTAGGCTTAACGAATGATCTATCAATCTTCCCCTCTTTGTCAAGAGAAAGATCGCACATCTTTTTGAA
 CCCGAACCTGGTAAGATCGCTCATATATCCAGCTCGGTATGAGTCCAGCTAACTTGTGACTAACACGGC
 AATGATATCACCGTGACACGGCAGAGGCGAGCAGGTACATCCTAAACGCTTTCCGTGCAGACTCAGTAAC
 ATTTCTCTAGTTATATTACCACGTCTGATCTCGTCTTTCAAGTGATTTTTGAAACGTTTCGATGTTTTCTGTTC
 GAGTT

CCGTCTTTGTGAGGATTTCCCCAGATCGTTCCTCGTTGAATGTCAACATCGAACTCCGTTTTATAC
 TTGTTTACCACATAGCACATAAATGCTTTCTCCGTTAAGTTCTCAGTTAGACCATATCGCTTTGGACAAA
 CGTGCCTATCTGCTAACTCTTCGTATTCAGAAAACATTGGAATGTCGTCAAGAATAACGAAATCCGTAAT
 GCTATGCTGTTGATGTGTCGGATCACCGATTCAACTCGATGATATCCGCCACCTGTGTAATCTATCAGGT
 CAACGATTTTCGATGTCAAGAAAATCGGCAATCTTTTTCGTTCTTTTGTATCGCCGACTTTAAACCAAGAG
 CTGATACCAACAACCTTCGCGTTAGTCTCGCGAATGATCCGATGTAGACGATTGAGCATTGGAACATAAA
 TCCAATCCATCTTGCCATATAATCGGAACACTCTTGCGTCATTCTTTTTTTGACAAGCGTATCAAGTTCGG
 AATACGAATTCAATACGCCGTCGATGTCAAGATAGATTACACTGCCATAGGTGCTTTGATAGCTGAGTGG
 CACTTGTAATCCTCTAGTTCAATATCATCTACAGACAGATTACACGCTTCTTCCAGGGTTGTAAAGCGGTT
 TTTAAACTTCAATGTTCGGAAGCTTGTGTGGTTCACGCTGTAATTGCTCTTGAACCTTGTCAAAGTGATTGT
 GATAGATATGTGTATCATCGAGCATAACCGTAAGAATGCCAGCTTTGTATCCGGTGATCTGGGCTACGAT
 TTCAAGCAGCAGGCCATAACTAGCGATGTTAAACGGCAGACCCAAGAAAGTATCCACAGAACGCTGATA
 CCAAGTCAGATTCAACCGGCCGCGCTTAACGCTGAAACGGAACAGAACGTGACAAGGAGGCAGAGCCAT
 TTTGTCAAGATCAACCGGATTCCAAGCACAAACGATATTACGACGACATTCTGGATTAGTCTTGATTGCTT
 CGATAGCTTTAGCAAGTTGATCAACGCCGTTAAAGTCGCGCCATTGCTTGCCATAAACAGGACCAAGCTC
 ACCATCGGTGTAACCCAGTGCTACCCCTTGATGATTGAAATTATCGTCCCAAATCGTTTTTGAAGACGATC
 CAACGCCATATGTCATCGCTCGAAGAACTTCAACGTTTGTAAAACCGTTCATAAACACAGACACTCACC
 GCGAACAGCTTTCCACGCTAACGTCTTTGTGGTAACAGCGGGGAAACCGTCTGCCATATCGTGTGAAAC
 ACTTGACCAAGAACAGAACGGGTACCCACACCCGTCGGATCCATTTTCATCTTCGCCGTTCTCGAAAGTAT
 AATTGATGATATCTAGATAAGCTTTCATAGCAGCAGAATACCACCCTCGGAGCGAGTTGACCCCATTTCA
 CCAGCTCCCTTGATTACATCGAGTTGCTTACGCAGTTCGATCAATCCCTCTTGGAGTTCGCCGATGCATTT
 CTCATGCAGTTTAAAGACTTCGCCGGCTTCAATGAGGCGCTGATTTTGTAGTCTTGATCACTTCGCTTTGAT
 TTTTCGATCTTGTCTGCTATTGTTTTCCAGAAGATAGAAAAACAGAGTATTCGTTTTCGTCTGGGTCATTTGCT
 CAGGATCTTTTTCCAGTAAAGTTTGAATGCTTAAATCCACTCAGATTCGTCCTCGATAATTTTCAGCCATAA
 CATAACGGCCGTACTTTTTCTAAAATAAATTTCACTTCGACTACCATTTTCGGAATAATCAACGATAGGAATA
 GTCTTGTTTGAATGCCGCGAATCAGCTTGTTGAAACTGTTTCGTGCTGATTGCAATCTTGCATATCGGCC
 GCCGTGCAGAACTTCGGCATCAATGAAATACGCAGTACCCGAATGCGAACGGATATCACCGATTTTCATG
 TTCGCTTTGTACACGAAATGAGCATTCTTTGTGCCTGGAATTCAGATGCACCGTGAAAATAATTACTGTA
 TTCGCCTGTCTGCGGAATACCGTCATAAACACTCAGGCTCCATTTACGTTTCTTAGCGTCTTACGAACGC
 CAAGAACTTCAATCACGGGTGCAATCTTATCAGTTTCATCTACGCTAATAAACATTAAATCAGATCCTTTA
 TTTACCAAAAATATGGCTCAGCATATACGTTTTTCGCTTTCTTTTTCAAGGACGAAATTCATACAAAACGT
 CCGGCAACAACGTGACCTTTCTTCCGCAATCGCTTTAAGCAACATAAAAACACCAGTCGCGCCAATCT
 CGATTTGCTGATCGTTATGCGGAGTGTGGAATGTCAGTTGAAAAGAACTCTGGCCGCGATACAGTTCACC

