

флорой, приобретающей патогенные свойства.

Литература:

1. Авдеенко В.С., Сорокина Л.В. Аналитический анализ распространения субклинического мастита свиноматок / Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы вет. медицины», УГСХА, 2003. – С.48-49.

2. Ключников А.Г., Егунова А.В. Йодсодержащие средства при метрит-мастит-агалактии у свиноматок // Ветеринария. – 2008. - №8. - С.31-32.

3. Методические указания по диагностике, лечению и профилактике послеродовых заболеваний у свиноматок. – Воронеж, 1986. – 23 с.

4. Нарижный А.Г. Профилактика послеродовых заболеваний у свиноматок // Ветеринария. – 1999. - № 7. - С. 33-36.

---

УДК 619:579

## РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИГЕННОГО БИОПРЕПАРАТА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*

*Т.И. Канаева, Д.А. Васильев А.А. Нафеев*  
*Научно-исследовательский инновационный центр*  
*микробиологии и биотехнологии*  
*ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная*  
*сельскохозяйственная академия»*

*Results of approbation of use of an antigenic biological product are described at identification of bacteria *Aeromonas hydrophila*.*

Описаны результаты апробации использования антигенного биопрепарата при идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Одним из направлений нашей работы было использование антигенной структуры бактерий *Aeromonas hydrophila* для их идентификации. Для достижения данной цели нами были решены следующие задачи:

- 1) Подготовка антигена
- 2) Получение гипериммунных сывороток
- 3) Постановка реакций для определения антигенного комплекса.

1) Для исследования в опыт был взят референс-штамм 01 *Aeromonas hydrophila*. Накопление бактериальной массы осуществляли на среде накопления УГСХА-1 в термостате в течение 48 ч, при температуре 37 °С, так как наибольшее количество микробных тел *Aeromonas hydrophila* достигается к этому времени.

Методика подготовки антигена:

Для инактивации *Aeromonas hydrophila* в один из образцов был добавлен мертиолят (1:10000), другой подвергся кипячению на водяной бане в течение 30 мин. В третий для дезинтеграции добавили 0,25 % SDS (додецилсульфат на-

трия) детергент, разрушающий нативную структуру клетки. Четвертый образец подвергли ультразвуковой дезинтеграции с помощью прибора фирмы.

Затем все образцы подвергались центрифугированию на аппарате СМ-6М для очистки клеток от питательного субстрата. Центрифугировали при 1900 g в течение 20 мин, осадок отмывали физиологическим раствором и вновь центрифугировали при 1900 g в течение 20 мин. Таким образом, получили осадок содержащий антигены *Aeromonas hydrophila*. К осадку добавили по 6 мл физиологического раствора и получили готовые антигенные препараты 4-х видов (Т – антигенный препарат подвергшийся кипячению; М – антигенный препарат с добавленным мертиолятом; SDS – антигенный препарат содержащий SDS; УЗ – антигенный препарат обработанный на ультразвуковом дезинтеграторе).

Проверили данные антигенные препараты на стерильность (полноту инактивации) высевом на плотную питательную среду (МПА). Получили отрицательный результат (отсутствие колоний на агаре спустя 48 ч инкубации в термостате при 37 °С).

2) В опыте были задействованы 4 группы кроликов породы «Шиншилла» со средним весом 3 кг. Первой группе кроликов вводили антигенный препарат содержащий мертиолят (М), второй – антигенный препарат инактивированный кипячением (Т), третьей – обработанный SDS (SDS), четвертой – подвергнутый ультразвуковой дезинтеграции (УЗ).

Схема иммунизации кроликов:

