

Таким образом, на козах нами была получена гипериммунная сыворотка, содержащая антитела к спорам *B. anthracis*, специфические взаимодействующие с антигенными детерминантами данного патогена и не взаимодействующие с антигенами спор типичного представителя *B. cereus*. Методами непрямого и прямого вариантов ТФ ИФА, РДП и иммуноэлектронной микроскопии подтверждено присутствие на поверхности спор *B. cereus* штамма Дакар 1 некоторого числа антигенных детерминант, сходных с таковыми спор *B. anthracis*. По-видимому, с наличием этих детерминант связано получение ложно-положительных результатов при проведении диагностических исследований [2]. Считаю целесообразным проведение дальнейших исследований по изучению структуры подобных детерминант и получению моноклональных антител, строго специфических к антигенам спор сибиреязвенного микроба, что позволит разработать высоко-специфические диагностические тест-системы для идентификации спор возбудителя сибирской язвы, основанные на методах иммунохимии.

Литература:

1. Дыкман Л.А. Развитие методологии иммуноанализа почвенных ассоциативных бактерий с использованием препаратов коллоидного золота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1996. – 24 с.
2. Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Лягоскин И.В. Сравнительная характеристика почвенных изолятов группы *Bacillus cereus* // Ветеринария. - 2008 г. - №6. - С. 29-33
3. Иммунологические методы. // Под ред. Г. Фримеля, Пер. с нем. А.Н. Маца. – М.: «Мир», 1979, 520 с.: ил.
4. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 15 / Ed. by Burdon R.H., Knippenberg P.H. – Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1985.

УДК 619:579

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* И
РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ БИОПРЕПАРАТА
THE CHARACTERISTICS OF PHAGES OF BACTERIA OF
STEM *KLEBSIELLA* AND WORKING OUT OF PARAMETERS
OF PRACTICAL APPLICATION FOR CREATION ON
THEIR BASIS OF THE BIOLOGICAL PRODUCT

Ляшенко Е.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.
Ljashenko E.A., Zolotukhin S.N., Vasiljev D.A.
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии, УГСХА
The Research innovative centre of microbiology and biotechnology,
The Ulyanovsk state agricultural academy

In the article there is given information about the isolated and selected bac-

teriophages of Klebsiella, their main biological peculiarities, making a biological preparation on basis of the selected phages.

Бактерии рода *Klebsiella* способны вызывать у людей и животных пневмонию, заболевания мочеполовой системы, острые кишечные инфекции, различные гнойно-септические осложнения, а также внутрибольничных инфекций, менингиты. Кроме того, многие исследователи отмечают учащение случаев заболеваний пневмонией, маститами, (энтеритом) острыми кишечными инфекциями, септицемией животных, где этиологическую роль играют клебсиеллы [2].

Выделение и идентификация клебсиелл в основном проводится бактериологическим методом. Использование метода фагодиагностики позволяет сократить срок исследования с нескольких суток до 40 часов. Данный метод на практике не имеет широкого применения из-за отсутствия набора специфических фагов.

Поэтому, целью нашей работы стала разработка технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов.

Материалы и методы. В работе были использованы 38 штаммов бактерий рода *Klebsiella* и 123 штамма других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Yersinia enterocolitica*, а также родов семейств *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по общепринятым методикам [1]. Материалом для выделения являлись сточные воды и фекалии животных свиноводческих и молочно-товарных ферм, частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей.

Результаты исследований и обсуждение. В результате исследований нами был выделен и селекционирован 21 штамм фагов бактерий рода *Klebsiella*.

При изучении биологических свойств выделенных фагов отмечались различия по морфологии образовавшихся негативных колоний, литической активности, спектру литического действия.

По морфологии, образовавшиеся негативные колонии разделили на два типа. Первый тип – круглые, прозрачные в центре негативные колонии диаметром от 2 мм и более с зоной неполного лизиса по периферии шириной 1-8 мм. Второй тип – круглые, прозрачные с ровными краями в диаметре до 2,5 мм с отсутствием зоны неполного лизиса.

Литическая активность бактериофагов составляла от 4×10^7 до 8×10^9 фаговых корпускул в 1 мл.

Для определения спектра литического действия бактериофагов использовали 38 штаммов бактерий рода *Klebsiella*. Установлено, что два бактериофага отличались широким диапазоном литической активности (К - 81 УГСХА – 73 %, К - 10 УГСХА лизировал 76%), а в сумме фаги проявили литическое действие в отношении 97% всех исследованных культур. У представителей бактерий других родов и семейств литической активности не выявлено, то есть все фаги обладали строгой специфичностью.

