

Практическое применение фагов

Группа 115 сд Егорова Т.С.

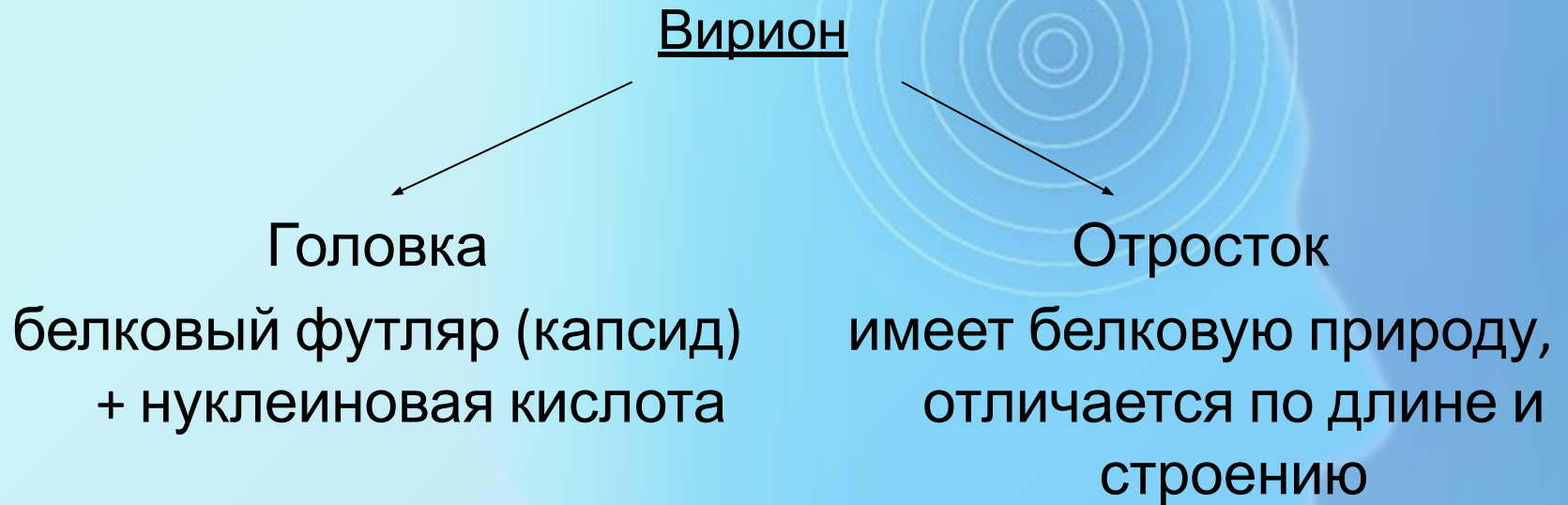
Бактериофаги (от лат.«phagos» - пожирающий) – вирусы бактерий, обладающие теми же характерными особенностями, что и другие вирусы.

Характерные свойства фагов, как представителей царства Vira:

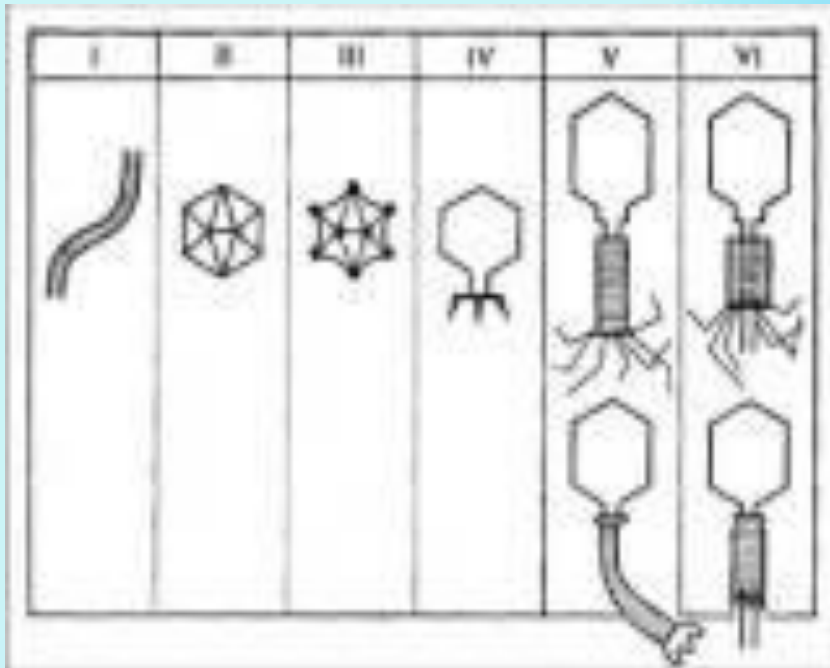
- фаги – неклеточные формы жизни
- содержат одну нуклеиновую кислоту – ДНК или РНК
- у них отсутствуют белоксинтезирующие системы и самостоятельный метаболизм
- облигатные внутриклеточные паразиты на генетическом уровне

СТРОЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ.

Покоящаяся, внеклеточная, форма – вирион.
Внутриклеточная форма – вегетативная.



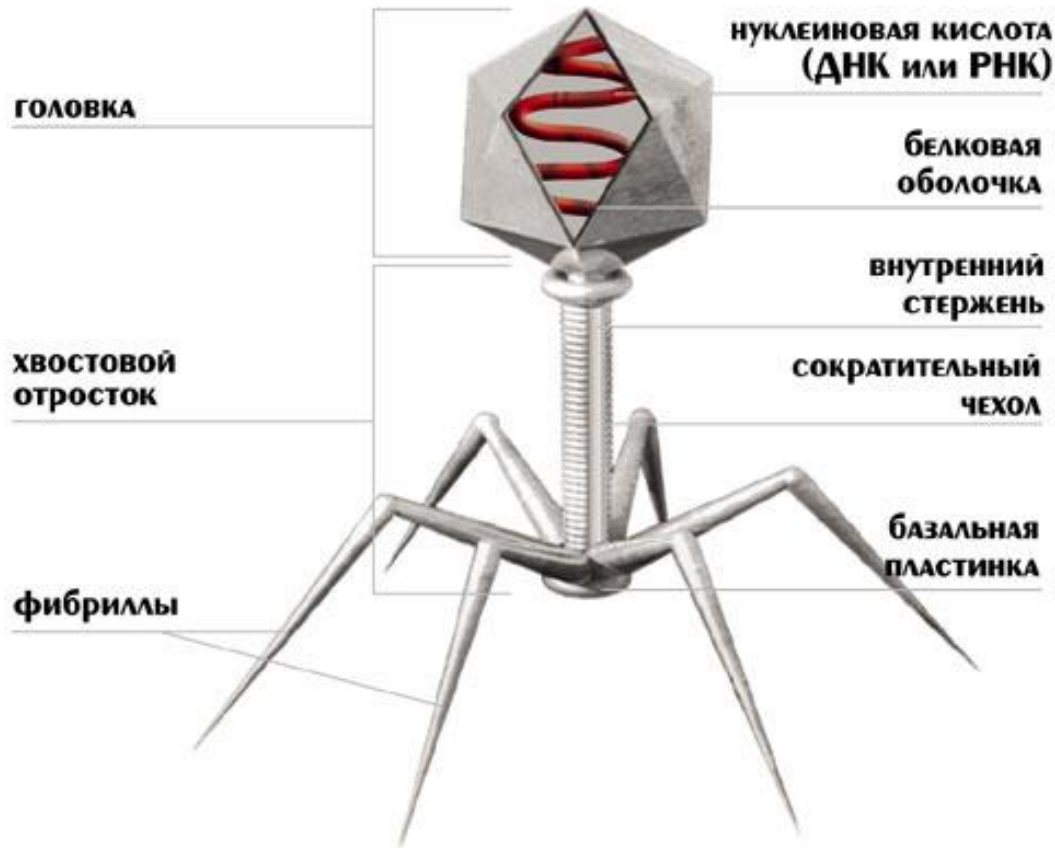
Морфологические типы фагов.



