

Таблица 3 — Результаты амплификации разведений вируса

№ п/п	Наименование образца	Пороговый цикл, (Ct)	Начальное количество, копий/ образец
1	развед. вируса 7 Lg	21,52	1,102E+06
2	развед. вируса 6 Lg	25,39	7,737E+04
3	развед. вируса 5 Lg	29,93	2,807E+03
4	развед. вируса 4 Lg	34,48	1,489E+02
5	развед. вируса 3 Lg	38,58	8,826E+00
6	развед. вируса 2 Lg	39,78	2,226E+00
7	развед. вируса 1 Lg	-	0,000E+00
8	Положит. контроль	31,98	1,000E+03
9	Положит. контроль	28,07	1,000E+04
10	Положит. контроль	24,78	1,000E+05
11	Положит. контроль	21,92	1,000E+06

Из таблицы видно, что чувствительность данного метода позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

Заключение. В настоящее время интенсивное ведение животноводства требует более быстрых и совершенных методов не только диагностики заболеваний, но и контроля биопрепаратов. Получившие в последнее время развитие и совершенствование методики полимеразной цепной реакции позволяют более быстро справляться с задачами, решаемыми традиционными методами. Кроме того, точность и чувствительность ПЦР превосходят традиционные методы. Определяя прямое наличие возбудителя в пробах, снижаем вероятность получения ложноотрицательных результатов по сравнению с изучением результатов жизнедеятельности микроорганизмов.

Разработанная методика позволяет быстро определять не только наличие вируса ИРТ, но и его первоначальное количество в пробе. Благодаря использованию зонда МВ, построенного по технологии «molecular beacon», данный метод является высокоспецифичным. Это связано с тем, что флуоресценция регистрируется только когда зонд связывается с комплементарным участком ДНК, в противном случае результат будет отрицательным. Чувствительность данной методики позволяет определить в образце наличие вируса с концентрацией 2 lg, что соответствует 2 копиям ДНК.

Литература. 1. Глотов А.Г. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, А.Ф. Шуляк, Т.И. Глотова и др. // РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ИЗВСиДВ. – Новосибирск, 2006. – 196 с. 2. Говорун В.М. Новые направления в ДНК-диагностике / В.М. Говорун // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний: Материалы 2-й Всероссийской науч.-практ. конф. (Москва, 20-22 января 1998г.). – Москва, 1998. – С. 12-13. 3. Гусева Е.В. Применение ПЦР в диагностике инфекционных болезней сельскохозяйственных животных / Е.В. Гусева, Т.А. Сатина, Т.А. Фомина // Науч. основы технологии пром. производства вет. биол. препаратов. Тез. докл. 5-й Всероссийской конф. (Щелково, 14-17 мая). – Щелково, 1996. – С. 38 – 40. 4. Инфекционная патология животных: в 2 т/Под ред. А.Я. Самуйленко, Е.В. Соловьева, Е.А. Непоклюнова, Г.С. Воронина – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т.1 – 2006. – 911 с. 5. Belak S. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology / S. Belak, A. Ballagi-Pordany // Vet. Res. Commun. - 1993. - Vol. 17. - P. 55-72. 6. Bitsch V. Persistence of infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in Danish cattle herds / V. Bitsch // Nord. Veter. Med. – 1978. – Vol. 30, № 4 - 5. - P. 178 – 185. 7. Chen W. Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting Salmonella / W. Chen, G. Martinez, A. Mulchandani // Analytical Biochemistry - Vol.280, P. 166–172. 8. Engels M. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis / M. Engels, F. Steck, R. Wyler // Arch. Virol. – 1981. – Vol. 67, №2. P. – 169 – 174. 9. Gupta P.K. Cloning and expression of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein C / P.K. Gupta, M. Saini, L.K. Gupta et al. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1999. – Vol.47 (№2). – P. 275-282. 10. Roizman B. Family Herpesviridae. / B. Roizman, R.S. Desrosier, B. Fleckenstein / In: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A. and Summers M.d. (Editors), Virus Taxonomy, 6th Rep. Of the Int. Committee on Taxonomy of viruses. Arch. Virol., Suppl. 10, Springer-Verlag, Wien, New-York, 1995. - P. 114 - 127. 11. Vet J. Design and Optimization of Molecular Beacon Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays / J. Vet. S. Marras // Methods in Molecular Biology, 2004. – Vol.288, P. 273-290.

