

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ *VACILLUS ANTHRACIS* В ПРОБАХ ПОЧВЫ

Феоктистова Наталья Александровна, 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 ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, почва, реакция, бактериофаги, бактерии, сибирская язва, выявление

В статье представлены результаты исследований по оптимизации методики постановки реакции нарастания титра фага с целью выявления бактерий *Bacillus anthracis* в нестерильных пробах почвы. Обработка исследуемой суспензии почвы трихлорметаном в соотношении 1:10 позволила повысить чувствительность методики фагоиндикации возбудителя сибирской язвы до выявления концентрации, равной $n \times 10^3$ КОЕ/г. Установлено, что оптимальным временем экспозиции, обеспечивающим наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага *Bla1* с индикаторной культурой *Bacillus anthracis* – Шуя-15 являются 4 часа культивирования с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 2 часов при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Введение

Общеизвестно, что для постановки диагноза на сибирскую язву применяют комплекс методов исследования. Согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике антракса до настоящего времени основным методом является бактериологическая диагностика, включающая в себя микроскопическое исследование исходного материала, получение и изучение свойств чистой культуры возбудителя болезни, биологическую пробу на лабораторных животных, иммунно-серологические и аллергологические методы исследования, а также молекулярно-генетические исследования, включающие постановку полимеразно-цепной реакции (ПЦР) [1].

В специальной литературе описано несколько методов по индикации *Bacillus anthracis* в пробах почвы, основанных на применении специфических бактериофагов. Они основаны на свойстве специфического фага адсорбироваться и размножаться в клетках гомологичного вида микроба с по-

следующим учетом этого процесса, исходя из особенностей реакции. Для выявления возбудителя сибирской язвы используют следующие методы фагоиндикации: реакция нарастания титра фага (РНФ), реакция адсорбции фага (РАФ), фаготетразоловый метод (ФТМ). Так, в РАФ специфический процесс необратимой фазы адсорбции фаговых частиц на бактериальных клетках определяется методом агаровых слоев после нейтрализации неадсорбированных фаговых корпускул антифаговыми сыворотками [2-3].

Однако от индикации *Bacillus anthracis* в почве этим методом мы отказались, так как Русалеевым В.С. (1988) была показана возможность адсорбции некоторых сибиреязвенных бактериофагов на клетках близкородственных видов аэробных бацилл. При индикации бациллы антракса ФТМ о взаимодействии в системе фаг клетка судят косвенным путем - по изменению цвета индикатора метилтиазолилтетразолия (довольно субъективный метод) [4].

Несмотря на то, что сибиреязвенные

бактериофаги нашли широкое применение при идентификации возбудителя заболевания, вопрос об использовании фагов для типирования штаммов и фагоиндикации остается открытым. ФТМ и РНФ рекомендованы при диагностике сибирской язвы, они не получили широкого практического применения в диагностических лабораториях [5]. В связи с этим изучение особенностей постановки РНФ и определение возможности применения их при фагоиндикации бациллы антракса в почве - одним из факторов передачи возбудителя инфекции - является актуальной задачей.

Цель работы - определение эффективности РНФ для ускоренного выявления возбудителя сибирской язвы в почве и оптимизация методики постановки этой реакции.

Объекты и методы исследований

Штаммы бактерий *Bacillus anthracis*-СТИ, *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ, *Bacillus anthracis* – Шуя-15, *Bacillus anthracis* 34 F₂, 12 штаммов бактерии *Bacillus mycoides*, 52 штамма бактерий *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* – 6 штаммов, *Bacillus mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *Bacillus coagulans* – 3 штамма, *Bacillus megaterium* – 3 штамма, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА. Для культивирования бактерий использовали мясо-пептонный бульон (МПБ). Плотной и полужидкой питательными средами служил 1,5- и 0,7%-й мясо-пептонный агар (МПА). В качестве раствора для разведений применяли МПБ. Питательные среды, используемые в работе, имели рН 7,2-7,4. Концентрацию споровой и вегетативной культур бактерий, а также титр бактериофага определяли методом агаровых слоев.

Сибиреязвенный бактериофаг Blau был выделен и селекционирован коллективом авторов в 2015 году [6-8].

Постановка реакции нарастания титра фага проводилась с использованием методических приемов, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [9-15].

