

теми или иными свойствами бактерий и их персистенцией часто заканчивались неудачей [8].

Тем не менее, продолжение работ в данном направлении необходимо, так как поможет раскрыть механизмы стационарности листериоза и сохранения возбудителя в межэпизоотический период.

#### Литература

1. Беляков В.Д. Эпидемиология / В. Д. Беляков, Р. Х. Яфаев // М.: Медицина, 1989. – 416 с.: ил. – (Учеб. лит. Для студ. мед. ин-тов).
2. Бойко А. В. Рибонуклеазная активность бактерий как фактор персистенции некоторых возбудителей сапронозных инфекций / А. В. Бойко, О. В. Бойко // ЖМЭИ 1997 №4 с 71.
3. Брудастов Ю. А. Анतिकомплементарная активность производственно-го штамма *Vacillus cereus* IP 5832 и энтеробактерий при их совместном культивировании / Ю. А. Брудастов, А. В. Вальшев, А. Н. Брудастов // ЖМЭИ 1996 №3 с. 91.
4. Бухарин О.В. // ЖМЭИ - 1994. – Приложение август-сентябрь. - с. 3.
5. Бухарин О. В. Бактерионосительство /О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов. - Екатеринбург, 1996.
6. Бухарин О. В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов, А. П. Малышкин, Н. В. Немцева // ЖМЭИ. – 1984. - №2 с.27.
7. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий /О. В. Бухарин. М.: Медицина; 1999, 366 стр.
8. Домардский И. В. Вирулентность бактерий как функция адаптации /И. В. Домардский //ЖМЭИ. – 1997. - №4. – с. 16.
9. Прозоровский С. В., L-формы бактерий (механизмы образования, структура, роль в патологии) / С. В. Прозоровский, Кац Л. Н., Каган Г. Я.. - М., 1981.
10. Шуляк Б. Ф. Руководство по бактериальным инфекциям собак. Т 2. Грамотрицательные бактерии // Б. Ф. Шуляк. – М. Издательство «ОЛИТА», 2003. – 608 с.

УДК 619:579

## **ПОЛУЧЕНИЕ УЗ - АНТИГЕНА *ORNITOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО АКТИВНОСТИ В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ**

*С.С Сыбатуллов, Н.И. Молофеева, Д.А.Васильев*  
*Научно-исследовательский инновационный центр*  
*микробиологии и биотехнологии*  
*ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная*  
*сельскохозяйственная академия»*

*In article results of reception and definition of activity and specificity of components *Ornitobacterium rhinotracheale* strain ATCC 51464 for an enzyme im-*

*minoassay are presented.*

*В статье представлены результаты получения и определения активности и специфичности компонентов *Ornitobacterium rhinotracheale* штамм ATCC 51464 для иммуноферментного анализа.*

#### Введение

Длительность и тяжесть болезни вызываемой *O. rhinotracheale* поражающей органы дыхания домашних птиц: аэросаккулит, ринотрахеит, пневмония, плеврит, зависит от факторов окружающей среды, таких как высокая плотность посадки птиц, повышенная концентрация аммиака в воздухе, не достаточная вентиляция, сопутствующие болезни (2,3).

Смертность от *O. rhinotracheale*. у цыплят-бройлеров может достигать 20 %. У индеек в возрасте 12 недель и старше данная инфекция вызывает острую пневмонию со смертностью, доходящую до 50 % (1).

Для идентификаций изолятов широко применяют биохимические тесты реакцию иммуннодиффузии в агаровом геле, в которой идентифицируют 7 серо типов *O. rhinotracheale* (A, B, C, D, E, F, G). А также реакцию агглютинации (РА), реакцию преципитации в агаровом геле и иммуноферментный анализ (ИФА) (4).

Целью нашей работы было получение антигенов *O. rhinotracheale* для использования в РА и ИФА и оценка их активности и специфичности.

#### Материалы и методы

**Штаммы бактерий.** В работе использовали бактерии *O. rhinotracheale* ATCC 51464, *Salmonella enteritidis* из коллекций штаммов УГСХА, *Pasterella multocida* штамм №11039 серовариант А1.

**Питательные среды.** Для получения биомассы бактерий штаммы, перечисленных выше видов, культивировали на 5 % кровяном агаре и сердечно-мозговом бульоне (фирма Difco).

**Получение антигена ультразвуковым дезинтегратором.** Ультразвуковой антиген бактерий *O. rhinotracheale* ATCC 51464 мы получали из 48 часовой культуры, выращенной на плотной питательной среде. Её смывали стерильным 0,9 % физиологическим раствором, затем осаждали бактериальную суспензию на центрифуге марки СМ 6 фирмы «ELMI» при 3000 оборотах в минуту в течений 10 минут. После центрифугирования разрушали ультразвуком на дезинтеграторе марки «Soniprep 150» и охлаждали в спирте со льдом. Полученный ультразвуковой антиген проверяли на стерильность, путем посева на 5 % кровяной агар.

