



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010106806/10, 26.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.02.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.02.2010

(45) Опубликовано: 10.08.2011 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2139343 C1, 10.10.1999. RU 2270253 C1, 10.10.2006. RU 2139343 C1, 20.09.2002. ODA M., MORITA M., UNNO H., TANJI Y. Rapid detection of Escherichia coli 0157: H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage. Appl Environ Microbiol, 2004, Jan 70 (1), p.527-534.

Адрес для переписки:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФГУН ГНЦ ПМБ

(72) Автор(ы):

Веревкин Владимир Васильевич (RU),
Воложанцев Николай Валентинович (RU),
Степаншин Юрий Германович (RU),
Светоч Эдуард Арсеньевич (RU),
Мякина Вера Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
науки Государственный научный центр
прикладной микробиологии и
биотехнологии (ФГУН ГНЦ ПМБ) (RU)(54) ШТАММ БАКТЕРИОФАГА Escherichia coli V32 ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
БАКТЕРИЙ Escherichia coli СЕРОГРУППЫ O157

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к методам идентификации и дифференциации культур с использованием бактериофага. Штамм бактериофага Escherichia coli V32 депонирован в коллекции музея микроорганизмов ФГУН ГНЦ ПМБ под номером Ph25, является

специфичным и вирулентным для бактериофага, и используют его как дополнительное средство при идентификации бактерий Escherichia coli серогруппы O157 на стадии анализа бактериальных колоний. Использование штамма является простым и общедоступным средством, не требующим больших затрат времени и материалов. 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 7/00 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010106806/10, 26.02.2010

(24) Effective date for property rights:
26.02.2010

Priority:

(22) Date of filing: 26.02.2010

(45) Date of publication: 10.08.2011 Bull. 22

Mail address:

142279, Moskovskaja obl., Serpukhovskij r-n, p.
Obolensk, FGUN GNTs PMB

(72) Inventor(s):

Verevkin Vladimir Vasil'evich (RU),
Volozhantsev Nikolaj Valentinovich (RU),
Stepanshin Jurij Germanovich (RU),
Svetoch Ehduard Arsen'evich (RU),
Mjakinina Vera Pavlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie nauki
Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr prikladnoj
mikrobiologii i biotekhnologii (FGUN GNTs
PMB) (RU)

(54) **BACTERIOPHAGE Escherichia coli V32 STRAIN FOR IDENTIFICATION OF Escherichia coli BACTERIA SEROGROUP O157**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: bacteriophage Escherichia coli V32 strain is deposited in the Collections of Museum of microorganisms of Federal State Intuition of Science State Science Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, No. Ph25 is

specific and virulent for bacteriophage, and used as an option for identification of Escherichia coli bacteria serogroup O157 at the stage of bacterial colony analysis.

EFFECT: simple and available product not requiring heavy time and material consumption.

1 dwg, 4 ex

R U 2 4 2 5 8 7 7 C 1

R U 2 4 2 5 8 7 7 C 1

Изобретение относится к медицинской микробиологии и может быть использовано для эпидемических учреждений как дополнительное средство при идентификации бактерий *Escherichia coli* серогруппы O157.

В последние годы появилось большое количество сообщений о вспышках у людей геморрагического гастроэнтерита, вызванного бактериями *Escherichia coli* O157. Решение проблемы во многом зависит от своевременной диагностики возбудителя. В России отсутствуют коммерческие препараты для выявления данных патогенов.

Известна питательная среда (1), которая является полуселективной для выделения сорбитолнегативных колоний *Escherichia coli* из клинического материала и продуктов питания. Чтобы выявить среди них бактерии *Escherichia coli* серогруппы O157, требуются дополнительные исследования.

Также предложен набор для идентификации энтерогеморрагических эшерихий (2), состоящий из иммуномагнитной разделительной тест-системы и тест-системы для постановки мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Набор обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Однако его применение требует специального оборудования и обученного персонала. Кроме того, в некоторых случаях получаются не однозначные результаты, связанные с широким распространением в природе генов, используемых для тестирования.

За рубежом для детекции *E.coli* O157 обычно используют три метода: микробиологические, ПЦР и иммунный анализы. Кроме этого предложен меченный рекомбинантный бактериофаг PPO1, который позволяет при наличии флюоресцентного микроскопа обнаружить бактерии *E.coli* O157 в течение 10 минут (3).