Результаты исследований

Учитывая, что в отечественной и зарубежной литературе, посвященной изучению специфичности и диагностической значимости метода фагодиагностики *Bacillus anthracis*, отсутствуют данные, указывающие на какое-либо принципиальное отличие по фаго-чувствительности аттенуированных и полевых сибиреязвенных штаммов, мы сочли возможным проведение экспериментов лишь на модели вакцинных и авирулентных штаммов *Bacillus anthracis*.

Проведенные нами ранее исследования по определению основных биологических свойств сибиреязвенного бактериофага Blau позволили установить, что при культивировании на штаммах *Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus anthracis* 34 F₂ он имел литическую активность $n \times 10^8$ БОЕ/мл, которая не значительно изменялась при хранении при температуре 2-4 °С без добавления консерванта в течение 12 месяцев (снижалась до $n \times 10^6$ БОЕ/мл; восстановление до показателя $n \times 10^8$ БОЕ/мл происходило при трехкратном пассировании на индикаторной культуре).

Первоначально исследования проводились нами с использованием в качестве тест-объекта стерильной пробы почвы, искусственно контаминированной *Bacillus anthracis* – Шуя-15. Опытным путем нами было установлено, что предварительное подрачивание материала в течение 5-24 часов с интервалом 3 часа и культивирование посевов в условиях термостата при температуре (36±1) °С в промежутке времени от 5 до 24 часов (интервал также составил 3 часа) позволяет провести индикацию бактерий *Bacillus anthracis* – Шуя-15 в пробах стерильной почвы при постановке РНФ в концентрации $n \times 10^3$ м.к./мл. Аналогичную концентрацию *Bacillus anthracis* – Шуя-15 возможно обнаружить в данной реакции без применения этапа предварительного подрачивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура), равной 5 часам. Установлено, что время на постановку реакции нарастания титра фага составляет приблизительно 24 часа.

Вторым этапом нашей работы была

отработка реакции нарастания титра фага на нестерильных пробах почвы, искусственно контаминированных *Bacillus anthracis*. Результаты исследований показали, что чувствительность РНФ при фагоиндикации возбудителя сибирской язвы в почве составляет $n \times 10^3$ КОЕ/г стерильной почвы против $n \times 10^4$ - 10^7 КОЕ/г для нестерильных образцов, что объясняется конкурентным ростом близкородственных видов аэробных сапрофитных бацилл. Следует отметить, что чувствительность РНФ при исследовании искусственно зараженных проб нестерильной почвы значительно колебалась.

Следующая серия экспериментов была посвящена детальному разбору методики постановки РНФ и выяснению возможных причин ее недостаточной чувствительности. Следует отметить, что при проведении экспериментов освобождение исследуемых проб от контаминации сопутствующими аэробными спорообразующими сапрофитами путем прогревания при различных температурных режимах и низкоскоростным центрифугированием не обеспечивало в должной степени достижения поставленной цели. Кроме того, физиологический раствор, рекомендованный для разведения клеток при определении титра фага в РНФ, является изотоничным лишь по отношению к клеткам млекопитающих, а использование его для разведения бактерий снижает их жизнеспособность на 50 % и более, искажая результаты реакции.

С целью максимально избавиться от микробной контаминации исследуемых образцов нестерильной почвы мы испытывали следующий методический прием. Он состоял в том, что в колбы, подлежащие исследованию, после добавления индикаторного фага и соответствующего периода инкубирования добавляли трихлорметан (хлороформ) из расчета 1 мл/10 мл исследуемой жидкости. Содержимое тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30-40 мин. После оседания хлороформа на дно верхнюю часть жидкости исследовали на наличие фага. Этот прием может быть заменен фильтрованием через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m

GV) в целях экономии времени на проведение исследования. Но данный прием повышает стоимость реакции.

Внесение в методологию постановки реакции нарастания титра фага с целью индикации сибиреязвенного микроба такого дополнительного приема, как обработка суспензии хлороформом, позволило повысить чувствительность реакции при исследовании образцов нестерильной почвы до выявления концентрации равной 10^3 КОЕ/г. При такой модификации РНФ на фоне нежного газона индикаторной культуры наблюдаются четко различимые негативные колонии, количество которых в опытной пробе было в 5-10 раз больше, чем в контрольной.

