

УДК 616.9:619

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЕЗА

*Паладьева Д.Е., студентка 5 курса, Ломакин А.А., студент 4 курса ФВМиБ  
Научный руководитель – Васильева Ю.Б., к.вет.н., доцент  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

**Ключевые слова:** бактерии, изоляты, бордетеллёз, инфекции, ПЦР.

В статье представлены результаты разработки тест-системы индикации и идентификации бактерий вида *B. bronchiseptica*. Описаны бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый наборы для проведения детекции бордетелл и схемы лабораторных анализов. Использование тестовой системы позволяет значительно сократить время исследования по сравнению с традиционными методами.

Согласно МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий» (2008) для выделения бактерий вида *B. bronchiseptica* используют бактериологический метод с подтверждением в реакции агглютинации [1]. При этом детекция занимает минимум 4-5 суток, а её эффективность редко превышает 20-40% [2-6]. В клинической практике неэффективность и длительность диагностики инфекции обуславливает запоздалое назначение курса антибактериальной терапии.

Новые возможности детекции бордетелл появились в последние годы в связи с внедрением современных методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноферментного анализа, фагодиагностики [2-8].

На сегодняшний день крайне актуальными остаются совершенствование классических и разработка современных методов детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, обладающих высокой чувствительностью, специфичностью и экономической эффективностью.

В связи с этим **целью** наших исследований явилась разработка тест-системы индикации и идентификации *B. bronchiseptica* (ТСИИ ББР).

**Материалы и методы.** Исследования проводили в лаборатории научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и

биотехнологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

**Результаты исследований и обсуждение.** Разработанная нами тест-система индикации и идентификации бактерий вида *B. bronchiseptica* (ТСИИ ББР) содержит бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый наборы.

Бактериологический набор ТСИИ ББР включает: дифференциально-диагностическую среду (состав, г/л: пептон сухой ферментативный – 10.0, железа сульфат – 0.02, магния сульфат – 0.4, натрия хлорид –  $4.5 \pm 0.5$ , мочевины – 5.0, крахмал – 2.5, лактоза – 5.0, бромтимоловый синий – 0.02, агар микробиологический –  $12.0 \pm 2.0$ ); селективную добавку (состав, г/л: ампициллин – 0.0025, цефазолин – 0.004, флуконазол – 0.002).

Иммунологический набор ТСИИ ББР включает: антигенный препарат, полученный ультразвуковой дезинтеграцией при частоте 23 кГц, амплитуде колебаний 7 микрон в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом; иммунную сыворотку, полученную гипериммунизацией кроликов по схеме: в/м введение полного адъюванта Фрейнда с антигеном по 0.5 мл и в/в инъекции 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 мл антигена с интервалом 3-4 дня с забором крови через 30 дней с момента начала инъекций. Иммунологический компонент используется в качестве подтверждающего теста в бактериологической схеме детекции.

Молекулярно-генетический набор ТСИИ ББР включает: комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб – «Проба ГС»; комплект реагентов для проведения амплификации участка ДНК, с уникальными системами праймеров: Pr1-1 (5' ccttccagcacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' cccctgtgccgggtgcctggacctggcg 3') для гена *BfrA* ДНК *B. bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggacgaccaggatcacatcttcc 3'), Pr3-2 (5' gcttctctggtagttgg-cgtagg 3') для гена *BfrZ*; Pr4-1 (5' gcattgctccatctgttgtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcg 3') для гена *Cytochrome-C-oxidase*; флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена *bfrZ*; комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза. Фаговый набор ТСИИ ББР включает биопрепарат на основе выделенных методом 3-х кратного ультрафиолетового облучения лизогенных штаммов *B. bronchiseptica* и селекционированных бактериофагов, обладающих общим спектром литического действия 92,5%; литической активностью по Аппельману  $10^7$ – $10^8$ , по Грациа  $3,1 \times 10^8$ – $4,3 \times 10^9$  активных корпускул в 1 мл.

**Заключение.** С помощью разработанной нами тест-системы индикации и идентификации бактерий вида *B.bronchiseptica* возможна постановка диагноза в течение 60-96 ч при использовании усовершенствованной бактериологической схемы. При проведении ПЦР или РНФ возможна постановка диагноза на бордетеллез в течение суток.

*Библиографический список*

1. Бордетеллёз животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина, О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко И.Г. - Ульяновск, 2014.
2. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции.- Ульяновская ГСХА, 2013. - С. 18-22.
3. Алгоритм использования тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, Е.И. Суркова // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 5. - С. 606.
4. Биотехнологический подход в разработке метода идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. - Ульяновская ГСХА, 2013. - С. 15-18.
5. Детекция бактерий *Bordetella bronchiseptica* в мультиплексной полимеразно-цепной реакции / Ю.Б.Васильева, А.В.Мастиленко, А.Г.Семанин, Д.С.Скорик, Е.И.Суркова // Аграрная наука - сельскому хозяйству: сборник статей. - 2014. - С. 253-257.
6. Наборы для детекции бактерий вида *B. Bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С.Скорик, А.Н. Пирюшова, Н.Р. Уралов // Актуальные в опросы контроля инфекционных болезней животных. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. - 2014. - С. 48-53.

7. Васильева, Ю.Б. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина //Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. - 2013. С. 28-32.

## IMPROVEMENT OF DIAGNOSTICS OF BORDETELLA

*Paladyeva D.E., Lomakin A.A.*

**Key words:** *bacteria, isolates, Bordetella, infection, PCR.*

*The article presents the results of the development of the test system of indication and identification of bacteria of the species *B.bronchiseptica*. The described compositions bacteriological, immunological, molecular genetics and phage kits for carrying out the detection of *Bordetella* and circuits laboratory analyses. The use of the test system can significantly reduce the time of the research compared to traditional methods.*