О серогрупповой принадлежности патогенных штаммов протея, выделенных от животных, сообщается в работах отдельных авторов (Е.Т. Парайко, И.Н. Парайко, 1990).

Не разработаны и методы фагодиагностики заболеваний и фаготипирования протеев из-за отсутствия стандартных наборов бактериофагов.

Поэтому перед исследователями поставлена задача, направленная на решение этих проблем.

УДК 619 : 579

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ СООТНОШЕНИЯ КУЛЬТУРЫ И ФАГА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ С ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев

В последние годы благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей расширилось представление о роле бактерий рода Citrobacter в патологии животных и человека.

Постановка бактериологического диагноза на заболевания, вызываемые данными микроорганизмами, имеет ряд трудностей. Одной из них является идентификация цитробактеров по их биологическим свойствам. Это длительный и трудоёмкий процесс, который не позволяет быстро и точно идентифицировать микроорганизмы. Поэтому возникла необходимость поиска альтернативных методов лабораторной диагностики, которые будут менее трудоёмкими, более быстрыми и доступными для любого уровня. Таким методом является фагодиагностика.

Для индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов необходимо иметь набор фагов с определёнными биологическими свойствами, одним из которых является их высокая литическая активность.

Для решения этой проблемы мы поставили перед собой задачу: найти оптимальное соотношение фага и культуры при его пассировании с целью получения фага с высокой активностью, который в дальнейшем будет использоваться для конструирования диагностического препарата.

Материалом для исследований послужили: фаг № 3, выделенный из сточных воды и выращеный на индикаторной тест-культуре C.freundii (7 часов при 37^0 С и затем до 18 часов при комнатной температуре), и индикаторная культура – Citrobacter freundii, полученная из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА, находящаяся в «S» форме, выращенная на МПБ при 37^0 С в течение 18 часов.

Селекцию фага проводили методом пассирования его на индикаторной тест-культуре.

Для опыта вносили фаг и индикаторную тест-культуру в разных количествах. Одновременно ставили контроль на рост тест-культуры без фага. В опытную и контрольную пробирки добавляли одинаковый объём суточной тест-культуры (табл. 1.).

1. Соотношение исследуемого фага и тест-культуры при его селекции

№ пассажа	Опытная пробирка			Контроль на культуру, мл
	Лизат бульонной культуры фага, мл	Объём суточной бульонной культуры, мл	Время просветления МПБ	
1	0,2	0,2	Лизис через 30 мин	0,2
2	0,2	0,4	Лизис через 40 мин	0,4
3	0,2	0,8	Лизис через 40 мин	0,8
4	0,2	1,0	Лизис через 1 ч	1,0
5	0,2	1,2	Лизис через 1 ч	1,2
6	0,2	1,4	Лизис через 1ч	1,4
7	0,2	1,6	Лизис через 1 ч	1,6
8	0,2	2,0	Лизис через 1ч	2,0
9	0,2	2,5	Лизис через 1 ч 20 мин	2,5
10	0,2	4,5	Лизис через 3 ч	4,5
11	0,1	3,0	Лизис через 9 ч	3,0

Каждый пассаж выдерживали в термостате при температуре 37^0 С в течение 7 часов, затем при комнатной температуре до 18 часов. В результате в опытных пробирках через разное количество времени наблюдали полный лизис тест-культуры, который выражался просветлением бульона, в то время как контроль на культуру был мутным.

Литическую активность бактериофага № 3 оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной тест-культуры C.freundii в жидкой и плотной средах (по методу Аппельмана и Грация). Её выражали тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявлял своё литическое действие. Более точным методом оценки активности бактериофага, по мнению Д.М.Гольдфарба (1961), является определение количества активных корпускул фага в единице объёма. Активность определяли в конкретных, стандартных условиях.

Сущность метода Аппельмана: в ряд пробирок из нейтрального стекла одного диаметра наливали по 4,5 мл МПБ. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого фага. Затем делали последовательные, десятикратные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл фага. Использовали для опыта 11 пробирок. Из по-

следней пробирки лишние 0,5 мл выливали. Затем во все опытные пробирки вносили по 0,2 мл 18-ти часовой культуры C.freundii № 9. 12-я и 13-я пробирки были контрольными, в первой из них находился МПБ и культура (без фага), во второй – один МПБ (контроль на стерильность). Все пробирки помещали в термостат при 37^0 С на 7 часов, а затем оставляли при комнатной температуре. Титр устанавливали при встряхивании по последней, прозрачной пробирке и выражали разведением фага.

