

клеток, которую в дальнейшем мы будем использовать при разработке метода иммуноферментного анализа листериоза.

Литература

1. Актуальность проблемы, этиология и эпидемиология листериоза <http://www.infekcii.net/aktualnost-problemy-etiologya-i-epidemiologiya-listerioza/#more-3552>.
2. Бакулов И.А Котляров В.М. Васильев Д.А. Белоусов В.Е. О серологической диагностике листериоза // Ветеринария, 1988, №10. - С-64-65.
3. Бакулов И.А Котляров В.М. Фирсова Т.Е., Кольпикова Т.Н., Чевелева С.С. Листериоз как пищевая инфекция и современные методы лабораторной диагностики.
4. Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П. Микробиология, 2003 г.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA***

Л. Ракова, Л. Укстина - 4 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель – научный сотрудник А.В. Мاستиленко

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии

Бордетеллез – инфекционное заболевание, вызванное мелкой (0,2-0,3x0,5-1,0 мкм) грамотрицательной коккобациллой и характеризующееся развитием острого или хронического воспалительного процесса слизистой оболочки респираторного тракта, сухим кашлем, который часто принимает пароксизмальный характер, снижением общей активности организма, а в совокупности осложнений другими бактериальными или вирусными инфекциями – развитием тяжелых симптомов, характерных для пневмонии [1].

**Целью** настоящей работы является применение современного молекулярно-генетического метода (ПЦР) для обнаружения *Bordetella bronchiseptica* [2, 3].

**Материалы и методы.** В качестве основного метода обнаружения ДНК *Bordetella bronchiseptica* использовалась полимеразная цепная реакция.

Для обнаружения ДНК *Bordetella bronchiseptica* были использованы праймеры («затравки»), разработанные на кафедре МВЭиВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Для проведения полимеразной цепной реакции были использованы стандартные реакционные смеси производства ООО «Синтол» (г. Москва).

На последнем этапе индикации (детекции) ДНК применялся горизонтальный электрофорез в 2,3% агарозном геле в Трис-борат буфере с рН-8,3.

Для апробации предложенной методики были использованы штаммы *Bordetella bronchiseptica* из коллекции музея кафедры МВЭиВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Метод полимеразной цепной реакции заключается в многократном копировании (амплификации) участка ДНК. Этот участок выбирается экспериментатором и ограничивается синтетическими одноцепочечными ДНК (праймерами).

Праймеры подобраны таким образом, что ограничивают участок гена *VfrZ* генома *Bordetella bronchiseptica* размером 298 пар нуклеотидных оснований (п.о.). Культуры штаммов *Bordetella bronchiseptica* были подвергнуты этапу выделения ДНК с помощью обратимой сорбции на синтетическом носителе (сорбенте). Для процесса амплификации был использован программируемый термостат-амплификатор «Терцик», программу для которого подбирали соответственно инструкции к стандартной реакционной смеси и расчетным температурам плавления праймеров.

**Результаты исследований.** После ряда проведенных опытов была определена программа амплификации:

1. 95°C – 5 минут – 1 цикл
  2. 95°C – 10 сек
  - 60°C – 10 сек
  - 72°C – 20 сек
- } 35 циклов
3. 72°C – 1 мин - 1 цикл

После проведенной амплификации реакционную смесь наносили в лунки агарозного геля (в состав геля был введен краситель этидиум бромид) и помещали в прибор для проведения горизонтального электрофореза. Разгоняющим буфером служил Трис-борат с рН-8,3. Затем подключали источник постоянного тока: напряжение 150V, сила тока 15A, продолжительность 25 минут.

