

**КОНТРОЛЬ ИНДИКАТОРНЫХ ФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ
БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И ОБЪЕКТАХ
ВЕТЕРИНАРНОГО НАДЗОРА В РФ**

Самойлов Д.А, магистрант

тел.: 8(8422) 55-95-47, jandaneziz@gmail.com

Ляшенко Е.А., кандидат биологических наук, доцент

тел. 8(8422) 55-95-47, elena-118@mail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактериофаги, *Klebsiella pneumoniae*, штаммы, биологические свойства фагов, РФ (реакция нарастания титра фага)

Установлено, что индикаторные фаги К-81 УлГАУ и К-10 УлГАУ имели следующую характеристику: титр по Грациа – от $1,5 \times 10^9$ до $2,8 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл, размер негативных колоний фага К-81 УлГАУ – 1 мм прозрачные; К-10 УлГАУ – 1-1,5 мм при инкубации 16 часов. Исходные штаммы фагов лизировали индикаторные штаммы бактерий *Klebsiella pneumoniae* №5006, *Klebsiella pneumoniae* №1 являются строго специфичными в отношении бактерий рода *Klebsiella*, с диапазоном литического действия К-81 УлГАУ – 52,4 %, К-10 УлГАУ – 47,6.

Согласно этим показателям данные фаги могут использоваться для индикации бактерий рода *Klebsiella* в пищевом сырье и объектах ветеринарного надзора в РФ.

Введение. В настоящее время особое внимание уделяют диагностике малоизученных инфекционных заболеваний, характеризующихся тяжелым течением, а нередко и летальным исходом. К их числу относятся клебсиеллезные инфекции. Представители рода *Klebsiella* широко распространены в природе, а подвид *pneumoniae* является нормальной микрофлорой респираторного тракта животных и человека. Однако среди этих микроорганизмов имеются патогенные варианты, способные вызывать у животных и людей самостоятельные заболевания. Клебсиеллы известны как

возбудители пневмонии, заболеваний мочеполовой системы, острых кишечных инфекции, различных гнойно-септических осложнений, а также внутрибольничных инфекций, менингитов. Заболевания, вызываемые клебсиеллами, протекающие по типу острого сепсиса, предложено рассматривать как самостоятельную нозологическую единицу – клебсиеллез. Известно так же, что *K. pneumoniae* играет этиологическую роль при маститах, пневмониях, септицемиях коров, свиней, лошадей, обезьян, инфекционной диареи молодняка животных.

Ряд исследователей приводят убедительные данные о положительных результатах индикации с помощью бактериофагов. Метод фагодиагностики является специфичным, не требующий больших затрат времени, материалов и доступен лабораториям всех уровней [1, 2].

Выделением и изучением бактериофагов рода *Klebsiella* занимались исследователи разных научных школ. Однако в арсенале ветеринарных лабораторий отсутствуют клебсиеллезные бактериофаги. Поэтому получение специфических бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Klebsiella*, выделенных из объектов ветеринарного надзора, с целью индикации, является актуальным.

Объекты и методы исследований.

В работе были использованы 21 штамм бактерий рода *Klebsiella*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина: *Klebsiella pneumoniae* №5001, *Klebsiella pneumoniae* №5006, *Klebsiella pneumoniae* №5007, *Klebsiella oxytoca* №5013, *Klebsiella pneumoniae* №76, *Klebsiella pneumoniae* №20, *Klebsiella pneumoniae* № 81, *Klebsiella pneumoniae* №85₂, *Klebsiella pneumoniae* №53 полевые штаммы *Klebsiella pneumoniae* №1, *Klebsiella pneumoniae* №2, *Klebsiella pneumoniae* № 24 *Klebsiella pneumoniae* № 20 *Klebsiella pneumoniae* № 03 *Klebsiella pneumoniae* № 04 *Klebsiella pneumoniae* № 513 *Klebsiella pneumoniae* № 408 *Klebsiella*

pneumoniae № 415 *Klebsiella pneumoniae* № 40 *Klebsiella pneumoniae* № 43
Klebsiella pneumoniae № 01.

