

УДК 579.62

РАЗРАБОТКА АНТИГЕННОГО БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

Туктаров А., Чобанюк В., 2 курс,

факультет ветеринарной медицины, специальность ВСЭ.

Научный руководитель: ассистент кафедры МВЭ и ВСЭ, Хлынов Д.Н.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»

С момента первого описания листериоза у животных прошло уже более 100 лет. С каждым годом значение этой инфекции в патологии людей и животных возрастает.

В конце XX века листериоз приобрел особую опасность, связанную в первую очередь с контаминацией пищевых продуктов листериями. Исходя из этого листериоз получил название «пищевой инфекции» (И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, 1991).

Диагноз на листериоз устанавливают комплексно на основании данных эпизоотологического и эпидемиологического обследования, клинических признаков, патологических изменений и результатов лабораторных исследований (И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.Е. Фирсова, и др., 2004).

В нашей стране принята бактериологическая диагностика листериоза и серодиагностическая схема, предусматривающая выявление антител с помощью традиционных серологических реакций: реакции агглютинации, реакции преципитации реакции непрямо́й гемагглютинации и реакции связывания комплемента (И.А. Бакулов, Д.А. Васильев и др.).

Цели и задачи исследования. Целью наших исследований явилось получение компонентов для диагностики *L. monocytogenes* в реакции агглютинации.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- получить специфические препараты антигенов и специфические сыворотки на лабораторных и восприимчивых животных;
- отработать условия постановки реакции агглютинации для выявления антител к бактериям *L. monocytogenes*;

Получение антигенного препарата листерий

Наработку бактериальной массы изолятов/штаммов проводили на мясопептонном агаре с добавлением 1% глицерина и 2% глюкозы. Суточную бульонную культуру по 5 см³ с примерной концентрацией 1×10⁶ м. т/см³ вносили в матрас с питательной средой, расплодочный материал равномерно распределяли по поверхности агара путем покачивания матраса, оставляли при комнатной температуре на 15 мин., затем матрасы переворачивали агаром вверх, помещали в термостат с температурой 37°C на 24 часа и дополнительно подращивали 24 часа при температуре 20°C.

Микробиологическую чистоту выращенных культур оценивали визуально по характеру роста и микроскопией мазков, окрашенных по Граму.

Если культура не содержала посторонней микрофлоры, то ее смывали с поверхности агара физиологическим раствором. Полученный смыв культуры

листерий центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок ресуспендировали в физиологическом растворе и вновь центрифугировали при указанном режиме (отмывание остатков питательной среды). Затем удаляли надосадочную жидкость и осадок ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде при pH 7,2. Исходную бактериальную массу дезинтеграции на ультразвуковом гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE, Англия).

Метод ультразвуковой дезинтеграции является одним из наиболее широко распространенных. Он позволяет получить дезинтеграты, в которых выявляются различные клеточные структуры и широкий спектр антигенов разной химической природы. Устойчивость микроорганизмов к ультразвуковой вибрации различна. Каждый вид требует отработки определенного режима. При обычной ультразвуковой дезинтеграции микроорганизмов кавитация является основной причиной разрушения клеток. Объясняется это тем, что при возникновении кавитации происходит резкое перераспределение акустической энергии; образующиеся вокруг кавитационных полостей градиенты давления и скорости жидкости на много порядков выше, чем в исходной акустической волне. При отсутствии же кавитации не происходит нарушения целостности микробной клетки из-за малости её размера (по сравнению с длиной ультразвуковой волны).

Образцы бактериальной суспензии озвучивали при амплитуде 14 мк. Варьировали временем экспозиции до 10 мин. В течение всего времени из образцов делали мазки и окрашивали их по Граму для фиксации степени разрушения бактериальных клеток в озвучиваемой суспензии.

Был определён оптимальный режим разрушения бактериальной клетки (рис. 3.), заключающийся в следующем: бактериальную суспензию концентрацией 1 млрд микробных клеток в 1 мл дистиллированной воды с pH – 7,2 подвергали ультразвуковой обработке на дезинтеграторе Soniprep 150 фирмы MSE (Англия) с амплитудой зонда – 14 мк, экспозицией обработки – 8 мин, объём суспензии – 1 мл. В качестве охлаждающей смеси стакана дезинтегратора использовали смесь спирта со льдом. Эффективность разрушения листериозных клеток оценивали по данным световой микроскопии, а также по данным подсчёта жизнеспособных клеток в исходной и разрушительной клеточной суспензии путём высева их на питательные среды. Микроскопическое изучение «ультразвуковых» гомогенатов выявило заметное повреждение структур клеток *Listeria monocytogenes*. Таким образом, мы подобрали оптимальные условия получения дезинтеграта листерий.

Следующим этапом нашей работы, согласно поставленной задаче, стала постановка реакции агглютинации для выявления антител к бактериям *L. monocytogenes*.

На часовом стекле сделали предварительное разведение (1:10; 1:100; 1:1000) полученного антигенного препарата с физиологическим раствором для определения самоагглютинации. В разведении 1:10 через 3 минуты происходила самоагглютинация антигена. В разведении 1:100 самоагглютинация отсутствовала длительное время (до 20 минут). В

разведении 1:1000 самоагглютинация не наступала на протяжении всего времени наблюдения.

Далее проводили постановку реакции агглютинации на часовом стекле. В качестве положительного контроля использовали коммерческую агглютинирующую листериозную сыворотку фирмы Difco. В качестве отрицательного контроля использовалась нормальная сыворотка КРС не содержащая антител к *Listeria monocytogenes*. На часовое стекло нанесли по 25 мкл положительной сыворотки, нормальной сыворотки и физиологического раствора (для проверки самоагглютинации). Затем к каждому образцу добавили по 25 мкл полученного нами антигенного препарата. Каждую каплю перемешали стерильными палочками. После покачивали стекло в течение 3 минут. В образце с положительной коммерческой сывороткой произошла заметная агглютинация в виде просветления жидкости и выпадения крупных хлопьев агглютината. В образце с нормальной сывороткой и физиологическим раствором изменений не наступило.

Таким образом, наработанный по указанному выше методу антигенный биопрепарат из листериозной бакмассы в дальнейшем может быть использован при постановке реакции агглютинации для диагностики листериоза.

Библиографический список

1. <http://www.epidemiolog.ru>
2. <http://www.rae.ru>

DEVELOPMENT OF ANTIGEN BIOLOGICAL PRODUCTS FOR THE DIAGNOSIS OF LISTERIOSIS IN THE AGGLUTINATION

Tuktarov A., Chobanuk V., Khlinov D.N.

The work is dedicated to the development of antigenic biological product for the diagnosis of listeriosis. We have gained from the antigen biologic listeriosnoy bakmassy can later be used in the production of the agglutination test for the diagnosis of listeriosis.

УДК 619:579

ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ МОРОЖЕНОГО

Уба С.Г., 5 курс, биотехнологический факультет

Научный руководитель: Викторов Д. А., научный сотрудник научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»

Мороженое – это сладкий взбитый замороженный продукт, вырабатываемый из приготовляемых по специальным рецептурам жидких смесей, содержащих в определенных соотношениях составные части молока, плодов, ягод, овощей, сахарозу, стабилизаторы, в некоторых рецептурах - яичные продукты, вкусовые и ароматические вещества. Во многих рецептурах предусматривается одновременное использование молочного и растительного сырья.