

ниже на 13,3%, а через 12 мес. – на 30,0%. Многоплодие снизилось на 1,4 и 2,3 поросенка соответственно через 6 и 12 мес. хранения среды без использования сухих компонентов.

При использовании сухих заготовок сред, приготовленных из компонентов, высушенных путем сублимации, показатели через 6 месяцев хранения сред были аналогичными при использовании сред без хранения, а через 12 месяцев они снизились незначительно (оплодотворяемость была ниже на 5,8%, а многоплодие – на 0,1 поросенка).

Заключение.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что степень влажности компонентов среды для разбавления спермы хряков играет важную роль в сухих заготовках сред, хранящихся длительное время. Установлено, что в заготовках сред происходят окислительные процессы, что сказывается на качестве сред.

При разбавлении средами с высокой влажностью компонентов снижаются качественные показатели спермы и оплодотворяемость свиноматок, особенно через 12 мес. хранения заготовок сред.

Поэтому рекомендуем для приготовления сухих заготовок использовать компоненты сред, высушенные при помощи лиофильной сушки.

Библиографический список

1. Савин, О.К. Влияние технологических и биологических факторов на результативность осеменения свиней охлажденной спермой. Автореферат диссерт. канд. биол. наук. – 1999. – 21с.
2. Методические рекомендации по использованию и хранению синтетических сред для спермы хряков. Москва. – 2002. – 22с.
3. Среда для разбавления и хранения спермы хряков. Патент РФ №2062068. – 1991.
4. Среда глюкозо-хелатно-цитратно-сульфатная для хранения спермы хряков. ГОСТ 17637-72. Инструкция по использованию.
5. Вишневский Е.П. Влияние влажности воздуха на свойства материалов / Е.П. Вишневский, Г.В. Чепурин // Журнал С.О.К. № 3-4. - 2010.
6. Сажин Б.С. Основы техники сушки. М.- 1984.

УДК 619:578.832.1

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФАГОДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЁЗА

Васильева Юлия Борисовна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, б.Новый Венец, 1, e-mail: vet_yulia@mail.ru

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012).

Ключевые слова: идентификация, диагностика, *Bordetella bronchiseptica*, бордетеллез, бактериофаги

В статье изложены результаты исследований по разработке метода идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью выделенных и изученных бактериофагов

Введение

Отечественными и зарубежными исследовательскими коллективами выделены и описаны бактериофаги бактерий *B. bronchiseptica* - 214, BPP-1, BMP-1 и BIP-1; *B. pertussis* - фТ, фК, 134, 41405; *B. parapertussis* 66₂₋₂; *B. avium* B1 и B2 [1, 2, 3].

Остаются открытыми вопросы изучения взаимодействия фаг – бактерия – макроорганизм. Возможно, бактериофаги участвуют в формировании вирулентных бактерий [3].

Анализ литературных источников показал отсутствие данных по применению методов фагодиагностики бордетеллёза домашних животных.

Выделение и исследование бордетеллёзных бактериофагов перспективно для изучения механизмов изменчивости и эволюционной адаптации бактерий, а также для разработки методов индикации и идентификации возбудителя.

Целью нашей исследовательской работы явилась разработка методических приёмов фагодиагностики бордетеллёза.

Материалы и методы

Работа была выполнена в научно-исследовательском инновационном центре микробиологии и биотехнологии (НИИЦ-МиБ) «Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина». Для опыта из коллекции музея НИИЦМиБ были взяты 5 референс-штаммов *Bordetella bronchiseptica* (№ 1, 7, 214, 22067, 8344), 24 штамма близкородственных культур и 8 штаммов выделенных фагов.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения, идентификации и индикации бактерий и фагов и соответствующие им среды, оборудование и реагенты [4-9].

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований мы вели поиск эффективного метода выделения фагов. Исследование штаммов *B. bronchiseptica* на выявление профага без воздействия на них индуцирующего фактора, выделение фагов из объектов внешней среды и от животных не дало положительных результатов.

Мы апробировали способ выделения

профагов при помощи индуцирующего фактора – ультрафиолетового излучения. Опыты по облучению бактерий УФЛ проводили с изменением параметров экспозиции в минутах и расстояния до объекта в см.

В результате исследований по выделению профага из бактериальных клеток наиболее эффективной показала себя следующая схема:

1 день: посев газонем суточной культуры *B. bronchiseptica* на мясопептонный агар, подсушивание в термостате 10-15 мин, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 5-7 мин. Далее проводили инкубирование чашек Петри с обработанными бактериями в термостате при 37°C в течение суток.

2 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°C) на сутки.

3 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 0,5 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°C) на сутки.

4 день: смыв выросших колоний мясопептонным бульоном с чашек Петри, помещение в пробирку со штаммами бордетелл. Культивирование в термостате в течение суток.

