УДК 619:578.832.1

НОВАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОРДЕТЕЛЛЁЗА – BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Васильева Ю.Б.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Ульяновск, e-mail: grant-ugsha@yandex.ru

В статье приводятся результаты по разработке новой тест-системы лабораторной диагностики бордетеллёза домашних животных с использованием бактериологического, иммунологического, молекулярно-генетического и фагодиагностического компонентов. В зависимости от цели диагностических исследований используют либо весь комплекс компонентов тест-системы, либо отдельные её составляющие. С помощью тест-системы возможно подтверждение клинического диагноза, выявление атипичных форм заболевания, обнаружение бордетеллоносителей в окружении больных животных, а также установление ретроспективного диагноза. С диагностической целью обследуются животные с подозрением на бордетеллёз с клиническими признаками, длительно кашляющие животные. Для ранней индивидуальной диагностики возможно использование бактериологического, молекулярно-генетического или фагодиагностического компонентов тест-системы. В затяжных случаях эффективнее сочетанное применение любого из вышеперечисленных компонентов с иммунологическим исследованием. По эпизоотическим показаниям массово обследуются животные питомников, приютов для бездомных животных, гостиниц для временной передержки питомцев, а также животные, особенно молодняк до 1 года, находившиеся в контакте с больными или подозрительными особями. Для массовых исследований рекомендуем применение фагодиагностического или молекулярно-генетического компонентов тест-системы.

Ключевые слова: Bordetella bronchiseptica, бордетеллёз, методы диагностики

NEW TEST SYSTEM IDENTIFICATION OF PATHOGENS OF BORDETELLOSIS – BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Vasileva Y.B.

FSBEI HPE «Ulyanovsk SAA named after P.A. Stolypin», Ulyanovsk, e-mail: grant-ugsha@yandex.ru

The article presents the results on the development of a new test laboratory system bordetellosis of pets using bacteriological, immunological, molecular and genetic, phagological components. Depending on the purpose of diagnostic tests using either the full range of components of a test system or its individual components. With the test system can confirm the clinical diagnosis, detection of atypical forms of the disease, the detection of bacteria carriers surrounded by sick animals, as well as the establishment of a retrospective diagnosis. For diagnostic purposes are examined animals with suspected bordetellosis with clinical signs long coughing animals. For the early diagnosis of an individual may use bacteriological, or molecular and genetic, phagological test system components. In protracted cases, effectively combines the use of any of the above components with immunological research. According to the testimony of epizootic mass examined animals kennels, shelters for homeless animals, hotels for temporary overexposure pets, and animals, especially young animals up to 1 year have been in contact with sick or suspicious individuals. For screening studies recommend the use of phagological or molecular genetic components of the test system.

Keywords: Bordetella bronchiseptica, bordetellosis, diagnostic methods

Бактерии рода *Bordetella* являются одними из важных возбудителей респираторных заболеваний у животных и людей [7].

Следуя требованиям современной ветеринарной медицины, крайне актуальной является разработка системы лабораторной диагностики бордетеллеза животных, её базовой технологии производства и применения. В нашей стране отсутствуют стандартизированные тест-системы для раннего выявления возбудителя, а зарубежные аналоги дорогостоящи и не находят широкого применения в ветеринарии [7].

Следовательно, совершенствование и разработка методологических подходов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica (B.bronchiseptica)* крайне актуальны.

Целью данного исследования явилась апробация новой тест-системы диагностики бордетеллёза домашних животных, включающей бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фагодиагностический компоненты.

Материалы и методы исследования

Работа выполнялась в лабораториях кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Научные исследования проводились в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012), а также при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «Старт-2012».

Часть исследований была выполнена совместно с научными сотрудниками кафедры: к.б.н. Д.Г. Сверкаловой, к.б.н. А.В. Мастиленко, к.б.н. Е.Н. Семаниной и Е.Г. Семаниным.

Объектами исследований явились 5 референс-штаммов *B.bronchiseptica*, 25 рефереснс-штаммов близкородственных бактерий и возможных нозофаренгиальных ассоциантов, полученных из кафе-

дральной музейной коллекции; а также 52 штамма *B.bronchiseptica,* выделенных от животных и 8 полевых фагов. В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения и типирования бактерий и фагов, соответствующие им среды, оборудование и реагенты, а также авторские усовершенствованные методики, приведенные ниже [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Результаты исследования и их обсуждение

Первым компонентом разработанной нами тест-системы является бактериологическая идентификация *B.bronchiseptica*.

