

УСКОРЕННАЯ ФАГОИНДИКАЦИЯ И ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PROVIDENCIA*

Барт Н.Г., кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47, bart@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактериофаги, патогены, инактивация, лизис, морфология, колонии, индикация, идентификация.

*Работа посвящена исследованию и разработке технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Providencia* с помощью специфических бактериофагов.*

Введение. В условиях роста устойчивости к противомикробным препаратам бактериофаготерапия, также известная как фаготерапия, возрождается в качестве потенциального средства лечения бактериальных инфекций, включая инфекцию мочевыводящих путей. Фаготерапия имеет ряд потенциальных преимуществ перед антибиотиками, включая способность разрушать бактериальные биопленки и сочетаться с противомикробными препаратами с минимальными побочными эффектами или воздействием на микробиоту. В то время как лизогенные бактериофаги обладают потенциалом вызывать более вирулентные инфекции у людей и животных, их литические аналоги обладают особой способностью использоваться для борьбы с инфекциями, вызванными УПП, поскольку литический процесс эффективно уничтожает бактериального хозяина.

Материалы и методы исследований. В этом исследовании бактериофаги *Providencia*, порлученные из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ.

В этом исследовании были использованы изученные по биологическим свойствам бактериофаги F-87 УГСХА и F-67 УГСХА, которые являются строго специфичными в отношении бактерий рода

Providencia, с широким совместным диапазоном литического действия – 96,4 %, с литической активностью от $4,2 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ до $1,8 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл, оказались устойчивы к воздействию хлороформа – 100 % и обладали более высоким порогом термоинактивации, чем у бактерий (81 °С).

Эти показатели биологических свойств соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов.

Исходные фаги имели следующую характеристику: титр (по Грациа от $4,2 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ до $1,8 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ корпускул в 1 мл, размер негативных колоний фага F-87 – 2 мм, прозрачные в центре и с зоной неполного лизиса по периферии 1,7 мм; F-67 УГСХА – 1-1,5 мм при инкубации 16 часов. Исходные штаммы фагов лизировали индикаторные штаммы бактерий *Providencia rettgeri* Н 87 и *Providencia rettgeri* Н 67.

Индикацию бактерий рода *Providencia* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале проводили с помощью реакции нарастания титра фага.

Подготовку и посев проб материала, подлежащего исследованию, проводили в соответствии с ГОСТами «Методы бактериологического анализа». В качестве материала для исследований использовали воду, комбикорм, мясо и фекалии контаминированные бактериями рода *Providencia* в концентрациях 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Результаты исследований и их обсуждение. Морфологию негативных колоний изучали в разведении фагов 10^{-7} - 10^{-9} с индикаторной культурой на питательном агаре в посевах методом агаровых слоев по Грациа. Учет проводили через 18-24 часа инкубации в термостате при температуре 37 °С. Отмечали величину негативных колоний, форму, степень прозрачности, характер краев колоний, наличие и величину неполного лизиса. Образовавшиеся негативные колонии разделили на два типа. К первому типу относятся круглые, прозрачные в центре негативные колонии диаметром от 1 до 2 мм и более с зоной неполного лизиса по периферии шириной 1-8 мм. Колонии второго типа – круглые, прозрачные с ровными краями, диаметром до 4-5 мм, с отсутствием зоны неполного лизиса.

Качество уже готового индикаторного фага *Providencia* вновь проверили по следующим показателям: чистоты физических свойств, титру, степени нарастания титра фага, спектру литической активности и специфичности. Для проверки качества фага отбирали из разных мест серии 3 флакона.

Индикаторные бактериофаги F-87 УГСХА и F-67 УГСХА представляют собой прозрачную жидкость желтоватого цвета (цвет засеянной среды), без посторонних примесей, осадка и имеют титр не ниже 10^8 . Дату изготовления серии исчисляли со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4 °С 12 месяцев.

Учитывая строгую специфичность отобранных бактериофагов F-87 и F-67 серии УГСХА по отношению к штаммам провиденций, мы разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов.

Фагоидентификация выделенных штаммов бактерий рода *Providencia* во всех объектах подтверждена результатами исследований биохимических свойств.

