

## МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ АЭРОМОНАДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Н. Феоктистова\* , А. Ломакин , А. Минаева, И. Раксина, П. Майоров

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,  
г. Ульяновск, Российская Федерация  
\*feokna@yandex.ru

**Аннотация.** В статье представлены результаты исследований по модификации методики реакции нарастания титра фага для аэромонадных бактериофагов. Применяя бактериофаги Av-4 серии УЛГАУ и Ah-4 серии УЛГАУ, которые характеризуются высокими титрами литической активности и широким спектром специфического литического действия, были отработаны оптимальные параметры постановки реакции нарастания титра фага (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями). Эмпирически установлено, что наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *A. veronii* *bv. veronii* и *A. hydrophila* в объектах санитарного надзора являются следующие параметры: концентрация индикаторной культуры, обнаруживаемая при постановке реакции –  $10^3 - 10^4$  м.к./мл/г, рабочее разведение бактериофага –  $10^5$  БОЕ/мл. Эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ показали, что для обнаружения бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii* *bv. veronii* в нестерильных пробах воды и рыбы в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подращивание исследуемого материала в течение 2 ч при  $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$  с последующим заражением фагами Av-4 серии УЛГАУ и Ah-4 серии УЛГАУ и инкубированием смеси в течение 4 ч при  $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 123031600041-9.

**Ключевые слова:** бактериофаги; *Aeromonas veronii* *bv. veronii*; *Aeromonas hydrophila*; реакция нарастания титра фага; модификация; методика

### Введение

Анализ литературных данных свидетельствует, что фаги можно использовать для биоконтроля инфекций, вызываемой *A. hydrophila* у вьюна (*M. anguillicaudatus*), нильской тилапии (*O. niloticus*), полосатого сома (*P. hypthalmus*) и радужной форели (*O. mykiss*) [1-2].

Первое применение фагов для борьбы с *A. hydrophila* произошло в 1981 г. Более трех десятилетий спустя было показано, что однократное введение простых суспензий фагов рAh1-С или рAh6-С увеличивает выживаемость против инфекции *A. hydrophila*. Однако фаг рAh6-С контролировал инфекцию *A. hydrophila* более эффективно, чем фаг рAh1-С [3].

Для выявления возбудителя сибирской язвы используют следующие методы фагоиндикации: реакция нарастания титра фага (РНФ), реакция адсорбции фага (РАФ), фаготетразоловый метод (ФТМ) и люминесцентно-серологический метод (ЛЮМ) [4].

Применение биопрепаратов на основе специфических бактериофагов в реакции нарастания титра фага (РНФ) дает возможность за 24 часа получить результат без выделения «чистой культуры» бактерий и сразу подобрать эффективный препарат для ингибирования роста изучаемого инфекционного агента. Сущность РНФ заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует искомым возбудитель, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступив во взаимодействие с ним, размножится, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага укажет на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя [5].

Цель исследования - модификация методики реакции нарастания титра фага для аэромонадных бактериофагов.

### Материалы и методы

В экспериментах были использованы штаммы из международной коллекции *Aeromonas veronii* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33568, *Alcaligenes* spp B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 и полевые штаммы *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. bestiarium*, хранящиеся в музее кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Для выделения специфических бактериофагов *Aeromonas* было происследовано 120 проб (91 водный источник (в водоемах производили отбор проб воды) и 29 проб рыбы карпа из 29 прудов).

В исследованиях использованы авторские бактериофаги Av-4 и Ah-4 серии УлГАУ, которые характеризуются высокими титрами литической активности и широким спектром специфического литического действия. Бактериофаги изготавливаются на коммерческом мясопептонном бульоне, Av-4 культивированием с индикаторной культурой *A. veronii* bv. *veronii* P3, Ah-4 – на штамме *A. hydrophila* 12. Оптимальное время пассажа 5 часов, оптимальное соотношение составляет 1:1 (0,2 мл/0,2 мл), температурный оптимум  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ . Индикаторные культуры хранятся при температуре  $2-4^\circ\text{C}$  на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) в пробирке с содержанием 0,3% бактериологического агара, каждые 4 месяца должен осуществляться ее пересев. Производственные штаммы бактерий обладают характерными для вида морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами [6].