**Получение К-антигена (К-АГ).** Капсульный антиген получали путем действия температуры (30 минут 56 °С) на бактериальную суспензию. Далее осаждали бактериальные клетки центрифугированием при 3000 оборотах в минуту в течение 30 минут, а над осадок использовали в качестве капсульного антигена (4).

Гипериммунная сыворотка (положительный контроль) получали по методике описанной (Hinz K.H, Neumann U. 1991 году) (5).



**Рис 1. Колонии *O. rhinotracheale* на 5% кровяном агаре (увеличение X 16)**

Оценку активности и специфичности антигенов проводили при помощи реакции агглютинации и ИФА. Реакцию агглютинации и непрямой вариант твердофазного ИФА для определения антител в сыворотках крови кроликов и свиней проводили по традиционным методикам. Учет результатов ИФА проводили с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом при длине волны 492 нм. Оценку и интерпретацию результатов в ИФА проводили по  $S/P$  (отношению значений оптической плотности испытуемой сыворотки положительного контроля к значению оптической плотности положительного контроля):

$$S/P = g_x - \kappa^- / \kappa^+ - \kappa^-,$$

где

$g_x$  - оптическая плотность испытуемой пробы сыворотки;

$\kappa^-$  - оптическая плотность положительного контроля;

$\kappa^+$  - оптическая плотность отрицательного контроля.

Если отношение  $S/P$  равно или меньше 0,2, это означает, что проба отрицательная.

Если отношение  $S/P$  равно 0,21 - 0,29, это означает, что проба сомнительная.

Если отношение  $S/P$  равно или больше 0,3, это означает, что проба положительная.

**Статистическая обработка результатов.** Для статистической обработки полученных данных использовали методы, описанные Бейли Н. (2).

Результаты исследования

**Получение биомассы *O. rhinotracheale*.** Бактерии *O. rhinotracheale* выращивали на стерильных чашках Петри с 5 % кровяным агаром. Посев сплошным газоном и дробно для контроля морфологии колоний. Культивировали в

термостате при 37 °С 48 часов.

Колонии *O.rhinotracheale* имели правильную круглую форму, ровные края, серо-белый цвет, что является характерным для данного вида бактерий (рис. 1).



**Рис.2.** Электронная микрофотография *O. rhinotracheale* (увеличение X25000)

При электронном микрокопировании клетки *O. rhinotracheale* имели характерную морфологию: короткие палочки без жгутиков и ресничек (рис. 2).

#### **Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotracheale* в РА на стекле**

На этом этапе работы сравнивали активность и специфичность капсульного и ультразвукового антигена, наиболее часто используемого в РА.

**Таблица 1.** Оценка специфичности полученных антигенов в РА на стекле

АГ Сыворотки	К-АГ	УЗ-АГ
<i>O. rhinotracheale</i>	++++	++++
<i>S. enteriditis</i>	+	–
<i>P. multocida</i>	–	–

Полученные антигены в РА на стекле были активны и специфичны, так как положительный результат наблюдали только между гомологичными сыворотками и антигенами.

#### **Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotrache-***

**ale в количественной РА**

Активность и специфичность капсульного и ультразвукового антигенов проверяли также в реакции агглютинации на планшетах.

**Таблица 2. Оценка активности и специфичности капсульного и ультразвукового антигена в количественной РА.**

АГ Сыворотки	капсульный			Ультразвуковой		
	1	2	3	1	2	3
повторность	1	2	3	1	2	3
<i>S. enteriditis</i>	50	50	50	100	50	50
<i>P. multocida</i>	100	100	100	100	100	100
<i>O. rhinotracheale</i>	>1600	>1600	1600	1600	1600	1600

По данным исследования видно, что оба антигена работают активно и специфично, давая значения титров 1600 и более.

**Определение активности и специфичности антигенов *O. rhinotracheale* в ИФА**

На этом этапе работы провели оценку активности и специфичности полученных антигенов *O. rhinotracheale* в ИФА.

**Таблица 3. Оценка специфичности и активности УЗ-АГ, К-АГ,**

АГ проба	Капсульный		Ультразвуковой	
	1:800		1:100	
	S/P отношение значения оптической плотности		S/P отношение значения оптической плотности	
S.ent	0,408±	P	0,275±	S
Pm	0,368	P	0,155	N
1	0,478	P	0,805	P
2	0,428	P	1,055	P
3	0,470	P	101,8	P
4	0,360	P	0,824	P
5	0,283	S	0,892	P
6	0,545	P	1,018	P
7	0,540	P	0,947	P

Примечание:

SE – *S. enteriditis*;

PM – *P. multocida*;

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – *O. rhinotracheale*;

N - отрицательная реакция;

P – положительная реакция;

S – сомнительная реакция.

