

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *B. BRONCHISEPTICA*

Васильева Ю.Б.¹, Мاستиленко А.В.¹, Васильев Д.А.¹, Бадаев Р.Р.², Мерчина С.В.¹, Швиденко И.Г.³, Скорик А.С.¹

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

²Московский финансово-юридический университет, Москва, Россия (117447, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 17а, стр. 6), vidagon@mail.ru

³ФГБОУ ВПО «Саратовский аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, Театральная площадь, 1)

В работе приводятся результаты изучения аналитической чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* (ТСИИ ББР). ТСИИ ББР включает бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты, обеспечивает раннюю и точную диагностику бордетеллёза. Аналитическая чувствительность бактериологического и иммунологического компонентов тест-системы составляет не менее 10^4 м.к. в мл, молекулярно-генетического и фагового - не менее 10^3 м.к. в мл. Бактериологический, иммунологический, фаговый компоненты следует использовать на ранних сроках заболевания (не позднее третьей недели), до начала терапии антибактериальными препаратами. В более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость резко снижается. ПЦР эффективнее в более поздние сроки заболевания и на фоне лечения антибиотиками, но максимальная эффективность метода приходится на 1-3 неделю от начала заболевания. Прием антибиотиков может привести к ложноотрицательному результату анализа. Срок проведения лабораторной диагностики с помощью тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* составляет от 1 до 4 суток.

Ключевые слова: бордетеллёз, диагностика, детекция возбудителя, инфекции кошек и собак, домашние животные.

THE ANALYSIS OF SENSITIVITY AND DIAGNOSTIC EFFICACY OF THE TEST SYSTEM OF INDICATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA *B. BRONCHISEPTICA*

Vasilyeva Y.B.¹, Mastilenco A.V.¹, Vasilyev D.A.¹, Badaev R.R.², Merhcina S.V.¹, Shvidenko I.G.³, Skorik A.S.¹

¹FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia (432017 Russia, Ulyanovsk, Boulevard New Crown-1), grant-ugsha@yandex.ru

²Research financial law University, Moscow, Russia (117447, Moscow, street Carmustine, da, P6), vidagon@mail.ru

³FSBEI HPE "Saratov agrarian University named after N.I. Vavilov", Saratov, Russia, 410012, Saratov, Theatre square, 1)

The paper presents results of a study of analytical sensitivity and diagnostic efficacy of the test system of indication and identification of bacteria *B. bronchiseptica* (TSII BBR). TSII BBR includes bacteriological, immunological, molecular genetics and phage components, provides early and accurate diagnosis of *Bordetella*. The analytical sensitivity of bacteriological and immunological components of the test system is not less than 10^4 microbial cells in ml, molecular genetics and phage - not less than 10^3 microbial cells in ml. Bacteriological, immunological, phage components should be used in the early stages of the disease (not later than the third week), before treatment with antibacterial drugs. At a later date and on the background of antibiotic therapy inoculation significantly reduced. PCR is more effective in the later stages of the disease and on treatment with antibiotics, but the maximum efficiency of the method on 1 - 3 week from the onset of the disease. Antibiotics may lead to false-negative result of the analysis. The term laboratory tests using the test system of indication and identification of bacteria *B. bronchiseptica* is from 1 to 4 days.

Keywords: *Bordetella*, diagnosis, detection of the pathogen, infection of cats and dogs, pets allowed.

Несмотря на то что микроорганизм *B. bronchiseptica* был открыт в начале XX века, многие вопросы, связанные с патогенностью, методами индикации и идентификации возбудителя, остаются недостаточно изученными. Опасность усугубляется чрезвычайной

распространённостью возбудителя в природе. Фактически все теплокровные животные являются носителями или восприимчивы к инфицированию бронхисептикозными бактериями. В литературе описано более 100 случаев инфицирования людей. Анамнестические данные показывают, что во многих случаях наблюдался предварительный контакт зараженных людей с больными собаками, кроликами, свиньями, кошками [1-23].

Возможность передачи возбудителя от сельскохозяйственных и домашних животных людям и перемещения очага из природных в антропоургические зоны имеет крайне важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение [1-23].

С 90-х годов прошлого века во многих странах мира ежегодно регистрируют массовые вспышки бордетеллёза животных. Установить точный уровень распространения инфекции достаточно сложно, так как чаще массово болеют и являются носителями уличные животные [1-23].

