

Штаммы *Pseudomonas fluorescens* 13525, *Pseudomonas putida* 901 и *Pseudomonas putida* 12633 проявили схожие признаки: формирование на среде Кинг В флюоресцирующей жёлто-зелёной пигментации, выявляемой при облучении ультрафиолетовой лампой, способность к росту при температуре 4°C и отсутствие роста при 41°C. Отличие *Pseudomonas putida* от *Pseudomonas fluorescens* заключается лишь в реакции на желатиназу. Для бактерии *Pseudomonas fluorescens* характерна положительная реакция на желатиназу, а для *Pseudomonas putida* – отрицательная.

Результаты тестов, характерные для бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдаются у штамма №39 и 50;

Pseudomonas fluorescens – штаммы № 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 23, 29, 32, 33, 35, 36, 47, 48, 49, 53, 58, 59, 60, 63, 64;

Pseudomonas putida – штаммы № 5, 10, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 34, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 65;

Так же, выявлены штаммы, результаты тестов которых не соответствуют ни одному из шести исследованных референс-штаммов: № 19, 26, 44. Очевидно, что данные штаммы относятся к бактериям других видов рода *Pseudomonas*, реже встречающихся в окружающей среде.

Вывод: В результате исследований из 70 образцов воды и почвы, подвергнутых длительному воздействию загрязнения нефтепродуктами, нами было выделено 2 штамма *Pseudomonas aeruginosa*, 27 штаммов *Pseudomonas fluorescens* и 33 штамма *Pseudomonas putida*. Выделенные культуры бактерий рода *Pseudomonas* перспективно использовать для конструирования на их основе биопрепарата для микробиологической нефтедеструкции.

Список литературы:

1. Берджи. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т.Т.1: Пер. с англ./Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 432с.: ил.
2. Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Разработка системы тестов для выделения и идентификации *Pseudomonas putida*. **Материалы международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения»**, Ульяновск., ГСХА, 2009, т. 4.
3. Киреева Н. А. Биодеструкция нефти в почве культурами углеводородокисляющих микроорганизмов // Биотехнология. - 1996. - № 1. - 51-54.
4. Коритаев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед.вузов. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591 с.: ил.
5. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. - М.: Наука, 1986.
6. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*.- Киев. Наукова думка, 1990. - С. 176-187.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ (ПК) К ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА АЧС МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

И.Х. Газзев, аспирант, А.А. Елсукова, младший научный сотрудник, А.С. Малоголовкин, кандидат биологических наук, С.Ж. Цыбанов доктор биологических наук, профессор

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» РАСХН, Тел./факс: (49243) 6-21-25;

6-10-56 VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Ключевые слова: Африканская чума свиней, ПЦР в реальном времени, положительный кон-

троль

Статья посвящена разработке рекомбинантного положительного контроля к тест-системе для обнаружения ДНК вирус АЧС в реальном времени.

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозная, склонная к природной очаговости, как правило, остро протекающая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. (3)

Анализ эпизоотической ситуации по АЧС показывает, что распространение болезни происходит двумя путями:

- заносом возбудителя на ранее благополучные территории инфицированными вирусом АЧС кабанами;
- при несанкционированных перевозках продукции свиноводства и живых свиней из неблагополучных по этой болезни территорий.

Возможен занос вируса с инфицированными кормами, транспортом, обслуживающим персоналом, предметами ухода, а так же необеззараженными продуктами убоя больных свиней. [1.2]

Ввиду отсутствия специфических средств профилактики и лечения, единственным способом борьбы с болезнью является своевременная диагностика болезни и принятие мер по ее ликвидации. В настоящее время для диагностики АЧС широко применяются ПЦР и РПИФ. Для выявления генома вируса в костном мозге свиней, а так же в объектах ветеринарного надзора основным методом является ПЦР.

Разработка тест-системы для выявления генома вируса АЧС в формате реального времени была обусловлена необходимостью повышения чувствительности, сокращения времени анализа и трудозатрат.

Целью нашей работы являлась разработка положительного контроля (ПКО) к тест - системе для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы.

