

УДК 57: 579.2

ПОДБОР КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РНФ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *KLEBSIELLA OXYTOSA*

*Садртдинова Г.Р., ассистент кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ,
Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор кафедры
микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор кафедры
микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, г.Ульяновск, Россия*

Ключевые слова: бактериофаг, реакция, увеличение, метод, материал.

В статье представлены результаты исследований, связанные с выбором оптимального (имеющего диагностическое значение) количественного показателя постановки реакции нарастания титра фага. По результатам проведенных опытов было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышало количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации МПБ бактериями *K. oxytosa* в концентрации 10^3 м.к./мл для фагов *Kox-9* УГСХА и *Kox-11* УГСХА.

Введение. Реакция нарастания титра фага (РНФ) - быстрый специфический метод обнаружения бактерий, обеспечивающий выявление возбудителя в исследуемом материале без выделения его культуры [1].

Работы Е.А. Булькановой с соавт. (2006) приводят данные о положительных результатах идентификации и индикации бактерий рода *Klebsiella* методом РНФ [2].

Цель исследования заключалась в подборе оптимального, имеющего диагностическое значение, количественного показателя постановки реакции нарастания титра фага для обнаружения бактерий вида *K. oxytosa*.

Материалы и методы. В проводимых исследованиях использовали бактериофаги, строго специфичные в отношении бактерий искомого вида. Выделение и селекция бактериофагов проводили согласно методикам Е.А. Ляшенко, С.Н. Золотухина [3,4,5,6]. Проведение эксперимента постановки РНФ основывалось на методике, предложенной В.Я. Ганюшкиным, Д.А. Васильевым, С.Н. Золотухиным, Е.А. Ляшенко.

В качестве исследуемого материала использовали стерильный мясопептонный бульон, контаминированный индикаторными штаммами *K. oxytoca*. Индикаторной культурой для фага Кох-9 УГСХА является штамм *K. oxytoca* 86, для фага Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124.

Результаты исследований и их обсуждение. Под количественным показателем понимают уровень нарастания титра фага по сравнению с контролем. Для того чтобы в наших экспериментах определить количественные показатели РНФ в качестве исследуемого материала использовали мясопептонный бульон, контаминированный 18-часовыми индикаторными культурами *K. oxytoca* в разных заражающих концентрациях. Индикаторной культурой для фага Кох-9 УГСХА является штамм *K. oxytoca* 86, для фага Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124.

В колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили 1 мл индикаторных штаммов *K. oxytoca* в концентрации 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок: пробирка № 1 являлась опытной, где присутствовал фаг в смеси с исследуемым материалом. Пробирка № 2 являлась контролем на присутствие «свободного» фага, содержала только исследуемый материал. Пробирка №3 служила контролем титра индикаторного фага. Для работы использовали бактериофаги в рабочем разведении (10^4 фаговых корпускул в 1 мл). Для определения количественного показателя реакции пробирки выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 5 часов. После этого содержимое пробирок разводили мясопептонным бульоном (из расчета 0,25 мл смеси к 4,5 мл МПБ) для получения сосчитываемого числа негативных колоний, прогревали на водяной бане в течение 30 минут (60 °С), затем исследовали методом агаровых слоев. Чашки с посевами культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний бактериофага, выросших на плотной питательной среде.

Критерии оценки показателей РНФ:

- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем в 2,5 раза - сомнительная оценка РНФ;
- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем от 3 до 5 раз - слабopоложительная оценка РНФ;
- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем свыше 5 раз - положительная оценка РНФ;
- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем более чем в 10 раз - резко положительная оценка РНФ.

**Таблица 1 - Показатели диагностического значения РНФ фага Кох-9
УГСХА**

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка № 1	Чашка № 2	Чашка № 3		
10 ¹	3	–	8	–	–
10 ²	25	–	11	2,3	–
10 ³	106	–	18	5,9	+
10 ⁴	полный лизис	–	31	более 20	+
10 ⁵	полный лизис	–	22	более 20	+

**Таблица 2- Показатели диагностического значения РНФ фага Кох-11
УГСХА**

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка № 1	Чашка № 2	Чашка № 3		
10 ¹	8	–	11	–	–
10 ²	46	–	24	1,92	–
10 ³	174	–	26	6,7	+
10 ⁴	полный лизис	–	30	более 20	+
10 ⁵	полный лизис	–	20	более 20	+

Расчет нарастания титра фага производили путем сравнения числа колоний на чашке № 1 (опытная) и № 3 (контроль титра фага). В случае обнаружения в исследуемом материале «свободного» фага (лизис индикаторной культуры в чашке № 2) реакцию не учитывали. Предварительного подращивания материала не предусматривалось (таблица 1-2).

Заключение. В результате проведенных исследований нами было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями вида *K. oxytoca* в концентрации 10³ м.к./мл для фага.

Библиографический список:

1. Бульканова, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе

- биопрепарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Бульканова Елена Анатольевна. – Саратов, - 2006. - 21 с.
2. Бульканова, Е.А. Фагоидентификация бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Бульканова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК»: Материалы международной научно-практической конференции. - Москва: Московский государственный агроинженерный университет им. В.П. Горячкина, 2007. - С. 222-225.
 3. Васильев, Д.А. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Г.Р. Садртдинова // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 4 (32). - С. 68-72.
 4. Садртдинова, Г.Р. Выделение бактериофагов бактерий *Klebsiella oxytoca* под действием рентгеновского облучения / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2015.- № 1 (33). - С. 76-81.
 5. Садртдинова, Г.Р. Sanitary assessment of environmental objects by isolation of virulent phages / Г.Р. Садртдинова, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. - 2016. - Т. 58, № 10. - С. 165-170.
 6. Садртдинова, Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella oxytoca* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА, 2016. - Т. III. – С. 266-269.

CHOICE OF QUANTITATIVE PARAMETERS OF THE FORMATION OF THE REACTION OF THE GROWTH OF THE PHAGE TITER FOR THE INDICATION OF BACTERIA *KLEBSIELLA OXYTOCA*

Sadrtidinova G.R., Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A.

Key words: bacteriophage, reaction, increase, method, material.

The article presents the results of studies related to the selection of the optimal (having a diagnostic value) quantitative indicator of the reaction of phage titer growth. Based on the results of the experiments, it was found that the number of phage particles was more than 5 times greater than the amount of phage particles in the control samples when the bacterial contamination of the nutrient medium was contaminated with K. oxytoca bacteria at a concentration of 10³ m.k.s./ml for Kox-9 phages UGSHA and Kox-11 USGSA.