Ареал распространения бактерий данного вида, по-видимому, повсеместен. Однако строгий учет вспышек инфекции среди животных ведется только в странах Западной Европы и США [1-23].

В России отсутствуют официальные статистические данные по распространению бордетеллёза животных и бронхосептикоза людей. Незнание истинной заболеваемости обусловлена недооценкой патогенности возбудителя и отсутствием эффективных мер его детекции [1-23].

Согласно традиционной схеме для учета штаммов *B. bronchiseptica* используют бактериологический метод с иммунологическим подтверждением в реакции агглютинации. Данные методы имеют ряд существенных недостатков. Бактериологическая детекция занимает неделю, при этом её эффективность редко превышает 20-40%. Долгосрочность исследований и низкая высеваемость возбудителя связаны со слабой устойчивостью бордетелл во внешней среде, их медленным ростом, несвоевременным и неполным обследованием животных и людей с затяжным кашлем, нарушением правил забора и транспортировки материала, несовершенной рецептурой питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных компонентов [1-23].

Серологическая диагностика не является высокоспецифичной, даёт нарастание титров антител в поздние сроки заболевания, неинформативна для молодняка первого года жизни [6; 7].

Следовательно, бактериологические методы недостаточно чувствительны, а серологические – слабо специфичны. В клинической практике неэффективность и длительность диагностики инфекции отражается в том, что большинство заболевших не может своевременно пройти курс антибактериальной терапии, которая эффективна только в начальный период [5; 9].

Новые возможности детекции бордетелл появились в последние годы в связи с внедрением современных методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментного анализа, фагодиагностики [1-23].

Многие исследователи отмечают перспективность использования молекулярно-генетических методов, которые позволяют провести раннюю и более точную детекцию возбудителей по сравнению с фенотипическими методами [23]. Однако в настоящее время широкое применение ПЦР для идентификации *B. bronchiseptica* ограничено в связи с отсутствием стандартизированных праймерных систем, позволяющих проводить точную внутривидовую диагностику. В связи с этим перспективным направлением является разработка методических приемов постановки ПЦР в моно- и мультиплексном формате, а также ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» для идентификации бактерий *B. bronchiseptica* [4; 7; 9; 12; 13; 15; 22].

На сегодняшний день выделено и охарактеризовано более 10 фагов бактерий *B. bronchiseptica*. Однако их практическое применение не описано, несмотря на то что фагодиагностика позволяет быстро и точно провести индикацию и идентификацию искомым бактерий при минимальных затратах [6-8; 16; 18; 19].

Для медицинской практики важна внутривидовая дифференцировка *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* [22].

Таким образом, на сегодняшний день крайне актуальными остаются совершенствование классических и разработка современных методов детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, обладающих высокой чувствительностью, специфичностью и экономической эффективностью [1-23].

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение аналитической чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации *B. bronchiseptica* (ТСИИ ББР), включающей бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты.

Материалы и методы. Работа проводилась на базе научно-исследовательского центра микробиологии и биотехнологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ.

Компоненты тест-системы мы апробировали на искусственно контаминированных мазках из носоглотки животных.

Мазки со слизистой носоглотки брали сухими стерильными назофарингеальными тампонами на пластиковом аппликаторе. Материал проверяли на отсутствие бактерий *B. bronchiseptica* бактериологическим методом.

Для искусственной контаминации проб использовали суточные культуры *B. bronchiseptica* в концентрации от 10^9 до 10^2 м.к./мл. Исходная концентрация культуры была

определена по стандарту мутности. Последовательные разведения высевали на селективный агар для учета бактериологического компонента. Далее проводили реакцию агглютинации на стекле (иммунологический компонент). Для проверки молекулярно-генетического компонента ставили ПЦР в мультиплексном формате с детекцией в электрофорезе и ПЦР в режиме «реального времени». Фаговый компонент тестировали в РНФ и СПОТ-тесте.

Результаты исследований чувствительности компонентов тест-системы приведены в таблице 1.