УДК 619:579

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ

Медведев А.П., Билецкий О.Р., Грибанова М.В., Кошнерова Л.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Предложена среда обогащения для изоляции сальмонелл из водной среды, которая проста в изготовлении и эффективнее традиционных сред, применяемых для этой цели.

A cultivation medium for salmonella isolation from aquatic environment which is more simple for preparation and more effective in relation to analogues.

Введение. Без микроскопической техники и питательных сред для культивирования микроорганизмов существование и развитие микробиологии как науки представить невозможно. Питательные среды нужны для изучения биологических свойств микробов, выделения чистой культуры бактерий и ее идентификации, постановки лабораторного диагноза, хранения и поддержания ценных производственных и музейных штаммов санитарно-биологической оценки воды, продуктов питания для людей, кормов для животных и других целей.

Известно, что факторами передачи возбудителей инфекционных болезней от больных животных к здоровым являются почва, навоз, корма, предметы ухода, вода и т.д. Типичные для элементарных инфекций – кормовой и водный пути передачи возбудителей, при которых животные заражаются при приеме корма или воды. В воду и другие объекты внешней среды патогенные микроорганизмы попадают с экскрементами от больных животных и людей.

Санитарно-бактериологическое исследование воды проводят с целью определения общего количества бактерий в 1 см^3 и титра кишечной палочки. Санитарно-показательными микроорганизмами являются представители нормальной микрофлоры животных и человека. Обнаружение этих микробов в воде свидетельствует о ее контаминации выделениями животных и человека. Поэтому для установления степени фекального загрязнения воды определяют коли-титр или коли-индекс. Под коли-титром понимают наименьший объем воды (в см^3), в котором обнаружена кишечная палочка, а под коли-индексом – количество кишечных палочек, обнаруженных в 1 литре воды. Определение коли – титра (индекса) – это косвенный метод установления степени вероятности наличия в воде патогенных микробов.

В ветеринарной практике для определения микробного числа воды используют обычный мясо – пептонный агар (МПА), среду Эйкмана, среду Эндо, розоловый дифференциальный агар (РДА), висмутсульфитный агар.

В практике здравоохранения в качестве первичной среды накопления микроорганизмов используют такие питательные среды, как бульон Мюллера, бульон Лейфсона, магниевую среду и другие.

Для приготовления среды Эндо к расплавленному и охлажденному МПА добавляют 1% лактозы, 0,5% насыщенного спиртового раствора фуксина, обесцвеченного 10%-ным раствором сульфата натрия, который прибавляют каплями до момента обесцвечивания, затем кипятят 5 минут и разливают в стерильные чашки Петри и после застывания среды используют ее для работы.

Розоловый дифференциальный агар представляет собой плотную питательную среду на основе МПА с добавлением 5% желчи, 1% лактозы, 0,1% глюкозы и индикатора – розоловой кислоты.

По нашему мнению, эти среды ввиду относительно невысокой чувствительности не всегда позволяют выделить бактерии, относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, особенно из открытых водоемов. Дело в том, что в условиях интенсивной антропогенной нагрузки на водоемы изменяются многие микробиологические процессы в воде и соотношение обитающих в ней микроорганизмов различных видов. Патогенные микробы в окружающей среде и, в частности, в воде находятся непостоянно. Сравнительно легко их можно выделить на стадии максимального развития эпидемий и эпизоотий, но довольно трудно – в межэпизоотические периоды. Количество патогенных микробов в окружающей среде значительно меньше, чем непатогенных. К тому же они в загрязненных объектах распределены неравномерно, что создает определенные трудности при обнаружении патогенов. Трудности возникают и при посевах проб из объектов окружающей среды, так как во многих случаях не удается получить положительные результаты. Получаемые отрицательные результаты, однако, еще не служат достоверным доказательством отсутствия патогенных микроорганизмов в исследуемых объектах окружающей среды.

Среди многочисленных возбудителей, вызывающих инфекционную патологию желудочно-кишечного тракта у животных с водным путем передачи бактерий, являются сальмонеллы. Признанным в практике методом изоляции сальмонелл из воды считают бактериологическое исследование ее. В то же время методы обнаружения микроорганизмов в почве, пищевых продуктах, испражнениях нельзя механически применять и абсолютизировать при изоляции патогенных бактерий из воды.