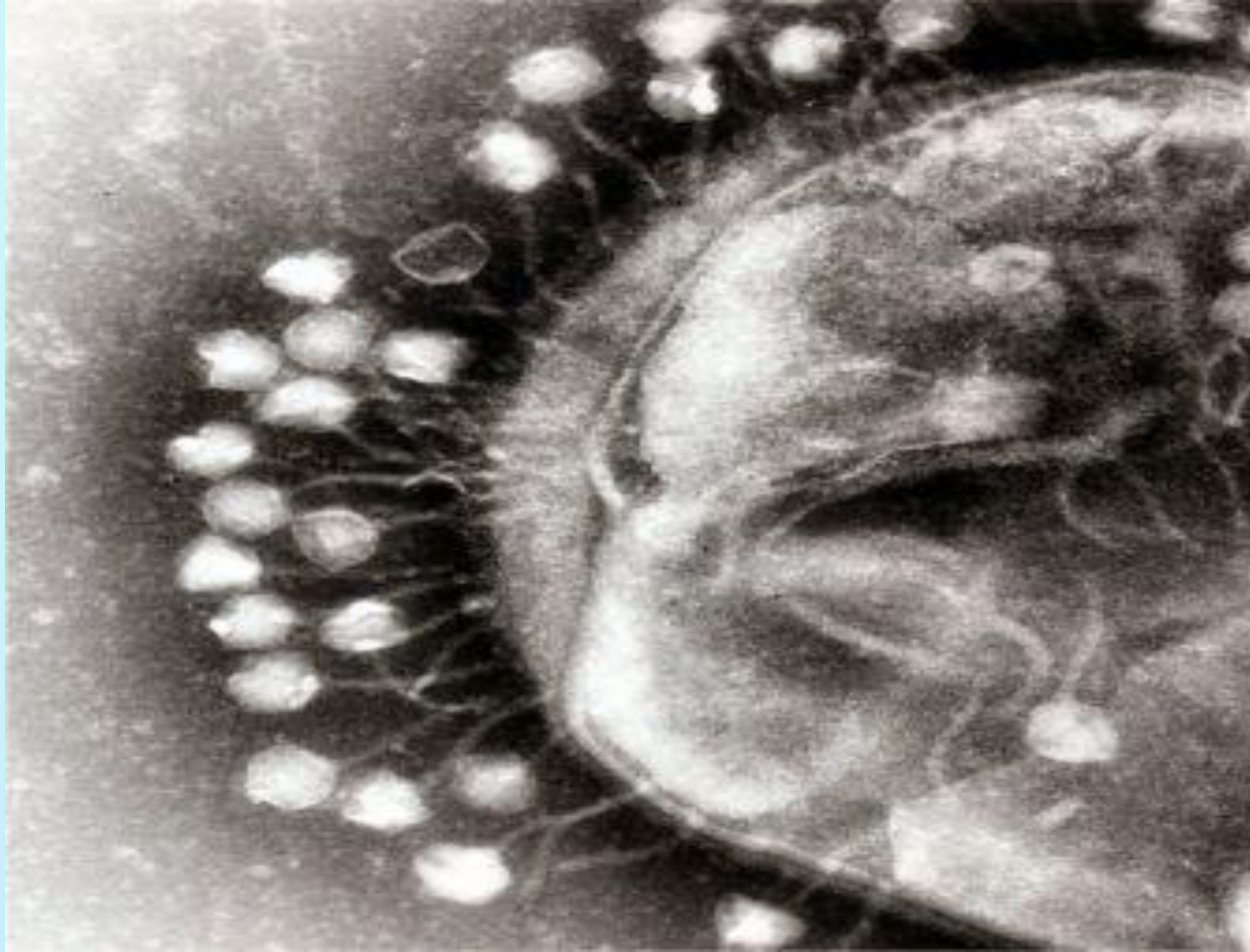
- I – нитевидные фаги
- II – фаги без отростка
- III- фаги с аналогом отростка
- IV – фаги с коротким отростком
- V – фаги с длинным несокращающимся отростком
- VI– фаги с длинным сокращающимся отростком

Наиболее сложно устроены фаги с сокращающимся чехлом отростка, например, Т-четные фаги (Т4) *E. coli*

АНАТОМИЯ БАКТЕРИОФАГА



Адсорбция фагов на бактериальной клетке



Взаимодействие фага с клеткой

↓

вирулентные фаги

↓

вызывают продуктивную инфекцию, при которой происходит репродукция фагов и лизис бактериальной клетки

