

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ УСКОРЕННЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИИ РОДА *CITROBACTER* В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

*Л.П.Пульчеровская, кандидат биологических наук, доцент,  
Тел. 8(8422) 55-95-47, pulcherovskaya.lidia@yandex.ru  
Д.Г.Сверкалова, кандидат биологических наук, ст.  
преподаватель, Тел. 8(8422) 55-95-47, da2307@yandex.ru  
ФГБУ ВО Ульяновский ГАУ*

**Ключевые слова:** *патологический материал, бактериофаги Citrobacter, типирование, индикация, бактериологический метод, РФ.*

*В статье представлен сравнительный анализ классического бактериологического метода и реакции нарастания титра фага с целью индикации патогенных для животных и человека бактерий рода Citrobacter в патологическом материале.*

**Введение.** Представители рода *Citrobacter* широко распространены в окружающей среде. Некоторые штаммы являются представителями нормальной микрофлоры кишечника [12]. Представители этого рода способны вызывать вспышки гастроэнтеритов, внутрибольничные инфекции, урологические заболевания и даже сепсис у людей.

*Бактерии* рода *Citrobacter* способны самостоятельно или в ассоциации с другими микроорганизмами вызывать заболевания у животных [5]. Особый интерес представляют исследования по изучению роли цитробактера в возникновении диареи новорожденных животных [6].

Согласно литературным данным цитробактеры, выделенные от больных и здоровых людей и животных, по степени гемолитической и антилизоцимной активности не отличаются друг от друга.

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых цитробактерами, проводится классическим бактериологическим методом и основана на выделении чистой культуры бактерий и их идентификации по общепринятым тестам.

Современные методы иммунодиагностики, предлагаемые для индикации названных бактерий, хотя и являются высокоспецифичными и чувствительными, но методики сложны, высокая стоимость оборудования и реактивов для постановки этих реакций делает их на данный момент недоступными для большого количества ветеринарных лабораторий. Поэтому

перед современными исследователями стоит задача изыскания более простых и доступных для микробиологических лабораторий разных уровней методов индикации и идентификации *бактерий рода Citrobacter* в патологическом материале, пищевых продуктах и объектах окружающей среды.

В лабораторной практике для ускорения индикации и идентификации патогенных для животных и человека микроорганизмов в объектах окружающей среды, патологическом материале и в продуктах питания, а также для их быстрого типирования, предложены специфические индикаторные бактериофаги [1-6,8].

О возможности использования специфических бактериофагов для индикации патогенных микроорганизмов имеются сообщения ряда авторов еще с 1936 года. В 1960 году В.Д.Тимаков и Д.М.Гольдфарб предложили метод обнаружения патогенных микроорганизмов в исследуемом материале без выделения чистой культуры и по настоящее время, и мы в своих исследованиях не единожды уже использовали [1-9].

Этими же учеными были разработаны основные требования, предъявляемые к индикаторным фагам, используемым в РНФ, а именно: они должны обладать высокой вирулентностью, широким диапазоном литического действия, высокой адсорбционной способностью, коротким латентным периодом и высокой урожайностью, иметь высокий показатель эффективности множественности[8].

**Цель и задачи исследования.** Провести сравнительный анализ классического бактериологического метода и ускоренного метода РНФ с целью индикации бактерий *рода Citrobacter* с использованием выделенных и селекционированных нами фагов Cf-1 и Cf-2 в патологическом материале.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для проведения наших исследований послужили - пробы фекалий от больных диареей поросят в возрасте до 12 суток (9 проб), принадлежащих свиноподкомплексу «Волжский» Ульяновской области.

В качестве индикаторных культур использовали бактерии рода *Citrobacter*, выделенные нами из патологического материала и пищевых продуктов и вирулентные, специфические бактериофаги Cf-1 и Cf-2, обладающие высокой литической активностью и изолированные из объектов окружающей среды.