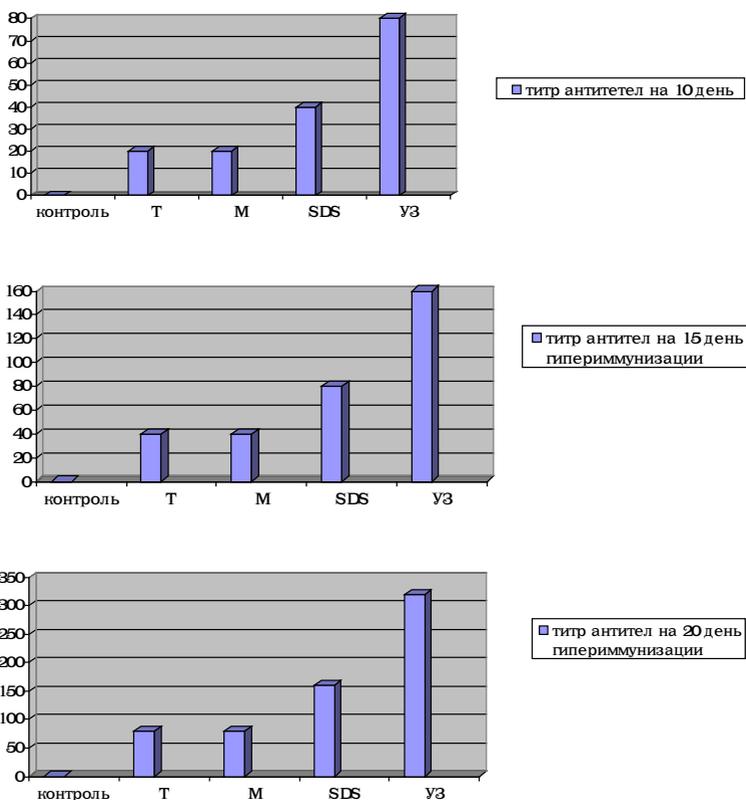
Антигенный препарат в объеме 0,5 мл соединяют с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (Difco) и вводят внутримышечно. Следующие введения без адьюванта делали внутривенно в краевую вену уха кроликов через каждые 3 дня по 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл антигенного препарата. Искомые сыворотки контролировали на 10, 16 и 19 дни. Получали сыворотки на 26 день гипериммунизации. В результате получили сыворотки А, В, С и D.

3) Антигены обладают двумя основными функциональными свойствами – антигенным действием и антигенной реакцией, поэтому в исследованиях по изучению антигенных свойств полученных препаратов мы изучали обе эти функции. Для выяснения антигенного действия применяемых суспензий определяли динамику образования агглютининов в ответ на гипериммунизацию кроликов. Установили, что титр антител, регистрируемых в РА, имеет значительную разницу при гипериммунизации различными антигенными препаратами (рис. 1)

Как показано на схемах максимальная величина титра антител наблюдается в ответ на введение ультразвукового дезинтеграта и равна к 10 дню гипериммунизации 1:80. К 19 дню титр антител вырос до 1:320 и оставался самым высоким.

Постановка реакции агглютинации:

Для постановки реакции агглютинации на поверхность хорошо обезжиренного предметного стекла пастеровской пипеткой нанесли две капли сыворотки и одну каплю физиологического раствора. Затем в каплю физиологического раствора и в одну из капель сыворотки внесли каплю бактериальной массы, выращенной на мясопептонном бульоне в течение 24 ч при 37 °С, и тщательно растерли, чтобы капля жидкости сделалась равномерно мутной. В капле, где соединены сыворотка и бактериальная масса, отмечалась агглютинация в виде мелкозернистых пластинок и крупинок, с одновременным просветлением суспензии. Жидкость в контроле антигена оставалась равномерно-мутной,



**Рис.1. Образование агглютининов при гипериммунизации кроликов изучаемыми препаратами на 10, 16 и 19 день**

а в контроле сыворотки – прозрачной. Все четыре полученные нами сыворотки давали положительные реакции с соответствующей бактериальной культурой. Дополнительно был проведен контрольный опыт и получена отрицательная реакция (жидкость равномерно-мутная) на *Escherichia coli*. Данные исследования доказывают специфичность полученных сывороток.

