

ИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER* С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА (РНФ)

Пульчеровская Лидия Петровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1.

Email: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru

Ключевые слова: диагностика, бактериофаги, бактерии рода *Citrobacter*, реакция нарастания титра фага (РНФ), патологический материал, объекты внешней среды.

В статье рассмотрены вопросы индикации бактерии рода *Citrobacter* в объектах внешней среды с помощью реакции нарастания титра фага. Указаны свойства специфических бактериофагов, возможность использования биопрепарата на их основе для индикации указанных микроорганизмов без необходимости выделения чистой культуры.

Несмотря на сравнительно большой срок существования в качестве отдельной систематической группы, относительно экологии о цитробактерах известно не очень много, что объясняется длительным отсутствием набора дифференцирующих тестов. Очевидно, бактерии широко распространены в окружающей среде, так как их обнаруживают в самых разнообразных пищевых продуктах, воде, почве различных стоках. Цитробактеры также выделяют из кишечника и мочевыводящих путей человека, лошадей, крупного рогатого скота, собак, грызунов, птиц, рептилий и насекомых [13-18]. Всё большее значение цитробактеры приобретают в качестве патогенов различных морских, а также тропических аквариумных рыб [19]. Парентеральное введение бактерий мышам, морским свинкам или кроликам приводит к развитию абсцессов.

Столь широкому распространению, очевидно, способствует устойчивость цитробактеров во внешней среде. В почве бактерии сохраняются более 6 мес, в навозе — до 11 мес, в воде — до 10 мес. Они хорошо переносят замораживание; при 60 °С погибают в течение 30 мин, при 100 °С — моментально; при использовании дезинфектантов (1-2% раствор хлорамина, 2,5%

раствор формалина, 5% раствор карболовой кислоты) — через 15 мин.

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых цитробактерами, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок, недостаточно чувствителен и требует затрат времени, питательных сред и реактивов. Поэтому перед исследователями стояла задача изыскания более простого и доступного для любых лабораторий метода индикации и идентификации названных микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды с использованием реакции нарастания титра фага РНФ.

Целью наших исследований явилось изучение возможности применения реакции нарастания титра фага (РНФ) при обнаружении бактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале и объектах ветеринарного надзора с помощью индикаторных бактериофагов: С66 УГСХА, С61 УГСХА, С52 УГСХА. Для этого мы провели исследования по индикации цитробактеров в искусственно контаминированных ими фекальных массах и мясе.

Материалы и методы.

Обнаружение бактерий рода

Citrobacter в исследуемых объектах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988), С.Н. Золотухина (1994).

В опытах использовали индикаторные бактериофаги: С66 УГСХА (Титр фага 3×10^9 фаговых корпускул в 1 миллилитре. Размер негативных колоний 3,0-8,0 мм.), С61 УГСХА (Титр фага 4×10^9 фаговых корпускул в 1 миллилитре. Размер негативных колоний 0,5-1,0 мм.), С52 УГСХА (Титр фага 3×10^9 фаговых корпускул в 1 миллилитре. Размер негативных колоний 2,0-3,0 мм.) представляют собой специфические вирулентные фаги с широким спектром литического действия на штаммы бактерий рода *Citrobacter*. Фаги не лизируют бактерии гетерологичных семейств и родов. Препараты бактериофагов представляли собой прозрачные светло-желтого и желтого цвета лизаты патогенных штаммов. Пригодны для применения в течение одного года со дня изготовления при хранении в условиях температуры 2-4°C. [1,5]. Индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter*, выращенные на скошенном МПА. В качестве объектов для исследования использовали искусственно загрязненные бактериями рода *Citrobacter* фекалии и мясо. Также при выполнении исследований использовали мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета, физиологический раствор.

Индикация бактерий рода *Citrobacter* в искусственно загрязненных фекальных массах с помощью РНФ.

Пробу фекалий весом 10-20 г вносили в две стерильные колбы объемом 100 мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter* в количестве от 10^1 до 10^4 м.к.