Сущность метода Грациа (метод агаровых слоёв) в данном случае состоит в количественном определении фаговых частиц в различных разведениях. Для опыта брали 1 мл фага в разведениях 10^{-7} до 10^{-12} (без культуры) и вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7% МПА, расплавленного и остуженного до 46-47^0 С, туда же вносили 0,2 мл 18-ти часовой культуры C.freundii № 9. Содержимое пробирки перемешивали и выливали на поверхность 1,5% МПА. Чашки оставляли для затвердения агара, затем их выдерживали в термостате при 37^0 С в течение 20 часов. Активность определяли по количеству негативных колоний на газоне индикаторной культуры.

Активность исследуемого фага № 3 определяли при выделении его из сточной воды и после проведённых опытов. Результаты приведены в таблице 2.

2. Результаты изменения литической активности фага № 3.

Литическая активность	Фаг	
	до пассирования	после пассирования
По Аппельману	10^{-6-7}	10^{-8-9}
По Грациа	$1,5\times10^{9}$	2×10^{11}

Анализируя результаты проведённых исследований по изучению литической активности цитробактерного фага № 3, установили: исследуемый фаг нужно пассировать на индикаторной тест-культуре C.freundii в соотношении: 1 часть фага и 2 части тест-культуры. В результате проведённых опытов активность фага достигает своего максимального значения (по Аппельману от 10^{-6} - 10^{-7} до 10^{-8}- 10^{-9}; по Грациа от $1,5\times10^{9}$ до 2×10^{11}).

Активность фага № 3 при выделении из сточной воды была ниже, чем в нём же, но после селекции на 2 единицы (табл. 2).

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) // -М., -1961. -521С.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие – Ульяновск. –1988. –45С.
3. ГольдфарбД.М. Бактериофагия. // -М.: Медгиз. –1961. -297С.

4. Колпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов. // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. / Материалы научной конференции ВНИИВиМ. – Покров. – 1992. – Часть 11. – С 211-212.

УДК 619 : 579

ИЗЫСКАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СРЕДСТВ И МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *CITROBACTER*

Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев

Род Citrobacter объеденяет группу ферментативно родственных бактерий, названных так благодаря их способности утилизировать цитрат (citrus- лимон, bacter- мелкие палочки) и использовать его в качестве единственного источника углерода. Название было предложено C. Wercam, G. Gjillen (1932), а также U.E. Mankuburen (1948).

Согласно современной классификации, род включает следующие виды: Citrobacter freunfii, C. coseri, C. amalonaticus, C. farmeri, C. youngae, C. braakii, C. rodentum, C. wermanii и два до сих пор безымянных вида. Для них предложены названия C. gillenii и C. murliniae.

Цитробактеры выделяют из почвы, воды, фекалий животных и человека. Вероятно, некоторые виды входят в состав нормальной микрофлоры кишечника. Штаммы патогенных серогрупп способны вызывать вспышки гастроэнтеритов и токсикоинфекций у детей и взрослых людей, лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Согласно литературным данным, факторы патогенности у данного рода изучены не достаточно, т.к. до настоящего времени не разработаны экспериментальные модели патогенеза инфекции. Возможно, основные факторы патогенности цитробактеров – микроворсинки, жгутики, энтеротоксин и поверхностный белок адгезии, которые отсутствуют у авирулентных штаммов.

Бактерии рода Citrobacter часто являются причиной желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных животных. Так, при исследовании Е.С. Ворониным с соавт. (1989) культур энтеробактерий, выделенных из фекалий больных диареей телят, из 580 изученных культур 30 принадлежали роду Citrobacter и оказались патогенными для белых мышей.

Л.С. Кавруком (1994) при исследовании соскобов с полов репродуктивных помещений в период массовых желудочно-кишечных заболеваний и фекалий, больных диареей новорожденных телят и поросят, было установлено, что бактерии рода Citrobacter циркулировали на 8 молочно-товарных фермах из числа 18 обследованных и на 6 свинарниках маточ-