После отработки методики освобождения исследуемого материала от сопутствующей микрофлоры оптимизировали целиком всю схему постановки РНФ в нестерильных пробах почвы. При оптимизации методики постановки РНФ использовали два варианта условий – подращивание исследуемого материала и последующее подращивание композиции (фаг+культура) при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ и отработанные на стерильных пробах почвы условия - подращивание композиции (фаг+культура) в течение 5 часов при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. В том и другом случае опыты проводили с применением заражающей дозы *Bacillus anthracis* – Шуя-15 10^2 - 10^4 КОЕ/г почвы. Экспериментально установлено, что подращивание в течение 2 часов гарантирует прорастание более 60% спор *Bacillus anthracis*, внесенных в исследуемую пробу.

При последующем заражении молодой вегетативной культуры индикаторным фагом необходимо было точно установить оптимальное время, обеспечивающее наиболее полное взаимодействие фага с клетками, и последующую его репродукцию, т. е. решить вопрос о режиме, необходимом для того, чтобы по нарастанию количества бляшкообразующих единиц выявить в исследуемом субстрате присутствие *Bacillus anthracis*.

Выводы

Таким образом, эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ пока-

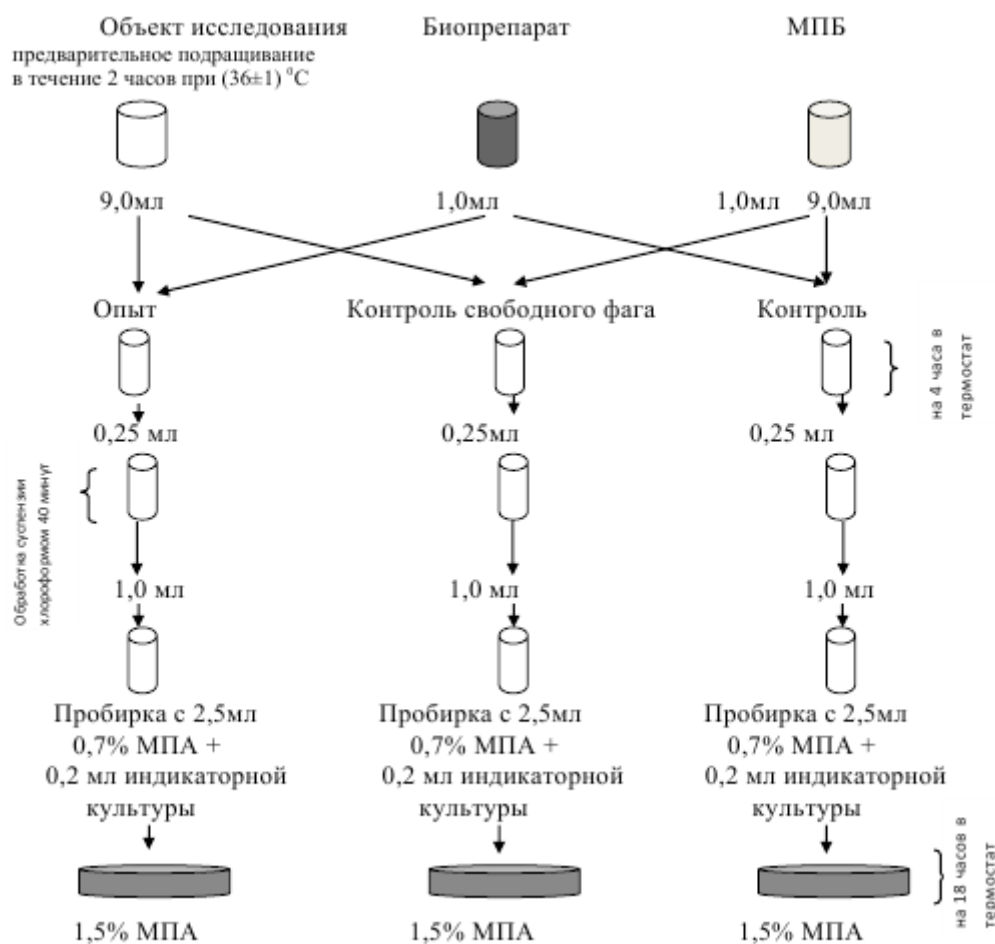


Рис. 1 – Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением фага Bla_u в пробах нестерильной почвы в целях индикации *Bacillus anthracis*

зали, что для обнаружения бациллы антракса в нестерильной почве в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подращивание исследуемого материала в течение 2 ч при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ с последующим заражением фагом и инкубированием смеси в течение 4 ч при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ (рис. 1).

