

14. Васильев Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева Ю.Б. / Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 233-235.
4. Катмакова Н.П. Разработка и применение диагностического биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Катмакова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2010 – 24 с.
5. Monack D.M., Falkow S. Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonisation by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model // *Mol. Microbiol.* – 1993. – N 10. P. 545–553.
6. Goodnow R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica* // *Microbiological Reviews*, Dec. – 1980, p.722-738.
7. Bemis D.A., Greisen H.A., Appel M.J. Bacteriological variation among *Bordetella bronchiseptica* isolates from dogs and other species // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – N 5. – P. 471-480.

IDENTIFICATION BORDETELLA BRONCHISEPTICA WITH SPECIFIC BACTERIOPHAGES

Vasilyev D.A., Vasilieva Y.B., Semanina E.N., Semanin E.G.

Key words: *fagoidentifikatsiya, Bordetella bronchiseptica, bordetellez, bacteriophages*

A scheme for the accelerated identification Bordetella bronchiseptica using indicator phages B.br. - 1 UGSKHA and B.br. - 7 UGSKHA. Cultural sensitivity to these phages indicator (the phenomenon of lysis) is the basis for the differentiation of culture as a form of B.bronchiseptica. Term studies with a decrease from 120 to 66 hours with minimum media and glassware.

УДК 619:578.832.1

ИНДИКАЦИЯ BORDETELLA BRONCHISEPTICA ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru*

*Ю.Б. Васильева, кандидат ветеринарных наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, ekaterinasema@mail.ru*

*Е.Н. Семанина, ассистент кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, ekaterinasema@mail.ru*

*Е.Г. Семанин, ассистент кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, semanin.e.g.-vet@mail.ru*

Ключевые слова: *бактериофаги, Bordetella bronchiseptica, бордетеллез, РНФ*
В статье приведены результаты исследований по индикации Bordetella bronchiseptica в объектах внешней среды и из клинических образцов биоматериала от собак и кошек с признаками респираторных заболеваний методом реакции нарастания титра фага (РНФ). В данной работе показана перспектива использования РНФ для диагностики бордетеллеза у домашних животных.

Введение. Для разработки мер борьбы и профилактики инфекции животных, вызываемой *Bordetella bronchiseptica* (*B. Bronchiseptica*), остаются актуальными вопросы диагностики и индикации микроорганизма в разных субстратах. Метод позволяет за относительно короткий срок обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры, что имеет важное значение при исследовании носоглоточных выделений животных.

В связи с вышесказанным целью научного исследования явилась апробирование метода индикации *B.bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов реакцией нарастания титра фага.

Материалы и методы исследований. Работа была выполнена в научно-исследовательском инновационном центре микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» им. П.А. Столыпина. Для опыта были использованы 5 референс-штаммов *Bordetella bronchiseptica* из коллекции музея НИИЦМБ (№ 1, 7, 214, 22067, 8344). Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1961), В.Я. Ганюшкина (1988).

Для РНФ был использован разработанный нами биопрепарат «*B.br.* – 11 УГСХА» при исследовании объектов внешней среды (смывы с поилок и кормушек питомника для собак) и животных (нософаренгиальные смывы).

Способ получения биоматериала от животных включал их предварительную фиксацию использованием зевника или шпателя для обеспечения доступа к задней стенке глотки и непосредственный забор материала стерильным ватно-марлевым тампоном. После забора материала с задней стенки глотки, тампон осторожно вынимали из пасти, не касаясь языка и щек, и проворачивая тампон вокруг своей оси, круговыми движениями втирали материал вначале по периферии агаровой среды в виде 4-5 площадок, а затем Z-образным штрихом в центре чашки. Стерильным шпателем растирали центральные части посева, не касаясь площадок.

Каждую исследуемую пробу вносили в стерильную колбу объемом 100 мл, содержащую мясоептонный бульон (рН 7,2-7,4) в соотношении 1:10. Содержимое колбы встряхивали с последующим отстаиванием взвеси в течение 10 минут. Готовили 3 широкие пробирки (диаметр 20 мм) и нумеровали их (№1, №2, №3). В пробирки №1, №2 вносили по 9 мл исследуемой взвеси, в пробирку № 3 вносили 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки №1, и №3 добавляли 1 мл индикаторного фага *B.br.* – 7 УГСХА в рабо-

чем разведении, а в пробирки №2 вносили 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага). Рабочее разведение фага содержало 1×10^4 корпускул в 1 мл. Пробирка №1, в которой находилась взвесь образца и индикаторный фаг, являлась опытной. Пробирка №2 – без фага являлась контролем для выявления в пробах свободного фага. Пробирка №3 – контроль на титр индикаторного фага. Все три пробирки выдерживали в течение 7 часов при температуре 37°C.

После культивирования при температуре 37°C содержимое каждой пробирки разводили питательным бульоном (рН 7,4-7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки №3 (контроль на титр фага) на чашках Петри образовалось несколько десятков негативных колоний (зон лизиса) фага. В пробирке №3 индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков корпускул в 1 мл, содержимое пробирки №3 разводили в 20 раз, т.е. 0,25 мл исследуемой смеси внести в 4,5 мл бульона. Содержимое опытных пробирок №1 и №2, разводили аналогично. Инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок №1, №2 и №3 проводили путем обработки хлороформом (в соотношении 1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата) в течение 15 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев.