Дальнейшее изучение антигенных свойств у полученных препаратов было направлено на выяснение их антигенного состава. С этой целью нами была использована реакция преципитации. В настоящее время разработано несколько методов постановки реакции диффузионной преципитации. Мы для своих исследований использовали реакцию иммунодиффузии (РИД) по Оухтерлони. Данную реакцию проводили в агаровом геле на предметных стеклах. Гелевую среду готовили из очищенного агара фирмы «Difco». Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-70 °С, разливали слоем 2 - 3 мм (12 - 15 мл) на предметные стекла. После застывания агара специальным штампом-

пробойником делала лунки в геле, не допуская образования трещин между ними и отслоения агара от предметных стекол. На предметных стеклах сделали по пять лунок: одна в центре, остальные по периферии. Диаметр каждой лунки составлял 3 мм, расстояние между центральной и периферическими лунками - 4 мм. Образовавшиеся диски геля удаляли из лунок канюлей, соединенной с вакуумным насосом. Испытуемые сыворотки вносили в центральную лунку. Периферические лунки заполняли используемыми в иммунизации антигенными препаратами. Лунки заполняли доверху, не допуская переливания жидкости через край. После заполнения всех лунок предметные стекла инкубировали во влажной камере при температуре 37 °С. Реакцию учитывали через 48 ч визуально. Между центральной лункой и лунками периферии образовывались полосы преципитации. Результаты исследований представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Результаты реакции иммунодиффузии**

Исследуемые сыворотки	Исследуемые антигенные препараты			
	Т	М	SDS	УЗ
А	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации
В	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации
С	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	2 полосы преципитации	2 полосы преципитации
Д	1 полоса преципитации	1 полоса преципитации	2 полосы преципитации	3 полосы преципитации

Примечание: Т – антигенный препарат подвергшийся кипячению; М – антигенный препарат с добавленным мертиолятом; SDS – антигенный препарат содержащий SDS; УЗ – антигенный препарат обработанный на ультразвуковом дезинтеграторе. А – сыворотка, полученная после гипериммунизации кроликов Т; В – сыворотка, полученная после гипериммунизации кроликов М; С – сыворотка, полученная после гипериммунизации кроликов SDS; Д – сыворотка, полученная после гипериммунизации кроликов УЗ.

Таким образом, в двух случаях, между центральной лункой, содержащей сыворотку 1 и 2 и лунками, заполненными исследуемыми антигенными препаратами, образовывалось по одной полосе преципитации, причем линии преципитации полностью сливались, что говорит об идентичности антигенов. Между центральной лункой содержащей сыворотку 3 и лунками заполненными антигенным препаратом, содержащим SDS и УЗ образовывались две полосы преципитации (что говорит о наличие в системе как минимум двух комплексов антиген-антитело). Между центральной лункой содержащей сыворотку 4 и: лунками заполненными Т и М образовывалось по одной линии преципитации, лункой заполненной антигенным препаратом, содержащим SDS – две полосы преципитации, и одной лункой, заполненной ультразвуковым дезинтегратором наблюдалось 3 полосы преципитации (рис. 2).

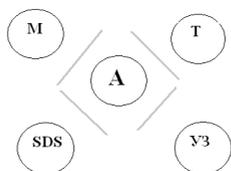


Схема 1.

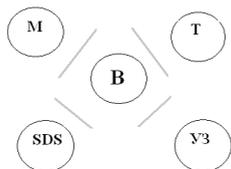


Схема 2.

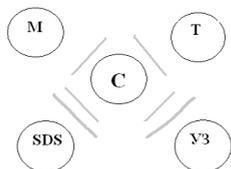


Схема 3.

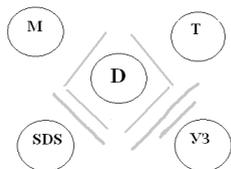
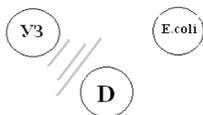


Схема 4.

**Рис. 2. Схемы результатов РДП с полученными гипериммунными сыворотками (А, В, С и D) и изготовленными антигенами (М, Т, SDS, УЗ)**

Для контроля испытываемая сыворотка (D) подверглась проверке в реакции иммунодиффузии со стандартным антигеном *Escherichia coli*. Для этого на покровном стекле были сделаны 3 лунки, в центральную внесли сыворотку D, а в периферические – антигенные препараты УЗ и *Escherichia coli*. В результате наблюдали отсутствие полос преципитации между сывороткой и антигеном *Es-*

cherichia coli. (рис. 3)



**Рис. 3. Схема контроля сыворотки D со стандартным антигеном Escherichia coli**

Благодаря проведенным исследованиям доказали, что аэромонады содержат до 3-х специфических антигенов. В силу высокой чувствительности и строгой специфичности, из исследуемых компонентов можно конструировать биопрепарат для антигенной идентификации выделенных бактерий.