↓

умеренные фаги

↓

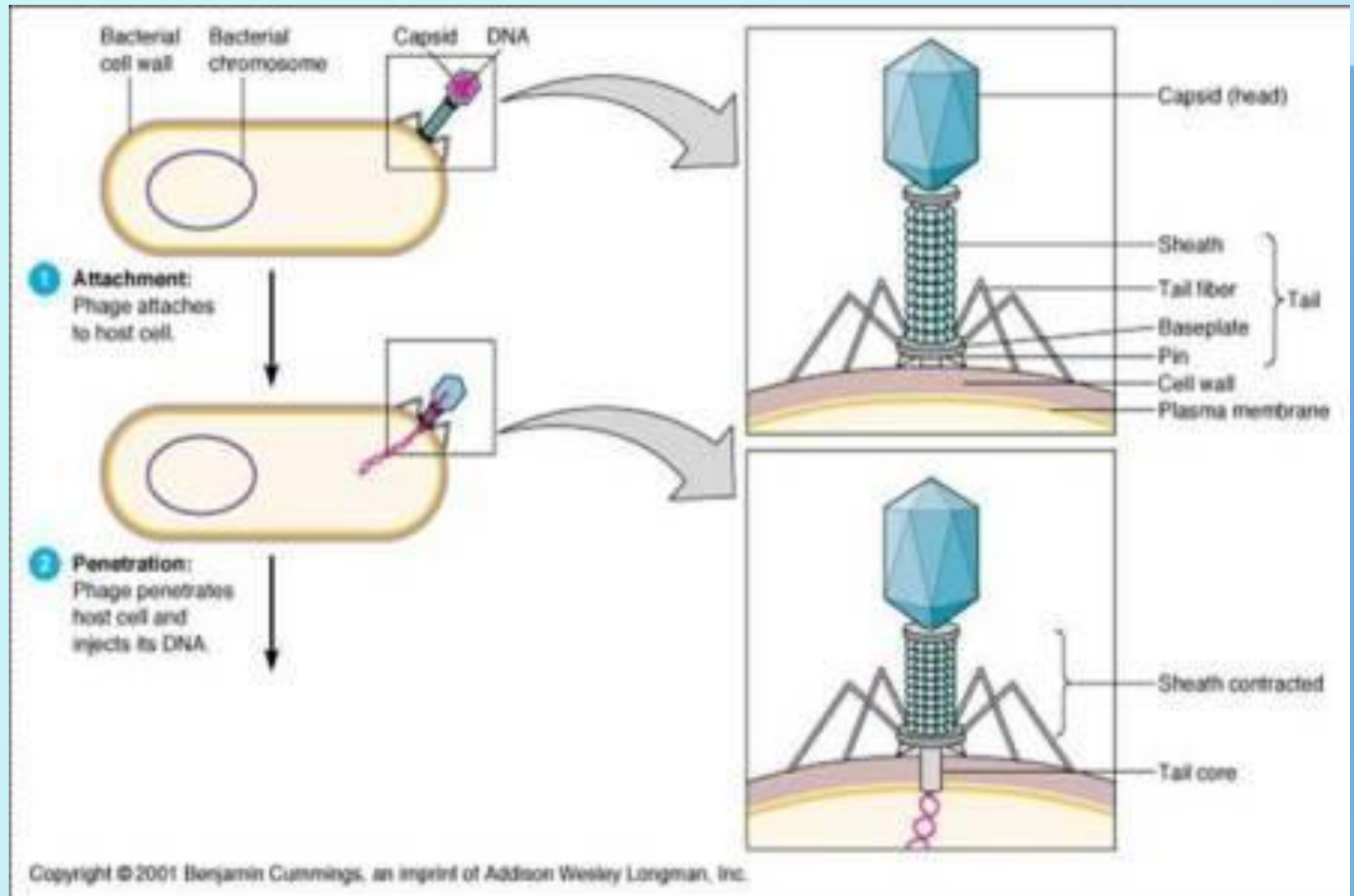
характерна интегративная инфекция, но могут вызывать и продуктивную инфекцию

Этапы продуктивной инфекции:

- **1я стадия.** Адсорбция фага на чувствительной клетке. Происходит при наличии комплементарных рецепторов в клеточной стенке бактерий или на концах нитей фагового отростка.
- **2я стадия.** Проникновение ДНК фага в бактериальную клетку. С помощью лизоцима осуществляется гидролиз участка клеточной стенки, чехол отростка сокращается и внутренний стержень прокалывает оболочку клетки. ДНК по каналу стержня проникает внутрь.
- **3я стадия.** Внутриклеточное развитие фага. ДНК бактериофага направляет клеточные системы на биосинтез компонентов, необходимых для репродукции фагов. Сначала идет синтез «ранних белков» – ферментов, осуществляющих репликацию ДНК, а затем «поздних белков» – белков головки, отростка и т.д.