Постановку ПЦР в режиме реального времени, на основе гибридационно-флуоресцентной детекции, для обнаружения ДНК вируса АЧС проводили на приборе «Rotor Gene 6000» фирмы (Corbette Research, Австралия), с использованием тест-системы для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

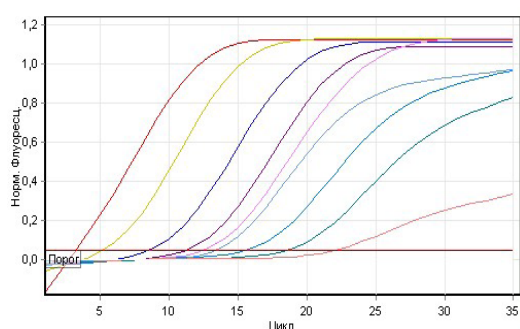
Для клонирования использовали вектор PTZ 57 R/T.

Результаты и обсуждения.

Предварительно был накоплен ПЦР - продукт участка гена, кодирующего белок Vp72 вируса АЧС размером 262 пар нуклеотидов. Лигирование проводили по Поли-т-концам в области Multi cloning site (MCS) плазмиды PTZ 57 R/T.

В качестве матрицы использовали полученную рекомбинантную плазмиду со вставкой специфической последовательности для праймеров ASF и ASR. Фланкируемый праймерами участок содержал мишень для гибридационного зонда ASZ, меченного флуоресцентным красителем FAM.

Рис.1. Подбор оптимальной концентрации рекомбинантного ПК ПЦР



Подбор оптимальной концентрации плазмиды в качестве матрицы для постановки ПЦР в реальном времени, и определение чувствительности реакции проводили, с использованием серии десятикратных разведений. Предельное разведение плазмиды, при котором в ПЦР-РВ регистрировали положительный сигнал, содержало 19 копий плазмиды/мкл ($1:10^{-8}$). На основании полученных данных подобрана оптимальная концентрация плазмиды в качестве матрицы для постановки ПЦР в реальном времени, что составляла 9500 копий на реакцию ($1:10^{-6}$).

Выводы.

В ходе исследований была оценена аналитическая чувствительность тест - системы а так же специфичность праймеров и флуоресцентного зонда, входящих в диагностический набор, с нуклеотидными последовательностями сконструированного рекомбинантного ПК ПЦР-РВ. В настоящее время полученная конструкция успешно применяется в качестве ПК ПЦР в тест-системе для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени разработанной в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Преимуществом разработанного ПК, является высокая устойчивость при хранении и многократном замораживании и оттаивании, а так же безопасное приготовление, т.к. исключена работа с вирусным агентом.

Библиографический список:

- 1.«Катастрофа для свиноводческой отрасли» // Ветеринария сельскохозяйственных животных, 2009.г. №3 с.9-12.
2. Козлова Д.И., Бесхлебнов В.А. Современные проблемы африканской чумы свиней. – М.: ВНИИТЭИСХ, 1980.- 60 с.
3. Zsak L., Borca M.V. // JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2005, p. 112–119

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS SALMONICIDA* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ.

Горшков И.Г., Гринева Т.А., Горшкова Н.Г., - соискатели кафедры МВЭиВСЭ УГСХА
 Канаева Т.И. к б н, ст преподаватель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Бактерии вида *Aeromonas salmonicida* – широко распространены в окружающей среде, особенно в водном ареале. Они относятся к группе болезнетворных микроорганизмов, вызывающих заболевания рыбы.

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* – граммотрицательная неподвижная, факультативно - анаэробная палочка (Griffin и др. 1953). Размер 1.7 нм – 1.0 нм. Оптимум роста 20-22 С, оптимальная рН среды от 5.3 до 9.0.

Основные биологические свойства приводятся в таблице 1. Они включают положительную реакцию на оксидазу и каталазу, разжижает желатин, восстанавливает нитраты, продуцируют ДНКазу. Чувствителен к цефалотину и/или ампициллину.

Табл. 1. Дифференциация неподвижных видов рода *AEROMONAS* по биохимическим признакам

Тест	A. media	A. salmonicida			
		achromogenes	masoucida	salmonicida	smithia
Индол	В	+	+	-	-
Проба с метиловым красным	+	+	+	+	-
Реакция Фогеса-Проскауэ	-	-	+	-	-
Использование цитрата (среда Симмонса)	В	-	-	-	-
Образование H ₂ S	-	-	+	-	+
Гидролиз мочевины	-	-	-	-	-
Фенилаланиндезаминаза	В	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	В	В	В	-
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	(-)
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-
Гидролиз желатина	+	+	+	+	+
Рост в присутствии KCN	+	-	-	-	-