

УДК 619:579

**РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ УСКОРЕННОЙ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА
E.FAECALIS С ПОМОЩЬЮ РНФ
A WORKING OUT OF THE FACTORS OF INDICATION OF THE BACTERIA
E.FAECALIS USING OF THE REACTION OF THE INCREASE OF THE TITRE OF THE
PHAGE**

**Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев
E.N. Kovaleva, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasiliev**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

The technological parameters of the increase of the titre of the phage using phage EF – 4 and EF – 5 significantly reduce the time of the indication of homologous bacteria in the test sites.

В настоящее время исследователи уделяют большое внимание разработке простых и надежных методов индикации различных патогенных бактерий в объектах внешней среды. Бактериофаги могут быть использованы для обнаружения возбудителя без выделения чистых культур – в реакции нарастания титра фага (РНФ).

Сущность РНФ заключается в том, что, если в исследуемом материале присутствует искомый возбудитель, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступив во взаимодействие с ним, размножится, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага укажет на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя. Целью исследования была разработка параметров ускоренной индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды с помощью реакции нарастания титра фага.

Объектами исследования являлись энтерококковые бактериофаги EF – 4 и EF – 5 серии УГСХА, выделенные нами из объектов внешней среды.

В качестве индикаторного использовали штамм *E.faecalis*, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА № 189.

Реакцию нарастания титра фага для индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом [2], С.Н. Золотухиным [1].

Определение количественного показателя РНФ

Для определения уровня нарастания титра, при котором РНФ можно считать положительной, были проведены эксперименты по обнаружению культур *E.faecalis* разных заражающих концентраций (от 10^5 до 10^1 м.к./мл) в мясопептонном бульоне.

Установлено, что результат реакции является положительным, т.е. увеличение количества корпускул фага EF – 4 УГСХА более чем в 5 раз, в пробах, при контаминации мясопептонного бульона бактериями *E.faecalis* в концентрации 10^3 м.к./мл, для фага EF – 5 УГСХА – при контаминации мясопептонного бульона бактериями *E.faecalis* в концентрации 10^4 м.к./мл.

Установление оптимального времени РНФ

В разработку оптимальных условий постановки реакции входит установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37°C;
- увеличение времени контакта исследуемого материала с фагом до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37°C.

В результате исследований было установлено, что после предварительного подращивания исследуемого материала в течение 5 часов удалось обнаружить энтерококки, гомологичные фагу EF – 4 УГСХА в концентрации 10^2 м.к./мл, фагу EF – 5 УГСХА – 10^3 м.к./мл (табл. 1,2).

Таблица 1

Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала с фагом EF – 4 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
	Результат РНФ					
5	–	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	33
24	+	+	+	+	+	41

Таблица 2

Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала с фагом EF – 5 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
	Результат РНФ					
5	–	–	+	+	+	22
16	–	+	+	+	+	33
24	+	+	+	+	+	41

Увеличение времени предварительной инкубации до 16 часов повысило чувствительность РНФ на один порядок для обоих фагов. Подращивание материала при 24-часовой экспозиции существенно не повлияло на результаты РНФ.

Во второй серии опытов изучали чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагами.

В результате проведенных исследований было установлено, что при инкубировании материала в течение 7 часов бактерии были обнаружены с помощью РНФ гомологичными фагами EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА в концентрации 10^2 и 10^3 м.к./мл исследуемого материала соответственно. Увеличение времени контакта материала с фагами позволило обнаружить исходные бактерии в концентрации 10^2 всеми фагами. 16 и 24-часовой контакт исследуемого материала с фагами не повлиял на чувствительность РНФ (табл. 3,4).

Таблица 3

Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом EF – 4 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
	Результат РНФ					
7	–	+	+	+	+	19
10	+	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	28
24	+	+	+	+	+	36

Таблица 4

**Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования
исследуемого материала с фагом EF – 5 УГСХА**

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	
Результат РНФ						
7	–	–	+	+	+	19
10	–	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	28
24	+	+	+	+	+	36

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что предварительное подращивание материала увеличивает время реакции, но чувствительность метода при этом не меняется в сравнении с исследованиями без подращивания.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным является режим РНФ при 7 часовой экспозиции исследуемого материала с фагами без подращивания, когда удастся провести индикацию энтерококков в количестве 10^2 – 10^3 м.к./мл изучаемого субстрата, на исследование которого затрачивается 19 – 24 часа. Поэтому данный режим рекомендован для дальнейших исследований.

Таким образом, разработанные технологические параметры РНФ с использованием фагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА значительно сокращают сроки обнаружения гомологичных бактерий в исследуемых объектах.

Литература

1. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
2. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – 32 с.