5 день: обработка хлороформом – 1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата в течение 15 минут, центрифугирование при 3000 об/мин – 15 мин. Снятие надосадочной жидкости в стерильную пробирку.

Полученную суспензию мы исследовали методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры [10]. Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,3 мл 18-часовой культуры. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. Для подсушивания ставили в термостат на 20 минут. На дне чашек Петри карандашом отмечали одинаковые секторы (по 2 сектора на каждой чашке Петри). На

поверхность подсушенной среды наносили капли исследуемых бактериофагов и наклоняли чашки Петри, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ.

6 день: учет результатов. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса.

После выделения бактериофаги пасеровали для повышения их литической активности. В процессе работы нами было выделено 8 фагов *V.bronchiseptica*.

Далее мы изучили биологические свойства выделенных бактериофагов.

Для определения морфологии негативных колоний мы высевали фаг в разведении 10^{-8} – 10^{-9} на чашки Петри методом агаровых слоев для того, чтобы в используемом

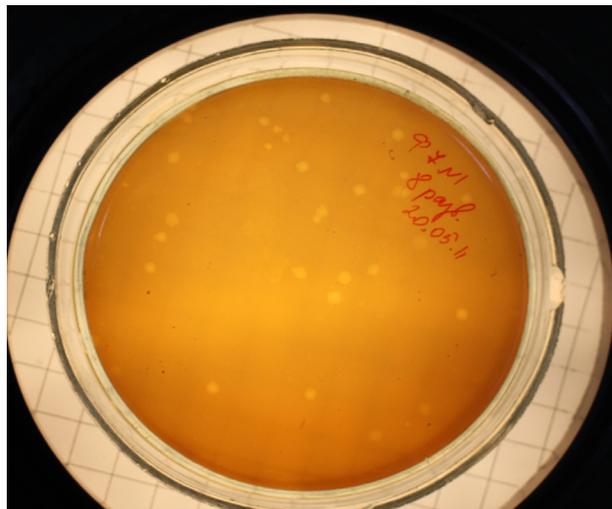


Рис.1 – Морфология негативных колоний фага V.br.–7 УГСХА (тип 1)



Рис. 2 - Морфология негативных колоний фага V.br.–1 УГСХА (тип 2)

разведении содержание фаговых корпускул в 1 мл не превышало 10–15. Для формирования газона роста культуры на поверхности агара использовали индикаторный штамм *V.bronchiseptica* № 8344. Посевы культивировали в термостате при температуре 37°C. Изучение морфологии негативных колоний проводили через 24 ч культивирования (рис. 1, 2).

Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и величине колоний разделили на два типа. К первому типу отнесли круглые прозрачные негативные колонии диаметром более 3 мм с зоной неполного лизиса по периферии, шириной 0,5 – 4 мм или без неё: V.br. – 7 УГСХА, V.br. – 22067 УГСХА, V.br. – 214 УГСХА.

Колонии второго типа были круглые прозрачные или полупрозрачные с ровными краями диаметром до 2 мм, к ним отнесены бактериофаги V.br. – 1 УГСХА, V.br. – 10 УГСХА, V.br. – 11 УГСХА, V.br. – 13 УГСХА и V.br. – 8344 УГСХА.

Проведённая селекция выделенных фагов позволила отобрать бактериофаги V.br.–1 УГСХА и V.br.–7 УГСХА, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой литической активностью по Аппельману 10^{-7} – 10^{-8} , по Грациа $3,1 \times 10^8$ – $4,3 \times 10^9$ активных корпускул в 1 мл. Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к *V.Bronchiseptica*; проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в течение 30 минут и выдерживали 30 минутное нагревание при 60°C.

Используя строгую специфичность отобранных бактериофагов, мы разработали схему ускоренной идентификации *V.Bronchiseptica*.

На поверхность МПА пипеткой нанесли 3-4 капли бульонной 18-часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки Петри ставили в термостат для подсушивания на 15 - 20 минут. Чашку Петри делили на три сектора и на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой лёгким прикосновением капли на два сектора