Учитывая, что отдельные фенотипические признаки имеют сходные черты у большого количества бактерий, при разработке бактериологической схемы идентификации возбудителя мы отбирали биологические особенности *B.bronchiseptica*, позволяющие в максимальной степени добиться угнетения роста сопутствующей микрофлоры респираторного тракта животных и повысить продуктивность биомассы искомого патогена. Методология базировалась на использовании совокупности уникальных биологических свойств, комбинация которых и является инструментом идентификации.

Были апробированы различные варианты бактериологической индикации *B.bronchiseptica*. Наилучшие результаты были получены при заборе биоматериала на разработанную нами селективно-диагностическую среду BBR-57 УГСХА. Состав среды: пептон ферментативный в количестве 20,0 г/дм^3; метионин – 0,3 г/дм^3; цистеин – 0,3 г/дм^3; никотиновая кислота – 0,1 г/дм^3; цефазолина натриевая соль – 0,004 г/дм^3; хлорид бария – 0,4 г/дм^3; глюкоза – 0,7 г/дм^3; лактоза – 0,7 г/дм^3; сахароза – 0,7 г/дм^3; мальтоза – 0,7 г/дм^3; маннит – 0,7 г/дм^3; бромтимоловый синий – 0,2 г/дм^3. Для приготовления среды в дистиллированную воду добавляют все компоненты по предложенной прописи, кроме цефазолина. Компоненты растворяют и нагревают на водяной бане до кипения. Доводят pH среды 0,1 N раствором NaOH до 7,2 ± 0,2. Среду автоклавируют при t 110–112 °C 15 минут. Повторно измеряют pH среды и разливают по чашкам Петри. Среда зеленого цвета.

Предлагаем следующую схему бактериологической идентификации *B.bronchiseptica:*

1-е сутки исследования: взятие тампоном глубоких мазков из глотки животных на селективно-диагностическую среду BBR-57 УГСХА с культивированием в течение 24–48 ч в термостате при t 35–37 °C.

2–3-е сутки исследования (48–72 ч): отбор и изучение не менее 3-х характерных колоний бирюзового цвета, возможно с темно-синим центром, размером от 1 до 4 мм. Колонии других микроорганизмов могут изменять цвет среды с зеленого на жёлтоватый. 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 рекомендуем проведение микроскопии окрашенных по Граму мазков. Бактерии *B.bronchiseptica* – мелкие коккобацилы, равномерно располагающиеся в мазке одиночно, по парам или короткими цепочками, грамотрицательны. По этим данным возможна постановка предварительного диагноза. Проводят отсев подозрительных колоний на скошенный МПА или другие агаровые среды (КУА, бордетелагар) для выделения чистой культуры и наращивания бактериальной массы в течение 24 ч. При отсутствии роста подозрительных колоний на среде BBR-57 УГСХА чашки Петри вновь помещают в термостат на 24–48 ч и просматривают повторно.

3–4-е сутки исследования (72–96 ч): просматривают посевы для выделения чистой культуры, проводят микроскопию и биохимические тесты. Учитывают хороший рост *B.bronchiseptica* на простых питательных средах в течение 24–48 ч при 35–37 °C, аэробность, способностью утилизировать цитраты и нитраты, отсутствие ферментации сахаров, многоатомных спиртов, пигментообразования и желатиназы, наличие уреазной, оксидазной и каталазной активности. На основании этих данных может быть выдан окончательный положительный ответ. Если в течение 4-х суток на среде выращивания не обнаружены подозрительные колонии, дают окончательный отрицательный ответ.

Таким образом, постановка окончательного диагноза на бордетеллёз с использованием бактериологического исследования занимает 3–4 дня. Постановка диагноза возможна на 2–3-е сутки с условием сочетанного применения бактериологической идентификации с другими компонентами тест-системы.

