

УДК 579.63:579.678

## ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *LISTERIA MONOCYTOGENES* С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА

**Ковалева Е.Н.**, кандидат биологических наук  
**Васильев Д.А.**, доктор биологических наук  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия  
E-mail: [elkov@pochta.ru](mailto:elkov@pochta.ru)

### АННОТАЦИЯ

В статье рассматриваются вопросы теоретического и экспериментального обоснования метода индикации бактерий вида *Listeria monocytogenes* с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ). Реакция определяет меньшие затраты времени (как на постановку, так и на интерпретацию результатов), высокую чувствительность и простоту исполнения по сравнению с бактериологическим методом детекции.

### КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Детекция бактерий, *Listeria monocytogenes*, бактериофаги, реакция нарастания титра фага.

Впервые теоретическое и экспериментальное обоснование методу индикации бактерий с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ) дали В.Д. Тимаков и Д.М. Гольдфарб в 1955 году [1].

Полученные рядом авторов [2, 3] результаты по выделению и изучению биологии листериозных бактериофагов L2A и L4A (ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия) позволили перейти к разработке и валидации условий постановки РНФ для обнаружения бактерий вида *L.monocytogenes* в различных субстратах.

В первую очередь для постановки РНФ Т.И. Кольпиковой [3] были испытаны различные питательные среды. На основании этих экспериментов было показано, что среда, содержащая 0,5 % глюкозы обеспечивает лучшую репродукцию фаговых корпускул и позволяет учитывать результаты РНФ на 6 часов раньше, чем на средах без содержания глюкозы. Указанные выводы о зависимости эффективности в проведении РНФ от используемой питательной среды совпадают с данными Н.А. Капыриной [2]. Она считает, что инкубирование листерий зараженных фагом, в обогащенной среде, к числу которых относится и бульон Мартена с глюкозой, способствует не только интенсификации внутриклеточного цикла развития вирусных частиц, но и повышает количественное содержание вновь образовавшихся потомков фага в клетке.

Использование при постановке РНФ таких, общедоступных для любой бактериологической лаборатории, питательных сред как: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА) (1,5 %, 0,7 %) с 0,5 % глюкозой значительно упрощает и облегчает применение РНФ в сравнении с методами бактериологического исследования.

В последующих опытах Т.И. Кольпикова [3] определяла количественный показатель листериозного фага, имеющий индикаторное значение. Из литературных источников [4, 5, 6, 7] известно, что при обнаружении бактерий РНФ считают отрицательной, если увеличение количества фага в опытной пробе по сравнению с контрольной составляет до 3 раз. Увеличение количества фага от 3 до 5 раз учитывается как слабо положительная реакция; от 5 до 10 раз – положительная, свыше 10 – резко положительная.

Для определения количества фага, имеющего индикаторное значение при детекции бактерий вида *L.monocytogenes*, было проведено более 200 исследований

различных субстратов (МПБ, вода, почва) контрольных и инфицируемых культурой листерий обеих серогрупп в концентрации от  $10^1$  до  $10^8$  м.к. в мл.

В результате проведенных авторами исследований установлено, что РНФ положительна в случае, если количество «стерильных пятен» на чашках Петри, засеянных из опытных проб, было в 5 раз больше по сравнению с контролями титра фагов. Выбранный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании, при которых возможно выявление невысокой степени увеличения количества фага. Достоверность РНФ определяли путём выделения бактерий вида *L.monocytogenes* бактериологическим методом и специфичностью РНФ с контрольными пробами.

Выбрав питательную среду для постановка РНФ и определив количество фага, имеющее индикаторное значение, Кольпиковой Т.И. [3] были начаты исследования по разработке режима РНФ. Для реализации этой цели были поставлены эксперименты с использованием двух основных модификаций, заключающихся в предварительном проращивании или увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом.

При отработке вопросов предварительного подращивания исследуемого материала использовали 7 режимов, различающихся по времени данного процесса (1, 2, 3, 4, 16 часов) и условиям аэрации (шуттелирование). После предварительного подращивания к исследуемому субстрату добавляли определённое количество фага и смесь выдерживали при температуре  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 8 часов. В результате этих исследований было показано, что при подращивании изучаемого материала в течение 16 часов при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  РНФ оказалась менее чувствительной, так как позволяла обнаруживать  $10^5$  м.к. в мл. Вероятно, при столь длительной экспозиции (16 часов) культивирования при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  сильно развивается посторонняя микрофлора, которая оказывает антагонистическое действие на листерии.

При подращивании исследуемого материала в течение 2-х часов при шуттелировании или 3 – 4 часа без шуттелирования при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , листерии обнаруживались в исследуемом материале в количестве  $10^3$  м.к./мл. Таким образом, эти режимы подращивания были выбраны авторами как оптимальные. Для выяснения оптимального времени контакта исследуемого материала с фагом было испытано 5 параметров. В результате этих исследований установлено, что при культивировании исследуемого субстрата с фагом в течение 6 часов при температуре  $28^{\circ}\text{C}$  заметное нарастание количества листериозного фага наблюдается при концентрации гомологичных бактерий не менее  $10^5$  в мл. Удлинение сроков инкубации (16 – 24 часа) дало возможность получить увеличение количества фага уже при концентрации листерий  $10^2$  до  $10^3$  м.к. в мл.

