

АЛГОРИТМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 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, Суркова Е.И.¹¹ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия (432017, Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1), grant-ugsha@yandex.ru²Московский финансово-юридический университет, Москва, Россия (117447, Москва, ул. Б. Черемушкинская, д.17а, стр.6), vidagon@mail.ru³ФГБОУ ВПО «Саратовский аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов, Россия (410012, Саратов, Театральная площадь, 1)

В работе приводятся результаты изучения алгоритмов применения 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. Бактериологический компонент системы эффективен и обладает достаточно высокой специфичностью, но его проведение трудоемко, длительно (72-96 ч) и является дорогостоящим. Иммунологический компонент экспрессный, но недостаточно специфичный и не может быть использован как самостоятельный. Молекулярно-генетический компонент идентификации, являясь быстрым, высокочувствительным и специфичным, не позволяет определить жизнеспособность микроорганизмов и дифференцировать текущую инфекцию от прошедшей. Фаговый компонент экономичнее бактериологического, так как на его проведение затрачивается меньшее количество лабораторной посуды, сред и реактивов.

Ключевые слова: бактерии вида *B.bronchiseptica*, тест-система, индикация, идентификация.

ALGORITHM USING 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, Surkova E.I.¹¹FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia (432017 Russia, Ulyanovsk, Boulevard New Crown-1), grant-ugsha@yandex.ru²Research financial law University, Moscow, Russia (117447, Moscow, street Carmustine, da, P6), vidagon@mail.ru³FSBEI HPE "Saratov agrarian University named after N.I. Vavilov", Saratov, Russia, 410012, Saratov, Theatre square, 1)

The paper presents the results of the study of algorithms applied test systems 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*. Bacteriological component of the system is effective and has a high specificity, but it is time-consuming, long-term (72-96 h) and is expensive. Immunological component of Express, but not specific and cannot be used as an independent. Molecular-genetic component identification, being rapid, sensitive and specific, it is not possible to determine the viability of the microorganisms and to differentiate the current infection from the past. Phage component more economical bacteriological, because it takes fewer laboratory glassware, media and reagents.

Keywords: bacteria species *B.bronchiseptica*, the test-system, display, identification.

Диагностика бордетеллеза имеет большое значение, так как бордетеллёз – инфекционное заболевание, передающееся от домашних животных – собак, кошек – человеку [1, 2, 3, 4].

Животные-носители могут быть источниками распространения заболевания других животных и взрослых людей, со слабым иммунным статусом, имеющих в анамнезе хронические системные заболевания, перенесших травмы, операции. Особенно восприимчивы дети [7, 11].

Диагноз на бордетеллезную инфекцию собак устанавливают на основании комплексных клинико-эпизоотологических данных, результатов патологоанатомических, бактериологических и серологических исследований. В сложных случаях ставят биологическую пробу на щенках.

Слизь, отобранную из носовой полости или глотки центрифугируют при 2500 – 3000 об/мин в течение 15 минут, а из надсадочной жидкости делают высевы на питательные среды. Тампонами, смоченными в носовой слизи, проводят несколько раз по поверхности твёрдой питательной среды (лёгкое круговое втирание). В положительном случае уже через 24-48 часов инкубации высевок, при температуре +37°C, на агаре появляются мелкие колонии, размером 2-3 мм серовато-белого цвета. Зоны гемолиза образуются на средах с кровью. На среде Гартхоха через 48 часов вырастают беловатые, каплевидные колонии, а на агаре Мак-Конки – розовые со светлым центром [1-23].

Ускоренная дифференциация культур бордетелл проводится с помощью реакции агглютинации на предметном стекле с положительными и отрицательными сыворотками; определение их биохимических особенностей на пёстром ряду и уреазной активности (положительная) с учётом микроскопических и культуральных результатов исследований [1, 5].

Материалы и методы. Нами разработана тест-система индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica*.

Бактериологическая детекция нацелена на выделение чистой культуры бактерий *B.bronchiseptica*.