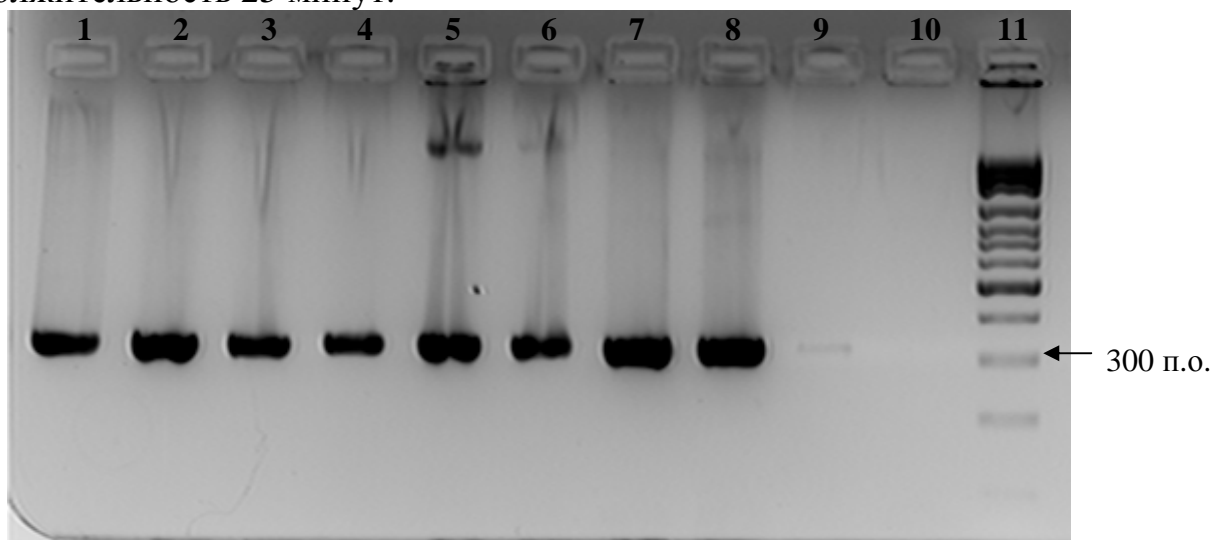


Рис.1. Электрофорез продуктов амплификации участков гена *VfrZ*. 11-маркер молекулярного веса М-DNA-100bp (100-3000 п.о.). Штаммы *Bordetella bronchiseptica* 1- №1, 2- №7, 3- №214, 4- №22067, 5-9 полевые штаммы, 10-отрицательный контрольный образец не содержащий ДНК *Bordetella bronchiseptica*.

После электрофореза агарозный гель помещали на прибор для визуализации ДНК – траниллюминатор с длиной волны 315нм. ДНК, двигаясь в электрическом поле, одновременно связывается с красителем и при освещении в УФО дает ярко флуоресцирующую полосу оранжевого цвета.

**Выводы.** В результате проведенной работы были подобраны оптимальные условия для проведения полимеразной цепной реакции с

праймерами к участку гена BfrZ генома *Bordetella bronchiseptica* и определен температурный режим для программируемого термостата-амплификатора.

Проведена детекция полученных продуктов методом горизонтального электрофореза в 2,3% агарозном геле с режимом: напряжение 150V, сила тока 15A, продолжительность 25 минут.

#### Литература

1. Красноженов Е.П. и др. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний // Ростов н/Д: Феникс, 2006.
2. Ребриков Д.В., Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. ПЦР в реальном времени. М: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
3. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of DNA sequences. *Biotechnology*, 1992,10:413-417.
4. Julian Parkhill, Mohammed Sebaihia, Andrew Preston et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics Advance online publication*, 10 August 2003; doi:10.1038/ng1227.

## **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА В НОЧНОМ КЛУБЕ**

К. Арзина, Т. Клевогина - 5 курс, факультет ветеринарной медицины

Научные руководители: к.б.н., доцент Л.П. Пульчеровская, д.б.н., профессор С.Н. Золотухин

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии

Начало микробиологическому анализу воздуха было положено в середине прошлого века великим французским ученым Луи Пастером, который в своих экспериментах доказал наличие микроорганизмов в воздухе. Контакт человека с микроорганизмами в воздухе наблюдается на протяжении всей жизни, и оснований для повышенного внимания данному вопросу предостаточно.

Многочисленные исследования микробного состава воздуха показали, что их достаточно много как в атмосферном воздухе, так и в воздухе закрытых помещений. Микрофлора обнаруженных организмов очень разнообразна, а воздух является для них естественным путем распространения, хотя среда обитания не благоприятная. Учитывая этот факт, влиянию микроорганизмов мы подвергаемся на улице, дома и на рабочих местах, а взаимосвязь между чистотой воздуха и здоровьем населения очевидна.

Воздух закрытых помещений более обсеменен, чем атмосферный. Как показывают наши исследования, микрофлора помещений представлена сапрофитными организмами, палочками и спорами плесневых грибов. Патогенные микроорганизмы могут определяться в воздухе при наличии больных. Чаще всего в воздушной среде жилых и общественных помещений определяются санитарно-показательные микроорганизмы (стафилококки, стрептококки).

Бактериологический анализ воздуха закрытого помещения подтверждает то, что содержание микроорганизмов в воздухе колеблется в