В воде на сальмонеллы оказывают действие многочисленные физико-химические факторы, под влиянием которых они переходят в состояние так называемых некультивируемых форм, сохраняя при этом свои вирулентные свойства. Необходимо учитывать, что при использовании традиционных питательных сред, указанных выше, входящие в их состав ингибиторы роста для некоторых бактерий угнетают рост и некоторых сальмонелл (*S. anatum*, *S. enteritidis*, *S. pullorum* и др.).

Исходя из вышеотмеченного, целью нашей работы явилось создание эффективной и легковоспроизводимой в условиях лаборатории питательной среды для выделения сальмонелл из воды, позволяющей повысить надежность, достоверность и эффективность бактериологического исследования объектов водной среды.

Материалы и методы. В опытной работе использовали для приготовления питательных сред многие химические вещества: лактозу, основной фуксин, глюкозу, цитрат висмута, сульфат натрия, фосфат натрия, бриллиантовый зеленый и другие.

В качестве накопительной среды для сальмонелл применяли среду Мюллера. Для ее приготовления в стерильные флаконы отвешивали по 4,5 г мела и стерилизовали сухим жаром, затем наливали 90 см^3 бульона и стерилизовали 30 минут при 1 атм. К каждому флакону в асептических условиях добавляли 2 см^3 раствора Люголя и 10 см^3 гипосульфита натрия. Вместо этой среды чаще использовали обычный мясопептонный бульон (МПБ), который стерилизовали автоклавированием и добавляли непосредственно перед употреблением 1 см^3 0,1% водного раствора бриллиантовой зелени. Лучшей средой для накопления патогенных энтеробактерий, особенно сальмонелл, является селенитовая среда. Селенит натрия стимулирует рост патогенных бактерий и подавляет рост сопутствующей микрофлоры. Для приготовления среды брали однозамещенный кислый селенит натрия – 0,4%, пептона – 0,5%, фосфата натрия двузамещенного – 0,7%, фосфата натрия однозамещенного –

0,3%, лактозы химически чистой – 0,4% и дистиллированной воды – до 100%.

Среду Эндо чаще всего готовили не из отдельно взятых ингредиентов, а использовали сухой агар, имеющийся в продаже. Для приготовления среды 5 г порошка кипятили в 100 см³ дистиллированной воды 5 минут, разливали в стерильные чашки Петри и после охлаждения использовали в работе.

В качестве плотной питательной среды для сальмонелл применяли висмутсульфитный агар. В его состав входят: гидролизат рыбы, агар-агар, глюкоза, цитрат висмута, сульфит натрия, бриллиантовый зеленый, pH среды 7,6 - 7,8, на поверхности этой среды растут колонии сальмонелл черного цвета.

В исследованиях использовали речную, озерную и водопроводную воду. Из открытых водоемов пробы воды брали с помощью стерильной бутылки с притертой пробкой с глубины 10-15 см от поверхности и на 10-15 см выше дна. Водопроводную воду брали из крана, который предварительно обжигали, открывали на 10 минут и набирали 0,5 л воды в стерильный сосуд. Хлорированную воду перед исследованием нейтрализовали дехлоратором (гипосульфит натрия 10мг на 500 см³ воды).

Из проб воды готовили десятикратные разведения ее. Для этого брали ряд пробирок, содержащих по 9 см³ стерильного физраствора. В первую пробирку вносили 1 см³ исследуемой воды (разведение 1:10). После тщательного перемешивания стерильной пипеткой из первой пробирки 1 см³ содержимого переносили во вторую пробирку (разведение 1:100) и т.д. Таким образом получали последовательные двукратные разведения исследуемой воды. Количество разведений зависело от предполагаемой загрязненности воды.

Для определения микробного числа мы использовали метод поверхностного посева, для чего 0,1 см³ каждого разведения воды вносили стерильной пипеткой на плотную питательную среду и шпателем распределяли по всей ее поверхности. Для выявления роста дрожжей и грибов делали высевы каждой пробы воды на несколько чашек с МПА и сусло-агаром.

В качестве среды сравнения использовали селенитовую среду с последующим пересевом бактерий на висмутсульфитный агар. Для выявления ингибирующих свойств применяли среду Эндо.