Положительный контроль антигенов: капсульный – 0,561; ультразвуковой – 0,913,

Отрицательный контроль антигенов: капсульный – 0,161; ультразвуковой – 0,191;

Разведение сыворотки 1:400.

Положительные пробы на сыворотку *S. enteriditis* получены с капсульным, отрицательная с ультразвуковым антигеном дал сомнительный результат (см. таб.3).

На сыворотку *P. multocida* положительная реакция прошла с капсульным антигеном, а с остальными антигенами реакция отрицательная.

На сыворотки *O. rhinotracheale* положительные результаты получены на все исследуемые антигены.

По результатам исследований этого этапа работы, что наиболее специфичны в ИФА ультразвуковой антигены. Менее специфичны для иммуноферментного анализа капсульный и антиген.

Оценка специфичности и активности ИФА и РА

В этом разделе мы проводили сравнительное исследование сывороток в РА и ИФА для выявления антител в сыворотке крови кур. Сравнение результатов проводили на примере капсульного и ультразвукового антигенов *O. rhinotracheale* штамм 51464.

Данные сравнительного исследования сывороток крови кур в реакциях ИФА и РА, представленные в таблице 4., дали схожие результаты. Таким образом, полученные специфические сыворотки можно использовать в обеих реакциях, так как получили сопоставимые результаты.

**Таблица. 4. Сравнительная оценка результатов ИФА и РА для капсульного и ультразвукового антигена *O. rhinotracheale* штамм ATCC 51464.**

Антигены Сыворотки	Капсульный		Ультразвуковой	
	в РА	в ИФА	в РА	в ИФА
<i>S. enteriditis</i>	S	P	S	S
<i>P. multocida</i>	N	N	N	N
1	P	P	P	P
2	P	P	P	P
3	P	P	P	P
4	P	P	P	P
5	P	P	P	P
6	P	P	P	P
7	P	P	P	P
8	P	P	P	P

1-8 - сыворотки *O.rhinotracheale*

Выводы

Анализируя полученные данные мы пришли к выводу, что наиболее активны и менее специфичным были антигены капсульный.

В реакции агглютинаций активно работали все антигены.

В реакциях ИФА активны и менее специфичны капсульный и ультразвуковой антиген, так капсульный антиген был положительный результат при взаимодействии с сывороткой *S. enteritidis*. Капсульный не специфичны для ИФА, но ультразвуковой антиген очень активный в ИФА.

Литература:

1.Linda van Veen: Do We Know Real Impact of *Ornithobacterium rhinotracheale* Infections? *Poultry International*, May 2003, Vol.42, No 5, pp. 20-

2. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*\Hafez M.H. *International Journal of Poultry Science*. 2002. 1(5): P.114-118

3 Isolation and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Commercial Broiler Flocks on the Delmarva Peninsula, Odor E.M., Salem M., Pope C.R.//*Avian Diseases*, 41, 1997. - 257-260 p.

4. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*, P. van Empel, H. van den Bosch, P. Loeffen// *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1996. - 418-421 p.

5. Pilotstudie zur Prävalenz der *Ornithobacterium rhinotracheale*- Infektion bei Masthuhn nordwestdeutschland, Ryll M., Hinz K.H, Neumann U. // *Tierärztlich Wschr.* 110, 1997. - 267-271 p.

## ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО СТИМУЛЯТОРА РОСТА «УГСХА – 08» НА УРОЖАЙНОСТЬ ФАСОЛИ И ГОРОХА В ПОЧВЕННО-КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

*Тигунов А.Е., Пузакова А.И., Трусова О.*

*Influence of a biological growth stimulant «UGSHA - 08» on productivity of a bean and peas in soil-climatic conditions of the Ulyanovsk area*

Известно, что природные и синтетические регуляторы роста и развития растений являются мощным средством управления онтогенезом растений. Поэтому в свете развития органического земледелия они находят широкое применение в биотехнологии сельскохозяйственных растений и в практическом растениеводстве. Предвестники таких препаратов с росторегулирующей и антистрессовой активностью были экстрагированы из культуры соответствующих грибов еще 40 лет назад (Гельцер 1981;1990). В последнее время, в мировой практике отслеживается тенденция снижения доз применяемых минеральных удобрений и возрастает роль биологических препаратов и их интегрированного использования с агротехническими приемами направленными на поддержание естественного плодородия почв, включая научно обоснованные севообороты и мероприятия направленные на повышение биоразнообразия полезной почвен-