Техническим результатом предлагаемого изобретения является использование для идентификации бактерий *E.coli* O157 высокоспецифичного вирулентного бактериофага *Escherichia coli* V32.

Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 выделен из стоков коровника, расположенного в Московской области, и депонирован в коллекции музея микроорганизмов ФГУН ГНЦ ПМБ (Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии") под номером Ph25.

Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 рекомендуется использовать на стадии анализа подозрительных сорбитолнегативных колоний микроорганизмов, выросших на среде MacConkey с сорбитолом или на среде (1).

Использование такого бактериофага позволит легко, без привлечения специального оборудования и обучения персонала идентифицировать бактерии *Escherichia coli* серогруппы O157.

Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 характеризуется следующими свойствами:

- морфология негативных колоний: на чувствительном бактериальном штамме формирует прозрачные негативные колонии диаметром около 2-3 мм, с четким краем. Вторичный рост отсутствует;

- относится к лямбдоидной группе фагов;

- вирулентен для 100% бактерий *E. coli* O157, используемых для проверки;

- специфичен для бактерий *E. coli* O157. Не активен для других серотипов эшерихий, видов шигелл и иерсиний;

- не содержит факторов патогенности *E. coli* O157:H7 (rfb, stx1, stx2, eae и fliC);

- не формирует устойчивых лизогенов;

- геном имеет двунитевую ДНК размером около 62 тысяч пар оснований (kb). ДНК не гидролизует ферментами SalGI, EcoRI, BamHI, PstI. Эндонуклеаза HindIII

расщепляет ДНК на 28 фрагментов, EcoRV - на 13.

- хранение в виде фаголизата, либо в лиофильно высушенном состоянии.

Пример 1. Получение фаголизата штамма бактериофага *Escherichia coli* V32.

К 1 мл ночной бульонной культуры *E. coli* O157:H7 EDL933 добавляют 4 мл
 5 бульона Лурия и 1 мкл суспензии штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 с
 концентрацией 5×10^9 БОЕ/мл. Смесь инкубируют на качалке при 37°C до наступления
 просветления бактериальной культуры. Добавляют 0,5 мл хлороформа и интенсивно
 10 перемешивают в смесителе в течение 20 мин. Низкоскоростным
 центрифугированием (10000g, 15 мин) удаляют обломки бактериальных клеток и
 титруют фаголизат. Полученный фаголизат содержит более 10^9 частиц фага в 1 мл.

Пример 2. Проверка специфичности штамма бактериофага *Escherichia coli* V32.

Специфичность штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 проверяют методом спот-
 15 тестов. Для этого по 0,5 мл ночных бульонных бактериальных культур, указанных в
 табл.1, смешивают с 4 мл полужидкого агара (бульон Лурия с 0,7% агара) при
 температуре 47°C и распределяют по поверхности чашки Петри, содержащей богатую
 питательную среду (например, Nutrient Agar, HIMEDIA). Через 20 мин на поверхность
 20 наносят каплю штамма бактериофага V32 (около 10^7 БОЕ/мл) и инкубируют при
 температуре 37°C в течение ночи. При визуальном осмотре только на чашках с
 культурами *E. coli* O157:H7 и *E. coli* O157 рост бактериального газона отсутствует в
 местах внесения штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 (прозрачное пятно лизиса).
 Во всех остальных случаях таких зон не обнаруживается.

Таблица 1

Специфичность штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 (спот-тесты).

Бактериальные штаммы	Пятно лизиса
<i>Escherichia coli</i>	
O157:H7 (60*)	+
30 O157:H7(8*)	+
Другие серотипы <i>E. Coli</i> (26**)	-
<i>Salmonella</i>	
<i>cholerae suis</i> (15*)	-
<i>gallinarum pullorum</i> (9*)	-
35 <i>typhimurium</i> (2*)	-
dublin(1*)	-
enteritidis (3*)	-
<i>Shigella dysenteriae</i> (1*)	-
<i>Shigella sonnei</i> (1 *)	-
40 <i>Yersinia</i>	
<i>enterocolitica</i> (3*)	-
<i>pseudotuberculosis</i> (4*)	-

В скобках: *, количество штаммов данного вида, используемых при тестировании;

** , штаммы *E. coli* серотипов O1, O2, O4, O6, O8, O15, O18, O19, O20, O23, O26, O28, O29, O33, O55, O78, O79, O110, O111, O113, O117,
 O119, O127, O139, O140 и O142;

«+», лизис; «-», нет лизиса.