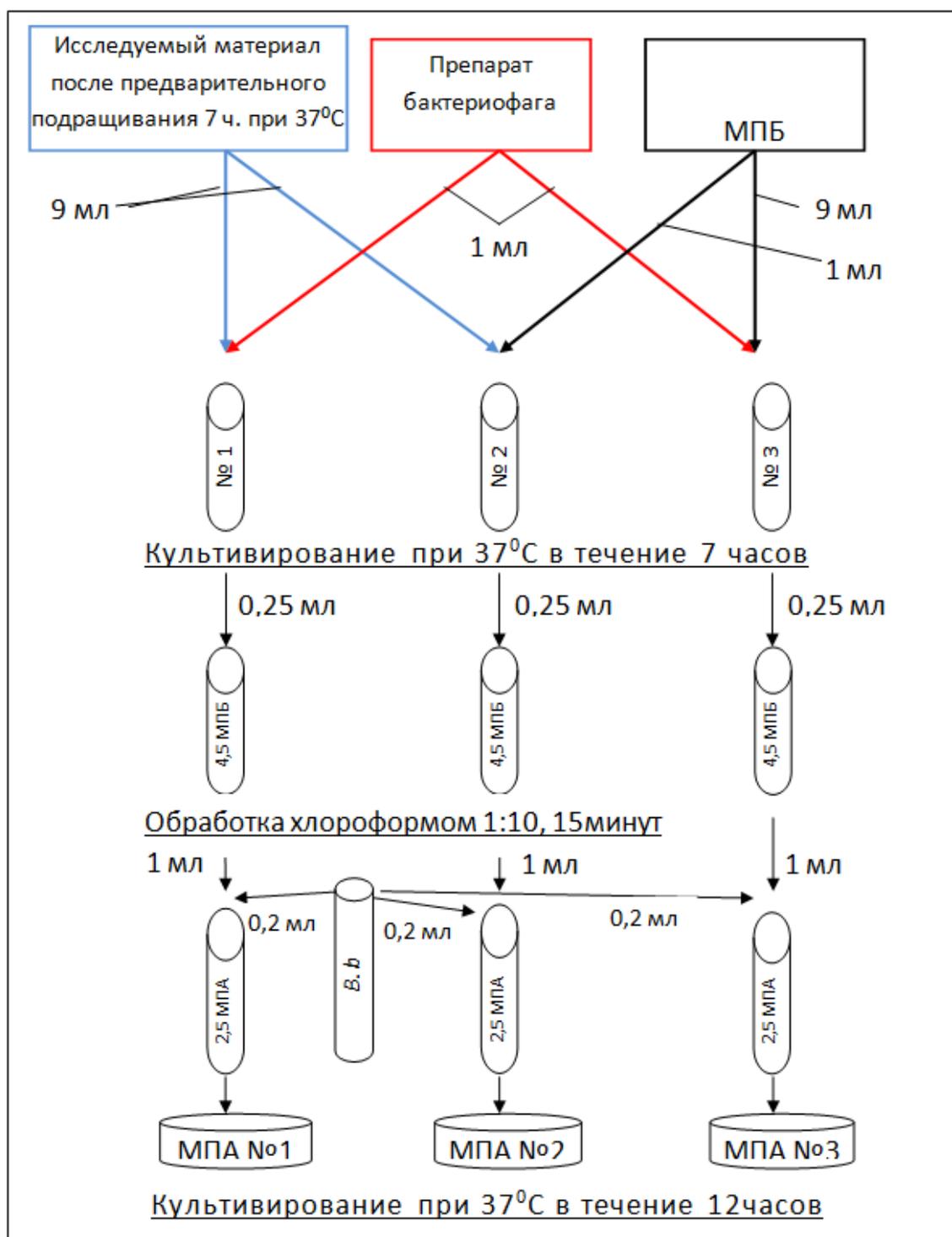


Рис. 3 – Схема постановки реакции нарастания титра фага

Примечание: Реакция считается положительной, если количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри № 1 превышает количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри № 3 в 5 и более раз.

наносили по штамму фагов V.br.–1 УГСХА и V.br.–7 УГСХА, на третий сектор в качестве контроля наносили стерильный МПБ, наклоняли чашку Петри, чтобы капли стекли. Чашки Петри после подсушивания в боксе в

течение 15-20 минут культивировали в термостате при 37°C 18 ч.

Наличие зоны лизиса на сплошном газоне культуры хотя бы одного из фагов указывало на принадлежность исследуемого

штамма к бактериям *V.bronchiseptica*.

Результаты проведенных опытов показали возможность идентификации *V.bronchiseptica* с помощью фагов V.br. – 1 УГСХА и V.br. – 7 УГСХА. Длительность исследования составляет 66 ч.

Далее были разработаны оптимальные технологические параметры для изготовления биопрепарата, включающего сочетание фагов V.br.–1 УГСХА и V.br.–7 УГСХА: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *V.bronchiseptica* составляет 1:2, время инкубации при температуре 37°C - 7 ч. Для инактивации жизнеспособных бактерий в фаголизате проводится обработка хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут.

Далее мы апробировали методику индикации и идентификации *V.bronchiseptica* реакцией нарастания титра фага (РНФ). Для выявления оптимальных условий РНФ мы определили количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, установили режимы постановки РНФ (оптимальное время, обеспечивающее наиболее полное взаимодействие корпускул фага с бактериями).

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подращиванием материала в течение 7 ч является более чувствительной и составляет 10^3 м.к./мл по сравнению с РНФ без подращивания - 10^4 м.к./мл.