Питательные среды: мясопептонный агар (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), 0,3%-ный, 0,7%-ный, 1,5%-ный; мясопептонный бульон ТУ 10-02-02789-176-94(ООО «БиоКомпас-С», РФ), агар Эндо-ГРМ»; агар Клиглера-ГРМ (г. Оболенск, ФБУН ГНЦ); среды Гисса с мальтозой, лактозой, маннитом, глюкозой» (г. Махачкала); инозитом, дульцитом,

сорбитом; среда Симмонса (ООО «Биокомпас С»); физиологический раствор; лабораторная посуда и оборудование.

**Результаты и выводы исследования.** Используя строгую специфичность выделенных из окружающей среды и селекционированных нами бактериофагов Cf-1 и Cf-2 по отношению к бактериям рода *Citrobacter* применяли схему выделения и ускоренной идентификации цитробактеров и сравнили ее со стандартной схемой бактериологического исследования патологического материала, изложенной «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года и «Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов» Утверждены Отделом ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года. (Методические рекомендации)/ ВНИИВСГиЭ, Москва, 2005 г.

Патологический материал для проведения исследований отбирали в соответствии с действующими нормативными документами.

Результаты исследований и их обсуждение. Обнаружение цитробактеров проводили классическим бактериологическим методом и ускоренным - с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ)

Тестируемые методы исследования проводили одновременно. Бактериологическое исследование проб фекалий проводили согласно «Методическим указаниям по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями». Которое включало в себя посев на общепотребительные питательные среды и специальные питательные среды. С последующим выделением чистой культуры искомого микроорганизма.

Ускоренный метод - РНФ имеет ряд преимуществ, которые позволили обнаружить искомые микроорганизмы в патологическом материале без выделения чистой культуры. Сущность данного метода заключается в том, что если в материале присутствуют искомые микроорганизмы, то гомологичный бактериофаг, вступив во взаимодействие с ним, размножится и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага будет указывать на присутствие искомого микроорганизма [4].

Общая схема нашего исследования состояла из следующих этапов: исследование начинали с превращения исследуемого материала в

оптимальную среду взаимодействия бактерии и специфического фага, добавления к исследуемому материалу индикаторного фага, инкубации смеси, отделения фага от посторонней микрофлоры и далее проводили количественный учет фага по методу Грациа [3-6]. Для этого исследуемую пробу испражнений поросят в возрасте до 12 суток весом 10 г вносили в стерильную колбу, содержащую мясопептонный бульон в соотношении 1:10. Содержимое колбы встряхивали. Затем готовили 3 пробирки. В пробирки №1 и №2 вносили по 9 мл исследуемой взвеси, в пробирку №3 – вносили 9 мл стерильного МПБ. Далее в пробирки №1 и 3 добавляли 1 мл индикаторного фага (Cf-1) в рабочем разведении, а в пробирку №2 вносили 1 мл МПБ. Рабочее разведение бактериофага содержало  $8 \times 10^4$  корпускул в 1 мл. При титре фага, равном  $4 \times 10^8$  частиц в 1 мл, фаг разводили 1:10<sup>4</sup>, при титре фага, равном  $6 \times 10^9$  частиц в 1 мл - 1:10<sup>5</sup>. Пробирка №1, в которой находилась взвесь исследуемого материала и индикаторный фаг, являлась опытной. Пробирка №2 – без фага. Пробирка №3 – контроль на титр индикаторного фага. Все пробирки выдерживают в течение 16 часов при температуре 37°C. Содержимое каждой пробирки разводили МПБ так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки №3 на чашках Петри образовалось несколько десятков негативных колоний фага. В пробирке №3 индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл. Содержимое опытных пробирок №1 и №2, разводили аналогично. Освобождение суспензий пробирок от посторонней микрофлоры 1-3 проводили путем прогревания в водяной бане при t 60°C в течение 30 минут. После чего содержимое пробирок исследовали на определение количества корпускул бактериофага по методу Грациа. Те же манипуляции проделали и с фагом Cf-2.

Результат реакции учитывали визуально - путем подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках Петри. [1-7] Положительный результат характеризовался увеличением количества корпускул бактериофага хотя бы одного штамма фага по сравнению с контролем в 5 раз и более.

