

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЁЗА

Васильева Ю. Б.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П. А. Столыпина», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, бульвар Новый Венец-1), grant-ugsha@yandex.ru

В статье представлен сравнительный анализ методических приёмов идентификации *Bordetella bronchiseptica*. В результате проведенных исследований установили, что бактериологический метод эффективен и обладает достаточно высокой специфичностью, но его проведение является дорогостоящим, трудоемким и длительным (96–120 ч). Иммунологические методы просты и быстро выполнимы, но они недостаточно специфичны, и с их помощью нельзя отличить текущую инфекцию от прошедшей или носительства. Молекулярно-генетические методы, являясь надежными, быстрыми, высокочувствительными и специфичными, позволяют провести прямое обнаружение бордетелл, выделить возбудителя среди близкородственных бактерий, не требуют для реакции жизнеспособности возбудителей. Отрицательными сторонами являются высокая стоимость анализов, многостадийность и возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов из-за контаминации материала или ошибок персонала. Метод фагодиагностики обладает высокой специфичностью, на постановку окончательного диагноза затрачивается до 66 ч, способ экономичен по сравнению с бактериологическим исследованием. Реакция нарастания титра фага позволяет обнаружить бордетеллы в концентрации от  $10^3$  м.к. в 1 мл исследуемого материала в течение 26 ч. Для выбора эффективного метода лабораторной диагностики бордетелллёза или их сочетанного применения необходимо учитывать масштабы планируемых исследований, период инфекционного цикла, контингент животных и их иммунный статус.

Ключевые слова: бордетелллёз животных, *Bordetella bronchiseptica*, лабораторная диагностика.

## FEATURE COMPARISON OF METHODS FOR DIAGNOSTICS OF BORDETELLOSIS

Vasileva Y. B.

FSBEI HPE «Ulyanovsk SAA named after P. A. Stolypin», Ulyanovsk, Russia (432017, Ulyanovsk, Novyj Venec boulevard, 1)

The article presents a comparative analysis of instructional techniques identify *Bordetella bronchiseptica*. The studies found that the bacteriological method is effective and has a relatively high specificity, but its implementation is a costly, labor-intensive and time (96–120 hours). Immunological methods distinguished by the simplicity and speed of execution, but they are not specific enough, and with their help it is impossible to distinguish current infection from the past or from the carrier. Molecular genetic techniques, being a reliable, rapid, highly sensitive and specific, allow for direct detection of Bordetella, select the agent among closely related bacteria that do not require a response to the viability of the parasites. The drawback is the high cost of analyzes, multiple stages and the possibility of false-positive and false-negative results due to contamination of the material or human error. Method method for diagnosis of phages has a high specificity for the final diagnosis is spent up to 66 hours, the method is economical compared to the bacteriological examination. Reaction Rise phage titer can detect *Bordetella* at a concentration of  $10^3$  MK in 1 ml of the test material for 26 hours. To select an effective method of diagnostic of bordetellosis or their combined use, consider the following criteria: extent of the planned research, the period of infection cycle, the contingent animals, their immune status.

Key words: bordetellosis of animals, *Bordetella bronchiseptica*, laboratory diagnostics.

**Введение.** Для постановки лабораторного диагноза на бордетелллёз в мировой практике широко применяют микроскопический, культуральный, иммунологический, серологический и генодиагностический методы. Так как применение всего диагностического комплекса в большинстве случаев затруднительно и экономически неэффективно, актуальным является вопрос о выборе одного – двух легкодоступных методов, обладающих высокими показателями по специфичности и чувствительности.

Подавляющее большинство сравнительных экспериментов, проведенных зарубежными исследователями, показывает превосходство молекулярно-генетических методов над традиционными бактериологическим и иммунологическим. Установлено, что выявляемость бордетелл в клинических образцах с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) возрастает до 4-х раз, по сравнению с микробиологическими методами, и приближается к 70 %. При этом специфичность анализа достигает 90 % [2, 3].