Иммунологический компонент тест-системы бордетеллёза включает обнаружение в исследуемой сыворотке специфических антител. Для проведения анализа необходим набор биопрепаратов: антиген *B.bronchiseptica* и иммунная сыворотка.

Экспериментальным путем мы подобрали оптимальный способ получения антигенного препарата методом ультразвуковой дезинтеграции (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) и оптимальную схему подготовки иммунной сыворотки (в/в введение 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). Далее проводят пластинчатую реакцию агглютинации на предметном стекле по общепринятой методике. Мы рекомендуем использовать иммунологический компонент тест-системы как дополнение к другим лабораторным методам. Следует учитывать, что иммунологические исследования проводят через 3 недели от начала заболевания, когда в крови появляются специфические антитела. При обследованиях вакцинированного поголовья иммунологические реакции учитывают в динамике, исследуя парные сыворотки 2–3 раза с интервалом 1–2 недели в развернутой реакции агглютинации. Положительным является нарастание титра не менее чем в 4 раза.

Следующим компонентом тест-системы является молекулярно-генетическая идентификация *B.bronchiseptica с* постановкой полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

Для проведения ПЦР рекомендуем использовать системы праймеров, видоспецифичные к участкам генов *bfrA* и *bfrZ B.bronchiseptica* и родовые к гену *Cytochrom–C–oxidase* и гену *16S rRNA*, а для проведения ПЦР в режиме «реального времени» – флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена *bfrZ*. Оптимальные параметры подготовки и проведения ПЦР: сорбентный способ экстракции ДНК, температура отжига праймеров – 62 °С, универсальная концентрация каждого из праймеров – 5 pmol на реакцию объемом 25 мкл.

Использование метода ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» с интеркалирующим красителем SYBR Green I позволяет провести количественную оценку содержания ДНК *B.bronchiseptica* в биоматериале от $2{,}3\cdot10^3$ до $6{,}8\cdot10^8$ копий ДНК/мл для участка гена *bfrZ*. Накопление продукта амплификации регистрируется на каждом цикле при температуре 62 °С в течение 15 с. Для проведения ПЦР в мультиплексном формате рекомендуем оптимальное соотношение праймерных систем генов *bfrA, bfrZ* и *Cytochrom–C–oxidase* в реакции – 1:1:3,5 соответственно. Длительность анализа составляет 70 минут.

Чувствительность ПЦР-исследования с подобранными системами праймеров: для участков генов *bfrA* и *bfrZ, Cytochrom–C–oxidasex* – $5{,}5\cdot10^3$ бактериальных клеток/мл; для участка гена *16S rRNA.* – $5{,}5\cdot10^2$ бактериальных клеток/мл.

Ещё одним компонентом тест-системы является фагоидентификация бактерий *B.bronchiseptica*. Для проведения исследования методом «стекающей капли» или реакцией нарастания титра фага (РНФ) необходимо иметь специфические бордетеллёзные бактериофаги. Фаги выделяют методом индукции из лизогенных штаммов.

Разработанная нами схема выделения бактериофагов включает 3-дневное воздействие ультрафиолетовым излучением на суточную культуру *B.bronchiseptica в* различных вариациях расстояния до лампы (l) и времени облучения (*t*): 1 день: $t = 5–7$ мин; $l = 1$ м. 2 день: $t = 7–10$ мин; $l = 1$ м. 3 день: $t = 7–10$ мин; $l = 0{,}5$ м. На основе отобранных по биологическим свойствам фагов B.br.–110 УГСХА и B. br.–107 УГСХА (спектр лизиса 92,5 %; литическая активность по Аппельману $10^{-7}–10^{-8}$, по Грациа $3{,}1\cdot10^8–4{,}3\cdot10^9$ активных корпускул в 1 мл) нами изготовлен фаговый препарат «ББР–117 УГСХА». Технологические параметры изготовления биопрепарата: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *B.bronchiseptica* – 1:2, время инкубации при температуре 37 °С – 7 ч, обработка хлороформом в пропорции 1:10 в течение 15 мин.

Фагодиагностика методом «стекающей капли» проводится следующим образом: на поверхность среды «ББР-57 УГСХА» в чашках Петри 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 биопрепарат «ББР-117 УГСХА», на другой – стерильный МПБ. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне исследуемой культуры сектора с биопрепаратом указывает на принадлежность штамма к бактериям *B.bronchiseptica.* Срок исследования составляет до 66 ч.