Постановку реакции нарастания титра фага (РНФ) проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом, отработанными и модифицированными сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [7-8].

Для постановки РНФ использовали пробы воды из открытых водоемов и рыбы (карп).

### Результаты

Экспериментально нами было установлено, что количество БОЕ/мл в опыте с бактериофагами Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ в более чем 5 раз превышало количество БОЕ/мл в контроле при концентрации бактериальной массы *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 в МПБ  $10^3$  м.к./мл. Данные показатели являются индикаторными, согласно принятых критериев оценки реакции.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подрачивание материала во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре  $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$  в промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить бактерии *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 при постановке реакции нарастания титра фага (РНФ) в концентрации  $10^3$  м.к./мл. Аналогичную концентрацию бактерий *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подрачивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура) равной 5 часам.

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

Первоначально исследования проводились с использованием в качестве тест-объекта стерильных проб воды и рыбы, искусственно контаминированных бактериями *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подрачивание материала в течение 5 часов и культивирование посевов в условиях термостата при температуре  $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18 часов позволяет провести индикацию бактерий *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 в пробах стерильной проб воды и рыбы при постановке РНФ в концентрации  $n \times 10^3$  м.к./мл.

Результаты исследований отражены в таблицах 1-4.

Таблица 1 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 стерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	21±3	-	144±5	6,8
10 <sup>4</sup>	21±3	-	229±7	10,9
10 <sup>5</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 2 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 стерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	19±1	-	129±3	6,8
10 <sup>4</sup>	19±1	-	231±5	12,2
10 <sup>5</sup>	19±1	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	19±1	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	19±1	-	лизис	-

Таблица 3 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 стерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	21±3	-	119±3	5,6
10 <sup>4</sup>	21±3	-	202±5	9,6
10 <sup>5</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 4 – Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в
--	---	--------------------------------------	---------------	---

<i>A. hydrophila</i> 12 стерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Количество бляшкообразующих единиц			опыте по сравнению с контролем
10 <sup>3</sup>	19±1	-	117±2	6,1
10 <sup>4</sup>	19±1	-	207±6	10,8
10 <sup>5</sup>	19±1	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	19±1	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	19±1	-	лизис	-

Вторым этапом нашей работы была отработка реакции нарастания титра фага на нестерильных пробах воды и рыбы, искусственно контаминированных бактериями *A. hydrophila* 12 и *A. veronii bv.veronii* P3. Полученные данные были сгруппированы в таблицу 5-8.

Таблица 5 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	21±3	-	38±5	1,8
10 <sup>4</sup>	21±3	-	70±7	3,3
10 <sup>5</sup>	21±3	-	99±9	4,7
10 <sup>6</sup>	21±3	-	124±7	5,9
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 6 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	23±1	-	39±5	1,7
10 <sup>4</sup>	23±1	-	74±7	3,2
10 <sup>5</sup>	23±1	-	101±9	4,4
10 <sup>6</sup>	23±1	-	144±7	6,3
10 <sup>7</sup>	23±1	-	лизис	-

Таблица 7 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УЛГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i>	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв
--	---	--------------------------------------	------------	--

<i>bv.veronii</i> P3 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Количество бляшкообразующих единиц			опыте по сравнению с контролем
10 <sup>3</sup>	21±3	-	31±2	1,5
10 <sup>4</sup>	21±3	-	67±3	3,2
10 <sup>5</sup>	21±3	-	91±5	4,3
10 <sup>6</sup>	21±3	-	117±5	5,6
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 8 – Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕв опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	23±1	-	40±4	1,7
10 <sup>4</sup>	23±1	-	64±5	2,8
10 <sup>5</sup>	23±1	-	105±6	4,6
10 <sup>6</sup>	23±1	-	142±5	6,2
10 <sup>7</sup>	23±1	-	лизис	-

Результаты этих экспериментов показали, что чувствительность РНФ при фагоиндикации возбудителей аэромоназа карпа в стерильных пробах воды и рыбы составляет  $n \times 10^3$  КОЕ/г против  $n \times 10^4$ - $10^7$  КОЕ/г для нестерильных образцов воды и рыбы. Следует отметить, что чувствительность РНФ при исследовании искусственно зараженных проб нестерильной воды и рыбы значительно колебалась в вышеназванном диапазоне, что объясняется конкурентным ростом близкородственных видов сапрофитных микроорганизмов, которые были естественной нормофлорой образцов исследований.