В исследованиях R. Lichtinghagen et al. [4], а позднее G. E. Buck [1] показано, что при сравнении бактериологического исследования, иммуноферментного анализа и ПЦР наиболее высокочувствительным оказался молекулярно-генетический метод. Скорость его исполнения составила 2,5 часа, тогда как культурального метода – до 7 суток.

В других исследованиях были сопоставлены методы обнаружения бордетелл с помощью прямой иммунофлуоресценции (РИФ) и ПЦР. Возбудитель был выявлен в ПЦР в 84,6 % проб, РИФ – в 88,4 %, бактериологическим методом – в 44 % проб. Исследователи отмечали наличие ложноположительных результатов при проведении РИФ вследствие низкой специфичности метода [5]. Тест-системы для ПЦР, имеющиеся в настоящее время, высокочувствительны (80–100 %), но слабо видоспецифичны и требуют совершенствования [6]. Методы фагодиагностики бордетеллёза не разработаны.

Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе разработанных нами методических приёмов лабораторной диагностики бордетеллёза домашних животных с рекомендацией к применению в клинической ветеринарии наиболее эффективных.

**Материалы и методы.** Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012). Исследования проводились в лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П. А. Столыпина». В работе использовали 5 референс-штаммов *B.bronchiseptica* из коллекции кафедры, а также 25 штаммов близкородственных видов и возможных носоглоточных ассоциантов 52 полевых штамма *B.bronchiseptica*, выделенных нами из клинических образцов биоматериала от животных, поступавших в ветеринарную клинику «Друг» и приют для бездомных животных «Лапа помощи», и 8 штаммов индуцированных фагов *B.bronchiseptica*. В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения и идентификации бактерий, соответствующие им среды и реагенты.

**Результаты и обсуждение.** При разработке бактериологической схемы были апробированы различные варианты. Наилучшие результаты были получены при испытании схемы, включающей взятие глубоких мазков из глотки животных на селективно-

диагностическую среду BBR-57 УГСХА, культивирование в течение 24–48 ч; отбор не менее 3-х характерных колоний сине-зеленого цвета в МПБ и культивирование в течение 24 ч; микроскопия мазков, окрашенных по Граму и посев на МПА штрихом для наращивания бактериальной массы в течение 24 ч и проведение биохимических тестов (рис. 1).

