

*Лабораторная практика*

УДК 602.3:579.6

**ПАРАМЕТРЫ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА  
С СИБИРЕЯЗВЕННЫМ БАКТЕРИОФАГОМ**

Н.А. ФЕОКТИСТОВА, Е.И. КЛИМУШКИН, Д.А. ВАСИЛЬЕВ, К.В. БЕЛОВА

*Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства  
в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере  
(программа "УМНИК").*

**Ключевые слова:** *сибиреязвенный бактериофаг, Bacillus anthracis, реакция нарастания титра фага, индикация.*

В статье описаны результаты исследований по подбору оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага с сибиреязвенным бактериофагом (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями). Табл. 2. Библ. 10.

Несмотря на наличие значительного количества описанных в литературе методов индикации возбудителя сибирской язвы, основанных на применении специфических сибиреязвенных бактериофагов, они не находят широкого применения в лабораторной практике. Простейшим методом, предложенным для этой цели, является метод нарастания титра фага (РНФ) [1].

Реакция нарастания титра фага - метод, который позволяет выявлять возбудителя непосредственно в исследуемом материале без выделения чистой культуры. Сущность методики заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует искомым возбудитель, то добавленный к такому материалу гомологичный бактериофаг с коротким циклом внутриклеточного развития, вступив во взаимодействие с ним, размножится и последующее увеличение концентрации (повышение титра) свободного внеклеточного фага укажет на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя [2,3].

В настоящее время выпускается коммерческий диагностический фаг-тест-набор "Оболенск R1", предназначенный для индикации и идентификации *Bacillus anthracis*. Очевидно, что для использования в целях индикации *Bacillus anthracis* в объектах окружающей среды, содержащих в большом количестве близкородственные сапрофиты рода *Bacillus*, бактериофаг должен обладать сочетанием широкого спектра литического действия на штаммы сибиреязвенного микроба с высокой специфичностью. По результатам проведенного сравнительного анализа указанных выше свойств семи сибиреязвенных бактериофагов: FаhВНИИВВиМ, R/D-Ph-6, Гамма А-26, ВА-9, К ВИЭВ, Саратов и 186, этим требо-

---

**ФЕОКТИСТОВА Наталья Александровна** - доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина", кандидат биологических наук, доцент

**КЛИМУШКИН Евгений Иванович** - аспирант ФГБОУ ВО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина"

**ВАСИЛЬЕВ Дмитрий Аркадьевич** - заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина", доктор биологических наук, профессор

**БЕЛОВА Ксения Вячеславна** - аспирант ФГБОУ ВО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина"

Адрес: бульвар Новый Венец, 1, г. Ульяновск, РФ, 432017. Тел. 8(8422) 55-95-47. E-mail: feokna@yandex.ru

ваниям в наибольшей степени отвечает бактериофаг R/D-RH-6. В то же время применение этого бактериофага в тесте РНФ требует более детального изучения количественных параметров динамики концентраций культуры *Bacillus anthracis* и бактериофага, определения показателей специфической активности и специфичности в условиях их проявления в жидкой питательной среде. Важным является изучение возможного влияния присутствия сапрофитных представителей рода *Bacillus* на концентрацию фаговых частиц в фильтрате среды инкубирования [4].

Использование сибирезвездного бактериофага, выделенного и селекционированного авторами, в тесте РНФ требует более детального изучения количественных параметров динамики концентраций культуры *Bacillus anthracis* и бактериофага, определения показателей специфической активности и специфичности в условиях их проявления в жидкой питательной среде.

**Целью наших исследований** была разработка оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага с сибирезвездным бактериофагом.

Задачи исследования:

- определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение (концентрацию микробных клеток, рабочее разведение бактериофага);
- определить оптимальное время экспозиции, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями (при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 15, 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ , после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5, 10, 15 и 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ ).

**Материалы и методы исследований.** Авирулентный штамм *Bacillus anthracis* 34 F<sub>2</sub>, полученный из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина".

Сибирезвездный бактериофаг, выделенный и селекционированный авторами в 2015 году [5,9].