Таким образом, наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с предварительным подращиванием в течение 7 ч, а также 7 ч контакта исследуемого материала с фагом. РНФ позволяет обнаружить *V.bronchiseptica* в количестве 10^3 м.к./мл за 26 ч.

РНФ результативно апробировали при индикации *V.bronchiseptica* в объектах внешней среды, а также из проб биоматериала клинических образцов от животных (рис.3).

В результате проведенных исследований предложен диагностический биопрепарат «V.br.–11 УГСХА», изготовленный на основе бордетеллезных фагов V.br.–1 УГСХА

и V.br.–7 УГСХА для индикации и идентификации *V.bronchiseptica* в объектах внешней среды и от предположительно инфицированных животных.

Выводы

Фагоидентификация *V.bronchiseptica* с помощью индикаторных бактериофагов V.br.–1 УГСХА и V.br.–7 УГСХА занимает 66 часов. Методика фагодиагностики бордетеллёза является высоко специфичной и экономичной.

Реакция нарастания титра фага по технике выполнения является простым и удобным, чувствительным и специфическим методом диагностики, позволяющим в течение 26 ч обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней нософарингиальной микрофлоры.

Библиографический список

1. Лапаева, И.А. Бактериофаг *Bordetella pertussis* / И.А. Лапаева [и др.] // Микробиология - 1980. - Т. 5. - С. 85-90.
2. Лапаева, И.А. Конверсия токсигенности коклюшными фагами у *Bordetella parapertussis* / И.А. Лапаева [и др.] // Микробиология -1982. -Т. 9. - С. 60-64.
3. Liu, M. Reverse Transcriptase-Mediated Tropism Switching in *Bordetella* Bacteriophage / M. Liu [et al.] // Science. - 2002. - V. 295. - P. 2091- 2094.
4. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
5. Васильев, Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. - Ульяновск, 1998. – 151 с.
6. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
7. Золотухин, С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.
8. Лабинская, А.С. Микробиология с техников микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. – 394с.

9. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // М., 1962. – С. 65-71.

10. Ганюшкин, В.Я. Реакция нараста-

ния титра фага при диагностике паратифа поросят / В.Я. Ганюшкин // Ветеринария. – 1967. – №3. – С. 69-71.

УДК 619:614.48:616.98:579.873.21

ТАБЛЕТИРОВАННЫЕ ХЛОРСОДЕРЖАЩИЕ ДЕЗИНФЕКТАНТЫ ДЛЯ БОРЬБЫ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Палий Анатолий Павлович, кандидат ветеринарных наук

Завгородний Андрей Иванович, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент НААН Украины

Тарасова Елена Владимировна, ассистент кафедры «Инфекционная и инвазионная патология»

ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА им. В.Я. Горина»

308503, Белгородская обл., Белгородский р-н, п. Майский, ул. Вавилова,

elena.tarasova.82@bk.ru, тел. 8(951) - 768 – 14 - 361

Ключевые слова: дезинфектант, концентрация, экспозиция, микобактерии.

Научными исследованиями установлено, что для проведения профилактических и оздоровительных мероприятий при туберкулезе сельскохозяйственных животных целесообразно применять новые таблетированные хлорсодержащие дезинфицирующие препараты «Жавель-Клейд» и «Клорсепт-фарм». Установлено, что препарата «Жавель-Клейд» уничтожает микобактерии при применении в концентрации 0,1 % по действующему веществу при экспозиции 30 минут, а дезсредство «Клорсепт-фарм» – в концентрации 0,5 % по действующему веществу при экспозиции 5 часов.

Введение. Ежегодное выявление в благополучных областях Российской Федерации животных с характерными для туберкулеза изменениями показывает, что истинная эпизоотическая ситуация несколько хуже, чем официально зарегистрированная, а выявление больных животных на фоне продолжающегося сокращения общего поголовья крупного рогатого скота предполагает ухудшение эпизоотической ситуации в будущем [1].

Ветеринарно-санитарные мероприятия, их эффективность и экологичность являются одними из главных условий ведения животноводства, которые влияют на получение и сохранность здорового поголовья, получения животноводческой продукции высокого качества [2].

Ассортимент антимикробных веществ,

пригодных для дезинфекции, ограничен рядом предъявляемых к ним требований. Наиболее важным показателем химических дезинфектантов, определяющих целесообразность их применения, является экологическая безопасность [3, 4].

Ассортимент препаратов, используемый для проведения дезинфекции на объектах различного назначения, достаточно велик и постоянно обновляется новыми препаратами. Особое место среди дезинфицирующих препаратов занимают средства, содержащие в качестве действующего вещества соединения хлора [5]. Сейчас ведется достаточно жесткая полемика по вопросам содержания в основе дезинфектантов хлорного начала. При этом акцент делается на относительно высокую токсичность и агрессивность хлора по отношению