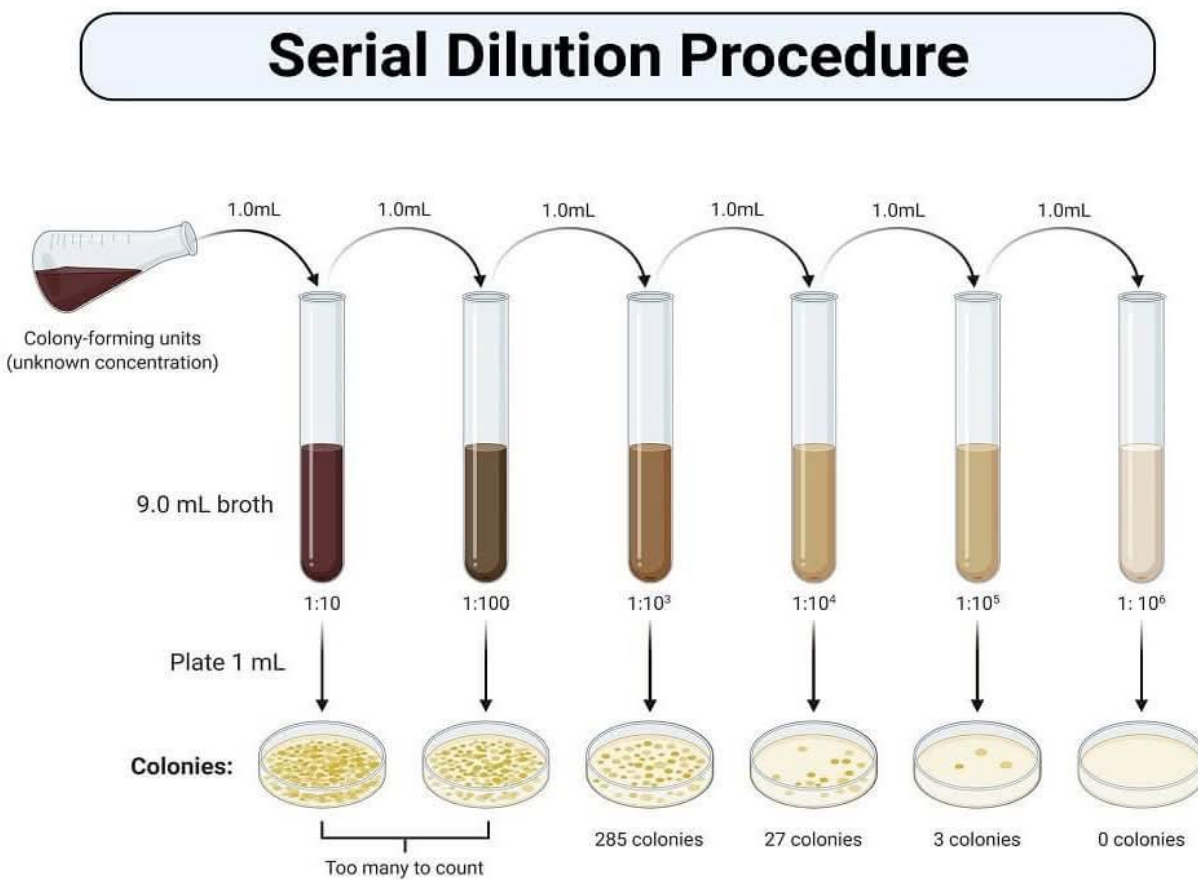


Бактериофаг — это вирус, мишенью которого является бактериальная клетка.

В целом различные аспекты взаимодействия вирусов с эукариотическими клетками (адсорбция, латентный период, выход вирусных частиц, проявление цитопатогенного эффекта) были изучены именно на примере фагов, поскольку такие эксперименты дешевле и проводятся быстрее.

Именно визуализацию цитопатогенного эффекта мы должны наблюдать на сегодняшнем лабораторном занятии. Также у нас будет возможность увидеть разнообразие колоний, образованных морфологически различными фагами.

1. Для опыта нам понадобится какой-либо коммерческий фаг (который представлен в готовом виде как фаговый коктейль, то есть содержит фаги против различных микробов). В таких препаратах общий титр фага обычно не превышает 10^6 . Берём 6 последовательно пронумерованных пробирок, в которые налито по 4,5 мл стерильного физиологического раствора. В первую пробирку вносим 0,5 мл рабочего разведения фага и проводим титрование до шестой пробирки (учитывая, что в каждую новую пробирку входим новой пипеткой). Таким образом, титр фага в каждой последующей пробирке уменьшается в 10 раз. Из последних трёх пробирок (4, 5, 6) переносим по 1 мл в новые пронумерованные пробирки и добавляем 2 капли суспензии микроба (20-часовой рост соответствующих культур на скошенном агаре смывают 5 мл стерильного физиологического раствора), а также 0,1 мл расплавленного 0,7% агара. Всё тщательно встряхиваем и наносим на пронумерованные чашки Петри, равномерно распределяя по всей поверхности. После этого помещаем чашки в термостат при 37 °С. Этот метод называется **двухслойным агаровым методом Грация**. Он часто используется для определения концентрации вируса в конкретном образце.