Для определения числа корпускул использовали МПА, содержащий 1,5% и 0,7% агара. Питательный агар разливали в чашки Петри по 25-30 мл. Для подавления роста грамположительных бактерий перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки Петри подсушивали в термостате в течение 2-3 часов. Индикаторные культуры бордетелл выращивали в МПБ в течение 18 часов. МПА с 0,7% содержанием агара расплавляли, охлаждали до температуры 46-48°C, и помещали в водяную баню с такой же температурой. В пробирку добавляли 0,2 мл индикаторной бульонной культуры, 1 мл разведенной и прогретой исследуемой смеси, перемешивали и выливали вторым слоем на чашки Петри с 1,5%-ным МПА. Для определения количества корпускул фага в опытной пробе и в контроле титра (пробирки №1 и №3) использовали по две чашки Петри, для пробы на свободный фаг (пробирка №2) – одну чашку Петри. Через 20-30 минут после застывания верхнего слоя агара чашки Петри помещали в термостат на 12-16 часов.

Результат реакции учитывали методом подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках Петри. Положительная реакция характеризовалась увеличением количества корпускул хотя бы одного штамма фага по сравнению с контролем в 5 и более раз.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате постановки реакции нарастания титра фага при исследовании 10 фаренгиальных смывов кошек и собак и 5 смывов с кормушек и поилок питомника в 3 пробах обнаружены микроорганизмы *B.bronchiseptica* (таблица).

Таблица. Результат РНФ при исследовании объектов внешней среды и животных на наличие бактерий *B. Bronchiseptica*.

Объекты исследования	Нарастание титра, раз	Результат РНФ
Смывы с глотки собак		
Проба № 1	более 20	+
Проба № 2	3	–
Проба № 3	–	–
Проба № 4	более 20	+
Проба № 5	–	–
Смывы с глотки кошек		
Проба № 1	–	–
Проба № 2	–	–
Проба № 3	2	–
Проба № 4	8	+
Проба № 5	–	–
Смывы с поилок и кормушек		
Проба № 1	–	–
Проба № 2	–	–
Проба № 3	–	–
Проба № 4	–	–
Проба № 5	–	–

Результаты исследований показали, что РНФ с использованием биопрепарата «*B.br.–11 УГСХА*» позволяет обнаружить бордетеллы в исследуемом материале за 26 часов.

Заключение. Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что реакция нарастания титра фага по технике выполнения является простым и удобным, чувствительным и специфическим методом диагностики.

Рекомендуем применение метода РНФ для выявления возбудителя бордетеллеза у домашних животных, который позволяет за относительно короткий срок обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги // - М.: Медгиз – 1961. 521 с.
2. Шуляк Б.Ф. Руководство по бактериальным инфекциям собак. Т.2. Грамотрицательные бактерии. М.: ОЛИТА, 2003. – 608с.
3. Monack D. M., Falkow S. Cloning of *Bordetella bronchiseptica* urease genes and analysis of colonisation by a urease-negative mutant strain in a guinea-pig model // *Mol. Microbiol.* – 1993. – N 10. P. 545–553.
4. Goodnow, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica* // *Microbiological Reviews*, Dec. – 1980, p.722-738.

5. Mattoo, S., A. K. Foreman-Wykert, P. A. Cotter, and J. F. Miller. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis // Front. Biosci. – 2001. 168-186.

INDICATION *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* IN ENVIRONMENTAL OBJECTS AND DOMESTIC ANIMALS

Vasilyev D.A., Vasilieva Y.B., Semanina E.N., Semanin E.G.

Key words: *bacteriophages, Bordetella bronchiseptica, bordetellex, RNFy*

The results of studies indicating Bordetella bronchiseptica in environmental objects and animals with clinical signs of the disease by the reaction of the phage titer rise. In the study of 15 samples in 3 of them has been found Bordetella bronchiseptica. In this paper the prospect of using the RNF to diagnose bordetellex in domestic animals.

УДК 636.92:611

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА СЕЛЕЗЕНКИ КРОЛИКОВ ПРИ СТРЕССЕ

Т.Я. Вишневская, кандидат биологических наук, доцент

ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ»

тел. 8-912-343-48-40, 8 (3532) 77-54-61, TSW1987@rambler.ru

Л.Л.Абрамова, доктор биологических наук, профессор,

ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ»

тел. 8 (3532) 77-54-61, anatom.OSAU@mail.ru

Ключевые слова: кролики, селезенка, капсула лимфоидные узелки, центральная артерия.

Работа посвящена изучению особенностей гистологического строения селезенки кролика, в условиях экспериментального стресса. Выявлено изменения гистологического строения функционально активных зон селезенки у животных в условиях стресса: преобладание лимфоидных узелков неправильно овальной формы с реактивными центрами разной площади, отек стенки центральных артерий и периваскулярной зоны лимфоидных узелков.

Введение. В современных условиях кролиководства, животные подвергаются воздействию технологических стресс-факторов – во время транспортировки, вакцинации, изменении кормления и температурного режима, скученности. Стресс снижает резистентность организма и как следствие приводит к заболеваемости и падежу [2, 1]. На изменение условий внешней среды очень быстро реагируют органы иммунной системы [4, 6, 5, 3] одним, из которых является селезенка - периферический и самый крупный орган.