Проводится взятие глубоких мазков из глотки животных на 2 чашки Петри с дифференциально-диагностической средой с селективной добавкой и без неё и культивирование в течение 24-48 ч в термостате при температуре 36±1°C.

На 2-3-е сутки исследования (48-72 ч): отбор и изучение не менее 3-х характерных колоний бирюзового цвета, возможно с темно-синим центром. Колонии других микроорганизмов могут изменять цвет среды с зеленого на желтоватый. Колонии *B.bronchiseptica* могут быть полиморфны. Подозрительными являются россинчатые, выпуклые, влажные, гладкие, блестящие с ровными краями, маслянистой консистенции, легко снимающиеся с поверхности среды колонии диаметром от 1 до 2 мм (фаза I) и более крупные (до 3-4 мм), плоские с приподнятым центром и шероховатыми краями колонии (фаза III) или переходные формы (фаза II). При наличии значительного количества однотипных подозрительных колоний проводят микроскопию окрашенных по Граму мазков с обнаружением мелких грамтрицательных коккобацилл, равномерно располагающиеся в мазке одиночно, по парам или короткими цепочками. Проводят отсев подозрительных колоний на скошенный МПА для выделения чистой культуры и наращивания бактериальной массы в течение 24 ч. При отсутствии роста подозрительных колоний чашки Петри вновь помещают в термостат на 24-48 ч и просматривают повторно.

На 3-4-е сутки исследования (72-96 ч) просматривают посеvy для выделения чистой культуры, проводят микроскопию и

биохимические тесты. Учитывают хороший рост *B.bronchiseptica* на МПА в течение 24-48 ч, аэробность, наличие оксидазной, каталазной и гемолитической активности. Если в течение 4-х суток на среде выращивания не обнаружены подозрительные колонии дают окончательный отрицательный ответ.

Иммунологическая детекция применяется для обнаружения в исследуемом материале с помощью гипериммунной сыворотки специфических антигенов *B.bronchiseptica* (дополнительный компонент бактериологического исследования).

При помощи иммунопрепаратов проводят пластинчатую реакцию агглютинации на предметном стекле или реакцию диффузной преципитации.

Молекулярно-генетическая детекция нацелена на обнаружение ДНК бактерий *B.bronchiseptica* в биоматериале без выделения чистой культуры или как подтверждение бактериологического исследования.

Проводят выделение нуклеиновых кислот из культур сорбентным способом, проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции с разработанными системами праймеров (Pr1-1 (5' ccttcagcacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' ccccgtgccggggtgcctggacctggcg 3') для гена *VfrA* ДНК *B.bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggacgaccaggatcacatctcc 3'), Pr3-2 (5' gcttctggtagtggtg-cgtagg 3') для гена *VfrZ*; Pr4-1 (5' gcattgctccatcctgtgtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcg 3') для гена *Cytochrom-C-oxidase* и Pr5-1 (5' ctacgggggaaagcggggga 3'), Pr5-2 (5' gaccgtactcccaggcggt 3') для гена 16S rRNA), флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена *bfrZ*, детекция с помощью горизонтального электрофореза и в режиме «реального времени». Программа проведения ПЦР с электрофоретической детекцией – 1) 95°C – 5 мин, 2) 95°C–10 сек, 62°C–10 сек, 72°C–20 сек – 40 циклов, 3) 72°C–2 мин; для детекции в режиме реального времени – 1) 95°C–5 мин, 2) 95°C–10 сек, 62°C–15 сек – 40 циклов, 3) 72°C–1 мин.