Содержимое колб встряхивали в шутель-аппарате, с последующим отстаиванием взвеси в течение 10 минут. Приготавливали для опытной и контрольной проб 6 широких пробирок (диаметр 20 мм) и нумеровали их (1, 2, 3 и соответственно 1к, 2к и

3к). В пробирки № 1, 2 и 1к, 2к вносили по 9 мл исследуемой взвеси фекалий, в пробирки № 3 и 3к-9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки №1, 3 и 1к и 3к добавляли 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, а в пробирки №2 и 2к вносили 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага).

Рабочее разведение фага содержало 1×10^4 корпускул в 1 мл. При титре фага, равном 2×10^8 частиц в 1 мл, фаг разводили 1:10000, при титре фага, равном $3-5 \times 10^9$ частиц в 1 мл - 1:100000.

Пробирки №1 и 1к, в которых находились взвеси фекалий и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки №2 и 2к – без фага являлись контролем для выявления в пробах фекалий свободного фага. Пробирки №3 и 3к – контроль на титр индикаторного фага. Все три пробирки выдерживали в течение 16 часов при температуре 37°C. Допустимо исследование пробы после 5 часов инкубации. [3,4]

После культивирования при температуре 37°C содержимое каждой пробирки разводили бульоном (рН 7,4-7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки №3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний (зон лизиса) фага. В пробирке № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл. Для того чтобы получить в конечном разведении несколько десятков корпускул в 1 мл, содержимое пробирки № 3 разводили в 20 раз, т. е. 0,25 мл исследуемой смеси внести в 4,5 мл бульона. Содержимое опытных пробирок № 1, 1к и №2, 2к разводили аналогично.

Инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок №1 и 1к, № 2 и 2к, №3 и 3к проводили путем прогревания в водяной бане при температуре 60°C в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев. [1,2]

Исследование методом агаровых слоев.

Использовали МПА, содержащий 1,5%-0,7% агара. Допустимо вместо 1,5%

Результаты РНФ с фагом 1

Объект исследования	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
Интактные фекалии	8	-	13	1,6
Контаминированные фекалии в дозе: (м.к. в 1 г) 10^4	8	-	Полный лизис	
10^3	8	-	Сливной рост	
10^2	8	-	62	7,7
10^1	8	-	7	-
Интактное мясо	8	-	8	-
Контаминированное мясо в дозе (м.к. в 1г): 10^4	8	-	Полный лизис	
10^3	8	-	Полный лизис	
10^2	8	-	Полный лизис	
10^1	8	-	102	13,5

Таблица 1 слоем на чашки с 1,5%-ным МПА. Для определения количества корпускул фага в опытной пробе и в контроле титра (пробирки 1 и 3) использовали по две чашки, для пробы на свободный фаг (пробирка 2) – одну чашку. При проведении нескольких анализов ставили один контроль. Через 20-30 минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 16 часов.

Индикация бактерий рода *Citrobacter* в искусственно контаминированном мясе с помощью РНФ.

Две пробы мяса по 5 г измельчали в стерильной фарфоровой ступке и помещали в две стерильные колбы объемом 100 мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter* в количестве от 10^1 до 10^4 м.к.

Дальнейшее исследования материала проводили по той же методике, что и с фекалиями.

Результаты исследований.

По данным В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), известно, что при обнаружении бактерий в РНФ считается отрицательным, если увеличение количества фага в опытной пробе по сравнению с контрольной составляет до 3 раз. Увеличение количества фага от 3 до 5 увеличивается как слабо положительная реакция, от 5 до 10 раз - положительная.

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция

МПА использовать агар на рыбном гидролизате. Мясопептонный агар разливали в чашки по 25-30 мл.

Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки подсушивали в боксе или термостате в течение 3 часов.

Индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter* выращивали на скошенном МПА в течение 16 часов и смывали физиологическим раствором (в количестве 10 мл). [3,7]

МПА с 0,7%-ным содержанием агара заготавливали заранее в пробирках по 2,5 мл, расплавляли, охлаждали до температуры 46-48°C и помещали в водяную баню с такой же температурой. В пробирку добавляли 0,1 смыва эталонной культуры, 1 мл разведенной и прогретой исследуемой смеси, перемешивали и выливали вторым

Таблица 2

не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения. [9,10,11,12]

Результаты реакции отражены в таблице 1, 2 и 3, их учитывали через 18 часов инкубирования посево в термостате при 37°C путем подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках.