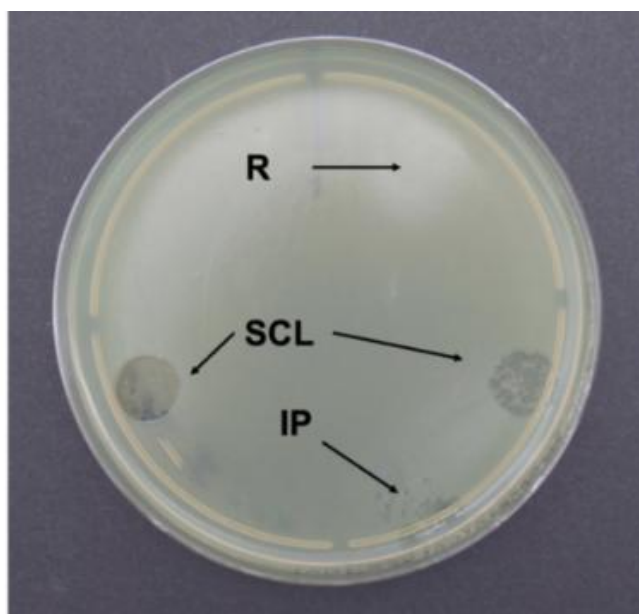
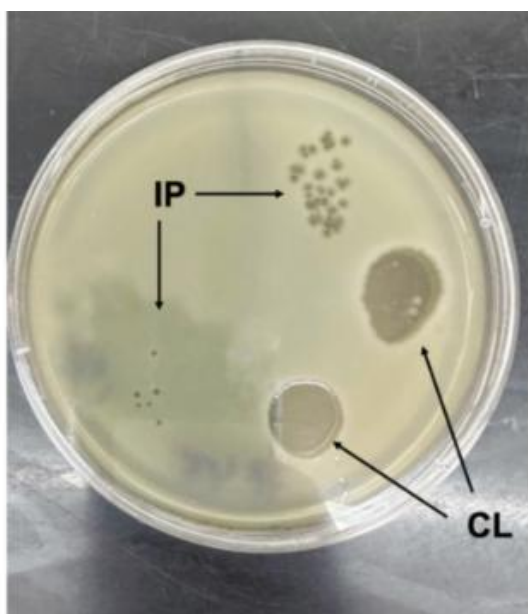
$$\text{CFU/mL} = (\text{no. of colonies} \times \text{dilution factor}) / \text{volume of culture plate}$$

Example: $(285 \text{ colonies} \times 10^3) / 1 = 2.85 \times 10^5 \text{ CFU/mL in sample}$

На следующий день рассматриваем чашки. На агаре хорошо визуализируются негативные колонии, которые образуются в результате размножения фагов в бактериальных клетках. При внимательном наблюдении можно различить колонии, образованные различными видами фагов. Следует знать, что в отличие от многих вирусов фаг не проникает полностью в клетку-мишень. С помощью вирусных ферментов — лизинов — он прокалывает клеточную стенку бактерии и впрыскивает в клетку свой генетический материал — нуклеиновую кислоту (подобно шприцу). Латентный период фага и выход новых вирусных частиц занимает несколько минут, тогда как у вирусов человека это в среднем около 10 часов.

2. Определить лизисный спектр различных фагов по отношению к бактериям можно следующим образом: На чашку Петри с агаром высевают бактериальную суспензию (приготовление суспензии описано ниже). После небольшого подсушивания наносят различные фаги по 20 мкл. Затем чашки помещают в термостат на 18–20 часов инкубации. На следующий день описывают результаты (критерии оценки фагочувствительности приведены ниже).

3. Ещё один опыт для определения лизисного спектра фага проводится следующим образом: Берут 18–20-часовой рост различных бактериальных культур и смывают его 5 мл стерильного физиологического раствора. Полученной суспензией проводят штрихи по поверхности агара и наносят по одной капле различных фагов. После подсушивания чашки помещают в термостат для инкубации. На следующий день чашки рассматривают и описывают результаты. Возможны различные типы лизиса, которые оцениваются следующим образом:



Different morphologies of lysis zones by BP on *P. aeruginosa* growth (Phagogram) are shown: resistant (R), individual plaques (IP), semi confluent lysis (SCL) and clear lysis (CL).

OL (opaque lysis) — мутный лизис. Бактерии не полностью уничтожены.

CL (confluent lysis) — полный лизис. Идеальный результат, когда бактериальный слой становится полностью прозрачным. Это означает, что вирус эффективно уничтожил все бактерии.

SCL (semi-confluent lysis) — частичный лизис. Бактериальный слой разрушен частично, на нём видны как чёткие, так и мутные участки. Это указывает на то, что концентрация вируса, возможно, недостаточно высокая.

IP (individual plaques) — отдельные прозрачные бляшки. Это означает, что количество вирусов в исследуемом образце низкое. Эти методы называются «спот-тест» (spot test) и позволяют также определить спектр клеток-хозяев для данного фага.