Для конструирования диагностического биопрепарата нами отобраны бактериофаги К - 10 и К - 81, обладающие высокой активностью и широким спектром лизиса. Отобранные фаги проявили устойчивость к воздействию высо-

ких температур (67 – 88 °С), и устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут. Данные параметры обработки хлороформом и температурой использовались для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

По результатам электронной микроскопии установили, что по морфологии фаговых корпускул бактериофаг К - 10 УГСХА согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов принадлежит к семейству *Siphoviridae*, по классификации А.С. Тихоненко к IV группе – «Фаги с длинным несокращающимся отростком», а фаг К - 81 УГСХА к семейству *Myoviridae* и к V морфологической группе – «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению».

Для получения специфического диагностического препарата с высокой литической активностью, состоящего из двух фагов (К - 10 и К - 81), были разработаны биотехнологические параметры изготовления и контроля клебсиеллезных бактериофагов. Установили, что оптимальное время экспозиции пассажей при температуре 37 °С для фагов К - 10 и К - 81 составляет 4 часа.

С учетом строгой специфичности отобранных бактериофагов, нами была предложена схема ускоренной идентификации бактерий рода *Klebsiella*. Идентификацию выделенных бактерий проводили по биохимическим свойствам и по феномену лизиса индикаторными фагами. Результаты идентификации бактерии рода *Klebsiella* бактериологическим методом подтвердились полученными результатами фагоидентификации (на газоне с культурой отмечалась зона лизиса). Сущность предлагаемого нами метода схемы фагоидентификации в том, что в сравнении с бактериологическим методом сокращаются сроки исследования с 4 до 2 суток.

Следующий этап наших исследований «Фагоиндикация» заключался в разработке технологических параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале без выделения чистой культуры. Одновременно исследовали объекты бактериологическим методом.

По результатам проведенных исследований водопроводной воды, комбикорма и мяса установлено, что нарастание титра фагов более чем в 5 раз произошло при минимальной концентрации бактерий рода *Klebsiella* 10^3 м.к./мл за 18 часов без выделения чистой культуры. При исследовании проб фекалий нарастание титра фагов более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий рода *Klebsiella* 10^4 м.к./г. При увеличении времени инкубации бактериофага с фекалиями до 10 часов обнаруживали клебсиеллы в концентрации 10^3 м.к./г за 22 часа. Бактериологическим методом удавалось обнаружить бактерии в минимальной концентрации 10^4 , но при этом затрачивается 96 часов.

При исследовании воды, комбикорма, фекалий и мяса мы наблюдали видимое преимущество метода фагоиндикации – РНФ над бактериологическим методом исследования.

В результате проведенных исследований были разработаны технологические параметры ускоренной индикации бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора (вода, комбикорм, фекалии и мясо) и патологическом материале с помощью РНФ с использованием индикаторных бактериофагов (К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА), позволяющие обнаружить клебсиеллы в минимальной концентрации 10^3 - 10^4 м.к./мл (г) исследуемого субстрата за 18-22 часа.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях

производства нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции телят, протекающей с участием клебсиелл. В качестве исследуемого материала использовали 13 проб фекалий от больных диареей телят в возрасте от 2 – 15 суток, принадлежащих учебно-опытному хозяйству УГСХА. При исследовании проб фекалий методом реакции нарастания титра фага с использованием фагов К - 10 и К - 81 клебсиеллы были обнаружены в 38% случаях (5 проб). Бактериологическим методом данные бактерии были обнаружены в 15 % случаях (в 2 пробах) с затратой времени от 96 часов и более. Таким образом, диагностическая чувствительность РНФ позволяет обнаруживать бактерии рода *Klebsiella* в концентрации 10^3 - 10^4 м.к./мл за 18-22 часа.

Для усовершенствования предложенного метода установлена возможность использования биопрепарата, состоящего из двух вышеуказанных бактериофагов.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований, предложен биопрепарат-диагностикум, состоящий из фагов К - 10 и К - 81 серии УГСХА, для идентификации и индикации с помощью РНФ бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале.

Литература:

1. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
2. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями // Ульяновск ГСХА. – 2005. – С. 43 – 48.

УДК 619:579

ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО УЧАСТКА ДНК *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* С ПОМОЩЬЮ ПЦР «REAL-TIME»

Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б., Васильев Д.А.
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия»

In article the characteristics of a specific plot of DNA Bordetella bronchiseptica by means of PCR «Real-Time» is given.

В статье дана характеристика специфического участка ДНК Bordetella bronchiseptica с помощью ПЦР «Real-Time».

Введение

Человек так устроен, что ему для нормальной жизнедеятельности нужно трудиться, но вместе с тем еще и активно отдыхать. Каждый выбирает отдых по своему вкусу и настроению, но, чаще всего, мы любим отдыхать со своими