Для проверки данного препарата исследовали выделенные полевые штаммы в реакции агглютинации. Результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Реакция агглютинации штаммов Aeromonas hydrophila и проверяемой сыворотки**

№ п/п	Штаммы	РА с испытуемым биопрепаратом	Контроль
1	A.h. 01 реф.	+	-
2	Escherichia coli	-	-
Морская рыба			
3	P <sub>8a</sub>	+	-
4	P <sub>8r</sub>	+	-
Речная рыба			
5	P <sub>4</sub>	+	-
6	P <sub>9</sub>	+	-
7	P <sub>10</sub>	+	-
8	P <sub>11</sub>	+	-
9	P <sub>12</sub>	+	-
10	P <sub>13a</sub>	+	-
11	P <sub>13b</sub>	+	-
Вода открытых водоемов			
12	1a	+	-
13	4a	+	-
14	5a	+	-
15	11a	+	-
16	13a	+	-
17	26	+	-

18	5д	+	-
19	7д	+	-
20	8д	+	-
21	9д	+	-
22	10д	+	-
23	11д	+	-
24	1е	+	-
25	5е	+	-
26	6е	+	-
27	7е	+	-
28	1з	+	-
29	2з	+	-
30	3з	+	-
31	5з	+	-
32	6з	+	-
33	8з	+	-
34	10з	+	-
35	11з	+	-
Сточные воды			
36	37	+	-
37	39	+	-
38	43	+	-
39	48	+	-
40	П1	+	-
41	П2	+	-
42	П3	+	-
43	П4	+	-
44	П5	+	-
45	1г	+	-
46	2г	+	-
47	5г	+	-
48	6г	+	-
49	1в	+	-
50	3в	+	-
51	X	+	-
Водопроводная вода			
52	A <sub>7</sub>	+	-
Молоко			
53	M <sub>1</sub>	+	-
54	M <sub>6</sub>	+	-

«+» положительно реагирующие штаммы

«-» отрицательно реагирующие штаммы

В результате исследований доказали, что предлагаемый нами диагностиком для идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*, состоящий из антигенного ультразвукового дезинтеграта данных бактерий и гипериммунной сыворотки (D), полученной на УЗ антиген можно использовать для идентификации выделенных бактерий методами РА и РДП.

УДК 619:579

## РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ ПРЕДЛАГАЕМОЙ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ТИПИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*

*Т.И. Канаева, Д.А. Васильев А.А. Нафеев*  
*Научно-исследовательский инновационный центр*  
*микробиологии и биотехнологии*  
*ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная*  
*сельскохозяйственная академия»*

*Results of approbation of the offered scheme of allocation and typification of bacteria of kind *Aeromonas hydrophila* are described.*

*Описаны результаты апробации предлагаемой схемы выделения и типизации бактерий вида *Aeromonas hydrophila*.*

Целью ниже описанных исследований являлась: разработка среды накопления, селективной и транспортной среды для *Aeromonas hydrophila*, а так же разработка схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий вида *Aeromonas hydrophila*.

Результаты

Конструирование селективной среды:

Для подбора селективного агента было проведено исследование референс-штаммов *Aeromonas hydrophila* (**A.h.01реф.** и **A.h.02реф.**) на устойчивость к химиотерапевтическим средствам методом диффузии в агар с применением 28 антимикробных препаратов. В результате проведенных исследований выяснили, что антибиотики непригодны для использования в качестве селективного агента. Наиболее приемлемым, был бы ампициллин, или доксициклин. Но некоторые виды из возможных ассоциантов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*) так же устойчивы к данным антибиотикам. Кроме того, некоторые штаммы *Aeromonas hydrophila* являются ампициллин-чувствительными, другие неустойчивы по отношению к доксициклину.

Чувствительность к красителям - один из критериев в систематике микроорганизмов. Имеются сообщения о применении красок и для выявления факторов патогенности различных бактерий. В условиях лаборатории нами были проведены исследования устойчивости *Aeromonas hydrophila* и возможных ассоциантов к следующим красителям: Конго-рот, кристаллический фиолетовый,