Следующая серия экспериментов была посвящена детальному разбору методики постановки РНФ и выяснению возможных причин ее недостаточной чувствительности. При проведении экспериментов освобождение исследуемых проб от контаминации сопутствующими сапрофитами методами прогревания при различных температурных режимах (60-76 °С с интервалом в 2 часа) и низкоскоростным центрифугированием (1000-2000 об/мин в течение 20-35 минут с интервалом в 5 минут) не обеспечивало в должной степени достижения поставленной цели. С целью максимально избавиться от микробной контаминации исследуемых образцов нестерильной воды и рыбы испытывали следующий методический прием: 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 трихлорметана на дно пробирки надосадочную часть исследовали на наличие фага. Экспериментально установлено, что этот прием может быть заменен фильтрованием через мембранные фильтры фирмы Millipore (filtertype: 0,22 µm GV) в целях экономии времени на проведение исследования.

Результаты исследований представлены в таблицах 9-12.

Таблица 9 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Av-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	21±3	-	120±5	5,7
10 <sup>4</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>5</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 10 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба воды) с бактериофагом Ah-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба воды № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	23±1	-	129±6	5,6
10 <sup>4</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>5</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	23±1	-	лизис	-

Таблица 11 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Av-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. veronii</i> <i>bv.veronii</i> P3 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 <sup>3</sup>	21±3	-	116±4	5,5
10 <sup>4</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>5</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	21±3	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	21±3	-	лизис	-

Таблица 12 – Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект нестерильная проба рыбы) с бактериофагом Ah-4 серии УлГАУ

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>A. hydrophila</i> 12 нестерильная проба рыбы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			

10 <sup>3</sup>	23±1	-	120±5	5,2
10 <sup>4</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>5</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>6</sup>	23±1	-	лизис	-
10 <sup>7</sup>	23±1	-	лизис	-

В обоих вариантах эксперимента заражающая доза *A. hydrophila* 12 и *A. veronii* bv. *veronii* P3 составляла 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> КОЕ/г воды/рыбы.

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 были проведены эксперименты по оптимизации схемы постановки РНФ в нестерильных пробах воды и рыбы. Использовали два варианта условий: первый - подращивание исследуемого материала и последующее подращивание композиции (фаг+культура) при температуре (29±1) °С; второй - отработанный на стерильных пробах почвы - подращивание композиции (фаг+культура) в течение 5 часов при температуре (29±1) °С.

Таким образом, эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ показали, что для обнаружения бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii* bv. *veronii* в нестерильных пробах воды и рыбы в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подращивание исследуемого материала в течение 2 ч при (29±1) °С с последующим заражением фагами Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ и инкубированием смеси в течение 4 ч при (29±1) °С.

Для определения специфичности РНФ с применением фагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ было проведено исследование образцов воды и рыбы, контаминированных бактериями *Aeromonas veronii* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33568, *Alcaligenes spp* B-5269, *Acinetobacter calcoaceticus* B-5971, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, в монокультуре. Результаты получены отрицательные.

Нами были проведены эксперименты по применению модифицированной методики индикации бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii*. Для исследований были использовано по 8 проб воды и рыбы (карп), из мест, где ранее были выделены бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii*.

Исследование проходило параллельно двумя методами: бактериологическим («Методические указания по лабораторной диагностике аэромоноза (краснухи) карпов», 1986) [213] и с применением РНФ. Результаты исследований представлены в таблице 13.

Результаты проведенных исследований по индикации бактерий видов *A. hydrophila* и *A. veronii* в пробах воды свидетельствуют о высокой чувствительности РНФ (24 часа) и специфичности (обнаружены бактериофагом специфичные для бактериофага бактерии). Использование «Методических указаний по лабораторной диагностике аэромоноза (краснухи) карпов» (1986) [213] не позволяет провести точную идентификацию выделенных бактерий, в то время как бактериофаги способны увеличить свой титр при контакте с конкретными бактериями видов *A. hydrophila* и *A. veronii* в концентрации 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> КОЕ/г воды. Свободный фаг при исследовании обнаружен не был.