Музейные штаммы фагов – К-81 УлГАУ, К-10 УлГАУ.

В качестве гетерологичных бактерий использовали 15 штаммов: *Escherichia spp.* 2 штамма, *Proteus spp.* 2 штамма, *Enterobacter spp.* 2 штамма, *Citrobacter spp.* 2 штамма, *Aeromonas hydrophila* 1 штамм, *Salmonella spp.* 2 штамма, *Providencia spp.* 1 штамм бактерий вида *Yersinia enterocolitica*, 2 штамма *Staphylococcus spp.*, 1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*.

Питательной средой для контроля индикаторных бактериофагов служил мясо-пептонный или питательный бульон для культивирования микроорганизмов.

Результаты исследований и их обсуждение.

Для обнаружения бактерий рода *Klebsiella* в РНФ использовали музейные штаммы фагов К-81 УлГАУ, К-10 УлГАУ и индикаторные культуры *Klebsiella pneumoniae* №5006, *Klebsiella pneumoniae* №1.

Из флакона, находящегося на хранении не более 12 месяцев отбирали пробу каждого фага 5 мл для определения чистоты физических свойств, титра фагов по отношению к индикаторным культурам, диапазона литической активности и специфичности.

Определение внешнего вида. Внешний вид фагов определяли путем просмотра флаконов с препаратом в проходящем свете и визуально. Индикаторные фаги не содержали посторонних примесей, лизат был прозрачным светло-желтого или желтого цвета.

Определение возможной контаминации. Для проверки на возможную контаминацию высевали фаг в объеме 0,1 – 0,2 мл в пробирки с мясо-пептонным печеночным бульоном (МППБ) Китта-Тароцци, МПА, питательный бульон, со средой Сабуро и 1 – 2 мл во флаконы с 80 – 100 мл питательного бульона и МППБ. Высевы проводили в 2 пробирки и 2 флакона с каждой средой из каждого образца. Посевы культивировали при температуре 37 – 38 °С. Через двое суток из жидких сред делали пересевы на

МПА, питательный бульон и МППБ, заседали по 2 пробирки и 2 флакона с питательным бульоном и МППБ. Первичные посева выдерживали в термостате в течение 10 суток, а вторичные – 8 суток. На питательных средах с посевами не обнаружили роста бактериальной микрофлоры и грибов.

Определение литической активности фагов при хранении в условиях 2 – 4 °С. Литическую активность изучали определением титра фагов К-81 УлГАУ и К-10 УлГАУ по истечении 3, 6, 12 месяцев (таблица 1) методом А. Грациа, на индикаторных культурах *Klebsiella pneumoniae* №5006, *Klebsiella pneumoniae* №1.

Таблица 1 Определение литической активности фагов при хранении

№ пп	Фаг	Индикаторная культура	БОЕ/мл		
			3 мес.	6 мес.	12 мес.
1	К-81 УлГАУ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №1	$1,5 \times 10^9$	1×10^9	$8,7 \times 10^8$
2	К-10 УлГАУ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №5006	$2,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$

Опытным путем, изучая литическую активность индикаторных фагов через 3, 6 месяцев, установили, что фаги содержали $1-2,8 \times 10^9$ активных корпускул в 1 мл, а через 12 месяцев активность фага К-81 УлГАУ понизилась до $8,7 \times 10^8$, фаг К-10 УлГАУ содержал $1,2 \times 10^9$ БОЕ в 1 мл. Таким образом, индикаторные фаги сохраняли активность спустя 12 месяцев не ниже 10^8 (К-81 УлГАУ) – 10^9 (К-10 УлГАУ) БОЕ в 1 мл, что допустимо и соответствует установленным параметрам.