- **4я стадия.** Морфогенез фага. Созревание фага - разобщенный процесс. Отдельно формируются головки фага: вокруг ДНК строится капсид. Независимо образуется отросток: формируется базальная пластинка, к ней прикрепляется внутренний стержень и одевается чехлом. Отдельно синтезируются нити отростка. Затем составные части фага объединяются, образуя вирионы.
- **5я стадия.** Лизис бактериальной клетки и выход фага. Фаговый лизоцим гидролизует клеточную стенку и осуществляет лизис клетки. Бактериофаги выходят в окружающую среду.

Этапы продуктивной инфекции.





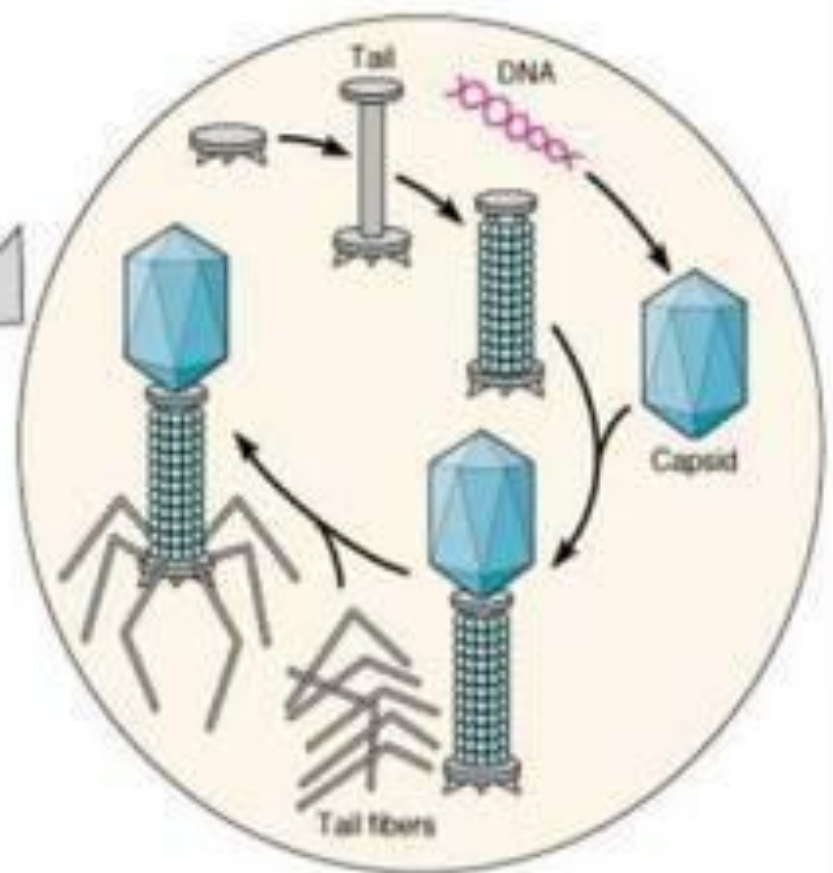
3 Biosynthesis:
Phage DNA directs synthesis of viral components by the host cell.