Таблица 13 - Результаты использования РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii* в пробах воды нестерильной

№ исследуемой пробы	№ фага	Количество БОЕ в контроле	Количество БОЕ в опыте	Увеличение титра фага, раз	Результат РНФ	Результат бактериологических исследований
---------------------	--------	---------------------------	------------------------	----------------------------	---------------	---

1	Av-4	21±1	104±4	4,9	Положительный	Отрицательный
1	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
2	Av-4	21±1	113±4	5,4	Положительный	Положительный
2	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
3	Av-4	21±1	119±4	5,7	Положительный	Отрицательный
3	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
4	Av-4	21±1	115±7	5,5	Положительный	Отрицательный
4	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
5	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
5	Ah-4	23±1	125±4	5,4	Положительный	Положительный
6	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
6	Ah-4	23±1	139±2	6,0	Положительный	Положительный
7	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
7	Ah-4	23±1	121±3	5,3	Положительный	Отрицательный
8	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
8	Ah-4	23±1	131±3	5,7	Положительный	Отрицательный

В таблице 14 представлены результаты наших исследований по индикации бактерий видов *A. hydrophila* и *A. veronii* в пробах карпа. Свободный фаг при исследовании обнаружен не был.

Таблица 14 - Результаты использования РНФ для индикации бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii* в пробах рыбы

№ исследуемой пробы	№ фага	Количество БОЕ в контроле	Количество БОЕ в опыте	Увеличение титра фага, раз	Результат РНФ	Результат бактериологических исследований
1	Av-4	21±1	108±2	5,1	Положительный	Отрицательный
1	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
2	Av-4	21±1	106±1	5,0	Положительный	Положительный
2	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
3	Av-4	21±1	107±2	5,1	Положительный	Отрицательный
3	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный

4	Av-4	21±1	106±2	5,0	Положительный	Отрицательный
4	Ah-4				Отрицательный	Отрицательный
5	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
5	Ah-4	23±1	110±3	4,8	Положительный	Положительный
6	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
6	Ah-4	23±1	107±2	4,7	Положительный	Положительный
7	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
7	Ah-4	23±1	114±1	5,0	Положительный	Отрицательный
8	Av-4				Отрицательный	Отрицательный
8	Ah-4	23±1	121±3	5,3	Положительный	Отрицательный

Полученные нами данные, представленные в таблицах 13-14 подтверждают специфичность метода, как как бактериофаг Av-4 *серии УлГАУ* специфичен только для *A. veronii*, а Ah – 4 серии УлГАУ – для *A. hydrophila*. Результаты бактериологического исследования согласно «Методических указаний по лабораторной диагностике аэромоназа (краснухи) карпов» (1986) [213] могут быть получены только после 96 часов и в 50 % случаев не были достоверными. Предлагаемый метод занимает 24 часа.

### Обсуждение

Действующим на данный момент нормативно-техническим документом на территории РФ по диагностике аэромоназа является «Методические указания по лабораторной диагностике аэромоназа (краснухи) карпов (утв. Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 23 апреля 1986 г. № 13-3/5), который включают рекомендации по бактериологическому исследованию, серологической идентификации и биологическому исследованию с оговоренным сроком исследования в течение 20 дней. Актуален приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 14.04.2020 № 196 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов аэромоназов лососевых и карповых рыб» (Зарегистрирован 21.05.2020 № 58409).