В работе, с целью сравнения активности накопительных сред (чувствительность, эффективность, скорость роста микробов и т.д.) применяли тест-штаммы *S. typhi*, *S. typhiniurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*, *S. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Результаты исследований. В многочисленных предварительных экспериментах нами была разработана среда обогащения, содержащая в своем составе: кормовых дрожжей (5 г/л), калия фосфорнокислого однозамещенного (8,6 г/л), едкого натра (1,4 г/л), 0,1% раствора бриллиантового зеленого (5 см³ /л), 0,01% раствора кристаллического фиолетового (10 см³ /л), воды дистиллированной (1л). Концентрация водных ионов составляла 6,5-6,6. Эту среду мы решили апробировать для выделения сальмонелл из воды, чтобы рекомендовать ее для практического применения.

Чувствительность среды определяли по наибольшему разведению, обеспечивающему видимый рост бактерий при высеве на плотные питательные среды.

Нижеуказанные показатели определяли по количеству колоний, выросших на висмутсульфитном агаре в результате посева на его поверхность культур бактерий, полученных в опытной и селенитовой средах.

Показатель эффективности опытной среды определяли отношением среднего числа колоний сальмонелл, выросших на поверхности плотной среды, к среднему числу колоний на такой же среде, выросших при посеве культур с селенитовой среды.

Показатель ингибиции роста бактерий определяли отношением среднего числа колоний тест - культур, появившихся на поверхности плотной среды, к среднему числу колоний, выросших на плотной среде при посеве на ее поверхность культур со среды сравнения.

В результате проведенной работы было установлено, что опытная среда является более чувствительной, чем селенитовая. Так, рост бактерий тест – штаммов на ней зафиксировали вплоть до разведения 10⁻⁸ (за исключением *S. typhi* и *S. enteritidis*, рост которых зарегистрирован в разведении 10⁻⁶ и 10⁻⁷ соответственно). На селенитовой среде бактерии тест-штаммов *S. typhiniurium*, *S. anatum*, *S. faecalis* давали видимый рост в форме колоний вплоть до разведения 10⁻⁵. Селенитовая среда подавляла рост *E. coli* и *K. pneumoniae*, но не задерживала *S. faecalis*. Опытная среда не обладала ингибирующим действием по отношению ко всем тест-штаммам бактерий, за исключением *S. faecalis* и *K. pneumoniae*.

Изучение эффективности сравниваемых сред выявило, что накопление тест-штаммов *S. enteritidis* на опытной среде больше в 10⁴ раза, *S. typhi* в 10³, *S. typhiniurium*, *S. anatum* в 10 раз, чем на селенитовой среде.

Среда Мюллера и мясо – пептонный бульон с добавлением 0,1% водного раствора бриллиантовой зелени оказались менее чувствительными и эффективными при выделении сальмонелл из воды. С помощью этих сред и агара Эндо мы определили общее микробное число, коли – титр и коли – индекс водопроводной, озерной и речной воды.

Нами было исследовано с помощью опытной среды 12 проб водопроводной, 15- озерной и 8 проб речной воды. Из водопроводной воды была выведена культура *S. enteritidis*, культура которой оказалась непатогенной при подкожном ее введении в дозе 0,5 см³ белым мышам. Из 2-х проб озерной воды было выделено 2 культуры бактерий, которые при изучении культурально-морфологических и биохимических свойств, а также по результатам серологической типизации были идентифицированы как бактерии *S. typhiniurium*. Из 8-ми проб речной воды изолированы бактерии *S. anatum* (2 пробы) и *S. typhiniurium* (1 проба).

С помощью селенитовой среды из речной воды была выделена лишь одна культура бактерий, при изучении биологических свойств которой она идентифицирована, как *S. typhiniurium*.

Заключение. Проведенная экспериментальная работа позволяет утверждать, что опытная питательная среда для выделения сальмонелл из водопроводной воды и открытых водоемов чувствительнее, чем селенитовая, проста в изготовлении и применении, позволяет более эффективно накапливать сальмонелл из водной среды.

Литература. 1. Солонко А.А., Гласкович А.А., Алешкевич В.Н., Тимофеев Ф.Е., Федосова Н.Х. Практикум по общей микробиологии – Минск, «Ураджай». - 2000- 280с. 2. Сидорчук А.А., Воронин Е.С., Глушаков А.А. Общая эпизоотология. – М., «Колосс». – 2005.-176с. 3. Вербицкий А.А., Медведев А.П. Питательные среды и культивирование микроорганизмов. - Витебск, ВГАВМ. - 2008.-238с.

УДК 619:616.98:579.842.14:615.37.636.2

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ВОЛОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ИХ СКОНСТРУИРОВАННЫМ САЛЬМОНЕЛЛЁЗНЫМ АНТИГЕНОМ

Медведев А.П., Даровских С.В.