4 Maturation:
Viral components are assembled into virions.



5 Release:
Host cell lyses and new virions are released.

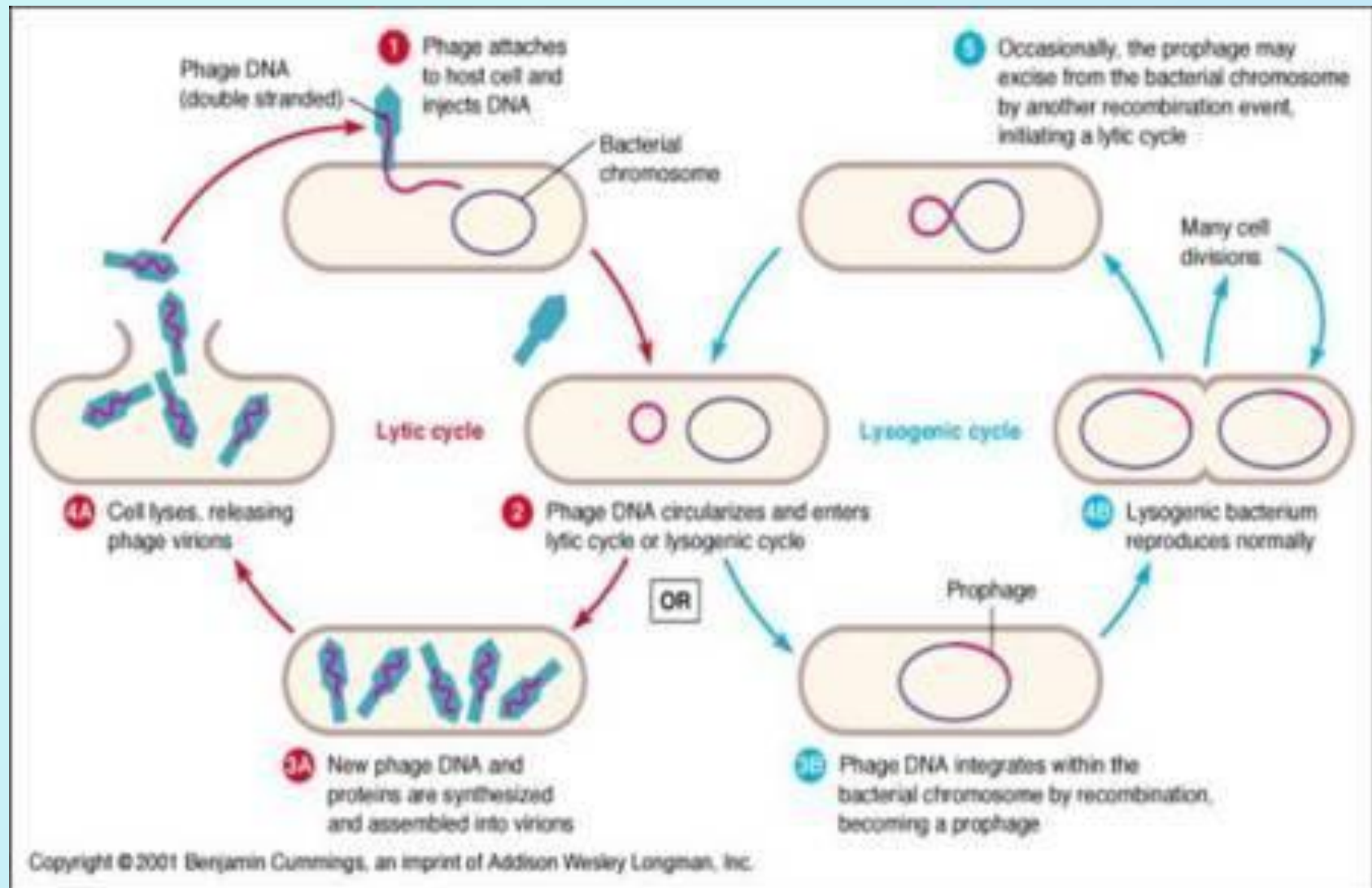


Интегративная инфекция (лизогения)

ДНК фага включается в кольцевую хромосому бактериальной клетки. Во время деления клетки профаг (интегрированная ДНК фага) реплицируется в составе клеточного генома и переходит в следующие поколения бактерий. Бактериальная культура, инфицированная умеренным фагом, сохраняет жизнеспособность и становится лизогенной.

Фаговая конверсия: процесс изменения свойств бактерии, под действием дополнительного набора генов, внесенных профагом в клетку, с приобретением ею токсигенных свойств (например, появление способности к образованию экзотоксина у возбудителей ботулизма, дифтерии, скарлатины).

Лизогенная инфекция.