Зарубежом актуальна бактериологическая идентификация возбудителей аэромоназа с использованием триптиказного соевого агара (TSA) и триптиказного соевого бульона (TSB), цефсулодин-иргасан-новобиоцинового агара (CIN), агара МакКонки, таурохолат-теллурит-желатинового агара (TTGA), ампициллин-декстринового агара (ADA), irgasan diamond green agar. Коммерческие системы идентификации (API 20E, Vitek, BBL Crystal, MicroScan W/A и др.) широко используются в клинических лабораториях. Молекулярная идентификация- это методы, основанные на гене 16S рРНК, генах домашнего хозяйства (*housekeeping genes*), матричной лазерной десорбции/ионизации - времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии, Для определения принадлежности изолятов *Aeromonas* к одному и тому же клону разработаны методы энтеробактериальной повторяющейся межгенной консенсусной ПЦР (ERIC-PCR), случайной амплифицированной полиморфной ДНК-ПЦР (RAPD-PCR), полиморфизм длины амплифицированного фрагмента (AFLP), гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) и мультилокусное типирование последовательностей (MLST). Применяется также метод гибридизации ДНК-ДНК. Метод для выявления бактерий рода *Aeromonas* при инфекционных процессах у людей предложен в рекомендациях «UK SMI ID 19 Identification of *Vibrio* and *Aeromonas* species». Разработаны

коммерческие наборы для обнаружения ПЦР в реальном времени: «VIASURE *Aeromonas* + *Yersinia enterocolitica*» (Испания), AccuPower® *Aeromonas hydrophila*, тест-системы для детекции *Aeromonas hydrophila* методом постановки ПЦР производства «PCRmax» и «Bioformula». AerSpp dtcc-qPCR включает в себя серию видоспецифичных таргетных реагентов, разработанных для *Aeromonas spp.* для детектирования с помощью кПЦР, производства «Genetic PCR solutions™» (Испания). Вышеперечисленные наборы для детекции аэромонад иностранного производства, поэтому есть необходимость в разработке собственных лабораторных инструментов.

При проведении лабораторных исследований не всегда есть возможность для типирования инфекционного агента использовать полимеразную цепную реакцию с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени», электрофоретическим методом или LAMP.

Куклиной Н.Г. (2017) была модифицирована схема индикации бактерии *A. salmonicida* методом РНФ с применением бактериофага As125-УГСХА, что позволяющая выявлять бактерии *A. salmonicida* за 28 часов [9]. Насибуллиным И.Р. (2020) было выделено и селекционировано 5 изолятов специфических бактериофагов *A. hydrophila*, изучены их основные биологические и молекулярно-генетические свойства. Был выбран бактериофаг Б43-УГСХА, отвечающий всем требованиям для индикаторных биопрепаратов и на его основе сконструирован бактериофаговый препарат. Были разработаны схемы фагоидентификации и фагоиндикации бактерий *A. hydrophila*, которые позволяли ускорить время получения результата [10].

### Заключение

Модификация методики реакции нарастания титра фага для аэромонадных бактериофагов позволит расширить спектр патогенов, для которых разработаны оптимальные параметры постановки реакции (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями) с использованием специфических бактериофагов Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ. Выделенные из объектов внешней среды, фаги характеризуются высокими титрами литической активности и широким спектром специфического литического действия. Экспериментально было установлено, что наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *A. veronii bv.veronii* и *A. hydrophila* в объектах санитарного надзора являются следующие параметры: концентрация индикаторной культуры, обнаруживаемая при постановке реакции –  $10^3$  -  $10^4$  м.к./мл/г, рабочее разведение бактериофага -  $10^5$  БОЕ/мл. Эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ показали, что для обнаружения бактерий *A. hydrophila* и *A. veronii bv. veronii* в нестерильных пробах воды и рыбы в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подрачивание исследуемого материала в течение 2 ч при  $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$  с последующим заражением фагами Av-4 серии УлГАУ и Ah-4 серии УлГАУ и инкубированием смеси в течение 4 ч при  $(29 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

**Финансирование:** Исследование выполнено согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 123031600041-9.

**Конфликт интересов:** Авторы не имеют конфликта интересов.

### Литература

1. Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila* / M. Akmal, A. Rahimi-Midani, M. Hafeez-ur-Rehman, A. Hussain, T.-J. Choi // Pathogens. – 2020. – Vol. 9. – P. 215.
2. Isolation of a lytic bacteriophage against virulent *Aeromonas hydrophila* from an organized equine farm /T. Anand, R.K. Vaid, B. Bera, J. Singh, S. Barua, N. Virmani // J. Basic Microbiol. – 2022. – Vol. 56. – P. 432–437.