AACTGATAGTTCAGCACGAAACACTGGGTGGTAAGAACGTTACACGAAAGGCGCTTGTTTCATCGGGACGA
TAGTAATAACGACCGTAATAGCCAGTCTTAATCTGACCCGTTGTTTTGTCGATTATGATGCACCAATTACG
CTTGCGGTTGTAATCTTCTCGCATACCGACAATTCGATATCGCGAACTATAGGCAGAACTTGATCTTTTG
TTAGATCGGACAAACGGAGATCTATAATGCTCATTCTTTTTCCTAACGGATGTGTATGTAATTGCTTCGT
CTCCAAGAACTTGTTGGACAGTACATAAAAATCAGATGTGATCTTTTCTTGTACCGTTTCGTCCAGTTCA
ACGTCGCACTCTAATTTTTCTTCGTTGAGAATGACAGTATGAACTACCTGATCTGCCATGTCAATCGCTTC
CTTCAACACAGTCATGCCACCGATAACACAGATGTTATTATAAAGCGTCTGGAGCTCGCTTAGAGCTTGA
GTAACATCACCGTGCATGAACATATCGGGTTCGCTCGCCGTTCTTCGCCACAACGCGGTTGG

TGTCGTTTGACGTACTCAATACCACGTTTACCCTGTTCTTTAATTTTTGTTGGCAGACTCATGAATGT
TTTTGCTCCCATGAGCAAGCATGAATCTTTAGTTGTTTCCATAAAGTTGAGCATGTCAACTCTACAGTGAC
CCCACGGCAGTCCGTTCTTGTTGCCGAACTACCGAATTTACCTGTTGCAAAAAGTCTTTGATCATTTTT
ATCACCTCTCACTTAATAAAAAAGGCACCCGAAGGTGCCTTAGTTTTTAGATTTTCGTTTCAGCAGATCATCC
AGATCGGTGTCTACAGTACCAGCGGAGCCGGTGTGAACGGAACATCGTCATCTTCTTCTCAGGCTTGG
AAGCCGGAGTATTTCAAACCTGTTCCATCTGTTTTTCGAAGTCATCAGCAGCGGAGCGTTAGAACGCTTC
TCGGCACCCATCACACGATTGAACACAGTGGTCAGATCTTCCATAGACTTGAACCTTGTCTTTGGCAATCAG
ATCCATGATATCGTGCATTTGTTCGAACAACCTGGGCTTGATAAGCTTCGTCTTCGATGTTTGCAATCTGGG
ATTGCTTGCCGAAAACAGAGTCATCATAAGTTGTTGTTGCCGCAACTTTCTTAATCTTGATAGTGAAGTTT
TTACCTTCAAACGGGCAAGTTACGTCGCACGGTTCTTCGCCCAGATCGGTGTTAACATCGACCTCAGCTTG
AATCTTGTCCATGATTTTTCTTACCGAAACGGAACCTTGAACACTTTGCCTTCGTTATCGGGATTAGCCGGGT
CTTTGATTACCAGGATGTTTGCCGAGAACGCGGTCTTACGAGTGACACCGGAAGCGTACATTGCTTTCTTG
TCGGCTTCAACGTTGTAATCCCAGTTTTGTTCTTTGATCCACTGGCAAGCAGGGCAGTTATCGTAATCACC
GTGAGTGCTGGAGCAATTCTCGATGTACCATTTGCCGTTGCGCTGGAAGCCGTGATTTACGAGCTTAACG
AAAGTGGTAGCATTATCACCTTAGCAGGCAGGAAGCGAATAACAGCAGCACCGTTACCATCTTTACCTT
GGGTACGTTTCCACTCGGTGGCATCAGATTCAAAACCTTTCTTAGCAGAGAAAGCAGCCAGTTGTTGTTGC
AGTTGGGACGGGTCTTTGCGCTTGAAAATAGACATTACAGTTTTTCTTTTTACAGTTTTAGTTTGGTTTAG
TTTTTTGTTTCCGTAAAGTTTGTAACGCATTATATATTCCTCACACCAAAGATTTACAGTTTTGTTTTGATTA
GCTATTT