

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* объединяет 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 С. Wercam, G. Gjillen (1932), а также U.E. Mankuburen (1948).

Согласно современной классификации, род включает следующие виды: *Citrobacter freundii*, *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. gilleni* 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-

никах из 28. По данным автора, 73% штаммов бактерий рода *Citrobacter*, выделенных от больных диареей и трупов поросят и 75% - выделенных от телят, обладали патогенными свойствами и вызывали гибель белых мышей при внутрибрюшинном введении суточных агаровых культур в дозе 500 млн. м.к.

Tschape H. et.al (1995) обследовали детей и персонал (всего 152 человека) в яслях и соседнем детском саду во время вспышки гастроэнтерита, сопровождающегося гемолитическим уремическим синдромом (ГУС). В образцах фекалий с помощью ИФА у 36 человек выделили веротоксин (VT). Выделено 59 штаммов *C. freundii*, содержащие генетические детерминанты VT. Все изоляты по серологическим и ферментативным свойствам не отличались от других представителей *C. freundii*, однако не относились ни к одному из 42 известных сероваров.

С.Н. Золотухин с соавт. (1999) сообщает о выделении патогенных штаммов цитробактера в ассоциации с эшерихиями и синегнойной палочкой от трупов и больных диареей новорожденных телят в период массовых желудочно-кишечных заболеваний.

Бактерии рода *Citrobacter* образуют мелкие, прямые, подвижные палочки. Факультативные анаэробы. Температурный оптимум – 37⁰ С, оптимальная рН - 7,2. Спор и капсул не образуют. В мазках располагаются одиночно и парами. По Граму окрашиваются – грамотрицательно. Цитробактеры хорошо растут на простых питательных средах, утилизируют цитрат как единственный источник углерода. На среде Эндо лактозоположительные варианты цитробактера образуют колонии, окрашенные в розовый или красный цвет, но лишённые типичного для кишечной палочки металлического блеска; у лактозоотрицательных вариантов колонии бесцветные или сероватые с розовым оттенком, более тёмным в центре. На среде Плоскирева лактозоотрицательные штаммы *Citrobacter* образуют слегка опалесцирующие выпуклые колонии, окрашенные в тон среды (слегка розовые); лактозоположительные колонии имеют более интенсивную окраску с темным центром. На висмут-сульфит агаре через 48 часов инкубации цитробактеры дают обильный рост, образуя светло-зеленые, коричневые или черные колонии без окрашивания участка среды под колонией. Рост их на этой среде более обильный, чем сальмонелл и отличается неприятным запахом. Основой идентификации *Citrobacter* являются их ферментативные свойства. Они утилизируют цитрат в среде Симмонса, образуют газ в глюкозе, ферментируют лактозу в разные сроки (встречаются лактозоотрицательные штаммы), а также ферментируют маннит, рамнозу, сорбит, арабинозу, ксилозу, мальтозу, не ферментируют инозит. Не обладают лизиндекарбоксилазой, фенилаланиндезаминазой и желатиназой. Большинство штаммов образуют сероводород и не образу-

ют индол. Они вариабельны в отношении сахарозы, салицина, дульцита, раффинозы и адонита. Положительны в реакции с метиловым красным и отрицательны в реакции Фогеса-Проскауэра. Вариабельность некоторых ферментативных признаков *Citrobacter* положена в основу их разделения на 3 вида (табл. 1).

В связи с этим возникла необходимость в поиске альтернативных методов лабораторной диагностики, которые были бы менее трудоёмкими, более быстрыми и доступными для лабораторий любого уровня. Одним из таких методов является фагодиагностика (М. Адамс, 1961; Д.М. Гольдфарб, 1961; В.Я. Ганюшкин, 1988. 1990; Т.И. Кольпикова и др., 1990, 1992).

Для индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов необходимо иметь набор фагов с определёнными биологическими свойствами. Поиск активных штаммов бактериофагов, лизирующих патогенные культуры цитробактеров, является одной из целей наших исследований.

Материалом для исследований послужили сточные воды из животноводческих помещений и общественных туалетов разных хозяйств Ульяновской и Самарской областей (совхоз «Рошинский» Ульяновской области, учхоз УГСХА Ульяновской области, центральный автовокзал с. Кошки Самарской области и др.).