3. Genomic structure of the *Aeromonas* bacteriophage pAh6-C and its comparative genomic analysis / J.W. Jun, H.J. Kim, S.K. Yun, J.Y. Chai, S.C. Park // Arch Virol. – 2015. - № 160(2). – P. 561-564.
4. Методика постановки реакции нарастания титра фага *Bacillus anthracis* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.И. Климушкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. - № 4 (32). – С. 99-105.
5. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus coagulans* в пищевых продуктах / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием - Ульяновск, 2014. - С. 377-379.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. / A. Martin-Carnahan, S.W. Joseph / In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M., editors. - Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2005. - P. 556–578.
7. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
8. Бактериофаги рода *Bacillus* и перспективы их применения / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4. - № 5. - С. 116-117.
9. Куклина, Н.Г. Бактериофаговый препарат для индикации и идентификации *Aeromonas salmonicida*: дис. ... кандидата биологических наук: 06.02.02 /Куклина Наталья Григорьевна. - Уфа, 2017. - 128 с.
10. Насибуллин, И.Р. Индикация и идентификация *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического бактериофага: дис. ... кандидата биологических наук : 06.02.02 // Насибуллин Ильдар Равильевич. – Саратов, 2020. – 176 с.

## References

1. Akmal M., Rahimi-Midani A., Hafeez-ur-Rehman M., Hussain A., Choi T.-J. (2020) Isolation, characterization, and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. Pathogens, vol. 9, p. 215.
2. Anand T., Vaid R.K., Bera B., Singh J., Barua S., Virmani N. (2022) Isolation of a lytic bacteriophage against virulent *Aeromonas hydrophila* from an organized equine farm. J. Basic Microbiol, vol. 56, pp. 432–437.
3. Jun J.W., Kim H.J., Yun S.K., Chai J.Y., Park S.C. (2015) Genomic structure of the *Aeromonas* bacteriophage pAh6-C and its comparative genomic analysis. Arch Virol, vol. 160(2), pp. 561-564.
4. Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Klimushkin E.I. (2015) Methodology for setting up the reaction of increasing the titer of the *Bacillus anthracis* phage / N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev, E.I. Klimushkin // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy, vol. 4 (32), pp. 99-105.
5. Klimushkin E.I., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A. (2014) Bioindication of the content of *Bacillus coagulans* bacteria in food products. Ecology of the native land: problems and solutions. Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference with international participation, Ulyanovsk, 2014, pp. 377-379.
6. Martin-Carnahan A., Joseph S.W. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov, Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA, pp. 556–578.
7. Vasiliev D. A., Zolotukhin S. N., Feoktistova N. A., Aleshkin A. V. (2013) Biosensor detection of *Bacillus* bacteria in milk and dairy products to prevent spoilage. Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy, vol. 4 (24), pp. 36-43.
8. Vasiliev D. A., Zolotukhin S. N., Feoktistova N. A., Aleshkin A. V. (2014) Bacteriophages of the genus *Bacillus* and prospects for their application. Infection and immunity, vol. 4 (S), pp. 116-117.

9. Kuklina N. G. (2017) Bacteriophage preparation for indication and identification of *Aeromonas salmonicida*: diss. ... Candidate of Biological Sciences: 06.02.02 Kuklina Natalya Grigorievna, Ufa, 128 p.

10. Nasibullin I.R. (2020) Indication and identification of *Aeromonas hydrophila* using a biological product based on a specific bacteriophage: dis. ... Candidate of Biological Sciences: 06.02.02 Nasibullin Ildar Ravilievich, Saratov, 176 p.