Одновременно были проведены исследования по определению минимальной заражающей концентрации микробных клеток бактерий рода *Providencia* в исследуемых объектах, при которой возможно обнаружить культуру бактериологическим методом.

По результатам данных исследований заражающая концентрация микробных клеток бактерий рода *Providencia* в объектах исследования составила 10^4 м.к./мл. При исследовании фекалий чувствительность понижается до 10^5 м.к./мл из-за обильной обсемененности посторонней микрофлорой.

Таким образом, схема фагоидентификации в сравнении с традиционной схемой, изложенной в вышеупомянутых методических указаниях, позволяла сократить сроки исследования в два раза, результат получали спустя 48 часов (2 суток) с меньшими затратами посуды и реактивов. В то время как бактериологическим методом время исследования занимало 96 часов (4 суток).

Решение следующей поставленной задачи заключалось в разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с различными субстратами:

- определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение;

определить оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями.

Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, при разной заражающей концентрации, исследование проводили по методике, с использованием МПБ контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами (*Providencia rettgeri* Н 87, *Providencia rettgeri* Н 67) от 10^1 до 10^5 м.к./мл. Фаги F-87 УГСХА, F-67 УГСХА использовали в рабочем разведении, содержащем не более 10^5 фаговых корпускул в миллилитре.

В результате проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями рода *Providencia* в концентрации 10^3 м.к./мл для фага F-87 УГСХА и 10^4 м.к./мл для фага F-67 УГСХА.

Заключение. Разработанные биотехнологические параметры изготовления и контроля бактериофагов *Providencia* позволяют получить специфический диагностический препарат штаммов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА с высокой литической активностью. Разработанная схема с применением фагов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА, позволяет выделить и идентифицировать бактерии рода *Providencia* за 48 часов.

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Р. Насибуллин и др. Ульяновск. – 2017.

2. Барт, Н.Г. Ветеринарно-санитарная экспертиза мяса при эхинококкозе /Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев// Актуальные вопросы ветеринарной науки. Материалы Международной научно-практической конференции. – 2015. – С.183-186.

3.Барт, Н.Г. Разработка методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний с использованием биопрепарата на основе бактериофагов *Providencia* / Н.Г. Барт, А.С.

Мелехин // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения. Международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – 2011. – С.46-48.

4. Ширманова, К.О. Определение общего количества бактерий в молоке / К.О. Ширманова, Е.Б. Мухин, О.С. Шумихина и др. // Студенческий научный форум – 2016: VIII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. – 2016.

5. Ширманова, К.О. Схема детекции маститогенной микрофлоры/ К.О. Ширманова, Е.Б. Мухин, Ю.Б. Васильева и др. // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – 2016. – С.234-235.

6. Мухин, Е.Б. Определение бактерий группы кишечной палочки в молоке / Е.Б. Мухин, К.О. Ширманова, А.В. Загуменнов и др. // Студенческий научный форум – 2016: VIII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание. – 2016.

7. Акимов, Д.Ю. Выделение фагов бактерий рода *Providencia* из объектов внешней среды и патологического материала/Д.Ю. Акимов, В.Р. Сайфулина, Н.Г. Барт и др.//Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра МВЭиВСЭ. – 2012. – С.12-14.

8. Ситнов, Д.В. Ветеринарно-санитарная экспертиза говядины в условиях лаборатории рынка/ Д.В. Ситнов, Д.Р. Балиева, Н.Г. Барт// СТУДЕНЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ - 2017. IX Международная студенческая электронная научная конференция. 2017.

9. Ситнов, Д.В. Определение доброкачественности мяса/ Д.В. Ситнов, Д.Р. Балиева, Н.Г. Барт// СТУДЕНЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ - 2017. IX Международная студенческая электронная научная конференция. 2017.

10. Барт, Н.Г. Характеристика бактериофагов рода *Providencia*/ Н.Г., Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев// Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. – 2013. – С.25-28.

ACCELERATED PHAGOINDICATION AND PHAGOIDENTIFICATION PROVIDENCIA BACTERIA

Bart N.G.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

Keywords: *bacteriophages, pathogens, inactivation, lysis, morphology, colonies, indication, identification.*

*The work is devoted to the study and development of technological parameters for the indication and identification of bacteria of the genus *Providencia* using specific bacteriophages.*