При исследовании патологического материала бактерии рода *Citrobacter* бактериологическим методом были обнаружены в 2-х пробах фекалий при затрате времени на проведение исследования - 120 часов. [5]

При исследовании материала от поросят в РНФ с использованием диагностических цитробактерных бактериофагов Cf-1 и Cf-2 положительная реакция была в 6 пробах фекалий. Время индикации искомых бактерий значительно сократилась и составило по сравнению с первой схемой всего 20 часов.

При классическом бактериологическом методе индикации бактерий рода *Citrobacter* отрицательный результат наблюдали в 7 пробах 1,2,3, 5, 6, 8 и 9. Положительный результат в 2 пробах 4 и 7. Отрицательный результат в процентном отношении к общему количеству исследуемых проб составил 78% и положительный 22% соответственно.

При использовании РНФ отрицательный результат обнаружения искомых бактерий получили в 3 пробах: 1, 3 и 9. Положительный результат наблюдали в 6 пробах: 2, 4, 5, 6, 7 и 8. При этом свободный фаг в контроле отсутствовал. Отрицательный результат в процентном отношении к общему количеству исследуемых проб фекалий составил 33% и положительный 67% соответственно.

**Заключение.** Результаты сравнительного анализа двух методов: классического бактериологического метода и РНФ свидетельствуют о более высокой чувствительности ускоренного метода при обнаружении бактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале без выделения чистой культуры и при, значительно, меньшем затратах времени, реактивов и посуды.

РНФ по технике исполнения является простым и удобным, достаточно чувствительным, специфическим и доступным методом, позволяющим быстро обнаружить искомый микроорганизм, конечно при условии наличия специфических бактериофагов, в условиях ветеринарной лаборатории любого уровня и в практически любом материале.

Что и подтверждают проведенные нами исследования патологического материала. При исследовании 9 проб патологического материала, взятого от больных поросят свинокомплекса «Волжский» Ульяновской области, бактериологическим методом выявлено искомым бактерий рода *Citrobacter* в 22% (2 пробы) исследуемых проб, а в реакции нарастания титра фага - 67% (7 проб). Метод РНФ оказался значительно эффективнее классического бактериологического в три с половиной раза.

В настоящее время реакция нарастания титра фага разработана для индикации многих патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов в патологическом материале, объектах окружающей среды, пищевых продуктах и кормах, а также ряд ее модификаций

#### Библиографический список

1. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Саратов. гос. аграр. ун-т им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2006. - 21 с.
2. Ефрейторова, Е.О. Контаминация пищевых продуктов инфекционным обь-

- ектом *Serratia marcescens*.// Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных / Всерос. науч.-исслед. ин-т. ветеринар. вирусологии и микробиологии, Покров, 2014.-Ч. 2.- С. 270-275.
3. Ефрейторова, Е.О. Выделение фагов бактерий рода *Citrobacter* из объектов окружающей среды и продуктов питания// Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Сборник: Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и безопасности Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. 2015. С. 245-247
  4. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис.канд.вет. наук: 16.00.03. - Москва, 1994. - 19 с.
  5. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике // – Киев: Урожай, - 1978. – С. 88.
  6. Феоктистова, Н.А. Выделение бактериофагов рода *Proteus* и подбор параметров культивирования / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 90-106.
  7. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 3 (39). – С. 99-105.
  8. Садртдинова Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumoniae* /Е.А.Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А.Васильев// Инфекция и иммунитет.2014.-№5.-С.95.
  9. W. Frederiksen, P. Sogaard // In: The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria ecophysiology, isolation, identification, applications / ed. by A. Balows [et al.]. - 2nd ed. - Berlin: Springer-Verlag, 1991. -P. 2744-2753.

## **POSSIBILITY OF APPLICATION OF ACCELERATED METHODS FOR INDICATION OF BACTERIA OF THE GENUS CITROBACTER IN PATHOLOGICAL MATERIAL**

***Pulitserovskaya L. P., Sverkalova D. G.***

**Key words:** *pathological material, bacteriophages of Citrobacter, typing, display, bacteriological method, RNF.*

*The article presents a comparative analysis of the classical bacteriological method and the phage titer increase reaction to indicate the pathogenic bacteria of the genus *Citrobacter* in the pathological material for animals and humans.*