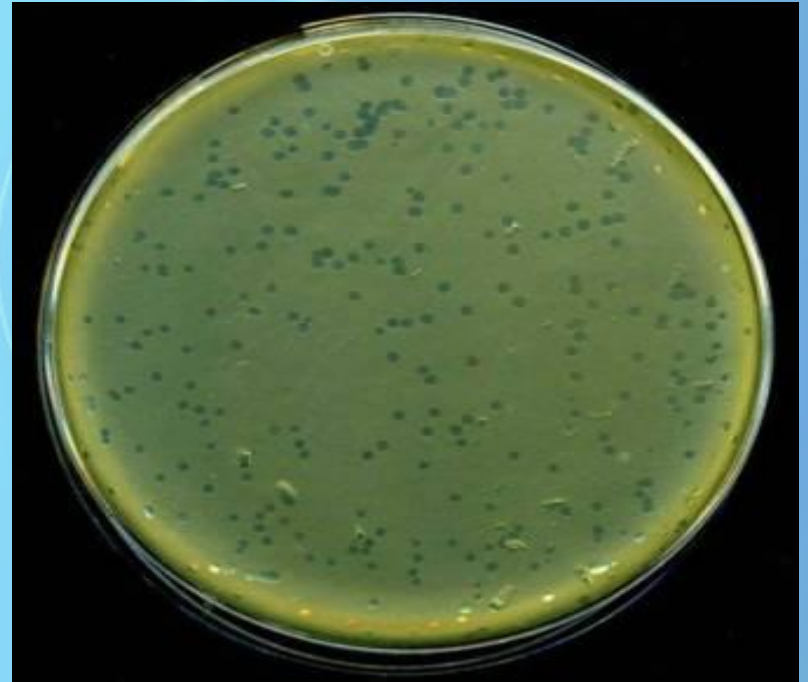
ИНДИКАЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА.

В основе - принцип совместного посева исследуемого материала и чувствительной к искомому фагу культуры бактерий – тест-культуры.

Метод обогащения с «подсевом».

- 1) Исследуемый материал суспензируют и фильтруют. Фильтрат и гомологичную тест-культуру вносят в пробирку с МПБ. Инкубируют.
- 2) Содержимое пробирки освобождают от бактерий (центрифугирование, фильтрование).
- 3) Фильтрат засевают с тест-культурой на чашки с МПА. Инкубируют. На МПА на фоне роста бактериальной культуры появляются округлые пятна – негативные колонии фага.

- 4) Материал из пятна переносят в пробирку с МПБ, добавляют тест культуру, инкубируют. Фаги, размножившись в бактериях, вызывают их лизис и в пробирке получают фаголизат, содержащий множество фагов.
- 5) Фаголизат полностью освобождают от бактерий.



Негативные колонии фага

Применение бактериофагов.

1. Для диагностики инфекционных заболеваний.

- а) для определения видовой принадлежности выделенной культуры бактерий.
- б) для фаготипирования – внутривидовой дифференциации чистой культуры бактерий.
- в) с целью индикации возбудителя непосредственно в материале от больного с помощью РНФ (применяют редко).

Фаготипирование

Основа метода: с помощью типовых фагов дифференцируют культуры одного вида на основании их различной чувствительности к набору таких фагов, то есть выявляют фаготип, что позволяет выявить источник заболевания и пути его распространения.

Фаготипирование *S. typhi*.

Используют набор типовых Vi-фагов (А,В,С,Д,Е), каждый из которых лизирует культуры определенных фаговаров. Для типирования нужен фаг Vi-1, который лизирует все брюшнотифозные культуры, содержащие Vi- антиген, т.к. только такие культуры пригодны для постановки опыта.

Постановка опыта:

- 1) Бульонную культуру засевают в виде капель на поверхность МПА.
- 2) На высохшие капли культуры наносят типовые Vi-фаги, а также фаг Vi-1. Инкубируют.
- 3) Проводят учет результата опыта: культура должна полностью лизироваться фагом Vi-1 и определенными типовыми фагами, что и позволяет определить ее фаговар (с помощью таблицы).



Фаготипирование *S. typhi*.

2. Для профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Для лечения инфекционных болезней широко применяют антибиотики, но их неправильное использование вызывает осложнения. В качестве альтернативной терапии используют бактериофаги.

Препараты бактериофага составлены из вирулентных бактериофагов широкого спектра действия, активных против антибиотикорезистентных бактерий. Их выпускают жидкими и лиофильно высушенными, в виде таблеток, кремов, мазей, свечей. Перед применением необходимо определить фагочувствительность возбудителя инфекции.

Наиболее употребляемые препараты бактериофагов.