Исходя из вышеизложенного можно предположить, что значение инкубации смесей в течение 16 – 24 часов при температуре  $22^{\circ}\text{C}$  или  $28^{\circ}\text{C}$  сводится к тому, что за это время бактерии, находящиеся в исследуемом субстрате в очень малых количествах, размножаются. В результате этого между добавленным индикаторным фагом и бактериями устанавливаются такие количественные соотношения, при которых вероятность встречи между ними повышается, и бактерии инфицируются фагом. Отсюда вытекает, что исход реакции зависит не только от свойств индикаторного фага, но и от биологических особенностей бактериального агента, обнаруживаемого с помощью РНФ.

В.А. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом [1] было показано, что чувствительность реакции является функцией времени и концентрации бактерий. Из этого следует, что чувствительность РНФ является функцией времени и концентрации бактерий. Удлинение срока контакта исследуемого субстрата с фагом способствует выявлению бактерий при незначительном содержании их в объекте исследования. Таким образом, из числа испытанных режимов наиболее быстрым, но менее чувствительным, является подращивание исследуемого материала в течение 3 часов при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  с последующим контактом исследуемого материала с фагом при температуре  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 8 часов. Учёт результатов проводят в этом случае через 24 часа. Бактерии удаётся обнаружить в количестве  $10^3$  м.к./мл /г/.

Наиболее чувствительным, но более длительным, методом является выдерживание исследуемого материала с фагом (без предварительного подрачивания) в течение 24 часов при комнатной температуре или температуре 28°C. При данном режиме выявляются листерии в концентрации  $10^2$  м.к./мл/г, на проведение РНФ затрачивается не более 48 часов. Этот метод наиболее удобен в практических условиях лаборатории.

Проведённые исследования в процессе изучения возможности использования РНФ для обнаружения листерий в органах и объектах внешней среды показывают следующее:

Во-первых – РНФ как метод детекции бактерий чувствительнее бактериологического исследования при обнаружении бактерий вида *L.monocytogenes* в различных субстратах. Это выражается в большей частоте положительных результатов РНФ по сравнению с бактериологическим методом исследования. Положительные результаты появляются при наличии такого количества листерий, которое бактериологическими исследованиями не выявляется.

Во-вторых – РНФ является ускоренным методом. Она позволяет за относительно короткий срок (24 – 48 часов) осуществлять детекцию бактерий вида *L.monocytogenes* в присутствии посторонней микрофлоры.

В-третьих, при помощи РНФ можно определить серогрупповую принадлежность листерий, без выделения культуры в чистом виде.

Указанная методика постановки РНФ даёт положительные результаты с использованием листериозных монофагов L2A и L4A (ВНИИВВиМ, г. Покров, Россия).

Раздельное применение монофагов вызывает ряд затруднений технического характера связанных, в частности, с объемом исследований и необходимостью расхода большого количества лабораторной посуды реактивов и питательных сред. В связи с этим, с целью сокращения объёма исследований и одновременного выявления листерий 1 и 2 серогрупп рекомендуем использовать технику постановки РНФ смешанными листериозными фагами. Исходя из того, что листериозные монофаги L 2A и L 4A строго специфичны, они не интерферировали. При использовании смеси фагов в РНФ для обнаружения листерий были проведены исследования МПБ, инфицированного отдельно культурами листерий 1 и 2 серогруппы, *E.coli*, *Streptococcus albus* и *Staphylococcus aureus*, а так же почвы песчаной и воды водопроводной, инфицированных культурой листерий 1-й серогруппы (штамм 9-127) в концентрации  $8 \times 10^2 - 8 \times 10^7$  м.к./мл /г/ и культурой листерий и 2-й серогруппы (штамм – 9-72) в концентрации  $10^2 - 10^8$  м.к. на мл/г. Параллельно для исследования этих проб использовали РНФ с монофагами.

Проведенные Кольпиковой Т.И [3] исследования позволили установить, что листериозные бактерии могут быть выявлены при постановке РНФ как с монофагами, так и со смесью фагов. Кроме того, использование смеси фагов позволяло определять листерий как 1, так и 2 серогрупп. Тогда как с помощью монофагов выявляли листерии по серогруппам.

При использовании монофагов и их смеси в РНФ при исследовании с гетерологическими бактериальными культурами ни в одном случае не было увеличения количества фага, что указывает на высокую специфичность данных биологических агентов и методики их использования.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – 32 с.
2. Капырина, Н.А. Изучение листериозного бактериофага и использование его для идентификации возбудителя болезни / Н.А. Капырина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 1973. – 22 с.

3. Кольпикова, Т.И. Использование реакции нарастания титра фага для обнаружения листериоза / Т.А. Кольпикова // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Покров, 1981. – 19 с.
4. Васильев, Д.А. Листерийные бактериофаги. Научное издание / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2013 – 66 с.
5. Каттер Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
6. Ковалева, Е.Н. Разработка параметров ускоренной индикации бактерий вида *E.faecalis* с помощью РНФ / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // В сборнике: Молодежь и наука XXI века Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. – 2010. – С. 85-87.
7. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.