Постановку реакции нарастания титра фага проводили с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО "Ульяновская ГСХА" [6-8,10].

**Результаты исследования и выводы.** Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественных показателей реакции, имеющих диагностическое значение, были проведены исследования с использованием стерильного мясо-пептонного бульона (МПБ), инкубированного совместно с 18-часовой индикаторной культурой *Bacillus anthracis* в концентрации от  $10^3$  до  $10^8$  м.к./мл при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ . В качестве контроля был использован интактный МПБ. Рабочее разведение бактериофага содержало  $10^2 - 10^5$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) в миллилитре МПБ.

**Методика постановки эксперимента:** в опытные колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили индикаторную культуру в концентрации  $10^3 - 10^8$  м.к./мл. Содержимое колб встряхивали в шуттель-аппарате в течение 10 минут.

Чтобы установить оптимальное время, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями, необходимо было провести эксперименты на тест-объекте (МПБ) при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и количество бляшкообразующих единиц в 1 мл) постановки РНФ.

Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала не предусматривалось, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ ;
- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ , после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ ;
- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 15 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ , после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ ;
- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ , после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ .

После проведения подготовки материала для исследований осуществляли работу по следующему алгоритму: готовили для опытной и контрольной проб по 6 широких пробирок (диаметр 20 мм) и номеровали их (1, 2, 3 и соответственно 1к, 2к и 3к, - для каждого разведения культуры). В пробирки № 1, 2 вносили по 9 мл МПБ с культурой, а в пробирки 1к, 2к вносили по 9 мл стерильного МПБ (контроль), в пробирки № 3 и 3к - 9

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

Пробирки № 1 и 1к, в которых находились МПБ (контаминированный бактериями *Bacillus anthracis* и стерильный) и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 (МПБ+бактерии *Bacillus anthracis*) и 2к - без фага были контрольными для выявления в пробах МПБ свободного фага. Пробирки № 3 и 3к - контроль на титр индикаторного фага. Посевы ставили в термостат при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  на то количество часов, которое предусматривает вариант эксперимента.

После культивирования посевов в условиях термостата содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4 - 7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирок №3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний фага. В пробирках № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации  $10^2 - 10^5$  БОЕ/мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков БОЕ/мл, содержимое пробирок № 3 и 3к разводили в 20 раз, то есть 0,25 мл исследуемой смеси вносили в 4,5 мл МПБ.

Содержимое опытных пробирок № 1, 1к и № 2, 2к разводили аналогично. Далее содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев по Грациа [9]. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования в условиях термостата при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ . Для этого подсчитывали количество бляшкообразующих единиц, выросших на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага).

**Результаты исследований** оценивали согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным и апробированной Пульчеровской Л.П. [7], представленной в таблице 1.

**Таблица 1 - Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)**

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3)	Оценка
Увеличение в 2,5 раза	Сомнительная
Увеличение от 3 до 5 раз	Слабо положительная
Увеличение свыше 5 раз	Положительная
Увеличение более 10 раз	Резко положительная

Экспериментальным путем нами было установлено, что количество БОЕ/мл в опыте в более чем пять раз превышало количество БОЕ/мл в контроле при концентрации бактериальной массы *Bacillus anthracis* в МПБ  $10^3$  м.к./мл. Данные показатели, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988), являются диагностическими.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подращивание материала во временной экспозиции (5, 15, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре  $(36,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  в промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить бактерий *Bacillus anthracis* при постановке РНФ в концентрации  $10^3$  м.к./мл.

**Таблица 2 - Результаты РНФ (тест-объект МПБ+*Bacillus anthracis*) с сибирезвненным бактериофагом**

Контаминированный бактериями <i>Bacillus anthracis</i> МПБ в концентрации: (м.к./мл)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
Предварительное подращивание не предусматривалось, время культивирования в условиях термостата 5 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$				
$10^3$	240±13	-	1296±35	5,4
$10^4$	240±13	-	лизис	-
$10^5$	240±13	-	лизис	-
$10^6$	240±13	-	лизис	-
$10^7$	240±13	-	лизис	-

Аналогичную концентрацию бактерий возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подращивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура), равной 5 часам.