УО «Витебская государственная академия «Знак Почета» академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Иммунологические показатели у волов при гипериммунизации их сальмонеллёзным полиантигеном по экспериментальной схеме свидетельствуют о нарастании иммунного ответа организма до пятой инъекции антигена. Последующие инъекции удлиняют срок гипериммунизации, ведут к неоправданным затратам материальных средств и труда.

Immunobiological properties in oxen immunized with Salmonella antigens indicate an increased immunity response in the animals up to the 5 injection. The following injections prolong the immunizations period leading to unreasonable material and labor waste.

Введение. Сальмонеллезы – это группа бактериальных болезней, преимущественно молодняка сельскохозяйственных животных, домашних и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника, а при хроническом – воспалением легких, артритами. У взрослых животных проявляется абортными, а у людей – в виде пищевых токсикоинфекций [1].

Последняя классификация сальмонелл (1997) выделяет два вида: *S. bongori* содержит менее 10 очень редких сероваров и *S. enterica*, который в свою очередь содержит все остальные серовары и подразделяется на 6 подвидов. На сегодняшний день насчитывается более 2500 сероваров сальмонелл, которые разделены по антигенному родству на 67 серологических групп.

Отслеживание эпизоотической ситуации, определение этиологической структуры сальмонеллеза является необходимым условием и основанием для конструирования новых и совершенствования применяющихся специфических препаратов для лечения и профилактики болезни [3,5].

Для пассивной специфической профилактики сальмонеллеза и лечения больных животных применяют сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц, которую получают путём гипериммунизации волов сальмонеллёзным антигеном, состоящим из следующих серовариантов сальмонелл: *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* и *S. abortusovis*.

Известно, что вирусные и микробные антигены вызывают сложную иммунобиологическую перестройку организма животного. Критерием эффективности гипериммунизации, наряду с высоким уровнем специфических антител, следует считать реакцию организма волов, проявляющуюся изменением относительного числа лейкоцитов, иммуноглобулинов М и G, динамики Т- и В-лимфоцитов в крови животных, определению агглютинирующей активности сыворотки [2,4].

Поэтому целью данной работы явилось изучение эффективности применения модифицированной схемы гипериммунизации волов-производителей сконструированным сальмонеллёзным полиантигеном в сравнительном аспекте с производственной схемой гипериммунизации.

Материалы и методы. Проведенные нами исследования по изучению этиологической структуры сальмонеллеза крупного рогатого скота и свиней на территории Республики Беларусь показали, что это заболевание наиболее часто вызывается следующими серовариантами сальмонелл: *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* CB, *Salmonella choleraesuis*.

С учетом этого при конструировании поливалентного антигена для гипериммунизации волов-производителей использовали производственные штаммы сальмонелл *S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373, *S. choleraesuis* 370, *S. enteritidis* CB. Прежде чем использовать штаммы для приготовления антигена, их высевали в мясопептонный бульон, на мясопептонный агар, изучали характер роста сальмонелл на этих средах, чистоту культур, тинкториально-морфологические свойства, антигенную структуру бактерий, используя при этом общепринятые в бактериологической практике методы исследований.

Проверенные культуры, каждую отдельно, засеивали в баллоны, содержащие бульон Хоттингера, и культивировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 часов. Параллельно проводили контроль чистоты роста. Затем полученные культуры сальмонелл смешивали в одной емкости в соотношении 1:1 и добавляли формалин (содержание формальдегида не менее 36,6%), выдерживали в термостате 25 суток при $37\pm 1^\circ\text{C}$ с целью инактивации.

Далее провели сорбцию антигена с помощью 4%-ного раствора гидрооксида алюминия в течение 3-х суток при 20°C . После отстоя готовый антиген концентрировал до 10 млрд. микробных клеток путем декантации надосадочной жидкости. Полученный антиген проверяли на стерильность путем посева на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци и агар Сабуро, а также измеряли pH. Для контроля безвредности антиген вводили подкожно 5 белым мышам массой 16-18 г в дозе $0,5\text{ см}^3$. Проверенный сконструированный полиантиген использовали для гипериммунизации волов.

Для гипериммунизации отбирали только клинически здоровых животных, перед инъекцией антигена производителей выдерживали на голодной диете в течение 20 часов. За всеми животными вели ежедневное наблюдение, контролируя их состояние после каждой инъекции.