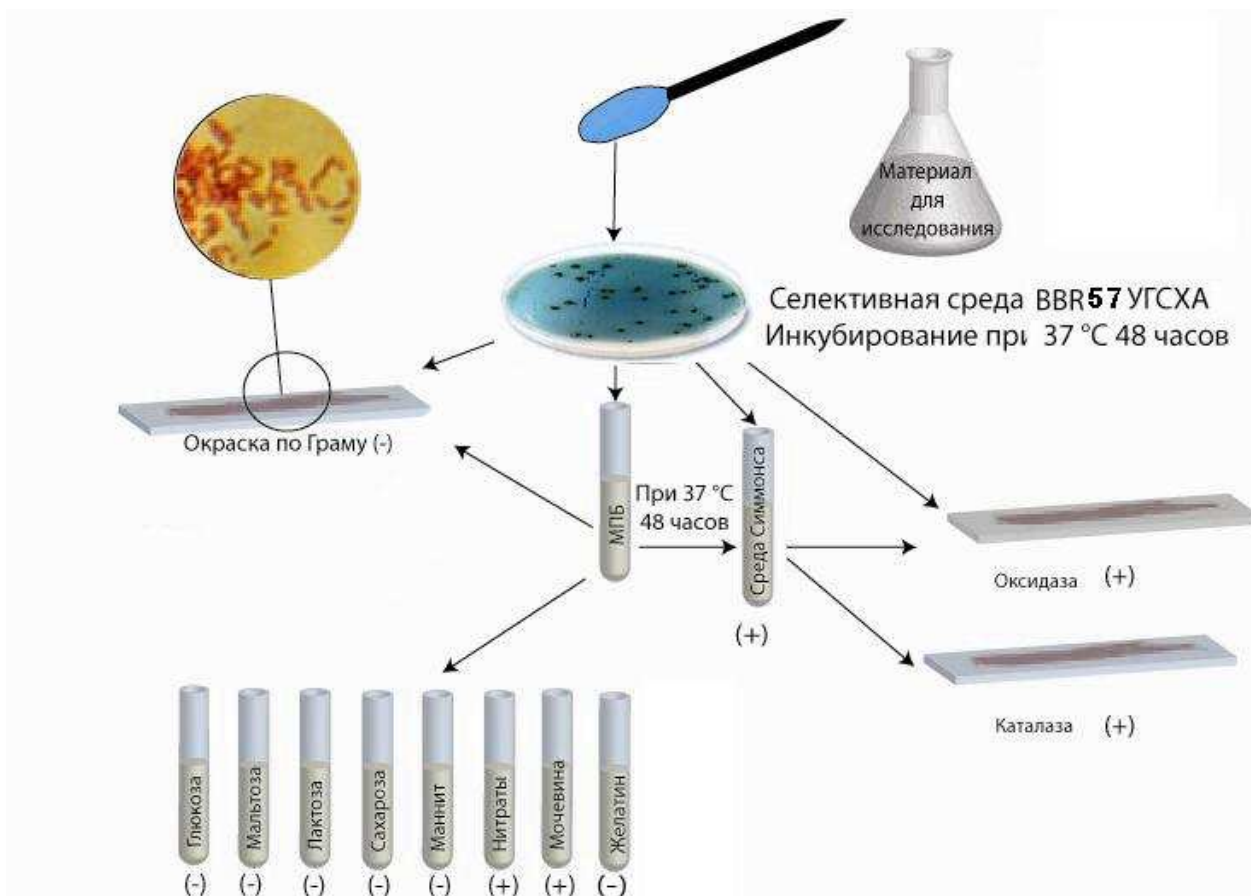


Рис. 1. Бактериологическая схема диагностики бордетеллёза

Время постановки предварительного диагноза 48–72 ч, окончательного – 96–120 ч. Апробация схемы на клиническом материале образцов показала, что результаты бактериологического исследования во многом зависят от соблюдения правил техники взятия биоматериала (мазки из зева – задней стенки глотки, а не из носоглотки), его транспортировки (желательно в течение 3 ч на обогащенной агаровой среде), длительности симптомов (эффективнее ранняя диагностика до появления приступов тяжёлого кашля) и предшествующей антибактериальной терапии (исследование возможно до и через 2 недели после окончания курса лечения).

Схема иммунологической идентификации *B.bronchiseptica* заключалась в проведении пластинчатой реакции агглютинации с использованием тест-набора из антигенного препарата и гипериммунной сыворотки. Антигенный препарат получали ультразвуковой дезинтеграцией в следующем режиме: частота 23 кГц, амплитуда колебаний 7 микрон, в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси

спирта со льдом, иммунную сыворотку – гипериммунизацией кроликов с в/в введением кроликам 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл антигена с интервалом 3 дня и забором крови через 20 дней с момента начала инъекций. В результате апробации схемы на клиническом материале мы установили, что исследование имеет наибольшее значение при диагностике заболевания в клинической стадии судорожного кашля и не результативно для раннего выявления возбудителя, так как антитела образуются с 3 недели от начала заболевания. У народившегося молодняка, старых животных, а также особей с ослабленным иммунитетом иммунологические реакции следует оценивать с особой осторожностью, возможны ложные результаты. Серологические реакции не позволяют различить иммунологический ответ, вызванный текущей инфекцией и вакцинацией, поэтому мы не рекомендуем использовать тесты с диагностической целью в течение года после прививки. Хотя по титру антител можно оценить эффективность вакцинации. Для контроля интенсивности эпизоотического процесса мы рекомендуем сравнивать титр антител в парных сыворотках, полученных с промежутком в 1 месяц. Увеличение титра антител на 50–100 % имеет диагностическое значение. Важным диагностическим преимуществом иммунологического метода явилась независимость чувствительности реакций от начатой антимикробной терапии. Таким образом, при интерпретации результатов иммунологических анализов необходимо учитывать период инфекционного цикла, возраст животных, состояние иммунитета и наличие вакцинации в прошлом.