- Коли- протейный (смесь фаголизатов *P.vulgaris* и *P.mirabilis*)
- Стафилококковый бактериофаг
- Бактериофаг псевдомонас аеругиноза
- Сальмонеллезный бактериофаг
- Бактериофаг поливалентный (смесь фаголизатов стафилококков, стрептококков, *E.coli*, *P.vulgaris* и *P.mirabilis*)



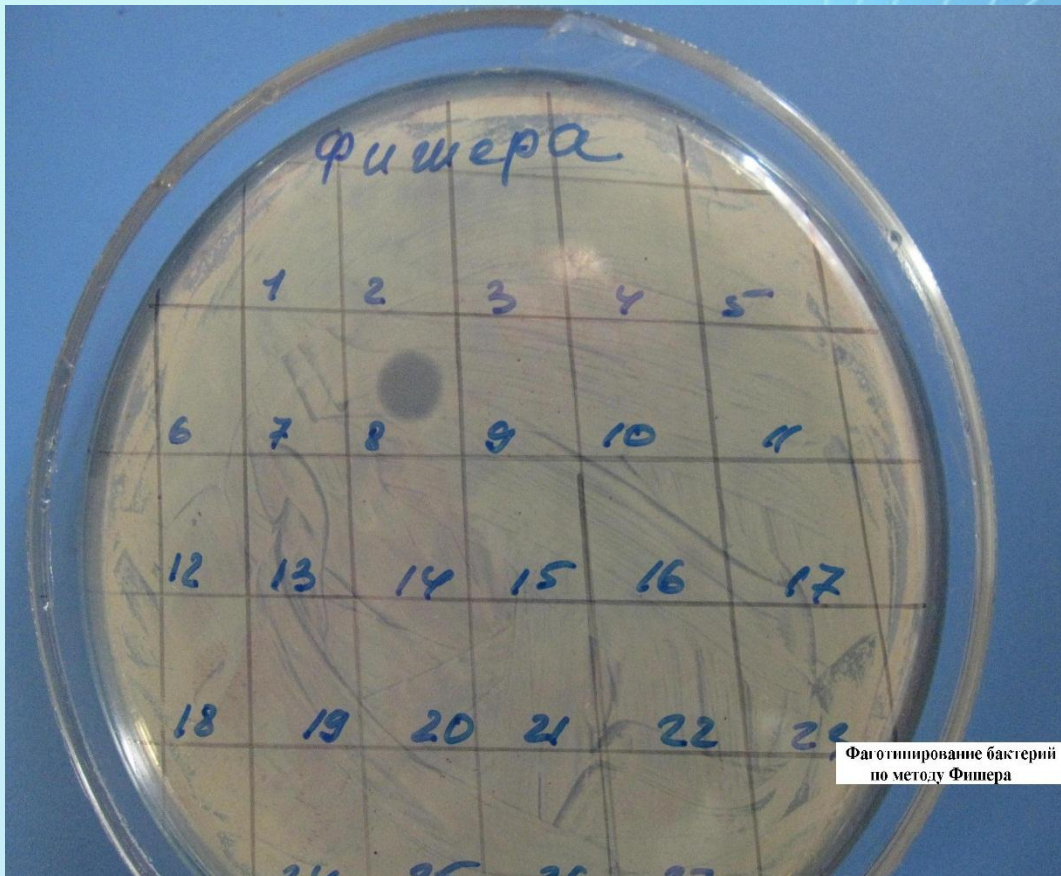
- **ТИТРОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГА ПО МЕТОДУ ГРАЦИЯ**

1,0 мл фага смешивают в пробирке с 0,5 мл бактериальной культуры и добавляют в эту же пробирку расплавленный МПА. Все содержимое выливают в чашку с МПА. Дают застыть верхнему тонкому слою и ставят в термостат. При встрече фага с бактерией, происходит лизис последней и образуется негативная колония фага. Такие негативные колонии затем подсчитывают для определения титра. Титром фага называют количество фаговых частиц в 1 мл препарата



ФАГОТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ФИШЕРА

Испытуемую суточную бульонную культуру засевают на МПА, затем условно делят чашку на квадраты. В каждый квадрат наносят по одной капле различных фагов. После суточной инкубации в термостате отмечают квадраты, в которых отмечается лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется типом лизирующего ее фага.



Фаготипирование бактерий по методу Фишера