1. Отличительные биохимические свойства основных групп бактерий рода *Citrobacter*

Тест или субстрат	<i>C.amalonicus</i>	<i>C.koseri</i>	<i>C.feundii</i>
Образование индола	+	+	-
Цитрат Симмонса	± (чаще +)	+	+
-гликизидаза	-	+	-
Образование сероводорода	-	-	± (чаще +)
Орнитин декарбоксилаза	+	+	± (чаще -)
Рост на средах с KSN	+	-	+
Утилизация малоната	-	+	± (чаще -)
Ферментация адонита (К)	-	+	+
Ферментация мелибиозы (К)	-	-	±
Ферментация рафинозы (К)	-	±	±
Ферментация сахарозы (К)	± (чаще -)	+	±
Чувствительность к :	+	+	-
Цефалониту (30мкг)			
Карбенициллину (100мкг)	-	-	+

Примечание: К- образование при ферментации кислоты.

В качестве индикаторных штаммов были использованы 9 патогенных штаммов бактерий рода *Citrobacter*, полученные нами из музея кафедры, а также выделенные с патологического материала и объектов внешней среды.

В качестве питательных сред использовали МПБ 1,5%, МПА с генцианвиолетом, 0,3% МПА и 0,7% МПА.

Цитробактеры культивировали в термостате при 37⁰ С в течение 19-24 часов на МПБ.

Фаги выделяли из сточных вод методом агаровых слоёв с предварительным прогреванием и центрифугированием исследуемого материала (по Грациа, 1936).

В результате проведённых исследований нами всего было выделено 23 термостабильные рассы фагов, обладающих способностью на индикаторных культурах цитробактера образовывать негативные колонии 4-х типов: 1-й тип – мелкие прозрачные негативные колонии до 1 мм в диаметре (фаг 5); 2-й тип – прозрачные негативные колонии до 2-3 мм (фаг 1); 3-й тип – прозрачные негативные колонии до 2-3 мм с зоной неполного лизиса по периферии (фаг 7); 4-й тип – стерильные пятна 5-12 мм с зоной неполного лизиса по периферии, ширина зоны 0,5-1 мм (фаг 3).

Специфичность бактериофагов проверяли на культурах бактерий гетерогенных семейств и родов: *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Morganella*, *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Proteii*, *Y.enterocolitica*, *Bacillus*. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что селекционированные фаги устойчивы к нагреванию при 60⁰ С и являются специфичными.

Литическая активность выделенных фагов была на плотных питательных средах (по методу Грациа) от 1×10^7 до $2,3 \times 10^9$, а в жидкой среде (по Аппельману) от 10^{-2} до 10^{-8} .

Специфичность и литическая активность выделенных нами цитробактерных бактериофагов открывает перспективы для их использования в качестве диагностических препаратов.

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. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. // -М.: Медгиз. –1961. –297С.
4. Золотухин С.Н., Малов А.А., Ганюшкин В.Я. Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции. Тезисы докладов 2-ой межгосударственной конференции. – М., 1997. С 124.

5. Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. // -Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветсанэкспертизы. // Ульяновск, 2000.

УДК 619:579

ВЫДЕЛЕНИЕ И УСКОРЕННАЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ O157

С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев, Н.И.Молофеева

Фаготипирование является одним из методов внутривидовой дифференциации бактерий, оно помогает выявить источники и пути циркуляции инфекции, качественнее проводить эпизоотологическое и эпидемиологическое обследование инфекции. Бактериологу оно позволяет дать более точную характеристику возбудителя болезни, а также сократить время исследования.

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к патогенным штаммам *E.coli* серологической группы O157, мы разработали схему выделения и ускоренной идентификации этих микроорганизмов и сравнили ее со схемой бактериологического исследования патологического материала, изложенной в действующих «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденных Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 27.07.2000.

Для этих целей пробы фекалий, контаминированные *E.coli* серологической группы O157, высевали на питательную среду сорбитол агар (прямой посев), инкубировали при температуре 36-37°C 18-20 часов. Выросшие в чашках на сорбитол агаре мелкие и средние полупрозрачные колонии сорбит отрицательные бактерии, имеющие S –форму, с голубоватым оттенком или серовато-голубоватого цвета пересеивали в МПБ (по 4-6 колоний с чашки). Культуры микроорганизмов инкубировали при 37°C в течение 6-18 часов (до появления выраженного помутнения среды).

Первичные бульонные культуры, полученные после посева колоний сорбитотрицательных бактерий с культур на сорбитол агаре, микроскопировали (окраска по Граму) и при наличии в мазках мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, не образующих спор, располагающихся одиночно и попарно, подвергали изучению ферментативных свойств. Производили посев на среды (глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, дульцит, мальтоза, сорбит, реакция с метилротом, реакция Фогес-Проскауера, среда Симонса, индол, сероводород, мочевины, желатин, фенилаланин, лизин, орнитин) и при получении результатов, соответствующих бактериям рода *Escherichia*, указанных в таблице 1 данные культуры подвергали фагоидентификации.