Мы разработали и апробировали проведение ПЦР в моно- и мультиплексном формате и провели оптимизацию режимов реакции. Температура отжига праймеров для создания универсального протокола ПЦР составила 62 °С, при этом наблюдался максимальный продукт амплификации и обнаруживалась ДНК всех штаммов в 1000-кратном разведении. Были подобраны оптимальные концентрации праймеров – 5 pmol на реакцию объемом 25 мкл. Для повышения специфичности идентификации *B.bronchiseptica* и возможности проведения массовых исследований апробировали мультиплексную ПЦР с тремя праймерными системами для одновременной амплификации фрагментов генов *bfrA*, *bfrZ* и *ssox* с соотношением праймеров 1:1:3,5 соответственно. Длительность анализа составила 70 минут. Были проведены эксперименты по испытанию ПЦР в режиме «реального времени» с флуоресцентной детекцией. Накопление продукта амплификации регистрировалось на каждом цикле при температуре 62 °С в течение 15 сек. Методика позволила провести количественную оценку содержания ДНК *B.bronchiseptica* в биоматериале от  $2,3 \times 10^3$  до  $6,8 \times 10^8$  копий ДНК/мл для участка гена *BfrZ*. Чувствительность и специфичность молекулярно-генетических исследований составила 95 % и 97 % по сравнению с бактериологическим методом. Показатели зависели от клинической стадии заболевания,

возраста животных и предшествующего лечения. Мы рекомендуем проведение ПЦР для исследования животных в продромальную и раннюю клиническую стадию заболевания (около 4 недель после появления первых симптомов). В этот период чувствительность ПЦР максимальна и превосходит чувствительность бактериологического метода. При диагностике в позднюю клиническую стадию и при выздоровлении для получения наиболее точных результатов необходимо комбинировать ПЦР с серологическим исследованием.

Идентификацию *B.bronchiseptica* с помощью выделенных нами фагов проводили по феномену лизиса бордетелл (реакция «стекающей капли»). На поверхность мясопептонного агара наносили 3–4 капли бульонной 18 часовой исследуемого материала. Нанесённую культуру равномерно распределяли по поверхности среды и подслушивали 15–20 минут при 37 °С. Чашку Петри делили на три сектора, и на поверхность засеянной среды лёгким прикосновением капли на два сектора наносили по штамму фагов V.br.–110 УГСХА и V.br.–107 УГСХА, на третий сектор в качестве контроля наносили стерильный МПБ, наклоняли чашку Петри, чтобы капли стекли. После 15–20 минутного подсушивания в боксе культивировали в термостате при 37 °С 18 ч. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне культуры хотя бы одного из фагов указывало на принадлежность исследуемого штамма к бактериям *B.bronchiseptica*. Срок исследования составил 66 ч при меньшем расходе сред, реактивов и лабораторной посуды по сравнению с бактериологическим методом. Чувствительность метода по сравнению с бактериологическим составила 92,5 %.

Для ускоренной фагоидентификации *B.bronchiseptica* мы апробировали реакцию нарастания титра фага (РНФ). Реакция позволила обнаружить возбудителя при исследовании нозофаренгиальных смывов в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры (рис. 2). Чувствительность РНФ составила от  $10^3$  м.к. в 1 мл исследуемого материала, длительность анализа – 26 ч. Метод высоко видоспецифичен, его можно использовать для индивидуального и массового обследования животных любого возраста, вида, с любым иммунным статусом. Для результативности исследований необходима жизнеспособность возбудителя, выделяемого от животных или из объектов внешней среды. Результат анализа не зависит от предыдущих инфекций в отличие от иммунологических реакций.