Таким образом, доказано, что:

Разработанная нами схема постановки РНФ с фагами бактерий *Citrobacter* является высокоспецифичной и обладает достаточной чувствительностью для обнаружения указанных микроорганизмов при их концентрации от 10 и более м.к. в 1 грамме исследуемого материала. Количество негативных колоний фагов при этом повышается в 7,7 и более раз.

Используя «реакцию нарастания титра фага» с фагами, полученными авторами, можно провести индикацию бактериальных культур *Citrobacter* в объектах внешней среды, патологическом материале и пищевом сырье без выделения чистой

Результаты РНФ с фагом 2

Объект исследования	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
Интактные фекалии	4	-	6	1,5
Контаминированные фекалии в дозе: (м.к. в 1 г) 10 ⁴	4	-	Полный лизис	
10 ³	4	-	61	15,2
10 ²	4	-	9	2,2
10 ¹	4	-	5	2,1
Интактное мясо	7	-	8	1,1
Контаминированное мясо 10 ⁴	7	-	Сливной рост	
10 ³	7	-	15	2
10 ²	7	-	2	-
10 ¹	7	-	1	-

Таблица 3

Результаты РНФ с фагом 3

Объект исследования	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
Интактные фекалии	12	-	14	1,1
Контаминированные фекалии в дозе: (м.к. в 1 г) 10 ⁴	12	-	Полный лизис	
10 ³	12	-	95	7,9
10 ²	12	-	19	1,5
10 ¹	12	-	12	-
Интактное мясо	17	-	18	1,1
Контаминированное мясо в дозе (м.к. в 1 г): 10 ⁴	17	-	Полный лизис	
10 ³	17	-	1300	76
10 ²	17	-	16	-
10 ¹	17	-	12	-

культуры в течение 16-18 часов.[1,2,6,8]

Библиографический список

1. С.Н.Золотухин, Пульчеровская Л.П., Д.А.Васильев, Л.С.Каврук «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. ВНИИВСГиЭ, Москва, 2005 г.
2. Адамс М. Бактериофаги. – Москва, 1961. – с. 15-44.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. // -М.: Медгиз. –1961. –297С.
4. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии.. – Ульяновск, 1988. – с. 45-49.
5. Колпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Фаготипирование листерий // Ветеринария. – 1990. - №6. - С.31-32.
6. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике
7. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. Канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.
8. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. «Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter*». «Вестник ветеринарии». Выпуск V. Сборник научных работ. Оренбург, 2002 г. С. 85-88.
9. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ)/В.Д.Тимаков, Д.М.Гольдфарб. –М., Мир, 1962, с.68-71.
10. Молофеева Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* и их применение в диагностике // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2004.
11. Феоктистова Н.А. // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2004.
12. Ляшенко Е. // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2004.
13. J. Sedlak // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 1973. - Vol. 62. -P.41-59.
14. Z. Filipkowska // Acta Microbiol. Pol. - 2003. - Vol. 52. - P. 57-66.
15. C.S.W. Kueh, P. Kuratsky, M. Brunton //J. Appl. Bacteriol. - 1992. -Vol. 73. - P. 412-420.
16. S. Okada, DM. Gordon // Mol. Ecol. - 2001. - Vol. 10. -P.2499-2513.
17. E.J. Goldstein [et al.] //J. Clin. Microbiol. - 1981. - Vol. 13. -P.954-956.
18. N. Chaichanawongsaroj [et al.] // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. - 2004. - Vol. 35. - P. 681-684.
19. A.E. Toranzo [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1994. — Vol. 60. — P.1789-1797

УДК 619:611

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ НЕЙРОЦИТОВ КРАНИАЛЬНОГО ШЕЙНОГО И ЗВЕЗДЧАТОГО ГАНГЛИЕВ СОБАКИ

Хохлова Светлана Николаевна, кандидат биологических наук, доцент
Симанова Надежда Германовна, кандидат биологических наук, доцент
Степочкин Александр Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, доцент
Фасакхутдинова Алсиня Набиуловна, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1
Тел.:8(8422)55-95-31

Ключевые слова: краниальный шейный и шейно-грудной ганглии, симпатический отдел нервной системы, нейроциты, ядерно-нейроплазменное отношение.