Таким образом, временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ, составляет: 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 часов (время культивирования посевов) = 24 часа.

Подращивание исследуемого материала не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется.

**Заключение.** Наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *Bacillus anthracis* в объектах санитарного надзора следующие параметры:

- количественный показатель реакции нарастания титра фага для сибирезвездного бактериофага, выделенного и селекционированного авторами в 2015 году, имеющий диагностическое значение (концентрация микробных клеток индикаторной культуры *Bacillus anthracis* 34F<sub>2</sub>, обнаруживаемая при постановке реакции - 10<sup>3</sup> м.к./мл, рабочее разведение бактериофага - 10<sup>5</sup> БОЕ/мл);

- оптимальное время экспозиции, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага с индикаторной культурой, – это 5 часов культивирования без предварительного подращивания исследуемого материала.

Полученные данные позволяют утверждать, что при заданных параметрах происходит увеличение количества бляшкообразующих единиц в 5 и более раз, что имеет диагностическое значение при индикации бактерий методом постановки реакции нарастания титра фага.

ЛИТЕРАТУРА. 1. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении "старой" болезни. Владимир: Посад, 2001. С. 140-141. 2. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 3 (23). С. 52-56. 3. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 4 (24). С. 36-43. 4. Головинская Т.М. Биотехнологические и микробиологические аспекты совершенствования фагодиагностики сибирской язвы: дис ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2014. С. 91-92. 5. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов III Международного форума. 2015. С. 10-12. 6. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова [и др.] // Экология родного края: проблемы и пути их решения: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Киров, 2014. С. 375-377. 7. Пульчеровская Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике: дис ... канд. биол. наук. Саратов, 2004. С. 88-89. 8. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Ульяновск, 2013. С. 186-197. 9. Биологические свойства сибирезвездного бактериофага / Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник ветеринарии. 2015. № 3 (74). С. 46-49. 10. Юдина М.А., Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Ульяновск, 2013. С. 197-211.

UDC 602.3: 579.6

#### IMPROVEMENT OF ANTHRAX BACTERIOPHAGE TITRE INCREASE TEST

**FEOKTISTOVA, Natalya A.**, Docent, the P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy, Candidate of Biology

**KLIMUSHKIN, Evgeny I.**, Graduate, the P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy

**VASILYEV, Dmitry A.**, Head of Subdepartment, the P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy, Doctor of Biology, Professor

**BELOVA, Kseniya V.**, Graduate, the P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy

Address: 1, Novy Venets Boulevard, Ulyanovsk, Russia, 432017. Ph. +7 (8422) 55-95-47.

E-mail: feokna@yandex.ru

**Keywords:** anthrax bacteriophage, *Bacillus anthracis*, phage titre increase test, indication.

Summary. This article describes new indications on the optimal parameters for the anthrax bacteriophage titre increase test (quantitative index, and optimum time). Tab. 2. Ref. 10.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES. 1. Bakulov I.A., Gavrilov V.A., Seliverstov V.V. Sibirskaya yazva (antraks). Novye stranitsy v izuchenii "staroy" bolezni. Vladimir: Posad, 2001. P. 140-141. 2. Bioindikatsiya bakteriy *Bacillus mycoides* v obyektakh sanitarnogo nadzora / D.A. Vasilyev [et al.] // Vestnik Ulyanovskoy

gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii. 2013. Vol. 3 (23). P. 52-56. 3. Biosensornaya detektsiya bakteriy roda Bacillus v moloke i molochnykh produktakh dlya preduprezhdeniya ikh porchi / D.A. Vasilyev [et al.] // Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii. 2013. Vol. 4 (24). P. 36-43. 4. Golovinskaya T.M. Biotekhnologicheskie i mikrobiologicheskie aspekty sovershenstvovaniya fagodiagnostiki sibirskoy yazvy: Dis ... Cand. of Biol. Stavropol, 2014. P. 91-92. 5. Vydelenie bakteriofagov, spetsifichnykh k Bacillus anthracis / E.I. Klimushkin [et al.] // BioKirov-2015: Collection of Materials of the Third International Forum. 2015. P. 10-12. 6. Bioindikatsiya sodержaniya bakteriy Bacillus megaterium v moloke i molochnykh produktakh / N.A. Petrukova [et al.] // Ekologiya rodnogo kraya: problemy i puti ikh resheniya: Materials of All-Russian Scientific-Practical Conference. Kirov, 2014. P. 375-377. 7. Pulcherovskaya L.P. Vydelenie i izuchenie osnovnykh biologicheskikh svoystv bakteriofagov Citrobacterii ikh primenenie v diagnostike: Dis ... Cand. of Biol. Saratov, 2004. P. 88-89. 8. Feoktistova N.A. Vydelenie i izuchenie osnovnykh biologicheskikh svoystv bakteriofagov bakteriy Bacillus subtilis // Bakteriofagi mikroorganizmov znachimykh dlya zhivotnykh, rasteniy i cheloveka. Ulyanovsk, 2013. P. 186-197. 9. Biologicheskie svoystva sibireyazvennoy bakteriofaga / N.A. Feoktistova [et al.] // Vestnik veterinarii. 2015. Vol. 3 (74). P. 46-49. 10. Yudina M.A., Feoktistova N.A. Vydelenie i izuchenie osnovnykh biologicheskikh svoystv bakteriofagov bakteriy vida Bacillus mesentericus // Bakteriofagi mikroorganizmov znachimykh dlya zhivotnykh, rasteniy i cheloveka. Ulyanovsk, 2013. P. 197-211.

Поступила в редакцию 25 октября 2015 года

УДК 579.672

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СРЕД ДЛЯ НЕСЕЛЕКТИВНОГО ОБОГАЩЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ

Е.О. ЧУГУНОВА, Н.А. ТАТАРНИКОВА, О.Г. МАУЛЬ

**Ключевые слова:** сальмонеллы, неселективное обогащение, забуференная пептонная вода, пропиленгликоль, кислотность.

В статье приведены результаты испытания модифицированной забуференной пептонной воды для неселективного обогащения сальмонелл. Табл. 1. Библ. 12. Рис. 2.

Лабораторные испытания пищевых продуктов животного происхождения с целью определения бактерий рода Salmonella проводят бактериологическим методом, чувствительность которого высока и составляет около  $10^5$  бакт/мл. Однако он трудоемок и требует значительной затраты времени на свое осуществление - от 4 до 7 дней и состоит из четырех этапов: неселективного, селективного обогащения, культивирования на твердых питательных средах и идентификации [1,5,6]. Бактерии рода Salmonella могут присутствовать в патматериале в небольшом количестве вместе с большим числом других бактерий. Поэтому предварительное обогащение просто необходимо, даже если в лаборатории применяют экспресс-методы типа ИФА-экспресс-теста Singlepath® [1,4]. Необходимо отметить, что на этапе неселективного обогащения невозможно определить наличие или отсутствие сальмонелл в исследуемом материале.

В связи с этим весьма актуальна разработка среды для обогащения сальмонелл, позволяющей уже на первом этапе исследований предположить присутствие бактерий рода Salmonella в испытуемых образцах.

**Цель исследования** - модифицировать забуференную пептонную воду (ЗПВ) для неселективного обогащения сальмонелл.

**Задачи:**

- 1 - изучить ферментативные свойства сальмонелл;
- 2 - разработать рецептурный состав модифицированной ЗПВ;
- 3 - апробировать полученную среду на музейных и полевых штаммах сальмонелл.

**ЧУГУНОВА Елена Олеговна** - доцент кафедры ВНБ, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО Пермская ГСХА, кандидат ветеринарных наук

**ТАТАРНИКОВА Наталья Александровна** - заведующая кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ ВО Пермская ГСХА, доктор ветеринарных наук, профессор

**МАУЛЬ Ольга Григорьевна** - аспирант ФГБОУ ВО Пермская ГСХА

Адрес: ул. Петропавловская, 23, г. Пермь, РФ, 614990, ГСП-165. Тел. +7 (342) 240-56-53.

E-mail: fvmz@pgsha.ru