Реакция нарастания титра фага проводится по следующей методике: 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°С. Затем содержимое каждой пробирки разводят питательным бульоном (pH 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.

РНФ с использованием биопрепарата «ББР-117 УГСХА» позволяет обнаружить бордетеллы в концентрации от 10^3 м.к. в 1 мл исследуемого биоматериала за 26 часов без выделения чистой культуры.

Фагодиагностический компонент тест-системы можно использовать, как самостоятельно, так и в сочетанном применении с другими компонентами тест-системы.

В зависимости от цели диагностических исследований используют либо весь комплекс компонентов тест-системы, либо отдельные её составляющие (рисунок).

Тест-система идентификации бактерий Bordetella bronchiseptica

Выводы

Таким образом тест-систему идентификации *B.bronchiseptica,* включающую бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический, фагодиагностический компоненты, возможно использовать для подтверждения клинического диагноза, выявления атипичных форм заболевания, обнаружения бактерионосителей в окружении больных животных, а также для установления ретроспективного диагноза.

Бактериологический, молекулярно-генетический, фагодиагностический компоненты тест-системы эффективны для ранней диагностики бордетеллёза, иммунологический – для ретроспективной. Бактериологический и молекулярно-генетический компоненты тест-системы являются дорогостоящими, а иммунологический

и фагоидентификационный – более экономичными.

Рекомендуем применять тест-систему с диагностической целью и по эпизоотическим показаниям.

С диагностической целью индивидуально обследуются животные с клиническими признаками бордетеллёза, а также длительно кашляющие животные. Для ранней индивидуальной диагностики возможно использование бактериологического, генодиагностического или фагодиагностического компонентов тест-системы. В затяжных случаях эффективнее сочетанное применение любого из вышеперечисленных компонентов с иммунологическим исследованием.

По эпизоотическим показаниям массово обследуются животные питомников, приютов для бездомных животных, гостиниц для временной передержки питомцев, а также животные, особенно молодняк до 1 года, находившиеся в контакте с больными или подозрительными особями (на выставках и других массовых мероприятиях, при посещении ветеринарных клиник). Для массовых исследований рекомендуем использовать фагодиагностический или молекулярно-генетический компоненты тест-системы.

На носительство необходимо обследовать беременных самок, коллективно содержащихся разновозрастных животных, питомцев, приобретенных за рубежом. Для выявления носительства, а также для оценки эффективности иммунопрофилактики рекомендуем использовать иммунологический компонент тест-системы.

Список литературы

1. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Медгиз, 1961. – 521 с.

2. Васильев Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. – Ульяновск, 1998. – 151 с.

3. Иммунология и аллергология / А.А. Воробьев и др. - М.: Практическая медицина. - 2006. – 288 с.

4. Лабинская А.С. Микробиология с техников микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.

5. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: пер. с англ. / С. Херрингтон [и др.] - М.: Мир, 1999. – 193 с.

6. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – С. 65–71.

7. Goodnow, R.A. Biology of Bordetella bronchiseptica // Microbiological Reviews, Dec. – 1980. – P.722–738.

References

1. Adams, M. Bacteriophages / M. Adams // M.: Medgiz, 1961. 521 p.

2. Vasilev, D.A. The educational-methodical manual on methods of General bacteriology / D.A. Vasilev, S.N. Zolotukhin, N.M. Nikishina Ulyanovsk, 1998. 151 p.

3. Immunology and Allergology / A.A. Vorobev M.: Practical medicine. 2006. 288 p.

4. Labinskaya, A.S. Microbiology with technicians microbiological studies. M.: Medicine, 1978. 394 p.

5. Molecular clinical diagnosis. Methods. Translation from English. / S. Kherrington M.: World, 1999. 193 p.

6. Timakov, V.D. Reaction growth titer phage / V.D. Timakov, D.M. Goldfarb // M., 1962. pp. 65–71.

7. Goodnow, R.A. Biology of Bordetella bronchiseptica // Microbiological Reviews, Dec. 1980, pp. 722–738.

Рецензенты:

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

Работа поступила в редакцию 15.08.2013.