Таблица 1

Чувствительность компонентов ТСИИ ББР при исследовании искусственно контаминированных культурой *B. bronchiseptica* проб

№	Количество м.к./мл	Результаты детекции <i>B. bronchiseptica</i> компонентами ТСИИ ББР			
		бактериологический (селективный агар)	иммунологический (РА на стекле)	молекулярно-генетический (ПЦР)	фаговый (РНФ)
1	10 ⁹	сплошной рост	+	+	+
2	10 ⁸	сплошной рост	+	+	+
3	10 ⁷	сплошной рост	+	+	+
4	10 ⁶	тесно расположенные колонии	+	+	+
5	10 ⁵	тесно расположенные колонии	+	+	+
6	10 ⁴	изолированные колонии	+	+	+
7	10 ³	отсутствие видимого роста	-	+	+
8	10 ²	отсутствие видимого роста	-	±	-

Оценка аналитической чувствительности компонентов тест-системы показала высокий уровень чувствительности молекулярно-генетического и фагового компонентов с выявлением бактерий в концентрациях 10³ м.к./мл и выше и допустимый диагностический уровень бактериологического и иммунологического компонентов – 10⁴ м.к./мл и выше.

Диагностическую эффективность компонентов ТСИИ ББР оценивали в зависимости от сроков заболевания, наличия или отсутствия антибиотикотерапии (таблица 2).

Таблица 2

Эффективность компонентов ТСИИ ББР

Компоненты ТСИИ ББР	1-2 недели от начала заболевания		3-4 недели от начала заболевания		Более 4 недель без лечения или с ним
	без лечения АБ	на фоне АБ	без лечения АБ	на фоне АБ	
Б	+	±	+	-	-
И	+	+	+	-	-
М-Г	+	+	+	+	+

Ф	+	+	+	-	-
---	---	---	---	---	---

Примечание. Компоненты тест-системы: Б – бактериологический, И – иммунологический, М-Г – молекулярно-генетический, Ф – фаговый.

Результаты исследований показали, что бактериологический, иммунологический, фаговый компоненты следует использовать на ранних сроках заболевания (не позднее третьей недели), до начала терапии антибактериальными препаратами. В более поздние сроки и на фоне антибиотикотерапии высеваемость резко снижается.

Обследование методом ПЦР нередко оказывается эффективнее бактериологического метода в более поздние сроки заболевания и на фоне лечения антибиотиками, однако максимальная эффективность метода приходится на ранние сроки (1-3 недели от начала заболевания), прием антибиотиков может привести к ложноотрицательному результату анализа.

Список литературы

1. Васильев Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 230-232.
2. Васильев Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастыленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 233-235.
3. Васильев Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1 (13). - С. 59–62.
4. Васильева Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 2 (22). – С. 25-29.
5. Васильева Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 2 (22). – С. 51-56.
6. Васильева Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллеза // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 275. - URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.
7. Васильева Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 285. - URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.

8. Васильева Ю.Б. Эффективность иммунохимических методов для анализа антигенного состава *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч. 1. – С. 100-104.
9. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллёза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч. 2. – С. 334-338.
10. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 46-51.
11. Васильева Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и возможности применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 44-49.
12. Васильев Д.А. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Ульяновск : УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. - Т. I. – С. 28-32.
13. Васильева Ю.Б. Биотехнологический подход в разработке метода идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск : УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т. II. – С. 15-18.
14. Васильев Д.А. Технология конструирования диагностического биопрепарата на основе бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и перспективы его применения / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Ульяновск : УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т. II. – С. 99-104.
15. Васильев Д.А. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск : ГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т. II. – С. 18-22.
16. Васильева Ю.Б. Основы подбора компонентов питательных сред для первичного выделения *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, А.Г. Семанин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 85-92.
17. Мастиленко А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на

основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 50-54.

18.Нафеев А.А. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями / А.А. Нафеев, Н.И. Пелевина, Ю.Б. Васильева // Дезинфекционное дело. - 2014. - № 1. - С. 39-43.

19.Никульшина Ю.Б. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Никулина // Ветеринарная патология. - 2007. - № 4. (23). — С. 103-106.

20.Никульшина Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск : УГСХА. - 2008. – Т. IV. - С. 57-59.

21.Сверкалова Д.Г. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* / Д.Г. Сверкалова, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов, Ю.Б. Никульшина, Д.А. Васильев // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск : УГСХА. - 2008. - Т. IV. – С. 134-136.

22.Vasilyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.

23.Vasilyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multyplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.

Рецензенты:

Золотухин С.Н., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», г. Ульяновск.

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.