Для определения специфичности РНФ с применением фага Bla_u было проведено исследование образцов почвы, инфицированных *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium* в монокультуре. Результаты получены отрицательные.

На основании полученных в ходе экспериментов данных, считаем, что наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *Bacillus anthracis* в не-

стерильных пробах почвы следующие методологические приемы и параметры:

- колбы с пробами почвы, подлежащие исследованию, после добавления индикаторного фага и соответствующего периода инкубирования добавляли трихлорметан (хлороформ) из расчета 1 мл/10 мл исследуемой жидкости. Содержимое тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30-40 мин. После оседания хлороформа на дно верхнюю часть жидкости исследовали на наличие фага; возможно применение мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV);

- оптимальное время экспозиции, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага с индикаторной культурой, это 4 часа культивирования с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 2 часов при $(36\pm 1)^\circ\text{C}$;

- рабочее разведение бактериофага – 10^2 БОЕ/мл.

При вышеназванных параметрах количественный показатель реакции нарастания титра фага с использованием сибирезвенового бактериофага В1аи, выделенного и селекционированного авторами в 2015 году, составляет 10^3 м.к./мл.

Определено, что сибирезвеновый бактериофаг В1аи способен к циклу внутриклеточного развития в нестерильных пробах почвы в диапазоне рН 3,4-8,2.

Совокупный временной интервал, затрачиваемый на постановку реакции нарастания титра фага, составляет приблизительно 26 часов = 30 мин. (закладка опыта) + (2+4) часа (время культивирования посевов) + 40 минут (обработка трихлорметаном) + 30 мин. (посев методом Грация) + 18 часов (время культивирования посевов).

Мы считаем, что РНФ – это простой в исполнении, но перспективный количественный метод обнаружения инфекционного агента без выделения чистой культуры, который может быть применен в комплексе с другими лабораторными методами исследований для индикации и идентификации патогена.

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

Библиографический список

1. МУК 4.2.2413-08: методические указания. 4.2 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы [Электронный ресурс] – URL:www.vnipchi.rosпотреbnadzor.ru. – Дата обращения 29.09.2016.

2. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир: Изд-во «Посад», 2001. - С. 141-142.

3. Бактериофаги рода *Bacillus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. - Ульяновск: ООО «Колор-

Принт», 2013. - С. 69-70.

4. Русалеев, В.С. Фагоиндикация *Bacillus anthracis* в почве / В.С. Русалеев // Вестник Сибирского отделения ВАСХНИЛ. – Новосибирск, 1988. – С.29-33.

5. Микробиологическая диагностика сибирской язвы / Л.И. Маринин, Г.Г. Онищенко, А.В. Степанов [и др.]. – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. –129с.

6. Биологические свойства сибирезвенового бактериофага / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 3 (74). - С. 46-49.

7. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* [Электронный ресурс] / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Сборник материалов III Международного форума. - БиоКиров, 2015. - 2015. - С. 10-12.

8. Параметры реакции нарастания титра фага с сибирезвеновым бактериофагом / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 4 (75). - С. 47-51.

9. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. - С. 197-211.

10. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Киров, 2014. - С. 375-377.

11. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 186-197.

12. Фагоиндикация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье растительного происхождения / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина

// Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. - Ульяновск, 2016. - С. 240-246.

13. Феоктистова, Наталья Александровна. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: автореф. дис. ... канд. биологических наук / Н.А. Феоктистова. - Саратов, 2006. – 21 с.

14. Кудряшова, К.В. Определение временных параметров постановки реакции нарастания титра фага с фагами ВР-10 и ВБ-13 серии УГСХА / К.В. Кудряшова, Н.А. Феок-

тистова, М.А. Лыдина // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. Ульяновск, 2016. - С. 224-233.

15. Феоктистова, Н.А. Реакция нарастания титра фага для индикации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарно-санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы III Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2012. - Том 1. - С. 327-333.