Детекция специфическими фагами позволяет обнаружить бактерии *B.bronchiseptica* реакцией нарастания титра фага (РНФ) без выделения чистой культуры (самостоятельный метод) или подтверждение бактериологического исследования методом «стекающей капли» (дополнительный метод к бактериологической схеме). Для постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) каждую исследуемую пробу вносят в стерильную колбу с МПБ в соотношении 1:10. Содержимое колбы встряхивают с последующим отстаиванием взвеси в течение 10 минут. Готовят 3 широкие пробирки (диаметр 20 мм), их нумеруют №1, №2, №3. В пробирки №1, №2 вносят по 9 мл исследуемой взвеси, в пробирку №3 - 9 мл стерильного МПБ. В пробирки №1 и №3 добавляют 1 мл биопрепарата «ББР-117 УГСХА», в пробирку №2 вносят 1 мл МПБ. Пробирка №1 является опытной. Пробирка №2 – является контролем для выявления в пробах свободного фага. Пробирка №3 – контроль на титр индикаторного фага. Все три пробирки выдерживают в течение 7 часов при температуре 37°C. Затем содержимое каждой пробирки разводят 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 вносят в 4,5 мл бульона. Содержимое опытных пробирок №1 и №2, разводят аналогично. Инактивацию микрофлоры разведенных смесей проводят путем обработки хлороформом в соотношении к фаголизату 1:10 в течение 15 минут. Содержимое пробирок исследуют на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев. Результат реакции учитывают методом подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках Петри. Положительная реакция характеризуется увеличением количества корпускул по сравнению с контролем в 5 и более раз.

Для постановки реакции «стекающей капли» на поверхность дифференциально-диагностической среды пипеткой наносят 3-4 капли бульонной 18 ч культуры исследуемых микроорганизмов, распределяют её по поверхности среды, подсушивают, делят чашку на два сектора и наносят на один сектор фаговый биопрепарат, на другой – стерильный МПБ. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне исследуемой культуры сектора с биопрепаратом указывает на принадлежность штамма к бактериям *B.bronchiseptica*.

Алгоритм использования ТСИИ ББР представлен на рисунке 1. Все компоненты имеют сильные и слабые стороны, что надо учитывать исходя из целей и масштабов исследований.

Так, бактериологический компонент системы эффективен и обладает достаточно высокой специфичностью, но его проведение трудоемко, длительно (72-96 ч) и является дорогостоящим.

Иммунологический компонент экспрессный, но недостаточно специфичный и не может быть использован как самостоятельный.

Молекулярно-генетический компонент идентификации, являясь быстрым, высокочувствительным и специфичным, не позволяет определить жизнеспособность микроорганизмов и дифференцировать текущую инфекцию от прошедшей.

Мультиплексная ПЦР дает возможность выделить возбудителя среди близкородственных бактерий. Негативными моментами являются высокая стоимость анализов, многоступенчатость и возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, как следствие контаминации лабораторий ДНК материалом и ошибок операторов.

Фаговый компонент экономичнее бактериологического, так как на его проведение затрачивается меньшее количество лабораторной посуды, сред и реактивов. Методика фагодиагностики бордетеллёза является простой, высоко специфичной и занимает 26 ч при постановке реакции нарастания титра фага и 60 ч – СПОТ-теста.

РНФ может использоваться как самостоятельный компонент тест-системы, СПОТ-тест в качестве дополнения бактериологической схемы.

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

Тест-систему рекомендуем использовать для подтверждения клинического диагноза, выявления атипичных форм заболевания, обнаружения бактерионосителей.