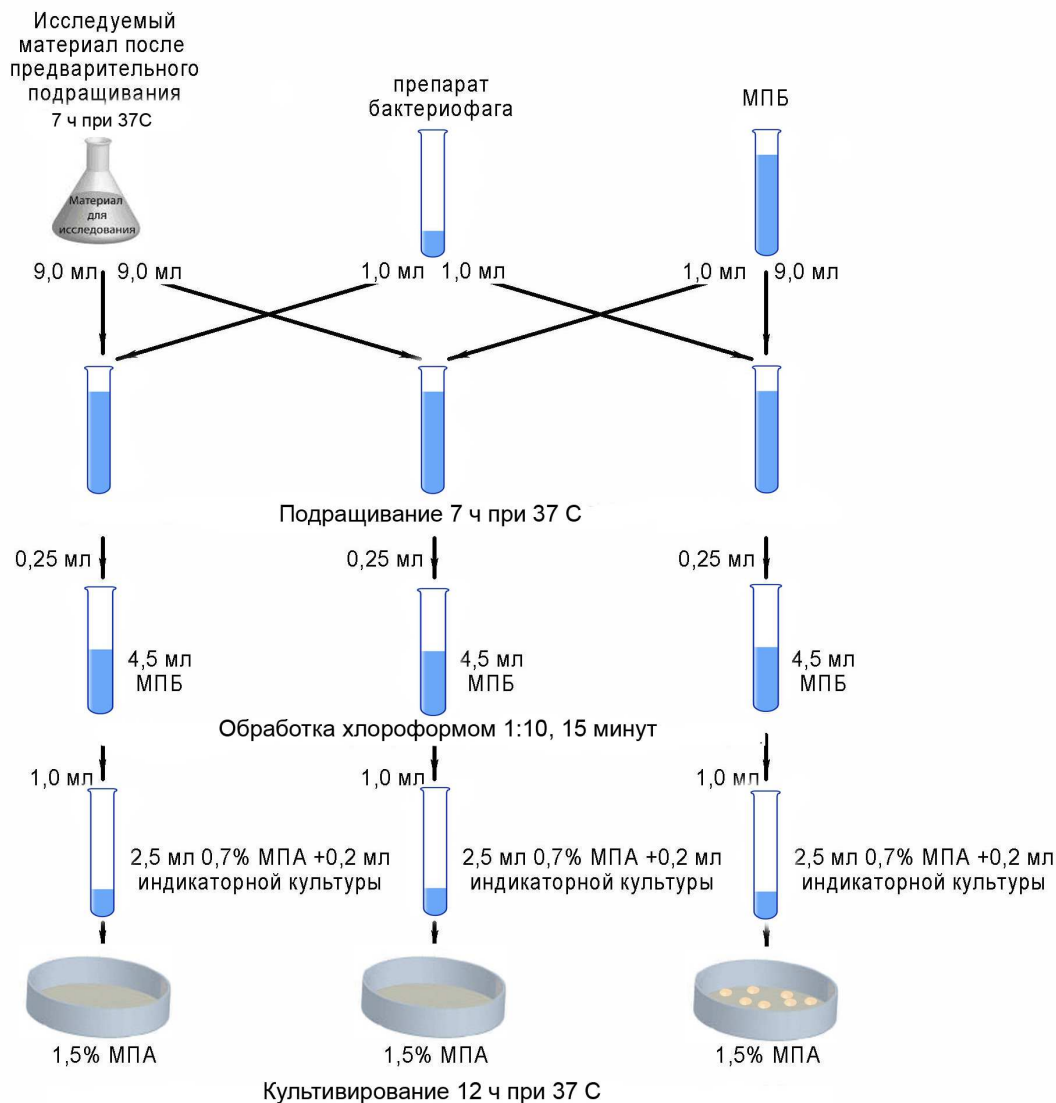


рис. 2. Схема постановки реакции нарастания титра фага

*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.*

**Выводы.** Таким образом, апробировав разработанные диагностические приёмы, мы пришли к выводу, что все методы имеют свои положительные и отрицательные стороны. Так, бактериологический метод эффективен и обладает достаточно высокой специфичностью, но его проведение занимает много времени (96–120 ч) и является дорогостоящим.