Пример 3. Ферментативный гидролиз ДНК штамма бактериофага *Escherichia coli* V32.

Составляют рестрикционную смесь, содержащую 0,1 мкг/мл ДНК штамма
 50 бактериофага *Escherichia coli* V32, 1 мкл 10-кратного рестрикционного буфера, 1
 единицу соответствующего фермента, деионизованную воду - до общего объема 10
 мкл. Смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. Электрофорез
 проводят в горизонтальном электрофорезном аппарате при постоянной силе тока 150

мА в течение 1 часа. После 15 мин окрашивания в растворе 0,4 мкг бромистого этидия гель визуализируют под УФ-лампой (см. чертеж).

Пример 4. Использование штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 для анализа бактериальных колоний методом спот-теста.

5 Бактериальные колонии анализируемых бактерий индивидуально суспендируют в 0,1 мл стерильного физиологического раствора и переносят на чашки с питательной средой Nutrient Agar. Суспензии досуха втирают стерильным шпателем в поверхность агара и, разделив чашку на 2 сектора, в один из них капают пипеткой каплю штамма
10 бактериофага *Escherichia coli* V32, в другой - каплю физиологического раствора. Чашки инкубируют ночь при 37°C. При визуальном осмотре только на чашках с чувствительными к фагу *Escherichia coli* V32 бактериальными культурами (*E.coli* O157:H7 или *E.coli* O157:H⁻) рост бактериального газона отсутствует на месте внесения бактериофага. Во всех остальных случаях таких зон нет.

15 Пример 5. Использование штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 для анализа бактериальных колоний методом фаговой "дорожки".

Каплю штамма бактериофага *Escherichia coli* V32 наносят на поверхность питательного агара Nutrient Agar и, наклонив чашку Петри, распределяют ее по
20 диаметру. Фаговую "дорожку" высушивают. Для этого чашку, приоткрыв крышку, помещают на 15 мин в термостат при 37°C. После этого суспензии колоний анализируемых бактерий переносят бактериологической петлей на поверхность питательного агара таким образом, чтобы они перпендикулярно пересекали фаговую
25 "дорожку". Чашки инкубируют ночь при температуре 37°C. При визуальном осмотре только культуры *E.coli* O157:H7 и *E.coli* O157:H⁻ растут прерывистой полосой из-за отсутствия роста в зоне фаговой "дорожки". Остальные культуры растут сплошной непрерывной полосой.

Таким образом, штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 является специфичным и
30 вирулентным для бактерий *Escherichia coli* серогруппы O157. Использование предлагаемого штамма бактериофага для идентификации бактерий *Escherichia coli* серогруппы O157 является простым и общедоступным методом, не требующим больших затрат времени и материалов.

35 Источники информации

1. Патент RU №2139343, C12Q 1/20. Бюл. №28, 1999 г.

2. Патент RU №2270253, C12Q 1/68. Бюл. №5, 2006 г.

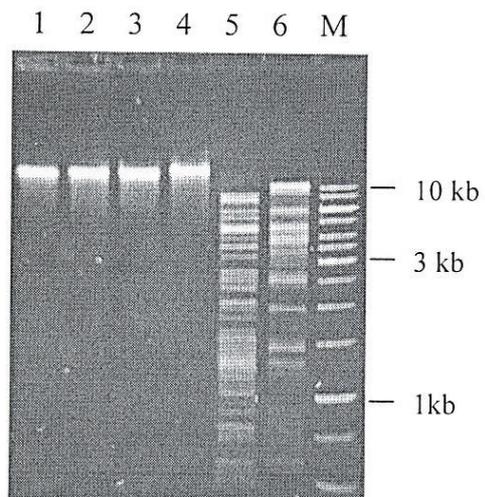
3. Oda M., Morita M., Unno H., Tanji Y. Applied Environmental Microbiol. 2004; 70:1:527-
534.

40

Формула изобретения

Штамм бактериофага *Escherichia coli* V32 для идентификации бактерий *Escherichia coli* серогруппы O157, депонированный в коллекции музея микроорганизмов ФГУН
45 ГНЦ ПМБ под номером Ph25.

50



Гидролиз ДНК фага V32 нуклеазами SalGI (1), EcoRI (2), BamHI (3), PstI (4), HindIII (5) и EcoRV (6). M – маркер молекулярных масс.