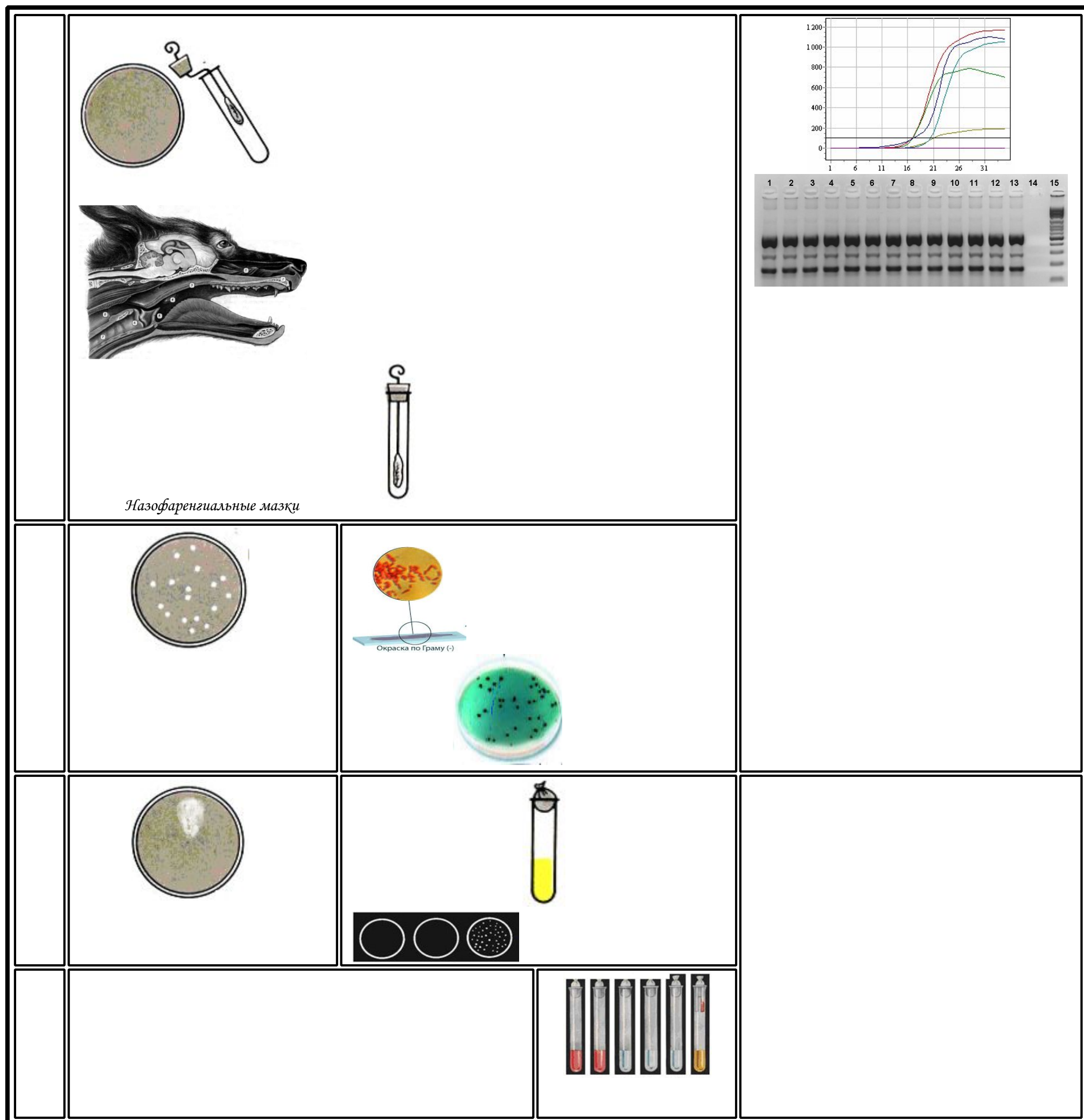


Рис. 1. Компоненты ТИСС ББР. Ф – фаговый, И – иммунологический, Б – бактериологический, М – молекулярно-генетический

Список литературы

1. Васильев, Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, 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. Мастиленко, 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 / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
5. Васильева, Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. - №2 (22). – С. 51-56.
6. Васильева, Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллеза / Ю.Б. Васильева // 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* / Ю.Б. Васильева // 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* / Ю.Б. Васильева // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 10. – Ч.1. – С. 100-104.
9. Васильева, Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // 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 / Васильева Ю.Б. / 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.1. – 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.11. – 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.11. – 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.11. – 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. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, А.Г. Семанин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. - № 1 (25). – С. 85-92.
17. Мاستиленко, 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. – Т. IV. – 2008. – 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 / Yu.B. Vasilyeva // 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 /

Yu.B. Vasylyeva / 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.