Проверка диапазона литической активности фагов. Для изучения спектра литической активности использовали штаммы *Klebsiella*. Проверку проводили на плотной агаровой среде путем нанесения бактериофага на газон культуры [3-5]. Фаг К-81 УлГАУ лизировал 52,4 % штаммов бактерий рода *Klebsiella*, К-10 УлГАУ – 47,6 %, а в сумме фаги проявили литическое действие в отношении 66,6 % всех исследованных культур.

Проверка специфичности фагов. Специфичность индикаторных фагов проверяли на культурах других родов: *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella spp.*, *Providencia spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Проверку проводили на плотном питательном агаре, путем нанесения капли бактериофага на газон культуры. Штаммы гетерологичных родов и семейств не лизировались фагами (на чашках отмечали сплошной газон культуры).

Индикаторные бактериофаги К-81 и К-10 представляют собой прозрачную жидкость желтоватого цвета (цвет засеянной среды), без посторонних примесей, осадка и имеют титр не ниже 10^9 . Срок годности бактериофагов при температуре 2 – 4 °С 12 месяцев.

Выводы. Установлено, что индикаторные фаги К-81 УлГАУ и К-10 УлГАУ имели следующую характеристику: титр по Грациа – от $1,5 \times 10^9$ до $2,8 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл, размер негативных колоний фага К-81 УлГАУ – 1 мм прозрачные; К-10 УлГАУ – 1-1,5 мм при инкубации 16 часов. Исходные штаммы фагов лизировали индикаторные штаммы бактерий *Klebsiella pneumoniae* №5006, *Klebsiella pneumoniae* №1 являются строго специфичными в отношении бактерий рода *Klebsiella*, с диапазоном литического действия К-81 УлГАУ – 52,4 %, К-10 УлГАУ – 47,6 %.

Согласно этим показателям данные фаги могут использоваться для индикации бактерий рода *Klebsiella* в пищевом сырье и объектах ветеринарного надзора в РФ.

Список использованных источников литературы

1. Алешкин А. В. Бактериофаги как пробиотики и дезактивирующие агенты для пищевых продуктов // Азиатско-Тихоокеанский журнал биологических наук. – 2013. – Т. 7. – №. 1. – С. 91.

2. Вакарина А. А., Катаева Л. В., Карпухина Н.Ф. Рациональные аспекты использования бактериофагов //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – №. 5. – С. 76-79.
3. Ляшенко Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии рода *Klebsiella*. В книге: Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В.и др. Ульяновск, 2013. С. 61-74.
4. Ляшенко Е.А Сравнительный анализ биологических свойств бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumonia* Ляшенко Е.А., Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А. Инфекция и иммунитет. 2014. № 5. С. 94-95.
5. Сульдина, Е.В. Характеристика бактериофагов бактерий *Enterobacter spp.* для оценки возможностей их использования в составе терапевтического биопрепарата / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.В. Мاستиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 1 (41). - С. 109-116.

**CONTROL OF INDICATOR PHAGES FOR INDICATION OF BACTERIA
OF THE GENUS KLEBSIELLA IN FOOD RAW MATERIALS AND
OBJECTS OF VETERINARY SURVEILLANCE IN RSF**

Samoilov D. A., Lyashenko E.A.

Key words: bacteriophages, Klebsiella pneumoniae, strains, biological properties of phages, RNF (phage titer increase reaction)

It was found that the indicator phages K-81 UIGAU and K-10 UIGAU had the following characteristics: Grace titer - from 1.5×10^9 to 2.8×10^9 phage corpuscles in 1 ml, the size of the negative colonies of phage K-81 UIGAU - 1 mm transparent; K-10 UIGAU - 1-1.5 mm when incubated for 16 hours. The original

phage strains lysed indicator strains of bacteria *Klebsiella pneumoniae* No. 5006, *Klebsiella pneumoniae* No. 1 are strictly specific for bacteria of the genus *Klebsiella*, with a lytic range of K-81 UIGAU - 52.4%, K-10 UIGAU - 47.6.

According to these indicators, these phages can be used to indicate bacteria of the genus *Klebsiella* in food raw materials and objects of veterinary surveillance in the RSF.