## АЭРОМОНАС БАКТЕРИОФАГТАРЫНЫҢ РЕАКЦИЯСЫН АРТУ ӘДІСІНІҢ ФАГТАР ТАҚЫРЫПЫН ӨЗГЕРТУ

Н. Феоктистова\* , А. Ломакин , А. Минаева, И. Раксина, П. Майоров

Федералдық мемлекеттік бюджеттік жоғары оқу орны П.А. атындағы Ульяновск мемлекеттік аграрлық университеті. Столыпин, Ульяновск, Ресей Федерациясы

\*feokna@yandex.ru

**Аннотация.** Мақалада аэромонад бактериофагтары үшін фаг титрінің жоғарылау реакциясының техникасын өзгерту бойынша зерттеулердің нәтижелері берілген. Литикалық белсенділіктің жоғары титр-лерімен және спецификалық литикалық әсердің кең спектрмен сипатталатын UIGAУ сериясы-ның Ав-4 және УльГАУ Ах-4 сериясының бактериофагтарын пайдалана отырып, фаг титрінің жоғарылау реакциясын кезеңділеудің оңтайлы параметрлері әзірленді ( диагностикалық мәні бар реакцияның сандық көрсеткіші және фагтың бактериялармен толық әрекеттесуін қамтамасыз етудің оңтайлы уақыты). бактериялар). Санитариялық қадағалау объектілерінде *A. veronii* *bv.veronii* және *A. hydrophila* бактерияларын көрсету мақсатында келесі параметрлердің РСФ орнату үшін ең тиімді екендігі эмпирикалық түрде анықталды: орнату кезінде анықталған инди-катор культурасының концентрациясы. реакцияның жоғарылауы - 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> мк/мл/г, бакте-риофагтың жұмыс сұйылтуы - 10<sup>5</sup> ПФУ/мл. RSF әдісін оңтайландыру бойынша жүргізілген тәжірибелер бактерияларды анықтау үшін *A. hydrophila* және *A. veronii* *bv. veronii* судың және балықтың стерильді емес үлгілерінде зертханалық жағдайда, ең оңтайлысы зерттелетін матери-алды 2 сағат бойы (29±1) 0С температурада алдын ала өсіру, содан кейін Ав-4 сериялы UIGAУ және Ах-4 фагтарымен жұқтыру болып табылады. сериясы UIGAУ және қоспаны 4 сағат бойы (29±1) 0С инкубациялайды. Зерттеу Ресей Федерациясы Ауыл шаруашылығы министрлігінің тақырыптық жоспар-тапсырмасына сәйкес жүргізілді, тіркеу нөмірі EGISU NIOKTR 123031600041-9.

**Түйін сөздер:** бактериофагтар; *Aeromonas veronii* *bv.veronii*; *Aeromonas hydrophila*; фаг титрінің жоғарылау реакциясы; модификация; әдістемесі.

## MODIFICATION OF THE PHAGE TITER INCREASE REACTION PROCEDURE FOR AEROMONAD BACTERIOPHAGES

N. Feoktistova\* , A. Lomakin , A. Minaeva, I. Raxina, P. Maiorov

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russian Federation

\*feokna@yandex.ru

**Abstract.** The article presents the results of studies on modification of the phage titer increase reaction technique for aeromonad bacteriophages. Using bacteriophages Av-4 of the UISAU series and Ah-4 of the UI-SAU series, which are characterized by high titers of lytic activity and a wide spectrum of specific lyt-ic action, the optimal parameters for setting up the phage titer increase

reaction (a quantitative indicator of the reaction that has diagnostic value and the optimal time that ensures full interaction of the phage with bacteria) were developed. It was empirically established that the following parameters are the most effective for setting up the RNF for the purpose of indicating *A. veronii* bv. *veronii* and *A. hydrophila* bacteria in sanitary inspection facilities: the concentration of the indicator culture detected during the reaction is  $10^3 - 10^4$  m.c./ml/g, the working dilution of the bacteriophage is  $10^5$  PFU/ml. Experiments to optimize the methodology for setting up the RNF have shown that the most optimal method for detecting *A. hydrophila* and *A. veronii* bv. *veronii* bacteria in non-sterile water and fish samples in laboratory conditions is preliminary cultivation of the test material for 2 hours at  $(29 \pm 1)$  °C, followed by infection with phages Av-4 of the ULSAU series and Ah-4 of the ULSAU series and incubation of the mixture for 4 hours at  $(29 \pm 1)$  °C. The study was carried out in accordance with the thematic plan-task of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation, registration number EGISU NIOKTR 123031600041-9.

**Keywords:** bacteriophages; *Aeromonas veronii* bv. *veronii*; *Aeromonas hydrophila*; phage titer increase reaction; modification; methodology.