Иммунологические методы обнаружения достаточно быстрые, и их возможно автоматизировать, но они недостаточно специфичны и с их помощью нельзя отличить текущую инфекцию от прошедшей, поскольку при этом определяется только наличие антител к бордетеллам в крови больных. Результат зависит от предыдущих инфекций и реинфекций.

Молекулярно-генетические методы, являясь быстрыми, высокочувствительными и специфичными, позволяют провести прямое обнаружение бордетелл. Мультиплексная ПЦР дает возможность выделить возбудителя среди близкородственных бактерий, не требует для реакции жизнеспособности паразитов. Негативными моментами являются высокая стоимость анализов, многоступенчатость и возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, как следствие контаминации и ошибок операторов.

Метод фагоидентификации возбудителя экономичнее бактериологического, так как на его проведение затрачивается меньшее количество лабораторной посуды, сред и реактивов. Методика фагодиагностики бордетелллёза является простой, высоко специфичной и занимает 26 или 66 ч в зависимости от методики.

Рекомендуем для выбора эффективного метода лабораторной диагностики или их сочетанного применения учитывать: масштабы планируемых исследований (массовые или индивидуальные обследования), контингент животных (уличные, домашние, вид, возраст, иммунный статус и др.) и период инфекционного цикла (инкубация, простудные симптомы, «лающий кашель», выздоровление).

#### Список литературы

1. Buck G. E. Detection of *B.pertussis* by rapid-cycle PCR and colorimetric microwell hybridization / G.E. Buck // J. Clin. Microbiol. – 1996. – V.34. – P.1355-1358.
2. Clinical validation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pertussis by comparison with serology, culture, and symptoms during a large pertussis vaccine efficacy trial / U. Heininger [et al.] // Pediatrics. – 2000. – V. 105. – P.e31.
3. Environmental contamination leading to false- Positive polymerase chain reaction for pertussis / J. Taranger [et al.] // Pediatr. Infect. Dis. J. – 1994. – V. 13. – P. 936-937.
4. Lichtinghagen R. Identification of *B.pertussis* in nasopharyngeal swabs using the polymerase chain reaction: evaluation of detection methods / R. Lichtinghagen, R. Diedrich-Glaubit, B. von Horsten // Eur.J.Clin. Chem.Clin. Biochem. – 1994. – V.32. – P.161-167.
5. Major outbreak of pertussis in northern Alberta, Canada: analysis of discrepant direct fluorescent-antibody and culture results by using polymerase chain reaction methodology / C. A. Ewanowich [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1993. – V.31. – P.1715-1725.
6. Muller F.-M.C. Laboratory Diagnosis of Pertussis: State of the Art in 1997 / F.-M. C. Muller, J. E. Hoppe, C.-H. Wirsing von Konig // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – V. 35. – № 10. – P.2435-2443.

7. Comparison of culture and PCR for detection of *B.pertussis* and *B.parapertussis* under routine laboratory conditions D.M. Dragsted [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2004. – V. 53. – P. 749-754.
8. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *B.pertussis* and *B.parapertussis* / Y. Xu [et al.] // Apmis. – 2010. – V. 118. – P. 685-91.

**Рецензенты:**

Васильев Д. А., д.б.н., профессор, директор ООО «Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии», Ульяновская область, п.Октябрьский.

Нафеев А. А., д.м.н., заведующий отделением особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск.