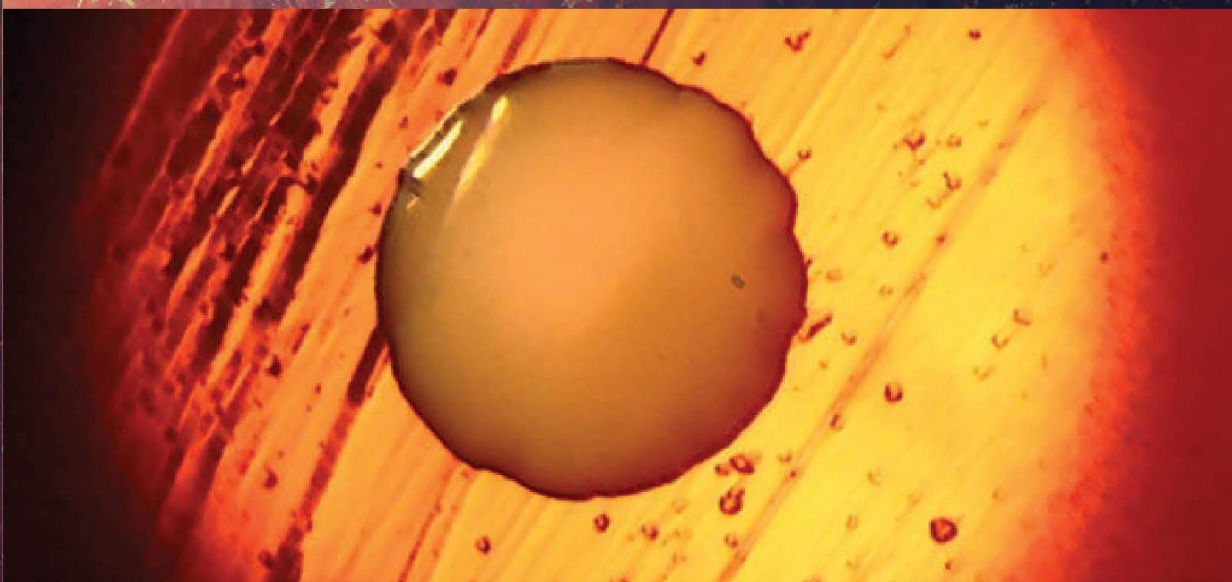


Д.А. ВАСИЛЬЕВ, Ю.Б. ВАСИЛЬЕВА, А.В. МАСТИЛЕНКО, Д.Г. СВЕРКАЛОВА, Е.Н.
СЕМАНИНА, О.Ю. БОРИСОВА, С.Н. ЗОЛОТУХИН, И.Г. ШВЕДЕНКО

БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ:

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ И
ВОЗБУДИТЕЛЯ, РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ



УЛЬЯНОВСК
2014

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

УЛЬЯНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ИМЕНИ П.А. СТОЛЫПИНА

Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева,
А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина,
О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Шведенко

БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ:

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ
И ВОЗБУДИТЕЛЯ,
РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО
УЛЬЯНОВСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ им. П.А. СТОЛЫПИНА

УЛЬЯНОВСК
2014

УДК 619:616.98:579.841.94:656.4
ББК 28.4

Васильев Д.А. БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики: монография / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. – 206 с.: ил.

Монография знакомит с эпизоотологией, диагностикой, методами терапии и профилактики бордетеллёза. В работе приведены результаты научных исследований по изучению биологии бактерий *Bordetella bronchiseptica*, методам их индикации и идентификации. Монография ориентирована на работников бактериологических лабораторий, ветеринарных специалистов, преподавателей, аспирантов, студентов ветеринарных факультетов, а также владельцев домашних животных.

Печатается по решению научно-технического совета ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» (протокол № 2 от 16.04.2013 г.).

Рецензенты:

О.А. Тугаринов, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией пищевых инфекций ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов «ВГНКИ»;

А.А. Нафеев, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области»

© Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина, О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ	
Историческая справка и распространение бордетеллёза	10
Эпизоотологическое и эпидемиологическое значения	13
Механизм развития	17
Клиническая картина и патологоанатомические изменения	19
Методы диагностики бордетеллёза	22
Лечебно-профилактические мероприятия	23
ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ	
Таксономия	33
Морфология и тинкториальные свойства <i>Bordetella bronchiseptica</i>	38
Культуральные свойства	43
Биохимические свойства	52
Устойчивость	57
Антигенный состав	75
Геном	83
Фаги бактерий рода <i>Bordetella</i>	88
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ <i>BORDETELLA BRONCHISEPTICA</i>	
Бактериологические методы	105
Иммунологические методы	120
Молекулярно-генетические методы	125
Детекция биосенсорами – бактриофагами	151
Тест-система индикации и идентификации <i>Bordetella bronchiseptica</i>	160
Заключение	167
Библиографический список	182

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Å	– ангстрем
АДФ	– аденозиндифосфат
ГЭ	– геном-эквивалент
ГЭ/мкл	– геном-эквивалент на 1 мкл
ГЭ/мл	– геном-эквивалентов на 1 мл
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	– иммуноферментный анализ
КОЕ	– колониеобразующие единицы
КОЕ/мл	– колониеобразующих единиц на 1 мл
МЕ	– международные единицы
мкл	– микролитр
м.к./мл	– количество микробных клеток в 1 мл
мл	– миллилитр
МПА	– мясопептонный агар
МПБ	– мясопептонный бульон
НИИЦМиБ	– научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии
п.н.	– пар нуклеотидов
п.о.	– пар оснований
пг	– пикограмм
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РА	– реакция агглютинации
РВР	– penicillin-binding proteins «пенициллинсвязывающие белки» энзимы, находящиеся в цитоплазматической мембране
РДП	– реакция диффузной преципитации
РИД	– Реакция иммунодиффузии
РИФ	– реакция иммунной флюоресценции
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РНФ	– реакция нарастания титра фага
РСК	– реакция связывания комплемента
РПГА	– реакция прямой гемагглютинации
УФЛ	– ультрафиолетовые лучи
ФВК	– фосфорно-вольфрамовая кислота
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ЧП	– чашка Петри
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
20 API	– система идентификации бактерий
API NPT	– система идентификации бактерий
BBR	– <i>Bordetella bronchiseptica</i>
CAV-1 и CAV-2	– аденовирусы
ELISA	– Enzyme-linked immunosorbent assay
kDa	– килодальтон
l	– расстояние, метры
NAD	– никотинамид-дифосфопиридиннуклеотид
NAG	– N-ацетилглюкозамин пентапептидный остаток пептидогликанов синтезируются в цитоплазме микробной клетки и транспортируются через цитоплазматическую мембрану.
NAM	– N-ацетилмураминовой кислоты пентапептидный остаток пептидогликанов синтезируются в цитоплазме микробной клетки и транспортируются через цитоплазматическую мембрану.
pmol	– пикомоль
SDS	– (додецилсульфат натрия) детергент, разрушающий нативную структуру клетки
t	– время облучения бактерий УФЛ, минуты
Tm	– температура плавления
Vitek AMS	– система идентификации бактерий

ВВЕДЕНИЕ

Первые сообщения о бордетеллёзе, как опасной инфекции дыхательного тракта животных были сделаны в начале XX века (N.S. Ferry, 1910). Затем долгое время возбудителю *Bordetella bronchiseptica* (*B.bronchiseptica*) не уделялось должного внимания. Дискуссионными были вопросы, связанные с патогенностью бактерий *B.bronchiseptica* и их способностью самостоятельно вызывать инфекционный процесс (М.М. Lopez, 1952; Н. Yoda et al., 1976; М. Pittman, 1984; В.Ј. Deeb et al., 1990; F. Dugal et al., 1991; В. F. Woolfrey et al., 1991; J.E. Bauwens и др., 1992; P. Gueirard, 1995; D.R. Woodard et al., 1995; М. Libanore и др., 1995; M.S.Dworkin et al., 1999; S. Mattoo et al., 2000).

В настоящее время бордетеллёз признан самостоятельной нозологической единицей, как высококонтагиозное инфекционное заболевание животных, вызываемое бактериями вида *Bordetella bronchiseptica*, характеризующееся поражением респираторного тракта, сухим, болезненным кашлем, рвотой, замедленным ростом и развитием, прогрессирующим исхуданием и высокой гибелью молодняка (А.А. Вербицкий, 2001; Б.Ф. Шуляк, 2003; Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; А.В. Мاستиленко и др., 2009; Д.Г. Сверкалова и др., 2010; Е.Н. Семанина, 2011; Ю.Б. Васильева, 2009-2014; М.Н. Прадед, 2013; S. Mattoo et al., 2005; T. Spilker, 2008; K. Register, E. Harvill, 2010; D. Wernli et al., 2011).

С 90-х годов прошлого века во многих странах мира ежегодно регистрируют массовые вспышки бордетеллёза животных. Серологические исследования показывают, что *B.bronchiseptica* явля-

ется ведущим инфекционным патогеном респираторной системы собак и кошек (А.Я. Миланко и др., 1995-1996; A.A. Jacobs et al., 1993; A.J. Coutts et al., 1996; R.M. Gaskell et al., 1997; D.A. Bemis, B. Fenwick, 2008; K. Register, E. Harvill, 2010; D. Wernli et al., 2011).

Установить точный уровень распространения бордетеллёзной инфекции достаточно сложно, так как чаще массово болеют и являются носителями уличные животные (Д.А. Васильев и др., 2011; Ю.Б. Васильева, 2013; D.A. Bemis, B. Fenwick, 2008).

Важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение бордетеллёза обусловлено длительным бессимптомным носительством возбудителя в организме животных и возможностью межвидовой и зооантропонозной передачи (А.В. Матиленко и др., 2014; Ю.Б. Васильева, 2013-2014; А.А. Нафеев и др., 2014; B.F. Woolfrey et al., 1991; J.E. Bauwens и др., 1992; P. Gueirard, 1995; D.R. Woodard et al., 1995; M. Libanore и др., 1995; M.S. Dworkin et al., 1999).

В литературе описано более 100 случаев инфицирования людей бактериями *B.bronchiseptica*. В основном возбудитель вызывает коклюшеподобное заболевание с поражением респираторного тракта, наряду с этим исследователи также наблюдали развитие эндокардитов, перитонитов, менингитов и раневой инфекции. Инфицированию в основном подвержены дети и люди с ослабленным иммунитетом. Анамнестические данные показывают, что во многих случаях наблюдался предварительный контакт зараженных людей с больными собаками, кроликами, свиньями, кошками (R. Goodnow, 1980; B.F. Woolfrey et al., 1991; B. Lorenzo-Pajuelo, 2002; Z. Ner, 2003; M.C. Jessica, 2006; A. Bose, 2008; J.J. Gisel et al., 2010; K.B. Register et al., 2012).

Учитывая, что возбудитель бордетеллёза собак и кошек (*B.bronchiseptica*) является и этиологическим инфекционным агентом атрофического ринита свиней и бронхисептикоза людей, возможна, не только эпизоотическая цепь, но и эпидемическая передача данной инфекции с клиническим проявлением у детей (риниты, фарингиты, ларинго-трахеиты, бронхиты, искривления носовой перегородки и зубов и др.).

В настоящее время бордетеллез домашних животных широко распространён в странах Западной Европы и США. Ученые следят за вспышками, разрабатывают диагностикумы, методы лечения и профилактики (М.М. Kattar et al., 2000; М.Н. Yuk, 2000; D. Wernli et al., 2011).

Несмотря на то, что бордетеллез домашних животных является актуальной проблемой во всем мире, в нашей стране заболевание недостаточно изучено. Данных по распространению, методам выявления и ликвидации бордетеллёза крайне недостаточно (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; А.В. Мاستиленко и др., 2009; Д.Г. Сверкалова и др., 2010; Е.Н. Семанина и др., 2011; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

Тогда как ранняя лабораторная диагностика бордетеллёза с выявлением возбудителя *B.bronchiseptica* должны занимать основное место в системе противозoonотических мероприятий и способствовать предупреждению и своевременной локализации очага инфекции (Д.А. Васильев и др., 2008).

Несогласованность данных различных авторов и отсутствие стандартных методик детекции бактерий *B.bronchiseptica* подтолкнуло нас к проведению исследований в данном направлении.

В настоящее время для лабораторной диагностики бордетеллёза, коклюша и паракоклюша рекомендован бактериологический метод с подтверждением в иммунологических реакциях согласно МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий» (2008). Однако данные многочисленных исследований показывают, что эти методы имеют ряд существенных недостатков. Эффективность бактериологического выявления метода редко превышает 40%, длительность анализа занимает до 8 суток и более. Для бактериологического исследования разработаны достаточно дорогие селективные среды, а культивирование на них занимает длительное время. Это связано со слабой устойчивостью бордетелл во внешней среде, медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным обследованием животных и людей с затяжным кашлем, нарушением правил забо-

ра и транспортировки материала, несовершенной рецептурой питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных ком-понентов (В.Д. Смирнов, 1998; Л.В. Феклисова, 2000; М.В. Сухинин, 2005; О.Ю. Борисова и др., 2008-2012; Г.И. Каратаев и др., 2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2010; Д.А. Васильев и др., 2011; Е.Н. Семанина и др., 2011; Ю.Б. Васильева, 2013; А.В. Мاستиленко и др., 2013).

Низкая эффективность иммунологической идентификации *B.bronchiseptica* обусловлена трудностями внутриродовой дифференциации различных видов бордетелл по антигенным свойствам. Применение иммунно-ферментного анализа ограничено особыми условиями воспроизведения, когда цельные бактериальные клетки должны иметь особую чистоту антигенных компонентов, их специфичность и афинность (Н.Н. Курова, 2001; А.А. Вербицкий, 2002; Б.Ф. Шуляк, 2003; Васильев и др., 2009; Мастиленко, 2010; О.Ю. Борисова, 2010;). Следовательно, бактериологические методы недостаточно чувствительны, а серологические – слабо специфичны.

Многие исследователи отмечают перспективность использования молекулярно-генетических методов для ускоренной детекции бордетелл (Е.С. Шобухова, 2000; О.Ю. Борисова и др., 2007-2012; Н.Т. Гадуа, 2012; С.Л. Williams, 2005; Е.М. Panina, 2005). Однако в настоящее время широкое применение полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для идентификации *B.bronchiseptica* ограничено в связи с отсутствием стандартизированных праймерных систем, позволяющих проводить точную внутривидовую диагностику. Поэтому перспективны конструирование мультиплексных тест-систем и разработка схемы проведения ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» для количественной оценки ДНК *B.Bronchiseptica* в биологическом материале (А.В. Мастиленко и др., 2008-2013; Д.А. Васильев и др., 2008-2013; Ю.Б. Васильева и др., 2011, 2013; D.J. Farrell et al., 2000; U. Reischlet al., 2001; K. Kusters et al., 2002; T. Anderson et al., 2003).

На сегодняшний день отечественными и зарубежными исследователями выделены и охарактеризованы более 10 бордетеллез-

ных бактериофагов. Однако не определена возможность их практического применения для детекции возбудителя *B.bronchiseptica* (Д.А. Васильев и др., 2010; Е.Н. Семанина и др., 2011; Ю.Б. Васильева, 2013; G.I. Karataev et al, 1988; T.A. Holzmayer et al, 1988; M. Liu et al., 2002, 2004; S. Doulatov et al., 2004).

В монографии приводится литературный анализ отечественных и зарубежных источников, а также результаты собственных исследований по совершенствованию методов детекции бактерий *B.bronchiseptica*, направленных на сокращение времени проведения анализов и повышения их чувствительности и специфичности.

Работа является частью комплексных исследований научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина» (номер Госрегистрации 0120.01157936).

Научные исследования получили грантовую поддержку со стороны государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012), а также в рамках реализации программ «УМНИК-2011» «СТАРТ-2012» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

ГЛАВА I

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ БОРДЕТЕЛЛЕЗА

Интерес к бактериям *B.bronchiseptica*, начиная с 1940-х годов, был вызван возможностью передачи диких штаммов из природных очагов в антропоургические к сельскохозяйственным и домашним животным. Были зарегистрированы сначала спорадические случаи заболеваний, затем эпизоотические вспышки (D.G. Evans, 1937, 1939).

В 1960-70 годы респираторные инфекции охватили свиноводческие хозяйства развитых стран мира. Возбудитель *B.bronchiseptica* был выделен как первичный этиологический агент. Заражение чистой культурой в лабораторных условиях приводило к сходной картине атрофического ринита и пневмонии у свиней, бордетеллёза у индеек и инфекционного трахеобронхита у собак (M.J. Appel et al, 1970).

В настоящее время бордетеллёз животных зарегистрирован и описан в Германии, США, Великобритании, Польше, Канаде, Венгрии, Норвегии, Японии, Мексике, Франции, Италии, Индии, Румынии, России, Украине, Беларуси. В зарубежной научной литературе описаны многочисленные вспышки бордетеллёза среди свиней, собак и кошек в странах Западной Европы и Соединенных Штатов Америки (S.E. Turnquist, E. Ostlund, 1997; A.J. Speakman, 1997; R.M. Gaskell et al., 1997; J.G. Bergman et al., 1997; J.D. Hoskins, 1997, 1998; H. Jungnitz et al., 1998; S.H. Binns et

al., 1999; M.S.Dworkin et al., 1999; M.M. Kattar et al., 2000; M.H. Yuk, 2000).

Бордетеллёз животных широко распространен и в странах СНГ. Так, в Украине заболевание составляет от 11 до 16% в общей инфекционной патологии собак, в республике Беларусь 5-32% свиней (А.Я. Миланко, 1996; А.А. Вербицкий и др., 2008).

Бордетеллез собак известный, как инфекционный трахеобронхит, инфекционный ларинготрахеобронхит, «питомниково-кашель», «комплекс вольерного кашля», «кашель псарен» или «собачий кашель», описан с начала прошлого века. Заболеваемость собак с рождения до года часто достигает 100% (N.S. Ferry, 1910; D.A. Bemis, 1977). В случаях смешанной инфекции возбудитель выделяют более, чем от 75% животных (J.P. McGowan, 1911; J. Winsser, 1960).

Часто заболевание протекает бессимптомно. H.D. Snow (1963), выделял *B.bronchiseptica* из носовых ходов 12,5% собак с латентным течением болезни и у 36% собак с поражениями респираторного тракта.

Первые упоминания об инфекционном бронхите кошек приводятся в 1911 году. Однако роль *B.bronchiseptica* в возникновении респираторных инфекций кошек была не полностью объяснена, хотя сообщалось, что её присутствие вызывает заболевание у экспериментально заражённых животных (J.P. McGowan, 1911).

В 1973 группа ученых изолировали *B.bronchiseptica* из легких и трахеи 10-ти кошек, умерших от пневмонии (S.K. Fisk, O.A. Soave, 1973).

S.B. Shyder и др. (1973) установили заболеваемость бордетеллёзом кошек в 10-48% случаев.

В 1991 году официально была зарегистрирована острая эпизоотическая вспышка бордетеллёза среди уличных кошек (H. Elliott, 1991), а 1996 году в питомниках Великобритании (A.A. Jacobs et al., 1993; A.J. Coutts et al., 1996). Тогда же было обращено внимание на факт, что животные содержались совместно и не изолировались от других зараженных особей. После *B.bronchiseptica* была выделена и при других вспышках респираторных заболеваний, как в

питомниках, так и от домашних кошек (K. Willoughdy et al., 1991; H. Elliott, 1991; R.D. Welsh, 1996; J.D. Hoskins, 1997; S.E. Turnguist, E. Ostlund, 1997).

В 1990-х годах был отмечен ряд острых респираторных эпизоотий среди породистых кошек (H.C. McArdle et al., 1994; J.D. Hoskins et al., 1998).

Серологические исследования показали, что 72% животных в Великобритании и 24,1% в США имели антитела к *B.bronchiseptica* (H.C. McArdle et al., 1994; A.J. Speakman, 1997).

При исследовании кошек в Великобритании, авторами установлено не только бордетеллоносительство у 3-11% исследуемых животных, но и возможность передачи инфекции другим животным, в частности собакам (H.C. McArdle et al., 1994; A.J. Speakman, 1997, S.H. Binns et al., 1999).

В Нидерландах 36% домашних кошек являются бордетеллоносителями (J.G. Bergman et al., 1997).

Серологические исследования свидетельствуют о том, что воздействие на организм животных *B.bronchiseptica* довольно распространено. Число инфицированных кошек и собак периодически меняется. 80% серопозитивных результатов зарегистрированы среди кошек и собак с заболеваниями дыхательных путей, содержащихся в приютах. Самые низкие показатели у домашних животных: 9% - у здоровых кошек и 14% - у животных с заболеваниями дыхательных путей (D.J. McMillan et al., 1999; D.G. Baker, 2003).

Клинические исследования показали, что *B.bronchiseptica* в последние десятилетия стала ведущим инфекционным патогеном респираторной системы кошек. Этот возбудитель был изолирован в питомниках, свободных от герпесвируса и калицивируса, что подтверждено вирусологическими и серологическими исследованиями (S. Dowson et al., 2000; Helps et al., 2005).

В исследовании, проведенном в 2000 году S. Dowson et al. у 19% уличных кошек, 13.5% кошек из питомников и у 3% домашних питомцев выделили возбудителя *B.bronchiseptica*. Всего авторы обследовали 740 животных.

В исследовании, проведенном Helps et al. (2005) было показано. Что из 1724 кошек с респираторной симптоматикой у 218 животных (5%) этиологической причиной заболевания явились бактерии *B.bronchiseptica*, тогда как 1051 животное (61%) были серопозитивны к возбудителю.

Статистические данные по распространению в России бордетеллёза домашних животных отсутствуют (Д.Г. Сверкалова и др., 2010; Д.А. Васильев и др., 2011; Е.Н. Семанина и др., 2011; Ю.Б. Васильева, 2013; А.В. Мاستиленко и др., 2013).

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

В отношении эпизоотологической характеристики и эпидемиологической роли на сегодняшний день остается много открытых вопросов. Первичный резервуар *B.bronchiseptica* не выявлен, слабо раскрыт вопрос о внутривидовой и межвидовой передаче возбудителя в природе.

Фактически все теплокровные животные восприимчивы к инфицированию *B.bronchiseptica*. Болеют, как домашние животные: собаки, лошади, свиньи, козы, кролики, кошки, хомяки, крысы, морские свинки, птицы, так и дикие: обезьяны, лисы, грызуны, хорьки и многие другие животные (Ю.Б. Васильева и др., 2009; Д.Г. Сверкалова и др., 2010-2011; B.J. Deeb et al., 1990; B.F. Woolfrey et al., 1991; C.A. Guzman et al., 1994; M.H. Yuk, 2000).

Восприимчивость у разных видов животных неодинакова. Высоко восприимчивы собаки, свиньи, кошки; умеренно – крысы, кролики и лошади; мало восприимчивы – птицы, мыши и люди (B.J. Deeb et al., 1990; P.A.Cotter, 1997).

Бордетеллёз чаще наблюдают у молодых, старых или животных, страдающих хроническими заболеваниями. Щенята заболевают чаще в четырех-пяти недельном возрасте, котята – в

10-ти недельном (K. Willoughby et al., 1991; R.D. Welsh, 1996, S.E. Turnquist, Ostung, 1997).

Основными источниками возбудителя инфекции являются больные животные и реконвалесценты, а также особи с латентным течением болезни.

У значительной части заразившихся животных инфекция протекает бессимптомно. Часть переболевших животных остается на длительное время бактерионосителями. Обе категории представляют повышенную опасность, как трудно выявляемые источники инфекции для контактирующих с ними восприимчивых животных. Носительство сохраняется от 4-5 недель до нескольких лет. В опытах на морских свинках, кроликах и свиньях было показано, что доля бессимптомных проявлений может достигать 20% и более (M.F. De Jong, 1992; H. Schipper et al., 1994).

Наиболее активно бактериальный агент выделяется во внешнюю среду в острый период заболевания. Во внешней среде, в условиях помещений возбудитель может сохраняться до 20 дней и более (A.A. Jacobs et al., 1993; R.M. Gaskell et al., 1997).

Установлено, что в воде стоячих водоемов бордетеллы могут длительно переживать, что предполагает межвидовую передачу без прямого контакта (J.F. Porter, 1991, 1993; S.L. Brockmeier, 1999).

Передача инфекции от больных животных происходит воздушным или контактным способами. Возможна и опосредованная передача возбудителя через инфицированные корма, воду, грызунов (W.P. Switzer, D.O. Farrington, 1972; H. Yoda, 1976; J.F. Porter et al., 1993).

Заражение от экспериментально инфицированных к восприимчивым собакам происходит в течение 1-4 дней (I.A.P. McCandlish et al., 1978; M.H. Yuk, 1998).

Высокая концентрация собак и кошек на ограниченной территории (питомник, гостиница для животных, микрорайон, дом, квартира) является одним из основных предрасполагающих факторов заражения (J.S. Wagener, 1994).

Инфекцию следует считать контагиозной, поскольку нередко заражение происходит после непродолжительного контакта с ее

источником, например, при посещении ветеринарной лечебницы, на выставке (A.J Speakman, 1997, S.H. Binns et al., 1999).

Пики энзоотии наблюдаются в периоды рождения и отъёма приплода от матерей. В результате неблагоприятного воздействия различных стресс-факторов (температурного, биологического и др.) инфекция даёт новую вспышку, сопровождающуюся летальностью до 30% и более (H. Elliott, 1991; R.D. Welsh, 1996; J.D. Hoskins, 1997).



Рис 1. Звенья эпизоотического процесса

При резком снижении общей иммунобиологической резистентности и при наличии в питомнике скрытых носителей возможно спонтанное возникновение заболевания. Заболевание имеет выраженную сезонность в зимне-весенний и осенне-зимний периоды (A.A. Jacobs et al., 1993; A.J. Coutts et al., 1996).

В условиях скученного содержания животных бордетеллёз зачастую осложняется пастереллёзом, аденовирозом, гриппом и другими инфекциями, протекая по типу ассоциированной болезни. При этом клиника заболевания, степень патологоанатомических изменений выражены ярче, значительно больше и гибель молодняка (H.C. McArdle et al., 1994; A.J. Speakman, 1997).

Ретроспективный анализ литературных источников показывает, что вопросы об этиологической роли бактерий *B.bronchiseptica* в отношении заболеваний человека являются малоизучен-

ными (B. Lorenzo-Pajuelo, 2002; Z. Ner, 2003; M.C. Jessica, 2006; L. Gopinathan, 2007; Y. Irie, 2007; A. Bose, 2008; J.J. Gisel et al., 2010; K.B. Register et al., 2012).

Возможность межвидовой передачи возбудителя среди животных подтверждают анализы генома, показывающие идентичность длинного фрагмента *B.bronchiseptica* (H. Elliot, 1991; S.H. Binns et al., 1999; S. Dawson et al., 2000; C. Boursaux-Eude, H. Guiso, 2000; K.B. Register et al., 2012). Подтверждающие генетические доказательства зоонозной передачи возбудителя в настоящее время отсутствуют (K.B. Register et al., 2012).

Риск возможной зооантропонозной передачи впервые предположили К.Н. Kristensen, Н. Lautrop (1962), а позднее В.Ф. Woolfrey, J. Moodi (1991). В последующем Р. Gueirard et al. (1995), описали возможность передачи микроорганизма от кролика человеку. Известны случаи возможной передачи инфекции от кошек, собак, свиней человеку (К.Н. Kristensen, Н. Lautrop, 1962; D.B. Stoll et al., 1981; P. Gueirard et al., 1995; E.L. Hewlett, 1995; J.D. Hoskins et al., 1998; V.L. Re et al., 2001; G. Viejo et al., 2002; F. Wallet et al., 2002).

В литературе приводится более 100 случаев инфекционных процессов у людей, вызываемых бактериями *B.bronchiseptica* (J. Sastre. et al., 1991; F. Tamion et al., 1996; J.D. Hoskins et al., 1998; V.L. Re et al., 2001; G. Viejo et al., 2002; F. Wallet et al., 2002; B. Lorenzo-Pajuelo, 2002; Z. Ner, 2003; S. Mattoo, J.D. Cherry, 2005; M.C. Jessica, 2006; L. Gopinathan, 2007; Y. Irie, 2007; A. Bose, 2008; T. Spilker, 2008; J.J. Gisel et al., 2010; K.B. Register et al., 2012).

По данным В.Ф. Woolfrey, J.A. Moody (1991), заболевание, вызванное *B.bronchiseptica* у человека, регистрируется в 0,5% случаев бордетеллезов.

В большинстве случаев бордетеллез (бронхосептикоз) людей связывают с иммунодепрессивным состоянием пациентов и в анамнезе не учитывают возможный контакт людей с больными животными (E.L. Hewlett, 1995; J.D. Hoskins et al., 1998; V.L. Re et al., 2001; G. Viejo et al., 2002; F. Wallet et al., 2002; L.H. Byrd, 1981; B.P. Buggy, 1987; K. Bromberg, 1991; B.F. Woolfrey et al., 1991; J.E. Bauwens et al., 1992; M. Libanore et al., 1995; D.R. Woodard et

al., 1995; L. Gomez et al., 1998; M.S. Dworkin et al., 1999; B. Lorenzo-Pajuelo, 2002; A. Bose, 2008).

В литературе описаны как случаи выделения бактерий *B.bronchiseptica* из респираторного тракта людей, так и из крови, слюны, паренхиматозных органов (J.J.S. Snell, 1973; H.K. Ghosh, J. Tranter, 1979; K.H. Katzenstein et al., 1984; C.J.Papasian et al., 1987; E.L. Hewlett, 1995; J.D. Hoskins et al., 1998; V.L. Re et al., 2001; G. Viejo et al., 2002; F. Wallet et al., 2002; B. Lorenzo-Pajuelo, 2002; A. Bose, 2008).

В педиатрии описаны случаи инфицирования бактериями *B.bronchiseptica* детей, страдающих муковисцидозом. Предположительным источником заражения послужили домашние животные (D. Moissenet et al, 2005; Z. Ner et al., 2003; T. Spilker, 2008; K.B. Register et al., 2012)

Таким образом, можно заключить, что *B.bronchiseptica* не только самостоятельно вызывает поражение дыхательных путей у домашних животных и людей, но и, вероятно зооантропонозная передача возбудителя.

МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Основные данные о патогенезе бордетеллеза получены экспериментальным путем в 1970-80 годах (H. Thompson et al., 1976; P.T. Hooper et al., 1985).

Инфекция носит местный характер. Бактерии обнаруживают в большом количестве в респираторном тракте, не зависимо от способа заражения: интраназально, интратрахально, аэрозольно или при контакте.

При участии филаментозного гемагглютинаина, пертактина и фимбрий бордетеллы адгезируются к реснитчатым эпителиальным клеткам респираторного тракта, на которых быстро размножаются. Колонизация слизистой оболочки органов дыхания

не приводит к бактериемии. Вслед за колонизацией эпителиоцитов регистрируют уклонение возбудителя от иммунного ответа. Бордетеллы начинают выделять дермонекротический токсин, фермент аденилатциклазу-гемолизин и липополисахарид, которые разрушают эпителиальную выстилку респираторного тракта и находящиеся там фагоциты, затрудняя элиминацию агента из органов дыхания. Вирулентные штаммы бордетелл, индуцирующие цилиостаз эпителия респираторного тракта, отличаются отсутствием пилей, гемолитической активности и синтеза внеклеточной аденилатциклазы.

Инфекция провоцирует состояние повышенной чувствительности бронхов к гистамину и метахолину, что является одной из причин приступов пароксизмального кашля. Кашель при значительном снижении активности реснитчатого эпителия становится единственным способом освобождения дыхательных путей от скопления в них слизи, бактерий, токсинов и продуктов их метаболизма. Отмечают лейкоцитоз с лимфоцитозом, гипогликемию вследствие гиперинсулинемии, возможно развитие энцефалопатии из-за кислородного голодания, связанного с пароксизмальным кашлем (S. Mattoo et al., 2000).

Максимальное накопление бактерий в дыхательных путях и проявление клинических признаков обычно совпадают по времени и приходятся на 3-7-й день после заражения. Средний инкубационный период для *B.bronchiseptica* составляет 6,5 дней. Симптомы проявляются от нескольких дней до нескольких недель (M.V. Thrusfield et al., 1992; S. Mattoo et al., 2000).

Даже у собак, не имеющих контакта с окружающей средой, респираторный тракт очищается в течение 3-х месяцев (D.A. Bemis et al., 2007).

Заболевание протекает тяжелее, если на организм животных действуют факторы, снижающие иммунитет, вызывающие раздражение слизистой оболочки органов дыхания и способствующие развитию гипоксии: плохая вентиляция, высокая концентрация животных в помещении, отсутствие прогулок на свежем воздухе, пыльные помещения (Н.Н. Губкина и др., 2008).

При ассоциированных инфекциях, отсутствии лечения и неудовлетворительных условиях содержания и кормления животных болезнь нередко принимает затяжное, хроническое течение. В этом случае риск возникновения бактерионосительства возрастает (S. Mattoo et al., 2000; D.A. Bemis et al., 2007).

На фоне напряженного иммунитета инфекция обычно принимает абортивную форму, заканчиваясь быстрым выздоровлением животного.

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА И ПАТОЛОГОАТОМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Инкубационный период бордетеллёза домашних животных при экспериментальном инфицировании составляет 4-7 дней, при естественном – до 14 дней. Чем выше доза возбудителя, тем быстрее проявляются клинические признаки (Д.Г. Сверкалова и др., 2007; Y.B. Vasylyeva, 2013).

Клинические признаки *при естественном заражении* ярко выражены, наиболее характерны и не исчезают в течение 3-4 месяцев и более. Начальный признак заражения: депрессия, чихание, анорексия, пирексия и серозные истечения из глаз и носа, которые затем становятся гнойными из-за вторичной инфекции. При *экспериментальном заражении* возникает пирексия, чихание, носовые истечения, субмандибулярная лимфаденопатия и кашель. Признаки исчезают через 10 дней, бронхопневмония не развивается. (C.R. Helps et al., 2005; B. Di Martino et al., 2007; H. Egberink et al., 2009).

Бордетеллёз протекает в острой, подострой и хронической формах (Д.А. Васильев, 2007; Д.Г. Сверкалова и др., 2007; Н.Н. Губкина и др., 2008; Ю.Б. Никульшина и др., 2008).

Для *острого течения* характерны: выраженное угнетение, частое затруднённое, сопящее дыхание, лихорадка ремитирующего типа; повышение температуры тела до 40,0-40,5 °C и выше; отказ

от корма (сосание матерей), конъюнктивит. Наиболее выраженным признаком является кашель (от редкого, мягкого до тяжёлого, с приступами удушья, осложняющегося рвотой).

Кашель легко можно вызвать незначительным раздражением или касанием в области трахеи. Развиваются двусторонние слизисто-гнойные истечения из носовой полости. Животные значительно худеют в течение 1-3 недель. «Голос» животного становится хриплым. При осмотре ротовой полости в этот период констатируют отечную гиперемию мягкого нёба и миндалин. Увеличиваются шейные и подчелюстные лимфатические узлы (Ю.Б. Никульшина, 2008).

Животные становятся вялыми, неохотно поднимаются, стонут. Острая форма длится 1-2 недели – это первая волна энзоотии (Д.Г. Сверкалова и др., 2007; Н.Н. Губкина и др., 2008).

Если животные погибают, то в верхушечных и сердечных долях лёгких находят разной конфигурации плотные очаги воспаления синевато-ржавого цвета. Поражаются чаще крайние участки лёгких, которые имеют чёткую демаркацию, а при их вскрытии выявляют мелкие некротические фокусы коричневого цвета. Наряду с этим, отмечают увеличение и гиперемию бронхиальных лимфатических узлов, слизистых оболочек трахеи и бронхов, а в их просветах – скопление слизи.

В *подострых случаях* инфекция осложняется секундарной микрофлорой; при этом отмечается продолжительный, судорожный кашель, удушье, хрипение, слизистые истечения из носовой полости, жажда; подушечки лап трескаются. Если в процесс вовлечено большое количество животных, то инфекция протекает значительно тяжелее с развитием генерализованного поражения лёгких. Больные отстают в росте и развитии, худеют и массово гибнут. При аускультации грудной клетки на вдохе отчётливо слышны шумы. Начиная с четырёхнедельного возраста, развитие костной основы верхней челюсти у щенят задерживается, нарушается прикус резцовых зубов.

После отъёма щенят и котят, бордетеллёзная инфекция даёт новую вспышку (вторая волна энзоотии) и переходит в *хрони-*

ческую форму. При хроническом течении и осложнении заболевания секундарной микрофлорой, в воспалительный процесс втягиваются другие органы и ткани. В таком случае выявляют слипчивый плеврит, перикардит, а также лёгочные абсцессы; поражённые участки приобретают серовато-жёлтый цвет. Очаги воспаления могут иметь как локализованный, так и диффузный характер, а патологоанатомические изменения при этом отличаются разнообразием и зависят от длительности процесса. При локализованной форме поражения в лёгких находят отдельные очаги, а при диффузной (продолжительность процесса более двух месяцев) – выявляют лobarные, с охватом передних, сердечных, дополнительных, а иногда и диафрагмальных долей (Д.Г. Сверкалова и др., 2007; Ю.Б. Никульшина и др., 2008; Н.Н. Губкина, 2008).

Кашель у кошек отмечается реже, чем у собак. Бордетеллёз проявляется чиханием и нозальными истечениями (R.D. Welsh, 1996; C.R. Helps et al., 2005; B. Di Martino et al., 2007). Описаны случаи развития цианоза и бронхопневмонии со смертельным исходом у кошек (K. Willoughby et al., 1991; B. Di Martino et al., 2007; H. Egberink et al., 2009).

В большинстве случаев бордетеллёз может заканчиваться самовыздоровлением (K.U. Sorenmo, 1993), но могут возникать осложнения. Факторы риска для развития осложнения включают нарушения иммунного статуса (P.A. Radrid, 1990) или хронические заболевания дыхательных путей, такие как бронхит (D.F. Edwards, 1989), ресничная дискинезия (M.J. Dallman, 1988) и коллапс трахеи (M.V. Thrusfield, 1992; B. Di Martino et al., 2007).

Осложнениями инфекции могут быть хронические риниты, синуситы, пневмонии, конъюнктивиты, кератиты, кашель, истощение, обезвоживание, поражения кожи, аборт, заболевания желудочно-кишечного тракта в виде рвоты и диареи. Даже при осложненном течении болезни смертность невысока (Д.Г. Сверкалова. 2007; Ю.Б. Никульшина, 2007; M.V. Thrusfield, 1992; B. Di Martino et al., 2007).

ДИАГНОСТИКА БОРДЕТЕЛЛЕЗА

Диагноз на бордетеллёз устанавливают на основании комплексных клинико-эпизоотологических данных, результатов бактериологических исследований и при необходимости патологоанатомического заключения (Y.B. Vasylyeva, 2013).

При сборе эпизоотологических данных обращают внимание на стационарность, медленное распространение инфекции, подъем заболеваемости в периоды получения приплода и его отъема, а также зависимость интенсивности эпизоотологического процесса от сопутствующих факторов (Н.Н. Губкина и др., 2008; Ю.Б. Никульшина и др., 2008; Ю.Б. Васильева, 2013).

В лабораторию направляют материал от больных животных, отобранный в период максимального проявления у них клинических признаков (выраженное угнетение, температурная реакция, чихание, кашель, выделения из носовых отверстий) или от павших собак (поражённые участки лёгких, бронхиальные лимфатические узлы, бронхиальная слизь), взятый не позднее, чем через 3-4 ч после их гибели. Небольшие трупы животных отправляют в лабораторию целиком. Тампоны с носовой слизью исследуют не позднее 3-4 ч с момента их отбора. Слизь, отобранную из носовой полости или трахеи, центрифугируют при 2500 – 3000 об/мин в течение 15 минут, а из надосадочной жидкости делают высевы на питательные среды (Д.Г. Сверкалова и др., 2007).

Пробы берут с тонзиллитной и околофарингеальной областей или из нозальной впадины, микроорганизм может быть выделен и из других органов. Используются также и трахеальные смывы (Д.А. Васильев и др., 2007; Ю.Б. Никульшина и др., 2007; А.В. Мاستиленко и др., 2010; R.D. Welsh, 1996). Забор материала осуществляют с помощью стерильного ватного тампона на селективную среду. Для выделения *B.bronchiseptica* обязательно используется селективная среда, так как довольно трудно изолировать бордетеллы от других микроорганизмов, составляющих флору носа и глотки. Если это затруднительно, получают смывы из глубины носовой полости. При невозможности доставки взятого патма-

териала в первые часы после взятия его хранят при температуре от 4 до 10°C. Для его доставки в лабораторию, в случаях, когда на это требуется до 48 ч (Ю.Б. Васильева, 2013).

Для лабораторной идентификации возбудителя рекомендованы культуральный и иммунологические методы. В сложных случаях ставят биологическую пробу на двухнедельных щенках. Их заражают интраназально суточной культурой бордетелл или суспензией из поражённых участков лёгких, бронхиальных лимфоузлов в дозе по 0,5-1 мл в каждую ноздрю (500 млн. микробных тел в 1 мл). В положительном случае через 4-7 дней щенки заболевают с типичным проявлением клинических признаков. На 14-20 день титры агглютининов в сыворотках их крови достигают 1:80 – 1:160 (R. Parton, 1998).

Бордетеллэз дифференцируют у собак от чумы плотоядных, пастереллёза, аденовирусной инфекции, парагриппа; у кошек от панлейкопении, калицивироза, герпесвирусной инфекции, микоплазмоза, хламидиоза, у свиней от пастереллеза, гриппа, некротического ринита.

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ

Главными условиями успешной ликвидации вспышек бордетеллёза животных являются раннее выделение возбудителя и определение его чувствительности к антибиотикам, своевременно начатое лечение, комплексность и систематичность в проведении оздоровительных мероприятий, включающих общие и специальные ветеринарно-санитарные меры. Комплексный метод лечения должен включать антимикробную, симптоматическую, неспецифическую, стимулирующую, физио- и диетотерапию (А.Я. Миланко, 1996; Б.Ф. Шуляк, 2003; Д.А. Васильев, 2008; Ю.Б. Васильева, 2013).

Некоторые авторы рекомендуют не лечить животных со слабыми клиническими признаками бордетеллёза. Они считают,

что достаточно не волновать больное животное, чтобы не вызывать приступов судорожного кашля. Отдых и предотвращение кашля помогают успешно справиться с несложными случаями бордетеллёза (R.B. Ford, 1990; D.A. Bemis, 1992).

Мы считаем, что эта мера не допустима, даже если домашние животные содержатся изолированно. Так как без применения этиотропных средств животные в течение 3-4, а иногда и более месяцев являются источником инфицирования, в том числе и для окружающих людей. Даже, если клинические признаки выражены умеренно, это не исключает контаминации бронхов (Д.А. Васильев и др., 2008; Ю.Б. Васильева и др., 2013).

При выраженности клинических признаков необходим подбор антибактериальной терапии на основании определения чувствительности выделенных штаммов к противомикробным средствам. Если данную процедуру невозможно провести, то рекомендуется применение тетрациклинов (S. Dawson et al, 2000; Helps et al., 2005).

Антибиотикотерапия в начальной стадии инфекции профилактирует развитие или снижает тяжесть симптомов болезни, а в последующем - секундарных инфекций. Кроме того, она предотвращает возникновение бактерионосительства. Наибольший терапевтический эффект даёт комплексное применение антибиотиков с сульфаниламидами. (Д.Г. Сверкалова и др., 2008)

В идеале антимикробная терапия должна основываться на результатах, полученных *in vitro*. Подбор эффективного химиотерапевтического средства значительно снижает период активного кашля (R.B. Ford, 1990, 1991; M.Y. Thrusfield, 1991; D.A. Bemis, 1992; J.P. Thys, 1994; A.J. Speakman et al., 1997).

Антимикробные препараты вводят аэрозольно или интратрахеально. Это обеспечивает более направленное использование лекарств, таких как аминогликозиды или полимексин, которые плохо поглощаются слизистой поверхностью и токсичны при парентеральном применении. Аэрозольные обработки канамицином, гентамицином, полимексином и колистином улучшают клинические признаки и уменьшают количество бордетелл в

трахее экспериментально зараженных собак. Антибиотики достигают терапевтической концентрации в дыхательных органах, плохо всасываются из респираторного тракта, исключая риск лекарственного токсикоза. Зарубежные авторы через неделю после окончания аэрозольных обработок бактерий в бронхах и трахее у собак не обнаруживали (D.A. Bemis, 1977; T. Turner, 1987; P.M. Dixon, 1988; J.P. Thys, 1994).

Интратрахеальное применение антибиотиков может быть выполнено с помощью иглы (B.C. McKiernan, 1978). Этот метод позволяет вносить антимикробные препараты только в крупные образования респираторного тракта и применяется редко (R.B. Ford, 1990; J.P. Thys, 1994).

Некоторые исследователи для лечения бордетеллеза рекомендуют тетрациклин (R.B. Ford, 1990; P.H.M. Savelkoul, 1993; J.C. Angus, 1997).

Цефалоспорины, начиная с третьего поколения, уже могут играть роль в лечении респираторных болезней. Несмотря на высокую активность против некоторых грам-отрицательных патогенов, цефтиофур-натрий и некоторые другие цефалоспорины третьего поколения не активны против бактерий *B.bronchiseptica* (R.J. Yancey et al., 1987; E. Bergogne-Berezin, 1994; E. Bergogne-Berezin, 1994; H. Lode, 1994; J.C. Angus, 1997).

Ципрофлоксацин и офлоксацин эффективны при введении внутривенно или в высоких дозировках. Эффективность кларитромицина и азитромицина против *B.bronchiseptica* делает их приемлемой альтернативой тетрациклину при лечении молодых собак с заболеваниями дыхательного тракта.

Сульфаниламиды влияют на синтез бактериальной фолиевой кислоты. Их действия могут быть потенцированы, например, триметопримом. Применение триметоприм-сульфадiazина уменьшило концентрацию бордетелл и предотвратило реинфекцию (I.A.P. McCandlish, 1979; M.Y. Thrusfield, 1991; B.F. Woolfrey, 1991). Из сульфаниламидных препаратов используют сульфадиметоксин, тримеразин, сульфатон, бисептол (Д.В. Душкин, 1998; R.B. Ford, 1990).

В Европе бромгексидиновая терапия увеличила эффективность кситетрациклина при лечении бордетеллёза собак, возможно, за счет повышения уровня препарата в бронхиальной слизи (I.J. Hackett, 1988).

Однако некоторые исследователи отмечают, что введение антимикробных средств в респираторный тракт перорально и парентерально, может быть не достаточно эффективно для подавления *B.bronchiseptica*. Так, лечение эритромицином и хлорамфениколом, ампицеллином, тетрациклином или тилозином орально и канамицином или гентимицином парентерально не уменьшило количество бактерий в трахее и бронхах у экспериментально зараженных собак (Н.М. Williams, 1975; D.A. Bemis, 1977; T.C. Amis, 1986).

Для снижения угнетающего действия антибиотиков и сульфаниламидов на иммунитет животных, их применение комбинируют с кортикостероидным препаратом – преднизолоном, кроме того, последний эффективно снимает воспалительные явления. Терапию дополняют бронходилататорами, которые уменьшают раздражение в дыхательном тракте.

Современное комплексное лечение бордетеллёза животных достаточно эффективно (95-96%) (А.Я. Миланко и др., 1996).

После выздоровления у животных формируется длительный напряженный иммунитет. Лишь изредка регистрируют повторные случаи заражения. В защите от инфекции участвуют специфические и неспецифические факторы иммунитета. На ранней стадии инфекции основную роль в защите от *B.bronchiseptica* играют нейтрофилы. В процессе развития инфекции возрастает концентрация С-реактивного протеина. Дермoneкротический токсин подавляет иммунный ответ. Антигены возбудителя индуцируют протективный иммунный ответ (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Разработка вакцин против бордетеллеза с нетоксичными компонентами – одна из главных задач промышленной биотехнологии.

Существует три типа вакцин: живая авирулентная вакцина, из стенок бактерий и из экстрагированного антигена (Б.Ф. Шуляк, 2003).

За рубежом выпускают целый ряд живых вакцин против бордетеллёза собак, часть из них представляет собой поливалентные препараты, в состав которых включены вакцинные штаммы вируса парагриппа и аденовируса собак, что диктуется ролью этих агентов, как ассоциантов (D.W. Chladek, 1981; F.J. Shade, 1993). Вакцины доступны для интранозального применения. Они эффективнее антител полученных, от матери, поэтому желательно использовать их для профилактики заболевания у щенков. Интранозальное применение вакцин стимулирует выработку системных антител (Ig G) и местных секреторных (Ig A). Поскольку на интенсивность выработки последних не оказывает влияние наличие у прививаемого щенка колострального иммунитета, то интраназальную вакцинацию можно проводить уже в 2-14-недельном возрасте. Через 3-5 дней после вакцинации у животных развивается протективный иммунитет, который защищает их от инфекции в течение 10-12 месяцев. Поэтому ревакцинацию этими препаратами проводят с интервалом в 6 или 12 месяцев. Заболеваемость бордетеллёзом уменьшается у привитых собак на 96% (E.J. Kontor et al., 1981).

Протективный эффект живой аттенуированной вакцины против бордетеллеза собак проявляется уже через 48 ч после ее интранозального введения. К 4, 5 и 14 дням после вакцинации протективный эффект достигает уровня 56%, 83% и 95%. В течение 21 дня после вакцинации титр сывороточных специфических антител вырастает с 0 до 1:128. Секреторные IgA выявляются на слизистой оболочке респираторного тракта через 4 дня после вакцинации в титре 1:16; через 3 недели их титр возрастает до 1:1024. Интранозальные вакцины успешно применяются у беременных сук и новорожденных щенков (L.T. Alkire, 1980; R.F. Bey et al., 1981). Собаки остаются носителями авирулентных вакцинных штаммов минимум 2 недели, при этом передача их от собаки к собаке не изучена (R.A. Goodnow, 1980).

По данным некоторых ученых, комбинированная вакцина с включением в состав штамма аденовируса коммерчески не приемлема (L.T. Glickman, 1981).

Возможность перехода авирулентного вакцинного штамма к вирулентному в организме маловероятна, но у всех живых вакцин опасность реверсibilityности существует. После интраназальной иммунизации у части собак появляются клинические признаки лёгкого респираторного заболевания, которые спонтанно проходят за несколько дней (G.N. Ostle, 1989).

Наличие в этом типе вакцин живого микроорганизма диктует необходимость особого контроля за применением их для животных со сниженным иммунитетом, а также собак, страдающих хроническими заболеваниями.

Например, интенсивное использование вакцин против родственного бордетеллёзу коклюша в Европе и Америке привело к появлению с цикличностью 3-5 лет штаммов агента, резко отличающихся в антигенном плане от ранее циркулировавших (О.А. Борисова, 2008). В Японии, где применяют только бесклеточные вакцины против этой инфекции, изменения антигенной структуры циркулирующих штаммов *B.pertussis* не происходит. Вероятно такая же ситуация может сложиться в будущем и в ветеринарии, по мере более интенсивного применения цельноклеточных живых вакцин (B.T. Cookson, W.E. Goldman, 1987; T. Aoyama, 1992; D.J. McMillan et al., 1996; M.J. Corbel, 1997; L. Bassinet, 2000).

Не допускается подкожное применение живых вакцин, т.к. это влечет за собой развитие тяжелых осложнений. Имеются данные о том, что авирулентные вакцинные штаммы *B.bronchiseptica* генетически и антигенно отличаются от полевых изолятов возбудителя. Это может быть причиной недостаточно высокого и продолжительного протективного эффекта вакцин (L. Bassinet, 2000).

Другая группа вакцин произведена из клеточных стенок бактерий *B.bronchiseptica*. Для повышения иммуногенности в состав вакцин этого типа включают гидроокись алюминия адъювант. Они создают менее напряженный системный иммунитет (Ig G), чем живые вакцины, и защищают от заражения 67-75% привитых собак (S.B. Snyder et al., 1973). Пока нет информации

о способности этой вакцины стимулировать местные секреторные антитела. Вакцина может уменьшить системные осложнения бордетеллёза. Привитая собака может заразиться *B.bronchiseptica*, но заболевание протекает в легкой форме. Важным фактором при выборе вакцины является концентрация материнских антител у непривитых щенков. Колостральный иммунитет оказывает отрицательное влияние на результаты иммунизации животных убитыми бактериями. Поэтому их применяют обычно для животных в возрасте 3-4 месяцев и старше. Животных ревакцинируют через 2 недели после первой вакцинации, а затем однократно с интервалом в 1 год. Вакцины могут содержать липополисахариды (эндотоксины), как компонент стенок грамотрицательных бактерий, что ведет к патологической реакции на вакцинацию и иногда к летальному исходу. Зарегистрированы единичные случаи гибели привитых ими собак (R.J. Fass, 1980).

Ранее попытки иммунизировать собак парентерально вакциной из стенок клеток бактерий были не очень успешны. Несмотря на то, что они давали высокий уровень антител в крови, они не представляли защиты от болезни, а в месте введения часто возникали абсцессы (D.A. Bemis, 1977; M.E. Shelton, 1977; I.A.P. McCandlish, 1978; R.A. Goodnow, 1980). Современные методы инаktivирования бактерий и дозировки антигенов позволили создать более эффективный и менее опасный препарат из клеточной стенки бактерий *B.bronchiseptica*. Сейчас имеются, как моновалентные препараты – «КохГард-В», так и в комбинации с измененными живыми вирусами: парагриппа, чумы собак, аденовируса типа 2 и парвовируса – «Ван-гард-5В». Их вводят внутримышечно или подкожно.

Последний класс вакцин состоит из экстрагированного антигена *B.bronchiseptica*. Вакцины, приготовленные таким образом, сводят к минимуму загрязнение липосахаридами (S.E. Sparks et al., 1988). Вакцина не токсична в месте введения при подкожном применении. Две иммунизации этим препаратом избавляют собак от клинических признаков болезни (F.J. Shade 1982). По некоторым данным (S.E. Sparks et al., 1988), при использовании

антигенной вакцины наблюдалось существенное уменьшение количества бордетелл по сравнению с контрольной группой собак. Привитые собаки быстрее освобождаются от микроорганизма, купируется ринит. Подобно вакцине из клеточной стенки бактерий, колостральные антитела могут подавлять иммунный ответ на внедренные антигены, поэтому у молодых собак желательны многократные введения. Вакцины применяются подкожно.

В настоящее время фирма Байер выпускает 3 вакцины этого типа – Перформер Борде-Вак, Камун В и Бронхин. Основными компонентами препаратов являются филаментозный гемагглютинин, пертактин и фимбрии. При парентеральном введении обеспечивается высокий уровень системного иммунитета, при интраназальном - повышенная устойчивость слизистой.

Некоторые авторы рекомендуют прививать против бордетеллёза всех собак (M. Azetaka et al., 1988). Другие считают, что вакцинация должна применяться при потенциальной опасности заболевания (R.B. Ford et al., 1990; A.S. Greig, 1994). Ежегодные вакцинации парентеральными сочетано с интраназальными вакцинами способны оптимизировать защитные силы организма и обеспечить устойчивость против заражения бордетеллами. Идея одновременного использования системной и секреторной устойчивости требует дополнительных исследований (T. Aoyama, 1995).

Существующие вакцины против бордетеллёза представлены в таблице 1.

Для вакцинации кошек разработано два типа вакцин: модифицированная живая и инактивированная вакцина. В местах, где зарегистрированы вспышки бордетеллёза кошек, прививка должна проводиться ежегодно и все беременные животные должны быть привиты инактивированной вакциной, для формирования пассивного иммунитета у котят. Применяются вакцины в 9 и 12 недельном возрасте, затем ежегодно. Хотя прививки не дают 100% гарантии, они предотвращают серьезные клинические осложнения болезни.

В настоящее время специфическая профилактика бордетеллёза домашних животных в России малоприменима (Д.А. Васильев и др., 2010, Д.Г. Сверкалова и др., 2010; Васильева Ю.Б. и др., 2013).

Таким образом, подводя итог вышеприведенному обзору по заболеванию необходимо отметить, что бордетеллез является широко распространенным заболеванием животных в странах Северной Америки, Западной Европы и СНГ. В нашей стране статистических данных по распространению, методам выявления, профилактики и ликвидации данной инфекции у животных крайне недостаточно. Отсутствуют нормативная документация и стандартизированные методы выявления и типирования возбудителя бордетеллеза *B.bronchiseptica*.

На текущий момент нет достаточно эффективных мер выявления и предотвращения заболевания и разработка качественных методов диагностики имеет первоочередное значение. Классическая бактериологическая диагностика с иммунологическим подтверждением занимает до 8 суток, что связано с медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным обследованием животных с затяжным кашлем, нарушением правил забора и транспортировки материала, а также несовершенной рецептурой

Таблица 1. Вакцины против бордетеллёза собак (по Б.Ф. Шуляку, 2003).

Препарат	Состав	Производитель
АВИРУЛЕНТНЫЕ ЖИВЫЕ ВАКЦИНЫ		
Бронхи-Шилд III	АВ-2, ВПГ, БРЛ	Форт Додж
Интра-Тракт	ВПГ, БРЛ	Шеринг Плау
Нарамун-2	ВПГ, БРЛ	Бэхрингер
Назагارد-В	БРЛ	Пфайзер
Прогард-КС	ВПГ, БРЛ	Интервент
ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫЕ БАКТЕРИНЫ		
Кох Гард-В	БРЛ	Пфайзер
Вангарт-5В	ВПГ, БРЛ, АВ-2, ВЧ, ПВ	Пфайзер
АНТИГЕННЫЕ ЭКСТРАКТЫ БЕЗ АДЬЮВАНТОВ		
Перформер Борде-Вак	БРЛ	Байер
Камун В	БРЛ	Байер
Бронхин	БРЛ	Байер

Сокращения: АВ-2 – аденовирус собак серотипа 2; ВПГ – вирус парагриппа; ВЧ – вирус чумы плотоядных; БРЛ – *B.bronchiseptica*.

питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных компонентов. Окончательный диагноз становится ретроспективным, что провоцирует возможные эпизоотические вспышки среди животных.

Сложность лабораторной диагностики бордетеллеза, его распространённость среди животных с невыясненной этиологией кашля и бессимптомных носителей, актуализируют поиск и разработку тест-систем, пригодных для ранней индикации и идентификации возбудителя и его фазовых состояний.

Главными условиями успешной ликвидации вспышек бордетеллёза животных являются раннее выделение возбудителя и определение его чувствительности к антибиотикам, своевременно начатое лечение, комплексность и систематичность в проведении оздоровительных мероприятий, включающих общие и специальные ветеринарно-санитарные меры.

В нашей стране вакцинопрофилактика бордетеллёза не распространена. Вследствие этого существует реальная угроза заражения для домашних животных и человека.

ГЛАВА II

ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* ТАКСОНОМИЯ

Микроорганизм *Bordetella bronchiseptica* (*B.bronchiseptica*) впервые был выделен N.S.Ferry как *Bacillus bronchicanis* в 1910 году. Такое название бактерии получили в связи с тем, что их выделили от длительно кашляющей собаки. В это же время бордетеллы выделили от собаки больной чумой и отнесли возбудителя к данной инфекции. В 1912-1913 годах микроорганизм был выделен от других животных (свиньи, кролика, крысы, морских свинок, обезьян), а также людей и получил название *Bacillus bronchisepticus* (N.S. Ferry, 1912; J.C. Torrey, A.H. Rahe, 1912; G. Eldering, P. Kendrick, 1938.).

Из-за схожих с другими бактериями морфологических, культуральных и биохимических свойств возбудителя относили к разным родам *Alcaligenes*, *Brucella* и *Haemophilus* и неоднократно переименовали. В 1925 году микроорганизм получил название *Alcaligenes bronchisepticus*, в 1929 году – *Brucella bronchiseptica*, в 1935 году – *Alcaligenes bronchicanis*, в 1946 году – *Haemophilus bronchisepticus*.

В 1952 году бактерии дали ее настоящее название, когда Moreno-Lopez описал род *Bordetella* и вид *Bordetella bronchiseptica*. Данные были размещены в седьмом издании систематического справочника Берджи (N.S. Ferry, 1912; M.F. De Jong, 1992). Род *Bordetella* получил название в честь ученого Jules Bordet, который выделил микроорганизм у больного коклюшем человека (M.C.N. Dorset, 1922; G. Eldering, 1941; S.M. Chang, 1950;

R.S. Breed, 1957; H.W. Dunne et al., 1961; M.J. Pickett, 1970; H. Yoda, 1976; M. Pittman, 1984).

До конца 70-х годов прошлого века бордетеллы слабо дифференцировали от некоторых бактерий родов *Acinobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* и *Brucella* (R. Jonson, P.H.A. Sneath, 1973; D.A. Bemis et al., 1977).

В настоящее время *Bordetella bronchiseptica* причислена к роду *Bordetella*, семейству *Alcaligenaceae*, порядку *Burkholderiales*, подклассу *Betaproteobacteria*, классу *Proteobacteria* (Characterization of Unusual..., 2002).

К роду *Bordetella* также относятся давно охарактеризованные микроорганизмы *B.pertussis*, *B.parapertussis* («классические» *Bordetella*), сравнительно недавно описанные *B.avium* и выделенные в последние годы *B.petrii*, *B.holmesii*, *B.hinzii*, *B.trematum*, *B.ansorpii* («новые» *Bordetella*). (R.N. Goodnow, 1980; Comparative analysis of..., 2003) и (New species of..., 2005) (схема1).

Подавляющая часть бордетелл проявляет тропизм к дыхательным путям животных и людей.

Бактерии *B.bronchiseptica* способны вызвать трахеобронхит у животных, птиц и редко людей. *B.avium* является этиологическим агентом респираторных инфекций птиц и изредка человека. *B.hinzii* — группа сходных с *B.avium* микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта индюшек и цыплят (J.K. Skeeles, L.H. Arp, 1988; B.T. Cookson et al., 1994; M.M. Kattar et al., 2004). *B.pertussis* инфицирует респираторный тракт людей (преимущественно детей) и вызывает заболевание коклюш. Ежегодно в мире регистрируется около 48,5 млн. больных коклюшем, при этом 300-500 тысяч случаев со смертельным исходом (N.S. Crowcroft et al., 2003). Штаммы *B.parapertussis* способны заражать людей, вызывая паракоклюш, некоторые штаммы вызывают пневмонию у ягнят (L.C. Cullinane et al., 1987). Сравнительно недавно зарегистрирован микроорганизм *B.ansorpii*, который был выделен у человека из гнойного экссудата эпидермальной кисты полости носа (New species of..., 2005).

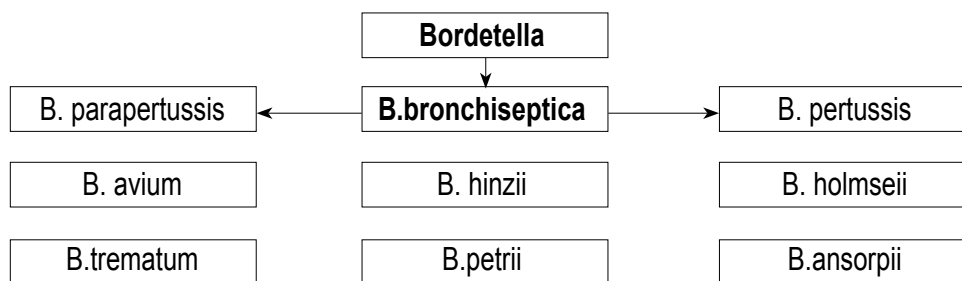


Рис. 2. Таксономическая характеристика рода *Bordetella*.

Отдельные виды и штаммы бордетелл лишены респираторного тропизма и способны вызвать инфекцию других органов и тканей. Бактерии *B.holmseii* вызывают у людей бактеримию, описано 15 штаммов, выделенных из крови пациентов с синдромом иммунодефицита, бордетеллы *B.trematum* провоцируют воспаление уха и раневую инфекцию, 2 штамма *B.hinzii* были выделены из слюны и крови больного СПИДом (K. Kersters et al., 1984; M. Pittman et al., 1984; C.R. Gentry-Weeks et al., 1991; P. Vandamme et al., 1995, 1996; R.S. Weyant et al., 1995; M.M. Kattar et al., 2000).

B.petrii – это единственный представитель рода *Bordetella*, который выделили из внешней среды в донных осадках рек (Г.И. Каратаев, 2008; F. Wintzingerode et al., 2001).

Повышенное внимание к *B.bronchiseptica* возникло в 1978 году с появлением публикаций W.E. Kloos et al., касающихся исследований гомологии дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) у *B.bronchiseptica*, *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Ученые полагали, что исследование инфекционного процесса *B.bronchiseptica* поможет подробнее изучить и возбудителя коклюша (W.E. Kloos et al., 1978).

Изучение генома, фаготипирование, сравнение биохимических и антигенных свойств указали на близкие таксономические отношения *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis* и *B.pertussis*. Морфологически они коккобациллы с латерально расположенными жгутиками перитрихиями, грамотрицательные, биполярно окрашиваются анилиновыми красителями, обладают дыхательным метаболизмом, не сбраживают сахара, не производят индол, сероводород, не разжижают желатин, продуцируют оксидазу, декарбоксилазу, каталазу, белок азурин (I.W. Sutherland, 1963).

Анализ рода *Bordetella* демонстрирует родство всех представителей с факультативным анаэробом *B.petrii*, которому отводится роль предшественника всех патогенных бордетелл. Исследователи подтверждают, что *B.pertussis*, *B.parapertussis* произошли от *B.bronchiseptica* (van der Zee et al., 1996, 1997). При этом *B.parapertussis*, обнаруженные у людей и овец, произошли, скорее всего, от разных линий *B.bronchiseptica*. У бактерий *B.holmesii* отсутствуют специфические белки вирулентности *B.bronchiseptica*, хотя её и относят к данному роду (J.D. Hoskins, 1997; G. Gerlach, 2001; J. Parkhill et al., 2003).

Характеристика основных представителей рода *Bordetella* приведена в таблице (Vandamme, 1996; Weyant et al., 1996).

Таблица 2. Характеристика основных представителей рода *Bordetella* (Vandamme, Weyant et al., 1996).

Характеристика	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>
Аэробный рост при 25°C	+	-	-	+	+	+	nd
Аэробный рост при 42°C	+	-	-	+	+	-	nd
Рост на:							
Агар МакКонке	+	-	+	+	+	-	+
Агар МакКонке с 320мг/дм ³ теллурита	-	nd	+	-	-	-	-
Цитратный агар Симмонса	+	-	-	-	+	-	-
Сальмонелла-Шигелла агар	+	nd	-	+	+	-	+
Цетримид агар	-	nd	-	-	-	-	-
Рост в питательном бульоне	+	nd	+	+	+	v	+
Рост в питательном бульоне с 6% NaCl	v	nd	-	v	+	-	+
Подвижность	+	-	-	+	+	-	+
Диффундирующий коричневый пигмент	-	nd	+	-	-	+	-
Продукция пигмента из тирозина	-	nd	+	-	-	+	-
Оксидазная активность:							
Реагент Ковача	+	+	-	+	+	-	-
Реагент Геби-Хедли	+	+	-	+	+	-	-
Редукция нитратов (классический метод):							
Образование нитритов	v	-	-	-	-	-	v
Денитрификация	v	-	-	-	-	-	v
Редукция нитратов (API 20NE test):							
Образование нитритов	+	-	-	-	-	-	v
Денитрификация	-	-	-	-	-	-	-
Уреазная активность	+	-	+	-	-	-	-
Редукция тетразолина	+	nd	+	+	+	-	+
Подщелачивание лакмусового молока	+	nd	-	-	-	-	-

Щелочное производство с:							
Ацетамид	-	nd	-	+	+	-	v
Адипинат	+	nd	-	+	+	-	+
Глицин	+	nd	-	-	+	-	-
Пропионамид	+	nd	-	+	+	-	+
Valepate	+	nd	-	-	+	-	v
Малонамид	+	nd	-	-	+	-	+
Малонат	+	nd	-	-	+	-	+
Малонат (API ID 32E test):	-	-	-	-	-	-	-
Ферментация глюкозы	-	-	-	-	-	-	-
Усвоение:							
D-Глюкоза	-	-	-	-	-	-	-
D-Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-
D-Глюконат	-	-	-	-	-	-	-
D-Манитол	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-	-	-	-
Капрат	v	-	-	-	+	-	-
Адипинат	+	-	-	+	+	-	+
L-Малат	v	-	-	+	+	-	+
Фенилацетат	+	-	-	+	+	-	+
Эскулин	-	-	-	-	+	-	+
5-Кето-глюконат	-	-	-	-	-	-	v
Браунинг на 2-кето-глюконате	-	-	-	-	+	+	-
Активность щелочной фосфатазы	v	-	-	v	+	+	+
Активность лизин декарбоксилазы	-	-	-	-	-	-	-
Активность липазы эфир C8	v	+	+	v	+	-	+
Активность липазы C14	-	-	-	-	-	-	v
Активность трипсина	-	-	-	-	-	-	-
Активность химотрипсина	-	+	+	v	-	+	v
Активность нафтол-AS-B1-фосфогидролазы	-	+	-	-	+	+	+
Arginamidase деятельность с:							
Валин	-	-	-	v	+	-	+
Гистин	-	-	-	v	-	-	-
Аргинин	+	+	-	v	+	+	v
Пролин	nd	-	-	-	-	+	-
Лейцил глицин	+	+	-	+	+	+	+
Фенилаланин	-	+	-	+	-	-	v
Pyroglutamic acid(Пироглютаминовая кислота)	-	-	-	-	-	-	-
Тирозин	+	+	-	+	+	-	v
Глутамил глутаминовой кислоты	-	+	-	-	-	-	v
Серин	+	+	-	+	+	-	+
Аспарагиновая кислота	+	+	+	+	+	-	+

Условные обозначения: «+» - > 89% штаммов положительные; «v» - 11-89% штаммов положительные; «-» - <11% штаммов положительные; «nd» - показатель не определен

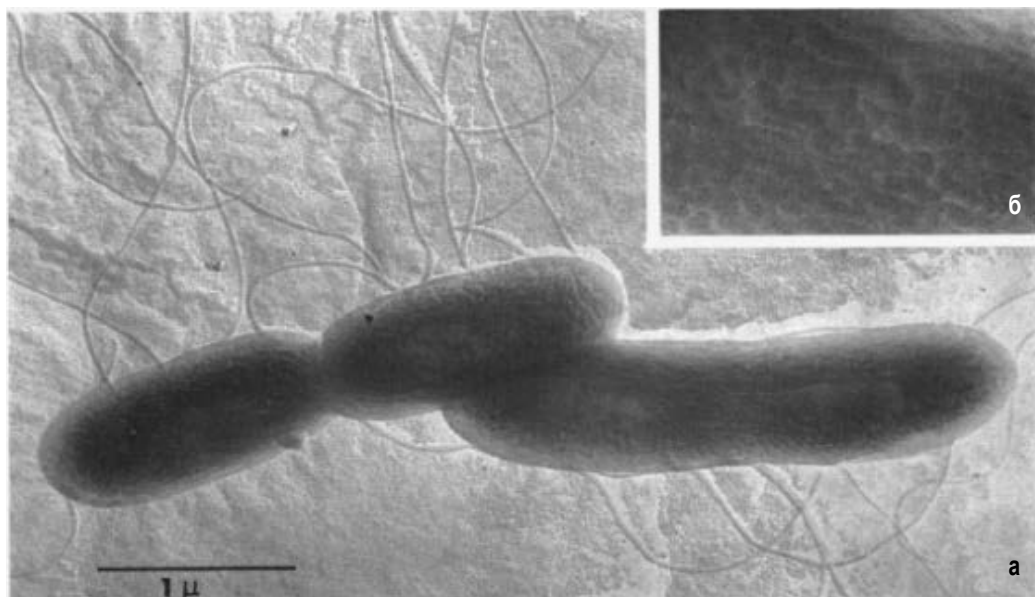
Мы провели исследование биологических свойств 5-ти лабораторных штаммов и 60-ти клинических изолятов *B.bronchiseptica*. В нижеприведенном разделе дан анализ литературных данных и собственных исследований по изучению фенотипических признаков бактерий *B.bronchiseptica*: типичной морфологии бактериальных клеток, характеристик окраски, специфических особенностей роста на различных питательных средах и биохимической деградации различных субстратов. Рассмотрены вопросы фенотипической гетерогенности колоний. Изучение биологических особенностей штаммов *B.bronchiseptica* направлено на подбор комплекса уникальных морфологических, тинкториальных, биохимических и культуральных свойств бордетелл, на основании которого можно с высокой степенью вероятности утверждать о наличии искомого возбудителя и который возможно использовать как инструмент бактериологической детекции возбудителя (Д.А. Васильев и др., 2007-2013; Д.Г. Сверкалова и др. 2007-2011; А.В. Мاستиленко и др., 2008-2013; Е.Н. Семанина и др., 2009-2012; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Bordetella bronchiseptica – мелкая коккобацилла (рис. 1а) с размерами 0,2-0,3 x 0,5-1,0 мкм. Однако, по описаниям отдельных исследователей, встречаются бордетеллы размером 0,4-0,5 x 7,0-8,0 мкм (Б.Ф. Шуляк, 2003; G.W.Richter, Y.Kress, 1967).

При электронной микроскопии поверхность бактерий, покрытых испаренным платиновым палладием, кажется морщинистой (рис. 3б), с лобулярными (дольчатыми) структурами до нескольких сотен Å (ангстремов) по ширине, которые отделены бороздами (приблизительно 100-200 Å).

Исследования структуры клеточной стенки *B.bronchiseptica* и цитоплазматической мембраны показали соответствие строению грамотрицательных бактерий. Внешние структуры клеточ-



1 1 миллиметр (мм) = 103 микрометров (мкм) = 106 нанометров (нм) = 107 ангстрем (Å)

Рис.3 *B.bronchiseptica* при электронной микроскопии (а). Отмечается лобулярная структура поверхности бактериальной клетки (б). Увеличение:(а) x 25 000; (б) x 75 000. (G.W.Richter and Y.Kress, 1967).

ной стенки, шириной 10-20 нм определяют внешний контур бактериальной клетки (G.W. Richter, Y. Kress, 1967).

В продольном сечении бактерии ее клеточная стенка имеет следующую структуру: три электронплотных слоя чередуются с двумя промежуточными (рис. 3). Толщина клеточной стенки – 100-120 Å. Хотя клеточная стенка имеет лобулярную структуру (рис. 3), ее слои непрерывны на всем протяжении.

Цитоплазматическая мембрана представляет собой трехслойную структуру: толщина внешнего и внутреннего электронно-плотных слоев составляет 20-30 Å каждый, а промежуточного слоя, приблизительно 15 Å.

Goodnow R.A. (1980), G.W. Richter, Y. Kress (1967) считают, что структуры, напоминающие мезосомы других бактериальных представителей встречаются довольно редко.

Бактериальная цитоплазма содержит большое количество рибосом, расположенных на цитоплазматическом матриксе. Ядерные зоны *B.bronchiseptica* имеют характерную структуру в виде волокнистой сети и плотных телец (рис.4). Самые тонкие волокнистые структуры имеют размер около 20-30 Å по ширине,

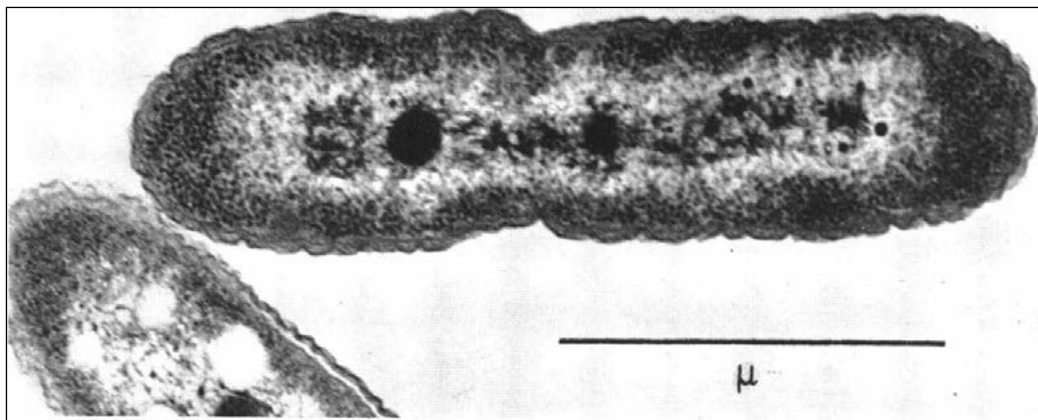


Рис.4. Продольное сечение *Bordetella bronchiseptica*. Отмечается шероховатая клеточная стенка. Рибосомы расположены на цитоплазматическом матриксе вокруг нуклеоида. Увеличение $\times 40\,000$. (G.W.Richter and Y.Kress, 1967).

но размеры большинства таковых около $50\text{--}70\text{ \AA}$. Волокнистые структуры чаще всего располагаются беспорядочно, но встречаются также и упорядоченные в виде спирали или завитков. Большие, плотные тельца хорошо окрашиваются уранилом, хотя при качественной электронной микроскопии они также хорошо видны.

Опубликовано несколько сообщений о выделении внехромосомных генетических элементов – плазмид из клеток *B.bronchiseptica* (Г.И. Каратаев, 2008). Их количество в бактериальной клетке может колебаться от 1 до 3. Плазмиды несут различный набор генов резистентности и имеют размеры по одним источникам от 5,5 до 20 тысяч пар оснований (т.п.о.) (Julian Parkhill, Mohammed Sebahia, Andrew Preston et al., 2003), а по другим от 10 до 51 т.п.н (N. Terakado et al., 1973, 1974; R.W. Hedges et al., 1974; M. Shimizu et al., 1981; A. C. Graham, G. K. Abruzzo, 1982; A. J. Lax, C. A. Walker, 1986; R. Antoine, C. Loch, 1992; A. J. Speakman et al., 1997; K. Kamachi et al., 2006). Наличие плазмид возможно обуславливает резистентность бордетелл к антибактериальным и химиотерапевтическим средствам.

Бактерия подвижна за счет перитрихально расположенных жгутиков (рис. 3), которые более редки на полюсах бактериальной клетки, чем по остальной поверхности. Микроструктура жгутиков напоминает таковую некоторых других грамотрицательных

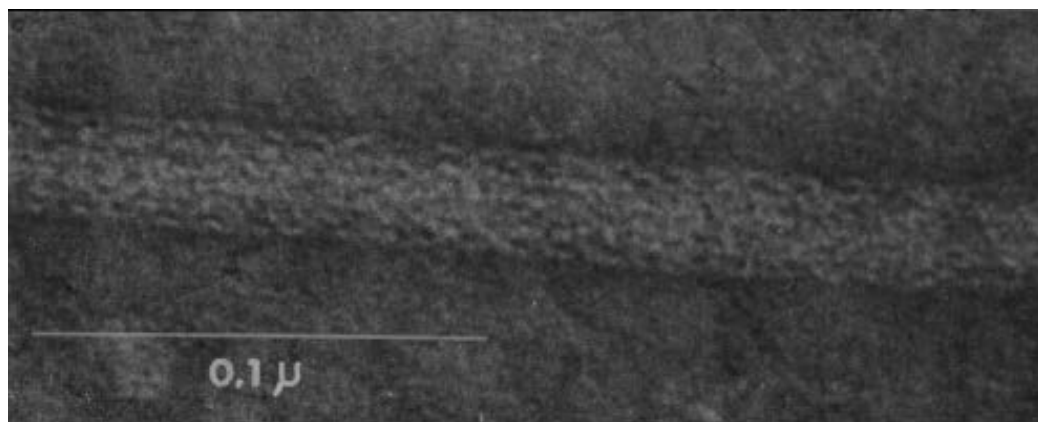


Рис. 5. Профиль части жгутика *Bordetella bronchiseptica*. Отмечаются переплетенные структуры, имеющие размер около 20 Å. Увеличение $\times 500\,000$. (G.W.Richter and Y.Kress, 1967).

бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и т.п.). Толщина жгутиков составляет 180-220 Å. Исследования, проведенные с помощью электронной микроскопии, показали, что жгутики *B.bronchiseptica* напоминают левостороннюю тройную спираль (рис. 5) (R.A. Goodnow, 1980, G.W. Richter, Y.Kress, 1967).

Морфологические свойства 65 клинических и лабораторных штаммов *B.bronchiseptica* мы оценивали при помощи световой микроскопии окрашенных по Граму мазков, которые готовили из 24–72 ч бульонных и агаровых культур. Электронную микроскопию проводили методом негативного контрастирования 1,5% фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК). Просматривали препараты на электронном микроскопе HV-12A (фирмы *Hitachi*) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении 35×10^3 . Фиксировали культуру 2%-ным раствором OsO_4 (Д.Г. Сверкалова и др., 2009).

При окраске мазков по Граму, Ольту и проведении световой микроскопии зарегистрировали, что бактерии *B.bronchiseptica* – грамтрицательные коккобациллы, располагающиеся одиночно и цепочками. Размер овоидных палочек $0,3 \pm 0,2$ мкм на $1,0 \pm 0,5$ мкм, спор не образуют. Капсула данными методами окраски не выявляется (рис. 6).

Из-за невозможности выявить капсулу у бактерий *B.bronchiseptica* стандартными методами окраски в течение 80 лет эту бактерию считали безкапсульной. С помощью элек-

тронной микроскопии, РИФ и метода Смита-Лоусона микрокапсулу обнаружили у ее вирулентной фазы. На других стадиях развития микроорганизма формирование капсулы прекращается (Б.Ф. Шуляк, 2003). При обработке водными растворами анилиновых красителей (особенно толуидинового синего) *B.bronchiseptica* проявляет биполярность окрашивания, ассоциированную с наличием в ее цитоплазме (на полюсах) метакроматических гранул, имеющих липоидный состав. Окрашивание анилиновыми красками происходит медленно (Б.Ф. Шуляк, 2003).

При проведении электронной микроскопии наблюдали фенотипическую вариабельность штаммов: наличие вирулентной (I), промежуточной (II) и авирулентной (III) фаз. Бордетеллы в III фазе подвижны за счет наличия перитрихально расположенных жгутиков (рис. 7).

По данным Б.Ф. Шуляка (2003) наличие жгутиков делает бактерию более мобильной, что позволяет ей перемещаться в места, богатые питательными веществами. Однако у вирулентной фазы бордетелл жгутики не образуются, что является следствием отрицательной регуляции синтеза флагеллина со стороны локуса *bvg*. Мутанты бактерии, лишенные способности образовывать жгутики, остаются такими же вирулентными, как и исходные штаммы, из которых они были получены. Тем не менее, условно можно отнести подвижность авирулентной фазы *B.bronchiseptica* к числу потенциальных факторов вирулентности, поскольку она обеспечивает распространение агента по слизистой оболочке респираторного тракта в момент заражения животного. Кроме того, между его подвижностью и способностью к внутриклеточной персистенции выявлена позитивная корреляция (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Жгутики перестают образовываться при переходе бактерии в вирулентную фазу. При этом бордетеллы покрыты микрокапсулой (рис. 8).

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

При первичной изоляции агента из патологического материала бордетеллы требовательны к условиям роста, среды должны содержать до 30-50% крови. При пересевах в ростовых факторах микроорганизм не нуждается и количество крови может быть снижено до 15-20% (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Зарубежные исследователи, культивируя *B.bronchiseptica* на бруцелл-агаре, описали три фазы развития колоний: I-ю, которая соответствовала D-форме, II- SR, III – R (D.A. Bemis, H.A.Griesen, M.J. Appel, 1977; G.S. Chhatwal, 1997).

Переход бактерий из одной фазы в другую происходит не только при выращивании на питательных средах, но и в живом организме в результате спонтанных мутаций. Поэтому возможна одновременная изоляция из патматериала разных фаз агента (Y. Nakase, 1957).

Мы исследовали 65 штаммов бордетелл и также установили фенотипическую гетерогенность колоний. Бордетеллы в I-й фазе образовывали мелкие (до 1 мм через 24-48 ч культивирования), россинчатые, выпуклые, круглые, с ровным краем, полупрозрачные колонии с блестящей поверхностью, с четкой зоной гемолиза на средах с добавлением крови.

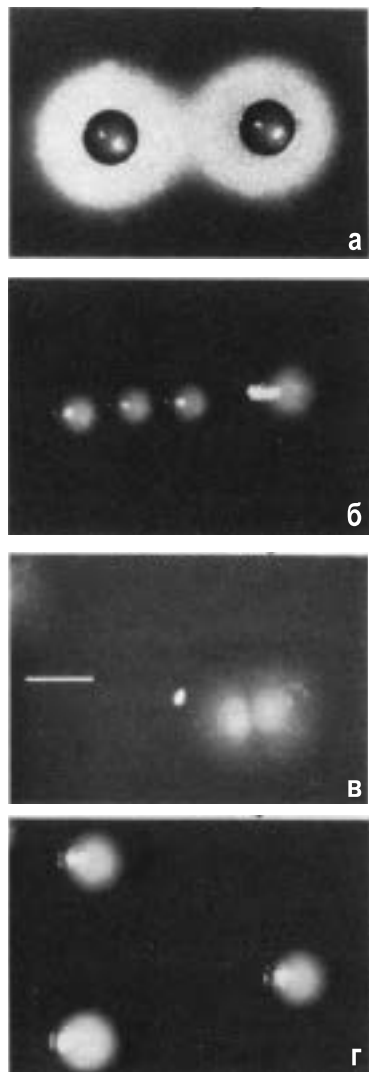


Рис.9. Различные морфотипы колоний *B.bronchiseptica* на среде Борде-Жангу (условия культивирования: 48 ч при 37°C): а-выпуклая, гладкая колония с характерной зоной гемолиза; б-выпуклые, гладкие колонии (слева) и выпуклая шероховатая колония (справа) без выраженной гемолитической активности; в-плоская, гладкая колония без зоны гемолиза; г-выпуклые, шероховатые колонии без зоны гемолиза. Масштаб штриха – 1 мм. Обозначения: Dom+ -выпуклая колония, Dom- -плоская, Scs+ -гладкая поверхность колонии, Scs- -шероховатая, Hly+ -наличие зоны гемолиза вокруг колонии, Hly- -отсутствие зоны гемолиза (M.S. Peppler, M.E.Schrumpf, 1984).

Цвет колоний был различным в зависимости от среды выращивания. На простых средах наблюдали жемчужные, грязно-белые или сероватые колонии. Колонии были влажной консистенции, легко снимались с поверхности среды (рис. 10а, д).

Бордетеллы в III-й фазе образовывали средние (более 2 мм через 24-48 ч культивирования), с шероховатыми краями, преимущественно плоские с приподнятым центром, матовой поверхностью колонии с отсутствующей зоной гемолиза. Цвет колоний на простых питательных средах был белый с желтоватым оттенком или серый с голубоватым оттенком. Консистенция колоний была маслянистая, они легко снимались с поверхности среды (рис. 10б, е). Также наблюдали промежуточные варианты (фаза II): с ровными и шероховатыми краями, выпуклые и плоские, блестящие и матовые, белые, желтоватые и серые колонии. Типы колоний соответствовали разным фазам инфекционного цикла микроорганизма (рис. 10в).

При длительном культивировании наблюдали переход референс-штаммов бордетелл из I-й во II-ю и III-ю фазы при значительном увеличении размера колоний (10 г).

Зарубежные исследователи установили, что на агаре Борде-Жангу активно культивируется вирулентная фаза I. При длительном выращивании происходит антигенная модуляция и трансформация микроорганизма в слабовирулентную фазу II и авирулентную фазу III. Этот феномен реверсибелен и возврат к I фазе возможен даже после 15 пассажей (Y. Nakase, 1957; C. Parker, 1976; D.A. Bemis, H.A. Greisen, M.J.G. Appel, 1977; A. Banemann, R.Gross, 1997).

Маркерами фазы I могут служить способность связывания штаммом *B.bronchiseptica* конго красного и его уреазная активность. Между результатами этих тестов и экспрессией филаментозного гемагглютинина и других мембранных факторов патогенности выявлена позитивная корреляция (Y. Horiguchi et al., 1997).

B.bronchiseptica защелачивают лакмусовое молоко, что сопровождается градиентным усилением интенсивности синей окра-

ски по направлению от поверхности ко дну среды. Эти изменения часто становятся заметными только после 48-72 ч культивирования. *B.bronchiseptica* активно растет на средах с цистеином и глутаматом. В искусственных средах цистеин присутствует в низких концентрациях, и, вероятно, служит источником серы, а глутамат – углерода. На картофеле обильный рост через 24 ч после засева. Срез приобретает темно-желтый или желтовато-коричневый цвет. Постепенно он становится влажным, липким и блестящим с заплесневелым запахом. (P.A. Cotter, J.E. Miller, 2001).

По мнению некоторых зарубежных исследователей бактерии *B.bronchiseptica* не нуждаются в ростовых факторах и способны длительно (до 6 месяцев) сохранять жизнедеятельность, находясь в физиологическом растворе (J.F. Porter, 1991, 1993; S.L. Brockmeier, 1999).

Мы проанализировали рост референс-штаммов *B.bronchiseptica* на жидких и плотных питательных средах. Установили, что бордетеллы являются строгими аэробами с оптимальной температурой культивирования $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, при pH $7,0\pm 2$.

В мясо-пептонном бульоне через 24-48 ч инкубации штаммы бордетелл вызывали равномерное помутнение с последующим образованием осадка и пристеночного кольца (рис. 11), в 0,7% МПА рост по всей поверхности наблюдали через 24 ч (рис. 12). При культивировании штаммов на агаровых средах установили, что они хорошо растут, как на простых, так и на обогащенных средах. На мясопептонном агаре с 0,03% цетримидом и стафилококкагаре рост всех штаммов отсутствовал через 24, 48, 72 ч (табл. 3 и рис. 13-32).

Появление визуально различимых колоний на агаровых средах регистрировали в основном в первые сутки выращивания через 18-24 ч. На чашках Петри образовывались точечные жемчужные полупрозрачные колонии, не превышающие в диаметре 1 мм. При более длительном культивировании колонии значительно увеличивались в размере до $5,6\pm 7,7$ мм.

Мы также наблюдали наличие реакции на некоторых селективных средах. На ацетатном агаре – изменение цвета среды в

зоне роста колоний с оливково-зеленого на васильковый, что свидетельствовало о способности штаммов *B.bronchiseptica* утилизировать ацетат натрия. На питательной среде Пизу в зоне роста бактерий выделялся коричневый пигмент, показывающий наличие фермента цистиназы. При культивировании бактерий *B.bronchiseptica* на среде для иерсиний и псевдотуберкулеза наблюдали изменение цвета с зеленого на синий. При открытии чашки ощущался запах аммиака, свидетельствующий о наличии фермента уреазы. На среде Симмонса также отмечали цветовую реакцию с переходом зеленого цвета в синий.

Фенотипические признаки вирулентных форм референц-штаммов при культивировании на различных агаровых средах представлены в таблице 4.

Таблица 3. Ростовые свойства лабораторных штаммов *B.bronchiseptica* на плотных питательных средах.

№	Агаровая среда	рН среды	Диаметр колоний в зависимости от срока инкубации, мм			Реакция среды
			24±2 ч	48±2 ч	72±2 ч	
1.	Агар Симмонса	7,0 ±0,2	1,0±0,5	1,0±0,5	2,0±0,5	с зеленого на синий
2.	Ацетатный агар	6,6±0,2	1,5±0,5	2,0±0,5	3,5±0,5	с оливково-зеленого на васильковый
3.	Vacto PPLO агар	7,0±0,1	2,0±0,5	2,5±0,5	4,0±0,5	отсутствует
4.	Бордетелагар	7,2±0,2	1,0±0,2	1,5±0,5	2,0±0,2	отсутствует
5.	ГРМ – агар	7,3±0,2	-	1,0±0,5	4,0±1,0	отсутствует
6.	Дифтерийная среда	7,2±0,1	1,5±0,5	3,0±0,5	4,5±0,5	отсутствует
7.	Кровяной агар 10%	7,2±0,1	-	2,5±0,5	3,5±0,5	слабый β-гемолиз через 48 ч
8.	Казеиново-угольный агар	7,2±0,1	-	2,0±0,5	4,5±0,5	отсутствует
9.	Менингококкагар	7,0±0,2	2,0±0,5	3,0±0,5	5,5±0,5	отсутствует
10.	Мясо-пептонный агар	7,2±0,2	1,0±0,2	2,5±1,0	5,5±7,5	отсутствует
11.	МПА с цетримидом	7,2 ±0,2	-	-	-	отсутствует
12.	Среда Пизу	7,7±0,2	1,5±0,5	2,5±0,5	2,5±1,0	среда вокруг колоний коричневая
13.	Среда Сабуро	5,7±0,2	0,5±0,5	1,0±0,5	2,0±0,2	отсутствует
14.	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	7,7±0,2	1,0±0,5	2,0±0,5	3,0±0,5	с зеленого на синий, при открывании – запах аммиака
15.	Стафилококк агар	7,0±0,4	-	-	-	отсутствует
16.	Триптиказо-соевый агар	7,2±0,1	1,0±0,5	2,0±0,5	3,0±0,5	отсутствует
17.	Среда Эндо	7,4±0,2	1,5±0,5	2,0±0,5	3,5±0,5	отсутствует

Таблица 4. Морфологическая характеристика колоний вирулентных штаммов *V.bronchiseptica*.

№	Питательная среда	Форма	Величина	Профиль	Цвет	Блеск	Край	Консистенция	Прозрачность
1.	Агар Симмонса	Круглая	Мелкие	выпуклые	ржавые или белые	есть	ровный	мягкая, маслянистая	непрозрачные
2.	Ацетатный агар	Округлая	россинчатые	выпуклые	Белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
3.	Васо РРЛО агар	Круглая	Мелкие	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
4.	Бордетелатар	Округлая	россинчатые	кулолообразные	Серо-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
5.	ГРМ – агар	Круглая	Мелкие	слабо выпуклые	серовато-белые	есть	ровный	влажная	непрозрачные
6.	Дифтерийная среда	Круглая	Мелкие	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
7.	Кровяной агар 10%	Круглая	россинчатые	слегка конические	Белые	есть	ровный	маслянистая	непрозрачные
8.	Казеиново-угольный агар	Круглая	россинчатые	кулолообразные	Серо-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
9.	Менингококкагар	Круглая	Мелкие	выпуклые	грязно-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
10.	Мясо-пептонный агар	Круглая	Мелкие	слабо выпуклые	серовато-белые	есть	ровный	маслянистая	непрозрачные
11.	Среда Пизу	Круглая	россинчатые	слегка выпуклые	с темным центром	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
12.	Среда Сабуру	Округлая	россинчатые	выпуклые	грязно-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
13.	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	Круглая	Мелкие	слегка выпуклые	беловатые	есть	ровный	мягкая	непрозрачные
14.	Триптиказо-соевый агар	Округлая	россинчатые	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
15.	Эндо	Круглая	россинчатые	слегка конические	грязно-белые	есть	ровный	мягкая	непрозрачные

Исследование характера роста максимального числа клинических изолятов *B.bronchiseptica* на плотных питательных средах имеет важное значение для разработки дифференциально-диагностических сред.

Мы провели культивирование клинических изолятов *B.bronchiseptica*, *B.pertussis* и *B.parapertussis* на 5-ти питательных средах. Среда подобрана исходя результатов характера роста референс-штаммов на 17-ти агаровых средах. Для исследования отобрали мясопептонный агар, бордетелагар, казеиново-угольный агар, среду для иерсиний и псевдотуберкулеза и 10%-ный кровяной агар. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Ростовые свойства клинических изолятов бордетелл на питательных средах.

№ п/п	Клинические штаммы	Размер колоний (мм) через 48 ч культивирования при 37°С				
		МПА	Бордетелагар	КУА	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	Кровяной агар 10%
1.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 105	2,5+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5
2.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 106	2,5+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5
3.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 108	2,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5
4.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 114	2,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5
5.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 115	2,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5
6.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 115a	2,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5	2,0+0,5	1,0+0,5
7.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 118	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	1,0+0,5
8.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 122	2,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	1,5+0,5
9.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 123	1,0+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5
10.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 124	2,5+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
11.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 125	2,5+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	1,0+0,5
12.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 126b	1,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
13.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 126	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
14.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 132	2,0+0,5	2,0+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
15.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 134	2,0+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
16.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 135	3,0+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5
17.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 136	2,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
18.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 148	3,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
19.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 149	1,0+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	1,0+0,5
20.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 154	1,0+0,5	1,0+0,5	1,0+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5
21.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 155	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	1,0+0,5
22.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 156	2,0+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
23.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 170	2,5+0,5	1,5+0,5	2,5+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5
24.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 164	2,0+0,5	1,5+0,5	2,5+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5

25.	B.bronchiseptica BBR 168	2,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
26.	B.bronchiseptica BBR 169	2,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
27.	B.bronchiseptica BBR 170a	2,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5
28.	B.bronchiseptica BBR 175	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5
29.	B.bronchiseptica BBR 176	2,0+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
30.	B.bronchiseptica BBR 177	2,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5
31.	B.bronchiseptica BBR 178	2,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
32.	B.bronchiseptica BBR 179	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
33.	B.bronchiseptica BBR 180	1,5+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
34.	B.bronchiseptica BBR 184	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	1,0+0,5
35.	B.bronchiseptica BBR 182	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
36.	B.bronchiseptica BBR 183	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
37.	B.bronchiseptica BBR 185	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5
38.	B.bronchiseptica BBR 188	1,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5
39.	B.bronchiseptica BBR 188a	1,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5
40.	B.bronchiseptica BBR 188b	1,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5
41.	B.bronchiseptica BBR 189	3,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	1,0+0,5
42.	B.bronchiseptica BBR 192	2,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
43.	B.bronchiseptica BBR 194	1,5+0,5	3,0+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
44.	B.bronchiseptica BBR 215	1,5+0,5	1,5+0,5	1,0+0,5	1,5+0,5	2,5+0,5
45.	B.bronchiseptica BBR 221	1,5+0,5	1,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5
46.	B.bronchiseptica BBR 225	2,0+0,5	1,5+0,5	1,0+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5
47.	B.bronchiseptica BBR 226	3,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5	2,0+0,5	1,5+0,5
48.	B.bronchiseptica BBR 228	2,0+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	1,5+0,5
49.	B.bronchiseptica BBR 229	1,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
50.	B.bronchiseptica BBR 230	2,0+0,5	2,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
51.	B.bronchiseptica BBR 235	3,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
52.	B.bronchiseptica BBR 236	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	1,5+0,5	1,0+0,5
53.	B.bronchiseptica BBR 238	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
54.	B.bronchiseptica BBR 240	1,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
55.	B.bronchiseptica BBR 241	3,0+0,5	1,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5
56.	B.bronchiseptica BBR 245	2,0+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5	2,5+0,5
57.	B.bronchiseptica BBR 245c	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	1,5+0,55	2,5+0,5
58.	B.bronchiseptica BBR 245b	2,5+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
59.	B.bronchiseptica BBR 254	2,0+0,5	2,5+0,5	2,5+0,5	2,0+0,5	3,0+0,5
60.	B.bronchiseptica BBR 258	2,0+0,5	2,0+0,5	2,5+0,5	3,0+0,5	3,0+0,5
61.	B. pertussis BP 12	–	–	–	–	–
62.	B. pertussis BP 14a	–	–	–	–	–
63.	B. pertussis BP 38	–	–	–	–	–
64.	B. paraptussis BPP 2547	–	0,5+0,1	1,0+0,5	–	2,0+0,5
65.	B. paraptussis BPP 109	–	–	0,5+0,2	–	–
66.	B. paraptussis BPP 2/154	–	–	0,5+0,2	–	1,0+0,5
67.	B. paraptussis BPP 2547a	–	–	–	–	–

Результаты наших исследований показали, что клинические изоляты *B.bronchiseptica* одинаково культивируются, как на простых, так и на специализированных агаровых средах, образуя через 48 часов колонии размером от 1+0,5 до 3+0,5 мм.

На средах, специализированных для выращивания бордетелл (КУА, бордетелагар), у референс-штаммов были аналогичные показатели по скорости появления и размеру колоний. Но так как эти угольные среды черного цвета, дифференциацию колоний по окрашиванию, прозрачности, изменению цвета среды или её pH провести достаточно сложно. Среда пригодна только для первичного выделения возбудителя с последующей многоэтапной дифференциацией по биологическим свойствам.

При этом результаты наших исследований показали, что на средах Симмонса, среде для иерсиний и псевдотуберкулеза и ацататном агаре клинические и лабораторные штаммы культивируются и дают заметную щелочную реакцию, что можно использовать при разработке дифференциально-диагностической селективной среды. Также требует изучения вопрос о возможности включения в питательную среду биохимических индикаторов и селективных добавок для сокращения сроков исследований и повышения уровня ингибирования ассоциативной микрофлоры.

Гемолитическая активность. Интенсивность гемолиза определяется способностью штамма экспрессировать аденилатциклазу-гемолизин, которая меняется при смене бактерией фазового состояния, а также зависит от состава питательной среды и уровня её pH. В щелочных средах с пептоном или глютамином гемолиз ингибируется, а в кислых он усиливается. По данным Б.Ф.Шуляка (2003) выявлена корреляция между гемолитической активностью и наличием плазмид.

На 20%-м кровяном бульоне в первые 24 ч культивирования рост *B.bronchiseptica* сопровождается лёгким помутнением среды и образованием поверхностной плёнки, от которой вниз спускаются сталактитоподобные отростки. К концу 2 недели культиви-

рования в посевах образуется обильный осадок, а среда светлеет, постепенно становится прозрачной. Первоначально хлопьевидный осадок приобретает в старых культурах вязкую консистенцию и перестает разбиваться при встряхивании (Д.А. Васильев и др., 2011).

При культивировании штаммов *B.bronchiseptica* на 10% кровяном агаре бордетеллы образовывали зону β -гемолиза при температуре 37 °С в течение 48 ч (рис. 32).

Гемолитическую активность бордетелл определяли двумя методами. Каждую исследуемую культуру высевали “штрихом” на поверхность 10% кровяного агара из дефибринированной крови человека, который потом помещали в термостат при 37°С. Через 24, 48, 72 ч наблюдали рост культур.

Используя другой способ, мы наблюдали за штаммами *B.bronchiseptica* в поле зрения микроскопа в течение 15-30 мин. Для микроскопии готовили эритроцитарную взвесь в разведении не более 2×10^4 эритроцитов в мл. Готовили препарат по типу “висячая капля” с эритроцитарной взвесью и 1-2 суточной агаровой культурой *B.bronchiseptica*. Наблюдали адсорбцию клеток бордетелл на поверхности эритроцитов и обесцвечивание последних под увеличением $\times 100 \times 15$. Мы установили, что экспресс-метод применим для оценки штаммов обладающих даже слабым β -гемолизом и занимает до 30 минут (рис. 34 – 36). При посеве “штрихом” гемолиз ярко проявлялся через 48 ч инкубации у штаммов с картиной гемолиза при микроскопии (рис. 37).

Результаты наших исследований клинических и лабораторных штаммов показали, что 31,91% штаммов бордетелл обладают гемолитической активностью.

Мы рекомендуем, разработанный нами экспресс-метод для определения гемолитической активности бордетелл в короткие сроки (30 минут), даже для штаммов обладающих слабым β -гемолизом.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Бактерии *B.bronchiseptica* являются неферментирующими хемоорганотрофами, обладающими дыхательным типом метаболизма. Бордетеллы нуждаются в никотиновой кислоте, цистеине, метионине. Формируют окислением глутаминовую кислоту, пролин, аланин, аспарагиновую кислоту, серин с выделением аммиака и углекислого газа. Не ферментируют многоатомные спирты, не образуют фосфатазу (M. Thalenet et al., 1999).

Продуцируют каталазу, оксидазу и уреазу. Синтез последней происходит медленно, активизируясь при температуре 37 °С, а также при добавлении в окружающий бактерию субстрат ионов магния. Наличие и концентрация в среде мочевины или азота не оказывает заметного влияния на экспрессию уреазы, но уреазопродуцирующие штаммы проявляют более выраженную способность сохранять жизнеспособность (J.F. Porter, R. Parton, A.C. Wardlaw, 1991; D.J. McMillan et al., 1999).

B.bronchiseptica отличается от других бордетелл способностью восстанавливать нитраты до нитритов. Бордетеллы утилизируют некоторые органические соединения (сукцинат, цитрат, пировуват, ацетат, фумарат, лактат, оксалоацетат, α-кетоглутарат, или аминокислоты – пролин, глутамат, глютамин и тирозин) в качестве единственного источника энергии (электронов и протонов) и углерода. Источником железа для *B.bronchiseptica* могут быть лактоферрин, трансферрин, гемин и гемоглобин хозяина. Биосинтез основного сидерофора бактерии алкалигина происходит путем преобразования орнитина в путресцин, а последнего – в сидерофор (L.A. Agiato-Foster, D.W. Dyer, 1993).

Имеются данные о том, что цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) в метаболизме *B.bronchiseptica* нефункционален. Возможно, он неактивен из-за приобретения дополнительных биохимических путей использования альтернативных питательных источников, а не из-за недостатка ферментов (J. Parkhill et al., 2003).

При оценке биохимических свойств лабораторных и клинических штаммов бордетелл мы использовали биохимические

тест-системы для идентификации микроорганизмов (НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург), тесты СИБ, развернутый ряд Гисса. При изучении оксидазной активности и индолообразования применяли тестовые диски фирмы HiMedia и реактив Эрлиха. Для определения способности бордетелл утилизировать аминокислоту с образованием сероводорода применяли среду Пизу (Д.А. Васильев и др., 2004).

Результаты исследования биохимических свойств представлены в нижеприведенной таблице 6.

Основываясь на данных наших исследований установили, что бордетеллы не ферментируют углеводы: сахарозу, лактозу, мальтозу; многоатомные спирты: дульцит, сорбит, манит. В реакции с глюкозой в 1,67 % случаях образуется небольшое количество кислоты (рис. 38).

Таблица 6. Основные биохимические свойства лабораторных и клинических изолятов бордетелл.

№ п/п	Штамм	Биохимические свойства																		β-гемолиз	β-гемолиз экспресс-метод
		Цветной ряд Гиса									Ферментация/ утилизация										
		глюкоза	лактоза	сахароза	мальтоза	маннит	сорбит	дульцит	уреаза	тирозин	индол	каталаза	желатиназа	сероводород	цитрат натрия	оксидаза	нитритредуктаза	подвижность			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1.	B.bronchiseptica BBR 1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
2.	B.bronchiseptica BBR 7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
3.	B.bronchiseptica BBR 22-067	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
4.	B.bronchiseptica BBR 214	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
5.	B.bronchiseptica BBR 8344	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
6.	B.bronchiseptica BBR 105	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
7.	B.bronchiseptica BBR 106	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
8.	B.bronchiseptica BBR 108	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
9.	B.bronchiseptica BBR 114	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
10.	B.bronchiseptica BBR 115	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
11.	B.bronchiseptica BBR 115a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
12.	B.bronchiseptica BBR 118	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
13.	B.bronchiseptica BBR 122	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
14.	B.bronchiseptica BBR 123	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	
15.	B.bronchiseptica BBR 124	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
16.	B.bronchiseptica BBR 125	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
17.	B.bronchiseptica BBR 126b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
18.	B.bronchiseptica BBR 126	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
19.	B.bronchiseptica BBR 132	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20.	B.bronchiseptica BBR 134	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
21.	B.bronchiseptica BBR 135	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
22.	B.bronchiseptica BBR 136	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
23.	B.bronchiseptica BBR 148	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
24.	B.bronchiseptica BBR 149	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
25.	B.bronchiseptica BBR 154	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
26.	B.bronchiseptica BBR 155	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
27.	B.bronchiseptica BBR 156	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
28.	B.bronchiseptica BBR 170	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
29.	B.bronchiseptica BBR 164	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
30.	B.bronchiseptica BBR 168	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
31.	B.bronchiseptica BBR 169	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
32.	B.bronchiseptica BBR 170a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
33.	B.bronchiseptica BBR 175	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
34.	B.bronchiseptica BBR 176	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
35.	B.bronchiseptica BBR 177	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36.	B.bronchiseptica BBR 178	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
37.	B.bronchiseptica BBR 179	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
38.	B.bronchiseptica BBR 180	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
39.	B.bronchiseptica BBR 184	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
40.	B.bronchiseptica BBR 182	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
41.	B.bronchiseptica BBR 183	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42.	B.bronchiseptica BBR 185	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
43.	B.bronchiseptica BBR 188	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
44.	B.bronchiseptica BBR 188a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
45.	B.bronchiseptica BBR 188b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
46.	B.bronchiseptica BBR 189	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
47.	B.bronchiseptica BBR 192	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
48.	B.bronchiseptica BBR 194	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
49.	B.bronchiseptica BBR 215	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
50.	B.bronchiseptica BBR 221	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
51.	B.bronchiseptica BBR 225	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
52.	B.bronchiseptica BBR 226	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
53.	B.bronchiseptica BBR 228	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
54.	B.bronchiseptica BBR 229	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
55.	B.bronchiseptica BBR 230	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
56.	B.bronchiseptica BBR 235	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
57.	B.bronchiseptica BBR 236	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
58.	B.bronchiseptica BBR 238	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
59.	B.bronchiseptica BBR 240	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
60.	B.bronchiseptica BBR 241	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
61.	B.bronchiseptica BBR 245	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

62.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 245c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
63.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 245b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
64.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 254	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
65.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 258	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
66.	<i>B. pertussis</i> BP 12a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
67.	<i>B. pertussis</i> BP 38	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
68.	<i>B. parapertussis</i> BPP 2547	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-/+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
69.	<i>B. parapertussis</i> BPP 109	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+

«-» - отрицательная реакция; «+» - положительная реакция

При определении наличия фермента нитритредуктазы слабая положительная реакция была заметна у всех штаммов только на вторые сутки.

По результатам наших исследований, биохимические особенности бордетелл достаточно однородны по тестам наборов ускоренного определения ФГУН НИИЭМ им Пастера: на сероводород, индол, арабинозу, маннозу, сахарозу, глюкозу, манит, лактозу, адонит, триптофандезаминазу и фенилаланиндезаминазу – результаты отрицательные; на лизин, аргинин, орнитиндекарбоксилазу, уреазу – результаты положительные. Тесты на индол с реактивом Эрлиха показали медленное образование малинового кольца через 48 ч – положительная реакция, тогда как экспресс-тест на индол с дисками Hi Media выявил отсутствие индолообразования (рис. 39). Клинические изоляты *B.bronchiseptica* утилизируют мочевины с образованием аммиака, обладают выраженной оксидазной, каталазной, цитохромоксидазной активностью, не ферментируют тирозин (в отличие от *B.parapertussis*).

Установили, что все исследуемые штаммы не обладают дезоксирибонуклеазной активностью, не нуждаются в факторах роста X и V, не образуют фермент желатиназу (рис. 40-50).

Изученные биологические свойства бактерий *B.bronchiseptica* показывают, что это подвижные, овоидные, грамотрицательные палочки, культивирующиеся на обычных и селективных средах, углеводы не ферментируют, образуют оксидазу, уреазу, фермент нитритредуктазу, сероводород, утилизируют цитраты, нитраты, не обладают ДНКазой, желатиназой, не нуждаются в факторах роста V и X. Традиционные схемы бактериологической детекции бактерий *B.bronchiseptica* представлены ниже (рис. 51).

Схема 1

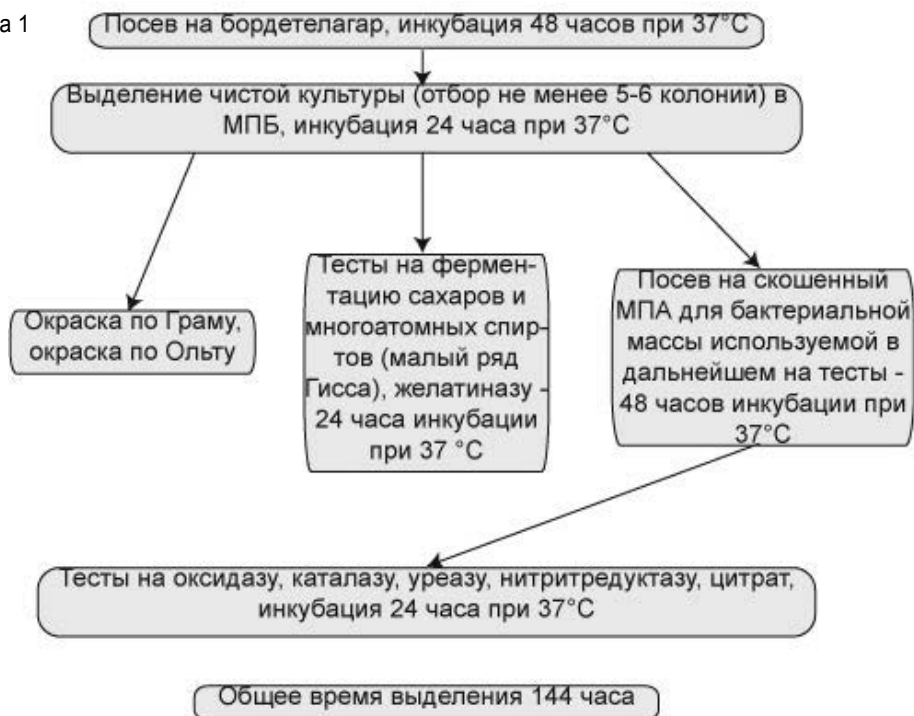


Схема 2

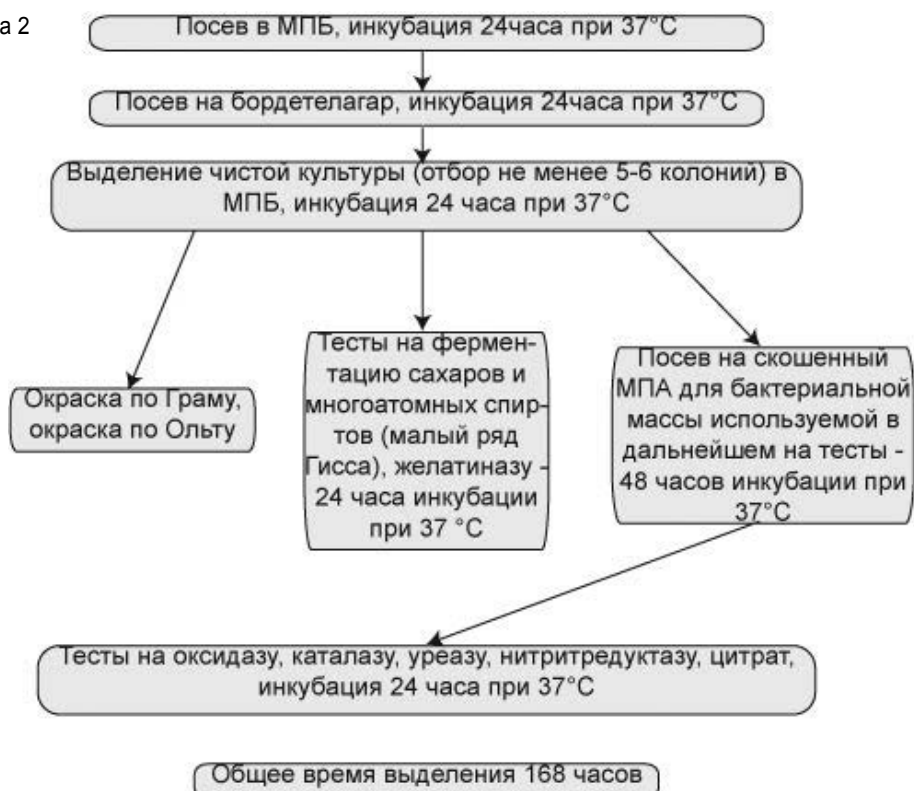


Рис. 51. Примерные схемы бактериологической детекции бактерий *B. bronchiseptica*.

УСТОЙЧИВОСТЬ

По данным D.A. Bemis et al. (2008) бактерии *B.bronchiseptica* вне организма чувствительных животных и человека не проявляют высокой устойчивости к факторам внешней среды и быстро разрушаются вне дыхательного тракта или вне фагоцитов, при ультрафиолетовом облучении, при воздействии высокой температуры, снижении уровня pH, воздействии моющих средств или обычных дезинфектантов.

По данным других исследователей во влажных, бедных необходимыми для бордетелл питательными веществами субстратах (например, в стоячей воде или фосфатно-буферном растворе) они сохраняют жизнеспособность на протяжении минимум 6-ти месяцев. В зарубежных источниках есть сообщения об установленном факте роста бактерий *B.bronchiseptica* в соленой воде без добавления каких-либо питательных веществ (J.F. Porter, 1991, 1993; S.L. Brockmeier, 1999).

По данным D.A. Bemis et al. (2008) бордетеллы лучше переносят низкие температуры, погибая во влажных субстратах при 56°C в течение 15 мин. Замораживание не уничтожает бактерии *B.bronchiseptica*. Надежными методами обезвреживания загрязненных бактерией материалов, одежды и других объектов служат автоклавирование (при 121°C в течение 1 ч) и обработка сухим жаром (при 160-170°C в течение 1 ч).

B.bronchiseptica неустойчивы ко многим дезинфицирующим средствам – глютаровому альдегиду, 1% раствору гипохлорита натрия, формальдегиду, 70% этиловому спирту, фенолу, йодсодержащим препаратам.

В зарубежных литературных источниках приведены противоречивые сведения о чувствительности бактерий к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам, что, по-видимому, связано с различными методиками исследований и многообразием штаммов *B.bronchiseptica*. Данные исследований одной группы авторов показывают, что изоляты *B.bronchiseptica* in vitro устойчивы к веществам пенициллинового ряда и сульфа-

ниламидам (P. Roudebush, 1981; A.C. Graham, 1982; D.C. Hirsch, 1986; B.F. Woolfrey, 1991), другие ученые регистрируют среднюю или высокую чувствительность к ним (A.J. Speakman et al., 1997; Hannan, 1999; D.A. Bemis et al., 2008).

Большинство исследователей выявили высокую чувствительность бордетелл к аминогликозидам, полимексинам, тетрациклину, среднюю – к амоксициллину, эритромицину и резистентность к нитрофуранам, стрептомицину и ко многим препаратам цефалоспоринового ряда (B.F. Woolfrey, 1991; A.J. Speakman et al., 1997; P.C.T. Hannan, 1999).

По нашим данным штаммы *B.bronchiseptica* растут в диапазоне pH от 4 до 8 с оптимумом роста в пределах pH 5 – 8 (Д.А. Васильев и др., 2008-2010; Д.Г. Сверкалова и др., 2009; Ю.Б. Никульшина и др., 2010).

Нами был определен уровень резистентности штаммов *B.bronchiseptica* к химиотерапевтическим средствам, ингибиторам роста, индикаторам и красителям (таблица 7).

Таблица 7. Предельные концентрации ингибиторов роста и красителей для лабораторных и клинических штаммов *B.bronchiseptica*.

Химические компоненты	Действие концентраций веществ, г/л			
	100	10	1	0,1
Мочевина	полностью подавляет	не влияет	не влияет	не влияет
Хлорид бария	полностью подавляет	не влияет	не влияет	не влияет
Уксуснокислый свинец	полностью подавляет	полностью подавляет	не влияет	не влияет
Уксуснокислый свинец	полностью подавляет	подавляет	не влияет	не влияет
Феноловый красный	полностью подавляет	полностью подавляет	не влияет	не влияет
Бромтимоловый синий	угнетает	не влияет	не влияет	не влияет
Метиловый оранжевый	угнетает	угнетает	не влияет	не влияет
Метиловый красный	полностью подавляет	полностью подавляет	угнетает	не влияет
Фуксин кислый	полностью подавляет	полностью подавляет	немного угнетает	не влияет
Водный голубой	сильно угнетает	не влияет	не влияет	не влияет
Бриллиантовый зеленый	полностью подавляет	полностью подавляет	сильно угнетает	не влияет
Конго красный	не влияет	не влияет	не влияет	не влияет
Сафранин	полностью подавляет	полностью подавляет	сильно угнетает	не влияет
Генциан виолет	полностью подавляет	полностью подавляет	не влияет	не влияет
Мурексид	полностью подавляет	не влияет	не влияет	не влияет

Анализ полученных результатов показывает, что штаммы *B.bronchiseptica* выдерживают высокие концентрации хлорида бария и мочевины, ниже показатели по уксуснокислому свинцу. Так на качество роста изучаемых штаммов бордетелл не влияют концентрации мочевины в субстрате в количестве 10 г/л и хлорида бария – 10 г/л, уксуснокислого свинца – 1 г/л. Мочевина, хлорид бария, уксуснокислый свинец полностью подавляют рост бордетелл в концентрации 100 г/л бульона.

Анализ полученных результатов по изучению предельных концентраций индикаторов и красителей в субстрате для штаммов *B.bronchiseptica* показывает, что они выдерживают высокие концентрации, которые можно использовать в качестве селективных компонентов и индикаторов pH сред. Предельная концентрация составила: феноловый красный – не более 1 г/л; бромтимоловый синий – 10 г/л; метиловый оранжевый – 0,1 г/л; фуксин кислый – 0,1 г/л; водный голубой – 10 г/л; бриллиантовый зеленый – 0,1 г/л; конго красный – 100 г/дм³; сафранин – 0,1 г/л; генциан виолет – 1 г/л; мурексид – 10 г/л.

Далее провели определение устойчивости лабораторных штаммов к антимикробным средствам (таблица 8).

Таблица 8. Чувствительность лабораторных штаммов *B.bronchiseptica* к химиотерапевтическим препаратам

№ п/п	Химиотерапевтический препарат	краткое название препарата	Содержание препарата в диске мкг	Диаметр зон задержки роста бордетелл (мм) на среде АГВ					E. coli ATCC 25922
				BBR 8344	BBR 1	BBR 7	BBR 214	BBR 22-067	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
КАРБАПЕНЕМЫ									
1	Имипенем / Циластатин	ИМ	10	15	17	15	17	17	-
ПРЕПАРАТЫ ГРУППЫ ПЕНИЦИЛЛИНА									
2	Бензилпенициллин	ПЕН	10	0	0	0	0	0	-
3	Ампициллин	АМП	10	0	0	0	0	0	22
4	Карбенициллин	КАР	25	0	0	15	0	0	-
5	Амоксиклав		300	0	0	0	0	0	-
АМИНОГЛИКОЗИДЫ									
6	Амикацин	АН	30	16	15	18	15	16	-
7	Оксациллин	ОКС	10	0	0	0	0	0	-
8	Неомицин / Банеоцин	Нео	30	25	14	14	14	16	-
9	Мономицин	МОН	-	27	24	26	25	25	-
10	Канамицин	КАН	30	16	15	15	19	15	-
11	Гентамицин / Герамицин / Гентацикол	ГЕН	10	33	20	16	20	20	25

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12	Сизомицин	-	10	14	11	17	14	12	-
13	Стрептомицин	Стр	30	0	0	10	9	0	15
14	Колистин		100	22	20	28	18	22	-
ПОЛИПЕПТИДЫ									
15	Бацитрацин	БЦ	10	0	11	0	14	10	-
ГЛИКОПЕПТИДЫ									
16	Ванкомицин	ВА	30	0	0	0	0	0	-
НИТРОФУРАНЫ									
17	Фурадонин	ФД	300	15	15	15	12	15	-
ЦЕФАЛОСПОРИНЫ									
18	Цефазолин	ЦЗ	30	0	0	0	0	0	21
19	Цефтазидим		30	0	0	0	0	0	-
20	Цефоперазон	ЦПР	75	17	36	25	19	15	30
21	Цефотаксим / Клафоран / Цефабол	ЦТК	30	15	0	0	0	0	-
22	Цефалотин	ЦФТ	30	0	0	20	0	0	16
23	Цефепим	ЦПМ	30	12	10	10	14	0	-
ФТОРХИНОЛЫ									
24	Ципрофлоксацин / Цифран	ЦИП / СФТ	-	40	23	15	15	22	-
25	Офлоксацин	Оф	10	29	25	22	23	25	-
ХИНОЛЫ									
26	Кислота оксалиновая		300	22	22	18	24	22	-
МАКРОЛИДЫ									
27	Эритромицин	Эри	15	0	0	0	0	0	-
28	Азитромицин	АРН	15	20	17	15	20	25	-
29	Рокситромицин	РКМ	-	17	17	25	18	20	-
30	Олеандомицин		15	0	0	0	0	0	-
ФУЗИДИНЫ									
31	Фузидин	ФУЗ	10	0	0	0	0	0	-
32	Фурадипан		15	0	0	0	0	0	-
ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ									
33	Нистатин	НИС	80	0	0	0	0	0	-
34	Итраконазол	ИКН	10	0	0	0	0	0	-
35	Клотримазол		25	0	0	0	0	0	-
36	Флуконазол	ФКН	40	0	0	0	10	0	-
37	Амфотерин В / Амбизом	АМВ	10	0	0	0	0	0	-
ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ									
38	Римфалицин	РИФ	5	0	0	0	0	0	-
ТЕТРАЦИКЛИНЫ									
39	Тетрациклин	ТЕТ	30	17	0	11	16	10	-
40	Доксициклин	Док	30	22	25	21	22	23	-
ПРЕПАРАТЫ ГРУППЫ ЛЕВОМИЦЕТИНА									
41	Левомецетин	ЛЕВ	10	25	25	25	25	25	27
42	Хлорамфеникол		300	22	17	25	17	28	-
ПРЕПАРАТЫ ГРУППЫ ЛИНКОМИЦИНА									
43	Линкомицин	Лиин	-	0	0	0	0	0	-
44	Клиндомицин	Кли	20	0	0	0	0	0	-

“0” отсутствие зоны задержки роста;

“-” исследование не проводилось.

Нами зарегистрирован высокий уровень устойчивости бордетелл к фузидинам (фузидину, фурадипану) и противогрибковым препаратам (нистатину, клотримазолу, итраконазолу, амфотери-ну В) и антибиотикам цефалоспоринового и пенициллинового ряда.

Далее провели исследование устойчивости клинических изолятов *B.bronchiseptica* к основным группам антимикробных средств (таблица 9).

Таблица 9. Чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов *B.bronchiseptica*.

№ п/п	Штамм	Антибактериальные препараты/ задержка роста (мм)								
		Аминогликозиды	Фторхинолоны	Макролиды	Цефалоспорины	Линкомицины	Гликопептиды	Карбапенемы	Пенициллины	Тетрациклины
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 105	16	18	5	0	2	6	14	0	25
2.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 106	18	17,5	8	0	1	8	16	0	24
3.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 108	18,5	18	4	0	1	8	15	2	25
4.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 114	15,5	19	5,5	0	2	9	16,5	0	22
5.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 115	17,5	20	8	0	3	7	14,5	0	20
6.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 115a	17	21,5	10	0	2	5	15	0	25,5
7.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 118	18	18,5	5,5	1,5	2,5	4,5	17	0	20
8.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 122	17,5	19	6	0	4	8	16	0	24
9.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 123	16	17	4	0	2	9,5	17	0	22
10.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 124	18	18,5	5	0	2	8	14	0	22,5
11.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 125	17	19	7	0	1	6	15,5	2	25
12.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 126b	17,5	15,5	12	0	2	4	14	2,5	23,5
13.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 126	17	17	10,5	0	2	9	16	0	20
14.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 132	17	20	6,5	1	2	5	15	0	20,5
15.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 134	18,5	20	1,5	0	3,5	7	15,5	0	25
16.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 135	16	21	2	0	5	8	16,5	0	23,5
17.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 136	16,5	22	5	0	4	8	17	0	22
18.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 148	17	25	5,5	0	2	8,5	14,5	0	20,5
19.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 149	17,5	20	8	0	2	6	14	0	20
20.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 154	18	20,5	4	1,5	2	4	16	1	16
21.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 155	18	19,5	6,5	0	2	5	16,5	0	24
22.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 156	17	20	8,5	0	1	5	15,5	0	25,5
23.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 170	15	21	4	0	3,5	6	14,5	0	22,5
24.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 164	18	21,5	4,5	1	2	6,5	17	3	23
25.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 168	16	20	9,5	1	2	8	17,5	2	23
26.	<i>B.bronchiseptica</i> BBR 169	16,5	18	10	0	1	4,5	16,5	0	23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
27.	B.bronchiseptica BBR 170a	19	17,5	13	0	1,5	5	16	0	24
28.	B.bronchiseptica BBR 175	22,5	19	15	0	4	4	16	0	19
29.	B.bronchiseptica BBR 176	15	19,5	10,5	0	2,5	4	15,5	0	25,5
30.	B.bronchiseptica BBR 177	18	20	6	1	6	8	14,5	0	26
31.	B.bronchiseptica BBR 178	18,5	24,5	4	1,5	2	6	16	1,5	20
32.	B.bronchiseptica BBR 179	19,5	20	8,5	1	2	4	18	0	20
33.	B.bronchiseptica BBR 180	17	20	7	1	5	5	17	0	20
34.	B.bronchiseptica BBR 184	16,5	19	5	0	3,5	4	17,5	0	19,5
35.	B.bronchiseptica BBR 182	18	17	6	0	3	4	16,5	0	24
36.	B.bronchiseptica BBR 183	19	19	7	0	1,5	4,5	17	0	23
37.	B.bronchiseptica BBR 185	15,5	25	10	0	2	8	15	0	25,5
38.	B.bronchiseptica BBR 188	18	22	12,5	0	4	4	14,5	2,5	20
39.	B.bronchiseptica BBR 188a	18,5	24,5	5,5	0	4,5	3,5	16,5	0	19,5
40.	B.bronchiseptica BBR 188b	17	20	7	1,5	3	9	17	0	24
41.	B.bronchiseptica BBR 189	17	20	4,5	1	3	7,5	17,5	0	26
42.	B.bronchiseptica BBR 192	17	20	9	1	2,5	8	16	0	23
43.	B.bronchiseptica BBR 194	17	19	11	0	2	9	16	2	22
44.	B.bronchiseptica BBR 215	18	18,5	10,5	1,5	2	9,5	16	0	22
45.	B.bronchiseptica BBR 221	17	20	8,5	0	2	4	17	0	22,5
46.	B.bronchiseptica BBR 225	19	20	5	0	2	6	16,5	0	26
47.	B.bronchiseptica BBR 226	17	20,5	5,5	0	2	8	17	0	25,5
48.	B.bronchiseptica BBR 228	16	16,5	6	0	1	5	16	0	20
49.	B.bronchiseptica BBR 229	16,5	20	8	0	1,5	7	17	0	24,5
50.	B.bronchiseptica BBR 230	17,5	19	4	1,5	1,5	9	17,5	0	26
51.	B.bronchiseptica BBR 235	18	19	10	1	2,5	5	14	0	20
52.	B.bronchiseptica BBR 236	18	19	8	1,5	0	4,5	17,5	0	16
53.	B.bronchiseptica BBR 238	18,5	19,5	9	0	2	6,5	16	0	20
54.	B.bronchiseptica BBR 240	22,5	20,5	5,5	0	3	6	16,5	0	24,5
55.	B.bronchiseptica BBR 241	17	20	7	0	3,5	6	16	0	20
56.	B.bronchiseptica BBR 245	16,5	16	5	0	2	8	17	0	22
57.	B.bronchiseptica BBR 245c	18	18	4,5	0	2	4	15,5	0	24
58.	B.bronchiseptica BBR 245b	18	19	6	1	2	9	15	1	25,5
59.	B.bronchiseptica BBR 254	18	19	7	0	2	5	17	0	20
60.	B.bronchiseptica BBR 258	17	19,5	12	0	2	4,5	16,5	0	20

Установили, что штаммы высокочувствительны к препаратам группы аминогликозидов – мономицину и колистину; к препарату группы хинолов – оксалиновой кислоте; к препаратам группы макролидов – азитромицину и рокситромицину; к

препарату группы тетрациклинов – доксициклину; к препаратам группы левомицетина – левомицетину и хлорамфениколу, что соответствует полученным результатам с использованием тест-штаммов.

Исследуемые штаммы *B.bronchiseptica* чувствительны (зона задержки роста от 15 до 25 мм) к препаратам группы карбапенемов – имипенем/ циластатин; аминогликозидов – амикацину, неомицину, канамицину, гентамицину, сизомицину; к препарату группы нитрофуранов – фурадонину; к препаратам группы цефалоспоринов – цефоперазону; к препарату группы фторхинолонов – цiproфлоксацину; к препаратам группы тетрациклина – тетрациклину. Все клинические изоляты *B.bronchiseptica* малочувствительны (зона задержки роста 11–15 мм) к препарату группы полипептидов – бацитрацину; к препарату группы цефалоспоринов – цефепину.

Нами зарегистрирован высокий уровень устойчивости бордетелл к препаратам группы пенициллина – бензилпенициллину, ампициллину, карбенициллину, амоксиклаву; к препарату группы аминогликозидов – стрептомицину; к препарату группы гликопептидов – ванкомицину; к препаратам группы цефалоспоринов – цефазолину, цефтазидиму, цефотаксиму, цефалотину; к препаратам группы макролидов – эритромицину, олеандомицину; к препаратам группы фузидинов – фузидину, фурадипану; к противогрибковым препаратам – нистатину, клотримазолу, флуконазолу, амфотерину В; к противотуберкулезному препарату – рифампицину; к препаратам группы линкомицина – линкомицину и клиндамицину.

Таким образом, мы зарегистрировали высокую устойчивость бордетелл к цефазолину, цефалотину и ампициллину, а также препаратам пенициллинового ряда (рис. 52-55).

Результаты исследований могут быть использованы при выборе компонентов для конструирования селективной среды, при назначении лечения больных бордетеллёзом животных и проведении дезинфекции помещений.

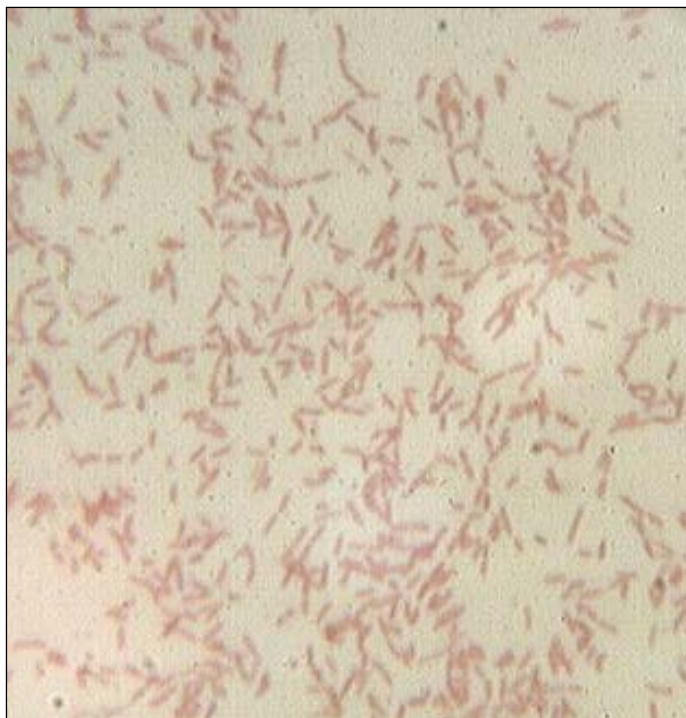


Рис. 6. Окраска по Граму референс-штамма *B. bronchiseptica* 7 увеличение $\times 100 \times 15$.



Рис. 7. Электронная микроскопия (35×10^3).

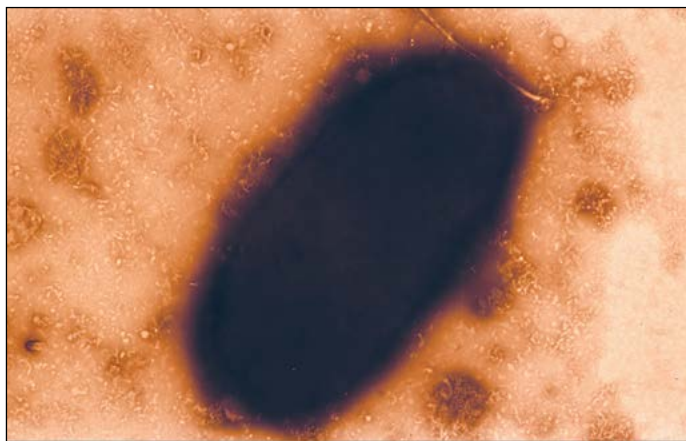


Рис.8. Электронная микроскопия (50×10^3).

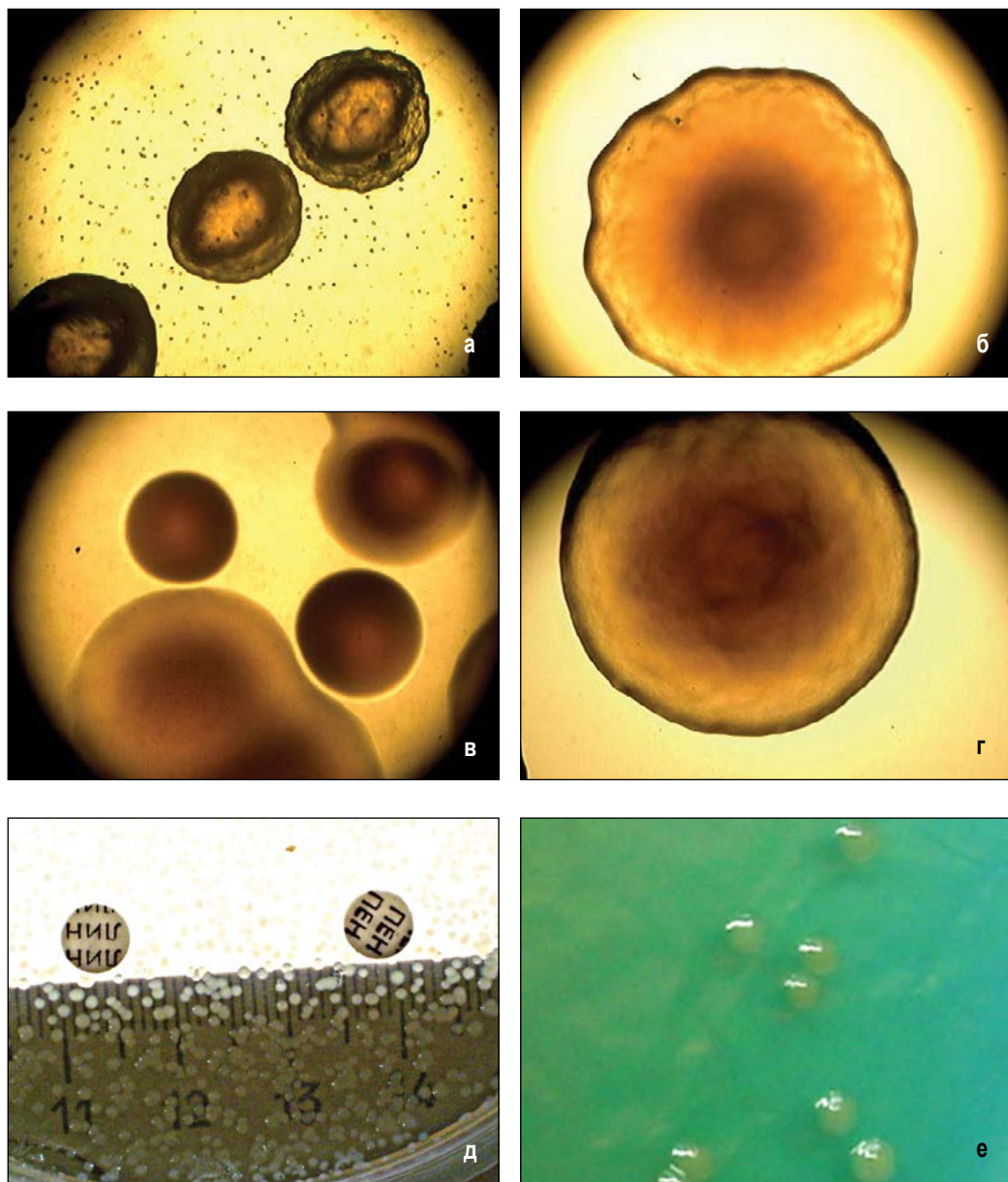


Рис. 10. Различные морфотипы колоний *B. bronchiseptica* на менингококкагаре (увеличение $\times 4$, условия культивирования: 72 ч при 37°C).

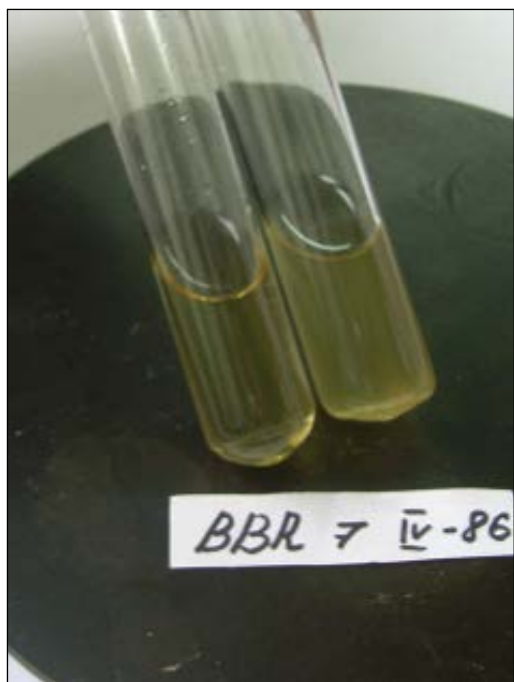


Рис. 11. Рост *V.bronchiseptica* в МПБ, пробирка слева контрольная (24 ч инкубирования при 37 °С).



Рис. 12. Рост *V.bronchiseptica* 214 в 0,7 % МПА (24 ч инкубирования при 37 °С).

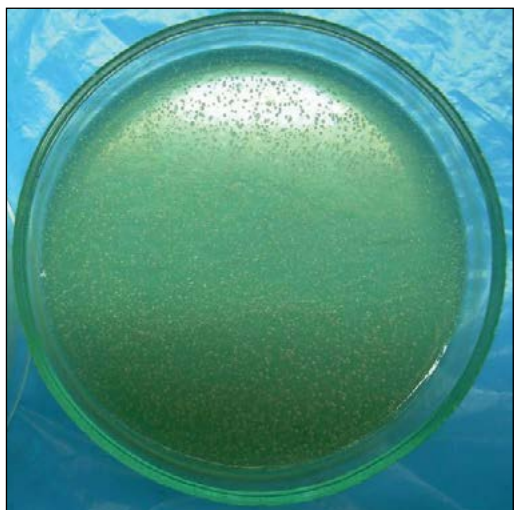


Рис. 13. Рост *V.bronchiseptica* на МПА после 24 ч инкубации при 37°С.

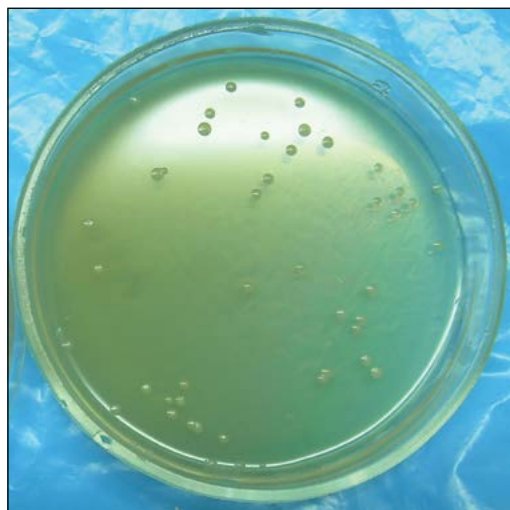


Рис. 14. Рост *V.bronchiseptica* на МПА после 42 ч инкубации при 37°С.

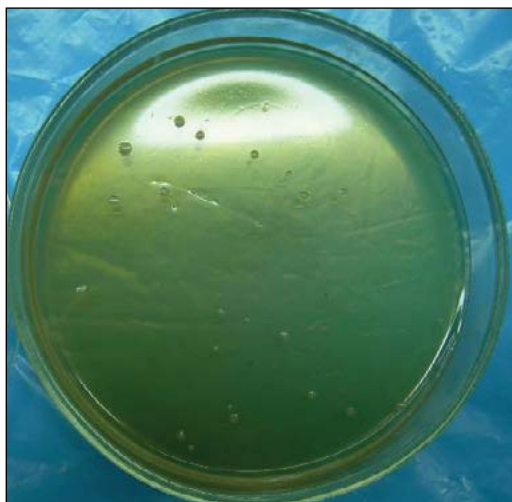


Рис. 15. Рост штаммов *B.bronchiseptica* на ГРМ – агаре через 48 ч инкубации при 37°C.



Рис. 16. Рост штаммов *B.bronchiseptica* на ГРМ – агаре через 72 ч инкубации при 37°C.



Рис. 17. Рост штаммов *B.bronchiseptica* на селективной среде для иерсиний и возбудителей псевдотуберкулеза при 37°C.



Рис. 18. Рост штаммов *B.bronchiseptica* на среде Эндо через 24 ч инкубации при 37°C..



Рис. 19. Рост штаммов *B.bronchiseptica* на среде Сабуро через 48 ч инкубации при 37°C.



Рис. 20. Рост штаммов на среде Сабуро через 72 ч инкубации при 37°C.

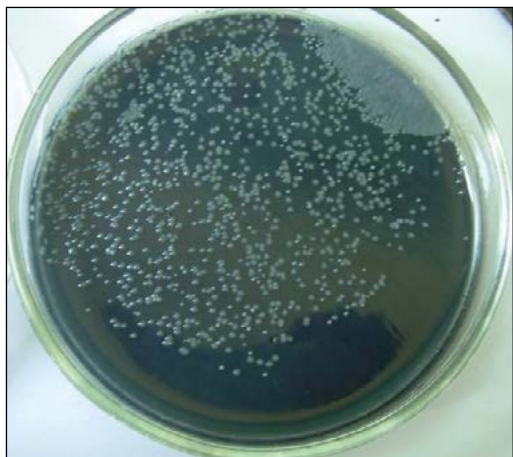


Рис 21. Рост *V.bronchiseptica* на бордетелагаре через 48 ч инкубации при 37°C.

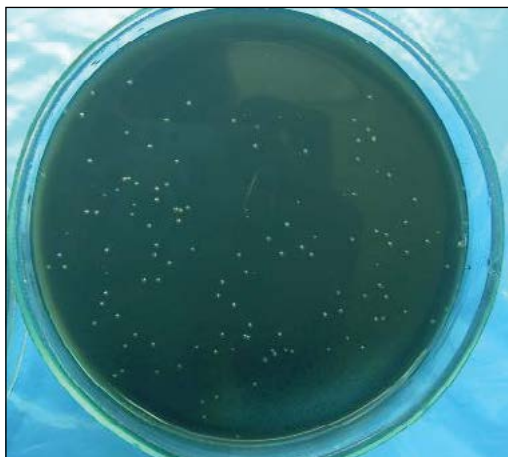


Рис 22. Рост *V.bronchiseptica* на казеиново-угольном агаре через 48 ч инкубации при 37°C.

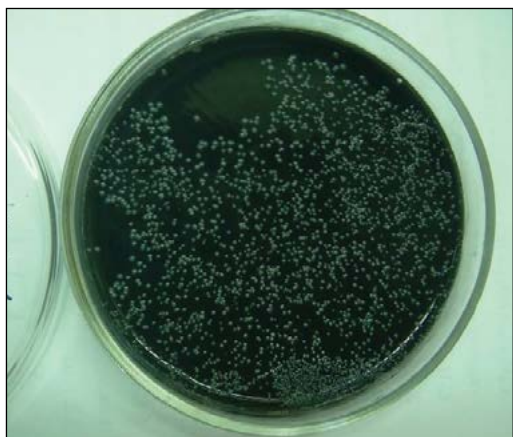


Рис. 23. Рост *V.bronchiseptica* на казеиново-угольном агаре через 72 ч инкубации при 37°C.

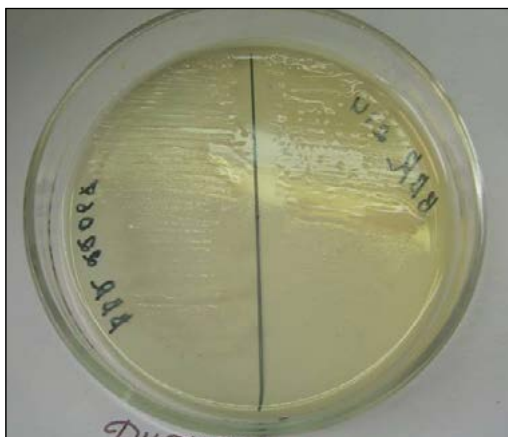


Рис. 24. Рост штаммов *V.bronchiseptica* на дифференциальной среде через 24 ч инкубации при 37°C.

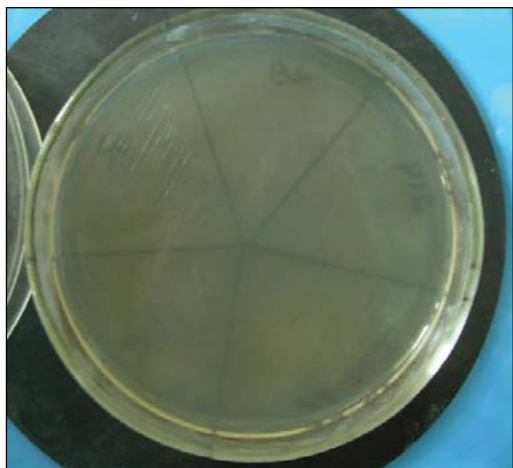


Рис. 25. Рост *V.bronchiseptica* на МПА с цетримидом (72 ч, при 37°C).



Рис. 26. Рост *V.bronchiseptica* на среде Пизу (48 ч, при 37°C).

Рис. 27. Рост штаммов *V.bronchiseptica* на среде Лизу через 48 ч инкубации при 37°C.

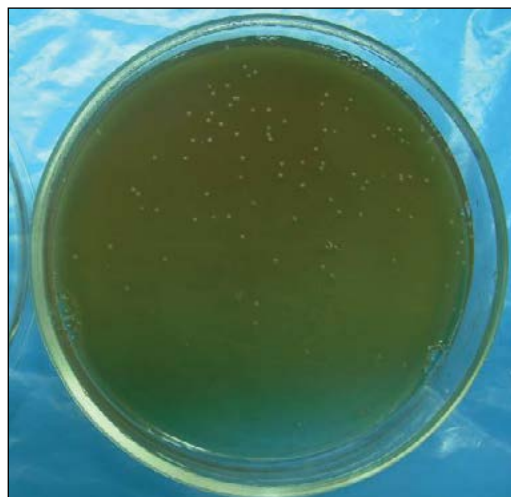
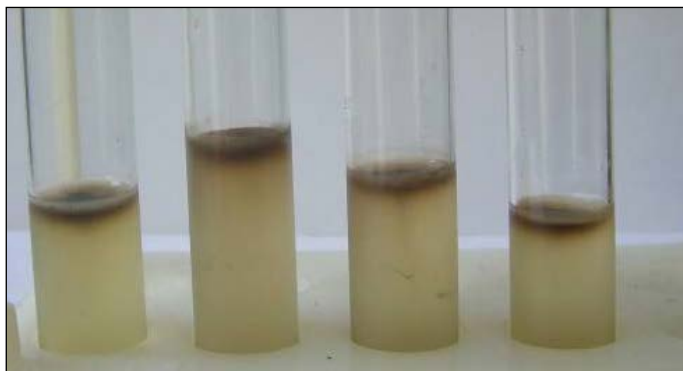


Рис. 29. Рост *V.bronchiseptica* на менингококкагаре через 42 ч инкубации при 37°C.

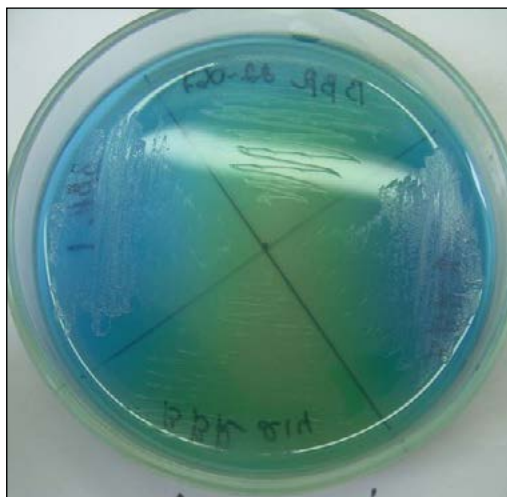


Рис 30. Рост штаммов *V.bronchiseptica* на ацетатном агаре через 48 ч инкубации.



Рис. 31. Рост *V.bronchiseptica* на среде Симмонса через 48 ч инкубации при 37°. Верхняя пробирка – контроль.



Рис. 28. Рост штаммов *V.bronchiseptica* на менингококкагаре через 24 ч инкубации при 37°C.

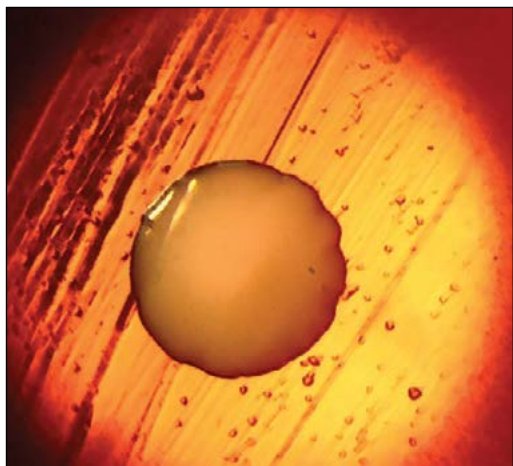


Рис. 32. Колония *B. bronchiseptica* на 10% кровяном агаре (48 ч, 37°C).

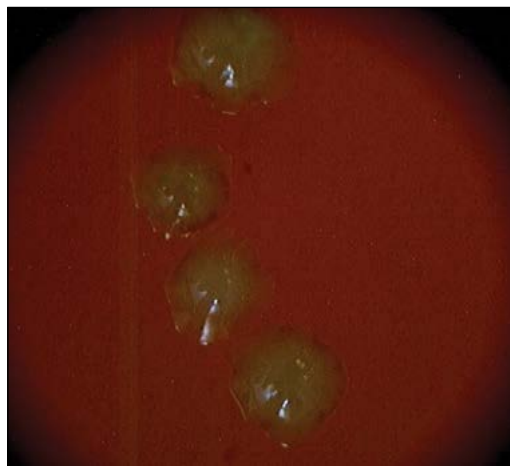


Рис. 33. Колонии *B. bronchiseptica* на кровяном агаре.

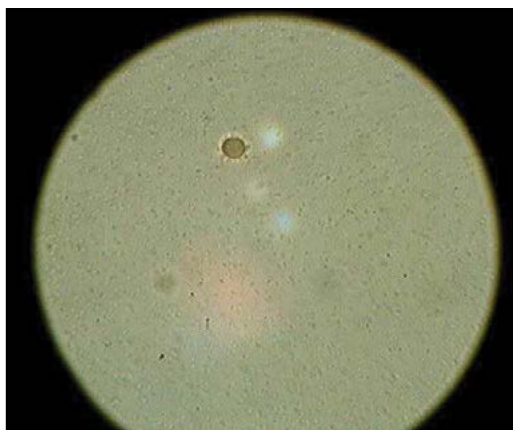


Рис. 34. Эритроцит и культура *B. bronchiseptica* в физиологическом растворе в первые минуты, увеличение $\times 100 \times 15$.



Рис. 35. Эритроциты и культура *B. bronchiseptica* в физиологическом растворе через 15 минут, увеличение $\times 100 \times 15$.

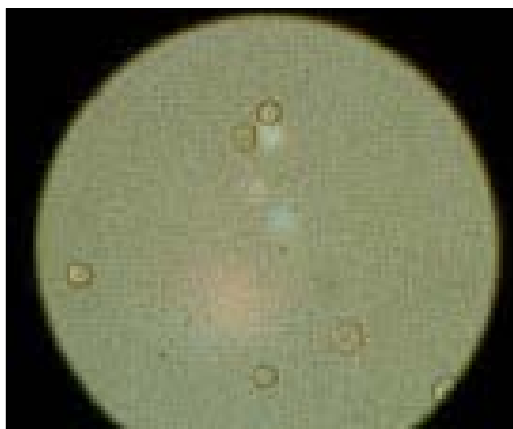


Рис. 36. Эритроциты и культура референс-штамма *B. bronchiseptica* в физиологическом растворе через 30 минут, увеличение .

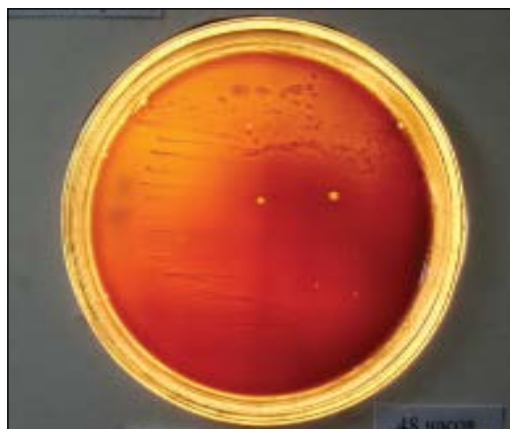


Рис. 37. Рост штамма *B. bronchiseptica* 7 на кровяном агаре с β -гемолизом.

Рис. 38. Тест на ферментацию сахаров и многоатомных спиртов на цветном ряде Гиса (пробирки слева направо: 1 – глюкоза с индикатором бромтимоловым синим; 2 – маннит; 3 – лактоза; 4 – сахароза; 5 – дульцит; 6 – мальтоза; 7 – сорбит).

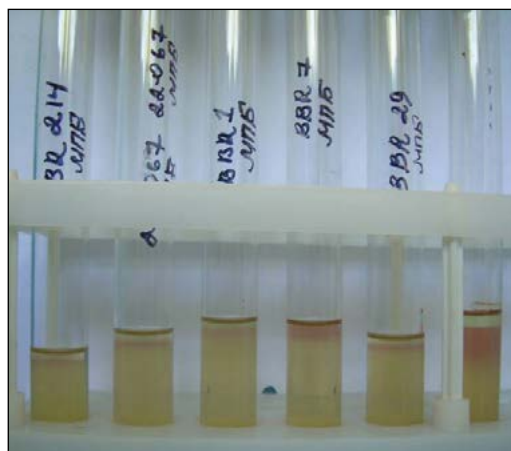
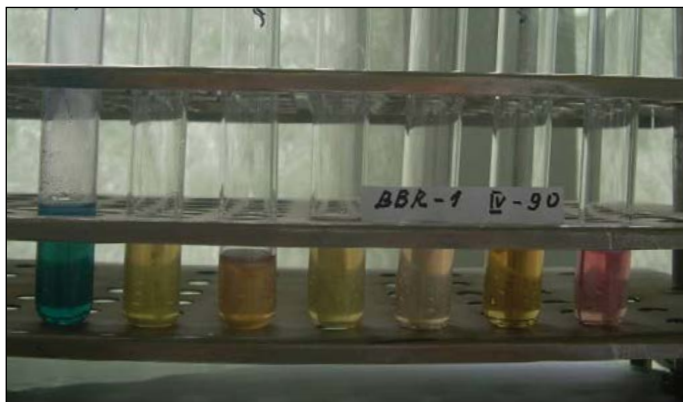


Рис. 39. Тест на индол с реактивом Эрлиха (пробирки слева направо: 1-5 – штаммы *B.bronchiseptica*, 6 – положительный контроль с *Aeromonas hydrophila*).



Рис. 40. Тест на оксидазу.

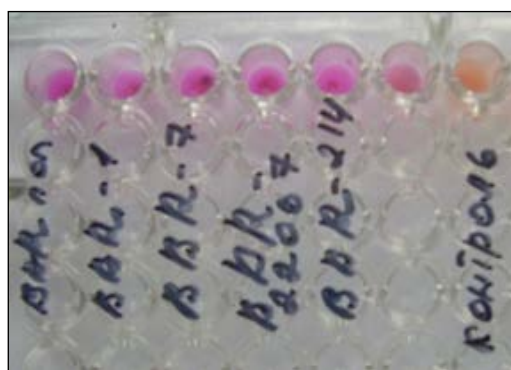


Рис. 41. Тест на уреазу со штаммами *B.bronchiseptica*. Положительная реакция – цвет малиновый, отрицательная – оранжевый.



Рис. 42. Проба с реактивом Нesslerа.



Рис. 43. Проба с реактивом Несслера. Верхняя пробирка – контроль.

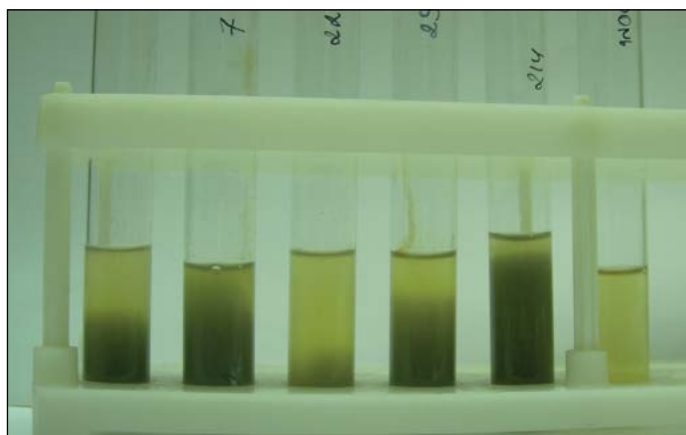


Рис. 44. Проба с реактивом Несслера (48-72 ч культивирования при 37 °С). Пробирки слева направо: 1-5 - *V.bronchiseptica*; 6 – контроль.



Рис. 45. Тест на утилизацию цитрата натрия. Положительная реакция – цвет малиновый, отрицательная - оранжевый.

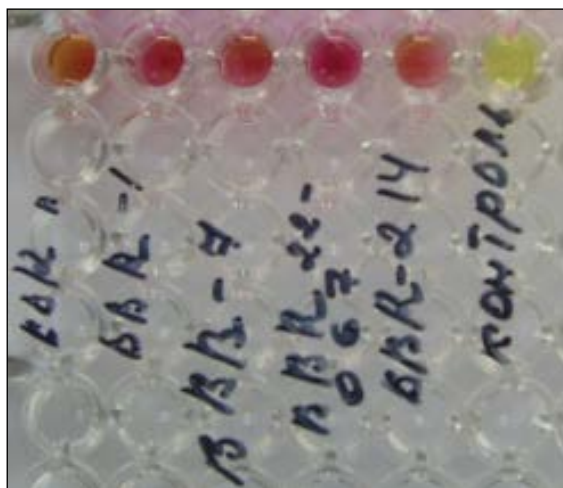


Рис. 46. Тест на наличие фермента нитритредуктазы. Положительная реакция – цвет малиновый, отрицательная – желтый.

Рис. 47. Тест на нитритное дыхание в анаэробных условиях 48 ч инкубации. Пробирки слева направо: 1 – контроль; 2 – контроль; 3 – контроль *Ps. aeruginosa* в субстрате, содержащем NO_3 под вазелиновой пробкой; 4 контроль *Ps. aeruginosa* в субстрате, содержащем NO_3 без вазелиновой пробки; 5-9 – штаммы *B. bronchiseptica* 214.



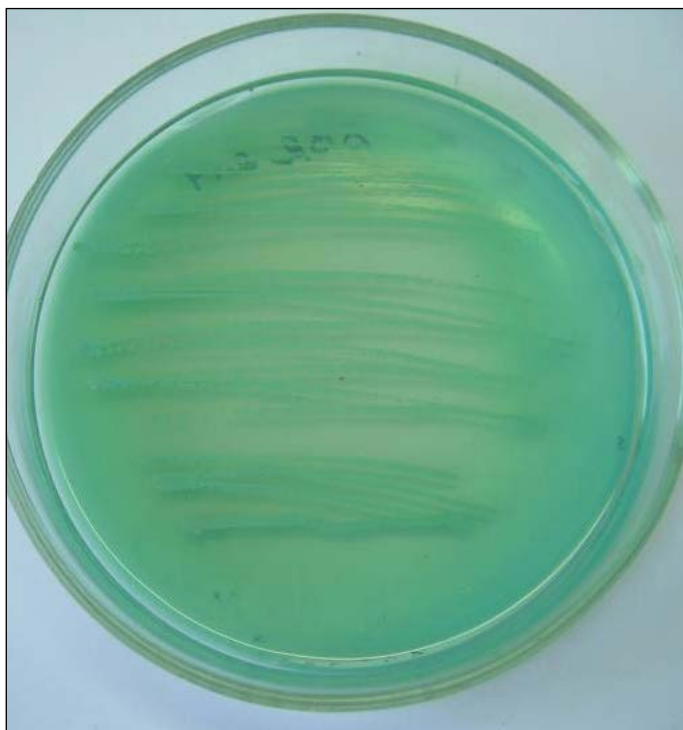
Рис. 48. Пластинчатая реакция на наличие фермента каталазы.



Рис. 49. Определение потребности *B. bronchiseptica* в факторах роста X и VX.



Рис. 50. Тест на ДНКазу с толуидиновым синим через 48 ч инкубации при 37°C.



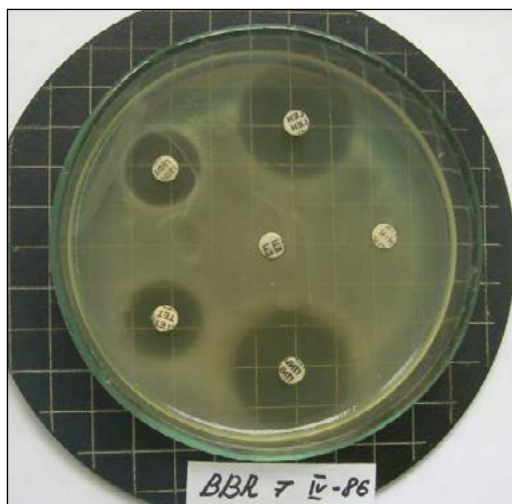


Рис. 52. Чувствительность штамма *B. bronchiseptica* на АГВ – среде:

1 – цефазолин, 2 – гентамицин, 3 – нистатин, 4 – ципрофлоксацин, 5 – тетрациклин, 6 – цефалотин

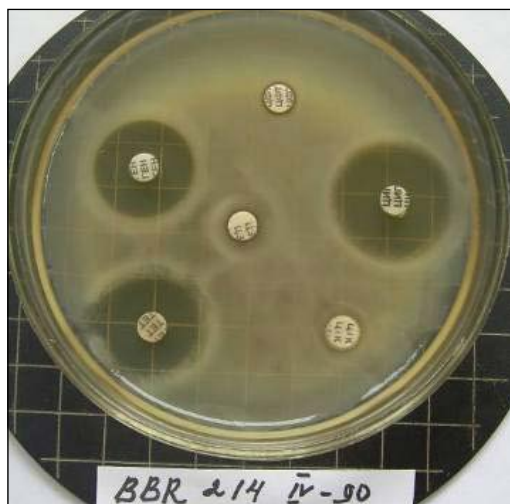


Рис. 53. Чувствительность штамма *B. bronchiseptica* на АГВ – среде:

1 – цефазолин, 2 – цефалотин, 3 – ципрофлоксацин, 4 – цефотаксим, 5 – тетрациклин, 6 – гентамицин



Рис. 54. Чувствительность штамма *B. bronchiseptica* на АГВ – среде:

1 – цефазолин, 2 – ципрофлоксацин, 3 – цефалотин, 4 – гентамицин, 5 – тетрациклин, 6 – цефотаксим

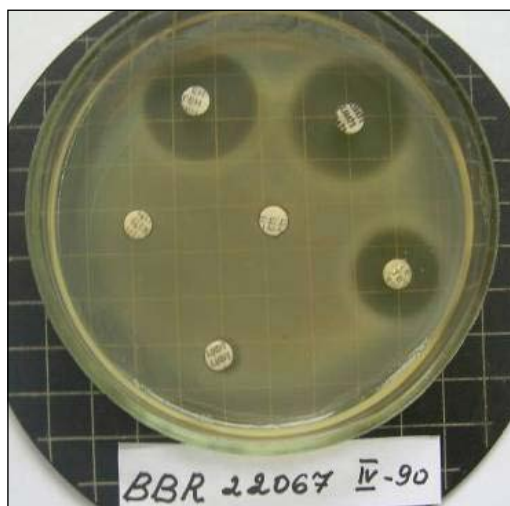


Рис. 55. Чувствительность штамма *B. bronchiseptica* на АГВ – среде:

1 – цефазолин, 2 – ципрофлоксацин, 3 – тетрациклин, 4 – цефалотин, 5 – нистатин

АНТИГЕННЫЙ СОСТАВ

Бордетеллы имеют 14 термолабильных агглютиногенов (К-антигены) и общий для видов данного рода термостабильный О-антиген.

01, 05, 07 – это три формы О-антигена и 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 – факторы К-антигена. К числу агглютинирующих антигенов относятся наружные мембранные протеины, в т.ч. фимбриальные, а также липополисахарид. Возможна утрата бактерией экспрессии тех или иных агглютининов в результате спонтанных мутаций - этот процесс происходит независимо от фазовой вариабельности (B.J.Akerley et al., 1993).

Методом электрофореза у *B.bronchiseptica* выявлено 2 мажорных и 35 минорных полипептидов. Бактерия имеет общие родоспецифические и видоспецифические антигены, многие из которых почти не изучены. Общие антигены дают перекрестные реакции с антителами к другим бордетеллам – *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Видоспецифический термолабильный антиген *B.bronchiseptica* обозначают как «фактор 12» (J.G. Coote, 1996).

Молекула наружного мембранного протеина пертактина в структурном плане представляет собой спираль, состоящую из 16 параллельных полипептидных цепочек. Как и у многих других протеинов участвующих в процессе адгезии бактерии к протеинам хозяина (фибронектину, витронектину, фибриногену и фактору Виллебранда) в ее N-терминальном домене имеется повторяющийся трипептидный мотив Arg-Gly-Asp. Этот протеин является не только адгезином, но и важнейшим протективным иммуногеном. Иммуногенность пертактина ассоциирована с богатым пролином C-терминальным доменом его молекулы. Однако иммунизация только этим антигеном дает значительно более слабую защиту от заражения по сравнению с иммунизацией цельным бактерином. Это может быть объяснено наличием у бактерии и других протективных антигенов, а также вариабельностью самого пертактина. В настоящее время идентифици-

ровано 7 иммунологически различающихся форм пертактина (B.J. Akerley et al., 1995; M. Masuda et al., 2000).

Патогенность *B.bronchiseptica* изменяется и определяется присутствием нескольких факторов патогенности (таблица 3). За исключением трахейного цитотоксина, все факторы находятся под контролем гена патогенности (D.M. Monack et al., 1989; Y. Horiguchi, 1997; C.B. Forde et al, 1998, 1999).

Антигенный состав микроорганизма в разных фазовых состояниях вариабелен. Только у фазы I обнаружен высокоиммунный антиген с мМас 74 кД, что позволяет использовать его в качестве маркера этой фазы (P. Novotny et al., 1985). У бордетелл, находящихся во второй фазе наиболее интенсивно экспрессируется протеин VirA. Он состоит из 1578 аминокислотных остатков и проявляет гомологию с интиминном энтеропатогенных и энтерогеморрагических штаммов *E.coli* и инвазином йерсиний. Этот протеин не оказывает влияния на адгезию или персистенцию бактерии, но вероятно важен для инфекционного цикла, например, в период аэрогенного заражения. С авирулентным фенотипом (фаза III) ассоциирован интенсивный синтез флагелина (B. Elias et al., 1990; P.C. Giardina et al., 1995).

Таблица 10. Антигенный состав видов бактерий рода *Bordetella*.

Антигены	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>
К-антигены:			
Общий для рода фактор 7	+	+	+
Специфические для вида:			
Фактор 1	-	+	-
Фактор 14	-	-	+
Фактор 12	+	-	-
Встречающиеся у отдельных штаммов:			
Факторы 2,3,4,5,6,13	-	+	-
Факторы 8,9,10	-	-	+
Факторы 8,9,10,11,13	+	-	-
О-антиген, общий для рода	+	+	+
Жгутиковый гемагглютинин	+	+	-
Термолабильный дермотоксин	+	+	+
Термостабильный экзотоксин	-	+	-

Филаментозный гемагглютинин образуется из протеина-предшественника имеющего мМас 367 кД, посредством отделения от последнего С-терминального участка размером 147 кД. В итоге мМас филаментозного гемагглютинина становится равной 200-220 кД. Антитела к нему ингибируют адгезию бактерии к клеткам хозяина. Они появляются на ранней стадии инфекции (Y. Sakurai et al., 1993).

Экспрессия филаментозного гемагглютинина и наружных мембранных протеинов (в т.ч. пертактина) неодинакова у разных штаммов агента и подвержена вариабельности в зависимости от внешних условий.

Аденилатциклаза-гемолизин является основным протективным антигеном бактерий. Антитела к нему появляются на ранней стадии инфекции. Его мМас равна 68 кД, а изоэлектрическая точка – 7,0-7,6. Он проявляет 95% гомологии с аденилатциклаза-гемолизином *B.pertussis*. У них различается только С-терминальный домен, но они не дают перекрестных реакций. Мутанты агента, лишённые аденилатциклазы-гемолизина, утрачивают способность выживать в нейтрофилах. Кроме того, антитела к этому белку проявляют защитное действие за счет усиления фагоцитарной активности нейтрофилов (E.T. Harvill et al., 1999; D.H. Lenz et al., 2000).

Пили *B.bronchiseptica* дают лишь слабую перекрестную реакцию с антителами к пиям других бордетелл. Тем не менее, гомология аминокислотного состава N-терминальных участков пильных полипептидов *B.bronchiseptica* и других бордетелл, а также *E. coli*, *H. influenzae* и *P. mirabilis* достигает 52-60%. Как установлено в опытах на лабораторных животных, пильные антигены создают протективный иммунитет. Додецилсульфат натрия, меркаптоэтанол и 5-минутное кипячение лишают их иммуногенности. Выделенные от собак штаммы агента обладают пиями, проявляющими значительно большую вариабельность иммунологических реакций по сравнению с изолятами, выделенными от свиней и морских свинок (B.J Akerley et al., 1992; D. DeShazer et al., 1995; H.M. Lacerda et al., 1997; M. Masuda et al., 2000).

B.bronchiseptica, как и *B.parapertussis*, имеет в составе клеточной стенки поверхностный липополисахарид, который называют О-антигеном. Липополисахарид является одним из основных компонентов клеточной оболочки грамотрицательных бактерий и общепризнанным фактором их патогенности. Он обладает рядом активных воздействий, направленных на преодоление механизмов врожденного иммунитета, таких как устойчивость к бактерицидному действию нормальных секретов слизистых и сыворотки крови, а также катионных пептидов фаголизосом. Он индуцирует альтернативный путь активации комплемента и образование специфических антител, связывание которых с бактериальной клеткой (опсонизация) необходимо для последующего фагоцитоза. Как правило, это удается благодаря наличию поверхностных полисахаридов – длинноцепочечных О-антигенов (у S-форм грамотрицательных бактерий) или капсульных полисахаридов. О-антиген высокотоксичен (является эндотоксином грамотрицательных микроорганизмов), термостабилен (не разрушается даже при кипячении). Однако соматический антиген разрушается под действием формалина и спиртов. Липополисахарид *B.bronchiseptica* дает перекрестные реакции в РДП, РА и ИФА с антисыворотками к *B.pertussis* и *B.parapertussis* (A.G.Allen et al., 1998)

Липополисахарид образован гептозой, 3-дезоксид-манно-2-октулосоновой кислотой, глюкозамином, уроновой кислотой, фосфатами и жирными кислотами. Видоспецифичность липополисахарида ассоциирована с входящим в его состав полисахаридным антигеном О. У гладкой (S) формы липополисахарида фаз 1 и 2 агента О-полисахаридный компонент состоит из линейного неразветвленного полимера, связанного с 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси- α -L-галакто-пиранозилуроновой кислотой (M. Watenabe et al., 1990; B. Arico et al., 1991; F.Betsou et al., 1995; W.M.R. van den Akker, 1997).

Мы изучили антигенные комплексы бордетелл в иммунохимических реакциях. Антигены *B.bronchiseptica* изолировали экстракцией микробных клеток в стерильном 0,9% NaCl с последу-

ющей ультразвуковой дезинтеграцией (Д.А. Васильев и др., 2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2009; А.В. Мастиленко и др., 2010; Ю.Б. Васильева, 2013).

Для подтверждения сохранности полученных антигенов после дезинтеграции проводили электрофорез в 2,0% агарозном геле в трис-боратном буфере (рН-8,3) с режимом 25 В/см в течение 30 минут. После электрофореза гель окрашивали красителем 1% Amido Black 10B в течение 60 минут. После этого пластину геля помещали в промывающий раствор, содержащий 10% лимонную кислоту на 24 часа для просветления фона. Гель документируют и анализируют количество полученных полос антигена.

В результате экспериментов был подобран оптимальный режим дезинтеграции бактериальных клеток, позволяющий полностью разрушить бактериальные клетки и максимально сохранить антигены *B.bronchiseptica*. При режиме дезинтеграции (частота 23 кГц, амплитуда колебаний 5 микрон, в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом) и электрофорезе в 2,0% агарозном геле с использованием трис-боратного буфера было определено 7 антигенов (рис.56).

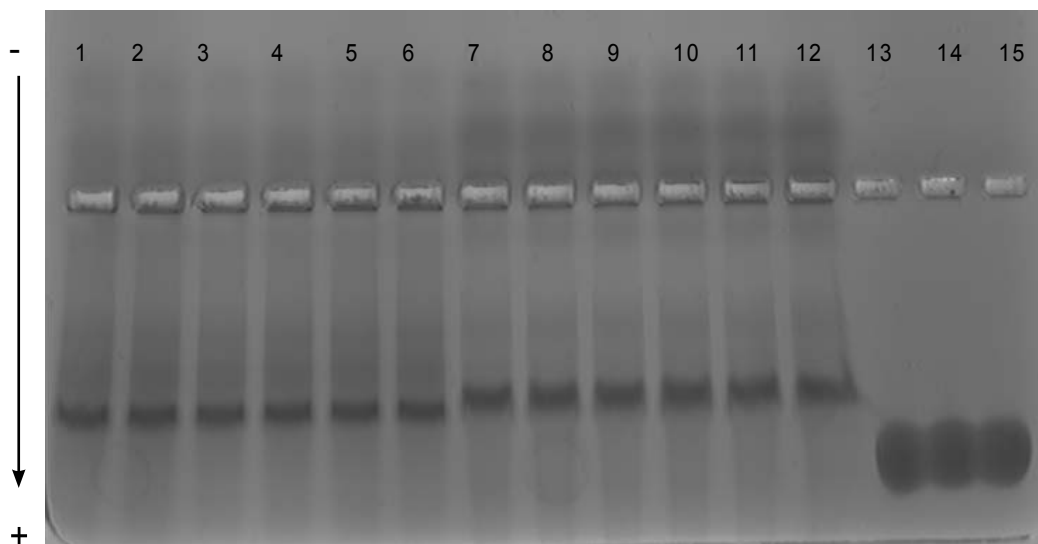


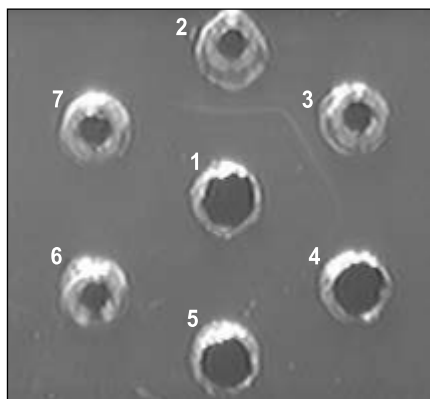
Рис. 56. Электрофореграмма антигенов *B.bronchiseptica*: 1-12 – штаммы *B.bronchiseptica*; 13-15 – альбумин (65 кДа).

После выбора оптимального режима дезинтеграции микробных клеток была получена бактериальная масса в количестве 50 мл. Была проведена ее ультразвуковая дезинтеграция для последующей иммунизации кроликов.

После проведения иммунизации кроликов и получения антисыворотки в реакции диффузной преципитации был определен титр антител, который составил 1:8 (рис. 57).

Далее провели испытания иммунохимических методов: двойной радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony (1948), встречного электрофореза по G. Bedarida et al. (1969) и иммуноэлектрофореза по методу P. Grabar и C. Williams, описанному Х. Фримель (1979).

Для двойной радиальной иммунодиффузии был использован 2,0% агарозный гель на трис-боратном буфере (pH – 8,3). Гель такой концентрации обладает достаточно хорошей разрешающей способностью для качественного выявления образующихся преципитатов (рис. 58).



В результате проведенных экспериментов было получено 5 линий преципитации с комплексными антигенами различных штаммов *B.bronchiseptica* и 3 линии преципи-

Рис. 57. Титр антител иммунной сыворотки. Лунки: 1 – раствор антигенов *B.bronchiseptica*; 2-7 – последовательные двукратные разведения иммунной сыворотки, начиная с разведения 1:2.

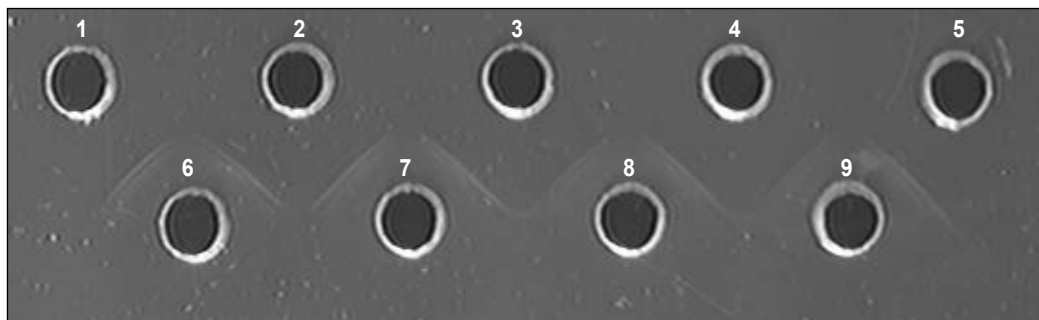


Рис. 58. Двойная радиальная иммунодиффузия по О. Ouchterlony. Лунки: 1 – *B.bronchiseptica* 36; 2 – *B.bronchiseptica* 37; 3 – *B.bronchiseptica* 45; 4 – *B.bronchiseptica* 48; 5 – *B.bronchiseptica* 59; 6-9 – иммунная сыворотка.

тации с комплексными антигенами *B.parapertussis*. 2 антигена *B.bronchiseptica* явились видоспецифичными.

Встречный электрофорез проводился в трис-боратном буфере (рН-8,3). В качестве поддерживающей среды в данной работе был использован 1,5% агарозный гель. В геле были вырезаны 2 ряда лунок: верхний – для антигена, нижний – для иммунной сыворотки. Ряды лунок располагались на расстоянии 1 см друг от друга. Электрофорез проводили с режимом 25 В/см, 100 мА, в течение 20 минут. После этого гель вынимали из электрофоретической камеры, промывали в 0,9% NaCl в течение 30 минут для отмывки несвязавшихся антигенов и антител. После этого наблюдали преципитаты в проходящем свете (рис. 59). При слабых преципитатах пластину геля оставляли в растворе 0,9% NaCl на 24-48 часов.

В результате эксперимента были получены четкие преципитаты, образованные с антигенами дезинтегрированных культур *B.bronchiseptica* и *B.parapertussis*. С антигенами культур грамотрицательных (*P.aeruginosa*, *A.hydrophila*, *E.coli*, *Y.enterocolytica*, *Y.pseudotuberculosis*) и грамположительных (*S.aureus*) бактерий преципитации не наблюдалось (А.В. Мاستиленко и др., 2010; Ю.Б. Васильева, 2013).

Далее испытали иммуноэлектрофорез. Сначала был проведен электрофорез антигенов в агарозном геле в течение 30 минут. Толщина геля составляла 3-4 мм. Затем в канавку, параллельную миграции антигенов, была помещена гипериммунная сыворотка

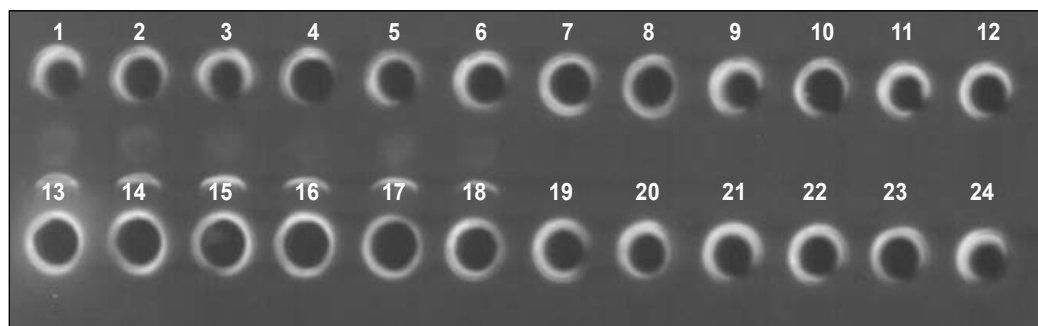


Рис. 59. Встречный электрофорез. Лунки: 1 – *B.parapertussis* №1; 2 – *B.parapertussis* №7; 3 – *B.bronchiseptica* №214; 4 – *B.bronchiseptica* №59; 5 – *B.bronchiseptica* №22067; 6 – *B.parapertussis*; 7 – *Pseudomonas aeruginosa*; 8 – *Aeromonas hydrophila*; 9 – *Escherichia coli*; 10 – *Yersinia enterocolytica*; 11 – *Yersinia pseudotuberculosis*; 12 – *Staphylococcus aureus*. Стрелкой указана линия преципитации антигена и иммунной сыворотки

ка. Для равномерной диффузии пластина с гелем находилась во влажной камере в течение 24-48 часов. После этого линии преципитации наблюдали в боковом освещении на темном фоне (рис. 60). Гели документировали и проводили анализ.

В результате данного эксперимента было идентифицировано 8 антигенов *B.bronchiseptica*. Антигены различных штаммов возбудителя имели значительное сходство, что подтверждается количеством и расположением линий преципитации. В опытах с комплексными антигенами *B.parapertussis* было определено 3 идентичных линии преципитации, что подтверждает наличие общих антигенов с *B.bronchiseptica*. Были проведены эксперименты иммуноэлектрофореза комплекс-

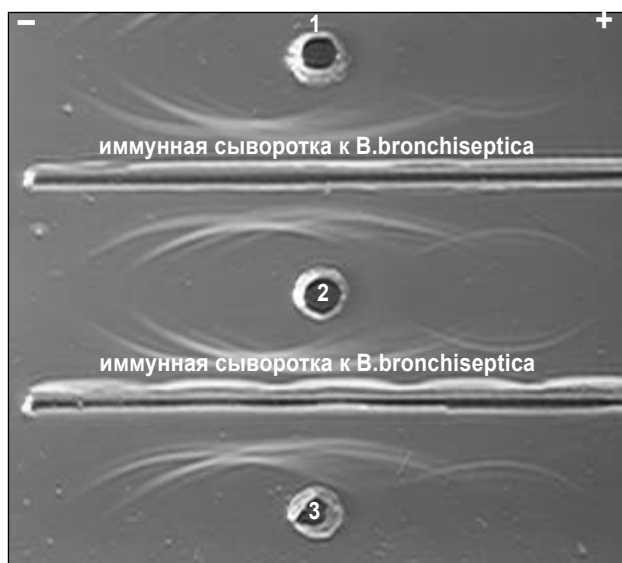


Рис. 60. Иммуноэлектрофореграмма антигенов *B.bronchiseptica* №169 (лунка 1), *B.bronchiseptica* №101 (лунка 2) и *B.bronchiseptica* №71 (лунка 3), полученная с помощью кроличьей иммунной сыворотки к *B.bronchiseptica*



Рис. 61. Тест на дермoneкротический токсин. Некроз кожи кролика на месте введения живой культуры *B.bronchiseptica*

ных антигенов грамотрицательных и грамположительных бактерий с гипериммунной сывороткой. Установили, что иммунная сыворотка к антигенам *B.bronchiseptica* образует с комплексными антигенами грамотрицательных бактерий 3 линии преципитации. Титр иммунной сыворотки, использованной для иммуноэлектрофореза, составил 1:8, что доказывает высокую чувствительность этого метода при анализе антигенной структуры *B.bronchiseptica*.

Результаты проведенных нами исследований на наличие дермонекротического токсина показали, что бордетеллы провоцируют образование некроза кожи в области введения взвеси культур через 48 ч (рис. 56).

Таким образом, использование двойной радиальной иммунодиффузии позволяет обнаружить 5 антигенов *B.bronchiseptica*, 3 из которых дают перекрёстную реакцию с *B.parapertussis*. Встречный электрофорез не дает возможности провести видовую идентификацию антигенов *B.bronchiseptica*. Метод иммуноэлектрофореза выявляет 8 антигенных комплексов, 5 из которых являются видоспецифичными для *B.bronchiseptica*.

ГЕНОМ

Важным моментом в изучении генетических характеристик *B.bronchiseptica* стали работы J. Parkhill, M. Sebahia, A. Preston (2003), которые рассматривали наследственный материал этой бактерии в сравнении с другими представителями рода *Bordetella*. По их мнению, *B.pertussis* и *B.parapertussis* являются независимыми производными *B.bronchiseptica*; во время эволюционного развития этих видов произошла крупномасштабная генная потеря и инактивация некоторых генов (с возможным отсутствием промоторов и генетических регуляторов). Предполагаемое время генетического обособления видов 0,27-1,4 миллиона лет назад для *B.parapertussis* и 0,7-3,5 млн. лет назад для *B.pertussis*. Таким образом, первоначальный геном рода *Bordetella*, возможно, сохранен лишь в *B.bronchiseptica*.

Геном *B.bronchiseptica* имеет размер 5,4 млн. пар оснований (самый большой в роду *Bordetella*) и характеризуется высоким (68,07%) содержанием гуанина и цитозина. Весь геном кодирует около 5 тысяч генов, обнаружено до 18 (0,4%) некодирующих псевдогенов, от 3 до 5 рРНК-оперонов, 55 генов-кодонов транспортных РНК. Средняя длина гена составляет 978 пар оснований. Инсерций (включений) в ДНК *B.bronchiseptica* секвенирующим анализом не выявлено, в отличие от других представителей рода *Bordetella* (A.Van der Zee et al., 1997; S.Karlin, 2001; J. Parkhill et al., 2003).

Геном *B.bronchiseptica* имеет несколько больших дискретных областей ДНК, уникальных для данного вида. Некоторые из них являются вставками профага, но природа трех из них не выяснена. Ученые предполагают, что большие блоки ДНК, отсутствующие у *B.parapertussis*, являются не вставками профага или ISE (вставочными последовательными элементами) у *B.bronchiseptica*, а делецией (выпадением) их у первого (B.Arigo, R.Rappuoli 1987; J. Parkhill et al., 2003).

Анализ различных штаммов *B.bronchiseptica* показал, что некоторые области ДНК с нетипичным содержанием G+C (GC-повторы) динуклеотидов, связаны с горизонтальным трансфером, а не с мутациями генетических кластеров (S.Stibitz, M.S.Yang, 1999).

При сравнительном анализе *B.bronchiseptica*, *B.parapertussis* и *B.pertussis* обнаружено, что около 3287 генов являются общими для них, а 602 – встречаются только у *B.bronchiseptica*. Исследования последних показали, что многие из них вовлечены в мембранный транспорт, некоторые процессы метаболизма, процессы регулирования экспрессии генов вирулентности и синтеза поверхностных структур (таких как жгутики). Среди генов, содержащихся только в геноме *B.bronchiseptica*, обнаружены уникальные для вида гены; они, вероятно, были потеряны другими представителями рода. Некоторые из этих генов вовлечены в транспорт и метаболизм широкого диапазона органических и неорганических соединений, включая аминокислоты, соедине-

ния ароматического ряда, жирные кислоты, полиамины, фосфаты, фталаты, ванилаты и манделаты. Есть также среди них группа генов, кодирующих два сидерофора – рецепторов, участвующих в доставке железа в бактериальную клетку (A. Van der Zee et al., 1997; J. Parkhill et al., 2003; S. Mattoo et al., 2001).

Проявление факторов вирулентности возбудителя (филаментозного гемагглютинина, пертактина, фимбрий, аденилатциклазы-гемолизина и алкалигина) вовлеченного в патогенетический процесс, регулируется двухкомпонентной системой BvgA/S. Трансмембранный сенсорный протеин BvgS и транскрипционный активатор/репрессор BvgA контролируют экспрессию адгезинов и токсинов. Внешние воздействия приводят к фосфорилированию рецептора – гистидинкиназы BvgA, расположенной на внутренней мембране бактериальной клетки. Фосфорилированная форма BvgA активирует транскрипцию генов, являющихся проявлением вирулентности, путем связывания с их активаторами. Один из таких генов кодирует регулятор BvgR, оказывающий репрессивное воздействие на транскрипцию генов, понижающих проявление генов вирулентности (на уровне транскрипции и трансляции). Таким образом, активация Bvg заметно изменяет экспрессию генетического профиля *B. bronchiseptica*. Фаза, при которой система Bvg активирована (Bvg⁺) обеспечивает проявление бактериальной клеткой вирулентности как за счет активации генов, продукты которых необходимы для колонизации агентом респираторного тракта, так и посредством угнетения активности генов, ингибирующих развитие инфекции. Наоборот, Bvg- фаза обеспечивает бактерии выживание в окружающей среде. Существует также фенотипическая фаза Bvg_i, являющаяся промежуточной между вышеупомянутыми, характеризующаяся нехваткой экспрессии генов-репрессоров факторов вирулентности (P.A. Cotter, J.E. Miller, 2001; S. Mattoo et al., 2001).

Система BvgAS способна также негативно влиять на активность генов *byf1A* и *B*, отвечающих за синтез флагеллина. У вирулентной и слабовирулентной фаз 1 и 2 эти гены репрессированы и у бактерии не формируются жгутики. У авирулентной фазы 3 не-

гативное влияние системы BvgAS снимается, и бактерия становится подвижной. Принято обозначать активируемые и угнетаемые системой BvgAS гены, как Vag- и Vrg-гены, соответственно.

Продукты еще одного из локусов – *gis* обеспечивают выживание агента внутри инвазированных клеток. На экспрессию этих генов также влияют внешние сигналы, такие как температура, концентрация некоторых веществ и т.п. Образование продуктов локуса *gis* не активирует подвижность микроорганизма, и, таким образом, происходит в стационарных внутриклеточных условиях (P.A. Cotter, J.E. Miller, 2001; I.H. Van Loo et al., 2002).

Гены *fim2*, *fim3*, *fimX*, *fimA* и *fimN*, регулирующие синтез фимбрий, располагаются в локусе *fimBCD*, находящемся по-соседству от локуса *bvg* в опероне, ответственном за синтез филаментозного гемагглютинина. Синтез уреазы кодирует хромосомный оперон размером 8,9 пар оснований, в состав которого входят структурные (*ureA*, *ureB* и *ureC*) и дополнительные (*ureD-urefsc*, *ureF*, *ureG* и *UreJ*) гены. Вблизи от оперона находится транскрипционный активатор *BbuR*, гомологичный активатору *LysR* участвующему в регулировании синтеза уреазы у клебсиелл, и активатору *OxyR* кишечной палочки, регулирующего синтез каталазы. Эти аналогии позволяют предположить, что уреазы *B.bronchiseptica* участвует также, как и названные ферменты клебсиелл и *E.coli*, в защите находящейся в макрофагах бактерий от фаголизосомного разрушения. Ген, отвечающий у *B.bronchiseptica* за синтез уреазы, проявляет 41-50% гомологии с уреазным геном протеев, клебсиелл и геликобактерий. Его активность регулируется температурой, концентрацией ионов магния.

B.bronchiseptica имеет ген *per*, ответственный за синтез пертуссина, но по данным некоторых авторов, для его экспрессии необходим промотор, отсутствующий в геноме бактерии (B. Arico, R. Rappuoli, 1987; P.E. Boucher, S. Stibitz, 1995). Генноинженерное включение в геном промоторов *ptx-ptl* делает *B.bronchiseptica* активным продуцентом пертуссина, что может быть использовано при изготовлении препаратов из последнего, поскольку *B.pertusis* отличается от *B.bronchiseptica* слабым ростом на пита-

тельных средах. Ген пертактина *prn* весьма вариабелен, особенно участок II.

Синтез протеина BhuR и сидерофора алкалигина, участвующих в доставке железа в бактерию, обеспечивают ген *bhu* и оперон *alcABCDER*, соответственно. Центральное место в синтезе алкалигина занимает регулятор *alcR*. Он управляет функциональным состоянием генов *alcA*, *B* и *C*, образующих железо-регулирующий оперон. Ген *AlcB* направляет ацилирование сукцината. Ген *alcC*, идентичный гену *iucC* аэробактининсинтетазы, по всей видимости, отвечает за окончательный этап биосинтеза алкалигина. В последнем принимает участие орнитин декарбоксилаза, кодируемая геном *odc*, функциональное состояние которого определяется активностью генов *alcABC*. Ген *fur*, напротив, тормозит биосинтез алкалигина. Этот ген несет информацию о синтезе протеина Fur, который наиболее активен в условиях нахождения бактерии в богатых железом субстратах. Ген *fauA* несет информацию о синтезе чувствительного к алкалигину рецептора.

Еще одна группа генов, детерминирующие Fe-рецепторно-транспортные протеины, представлена у вида *B.bronchiseptica* в несколько ином составе, отличным от таковой у *B.pertussis* и *B.parapertussis*. Наличие наряду с другими генами также *BfrA* и *BfrZ* у *B.bronchiseptica* говорит о полном комплекте рецепторов железа, который, вероятно, предоставляет более широкий диапазон хозяев и выживаемости во внешней среде (J. Parkhill et al., 2003).

С помощью рестрикционного фермента PvuII проведено риботипирование 113 изолятов *B.bronchiseptica*, выделенных от 11 видов животных в разных странах. Идентифицировано 16 риботипов, каждый из которых содержал по 5-7 рестрикционных фрагментов размером от 1,8 до 5,6 тыс. пар оснований. Около 88% выделенных от свиней изолятов отнесено к риботипу 3, свыше 74% выделенных от собак изолятов – к риботипу 4, а штаммы, изолированные от остальных видов животных отнесены к 15 разным риботипам. Связи риботипа с географическим фактором не выявлено (J. Parkhill et al., 2003).

ФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *BORDETELLA*

С 80-х годов прошлого века учеными предпринимаются попытки выделения фагов бактерий рода *Bordetella*. В настоящее время несколькими группами отечественных и зарубежных исследователей выделены, изучены и охарактеризованы бактериофаги *B.bronchiseptica*, *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.avium* (И.А. Лапаева и др., 1982; Г.И. Каратаев, 2004; С.В. Shelton et al., 2000; M. Liu et.al., 2004; Z. Tom et.al., 2010, 2013).

Учеными НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи были описаны бактериофаги бактерий *B.bronchiseptica* – 214, *B.pertussis* – фТ, фК, 134, 41405 и *B.parapertussis* 662-2. Исследователями проведены сравнительный анализ структуры геномов бактериофагов, выявлены особенности лизогении и конверсии бактерий рода *Bordetella* (И.А. Лапаева и др., 1982; Г.И. Каратаев, 2004).

В 2000 году американскими исследователями были выделены и изучены два бактериофага *B.avium* B1 и B2 (С.В. Shelton et al., 2000). Бактериофаги размножались только на клетках *B.avium* и не лизировали бактерии *B.bronchiseptica*, *B. pertussis*, *B.parapertussis*. Авторы показали, что в процессе лизогенизации происходила интеграция фагового генома в специфические участки бактериального генома. Установлена способность бактериофага B1 к генерализованной трансдукции.

В 2004 году исследователем Mingsun Liu были выделены бактериофаги *B.bronchiseptica* путем многократного облучения бактерий ультрафиолетовыми лучами. На основе структурных характеристик, автор отнес фаг *B.bronchiseptica* к семейству *Podoviridae*. Это семейство короткохвостовых фагов с изометрической головкой. Автор описал бактериофаги BPP-1, BMP-1 и VIP-1 *B.bronchiseptica* (M. Liu et.al., 2004). Бактериофаги проявляли различный тропизм к бордетеллам в разных фазовых состояниях инфекционного цикла возбудителя (И.А. Лапаева и др., 1980; Н.А. Переверзев, 1981; Л.Н. Синяшина и др. 1982). Все фаги размножались на клетках *B.parapertussis* и обладали сход-

ными биологическими свойствами и морфологией. Полученные исследователями результаты, свидетельствуют о наличии у некоторых бактериофагов бордетелл конвертирующих способностей (И.А. Лапаева и др., 1982).

В 2013 году группа американских исследователей предположила, что для разных фаз *B.bronchiseptica* (вирулентной BVG + и авирулентной BVG -) можно получить различные виды фагов (T.Z. Yuanl et al., 2013). Они разработали следующую методику выделения фагов *B.bronchiseptica*. Для получения жизнеспособного профага из бактерий *B.bronchiseptica* в вирулентной фазе 3 мл культуры выращивали 16ч при температуре 37°C и центрифугировали при 225 оборотах в минуту. Собранный супернатант фильтровали через поры 0,2 мкм. Процедуру проводили с использованием отфильтрованных фагов от предыдущего цикла.

Повторный пассаж способствовал увеличению титра фага. Для третьего пассажа отфильтрованные фаги были разделены на две порции для заражения вирулентных (BVG+ фаза) и авирулентных (фаза BVG-) бордетелл. Дальнейшее культивирование приводило к повышению титра фага и получению фагов с отличающимся набором белков. Авторы установили, что многообразие белков фага позволяет ему приспосабливаться к различным фазам существования динамически изменяющихся *B.bronchiseptica* (рисунок 62).

Развитие компьютерных технологий позволило разработать 3D-модель фагов, изучить механизм взаимодействия фагов с клеткой-хозяином, сформулировать общие принципы организации фагового генома и провести поиск геномов профагов в секвенированных хромосомах бактерий.

Американские ученые изучили строение бактериофага BPP-1 *B.bronchiseptica* и смоделировали его компьютерную трёхмерную структуру (T.Z. Yuanl et al., 2010). Они установили, что каждая частица фага BPP-1 имеет икосаэдрическую головку и необычный волокнистый хвост, состоящий из короткого центрального отростка, шести периферических коротких шипов и шести удлиненных нитей.

Полная трехмерная структура фага BPP-1 была сконструирована авторами на основании анализа многочисленных электронных 2D-снимков отдельных частиц. Методы криоэлектронной микроскопии позволили изучить структуру головки фага, а криоэлектронной томографии – его уникального хвоста с функциями адаптивного тропизма (рисунок 63).

На рисунке показано компьютерное 3D-моделирование фага путем анализа каждой отдельной частицы на электронных снимках, находящихся в угловом диапазоне от -70° до 70° (рис. 63а). Продольные разрезы отдельных частиц фага позволили авторам изучить головку, центральный отросток хвоста, шипы (жёлтая стрелка на рис. 63 б) и нитчатый хвост (красная стрелка на рис. 63 в). Компьютерные модели строения фага и его отдельных частей показаны на рис. 63 с, d, e.

Бактериофаг *V.bronchiseptica* BPP-1 относится к короткохвостовым фагам и механизм доставки его ДНК уникален.

Гибкость нитей хвоста необходима для эффективного сканирования наружной мембраны бактерий, однако, нити всегда находятся параллельно центральному отростку, то есть немного ограничены в движениях. После прикрепления нитей хвоста к бактерии они фиксируются, располагая перпендикулярно центральный отросток хвоста к поверхности клетки-хозяина. Это облегчает взаимодействие с клеточной мембраной, вызывая высвобождение ДНК (рисунок 64).

Для инъекции ДНК в бактериальную клетку кончик хвоста центрального отростка должен достичь сначала внешнюю, а затем внутреннюю мембрану. Когда частицы фага находятся во внешней среде средний угол между вертикальной осью хвоста и нитями хвоста составляет 66° . Нити хвоста закрывают центральный отросток и, возможно, блокируют контакт с бактериями. Для появления центрального отростка необходим угол не менее 78° . На рисунке 2В видно, что при атаке фаги располагаются по всей длине бактерий, как на ровных боковых поверхностях, так и на округлых полюсах.

В томографической реконструкции частиц видно, что у свободных фагов средняя разница высоты между хвостом и шестью окружающими шипами составляет 60Å (рис. 63 е). Тогда как средняя толщина клеточной мембраны *B.bronchiseptica* составляет $\approx 100\text{\AA}$.

Авторы предполагают, что после прикрепления хвоста к бактериальной клетке шипы сгибаются еще на 30 градусов внутрь к хвосту (рис. 64 а). Эти изменения передаются в капсид и служат началом выпуска ДНК в цитоплазму, так как хвост уже может проникнуть через внутреннюю мембрану.

Предположение авторов подтверждает анализ плотности шипов хвоста. Он показал, что шипы – цилиндрические структуры, взаимодействующие с белками оболочки головы, а не с центральным хвостом (рис. 63 d).

Таким образом, механизм фаговой структурной адаптации к динамически изменяющимся клеткам-хозяина состоит в строгом сохранении ДНК материала капсида и относительной мобильности и изменчивости хвостового аппарата, что обеспечивает выживание потомства фага.

При изучении генома фагов брдетелл исследователями были получены следующие данные: фаги ВРР-1, ВМР-1 и ВІР-1 имеют одинаковую по строению икосаэдрическую головку и хвостовой отросток с базальной пластинкой и нитями. Размер генома составил 42,6 т.п.н. Однако изученные фаги обладали разным тропизмом к клеткам *B.bronchiseptica*, находящимся в разных фазовых состояниях (M. Liu, 2002, 2004).

С. Shelton et al. (2000) исследовала два близких по структуре бактериофага *B.avium* В1 и В2, имеющих икосаэдрическую головку и сокращающийся хвостовой отросток размером 14 нм. Бактериофаги содержали геном размером 46,5 т.п.н.

Отечественными учеными охарактеризована структура и проведен сравнительный анализ структуры геномов бактериофагов *B.bronchiseptica* – 214, *B.pertussis* – фТ, фК, 134, 41405 и *B.parapertussis* 662-2. Авторы установили, что все изученные фаги морфологически идентичны друг другу. Диаметр икосаэдрической головки составляет 49,5 нм. Бактериофаги имеют хво-

стовой отросток длиной 145 нм, толщиной 8,7 нм с внутренним каналом 2,0 нм. Хвостовой отросток представлен, соединенными друг с другом 37-40 сегментами, на которые он легко фрагментируется. Сегменты имеют розеткообразную структуру диаметром 11,0 нм. Розетки образованы 6-7 субъединицами и соединены с соседними розетками на расстоянии порядка 15 нм друг от друга (Г.И. Каратаев, 2008).

Результаты электронно-микроскопического анализа ДНК бактериофагов *B. bronchiseptica* 214, *B. pertussis* 134, 41405, фТ показали, что их популяции гетерогенны и содержат гомологичные ДНК размером 37 т.п.н., отличающиеся друг от друга одной или двумя инсерциями (включениями) размером около 1 т.п.н. Геном бактериофага фК размером 41 т.п.н. циркулярно пермутирован, что указывает на его способность к генерализованной трансдукции. Следовательно, ДНК бактериофагов фТ, 134, 41405 и 214 имеют высокую степень гомологии, а бактериофаг фК идентичен по морфологии с фагами фТ, 134 и 214, но имеет отличный от них геном.

Методом гибридизации ДНК бактериофагов автор не обнаружил фаговых геномов в структуре хромосом бордетелл, что, по его мнению, указывает на преимущественно внехромосомную локализацию геномов (Г.И. Каратаев, 2008).

М. Liu et.al. (2004) при сопоставлении последовательностей *B. bronchiseptica* RB50 также не выявили профага BPP1 в хромосоме (М. Liu et.al., 2004).

Исследования И.А. Лапаевой и др. (1982) указывают на то, что только часть фагового генома интегрирует в хромосому бактерии в процессе лизогенизации. Так, при титровании бактериофага 134 *B. pertussis* на индикаторном штамме *B. parapertussis* 17903 в зоне лизиса были обнаружены микробные колонии, содержащие бактерии резистентные к фагу и обладающие свойствами, отличными от свойств бактерий *B. parapertussis*.

Бактерии приобретали признаки *B. pertussis*, такие как, специфические агглютиногены, летальную токсичность, способность размножаться в мозговой ткани мышей, вызывать атрофию се-

лезеночной ткани, ишемию при внутрикожном введении кроликам, выраженную уреазную активность. Авторы называли эти бактерии конвертантами. Выявление бактерий конвертантов с измененными свойствами, их иммунитет к суперинфекции гомологичным фагом, спонтанная продукция фагов свидетельствовали о способности бактериофагов *B.pertussis* к лизогенизации бактерий *B.parapertussis* и передаче им некоторых свойств бактерии – хозяина (И.А. Лапаева и др., 1982).

Результаты, полученные Г.И. Каратаевым (2008) показывают, что бактерии двух представителей рода *Bordetella* – *B.bronchiseptica* и *B.pertussis* полилизогенны и содержат два профага. Геномы одного из профагов обнаружены в хромосомах клеток-хозяев. Геномы второго профага присутствуют только в части популяции лизогенных бактерий в автономном состоянии и утрачиваются в процессе культивирования *in vitro* большей частью бактериальной популяции. Ко второй группе относятся и бактериофаги BPP-1, BMP-1 и BIP-1 *B.bronchiseptica*, имеющие различный тропизм к бактериям, находящимся в разных фазовых состояниях (Г.И. Каратаев, 2008).

Бактериофаги нередко участвуют в формировании вирулентных бактерий. Изменение патогенности может достигаться в результате прямого переноса генов, кодирующих факторы вирулентности или является следствием более сложных событий, например, изменяющих поверхность бордетелл. Приобретение бактерией резистентности к бактериофагу, часто приводит не только к изменению во взаимодействии бактерии с фагом, но и бактерии с макроорганизмом. Поэтому интерес к бактериофагам микроорганизмов рода *Bordetella*, особенно в связи со сложностью регуляции вирулентности *Bordetella*, постоянно поддерживается.

В связи с тем, что изучение бактериофагов может оказаться полезным для понимания механизмов изменчивости и эволюционной адаптации бактерий, а также для разработки методов индикации и идентификации бордетелл задачами нашего научного исследования явились разработка собственной схемы выделения фагов, изучение их биологических свойств с отбором активных

фагов для дальнейшего конструирования диагностического био-препарата (Д.А. Васильев и др., 2011; Е.Н. Семанина др. 2011; Ю.Б. Васильева и др. 2013).

Исследование штаммов *B.bronchiseptica* на выявление профага без воздействия на них индуцирующего фактора, выделение фагов из объектов внешней среды и от животных не дало положительных результатов.

Мы апробировали способ выделения профагов *B.bronchiseptica* из бактерий при помощи индуцирующего фактора – ультрафиолетового излучения.

Опыты по облучению бактерий УФЛ проводили с изменением параметров экспозиции в минутах и расстояния до объекта в см (рис. 65).

В результате исследований по выделению профага из бактериальных клеток наиболее эффективной показала себя следующая схема:

1 день: посев газоном суточной культуры *B.bronchiseptica* на мясопептонный агар, подсушивание в термостате 10-15 мин, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 5-7 мин. Далее проводили инкубирование чашек Петри с обработанными бактериями в термостате при 37°С в течение суток.

2 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°С) на сутки (рис. 66).

3 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 0,5 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37°С) на сутки.

4 день: смыв выросших колоний мясопептонным бульоном с чашек Петри, помещение в пробирку со штаммами бордетелл. Культивирование в термостате в течение суток.

5 день: обработка хлороформом 1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата в течение 15 минут, центрифугирование при

3000 об/мин – 15 мин. Снятие надосадочной жидкости в стерильную пробирку.

Полученную суспензию мы исследовали методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры (С.Н. Золотухин, 2008). Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,3 мл 18-ти часовой культуры. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. Для подсушивания ставили в термостат на 20 минут. На дне чашек Петри карандашом отмечали одинаковые сектора (по 2 сектора на каждой чашке Петри). На поверхность подсушенной среды наносили капли исследуемых бактериофагов и наклоняли чашки Петри, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ.

6 день: учет результатов. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса (рис. 67)

После выделения бактериофаги пассировали для повышения их литической активности.

В процессе работы из 60 клинических излятов *B.bronchiseptica* нами было выделено 8 фагов (68-69).

По морфологии негативные колонии выделенных фагов разделили на два типа. К первому типу отнесли колонии круглые, прозрачные, диаметром более 3 мм, с зоной неполного лизиса по периферии 0,5 – 4 мм или без неё. Ко второму типу причислили круглые, прозрачные или полупрозрачные колонии, с ровными краями, диаметром до 2 мм (таблица 11, рис. 64, 65).

Таблица 11. Морфология негативных колоний выделенных фагов *B.bronchiseptica*.

№ п/п	Бактериофаг	Морфология негативных колоний		
		Размер, Ø мм	Форма	Зона неполного лизиса
1	B.br. – 100 УГСХА	1,5±0,2	округлые прозрачные	Нет
2	B.br. – 107 УГСХА	3,0±0,4	округлые прозрачные	полупрозрачная, шириной 0,7±0,2 мм
3	B.br. – 110 УГСХА	1,6±0,2	округлые прозрачные в центре	Нет
4	B.br. – 111 УГСХА	2,0±0,4	округлые прозрачные в центре	Нет
5	B.br. – 113 УГСХА	1,5±0,2	округлые прозрачные	Нет
6	B.br. – 122 УГСХА	3,2±0,3	округлые прозрачные	полупрозрачная, шириной 3,5±0,5 мм
7	B.br. – 124 УГСХА	3,6±0,1	округлые, мутные	полупрозрачная, шириной 1,5±0,5 мм
8	B.br. – 183 УГСХА	1,9±0,1	округлые прозрачные	нет

Таблица 12. Литическая активность полученных нами фагов *B.bronchiseptica*.

№ п/п	Фар	Индикаторная культура	Активность по Аппельману, степень разведения	Активность по Грациа, количество корпускул в 1 мл
1	B.br. –100 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-7}	$3,1 \times 10^8 \pm 1,2 \times 10^8$
2	B.br. – 107 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-8}	$4,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^9$
3	B.br. – 110 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-7}	$1,8 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$
4	B.br. –111 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-6}	$5,3 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^7$
5	B.br. – 113 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-7}	$3,1 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$
6	B.br. – 122 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-7}	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
7	B.br. – 124 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-8}	$1,4 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^9$
8	B.br. – 183 УГСХА	B.bronchiseptica № 120	10^{-6}	$5,9 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$

Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от 10^{-6} до 10^{-9} по методу Аппельмана и от $5,3 \times 10^7$ до $4,3 \times 10^9$ по методу Грациа (таблица 12).

Таблица 13. Спектр литического действия выделенных фагов *B.bronchiseptica*.

№	Штаммы бактерий <i>B.bronchiseptica</i> (n=52)	Бактериофаги							
		<i>B.br.–100 УГСХА</i>	<i>B.br.–107 УГСХА</i>	<i>B.br.–110 УГСХА</i>	<i>B.br.–111 УГСХА</i>	<i>B.br.–113 УГСХА</i>	<i>B.br.–122 УГСХА</i>	<i>B.br.–124 УГСХА</i>	<i>B.br.–183 УГСХА</i>
1	B.bronchiseptica BBR 105	-	+	+	-	+	-	+	+
2	B.bronchiseptica BBR 106	+	-	+	+	-	+	+	+
3	B.bronchiseptica BBR 108	-	-	-	-	-	-	-	-
4	B.bronchiseptica BBR 114	-	+	-	+	-	-	-	-
5	B.bronchiseptica BBR 115	+	+	-	+	-	-	-	-
6	B.bronchiseptica BBR 115a	-	+	-	+	-	-	-	-
7	B.bronchiseptica BBR 118	+	+	-	-	-	-	-	-
8	B.bronchiseptica BBR 122	-	+	-	-	-	-	-	-
9	B.bronchiseptica BBR 123	+	+	+	-	-	-	+	-
10	B.bronchiseptica BBR 124	+	+	+	-	+	+	+	+
11	B.bronchiseptica BBR 125	+	+	-	+	+	+	+	+
12	B.bronchiseptica BBR 126b	+	-	+	-	+	+	+	+
13	B.bronchiseptica BBR 126	+	-	+	-	+	+	+	+
14	B.bronchiseptica BBR 132	-	+	-	-	-	+	+	+
15	B.bronchiseptica BBR 134	+	+	+	-	-	-	+	+
16	B.bronchiseptica BBR 135	-	+	-	+	+	-	-	+
17	B.bronchiseptica BBR 136	-	+	+	+	-	-	-	+
18	B.bronchiseptica BBR 148	-	+	+	+	-	-	-	+
19	B.bronchiseptica BBR 149	-	+	+	+	-	-	-	+
20	B.bronchiseptica BBR 154	+	+	-	+	-	-	-	+

21	B.bronchiseptica BBR 155	+	+	-	+	-	-	-	+
22	B.bronchiseptica BBR 156	+	+	-	+	-	-	+	+
23	B.bronchiseptica BBR 170	+	+	-	-	-	-	-	-
24	B.bronchiseptica BBR 164	+	+	-	+	+	-	-	-
25	B.bronchiseptica BBR 168	+	+	+	+	+	+	-	-
26	B.bronchiseptica BBR 169	-	+	+	1	2	3	4	5
27	B.bronchiseptica BBR 170a	-	+	+	+	-	+	-	-
28	B.bronchiseptica BBR 175	-	+	-	-	-	-	-	-
29	B.bronchiseptica BBR 176	-	+	-	-	-	-	-	-
30	B.bronchiseptica BBR 177	-	-	-	-	-	-	-	-
31	B.bronchiseptica BBR 178	+	+	-	+	-	-	-	-
32	B.bronchiseptica BBR 179	-	+	-	-	-	-	-	-
33	B.bronchiseptica BBR 180	-	+	+	+	-	+	-	-
34	B.bronchiseptica BBR 184	-	-	-	-	-	-	-	-
35	B.bronchiseptica BBR 182	-	+	-	+	-	+	-	-
36	B.bronchiseptica BBR 183	-	-	-	-	-	-	-	-
37	B.bronchiseptica BBR 185	+	+	-	+	-	-	+	-
38	B.bronchiseptica BBR 188	+	+	-	-	-	-	+	-
39	B.bronchiseptica BBR 188a	+	+	-	-	-	-	+	+
40	B.bronchiseptica BBR 188b	+	+	+	+	+	+	-	-
41	B.bronchiseptica BBR 189	-	+	+	+	-	-	-	+
42	B.bronchiseptica BBR 192	-	+	+	+	-	-	-	+
43	B.bronchiseptica BBR 194	+	+	-	-	-	-	+	-
44	B.bronchiseptica BBR 215	-	+	+	+	-	-	-	+
45	B.bronchiseptica BBR 221	-	+	+	+	-	-	-	+
46	B.bronchiseptica BBR 225	+	+	-	-	+	-	-	-
47	B.bronchiseptica BBR 226	-	+	-	+	+	-	-	-
48	B.bronchiseptica BBR 228	+	-	+	-	-	+	-	-
49	B.bronchiseptica BBR 229	-	+	+	+	-	+	-	-
50	B.bronchiseptica BBR 230	-	+	+	+	-	-	-	-
51	B.bronchiseptica BBR 235	-	+	+	+	-	-	-	-
52	B.bronchiseptica BBR 236	+	-	-	-	-	-	-	-
53	B.bronchiseptica BBR 238	+	-	-	-	-	-	-	-
54	B.bronchiseptica BBR 240	+	+	+	+	+	+	-	-
55	B.bronchiseptica BBR 241	-	+	-	-	-	-	-	-
56	B.bronchiseptica BBR 245	+	+	-	-	-	-	+	-
57	B.bronchiseptica BBR 245c	-	-	+	-	-	-	-	-
58	B.bronchiseptica BBR 245b	+	+	-	+	-	-	-	-
59	B.bronchiseptica BBR 254	-	+	-	+	-	-	-	+
60	B.bronchiseptica BBR 258	-	+	+	+	-	-	-	+
Количество положительных результатов		28	49	26	33	12	15	16	22
Процент лизируемых культур		46,7	81,7	43,3	55,0	20,0	25,0	26,7	36,7

Спектр литического действия выделенных фагов, использованный на 60 клинических штаммах бактерий *B.bronchiseptica* составил от 20,0% до 81,7% (таблица 13). Бактериофаг V.br.-107 УГСХА проявил самый большой спектр литического действия, который составил 82,7%. В результате подсчетов наибольшим совместным спектром литического действия обладали бактериофаги V.br.-107 УГСХА и V.br.-110 УГСХА – 90,0 %.

Определили специфичность фагов по отношению к референс-штаммам *B.bronchiseptica*, а также возможным ассоциантам (таблица 14).

Таблица 14. Специфичность бордетеллезных фагов, выделенных нами.

B.bronchiseptica	Количество штаммов	Бактериофаги							
		V.br.-100 УГСХА	V.br.-107 УГСХА	V.br.-110 УГСХА	V.br.-111 УГСХА	V.br.-113 УГСХА	V.br.-122 УГСХА	V.br.-124 УГСХА	V.br.-183 УГСХА
Bordetella bronchiseptica	5	+	+	+	+	+	+	+	+
Bordetella parapertussis	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Bordetella pertussis	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia pseudotuberculosis	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Morganella morganii	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella typhimurium	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumonia	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Providencia rettgeri	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Aeromonas hydrophila	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas putida 12633, 901	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacter cloacae	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus cereus	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса; «+» - лизис более 75% исследованных штаммов; «+» - лизис 50%-75% исследуемых штаммов.

Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к штаммам бактерий *B.bronchiseptica*, не лизировали бактерии других видов и родов.

Для работы с бактериофагами при их получении, изучении биологических свойств и применении с диагностической целью важным моментом исследования является подбор метода инактивации оставшихся жизнеспособными культур бактерий в фаголизате. Применяемый для этих целей метод не должен понижать литическую активность фагов.

В качестве физического фактора инактивации бактерий мы изучали действие высокой температуры на бактериофаги, а в качестве химического – действие хлороформа.

Результаты физического и химического воздействия на бордетеллезные фаги представлены в таблицах 15 и 16.

Таблица 15. Температурная устойчивость бактериальных клеток *B. bronchiseptica*.

№ п/п	штамм бактерий	Воздействие температуры, °С							
		46	48	50	52	54	56	58	60
		Количество колониеобразующих единиц <i>B. bronchiseptica</i> в 1 мл							
1	№ 113	$2,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$4,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^3$	$1,6 \times 10^1$	–	–	–
2	№ 123	$3,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^2$	–	–	–	–
3	№ 180	$1,9 \times 10^9$	$0,6 \times 10^9$	$2,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^1$	–	–	–

Таблица 16. Температурная устойчивость фагов.

Температурный режим, °С	Активность фагов, количество активных корпускул в 1 мл	
	В.br.–107 УГСХА	В.br.–110 УГСХА
50	$4,6 \times 10^9$	$6,9 \times 10^9$
55	$3,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$
60	$2,8 \times 10^8$	$3,9 \times 10^9$
65	$4,2 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$
70	$3,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
75	$3,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$
80	$1,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
85	$1,7 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$
90	$1,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
95	–	–
Контроль активности фага	$3,1 \times 10^8$	$4,3 \times 10^9$

Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости бактериофагов В. br. – 110 УГСХА и В. br. – 107 УГСХА к температуре 60°С в течение 30 минут, и гибели бактериальных клеток *B. bronchiseptica* при данном режиме.

Обычно бактериофаги более устойчивы к воздействию хлороформом, чем клетки микроорганизмов, поэтому хлороформ используют для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий (Ревенко, 1978). Кроме того, степень устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформа имеет таксономическое значение. Результаты изучения устойчивости бактерий *V.bronchiseptica* и фагов V.br. – 107 УГСХА и V.br. – 110 УГСХА к воздействию хлороформа представлены в таблицах 17, 18.

Таблица 17. Устойчивость бактерий *V.bronchiseptica* к хлороформу.

№ п/п	Штаммы Бактерий	Контроль	Воздействие хлороформа, минуты		
			5	10	15
		Количество колониеобразующих единиц <i>V.bronchiseptica</i> в 1 мл			
1	№ 113	$2,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^4$	$0,4 \times 10^1$	–
2	№ 123	$3,1 \times 10^9$	$2,1 \times 10^4$	$0,3 \times 10^1$	–
3	№ 180	$1,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^3$	–	–

Таблица 18. Устойчивость бактериофагов к воздействию хлороформа.

Фаг	Активность бактериофагов после обработки хлороформом, количество активных корпускул в 1 мл						Контроль активности
	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин	
V.br.–107 УГСХА	$3,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$
V.br.–110 УГСХА	$2,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$5,3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^9$

Установили, что бактерии инактивируются при действии хлороформа при 10 минутной обработке. Бактериофаги V.br.–107 УГСХА и V.br.–110 проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут.

Наблюдалось снижение активности фага свыше 30 минут обработки хлороформом. Однако активность бактериофагов V.br. – 107 УГСХА и V.br. – 110 восстанавливалась до первоначального уровня после одного пассажа.

На основании проведенных исследований изучения биологических свойств бактериофагов, нами были отобраны фаги V.br. – 107 УГСХА и V.br. – 110 УГСХА. По данным изучения биологических свойств селекционированных бордетеллёзных бактериофагов установлено, что изоляты фагов образуют однородные негативные колонии, диаметром 1,0 до 4,0 мм, литическая активность фага V.br. – 107 УГСХА составила – 10^{-7} по Аппельману, 3,1

х 10^8 по Грациа; В.br. – 110 УГСХА – 10^{-8} по Аппельману, $4,3 \times 10^9$ по Грациа.

Фаги В.br. – 107 УГСХА и В.br. – 110 УГСХА являются специфичными для *B.bronchiseptica* и не лизируют бактерии гетерологичных родов, видов. Выделенные бактериофаги устойчивы к действию высокой температуры и устойчивы к обработке хлороформом.

Мы изучили безопасность совместного действия отобранных фагов и установили отсутствие антагонистического эффекта при их взаимодействии.

ГЛАВА III

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ B.BRONCHISEPTICA

В настоящее время лабораторная диагностика бордетеллеза по-прежнему включает бактериологическое выделение чистой культуры. При этом исследование проводится в течение 5-7 суток, а его диагностическая эффективность в клинической практике редко превышает 10-38%. Это связано с медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным обследованием животных с затяжным кашлем, контаминацией исследуемого материала другими микроорганизмами, применением антибактериальных препаратов до начала исследования, нарушением правил забора и транспортировки материала, а также несовершенной рецептурой питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных компонентов. (Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, 2003; Л.М. Панасенко, Е.И. Краснова, 2004; Г.И. Каратаев, 2008; О.Ю. Борисова, 2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2009; Д.А. Васильев и др., 2010; Ю.Б. Васильева, 2013).

Бессимптомное течение бордетеллёзной инфекции с длительным носительством возбудителя в организме животных затрудняет эпизоотологический мониторинг (Д.А. Васильев и др., 2010). Серологические методы лабораторной диагностики бордетеллеза, базирующиеся на определении уровня специфических антител к антигенам (РА, РИГА, реакции латекс-микроагглютинации, РН) широкого применения в практической ветеринарии не нашли, вследствие низкой чувствительности, специфичности, ретроспективности и отсутствия стандартизированной методики.

Иммуно-ферментный анализ (ИФА) является чувствительным, специфичным, относительно недорогим тестом и требует

небольшого объема сыворотки. Для проведения ИФА используются целые бактериальные клетки, комплексы антигенов или частично очищенные антигены бордетелл. Однако ряд бордетеллезных антигенов являются перекрестно реагирующими с антигенами других грамотрицательных бактерий, а при высокой чувствительности метода вероятность перекрестных реакций значительно возрастает. Адсорбция антигенов зависит и от материала, из которого изготовлены планшеты. Таким образом, эффективность ИФА зависит от чистоты используемых антигенов, и для массовой диагностики бордетеллёза метод не достаточно специфичен и чувствителен, возможны ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Постановка ИФА ограничено особыми условиями воспроизведения, когда цельные бактериальные клетки должны иметь особую чистоту антигенных компонентов, их специфичность и афинность (Г.А. Кириллова и др., 1994; Л.М. Панасенко, Е.И. Краснова, 2004).

В последние годы в диагностику инфекционных болезней активно внедрились методы молекулярной биологии, из которых наиболее широкое применение нашел метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Молекулярно-генетические методы исследования генома позволяют осуществлять раннюю и более полную диагностику инфекционных заболеваний, своевременно проводить их дифференциацию и осуществлять контроль эффективности терапии, методом ПЦР достигается предельно возможная чувствительность – до одного возбудителя в пробе, что позволяет получить положительный результат в течение 6 недель от момента заражения, даже на фоне антибактериальной терапии. Специфичность метода равна 100%, в связи с чем контаминация исследуемого материала ассоциативной флорой не оказывает влияния на результат. Экспрессность метода – ещё одно преимущество ПЦР, диагноз подтверждается в течение одного дня. ПЦР равноценная альтернатива бактериологическому исследованию, однако её широкое внедрение в ветеринарную практику нашей страны сдерживается относительно высокой стоимостью (Г.Я. Ценева. Н.Н. Курова, 2003; Л.М. Панасенко, Е.И. Краснова,

2004; Г.И. Каратаев, 2008; О.Ю. Борисова. 2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2009; Д.А. Васильев и др., 2010; Ю.Б. Васильева, 2013).

Специфичность ПЦР при выявлении ДНК бордетелл, находящихся в носовой полости, проверенная параллельно с бактериологическим анализом, составила 98% (Г.И. Каратаев и др., 2000).

Метод ДНК-зондирования основан на поиске в составе хромосомы бордетелл последовательности, гомологичной ДНК-зонду. При этом наблюдается взаимодействие такой последовательности с меченным ДНК-зондом и визуализация продуктов взаимодействия с помощью цветной реакции (Г.Я. Ценева. Н.Н. Курова, 2003; А.В. Мاستиленко, 2011).

Применение биосенсоров - бактериофагов может оказаться полезным для разработки метода индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica*. Разработка реакции нарастания титра фага на основе бактериофагов *B.bronchiseptica*, является актуальной задачей, так как метод позволяет существенно сокращать сроки лабораторных анализов по сравнению с бактериологическим исследованием и проводить индикацию бактерий с высокой точностью. Реакция нарастания титра фага по технике выполнения является простым и удобным, чувствительным и специфическим методом диагностики. Метод позволяет за относительно короткий срок обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры, что имеет важное значение при исследовании носоглоточных выделений животных (Д.А. Васильев и др., 2010; Е.Н. Семанина, 2012; Ю.Б. Васильева и др., 2013).

В связи с этим одной из задач научного исследования явилось усовершенствование бактериологического метода детекции возбудителя путем детального изучения биологических свойств штаммов *B.bronchiseptica*, оценки различных питательных сред, разработки собственных дифференциально-диагностических агаров и схемы ранней детекции возбудителя от животных.

В нижеприведенном разделе освещен анализ применяемых в настоящее время методов лабораторной диагностики бордетеллёза, а также результаты собственных исследований по разработ-

ке и усовершенствованию приемов индикации и идентификации *B.bronchiseptica*, основанных на бактериологических, иммунологических, молекулярно-генетических и фагоидетекционных методах.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Совершенствование традиционного бактериологического исследования возможно путем сокращения времени и трудозатрат получения результата, повышения достоверности за счет большей объективности идентификационных признаков, стандартизации условий и этапов выполнения методик. Для этого необходима разработка питательных сред, обеспечивающих ростовые качества бактериям *B.bronchiseptica* и имеющих в составе маркеры специфичной ферментативной активности возбудителя для исключения длительных этапов биохимического тестирования, а также доступные и эффективные селективные компоненты, ингибирующие рост сопутствующей носоглоточной микрофлоры.

В истории разработки дифференциально-диагностических сред для идентификации бордетелл одним из ключевых моментов было создание среды Борде-Жангу (BG), основу которой составляли кровяной агар, обогащенный казеиновым пептоном с добавлением картофеля и глицерина. В дальнейшем состав среды Борде-Жангу неоднократно модифицировали, добавляя различные селективные компоненты (метициллин, цефалексин, пенициллин, стрептомицин, нистатин и другие), а также исключая или изменяя процентное количество дефибринированной крови (от 15-20% до 30-50%) и вид доноров крови (человек, кролик, овца, лошадь). Данный субстрат обеспечивает питание бордетеллам и позволяет осуществлять детекцию гемолитических реакций с целью идентификации возбудителя (Kendrick, G. Eldering, 1934).

Mishulow et al. (1953) была разработана селективная среда для *B.pertussis*, которая также была рекомендована для идентификации *B.bronchiseptica*. В основу этой среды вошли угольный агар, экстракт дрожжей и крахмал. Отличительной особенностью этой среды от среды Борде-Жангу было отсутствие в составе крови и её компонентов. Sutcliff and Abbott (1972) разработали схожую с модификационной средой Jones and Kendrick среду, в состав которой входила лошадиная кровь (10%) и цефалексин в количестве 40 мкг/мл.

B. Elias, B. Galgoczi (1981) для изоляции *B.bronchiseptica* вводили в агар МакКонки пенициллин и нитрофурантин.

B. Elias (1987) рекомендует культивировать бордетеллы вначале на плотной, а затем в жидкой питательных средах.

J. Hommez et al. (1984), показали эффективность использования цефалексина в селективной среде для изоляции *B.bronchiseptica* из носовых мазков и посмертного материала, хотя лучшие результаты были получены при добавлении в среду пенициллина и фуралдона.

J. Норпе, R. Vogl (1986), для выделения бордетелл предлагают угольный агар с кровью лошади и цефалексином. Угольный или альгинатный агар с лошадиной кровью и цефалексином оказался более эффективной транспортной системой, чем агар Jones-Kendrick и среда Amies. Эти же авторы выявили низкую эффективность угольно-кровяного бульона с цефалексином для выделения бордетелл.

F. Chan et al. (1987), изучали ингибирующее для бордетелл влияние различных концентраций антибиотиков на кровяном угольном агаре, приготовленном из сухого угольного агара («Oxoid») с цефалексином и среде Борде-Жангу. На первой росли все изученные штаммы (очевидно из-за наличия в ней угольного компонента), а на среде Борде-Жангу-только 20,2%.

При изучении клеточных жирных кислот С. Moore et al. (1987), выращивали *B.avium* и *B.bronchiseptica* на сердечно-мозговом агаре добавлением 5% бараньей крови в атмосфере 5% CO₂ 16 ч при 37°C.

W. Morrill et al. (1987), выделяли бордетеллы из назофарингеальных мазков, хранящихся в транспортной среде Регана-Лоува (Regan-Lowe), используя агары Регана-Лоува, Борде-Жангу с циклодекстрином (CD). Количество жизнеспособных бордетелл, выделенных на агарах Борде-Жангу с CD, составило 90% и менее 70% от выделенных на агаре Регана-Лоува.

M.-J. Quentin-Millet et al. (1990), запатентовали питательную среду для бордетелл, содержащую циклодекстрин или соль декстрана в сочетании с этерифицированным производным D-глюкозы с молекулярной массой не менее 2 кД.

B. Vidic et al. (1993), культивировали *B.bronchiseptica* на следующих плотных средах: агары кровяной; МакКонки, содержащий 1% декстрозы; Эндо; триптон-соевый; пептонный; Борде-Жангу, древесно-угольный и FC. Наилучшие результаты получены при использовании кровяного и FC-агаров, содержащих пенициллин с цепофексом или нитрофурантином (68-69,4%). Другие среды и сочетания антимикробных препаратов также обладали удовлетворительной селективностью. Среди селективных сред агары МакКонки, содержащий 1% декстрозы и 50 мг/мл нистатина, пенициллин-нитрофурантоиновый агар Мак-Конки, пенициллиновый нитрофурантоиновый кровяной агар и Эндо были наиболее эффективными.

S. Lariviere et al. (1993) для изоляции и идентификации *B.bronchiseptica* использовали агар MacConkey без добавления нистатина, среду Smith-Baskerville (SB) с амфотерицином В и без него, кровяной агар с цефалексином. Для дальнейшей идентификации возбудителя проводили окраску по Грамму, определение подвижности, тесты на оксидазу и каталазу, утилизацию мочевины и ряда углеводов. Согласно исследованиям, использование кровяного агара с селективным компонентом цефалексином позволило выявить 46 (38%) штаммов возбудителя. Однако в работе авторами не описана максимальная допустимая концентрация цефалексина в отношении *B.bronchiseptica*.

Согласно исследованиям K. Connor et al. (1996) среда MBM с заменой амфотерицина В и бензилпенициллина и добавлением

спектиномицина и циклогексимида в конечной концентрации 100 мг/мл и 0,5 мг/мл, соответственно, существенно увеличивает высеваемость бордетелл, тогда как оригинальный состав среды МВМ не позволяет подавить рост грибов и других комменсалов ротоглотки (K. Connor et al., 1996).

S. Armstrong and M. Clements (1993) при выявлении мутантных штаммов *B.bronchiseptica* по генам, отвечающим за синтез и активацию сидерофоров использовали кровяной агар и среду Борде-Жангу с минимальным содержанием железа (36 мкМ), комплекса аминокислот, и селективными компонентами - налидиксовой кислотой (35 мкг/мл) и канамицином (30 мкг/мл).

Среди разработок селективных сред для возбудителей бордетеллёза были также синтетические среды. Так, например, в 1986 году была разработана плотная среда Stainer-Scholte с циклодекстрином и селективным компонентом – цефалексином. Циклодекстрин в этой среде введен в качестве стимулятора роста бактериальных клеток различных представителей рода *Bordetella*. Несмотря на лучшие качества этой среды, по сравнению, с агаром Борде-Жангу, она имеет высокую стоимость.

В настоящее время в качестве селективной среды в лабораториях используют угольный агар с 10% лошадиной крови и добавлением цефалексина в количестве 40 мкг/мл. Для отбора антибиотикочувствительных штаммов параллельно применяют кровяной угольный агар с цефалексином и без него (МУК, 2008).

При межвидовой дифференциации бактерий рода *Bordetella* spp. Gueirard P. et al. (1995) использовали агар Борде-Жангу с 15% дефибринированной бараньей крови с двукратным пересевом: через 48 часов, затем через 24 часа при 36°C. Данная модификация позволила авторам изолировать штаммы *B.bronchiseptica* от человека после контакта с больным животным (Gueirard P. et al., 1995).

А.Я. Миланко с соавт. (1996), использовали для первичной изоляции агар МакКонки и лактозно-сахарный агар.

Н.Т. Татаринцев и С.В. Кожевников (1993) посевы образцов на наличие *B.bronchiseptica* осуществляли на следующие обогащен-

ные среды: КУА, среда Гартоха, агар МакКонки и кровяной агар.

Анализ литературы показал, что коммерческие импортные среды для культивирования и выделения бордетелл, выпускаемые фирмами «Difco», «Gibco», «BBL», «Conda», «HiMedia» содержат бактопептоны, экстракты мяса, ферментативные гидролизаты казеина, желатина, витамины и 10-15% дефибринированной крови. Эти среды богаты по питательным свойствам, но сложны по составу и дорогостоящи (Ю.Б. Васильева, 2013).

В нашей стране единственной коммерческой средой для культивирования бордетелл является казеиново-угольный агар (КУА), выпускаемый НПО «Питательные среды» (Махачкала) и под названием бордетелагар (аналог КУА) ФБУН «ГНЦ ПМБ» (Оболensk). КУА (бордетелагар) содержит гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, агар, калий фосфорнокислый, медь сернокислую, магний хлористый, крахмал, цистеин, уголь активированный. Недостатками являются низкие ростовые качества сред (Д.Г. Сверкалова и др., 2008; Ю.Б. Васильева, 2013). Также в микробиологической диагностике используется ряд сред лабораторного изготовления: среда Борде-Жангу (картофельно-глицериновый агар), молочно-кровяной агар. В промышленном производстве эти среды не выпускаются, при лабораторном изготовлении требуют больших материальных и временных затрат, нестандартны (Д.А. Васильев и др., 2008).

Бактерии *B.bronchiseptica* в отличие *B.pertusis* растут на простых питательных средах. Размножению *B.pertusis* на мясопептонном бульоне и агаре мешают накопление в среде ненасыщенных жирных кислот, образующихся в процессе длительного роста (более 48 ч), а также возникающая при росте коллоидная сера и другие продукты метаболизма. Для их нейтрализации в среду добавляют крахмал, альбумин и древесный уголь или ионообменные смолы. Коклюшная палочка *B.pertusis* требует наличия в среде 3 аминокислот - пролина, цистеина и глутаминовой кислоты, источником которых служат гидролизаты казеина или фасоли. Исходя из вышесказанного, можно сделать заключение, что компоненты сред Борде-Жангу и КУА жизненно необходимы

для бактерий *B.pertusis* и, по всей вероятности, необязательны для бактерий *B.bronchiseptica*. Учитывая короткий срок хранения сред, непосредственное рецептурное приготовление в условиях лабораторий, недостаточную селективность в отношении носоглоточной флоры животных и потребность в многоэтапной последующей идентификации возбудителя по биохимическим свойствам, крайне необходимо усовершенствование селективно-диагностических сред.

В связи с этим, целью нашего исследования явилась оптимизация рецептуры питательных сред для выделения и идентификации бактерий *B.bronchiseptica*.

Необходимость совершенствования бактериологических методов диагностики бордетеллёза связана с потребностью в скорейшем выделении, типировании, дифференциации возбудителя. Важную роль в этом направлении играет разработка качественных селективных сред.

При разработке дифференциально-диагностической или селективной сред одним из самых важных является вопрос выбора комплекса микроорганизмов, являющихся первичными симбионтами или ассоциантами исследуемого возбудителя, т.е. от каких групп микроорганизмов его следует дифференцировать в первую очередь.

Для дифференциации бактерий рода *Bordetella* от других морфологически и фенотипически схожих родов предложены критерии, приведенные в таблице 19 (Vandamme, 1996; Weyant et al., 1996).

Основными ассоциантами для дифференциации *B.bronchiseptica* являются *H.influenzae*, *H.haemolyticus*, *H.parainfluenzae*, *H.parahaemolyticus*, *M.catarrhalis*, *N.meningitidis*, *N.flavescens*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. (H. Lautrop, 1960).

При детекции бактерий *B.bronchiseptica* мы учитывали литературные данные о возможных ассоциантах носоглотки животных, проводили дифференцию от близкородственных бордетелл *B.parapertussis* и *B.pertussis*, а также бактерий дыхательного и пищеварительного тракта *Yersinia pseudotuberculosis*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus*

mirabilis, Salmonella typhimurium, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis, Providencia rettgeri, Enterobacter cloacae, Bacillus cereus, Bacillus subtilis (Д.А. Васильев и др., 2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2010; А.В. Мастиленко и др., 2012; Ю.Б. Васильева и др., 2013).

Таблица 19. Дифференциация рода *Bordetella* от других морфологически и фенотипически схожих родов (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1996).

Характеристика	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Asaccharolytic</i>	<i>Brucella</i> sp.	<i>Hemophilus</i> sp.
Подвижность	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Рост на:												
Кровяной агар	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
МакКонки агар	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	V	V
Цитратный агар Симмонса	+	-	-	-	+	-	-	+	+	V	-	-
Оксидазная активность												
(реагент Ковача)	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+b	+
Продукция кислоты из D – глюкозы	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	+
Редукция нитрата	V	-	-	-	-	-	V	+	-	-	+	nd
Газ из нитрата	-	-	-	-	-	-	V	V	-	-	V	nd
Уреазная активность	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	+	V
Продукция пигмента	-	-	+	-	-	+	-	-	-	V	-	-
Основные клеточные жирные кислоты:												
C _{14:0}	+		+					+	+			+
C _{16:0}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C _{16:1 ω7c}	+	+						+	+	+		+
C _{17:0 cyclo}	+		+	+	+	+	+	+	+			
C _{18:0}		+	+	+	+	+	+					
C _{18:1 ω7c}											+	
C _{18:1 ω9c}										+		
C _{19:1 cyclo ω9c}											+	
C _{14:0 SOH}		+										

^a символы: «+» - >89% штаммов положительные; «V» - 11-89% штаммов положительные; «-» - менее 11% штаммов положительные; «nd» – не определено (Vandamme, 1996; Weyant et al., 1996).

^b Небольшое количество оксидаза-негативных штаммов *Brucella abortus* и *Brucella suis* были зарегистрированы (Weyant et al., 1996).

^c Продемонстрировано на агаре с сердечной инфузией с тирозином (Weyant et al., 1996).

^r Присутствует более 5% от общего числа клеточных жирных кислот; C16:1 ω7c, пальмитолеиновой; C16:0, пальмитиновой; C14:0 ЗОН, β-hydroxymyristic; C18:0, стеариновая, C17:0 цикл, C17:0 цикло ω7c; C14:0, миристиновая; C18:1 ω9c, олеиновая; C19:0 цикло ω7c, лактобацилловой; C18:1 ω7c, cis-vaccenic (Vandamme, 1996; Weyant et al., 1996).

Исходя из литературных данных, мы сделали следующие предположения. *B.bronchiseptica* можно дифференцировать от бактерий рода *Alcaligenes* по уреазной активности. От бактерий рода *Haemophilus* – по ферментации углеводов (*Haemophilus* ферментирующие микроорганизмы), подвижности (*Haemophilus* неподвижны), по отношению к кислороду (*Haemophilus* факультативные анаэробы). Представители *Haemophilus* spp. для своего роста требуют наличия в среде одного из следующих факторов роста: гемина (фактора X) и/или никотинамид-аденин-динуклеотида (фактора V), присутствия от 3 до 10% CO₂, температуры инкубации 30–35°C. Все эти факторы были исключены из состава будущей среды или условий ее инкубации.

M.catarrhalis не требователен к содержанию ауксотрофтных веществ и прекрасно культивируется на простых питательных средах, таких как МПБ, МПА; аналогично возбудителю бордетеллёза не ферментирует большинство углеводов, однако, согласно данным M.D. Tamang et al. (2005) проявляет высокую чувствительность к антибиотикам цефалоспоринового ряда, что обуславливает необходимость его введения в конструируемую среду.

Большинство патогенных представителей *Neisseria* spp. требовательны к обязательному содержанию в среде компонентов крови. Характерной особенностью *Neisseria* spp. является ферментация углеводов с образованием кислоты, и соответственно сдвигом pH среды с изменением цвета индикатора (межвидовая дифференциация основана на ферментации разными видами нейссерий различных комбинаций углеводов).

Corynebacterium spp. имеют в своей таксономической группе патогенные и непатогенные виды, первые – требовательны к содержанию в среде сыворотки или цельной крови, вторые – культивируются на средах, не имеющих в составе компонентов крови. Межвидовая дифференциация может основываться на ферментации углеводов (глюкоза, мальтозы, сахарозы), а также ферментации мочевины.

Среди *Pseudomonas* spp. встречаются виды, как активно ферментирующие углеводы с образованием кислоты, так и нефер-

ментирующие виды, однако при культивировании они проявляют высокую чувствительность к содержанию солей бария, что и положено в основу дифференциально-диагностической среды для возбудителя бордетеллеза.

От бруцелл, в частности *B.canis* 82, бордетеллы можно отличить по подвижности и отсутствию ферментации глюкозы. От энтеробактерий *B.bronchiseptica* отличают – наличие цитохромоксидазы, отсутствие способности ферментировать сахара и многоатомные спирты, отношение к кислороду (Н. Lautrop, 1960).

Разработка состава питательных сред включала подбор основы и составляющих компонентов, обеспечивающей максимальный ростостимулирующий эффект, даже при наличии единичных клеток в пробе; дифференцирующих биохимических маркеров – элективных компонентов, позволяющих сократить общее количество идентификационных тестов; селективных компонентов, угнетающих сопутствующую носоглоточную микрофлору и не влияющих на размножение и видовые свойства *B.bronchiseptica* (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008).

Мы подбирали компоненты питательной среды и условия культивирования бактерий *B.bronchiseptica* исходя из уникальных ферментативных и культуральных свойств бордетелл представленных в таблице 20.

Тест-штаммы показали хорошие результаты роста, как на средах, специализированных для выращивания бордетелл (казеиново-угольный агар, бордетелагар, Борде-Жангу), так и на простых агарах (МПА, ГРМ) по скорости появления, размеру колоний и количеству колониеобразующих единиц. Мы отметили следующие недостатки: питательные среды бордетелагар и КУА имеют черный цвет из-за угольных компонентов, что затрудняет дифференциацию колоний по окрашиванию, прозрачности и изменению цвета среды. Среда пригодна только для первичного выделения возбудителя с последующей многоэтапной дифференциацией по биологическим свойствам. Желательно, чтобы среды были прозрачными. Это облегчает наблюдение за ро-

Таблица 20. Биологические свойства бактерий *B.bronchiseptica*.

№	Тесты		Результат	
	Морфология и тинкториальные свойства			
1	Окраска по Грамму, по Ольту		грамотрицательные коккобациллы (0,3+0,2)*(1,0+0,5) мкм, располагающиеся одиночно и цепочками. Спор не образуют. Капсула не выявляется	
2	Морфотипы (электронная микроскопия)		1-й морфотип: овоидные палочки, без жгутиков с нежной капсулой (вирулентная фаза), 2-й морфотип: промежуточный; 3-й морфотип: перитрихально расположенные жгутики (авирулентная фаза).	
	Культуральные свойства			
3	Рост на жидких питательных средах (МПБ, ТСБ) через 24-48 ч		равномерное помутнение с последующим образованием осадка и пристеночного кольца	
4	Рост на полужидких средах (0,7% МПА) через 24 ч		рост по всей поверхности	
5	Рост на агарах через 48 ч:	диаметр	морфотип	реакция среды
	Агар Симмонса	1,0+0,5	S	с зеленого на синий
	Ацетатный агар	2,0+0,5	S	с оливкового на васильковый
	Васто PPLO агар	2,5+0,5	S, R, SR	-
	Бордетелагар	1,5+0,5	S	-
	ГРМ – агар	1,0±0,5	S, R, SR	-
	Дифтерийная среда	3,0+0,5	S, R, SR	-
	Кровяной агар 10%	2,5+0,5	S	слабый β-гемолиз
	Казеиново-угольный агар	2,0+0,5	S	отсутствует
	Менингококкагар	3,0+0,5	S	отсутствует
	Мясо-пептонный агар	2,5±1,0	S, R, SR	отсутствует
	МПА с цетримидом	-	-	отсутствует
	Среда Пизу	2,5+0,5	S, R, SR	вокруг колоний коричневая
	Среда Сабуро	2,0+0,5	S, R, SR	с зеленого на синий, запах аммиака
	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	2,0+0,5	S	отсутствует
	Стафилококк агар	-	-	отсутствует
	Триптиказо-соевый агар	2,0+0,5	S, R, SR	отсутствует
	Среда Эндо	1,0+0,5	S, R	с зеленого на синий
	Борде-Жангу	2,5+0,5	S	слабый β-гемолиз
	Морфотипы, образуемые на агарах через 48 ч			
6	1-й морфотип (S)		мелкие (до 1 мм), выпуклые, круглые, с ровным краем, полупрозрачные жемчужные, грязно-белые или сероватые, влажной консистенции, легко снимающиеся с поверхности среды колонии с блестящей поверхностью, с четкой зоной гемолиза на средах с добавлением крови	
7	2-й морфотип (S, R)		мелкие, средние, крупные колонии с ровными и шероховатыми краями, выпуклые и плоские, блестящие и матовые, белые, желтоватые и серые	
8	3-й морфотип (R)		средние (более 2 мм), с шероховатыми краями, преимущественно плоские с приподнятым центром, матовой поверхностью колонии с отсутствующей зоной гемолиза. Цвет колоний белый с желтоватым оттенком или серый с голубоватым оттенком. Консистенция колоний маслянистая, легко снимаются с поверхности	
	Гемолитическая активность			
9	Классический метод		слабый β-гемолиз через 48 ч	
10	Микрометод		слабый β-гемолиз через 15-30 мин	

Ферментативные свойства		
11	лизин, уреаз, аргинин, оксидаза, орнитиндекарбоксилаза, каталаза, цитохромоксидаза, индол (через 48 ч), утилизация цитратов, восстановление нитратов	положительный
12	сероводород, индол, арабиноза, манноза, сахароза, глюкоза, манит, лактоза, адонит, триптофандезаминаза, фенилаланиндезаминаза, дезоксирибонуклеаза, желатиназа, тирозин, факторы роста X и V	отрицательный
Устойчивость к антимикробным средствам		
13	бензилпенициллин, ампициллин, карбенициллин, амоксиклав; стрептомицин; ванкомицин; цефазолин, цефтазидим, цефотаксим, цефалотин; эритромицин, олеандомицин; фузидин, фурадипан; нистатин, клотримазол, флуконазол, амфотерин В; рифампицин; линкомицин, клиндамицин	высокий уровень
14	имипенем; амикацин, неомицин, канамицин, гентамицин, сизомицин; фурадонин; цефоперазон; ципрофлоксацин; тетрациклин	средний уровень
15	бацитрацин; цефепин, мономицин, колистин, оксалиновая кислота, азитромицин, окситромицин, доксициклин, левомицетин, хлорамфеникол	низкий уровень
Температура культивирования		
16	< 35	рост R и SR колоний
17	35-37	активный рост S колоний
18	38-52	рост снижается (3,1x10 ⁹ - 1,6x10 ¹ КОЕ/мл)
Показатель кислотности среды (pH)		
19	< 3	отсутствие роста
20	4-8	активный рост
21	> 8	снижение роста

стом культур и возможным загрязнением среды посторонними микроорганизмами.

Среды, содержащие кровь (Борде-Жангу, кровяной агар) имеют ограниченный срок хранения и нестандартны по составу, так как готовятся в лабораторных условиях. Необходимость в угольных адсорбентах и крови обусловлена потребностями родственной коклюшной палочки, на свойства которой ориентировались при разработке специализированных сред.

Мы установили, что тест-штаммы *B.bronchiseptica* активно культивируются на средах обогащенных пептонами, витаминами, аминокислотами, ферментами и микроэлементами (ТСА, Васто PPLO агар), также обильно и быстро растут на некоторых селективных средах, не предназначенных для их культивирования и содержащих ингибиторы роста и другие агрессивные вещества (менингококкагар, дифтерийная среда, среда для иерсиний

и псевдотуберкулеза, среда Сабуро, Эндо). Компоненты стафилококк агара и МПА с цетримидом ингибировали рост бордетелл.

Таким образом, ни одна из исследованных питательных сред полностью не удовлетворила наши требования по ростовым, селективным и элективным качествам, что обусловило целесообразность проведения целенаправленного активного поиска компонентов для культивирования бактерий *B.bronchiseptica*.

Задача поиска необходимых компонентов осложнялась наличием значительного межфакторного взаимодействия. Вследствие этого мы проводили многофакторный поиск, используя индивидуальные химические соединения в серии многофакторных экспериментов. При этом старались рассмотреть максимальное количество качественно разнообразных вариантов условий культивирования при минимальном количестве экспериментов.

Необходимость учета взаимодействия различных компонентов была очевидна, так как отдельные факторы, не оказывающие сами по себе прямого влияния на активность роста бордетелл, могли существенно влиять на него благодаря взаимодействию с другими компонентами среды.

Исходя из литературных данных и собственных исследований по культивированию тест-штаммов на агаровых средах в качестве питательной основы разрабатываемой среды остановились на ферментативном пептоне.

Выбор был обусловлен аминокислотным составом пептона, который представлен 17 аминокислотами: аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, глицин, аланин, цистин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин, триптофан. Кроме этого питательная основа богата азотом, минеральными веществами, рН раствора $7,1 \pm 0,1$ [15].

Экспериментальным путем подобрали оптимальную концентрацию основы. Исследования ростовой активности *B.bronchiseptica* на средах с различным содержанием пептонов (10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 г/л) проводили в течение 48 ч. Установили, что наибольшую удельную скорость роста борде-

телл наблюдали через 24 ч выращивания в среде, содержащей 20,0-30,0 г/л пептона. При этом показатель КОЕ/мл составил $(2,54+3,54) \times 10^9$ при $pH=7,2+0,2$. В других вариантах показатели были ниже. Введение в пептон дополнительно аминокислот (метионин, цистеин, пролин, глутаминовая кислота) и витаминов (аскорбиновая кислота, никотиновая кислота) не оказало существенных изменений в активности роста *B.bronchiseptica*, поэтому их не стали включать в состав основы.

Таким образом, питательная основа, содержащая 20,0 г/л пептона была взята в качестве базовой для дальнейших исследований.

Подобрали оптимальные концентрации железосодержащих и магнесодержащих солей на 3-х уровнях концентраций для каждого компонента. Фосфаты не испытывали, так как они содержатся в пептоне. Наилучшие ростовые показатели бордетелл наблюдали при содержании в среде (г/л): 0,1 - железа сернокислого и 0,4-0,5- сернокислого магния. Так как максимальный эффект влияния солей железа соответствовал минимальному значению концентрации, матрица планирования была смещена на шаг в сторону уменьшения концентрации. Таким образом, подобрали оптимальную концентрацию железосодержащих солей – 0,02-0,03 г/л.

Среда должна быть изотонична. Хлорид натрия позволяет регулировать изотоничность в концентрациях 4,5-6,5 г/л. Чтобы во время роста микроорганизмов кислые или щелочные продукты их жизнедеятельности не избыточно изменяли уровень pH , среды должны обладать буферностью, т. е. содержать вещества, нейтрализующие продукты обмена. В качестве нейтрализатора продуктов жизнедеятельности бордетелл в состав среды может быть введен крахмал в количестве 2,5-5,0 г/л, который *B.bronchiseptica* не ферментирует.

В качестве элективных биохимических маркеров решили использовать уреазную активность и отсутствие ферментации сахаров. Введение лактозы повышает селективность среды для роста лактозоположительных ассоциантов и технологичность, так как лактоза не образует токсичных соединений с азотсодержащими

компонентами при автоклавировании в составе готовой среды в режимах до 1 атм., 30 мин. *B.bronchiseptica* во время роста, а также ферментации мочевины, защелачивает субстрат, вследствие чего происходит изменение цвета среды (с зеленого на синий) и потемнение вершины колоний бордетелл (через 24 ч), тогда как бактерии, ферментирующие сахара и многоатомные спирты закисляют среду (желтый цвет).

Используя многофакторный эксперимент подобрали оптимальные концентрации элективных компонентов (г/л): мочевины 5,0; лактоза 0,7; бромтимоловый синий 0,2.

Для придания необходимой плотности в питательную среду добавляют агар в количестве $12,0 \pm 2,0$ г/л. Оптимальный показатель pH среды для роста бордетелл $7,0 \pm 0,2$ (рис. 66-69).

Важным звеном подбора компонентов питательной среды для первичного выделения возбудителя является качественный выбор селективных компонентов, не влияющих на ростовые качества бордетелл при этом активно подавляющих ассоциантов. В качестве селективных компонентов в основном используют антимикробные средства, химические соединения – ингибиторы роста бактерий, индикаторы и красители.

Анализ полученных результатов позволил установить, что бактерии *B.bronchiseptica* выдерживают высокие концентрации хлорида бария и мочевины, ниже показатели по уксуснокислому свинцу. На качество роста изучаемых штаммов бордетелл не влияют концентрации мочевины и хлорида бария в субстрате в количестве 10 г/л, уксуснокислого свинца – 6,5 г/л (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2007-2011; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

Предельные концентрации индикаторов и красителей для бактерий *B.bronchiseptica* составили: феноловый красный – не более 1 г/л; бромтимоловый синий – 10 г/л; метиловый оранжевый – 0,1 г/л; фуксин кислый – 0,1 г/л; водный голубой – 10 г/л; бриллиантовый зеленый – 0,1 г/л; конго красный – 100 г/дм³; сафранин – 0,1 г/л; генциан виолет – 1 г/л; мурексид – 10 г/л (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; Д.Г. Сверка-

лова и др., 2007-2011; А.В. Мاستиленко и др., 2008-2013; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

Результаты, проведённых исследований показали высокую устойчивость бордетелл к цефазолину, цефалотину и ампициллину, тогда как возможные ассоцианты были высокочувствительны. По нашим данным, максимальная подавляющая концентрация цефазолина натриевой соли в субстрате составила 0,004 г/л, ампициллина – 0,0025 г/л. Поскольку антимикотические препараты не оказывают влияние на рост клинических изолятов *B.bronchiseptica* в состав дифференциально-диагностической среды можно ввести флуконазол, миконазол, подавляющие рост большинства грибов-симбионтов данного возбудителя. Антимикотики также позволяют увеличить сроки хранения готовой среды в 2-3 раза. По нашим данным, максимальная подавляющая концентрация флуконазола, миконазола составила 0,002 г/л (рис. 61, 62).

В результате проведенного научного поиска структурных компонентов для культивирования бактерий *B.bronchiseptica*, установили наиболее оптимальные концентрации питательной основы (ферментативный пептон 20-30 г/л), солей (железа сернокислого – 0,02-0,03 г/л, сернокислого магния - 0,4-0,5 г/л, хлорид натрия 4,5-6,5 г/л), нейтрализаторов продуктов обмена (крахмал 2,5-5,0 г/л), элективных компонентов (мочевина 5,0 г/л, лактоза 0,7 г/л, бромтимоловый синий 0,2 г/л). В качестве селективных добавок возможно применение антимикробных средств (цефазолин – 0,004 г/л, ампициллин – 0,0025 г/л), антимикотических препаратов (флуконазол, миконазол – 0,002 г/л) и ингибиторов ассоциантов (хлорид бария – 5,0 г/л). Оптимальный показатель pH среды для роста бактерий *B.bronchiseptica* 7,0±0,2 (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2007-2011; А.В. Мастыленко и др., 2008-2013; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

При проведении испытаний был подтвержден ожидаемый результат - рост всех исследуемых штаммов *B.bronchiseptica* на разрабатываемой среде, тогда так рост культур *Pseudomonas putida* ATCC 12633, *Pseudomonas putida* 901, *Pseudomonas aeruginosa* 128,

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* 4, *Yersinia pseudotuberculosis* ВИЭВ-3, полностью отсутствовал, за исключением *Aeromonas hydrophila* и *Salmonella bongori* рост которых сопровождался изменением цвета среды с зеленого на желтый, вследствие изменения рН среды в кислую сторону.

В результате проведенных исследований мы рекомендуем следующую технологию приготовления селективно-диагностических питательных сред для выделения, накопления и дифференциации бактерий *B.bronchiseptica*: в дистиллированную воду добавляют компоненты по прописи, кроме селективных добавок. Компоненты растворяют и доводят на водяной бане до кипения. рН среды доводят 0,1 N раствором NaOH до 7,2. Среду стерилизуют автоклавированием при температуре 110-112°C в течение 15 минут. Затем повторно определяют рН среды, асептически вносят селективные добавки и разливают среду по чашкам Петри. Готовая среда зеленого цвета (рис. 70-71).

Результаты испытаний и использования среды в течение 6-ти лет подтвердили её дифференцируемость и избирательную селективность в отношении возбудителя бордетеллеза (Д.А. Васильев и др., 2006-2013; Ю.Б. Никульшина и др., 2007-2008; Д.Г. Сверкалова и др., 2007-2011; А.В. Мاستиленко и др., 2008-2013; Ю.Б. Васильева и др., 2009-2013).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммунологические реакции широко используются для диагностики инфекционных заболеваний. Различают реакции, в которых по известным антителам определяют неизвестные антигены, и наоборот. Однако перекрестные реакции, связанные с наличием общих антигенов среди различных бактерий, в ряде случаев затрудняют правильное толкование результатов. Изучением антигенных характеристик клеточных компонентов *B.bronchiseptica*

зарубежные исследователи занимались в комплексе с изучением возбудителя коклюша и паракоклюша, так как рассматривали его родоначальным видом (C.R. Manclark, B. Meade, 1985; F.-M.C. Muller et al., 1997; B.D. Meade, 1990).

После открытия J. Bordet and O. Gengou в 1911 году возбудителя коклюша, авторы опубликовали ряд статей, где предлагали пластинчатую реакцию агглютинации в качестве универсального метода определения антител к инфекционному агенту или идентификации возбудителя. В их исследованиях были использованы антигены цельных бактериальных клеток. В течение 70 лет этот метод оставался основой иммунологических исследований бордетеллеза (F.-M.C. Muller et al., 1997). С появлением в 1980 году иммуноферментного анализа (ELISA), исследователи стали проявлять все больший интерес к разработке на его основе принципиально новых методик диагностики заболеваний, вызванных представителями рода *Bordetella* (Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, 2003; Л.М., Панасенко, Е.И. Краснова, 2004; B.D. Meade, 1990).

Метод определения агглютинации антител к цельным клеткам бордетелл был со временем модифицирован C.R. Manclark, B. Meade (1985) и нашел свое отражение в различных реакциях микроагглютинации для идентификации бордетелл. В своих исследованиях авторы применяли антигенные комплексы, полученные с использованием физических способов разрушения бактериальных клеток, совмещенных с ультрацентрифугированием. Главным образом, с помощью реакций микроагглютинации исследователи определяли наличие фимбриальных антигенов, пертактина и/или липополисахарида, однако к качеству антигенов были применены самые высокие требования.

S.C. Redd et al. (1988) впервые описали технологию иммуноблотинга для идентификации представителей рода *Bordetella*. Первоначально для авторов она имела прикладное исследовательское значение, но позднее стала применяться в качестве самостоятельного качественного метода в рутинных исследованиях в лабораториях, наряду с культуральным методом. В своих исследованиях авторы получали смесь белковых комплексов бак-

териальных клеток путем термического лизиса при 100°C в течение 10 минут. После разделения в ПААГ лизата трех штаммов возбудителя бордетеллеза ими были получены сходные электрограммы белковых компонентов. После этого был проведен блотинг с иммунными сыворотками. В результате опытов исследователи показали, что выраженными антигенными свойствами обладали белки с молекулярной массой 200 и 220 кДа, а менее выраженными - белки с молекулярной массой 75 и 84 кДа, которые являются компонентами гемагглютинина бордетелл (Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, 2003; Л.М., Панасенко, Е.И. Краснова, 2004).

Исследователями М. Granstrom et al. (1982), а позднее Н.Р. Kaslow et al. (1982) были описаны различные варианты количественного определения антител с использованием реакции нейтрализации. В своих работах авторами была показана высокая эффективность определения нейтрализации АДФ-рибозилтрансферазной активности токсина сывороточными антителами. Экспериментами было доказано, что резкое снижение ферментативной активности в 90% исследуемых образцах после вакцинации, измеряемое в сцинтилляционных счетчиках, находилось в пределах 2 log, а в иммуноферментном анализе эти пробы были отрицательными.

В реакции двойной радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony сыворотка, полученная при гипериммунизации цельными клетками бордетелл, образовывала четкие зоны преципитации с компонентами клеток, разрушенных с помощью химического лизиса и последующего ультрацентрифугирования в солевом буфере при 27000 g в течение 40 минут. При этом наблюдалось образование до 3 линий преципитации (А.В. Мاستиленко и др., 2009; Ю.Б. Васильева, 2013).

В исследованиях, проведенных Н. Billaudelle et al., связанных с изолированием гистамин-чувствительного фактора (HSF) и определением его иммуногенности, было показано, что при проведении радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony выделенной фракции разрушенных с помощью ультразвука бактериальных клеток, было идентифицировано до 12 антигенных

комплексов бордетелл (Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, 2003; Л.М., Панасенко, Е.И. Краснова, 2004).

Большинство исследователей описывают эксперименты, касающиеся антигенных различий трех представителей рода *Bordetella*: *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*.

R. Ross et al. исследовал антигенный состав *B.pertussis*, *B.bronchiseptica* и *B.parapertussis* с помощью методов диффузной преципитации в агаровом геле и иммуноэлектрофореза в барбитуратовом буфере. Антигены были получены путем экстрагирования лизированных культур в щелочном солевом буфере. При сравнении результатов полученных после преципитации в геле антигенных структур этих видов бордетелл с антисывороткой к *B.pertussis* оказалось, что как минимум три антигена являются общими (А.В. Мاستиленко. 2009).

N. Holby et al. (1977), продемонстрировали в своих исследованиях с помощью количественных методов иммуноэлектрофореза перекрестные реакции между антигенами возбудителя бордетеллеза и 28 другими видами бактерий. В опытах были использованы антигены бактерий, полученные при помощи ультразвука, и иммунная кроличья сыворотка. Только два антигена из 44 выделенных давали перекрестную реакцию с представителями других видов, в основном грамотрицательными бактериями. Однако оказалось, что антигены *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica* перекрестно реагируют с антисывороткой к *B.pertussis* в широком диапазоне, и только 4 антигена являются видоспецифичными для возбудителя бордетеллеза.

Ряд авторов в своих работах описывали отдельные антигены, которые были изолированы из бактериальных клеток, изучены и сопоставлены между различными представителями рода *Bordetella* в иммунохимических реакциях. Так в работах A. Banerjea and J. Munoz (1962), показано, что термолабильный токсин, содержащийся в протоплазме инфекционного агента может быть выделен только при щадящем лизисе. Авторы отмечают, что, несмотря на потерю токсического эффекта при температурной обработке, он сохраняет свои выраженные антигенные

свойства, а при простой обработке мертиоллятом токсический эффект сохранялся. Эти данные позволили в последствии использовать его в производстве комплексных вакцин.

А.Р. MacLennan (1960), обнаружил в своих исследованиях, что липополисахарид, являющийся протективным антигеном, в реакциях микроагглютинации и радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony был идентичен таковым, выделенным из грамотрицательных бактерий кишечной группы.

В настоящее время для серологической диагностики бордетеллеза используют различные методы – РА, РСК, РПГА с исследованием парных сывороток, взятых в динамике инфекционного процесса (Г.Я. Ценева, Н.Н. Курова, 2003; Л.М., Панасенко, Е.И. Краснова, 2004; МУК, 2008).

Что касается антигенов, используемых для различных иммунохимических реакций, то разные исследователи представляют экспериментальные данные о различных видах антигенов. Так в исследованиях М. J. Brennan et al. (1988), доказана высокая специфичность выделенного пертактина при идентификации инфекции, вызванной бордетеллами; D.G. Burstyn et al. (1983), при серологическом исследовании сывороток обнаружили, что филаментозный гемагглютинин, являющийся иммунопротектором на начальных стадиях инфицирования, не проявляет видовой специфичности и дает перекрестные реакции с другими видами рода *Bordetella*; в опытах В. D. Meade et al. (1990), показано на однородность фимбриальных антигенов, по крайней мере, у трех представителей рода – *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis*.

Иммунохимические методы антигенной идентификации *B. bronchiseptica* в основном решая прикладные задачи, определяющие технологии серологических и иммунологических методов, вместе с тем являются определяющими при идентификации возбудителя. Прежде всего, это связано с предопределяющим фактором качества, специфичности и афинности антигенов и их комплексов при разработке и производстве диагностикумов и вакцин.

Нами рекомендованы реакции агглютинации и диффузной преципитации в качестве дополнительных компонентов бактериологического исследования (Д.А. Васильев и др, 2008-2009; А.В. Мاستиленко, 2011; Д.Г. Сверкалова. 2011; Ю.Б. Васильева, 2013).

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Молекулярно-генетические методы исследований бактерий и вирусов чаще всего называют ДНК-исследованиями (В.Г. Владимиров и др., 2002).

Полимеразная цепная реакция – это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

ПЦР, являясь точкой интеграции биофизики, физики, химии, биохимии, медицины и математики, вместе с тем является точным биологическим инструментом в решении конкретных задач микробиологии.

Вместе с тем, следует отметить, что данный метод исследования, позволяет судить лишь о присутствии короткого участка наследственной информации возбудителя (ДНК или РНК), который ограничивает исследователь выбранными праймерами. Поэтому на основании результатов проведения ПЦР нельзя судить о жизнеспособности микроорганизма, его резистентности к химиотерапевтическим средствам, дезинфектантам и т.д. Все это находится в ведении классического микробиологического исследования.

Тест-системы, основанные на принципе амплификации ДНК, позволяют обнаруживать патогенные для человека и/или животных бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.

Это преимущество достигается за счет высокой чувствительности ПЦР-системы, которая составляет около 10 бактериаль-

ных клеток/пробу, в то время как чувствительность иммунологических и микроскопических тестов колеблется в пределах 10^3 - 10^6 клеток/пробу.

Тест-системы на основе ПЦР особенно эффективны при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий. С этим приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, а также при тестировании объектов внешней среды. При ПЦР – диагностике «размножению» подвергается не бактерия, а только ее ДНК, причем не вся молекула, а только определенный фрагмент, являющийся уникальным маркером данного возбудителя.

ПЦР-диагностикумы, в отличие от иммунологических тест-систем, позволяют избежать проблем, связанных с перекрестно-реагирующими антигенами, обеспечивая абсолютную специфичность.

Определение можно проводить непосредственно в клиническом материале (кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы) и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва).

При разработке систем праймеров для ПЦР мы провели исследование геномов штаммов *B.bronchiseptica* на наличие уникальных генов – кандидатов для молекулярно-генетической идентификации возбудителя. Были найдены два уникальных гена *bfrA* и *bfrZ* системы TonB-комплекса наружных мембранных протеинов-рецепторов железа *B.bronchiseptica*. После проверки гены подтвердили видоспецифичность.

Для повышения чувствительности молекулярно-генетической диагностики возбудителя при SNP-заменах в уникальных генах *bfrA* и *bfrZ* или неспецифическом отжиге соответствующих им праймеров были подобраны гены-мишени для родового типирования. Ими явились ген кодирующий фермент цитохром–С-оксидазу (*ccoX*) и ген 16S субъединицы бактериальных рибосом (16S rRNA).

После выбора специфичных генов-кандидатов для молекулярно-генетической идентификации *B.bronchiseptica* были определены наиболее консервативные участки выбранных мишеней, пу-

тем их сравнения у различных штаммов в базе данных GeneBank. На эти консервативные участки были положены праймеры, отвечающие требуемым нами условиям: длина праймеров должна составлять 20–32 пары нуклеотидов, температура плавления праймера - 60–70 °С, размер фланкируемого праймерами участка гена – не менее 100 и не более 1000 п.о. (таблица 21).

Праймеры были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно.

B.bronchiseptica, также как и *B. pertussis* и *B. parapertussis*, экспрессирует ряд факторов патогенности: адгезины (филаментозный гемагглютинин, пертактин и фимбрии), токсины (дермoneкротический, аденилатциклазу-гемолизин и липополисахарид) (P. Gueirard, B. Human, 1995).

Однако нуклеотидный состав генов, кодирующих эти факторы, имеет гомологию не менее 90% среди данных возбудителей, поэтому их использование в качестве мишеней для систем молекулярно-генетической идентификации нецелесообразно (L. Roorda et al., 2011).

Результаты исследований свидетельствуют, что молекулярно-генетическая дифференциация *B.bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B.parapertussis* может быть основана на вставочных элементах

Таблица 21. Характеристика подобранных систем праймеров.

Параметры	Участок гена <i>B.bronchiseptica</i>			
	bfrA	bfrZ	CcoX	16S rRNA
Прямой праймер (f) 5'-3'	CCTTCCAGCAC CTGGCGGTACG AGTTGCTCC	GGACGAC CAGGATCA CATCTTCC	GCATTGCTCC ATCCTGTTGT GCG	CTACGGGGGA AAGCGGGGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	CCCCGTGCCGG GGTGCCTGGAC CTGGGCG	GCTTTCCT GGTAGTTG GCGTAGG	GATGGGTAT CTGAGCGCG	GACCGTACTC CCCAGCGGT
Расчетная t плавления прямого и обратного праймеров	62,0 °C	62,0 °C	62,0 °C	62,0 °C
Теоретическая специфичность	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>B.bronchiseptica</i> , <i>B.pertussis</i> , <i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i> , <i>B.pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. avium</i> , <i>B. hinzii</i> , <i>B. holmseii</i> и <i>B. trematum</i>
Длина специфического ампликона (п.о.)	528	298	168	711

(IS), делециях или тандемных повторах отдельных элементов генома. Так, авторы считают, что для *B. pertussis* уникальными являются IS481 и IS1663, а для *B. parapertussis* IS1001; IS1002 имеет до 90 включений в геном *B. parapertussis* и до 6 – в геном *B. pertussis* (B.F. Woolfrey, J.A. Moody, 1991; Triplex real-time, 2010; A real-time PCR..., 2011).

Основываясь на этих данных, нами были разработаны олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды для дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* при использовании метода ПЦР в режиме «реального времени». В качестве мишени для *B. pertussis* был выбран участок гена транспозазы IS481

Были определены гены и их нуклеотидные последовательности в системе BLAST NCBI. После их выравнивания среди штаммов *B. pertussis* были определены консервативные участки и праймеры. Результаты представлены в таблице 22.

В результате были разработаны системы праймеров для молекулярно-генетической идентификации *B. bronchiseptica* с использованием метода ПЦР.

Для идентификации ДНК бактериальных возбудителей с помощью амплификационной технологии молекулярных методов – ПЦР в режиме «реального времени», кроме праймеров необходим флуоресцентный зонд, разрушающийся с помощью Taq-ДНК-полимеразы и повышающий флуоресцентный сигнал во время амплификации искомого участка генома.

Принцип подбора флуоресцентного зонда не отличается от подбора праймерных систем, за исключением того, что зонд имеет место отжига внутри амплифицируемого участка ДНК.

Таблица 22. Характеристика праймеров к участкам гена IS481 *B. pertussis*.

Параметр	Характеристика
Участок гена IS481	
Прямой праймер (f) 5'-3'	TTCCGCATGAATGTCTTCGC
Обратный праймер (r) 5'-3'	CACCTAGTGGCGTCTGCAC
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	60,0°C
Теоретическая специфичность	<i>Bordetella pertussis</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	151

При выборе систем праймеров для ПЦР в режиме «реального времени» мы руководствовались скоростью наработки ампликонов, т.е. длиной не более 500 п.н., а также специфичностью отжига самих праймерных систем на матрице бактериальной ДНК.

С помощью программ PrimerQuest в режиме on-line и Gene Runner Version 3.05 были исследованы все праймерные системы на наличие димеров и возможности подбора флуоресцентных зондов для ПЦР в режиме «реального времени». Олигонуклеотиды BfrA имеют длину более 30 п.н. и при анализе возможного образования димеров в программе Gene Runner Version 3.05 наблюдается их неспецифическое взаимодействие, поэтому данную систему олигонуклеотидов нецелесообразно использовать при разработке ПЦР-системы с детекцией в режиме реального времени.

Модифицированные системы олигонуклеотидов (с введением в структуру LNA) ввиду определенных сложностей введения аналогичной модификации в структуру флуоресцентного зонда (наличие внутренней флуоресцентной метки и гасителя на 5' конце) также представляется нецелесообразным в отличие от их использования в мультиплексном формате ПЦР с электрофоретической детекцией и визуализацией различий длин ампликонов.

В результате для остальных олигонуклеотидных систем были подобраны флуоресцентные зонды для идентификации и дифференциации *B.bronchiseptica* методом ПЦР с регистрацией в режиме реального времени. Результаты представлены в таблице 23.

В результате были разработаны системы праймеры–зонды для молекулярно-генетической идентификации *B.bronchiseptica* с помощью ПЦР в режиме реального времени и мультиплексной системы для дифференцирования *B.bronchiseptica* от других патогенов этого рода.

Одним из важных этапов в практике проведения ПЦР является подготовка суспензии бактериальной массы или клинического биоматериала к исследованию – выделение ДНК из бактериальной клетки. Для этого были использованы несколько различных технологий очистки нуклеиновых кислот от ферментов, белков,

Таблица 23. Флуоресцентные зонды к разработанным системам олигонуклеотидов для идентификации и дифференциации *B.bronchiseptica*.

Система олигонуклеотидов	Флуоресцентный зонд (5'-3')
BFRA1 <i>B.bronchiseptica</i>	CATCCAGACGCCGCCGATC
BFRA2 <i>B.bronchiseptica</i>	CATCCAGACGCCGCCGATC
BFRA3 <i>B.bronchiseptica</i>	CGCCACAGCCTGAACCTGGG
BFRZ <i>B.bronchiseptica</i>	AACAACATGCGCATCAGCAACCGGAACA
BFRZ1 <i>B.bronchiseptica</i>	CCGGCTACGGCATCGTCGAC
BFRZ2 <i>B.bronchiseptica</i>	TCAACCCTGGCTGGGCATG
BFRZ3 <i>B.bronchiseptica</i>	CCGGCTACGGCATCGTCGAC
IS481 <i>B.pertussis</i>	CAGCACAGGCTGTGGGTCCG

ионов, которые могут существенно усложнить прохождение реакции, а в некоторых случаях ингибировать действие Taq-ДНК-полимеразы. Методики, примененные в данной работе: сорбентная с применением гуанидинтиоционата в качестве хоатропного агента, фенольно-хлороформная экстракция ДНК, термический лизис и последующее осаждение клеточного детрита.

Используя вышеперечисленные методики, было проведено экстрагирование нуклеиновых кислот из суспензий бактериальной массы 9 штаммов *B.bronchiseptica*. Далее после получения раствора нуклеиновых кислот в трис-ЭДТА буфере, было проведено спектрофотометрическое измерение оптической плотности каждой пробы при 260 нм, 280 нм, 320 нм. При этом были использованы расчеты ОП260-ОП320, позволяющие вычесть примеси, не относящиеся к поглощению светового потока нуклеиновыми кислотами. Для определения чистоты ДНК использовались расчеты ОП260/ОП280, при этом образцы считались с содержанием достаточно чистой для использования в ПЦР ДНК при коэффициенте не менее 1,8. Результаты представлены в таблице 24.

После ряда проведенных исследований и расчетов коэффициента чистоты ДНК в растворе трис-ЭДТА было сделано заключение, что использование сорбента приводит к наилучшему выходу матричной ДНК, а это отвечает целям эксперимента (рис. 72).

На рисунке также представлены результаты эксперимента, в котором были экстрагированы нуклеиновые кислоты штамма BBR-121 с использованием различных методических подходов, а

Таблица 24. Расчет коэффициента чистоты ДНК.

Штамм	Методика выделения ДНК из бактерий <i>V.bronchiseptica</i>								
	Сорбентная			фенольно-хлороформная экстракции ДНК			термического лизиса		
	ОП ₂₆₀₋₃₂₀	ОП ₂₈₀	ОП ₂₆₀ /ОП ₂₈₀	ОП ₂₆₀₋₃₂₀	ОП ₂₈₀	ОП ₂₆₀ /ОП ₂₈₀	ОП ₂₆₀₋₃₂₀	ОП ₂₈₀	ОП ₂₆₀ /ОП ₂₈₀
BBR 126	0,022	0,012	1,83	0,025	0,014	1,79	0,016	0,010	1,60
BBR 134	0,028	0,015	1,86	0,029	0,016	1,81	0,012	0,007	1,71
BBR 137	0,031	0,017	1,82	0,021	0,013	1,62	0,014	0,008	1,75
BBR 140	0,030	0,016	1,87	0,020	0,011	1,82	0,010	0,006	1,67
BBR 143	0,028	0,015	1,86	0,018	0,010	1,80	0,017	0,009	1,89
BBR 149	0,025	0,013	1,92	0,023	0,013	1,77	0,016	0,009	1,78
BBR 175	0,029	0,016	1,81	0,028	0,015	1,86	0,012	0,007	1,71
BBR 179	0,024	0,013	1,84	0,022	0,013	1,69	0,019	0,010	1,90
BBR 182	0,019	0,011	1,72	0,015	0,008	1,87	0,015	0,008	1,87

затем визуально было определено качество выделенной ДНК в горизонтальном электрофорезе с окрашиванием двуцепочечной ДНК бромистым этидием, где подтверждается эффективность выделенной ДНК при использовании методик сорбции на силикагеле и магнитных частицах.

Оптимизация режима проведения ПЦР (температурный ре-

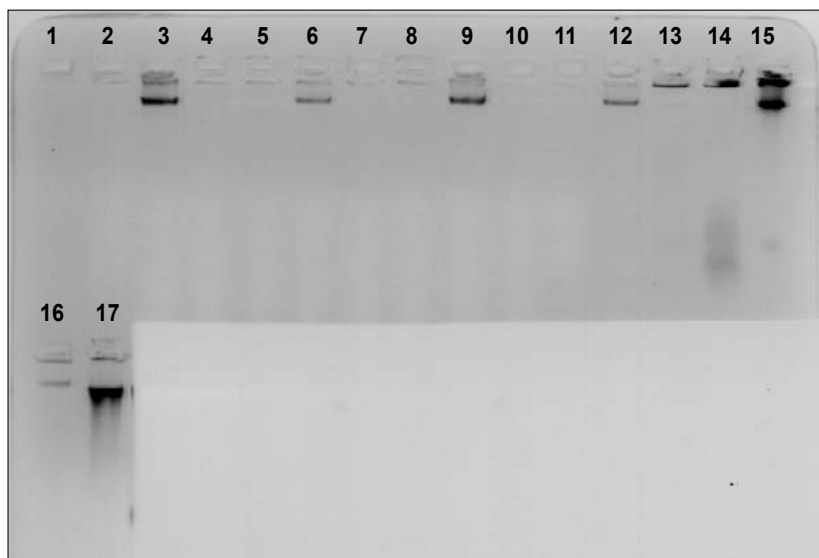


Рис. 72. Электрофореграмма тотальной ДНК *V.bronchiseptica*. Используются: 1-3 – сорбентная методика с использованием силикагеля; 4-6 – сорбентная методика с использованием магнитных частиц; 7-9 – сорбентная методика с использованием свободного SiO_2 ; 10-12 – термического лизиса с последующей сорбцией ДНК на силикагеле; 13-15 – термический лизис бактериальных клеток; 16-17 – фенольно-хлороформный метод; 1, 4, 7, 10, 13 – деионизированная вода; 2, 5, 8, 11, 14, 16 – отрицательные контроли; 3, 6, 9, 12, 15, 17- культура *V.bronchiseptica*.

жим, количество циклов, концентрация праймеров для реакции) для участков генов *bfrA* и *bfrZ*, а также проверка работоспособности и специфичности праймеров были проведены на лабораторных штаммах и клинических изолятах *B.bronchiseptica*, *B.pertussis*, *B.parapertussis*.

Температура отжига праймеров при проведении экспериментов подбиралась эмпирическим путем, исходя из их расчетных температур плавления. Наиболее оптимальной, с точки зрения эффективности амплификации, а также с учетом модификации олигонуклеотидов LNA оказалась температура отжига – 62 °С.

Также опытным путем была подобрана концентрация праймеров на реакцию. Слишком малое количество праймеров может привести к появлению ампликонов большой длины (более 1000–2000 п.о.). Это связано с тем, что праймеры на каждом цикле, отжигаясь на матрице, в дальнейшем в реакции не участвуют, так как они являются основой для работы Taq–ДНК–полимеразы и входят в структуру ампликонов. При нехватке ограничивающих праймеров и исходном достаточном количестве матрицы ДНК *B.bronchiseptica* Taq–ДНК–полимераза работает без ограничения участка, то есть столько, сколько ей позволяет ее активность. А при слишком большой концентрации праймеры образуют димеры, отжигаясь на самих себя или на пару, образуя ампликоны длиной не более 100 п.о. Однако следует заметить, что димеры обычно начинают образовываться на конечных циклах реакции. Таким образом, были подобраны оптимальные с точки зрения эффективности ПЦР концентрации праймеров для каждой реакции. Однако и в этом случае оказалась необходимой универсальность их рабочих количеств. После ряда проведенных экспериментов была определена оптимальная универсальная концентрация каждого из праймеров для каждой из систем – 5 pmol на реакцию объемом 25 мкл.

В состав тест-системы для проведения ПЦР вошли комплекты реагентов для выделения ДНК из биопроб – «Проба ГС», для проведения амплификации участка ДНК и для детекции ДНК методом гель-электрофореза.

Для обнаружения участка ДНК *B.bronchiseptica* были использованы суточные культуры, полученные путем культивирования при 37°C на мясо-пептонном бульоне или селективно-диагностической среде. Пробы клинического материала (мазки и соскобы клеточного материала со слизистой зева) отбирались у животных с помощью стерильных шпателей и эндоцервикальных ПЦР щеточек. Отдельные колонии культуры с селективной среды, бактериологическая петля с бульонной культурой или мазки и соскобы клинического биоматериала от животных помещались в 0,5 мл стерильного физиологического раствора, предварительно разлитого в условиях стерильности ламинарного ПЦР-бокса в микропробирки типа «Eppendorf» (объема 1,5-1,7 мл). Затем все пробы доставлялись в термоконтейнере в ПЦР-лабораторию.

После выделения ДНК на амплификаторе набирали программу, представленную в таблице 25.

После окончания реакции (в день проведения исследования или после хранения утром следующего дня) проводили анализ продуктов ПЦР методом горизонтального электрофоретического разделения фрагментов ДНК в агарозном геле. При определении специфичности все пары праймеров были проверены в ПЦР на клинических штаммах *B.bronchiseptica*. Все исследуемые штаммы возбудителя дали положительный результат.

Для оптимизации ПЦР-протокола, а также для выбора наиболее эффективных и высокоспецифичных праймерных систем в реакциях были использованы клинические изоляты *B.pertussis*, *B.parapertussis* для возможности исключения олигонуклеотид-

Таблица 25. Программа для амплификации ДНК

Для амплификаторов с активным регулированием (по раствору в пробирке): Терцик» (НПО «ДНК-Технология», Россия)				
№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Количество повторов
1	1	95°C	5 мин	1
2	1	95°C	10 сек	40
	2	62°C	10 сек	
	3	72°C	20 сек	
3	1	72°C	2 мин	1

ных систем, вызывающих неспецифический отжиг. Исходя из результатов проведенных исследований нами были сделаны выводы, что наиболее эффективными (не дающими дополнительных полос неспецифической амплификации) как для референсных штаммов, так и для клинических изолятов *B.bronchiseptica* является система олигонуклеотидов BFRA и BFRZ (рис. 73-77).

Исходя из результатов проведенных исследований нами были сделаны выводы, что наиболее эффективными (не дающими дополнительных полос неспецифической амплификации) как для референсных штаммов, так и для клинических изолятов

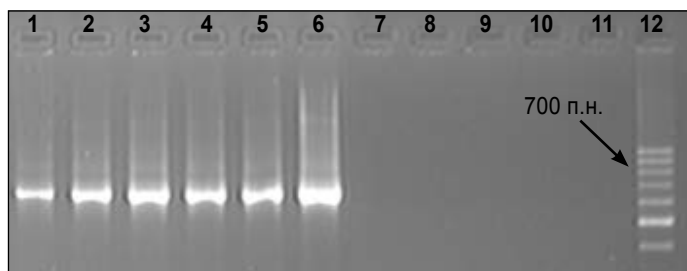


Рис. 73. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrA* с олигонуклеотидной системой BFRA1. 1-7 – штаммы *B.bronchiseptica*; 8-9 – штаммы *B. pertussis*; 10 – *B. parapertussis*; 11 – отрицательный контроль; 12 – маркер молекулярного веса М-100.

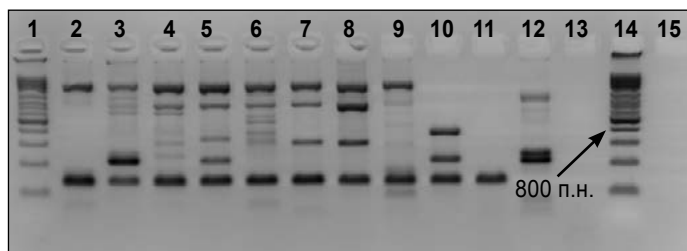


Рис. 74. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrA* с олигонуклеотидной системой BFRA2. 1-11 – штаммы *B.bronchiseptica*; 12 – *B. pertussis*; 13 – *B. parapertussis*; 14 – маркер молекулярного веса М-100; 15 – отрицательный контроль.

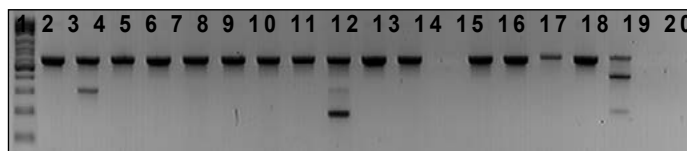


Рис. 75. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrA* с олигонуклеотидной системой BFRA3. 1 – маркер молекулярного веса М-100; 2-18 – штаммы *B.bronchiseptica*; 19 – *B. pertussis*; 20 – *B. parapertussis*.

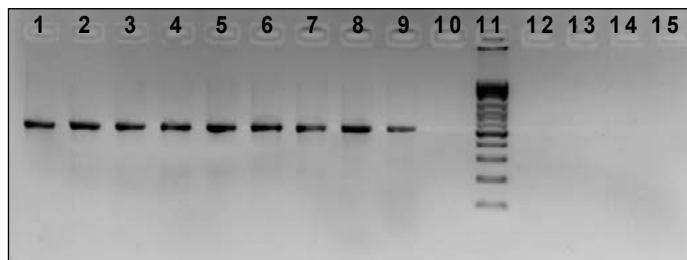
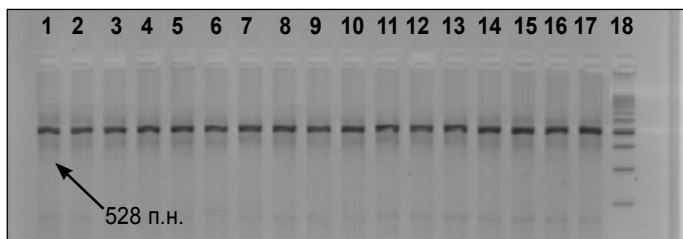


Рис. 76. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrA* с олигонуклеотидной системой BFRA. 1-19 – штаммы *B.bronchiseptica*; 10 – отрицательный контроль; 11 – маркер молекулярного веса М-100; 12-13 – *B. pertussis*; 14-15 – *B. parapertussis*.

Рис. 77. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrA* с олигонуклеотидной системой BFRA. 1– 17 – штаммы *B.bronchiseptica*; 18 – маркер молекулярного веса М–100.



B.bronchiseptica является система олигонуклеотидов BFRA.

Аналогичным образом были исследованы разработанные олигонуклеотидные системы BFRZ1, BFRZ2 и BFRZ3 для идентификации специфического для данного возбудителя фрагмента гена *bfrZ*. Данные исследований систем BFRZ1, BFRZ2 и BFRZ3 были сопоставлены с результатами, полученными при использовании системы BFRZ и представлены на рис. 78 – 81.

По полученным результатам можно сделать выводы, что все олигонуклеотидные системы, позволяющие идентифицировать фрагмент гена *bfrZ* являются специфичными в отношении возбудителя бордетеллеза.

Рис. 78. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrZ* с олигонуклеотидной системой BFRZ1. 1– 6 – штаммы *B.bronchiseptica*; 7–8 – *B. pertussis*; 9–10 – *B. paraptussis*; 11 – отрицательный контроль; 12 – маркер молекулярного веса М–100

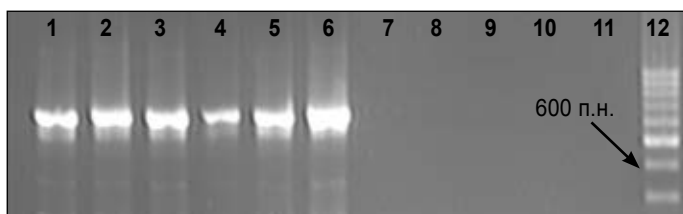


Рис. 79. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrZ* с олигонуклеотидной системой BFRZ2. 1– 15 – штаммы *B.bronchiseptica*; 16 – *B. Paraptussis*; 17 – маркер молекулярного веса М–100; 18 – отрицательный контроль.

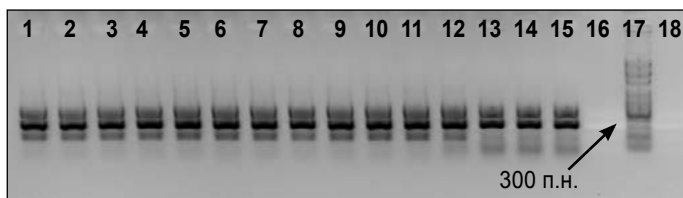
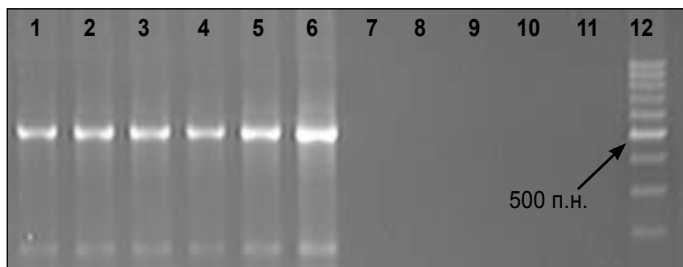


Рис. 80. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrZ* с олигонуклеотидной системой BFRZ3. 1– 6 – штаммы *B.bronchiseptica*; 7–8 – *B. pertussis*; 9–10 – *B. paraptussis*; 11 – отрицательный контроль; 12 – маркер молекулярного веса М–100.



Также были разработаны основные параметры проведения реакции с праймерами к участкам генов 16S RNA и ssox (рис. 82).

Оптимальная температура отжига праймеров составила 60°C, однако ввиду введения в олигонуклеотиды модификации LNA для повышения специфичности их отжига, была установлена температура 62°C с дополнительным внесением 2,5M MgCl₂ в количестве 1 мкл/25 мкл реакционной смеси.

Так как актуальным является вопрос о сокращении себестоимости и времени проведения ПЦР в «поточном» режиме мы выявили необходимость разработки мультиплексной ПЦР-системы для скрининговых анализов.

В ходе опытов оказалось, что праймеры к участку гена 16S RNA при внесении в общую реакционную смесь дают побочные продукты (димеры) с остальными праймерными системами. По-

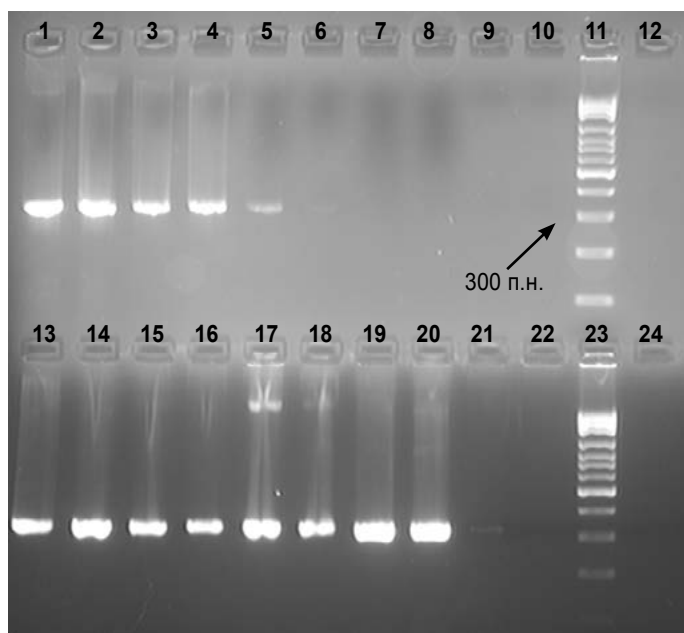


Рис. 81. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *bfrZ* с олигонуклеотидной системой BFRZ. 1–6, 13–21 – штаммы *B.bronchiseptica*; 7–8 – *B. pertussis*; 9–10, 22 – *B. paraptussis*; 11, 23 – маркер молекулярного веса M-100; 12, 24 – отрицательный контроль.

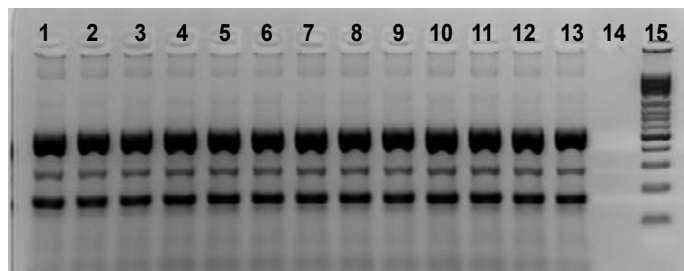


Рис. 82. Электрофореграмма мультиплексной ПЦР. 1–13 – штаммы *B.bronchiseptica*; 14 – отрицательный контроль; 15– маркер молекулярного веса

Таблица 26. Специфичность ПЦР-исследования на штаммах *B.bronchiseptica*.

№ п/п	Наименование штамма	Участок гена <i>bfrA</i>	Участок гена <i>bfrZ</i>	Участок гена 16S rRNA	Участок гена <i>Cytochrom-C-oxidase</i>	Бакисследование
1	<i>B.bronchiseptica</i> 29«Покров»	+	+	+	+	+
2	<i>B.bronchiseptica</i> 30/10608	+	+	+	+	+
3	<i>B.bronchiseptica</i> 36	+	+	+	+	+
4	<i>B.bronchiseptica</i> 37	+	+	+	+	+
5	<i>B.bronchiseptica</i> 45	+	+	+	+	+
6	<i>B.bronchiseptica</i> 47	+	+	+	+	+
7	<i>B.bronchiseptica</i> 48	+	+	+	+	+
8	<i>B.bronchiseptica</i> 49	+	+	+	+	+
9	<i>B.bronchiseptica</i> 56	+	+	+	+	+
10	<i>B.bronchiseptica</i> 59	+	+	+	+	+
11	<i>B.bronchiseptica</i> 62	+	+	+	+	+
12	<i>B.bronchiseptica</i> 68	+	+	+	+	+
13	<i>B.bronchiseptica</i> 71	+	+	+	+	+
14	<i>B.bronchiseptica</i> 74	+	+	+	+	+
15	<i>B.bronchiseptica</i> 75	+	+	+	+	+
16	<i>B.bronchiseptica</i> 82	+	+	+	+	+
17	<i>B.bronchiseptica</i> 85	+	+	+	+	+
18	<i>B.bronchiseptica</i> 89	+	+	+	+	+
19	<i>B.bronchiseptica</i> 101	+	+	+	+	+
20	<i>B.bronchiseptica</i> 115	+	+	+	+	+
21	<i>B.bronchiseptica</i> 121	+	+	+	+	+
22	<i>B.bronchiseptica</i> 132	+	+	+	+	+
23	<i>B.bronchiseptica</i> 136	+	+	+	+	+
24	<i>B.bronchiseptica</i> 139	+	+	+	+	+
25	<i>B.bronchiseptica</i> 140	+	+	+	+	+
26	<i>B.bronchiseptica</i> 149	+	+	+	+	+
27	<i>B.bronchiseptica</i> 154	+	+	+	+	+
28	<i>B.bronchiseptica</i> 161	+	+	+	+	+
29	<i>B.bronchiseptica</i> 169	+	+	+	+	+
30	<i>B.bronchiseptica</i> 178	+	+	+	+	+
31	<i>B.bronchiseptica</i> 190	+	+	+	+	+
32	<i>B.bronchiseptica</i> 198	+	+	+	+	+
33	<i>B.bronchiseptica</i> 202	+	x	X	x	+
34	<i>B.bronchiseptica</i> 212	+	x	X	x	+
35	<i>B.bronchiseptica</i> 218	+	x	X	x	+
36	<i>B.bronchiseptica</i> 233	+	x	X	x	+
37	<i>B.bronchiseptica</i> 236	+	x	X	x	+

Примечание: «+» – положительная реакция, «-» – отрицательная реакция, «x» - не исследовали

этому для многокомпонентного формата ПЦР было решено использовать 2 системы праймеров к участкам генов *bfrA* и *сsox* и 3 системы праймеров к участкам генов *bfrA*, *bfrZ* и *сsox*. Количество и соотношение праймеров были подобраны экспериментальным путем: по 5 pmol праймеров системы для участков генов *bfrA* и *bfrZ* и 15 pmol для участка гена *сsox*. Также следует отметить, что была использована универсальная программа амплификации, представленная ранее. Время, затраченное на выполнение программы на термоциклере, составило 70 мин (рис. 83).

Мультиплексный формат ПЦР позволяет в короткие сроки в одной пробе определить наличие участка ДНК, специфичного для трех представителей рода *Bordetella* и отдельно выделить фрагмент ДНК *B.bronchiseptica*.

После разработки параметров проведения реакции с электрофоретической детекцией были проведены исследования по оптимизации ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Программа амплификации (табл. 27) была оптимизирована ввиду увеличения температуры отжига данных систем. Таким образом, накопление продукта амплификации регистрировалось на каждом цикле при температуре 62°C в течение 15 сек.

В результате были получены данные, представлены в нижеприведенных таблицах.

Нами была разработана методика полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественной ха-

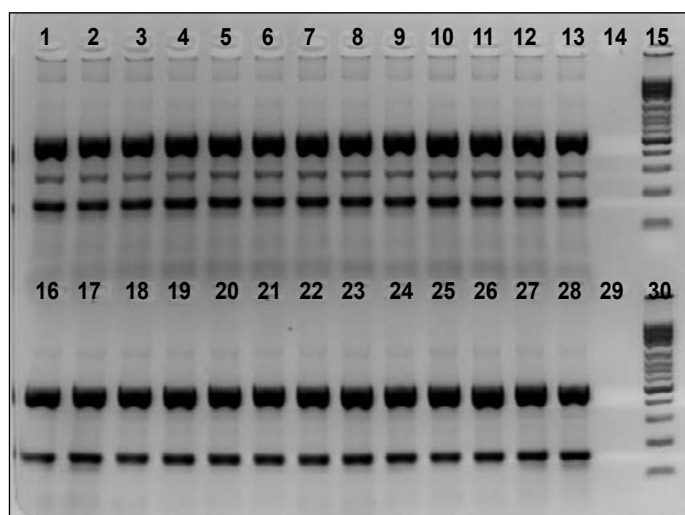


Рис. 83. Электрофореграмма полученных продуктов амплификации мультиплексной реакции в эксперименте. 1-15 мультиплексный формат с использованием праймеров к участкам генов *BfrA+BfrZ+Cytochrom-C-oxidase*. 16-30 мультиплексный формат с использованием праймеров к участкам генов *BfrA+Cytochrom-C-oxidase*. 1-13, 16-28 клинические штаммы *B.bronchiseptica*; 14, 29 – отрицательные контроли; 15, 30 – маркер молекулярного веса.

Таблица 27. Программа амплификации для детекции фрагмента гена *bfrZ* *B.bronchiseptica*.

№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Детекция	Количество повторов
1	1	95°C	5 мин		1
2	1	95°C	10 сек	*	40
	2	62°C	15 сек		
3	1	72°C	1 мин		1

рактеристики возбудителя в клиническом материале. В связи с некоторыми трудностями культивирования и определения КОЕ данная методика является исключительно своевременной. В основу количественной ПЦР были взяты праймеры к участку гена *BfrZ* ДНК *B.bronchiseptica*. В качестве флуоресцирующего агента для выявления экспоненциального роста количества ампликонов в ходе амплификации был использован интеркалирующий краситель SYBR Green I (флуоресценция по каналу Fam). Используя детектирующий амплификатор «ДТ-322» нами были получены результаты, представленные в таблице 28.

Зарубежными учёными также разработана полимеразно-цепная реакция, позволяющая идентифицировать *B.bronchiseptica* на основании обнаружения участков гена флагеллина. Участок данного гена размером 237 пар оснований оказался видоспецифичным для *B.bronchiseptica*, что обеспечило высокую специфичность показаний теста. Чувствительность реакции не превышает 10 бакт/пробу. Фирма HealthGene выпускает набор реагентов для проведения этого теста (N.H. Carbonetti, 1994; R.A. Cotter et al., 1998, 2000; R.E. Sacco et al., 2000).

Так как олигонуклеотиды BFRA имеют длину более 30 п.н. и при анализе возможного образования димеров в программе Gene Runner Version 3.05 наблюдается их неспецифическое взаимодействие с зондами, предлагаемыми системой BLAST, данную систему олигонуклеотидов нецелесообразно использовать при разработке ПЦР-диагностикумов с детекцией в режиме реального времени. Поэтому использовали разработанные системы олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов к фрагменту гена *bfrZ*, а также гена IS481 (*B.pertussis*) для проведения дифференцировки *B.bronchiseptica* от близкородственных видов.

Таблица 28. Количественный анализ амплификации с праймерами к участку гена *BfrZ*, проведенный на детектирующем амплификаторе «ДТ-322» в режиме «реального времени» с красителем SYBR Green I

Номер лунки	Идентификатор пробы	Ср, Fam	Ср, Hex	Концентрация, копий/мл
A1	Стандарт 1	18,2		5,5E+06
A2	Стандарт 1	18,6		5,5E+06
A3	Стандарт 2	21,9		550 000
A4	Стандарт 2	21,8		550 000
A5	Стандарт 3	28,4		5 500
A6	Стандарт 3	28,3		5 500
A7	<i>P.aeruginosa</i>			
A8	<i>B.parapertussis</i> 119			
B1	<i>E.coli</i>			
B2	<i>A.hydrophila</i>			
B3	<i>B.bronchiseptica</i> 1	13,4		1,4E+08
B4	<i>B.bronchiseptica</i> 7	14,0		9,1E+07
B5	<i>B.bronchiseptica</i> 214	17,5		9,2E+06
B6	<i>B.bronchiseptica</i> 22067	20,9		910 000
B7	<i>B.bronchiseptica</i> 8344	17,8		7,4E+06
B8	<i>B.bronchiseptica</i> 10608	19,8		2,0E+06
C1	<i>B.bronchiseptica</i> 12sm	13,1		1,8E+08
C2	<i>B.bronchiseptica</i> 1sm	13,2		1,6E+08
C3	<i>B.bronchiseptica</i> 1hr	27,2		13 900
C4	K-			
C5	<i>B.bronchiseptica</i> 106081	14,0		1,7E+08
C6	<i>B.bronchiseptica</i> 106082	20,4		1,3E+06
C7	<i>B.bronchiseptica</i> 8P	22,9		202 000
C8	<i>B.bronchiseptica</i> 8P1	16,0		3,7E+07
D1	<i>B.bronchiseptica</i> 18AQ	20,2		1,5E+06
D2	<i>B.bronchiseptica</i> 18	18,6		5,1E+06
D3	<i>B.bronchiseptica</i> 7SOL			
D4	<i>B.bronchiseptica</i> 22067a	15,6		4,9E+07
D5	<i>B.bronchiseptica</i> 83449	12,2		6,8E+08
D6	<i>B.bronchiseptica</i> 8344bj	28,7		2 310
D7	<i>B.bronchiseptica</i> 214kua	18,5		5,6E+06
D8	K-			

Со всеми системами олигонуклеотидов, фланкирующих ген *bfrZ*, а также флуоресцентными зондами для детекции каждой из них были проведены исследования ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени». Каждый из зондов имел включенную при синтезе флуоресцентную метку Fam и гаситель BHQ1.

Таблица 29. Результаты детекции фрагмента гена *bfrZ* при проведении ПЦР в режиме реального времени

Номер лунки	Идентификатор пробирики	BFRZ1		BFRZ2		BFRZ3		BFRZ	
		Ср, Fam	Результат	Ct, Fam	Результат	Ct, Fam	Результат	Ct, Fam	Результат
A1	BBR 105	29,8	+	30,3	+	32,9	+	26,3	+
A2	BBR 106	30,0	+	27,3	+	29,6	+	23,3	+
A3	BBR 108	32,7	+	24,8	+	32,2	+	23,8	+
A4	BBR 114	21,4	+	25,4	+	36,3	+	22,7	+
A5	BBR 115	30,0	+	32,4	+	36,9	+	23,3	+
A6	BBR 115a	29,8	+	28,2	+		-	23,2	+
A7	BBR 118	30,0	+	28,7	+	19,3	+	28,3	+
A8	BBR 122	29,9	+	28,7	+	24,8	+	21,3	+
A9	BBR 123	28,1	+	30,5	+	25,9	+	28,3	+
A10	BBR 124	19,1	+	27,5	+	31,5	+	28,7	+
A11	BBR 125	29,7	+	25,0	+	30,4	+	25,6	+
A12	BBR 126b	31,0	+	25,5	+	23,7	+	28,6	+
B1	BBR 126	29,2	+	32,6	+	32,7	+	31,8	+
B2	BBR 132	31,1	+	27,8	+	30,3	+	33,5	+
B3	BBR 134	19,1	+	28,6	+	34,5	+	32,5	+
B4	BBR 135	28,1	+	28,7	+	25,1	+	32,3	+
B5	BBR 136	20,6	+	30,2	+	25,0	+	31,8	+
B6	BBR 148	26,1	+	26,8	+	27,4	+	32,7	+
B7	BBR 149	32,1	+	25,1	+	24,5	+	31,4	+
B8	BBR 154	31,7	+	25,6	+	29,0	+	32,5	+
B9	BBR 155	17,8	+	32,7	+	31,2	+	33,3	+
B10	BBR 156	35,8	+	27,7	+	25,8	+	32,5	+
B11	BBR 170	24,5	+	28,6	+	31,4	+	31,9	+
B12	BBR 164	34,6	+	28,6	+	32,7	+	31,0	+
C1	BBR 168	32,6	+	30,4	+	34,7	+	24,6	+
C2	BBR 169	33,1	+	26,6	+	22,9	+	24,1	+
C3	BBR 170a	31,6	+	25,1	+	28,4	+	25,3	+
C4	BBR 175	32,4	+	25,5	+	35,8	+	24,2	+
C5	BBR 176	32,1	+	32,6	+	34,1	+	24,4	+
C6	BBR 177	31,7	+	28,1	+	24,8	+	24,3	+
C7	BBR 178	34,2	+	28,6	+	31,7	+	29,9	+
C8	BBR 179	37,2	+	28,6	+	27,6	+	30,7	+
C9	BBR 180	30,2	+	30,2	+	28,0	+	31,0	+
C10	BBR 184	31,6	+	27,6	+	22,3	+	30,5	+
C11	BBR 182	20,8	+	24,7	+	24,4	+	30,0	+
C12	BBR 183	28,2	+	25,7	+	27,9	+	30,7	+
D1	BBR 185	32,3	+	32,4	+	27,7	+	30,2	+
D2	BBR 188	33,0	+	27,7	+	24,4	+	30,8	+

D3	BBR 188a	37,1	+	29,3	+	31,6	+	25,5	+
D4	BBR 188b	31,6	+	27,4	+	34,3	+	26,0	+
D5	BBR 189	31,4	+	30,3	+	25,1	+	30,1	+
D6	BBR 192	26,7	+	27,7	+	35,4	+	30,7	+
D7	BBR 194	29,0	+	25,2	+	25,7	+	26,2	+
D8	BBR 215	31,3	+	30,5	+	28,4	+	26,9	+
D9	BBR 221	27,1	+		-	34,7	+	22,5	+
D10	BBR 225	28,6	+		-	22,0	+	25,4	+
D11	BBR 226	30,5	+	32,1	+	30,0	+	27,8	+
D12	BBR 228	30,0	+	30,4	+	36,8	+	23,9	+
E1	BBR 229	31,0	+		-	37,9	+	23,2	+
E2	BBR 230	31,6	+	32,1	+	31,9	+	23,5	+
E3	BBR 235	25,8	+	29,5	+	38,7	+	22,6	+
E4	BBR 236	30,5	+	27,7	+	39,0	+	23,3	+
E5	BBR 238	28,8	+	24,6	+	25,1	+	26,3	+
E6	BBR 240		-	32,9	+	22,3	+	25,2	+
E7	BBR 241	26,0	+	28,8	+	36,5	+	25,8	+
E8	BBR 245	28,5	+	26,3	+	39,8	+	32,9	+
E9	BBR 245c		-		-	18,0	+	30,4	+
E10	BBR 245b	22,5	+	24,7	+	23,5	+	23,3	+
E11	BBR 254		-		-	37,7	+	26,4	+
E12	BBR 258		-		-		-		-
F1	BP 12		-		-		-		-
F2	BP 14a		-		-		-		-
F3	BP 38		-		-		-		-
F4	BPP 2547		-		-		-		-
F5	BPP 109		-		-		-		-
F6	BPP 2/154		-		-		-		-
F7	BPP 2547a		-		-		-		-
F8	K-		-		-		-		-
F9	K+ (BBR 50)	23,1	+	19,2	+	25,4	+	20,7	+

В результате проведенных исследований среди 60 клинических изолятов *B.bronchiseptica*, принадлежность к данному виду которых была подтверждена бактериологическим методом, при использовании системы олигонуклеотидов BFRZ1 и специфичного к ней флуоресцентного зонда с меткой Fam положительная реакция наблюдалась у 57 штаммов (95%); при использовании системы BFRZ2 – также у 57 штаммов (95%); при использовании системы BFRZ3 – у 59 штаммов (98,3%); при использовании системы BFRZ – у 60 штаммов (100%). С близкими по генетической

структуре видами бордетелл (*B.pertussis* и *B.parapertussis*) при использовании всех праймерных систем неспецифичной положительной реакции не наблюдалось.

Далее были проведены эксперименты по оптимизации флуоресцентной метки специфичного зонда для наиболее эффективной системы BFRZ. Выбор системы BFRZ для ПЦР-диагностикума связан как со специфичностью в отношении клинических изолятов *B.bronchiseptica* (100%), так и с особенностью флуоресцентного зонда – большая, по сравнению с другими специфичными зондами, длина позволяет образовывать наибольшее число комплементарных связей на образующихся ампликонах, что повышает специфичность данной диагностической системы.

В проведенных исследованиях были использованы два флуоресцентных зонда, специфичных олигонуклеотидной системе BFRZ, имеющих одинаковую нуклеотидную последовательность, но отличающихся самой флуоресцентной меткой и её гасителем: 1) Fam-RTQ, 2) R6G-BHQ. Ввиду необходимости определения эффективности прохождения реакции с каждым из зондов был выбран мультиплексный формат ПЦР в реальном времени. Результаты представлены в таблице 30 в виде отношения величины циклов Ct Fam к Ct R6G и рис. 84 (а, б).

В результате максимальная разница Ct Fam/Ct Hex составила 0,4 цикла. При статистической обработке данных (при использовании программного обеспечения Microsoft® Office Excel 2003 (11.6560.6568) критерия Стьюдента) на основе сравнения связанных данных по каналу Fam и Hex ($p < 0,01$) был сделан вывод о равнозначной эффективности флуоресцентных меток Fam и R6G при использовании данного зонда для RT-PCR.

Данная праймерная система, фланкирующая специфический участок генома *B.bronchiseptica*, при использовании флуоресцентного зонда с флуоресцентной меткой как Fam, так и R6G позволяет проводить высокоэффективную ПЦР в режиме «реального времени» при идентификации специфического участка гена *bfrZ* *B.bronchiseptica*.

На основе вышеуказанной олигонуклеотидной системы был

Таблица 30. Ct Fam/Hex, среднее отклонение от медианы и разница циклов при RT-PCR проб с содержанием *B.bronchiseptica*

Лунка	Идентификатор	Ct Fam	Ct Hex	Ср отклонение от медианы Ct	Разница циклов
A1	BBR 136	20,7	20,7	0	0
A2	BBR 148	21,1	21	0,05	0,1
A3	BBR 149	20,8	20,7	0,05	0,1
A4	BBR 154	20,7	20,7	0	0
A5	BBR 155	20,9	20,7	0,1	0,2
A6	BBR 156	20,6	20,6	0	0
A7	BBR 170	20,8	20,6	0,1	0,2
A8	BBR 164	20,8	20,7	0,05	0,1
A9	BBR 168	20,5	20,6	0,05	-0,1
A10	BBR 169	20,5	20,5	0	0
A11	BBR 170	20,7	20,6	0,05	0,1
A12	BBR 175	20,9	20,7	0,1	0,2
B1	BBR 176	21,1	20,7	0,2	0,4
B2	BBR 177	21,5	21,4	0,05	0,1
B3	BBR 178	21,8	21,7	0,05	0,1
B4	BBR 179	21,6	21,5	0,05	0,1
B5	BBR 180	24	23,8	0,1	0,2
B6	BBR 184	26	26	0	0
B7	BBR 182	28,4	28,5	0,05	-0,1
B8	BBR 183	30,8	30,8	0	0
B9	BBR 185	32,8	32,6	0,1	0,2
B10	BBR 188	34,6	34,8	0,1	-0,2
B11	BBR 189	35,5	35,5	0	0
E1	BBR 192	21	20,7	0,15	0,3
E2	BBR 194	20,5	20,5	0	0
E3	BBR 215	20,9	20,9	0	0
E4	BBR 221	20,7	20,8	0,05	-0,1
E5	BBR 225	21	20,9	0,05	0,1
E6	BBR 226	20,8	20,6	0,1	0,2
E7	BBR 228	20,9	20,8	0,05	0,1
E8	BBR 229	20,8	20,7	0,05	0,1
E11	BBR 230	20,5	20,4	0,05	0,1
E12	BBR 235	20,8	20,7	0,05	0,1
F1	BBR 236	20,8	20,8	0	0
F2	BBR 238	22	21,9	0,05	0,1
F3	BBR 240	21,8	21,7	0,05	0,1
F4	BBR 241	21,9	21,8	0,05	0,1
F5	BBR 245	24,5	24,4	0,05	0,1
F6	BBR 136	26,9	26,7	0,1	0,2
F7	BBR 148	29,2	29,2	0	0
F8	BBR 149	31,6	31,5	0,05	0,1
F9	BBR 240	33,4	33,1	0,15	0,3
F10	BBR 245	34,7	34,5	0,1	0,2
F11	K-				
F12	K-				

составлен лабораторный образец ПЦР-системы для идентификации *B.bronchiseptica* для проведения 100 реакций. Данный образец прошел предварительное тестирование в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского на клинических изолятах возбудителя, выделенных из биологического материала от людей.

Для создания мультиплексной ПЦР-системы дифференцирования *B.bronchiseptica* от близкородственных видов *B.pertussis* и *B.parapertussis* нами рекомендуются следующие системы олигонуклеотидов: система BFRZ, флуоресцентный зонд с метками Fam/R6G высокоспецифичны в отношении *B.bronchiseptica*; система IS481 и флуоресцентный зонд с включенной при синтезе меткой Fam специфичны в отношении *B.pertussis*.

Мультиплексный формат ПЦР-диагностической системы для идентификации и дифференциации *B.bronchiseptica* от близкородственных видов содержал в своем составе все вышеперечисленные системы олигонуклеотидов в равных количествах со специфичными им флуоресцентными зондами таким образом, что дифференциация видов происходила на различных каналах детекции амплификатора в режиме «реального времени» в одной пробирке. Для оптимизации режима амплификации и детекции были использованы 9 штаммов *B.bronchiseptica*, 4 штамма *B.pertussis* и 3 штамма *B.parapertussis*. Результаты представлены в таблице 31 и на рис. 85 – 86.

В результате проведенных экспериментов нами было обнаружено, что олигонуклеотиды и флуоресцентный зонд с красителем R6G, фланкирующие фрагмент гена *bfrZ* являются видоспецифичными для *B.bronchiseptica*. Олигонуклеотиды и флуоресцентный зонд, фланкирующие специфический фрагмент гена транспозазы IS481 *B. pertussis*, не являются видоспецифичными; при их отжиге наблюдается экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала красителя Fam также для *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*. Исходя из этого использование гена транспозазы IS481 в качестве видоспецифичной мишени для *B. pertussis*, по нашему мнению, нецелесообразно, однако возможно использование данных олигонуклеотидов и флуо-

Таблица 31. Результаты идентификации и дифференциации *B.bronchiseptica* от близкородственных видов при проведении ПЦР в режиме «реального времени».

Лунка	Идентификатор	Cp Fam	Cp Hex
A1	<i>B.bronchiseptica</i> 123	21,5	20,4
A2	<i>B.bronchiseptica</i> 107	22,3	22
A3	<i>B.bronchiseptica</i> 342	34,3	29,9
A4	<i>B.bronchiseptica</i> 45	26,7	25,4
A5	<i>B.bronchiseptica</i> 156	25,9	23,2
A6	<i>B.bronchiseptica</i> 178	24,8	22,1
A8	<i>B.bronchiseptica</i> 112	25	24,8
A9	<i>B. pertussis</i> 24/08	29,2	
A10	<i>B. pertussis</i> 256/3	31,4	
A11	<i>B. pertussis</i> 124	27,5	
A12	<i>B. pertussis</i> 36/11	26,4	
B1	<i>B. paraptussis</i> 109	22,6	
B2	<i>B. paraptussis</i> 34	27,2	
B3	<i>B. paraptussis</i> 413	26,8	
F12	K-		

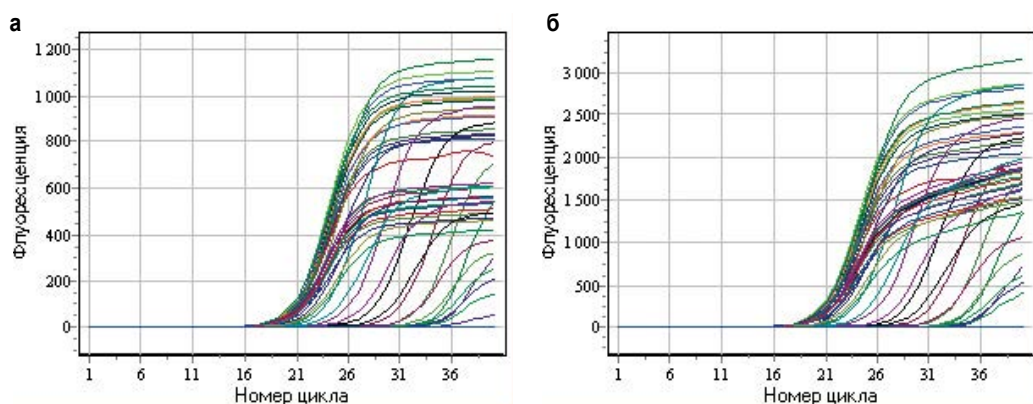


Рис.84. Зависимость флуоресценции канала FAM (а) и HEX (б) от номера цикла

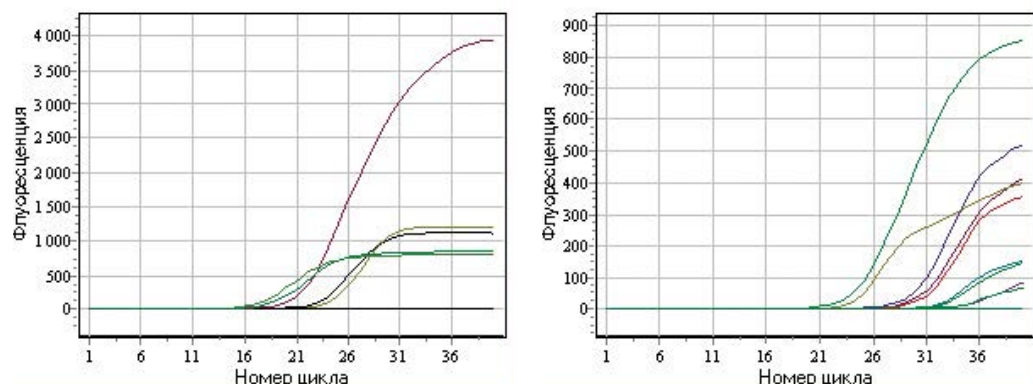


Рис. 85. Данные роста флуоресценции по каналу FAM в эксперименте с праймерной системой IS481.

Рис. 86. Данные роста флуоресценции по каналу HEX в эксперименте с праймерной системой BFRZ, специфичной в отношении *B.bronchiseptica*.

ресцентного зонда в качестве родоспецифической мишени при проведении ПЦР в режиме «реального времени» для идентификации *B.bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* без видовой дифференцировки.

В ходе испытаний эффективности использования разработанных праймерных систем и основных параметров проведения ПЦР при идентификации *B.bronchiseptica* были использованы различные концентрации компонентов реакционных смесей.

Немаловажной характеристикой любой ПЦР-системы является ее чувствительность. Используя вариации чувствительности, в настоящее время создают тест-системы для определения, например, уловно-патогенной флоры в клинически значимом количестве. Таким образом, если в пробе присутствуют представители условно-патогенной флоры в количестве меньше определенного порога, результат ПЦР-исследования будет отрицательным. На практике это позволяет избежать гипердиагностики.

Нами были приготовлены последовательные 10-ти кратные разведения из исходной бактериальной взвеси *B.bronchiseptica*, содержащей $5,5 \times 10^9$ клеток/мл. Исходная концентрация была определена по стандарту мутности и подсчету КОЕ. Результаты определения чувствительности представлены на рисунках 87-89.

Вследствие этого, чувствительность ПЦР-исследования с праймерами, использованными для идентификации ДНК *B.bronchiseptica*, составила:

- для участка гена BfrA генома *B.bronchiseptica* – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл;
- для участка гена BfrZ генома *B.bronchiseptica* – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл;
- для участка гена 16S rRNA генома *B. spp.* – $5,5 \times 10^2$ бактериальных клеток/мл;
- для участка гена Cytochrom-C-oxidase генома *B. complex (bronchiseptica+pertussis+parapertussis)* – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл.

При определении специфичности были использованы 45 клинических изолятов *B.bronchiseptica*, принадлежность к данному

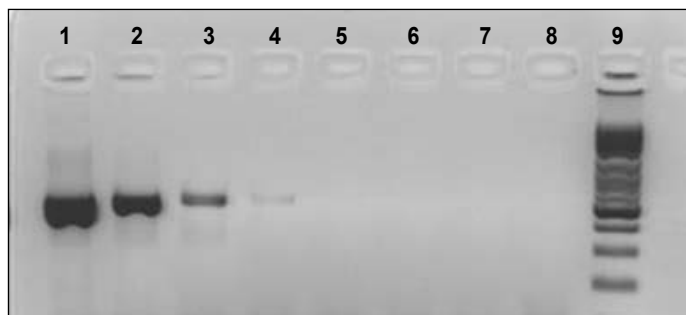


Рис. 87. Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР с праймерами к участку гена *VfrA* генома *B. bronchiseptica*. 1 – $5,5 \times 10^6$ бактериальных клеток/мл; 2 – $5,5 \times 10^5$ бактериальных клеток/мл; 3 – $5,5 \times 10^4$ бактериальных клеток/мл; 4 – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл; 5 – $5,5 \times 10^2$ бактериальных клеток/мл; 6 – $5,5 \times 10^1$ бактериальных клеток/мл; 7 – $5,5 \times 10^0$ бактериальных клеток/мл; 8 – отрицательный контроль; 9 – маркер молекулярного веса

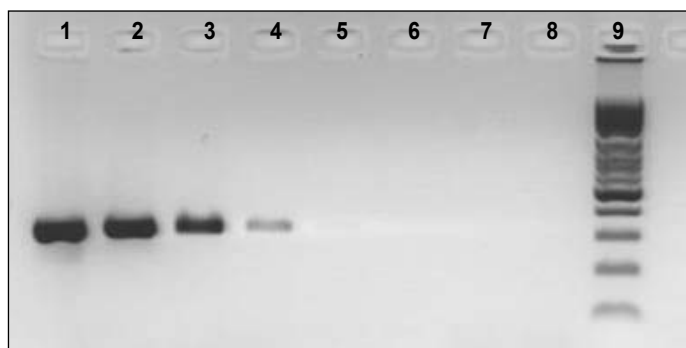


Рис. 88. Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР с праймерами к участку гена *VfrZ* генома *B. bronchiseptica*. 1 – $5,5 \times 10^6$ бактериальных клеток/мл; 2 – $5,5 \times 10^5$ бактериальных клеток/мл; 3 – $5,5 \times 10^4$ бактериальных клеток/мл; 4 – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл; 5 – $5,5 \times 10^2$ бактериальных клеток/мл; 6 – $5,5 \times 10^1$ бактериальных клеток/мл; 7 – $5,5 \times 10^0$ бактериальных клеток/мл; 8 – отрицательный контроль; 9 – маркер молекулярного веса

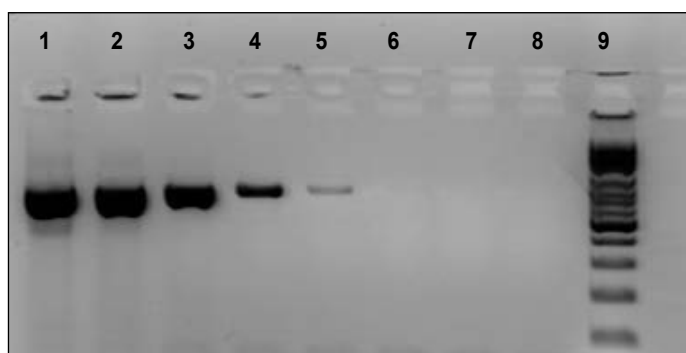


Рис. 89. Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР с праймерами к участку гена 16S rRNA генома *B. spp.* 1 – $5,5 \times 10^6$ бактериальных клеток/мл; 2 – $5,5 \times 10^5$ бактериальных клеток/мл; 3 – $5,5 \times 10^4$ бактериальных клеток/мл; 4 – $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл; 5 – $5,5 \times 10^2$ бактериальных клеток/мл; 6 – $5,5 \times 10^1$ бактериальных клеток/мл; 7 – $5,5 \times 10^0$ бактериальных клеток/мл; 8 – отрицательный контроль; 9 – маркер молекулярного веса

виду которых была подтверждена бактериологическим методом, а также штаммы гомологичных родов и видов бактерий, имеющих общие фенотипические признаки (биохимическую активность, антигенные характеристики и т.д.), близкородственных видов (*B.pertussis* и *B.parapertussis*) и возможных ассоциантов носо-глотки (*Pseudomonas* spp., *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *M. catarrhalis*, *N. flavescens*, *Corynebacterium* spp.).

В соответствии с методом, рекомендованным А.Петри и К.Сэбин были построены таблицы данных качественных признаков: положительный тест «+» и отрицательный тест «-» (табл. 32).

Оценка чувствительности: доля «+» штаммов, точно идентифицированных микробиологическим методом = $45/46 = 0,97$ (= 97%). Оценка специфичности: доля «-» штаммов, точно идентифицированных микробиологическим методом = $98/103 = 0,95$ (= 95%).

В результате проведенных испытаний была доказана высокая эффективность предлагаемых праймерных систем (*BFRZ*, *IS481*, *Putative membrane protein* и соответствующих им флуоресцентных зондов) при идентификации *B.bronchiseptica* и дифференциации данного возбудителя от близкородственных видов.

Таким образом, определена наиболее эффективная система олигонуклеотидов для детекции специфического фрагмента гена *bfrA* при идентификации *B.bronchiseptica* с использованием метода ПЦР среди разработанных и оптимизированных при реализации данного этапа проекта: *BFRA* (5'-3' CCTTCCAGCACCTGGCGGTACGAGTTGCTCC и CCCCGTGCCGGGGTGCCTGGACCTGGGCG), *BFRA1* (5'-3' TTCCTTCCCGCATCAACCG, CGGGATGAAGTTGGTGTCCA), *BFRA2* (5'-3' GTTCCTTCCCGCATCAACCG, GATGATGTTGATCACGCCGC), *BFRA3* (5'-3'

Таблица 32. Оценка чувствительности и специфичности ПЦР

	<i>B.bronchiseptica</i> обнаружена (кол-во штаммов)	<i>B.bronchiseptica</i> не обнаружена (кол-во штаммов)
Идентификация специфического участка гена <i>bfrZ</i> <i>B.bronchiseptica</i> с помощью ПЦР	45	103
Бактериологический метод	46	98

САACGCGTGAACGTGGATAC, GGGTTCGAGGCCATGCTG).

Определена наиболее эффективная система олигонуклеотидов для детекции специфического фрагмента гена *bfrZ* при идентификации *B. bronchiseptica* с использованием метода ПЦР среди разработанных и оптимизированных при реализации данного этапа проекта: BFRZ (5'-3' GGACGACCAGGATCACATCTTCC, GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG), BFRZ1 (5'-3' GATCACCGACTGGTGGGC, TATAGCGTGTAGTGCTGCGG), BFRZ2 (5'-3' GCGCCGCCGAAAGTTAAA, GATCAGTTCCTCCCGCCATT), BFRZ3 (5'-3' TACGCCTACCTCAAGACCGA, GGGCTGTCAAGGGACGG);

Обоснован выбор методики экстракции ДНК возбудителя на основании данных чистоты выделенной ДНК из биопроб с использованием расчета коэффициента спектрофотометрической экстинкции ОП260/ОП280, при котором образцы считались с содержанием достаточно чистой для использования в ПЦР ДНК при коэффициенте не менее 1,8, а также метода визуализации ДНК при проведении горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Разработаны параметры проведения ПЦР при идентификации *B. bronchiseptica* с предлагаемыми системами олигонуклеотидов и соответствующих им флуоресцентных зондов (BFRZ (5'-3' GGACGACCAGGATCACATCTTCC, GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG, AACAACATGCGCATCAGCAACCGGAACA-Hex/(Fam)), IS481 (5'-3' TTCC GCATGAATGTCTTCGC, CACCTAGTGGCGTCTGCAC, CAGCACAGGCT GTGGGTCCG-Fam),) при использовании моноплексного и мультиплексного формата.

Оптимизированы программы проведения ПЦР при идентификации *B. bronchiseptica*: для электрофоретической детекции – 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;

Разработанные системы праймеров и соответствующих им флуоресцентных зондов апробировали в ПЦР для идентифика-

ции клинических изолятов *B.bronchiseptica*, близкородственных видов *B.pertussis* и *B.parapertussis*, а также возможных ассоциантов возбудителя (*Pseudomonas* spp., *H.influenzae*, *H.haemolyticus*, *M.catarrhalis*, *N.flavescens*, *Corynebacterium* spp.).

ДЕТЕКЦИЯ БИОСЕНСОРАМИ – БАКТЕРИОФАГАМИ

В литературных источниках мы не нашли описания использования бордетеллёзных фагов с диагностической целью. Мы апробировали 2 метода детекции возбудителя с помощью бактериофагов: метод «стекающей капли» и реакцию нарастания титра фага.

Метод «стекающей капли» используется в качестве дополнительного компонента бактериологического исследования и заключается в следующем: на поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносят 3 - 4 капли бульонной 18 часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую культуру равномерно распределяют по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки Петри ставят в термостат для подслушивания на 15 - 20 минут. Затем поверхность чашки Петри делят на три сектора и лёгким прикосновением капли на два сектора наносят по штамму фагов *B.br. – 107 УГСХА* и *B.br. – 110 УГСХА*, на третий сектор в качестве контроля наносят стерильный МПБ, наклоняют чашку, чтобы капли стекли. После подслушивания в боксе в течение 15-20 минут чашки культивируют в термостате при 37°C 18 ч. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне культуры хотя бы одного из фагов указывает на принадлежность исследуемого штамма к бактериям *B.bronchiseptica*. Отрицательным считают результат при отсутствии лизиса на газоне культуры (рис.91).

При заражающей концентрации бактериальной культуры менее 10^4 м.к./мл выделение бактерий из клинических образцов не происходит ввиду их обильной обсемененности сопутствующей микрофлорой, следовательно, чувствительность бактериологического метода мала. Результаты проведенных опытов демон-

стрируют возможность идентификации *B.bronchiseptica* в малых концентрациях с помощью фагов V.br.–107 УГСХА и V.br.–110 УГСХА, при этом срок исследования сокращается до 66 ч при меньшем расходе лабораторной посуды, питательных сред, реактивов.

Для апробирования реакции нарастания титра фага мы сконструировали лабораторную модель биопрепарата, состоящего из смеси бактериофагов V.br. – 107 УГСХА и V.br. – 110 УГСХА в соотношении 1:1.

Для определения внешнего вида (цвета, наличия хлопьев, пленок, механических примесей) флаконы с биопрепаратом бордетеллезных фагов просматривали в проходящем свете. Биопрепарат не содержал посторонних примесей, фаголизат был прозрачным, светло-желтого цвета.

Для проверки на чистоту фаголизата биопрепарата, исследуемые фаги в объеме 0,2 мл засекали в пробирки с 5,0 мл мясопептонного бульона и затем высевали на среду Сабуро. 2,0 мл фаголизата разливали во флаконы с 50,0 мл мясопептонного бульона. Для каждого образца фаголизата использовали 2 пробирки и 2 флакона с каждой средой. Посевы на среде Сабуро культивировали в термостате в пределах температуры 20-24°C, посевы на других средах культивировали при температуре 37 °C. Через двое суток материал из жидких сред пересевали на мясопептонный агар, мясопептонный бульон, во флаконах и в пробирках. Первичные посевы выдерживали в термостате в течение 10 суток, а вторичные – 8 суток. На питательных средах с посевами рост бактериальной микрофлоры и грибов отсутствовал.

Литическая активности биопрепарата составил 10^{-7} по методу Аппельмана и $3,3 \times 10^8$ по Грациа (табл. 33). В результате исследований литической активности установлено, что использование бактериофагов *B.bronchiseptica* в смеси не влияет на показатели. При совместном использовании фагов отсутствует антагонистический эффект при их взаимодействии.

Хранение бактериофагов V.br. – 107 УГСХА и V.br. – 110 УГСХА в течение 6 месяцев не повлияло на потерю литической активности.

Таблица 33. Литическая активность сконструированного биопрепарата.

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана (степень разведения)	по методу Грациа (количество корпускул в 1 мл)
B.br. – 107 УГСХА	10^{-7}	$3,1 \times 10^8$
B.br. – 110 УГСХА	10^{-8}	$4,3 \times 10^9$
Биопрепарат (Смесь фагов 1:1)	10^{-7}	$3,3 \times 10^8$

Получив положительные результаты контроля, фаголизаты B.br. – 107 УГСХА и B.br. – 110 УГСХА разлили по 5,0 мл в стерильные флаконы и герметично закрыли. На флаконы наклеили этикетки с указанием наименования фага, литической активности бактериофагов, даты упаковки.

Для определения оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации и идентификации *B.bronchiseptica* в исследуемом субстрате мы определили количественный показатель реакции, т.е. уровень нарастания титра фага по сравнению с контролем, имеющий диагностическое значение и установили режимы постановки реакции, т.е. оптимальное время, обеспечивающее наиболее полное взаимодействие корпускул фага с бактериями.

В качестве исследуемого субстрата использовали мясопептонный бульон, контаминированный 18-часовыми индикаторными культурами *B.bronchiseptica* в разных заражающих концентрациях. В колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили по 1 мл индикаторных штаммов *B.bronchiseptica* в концентрации 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок: пробирка №1 являлась опытной, где присутствовал фаг в смеси с исследуемым материалом. Пробирка №2 являлась контролем на присутствие «свободного» фага, содержала только исследуемый материал. Пробирка №3 служила контролем титра индикаторного фага (рис. 92). Одновременно ставили контроль стерильности сред. Для работы использовали бактериофаги в рабочем разведении (10^4 фаговых корпускул в 1 мл).

Для определения количественного показателя реакции пробирки выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение

7 ч. После этого содержимое пробирок разводили мясопептонным бульоном (рН 7,4 – 7,6) для получения сосчитываемого числа негативных колоний, обрабатывали хлороформом для инактивации присутствующих бактерий (1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата) в течение 15 минут, затем исследовали методом агаровых слоев (рис. 84). Чашки Петри с посевами культивировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 ч. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний бактериофага, выросших на плотной питательной среде. Расчет нарастания титра фага производили путем сравнения числа колоний на чашке Петри №1 (опытная) и №3 (контроль титра фага). В случае обнаружения в исследуемом материале «свободного» фага (лизис индикаторной культуры в чашке Петри №2) реакция не учитывалась.

Оценку результатов исследований производили в соответствии с показателями, разработанными В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1962) (табл. 34).

Установлено, что результат реакции является положительным (увеличение количества корпускул фагов V.br.-107 УГСХА и V.br.-110 УГСХА более чем в 5 раз) в пробах при контаминации мясопептонного бульона бактериями *B.bronchiseptica* в концентрации 10^3 микробных клеток в 1 мл (табл. 35).

Под оптимальным временем реакции нарастания титра фага понимают время экспозиции материала с фагом, которое позволит обеспечить индикацию 10^3 микробных клеток в 1 мл.

Чтобы установить наилучший для наших целей временной параметр реакции, обеспечивающий оптимальное взаимодействие корпускул фага с бактериями, мы увеличивали время контакта исследуемого материала с бактериофагом до 7, 10, 16 и 24 ч, а также применяли метод предварительного подращивания исследуемого материала при температуре 37°C в течение 7, 16 и 24 ч. В качестве исследуемого материала использовали стерильный МПБ, контаминированный индикаторными штаммами *B.bronchiseptica*. Индикаторной культурой для фагов V.br.-107 УГСХА и V.br.-110 УГСХА является штамм *B.bronchiseptica* № 8433.

Таблица 34. Критерии оценки показателей РНФ

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем	Результат РНФ
Нарастание в 2,5 раза	Сомнительная оценка
Нарастание от 3 до 5 раз	Слабоположительная оценка
Нарастание свыше 5 раз	Положительная оценка
Нарастание более чем в 10 раз	Резко положительная оценка

В колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили по 1 мл индикаторных штаммов *B.bronchiseptica* в концентрации 10^1 – 10^5 м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок: в пробирку №1 вносили 1 мл фага и 9 мл исследуемого материала. В пробирку №2 добавляли 9 мл исследуемого материала и 1 мл стерильного МПБ. В пробирку №3 вносили 1 мл фага и 9 мл стерильного МПБ (рис. 120). Пробирка №1 являлась опытной, пробирка №2 служила контролем на присутствие «свободного» фага, пробирка №3 являлась контролем титра индикаторного фага. Использовали бактериофаг в рабочем разведении (10^4 фаговых корпускул в 1 мл). Одновременно ставили контроль стерильности сред. Чтобы выявить чувствительность РНФ в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом пробирки ставили в термостат при 37 °С на 7, 10, 16, 24 ч. Через определённый пери-

Таблица 35. Показатели диагностического значения РНФ фагов B.br.–107 УГСХА, B.br.–110 УГСХА

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка Петри № 1	Чашка Петри № 2	Чашка Петри № 3		
B.br.–107 УГСХА					
10 ¹	19	–	11	–	–
10 ²	19	–	14	–	–
10 ³	лизис	–	26	более 20	+
10 ⁴	лизис	–	30	более 20	+
10 ⁵	лизис	–	20	более 20	+
B.br.–110 УГСХА					
10 ¹	10	–	27	–	–
10 ²	37	–	8	4,5	±
10 ³	141	–	25	5,5	+
10 ⁴	лизис	–	10	более 20	+
10 ⁵	лизис	–	16	более 20	+

од инкубации пробирки вынимали из термостата, содержимое в количестве 0,25 мл вносили в пробирки со стерильным МПБ для получения сосчитываемого числа негативных колоний, обрабатывали хлороформом для инактивации присутствующих бактерий (1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата) в течение 15 минут, затем исследовали методом агаровых слоев. Чашки Петри с посевами культивировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 ч. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний бактериофага, выросших на плотной питательной среде (чашка Петри №1) и сравнивали с контролем (чашка Петри №3). Время, затраченное на проведение исследований, составило 19, 22, 28 и 36 ч, соответственно.

Опыты по изучению чувствительности реакции в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом показали, что РНФ с 7-ми часовой экспозицией материала с фагами V.br.–107 УГСХА и V.br.–110 УГСХА позволяет провести индикацию *B.bronchiseptica* в концентрации 10^4 м.к./мл за 19 ч (табл. 36).

Инкубация исследуемого материала с фагом в течение 16 ч повышает чувствительность РНФ до 10^2 м.к./мл, 24-ч экспозиция материала с фагами характеризуется одинаково высокой чувствительностью реакции (10^1 м.к./мл) с увеличением сроков исследования до 36 ч.

Для изучения чувствительности реакции нарастания титра фага с помощью метода «предварительного подращивания» колбы с МПБ, загрязненным бактериями *B.bronchiseptica* в концентрации 10^1 – 10^5 , ставили в термостат при температуре 37°C на 7, 16, 24 ч. После этого ставили реакцию по указанной схеме (рис. 94) со всеми разведениями культуры: содержимое колб разливали по 9 мл в пробирки №1 и №2. Пробирки №2 и №3 содержали 1 и 9 мл стерильного МПБ, соответственно. Индикаторный бактериофаг в рабочем разведении по 1 мл добавляли в пробирки №1 и №3. Пробирка №1 являлась опытной, пробирка №2 служила контролем на присутствие «свободного» фага, пробирка №3 являлась контролем титра индикаторного фага. Параллельно ставили контроль стерильности сред. Все пробирки выдерживали в

Таблица 36. Чувствительность РНФ в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагами B.br.–107 УГСХА и B.br.–110 УГСХА.

Взаимодействие исследуемого материала с фагом, ч	Метод Грация, ч	Концентрация бактерий B.br. о бнаруживаемая методом РНФ	Время исследований, ч
7	12	10^4	19
10	12	10^4	22
16	12	10^2	28
24	12	10^1	36

термостате в течение 7 ч, после чего содержимое пробирок разводили в МПБ для возможности подсчета негативных колоний бактериофага, обрабатывали хлороформом и высевали на чашки Петри методом агаровых слоев. Чашки Петри с посевами культивировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 ч.

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 ч позволяет обнаружить бактерии *B.bronchiseptica* в количестве 10^3 м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 ч (табл. 37).

Увеличение времени предварительного подрачивания исследуемого материала до 16 ч повышает чувствительность реакции до 10^1 м.к./мл. Время исследования составило 35 ч. Предварительное подрачивание материала в течение 24 ч не изменило чувствительности реакции по сравнению с подрачиванием в течение 16 ч. Бактериологическим методом бактерии обнаруживались в концентрации 10^4 м.к./мл, при этом на исследование затрачивалось более 96 ч.

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подрачиванием материала в течение 7 ч является более чувствительной по сравнению с РНФ без подрачивания и составляет 10^3 м.к./мл и 10^4 м.к./мл соответственно.

Таблица 37. Чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подрачивания исследуемого материала

Время предварительного подрачивания материала, ч	Взаимодействие исследуемого материала с фагом, ч	Метод Грация, ч	Концентрация бактерий B.br., обнаруживаемая методом РНФ	Время исследований, ч
7	7	12	10^3	26
16	7	12	10^1	35
24	7	12	10^1	43

Таким образом, наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с предварительным подращиванием в течение 7 ч, а также 7 часовой контакт исследуемого материала с фагом. Метод позволяет обнаружить бактерии *B.bronchiseptica* в количестве 10^3 м.к./мл за 26 ч. Данный режим рекомендован для дальнейших исследований.

Для определения возможности использования РНФ для индикации *B.bronchiseptica* от домашних животных исследовали образцы смывов с глотки животных.

Для определения минимальной диагностической концентрации возбудителя глоточные смывы искусственно контаминировали бактериями *B.bronchiseptica* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл. Для исследования использовали собак, у которых брали смыв физиологическим раствором с глотки, в объеме 5 мл. Вносили в колбы, содержащие по 50 мл МПБ, контаминировали и подращивали материал в термостате при температуре 37°C в течение 7 ч. Ставили реакцию по вышеуказанной схеме для каждого разведения культуры. Результаты приведены в таблице 38.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра фагов V.br.-107 УГСХА и V.br.-110 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации 10^3 микробных клеток бордетелл в 1 мл исследуемых смывов с глотки собак (табл. 38). Продолжительность исследования составила 26 ч.

Далее мы апробировали метод РНФ при исследовании животных приюта для бездомных кошек и собак. В результате постановки РНФ при исследовании 10 фаренгиальных смывов кошек и собак и 5 смывов с кормушек и поилок в 3 пробах обнаружены микроорганизмы *B.bronchiseptica* (таблица 39). Исследования были подтверждены бактериологическим методом.

Результаты исследований показали, что РНФ позволяет обнаружить бордетеллы в исследуемом материале за 26 ч.

Таким образом, разработаны схемы и методики ускоренной идентификации *B.bronchiseptica* в объектах ветеринарного надзора с использованием набора фагов, позволяющие обнаружить гомологичные бордетеллы с выделением чистой культуры за 66 ч и в течение 26 ч – без выделения чистой культуры.

Таблица 38. Результат РНФ с фагами B.br.–107 УГСХА, B.br.–110 УГСХА при исследовании смывов с глотки собак, искусственно контаминированных бактериями B.bronchiseptica

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Наращение титра, раз	Результат РНФ
	Чашка Петри № 1	Чашка Петри № 2	Чашка Петри № 3		
B.br.–107 УГСХА					
10 ¹	21	–	17	–	–
10 ²	30	–	21	–	–
10 ³	93	–	17	5	+
10 ⁴	129	–	15	8,5	+
10 ⁵	Лизис	–	16	более 20	+
Контроль	21	–	19	–	–
B.br.–110 УГСХА					
10 ¹	18	–	21	–	–
10 ²	35	–	21	–	–
10 ³	115	–	18	6	+
10 ⁴	232	–	20	11	+
10 ⁵	Лизис	–	19	более 20	+
Контроль	19	–	19	–	–

Таблица 39. РНФ при исследовании объектов внешней среды и животных на наличие бактерий B.bronchiseptica

Объекты исследования	Наращение титра, раз	Результат РНФ
СМЫВЫ С ГЛОТКИ СОБАК		
Проба № 1	более 20	+
Проба № 2	3	–
Проба № 3	–	–
Проба № 4	более 20	+
Проба № 5	–	–
СМЫВЫ С ГЛОТКИ КОШЕК		
Проба № 1	–	–
Проба № 2	–	–
Проба № 3	2	–
Проба № 4	8	+
Проба № 5	–	–
СМЫВЫ С ПОИЛОК И КОРМУШЕК		
Проба № 1	–	–
Проба № 2	–	–
Проба № 3	–	–
Проба № 4	–	–
Проба № 5	–	–

ТЕСТ-СИСТЕМА ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Тест-система индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica* (ТСИИ) включает бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты. Возможно как самостоятельное использование отдельных компонентов тест-системы, так и их сочетанное применение.

Бактериологическая детекция бактерий *B.bronchiseptica*

Цель исследования: выделение чистой культуры бактерий *B.bronchiseptica*.

Сконструированные биопрепараты: дифференциально-диагностическая среда (состав г/л: пептон ферментативный 20,0; сернокислое железо - 0,02 г/л, сернокислый магний - 0,4 г/л, хлорид натрия 4,5-6,5 г/л, крахмал 5,0 г/л, мочевины 5,0 г/л, лактоза - 0,7; бромтимоловый синий - 0,02; хлорид бария - 0,4); селективные добавки (цефазолин - 0,004 г/л, ампициллин - 0,0025 г/л, флуконазол, миконазол - 0,002 г/л. рН среды 7,0±0,2.

Методика: взятие глубоких мазков из глотки животных на 2 чашки Петри с дифференциально-диагностической средой с селективными компонентами и без них и культивирование 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. Колонии других микроорганизмов могут изменять цвет среды с зеленого на жёлтоватый. Колонии *B.bronchiseptica* могут быть полиморфны. Подозрительными являются росинчатые, 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 обнару-

жением мелких граммотрицательных коккобацилл, равномерно располагающиеся в мазке одиночно, по парам или короткими цепочками. По этим данным возможна постановка предварительного диагноза. 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.

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 МПА в течение 24-48 ч при 35-37°C, аэробность, способностью утилизировать цитраты и нитраты, отсутствие пигментообразования и желатиназы, наличие 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.

Иммунологическая детекция бактерий *B.bronchiseptica*

Цель исследования: обнаружение в исследуемом материале с помощью гипериммунной сыворотки специфических антигенов *B.bronchiseptica* (дополнительный компонент бактериологического исследования).

Сконструированные биопрпараты: антиген *B.bronchiseptica*, получаемый методом ультразвуковой дезинтеграцией (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 иммунная сыворотка, получаемая гипериммунизацией кроликов (предварительное внутримышечное введение смеси адъюванта Фрейнда с бордетеллёзным антигеном 1:1 в дозе 0,5 мл с последующим внутривенным введением антигена кроликам в дозах 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл с интервалом 3 дня и забором крови через 20 дней).

Методика: при помощи иммунопрепаратов проводят пластинчатую реакцию агглютинации на предметном стекле или реак-

цию диффузной преципитации. Максимальный срок проведения анализа в течение 1 часа.

Молекулярно-генетическая детекция бактерий *B.bronchiseptica*

Цель исследования: обнаружение ДНК бактерий *B.bronchiseptica* в биоматериале без выделения чистой культуры или как подтверждение бактериологического исследования.

Сконструированные биопрепараты: праймеры (Pr1-1 (5' ccttcagcacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' ccccgtagccggggtgcctggacctgggcg3') для гена BfrA ДНК *B.bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggacgaccaggatcacatcttc 3'), Pr3-2 (5' gctttcctggtagttggcgtagg 3') для гена BfrZ; Pr4-1 (5' gcattgctccatctgtgtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcg 3') для гена Cytochrom-C-oxidase и Pr5-1 (5' ctacgggggaaagcggggga 3'), Pr5-1 (5' gaccgtactccccaggcggt 3') для гена 16S rRNA), флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена bfrZ.

Методика: выделение нуклеиновых кислот из культур сорбентным способом, проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции с системами праймеров, 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.

Мультиплексный формат ПЦР позволяет проводить массовые исследования, удешевляет и ускоряет лабораторный процесс. ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» дает возможность провести количественную оценку содержания ДНК *B.bronchiseptica* в биоматериале от $2,3 \times 10^3$ до $6,8 \times 10^8$ копий ДНК/мл. ПЦР позволяет провести дифференциацию клинических изолятов *B.bronchiseptica* от близкородственных видов *B.pertussis* и *B.parapertussis*, а также возможных ассоциантов возбудителя.

Детекция бактерий *B.bronchiseptica* специфическими фагами

Цель исследования: обнаружение бактерий *B.bronchiseptica* реакцией нарастания титра фага (РНФ) без выделения чистой

культуры (самостоятельный метод) или подтверждение бактериологического исследования методом «стекающей капли» (дополнительный метод).

Материалы: фаговый биопрепарат ББР–117 УГСХА (технологические параметры: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *V.bronchiseptica* - 1:2, время инкубации при температуре 37°C - 7 ч, обработка хлороформом в пропорции 1:10 в течение 15 мин).

Методика: 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. По-

ложительная 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 концентрациях от 10^3 м.к. в 1 мл исследуемого биоматериала за 26 часов без выделения чистой культуры.

Методика 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 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.

Тест-система индикации и идентификации *B.bronchiseptica* представлена на рисунке 90.

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

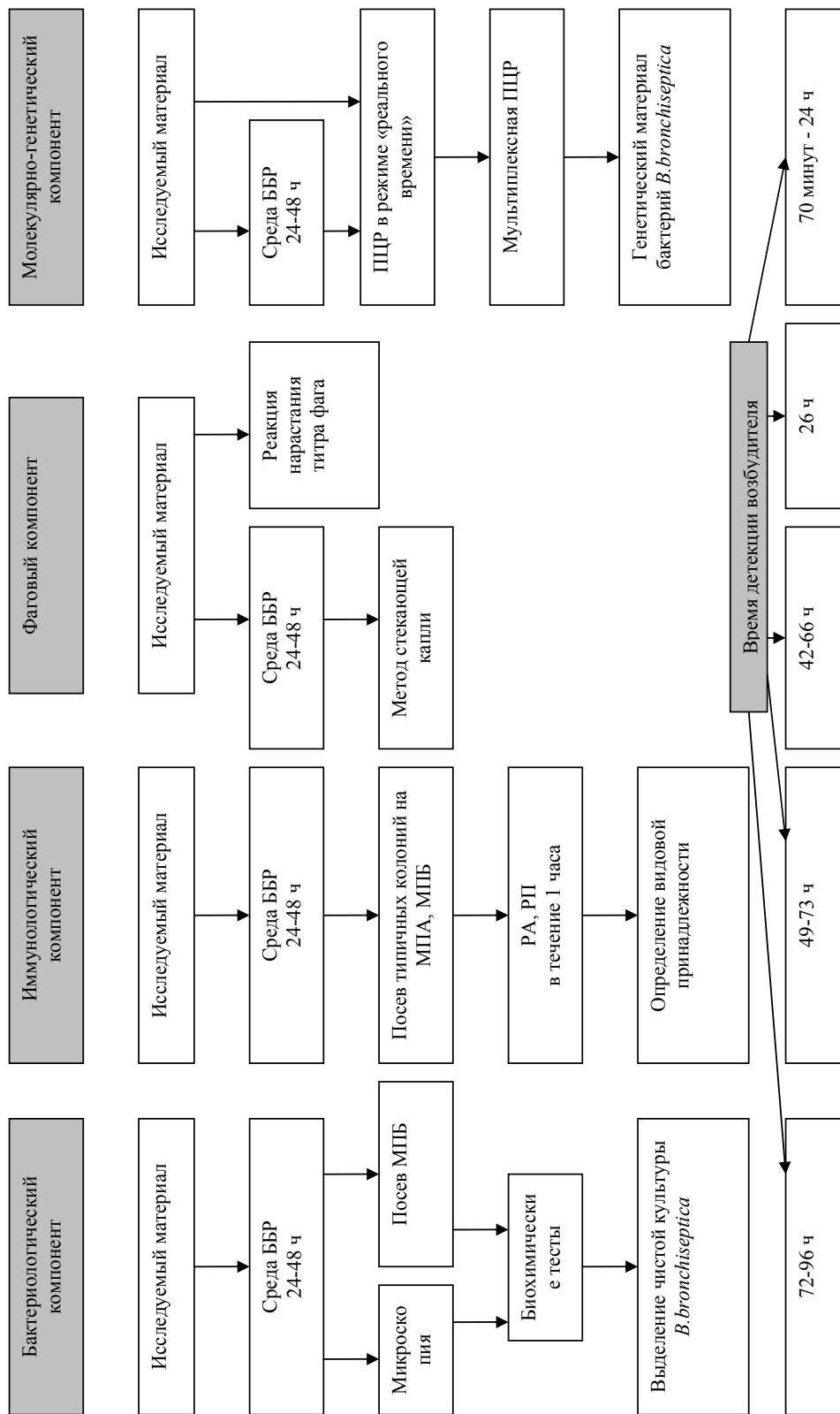
Бактериологический и молекулярно-генетический компоненты тест-системы являются относительно дорогостоящими, а иммунологический и фагоидентификационный - более экономичными.

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. По эпизоотическим показаниям массово обследуются животные питомников, приютов для бездомных животных, гостиниц для временной передержки питом-

цев, 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 РНФ или ПЦР в мультиплексном формате.

На носительство необходимо обследовать беременных самок, коллективно содержащихся разновозрастных животных, питомцев, приобретенных за рубежом.

Рис. 90. Тест-система индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время вспышки бордетеллёза домашних животных, вызываемого *B.bronchiseptica*, ежегодно регистрируются во многих странах мира. Эпизоотологическую ситуацию осложняют широкое бордетеллоносительство среди уличных животных, а также возможность межвидовой и зооантропонозной передачи (S.E. Turnquist, E. Ostlund, 1997; A.J. Speakman, 1997; R.M. Gaskell et al., 1997; J.G. Bergman et al., 1997; J.D. Hoskins, 1997, 1998; H. Jungnitz et al., 1998; S.H. Binns et al., 1999; M.S.Dworkin et al., 1999; M.M. Kattar et al., 2000; M.H. Yuk, 2000).

Сведений отечественных исследователей по распространению и ликвидации бордетеллёза домашних животных недостаточно.

Несогласованность данных различных авторов и отсутствие стандартных методик изучения биологических свойств, индикации и идентификации *B.bronchiseptica* подтолкнуло нас к проведению исследований в данном направлении.

В настоящее время бактериологический метод индикации и идентификации *B.bronchiseptica* занимает 5-7 суток, что связано с медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным обследованием животных с затяжным кашлем, нарушением правил забора и транспортировки материала, а также несовершенной рецептурой питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных компонентов.

В связи с этим одной из задач нашего исследования явилось усовершенствование бактериологического метода диагностики бордетеллезной инфекции путем детального изучения биологических свойств *B.bronchiseptica*, оценки различных питательных

сред, разработки селективной среды и качественного метода выделения возбудителя от животных.

При изучении биологических свойств *B.bronchiseptica* мы во многом подтвердили литературные данные, что бордетеллы имеют коккобацилярную форму, размер овоидных палочек 0,2-0,3 x 0,5-1,0 мкм, спор не образуют, грам-отрицательны, в мазках располагаются одиночно, парами, редко короткими цепочками. *B.bronchiseptica* подвижна за счет наличия перитрихально расположенных жгутиков. С помощью электронной микроскопии мы регистрировали наличие микрокапсулы у вирулентной фазы бордетелл. Другие исследователи также регистрировал капсулу электронной микроскопией, РИФ и методом Смита-Лоусона (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Бордетеллы строгие аэробы, способны культивироваться на обычных питательных средах (ГРМ агар и бульон, МПБ, МПА, и др.) и на элективных (бордетелагар, козеиновоугольный агар, менингококкагар, среда Сабуро, среда для иерсиний и псевдотуберкулеза, агар Гартоха, среда Эндо, триптиказосоевый бульон и агар).

По результатам наших исследований, биохимические особенности бордетелл достаточно однородны по тестам наборов ускоренного определения ФГУН НИИЭМ им Пастера: на сероводород – результат положительный; на лизин – положительный; на аргинин – положительный; на триптофандезаминазу и фенилаланиндезаминазу – отрицательный; на орнитиндекарбоксилазу – положительный; на уреазу – положительный; на каталазу – положительный; на арабинозу, маннозу, сахарозу, глюкозу, манит, лактозу, адонит – отрицательный, разжижение желатина – отрицательный.

Бордетеллы не обладают ДНКазной активностью, треть выделенных нами штаммов проявляли способность к β -гемолизу, четверть - вызывают дермонекротический эффект. Лабораторные и «полевые» образцы бактерий не нуждались в факторах роста V и X.

Полученные нами результаты идентичны в многократной повторности, но есть расхождения по некоторым позициям с известными литературными данными. В частности по требова-

тельности к наличию крови при культивировании и первичном выделении от больных животных и по способности бактерии образовывать сероводород.

По нашим данным, бактерии *B.bronchiseptica* не требовательны к условиям роста, к наличию крови при культивации, а также, все изученные штаммы способны образовывать сероводород из аминокислот и образовывать индол (тест положителен с 48-часовой культурой).

Нами разработан микрометод определения гемолитической активности бактерий, повышающий точность определения β -гемолиза и заключающийся в приготовлении разведения свежей крови или эритроцитарной массы в стерильном физиологическом растворе, с таким расчетом, чтобы полученный раствор содержал в 1 мл не более 2×10^4 эритроцитов, нанесении пипеткой данной эритроцитарной взвеси на предварительно обезжиренное чистое покровное стекло, внесении бактериологической петлей 1-2 суточную агаровую культуру штаммов *B.bronchiseptica* в каплю эритроцитарной взвеси, приготовлении препарата по типу «висячая капля» с дальнейшим просмотром под увеличением $\times 100 \times 15$ не менее 5-ти полей зрения в течение 20-30 минут и учета результатов. Положительным результатом на наличие гемолитической активности считать адгезию бактериальных клеток на поверхности эритроцитов и обесцвечивание последних в сравнении с контролем.

Разработанный нами метод определения гемолитической активности бордетелл позволяет сократить срок исследования до 30 минут по сравнению с 48 ч при использовании общепринятой в микробиологии методики, даже для штаммов обладающих слабым β -гемолизом.

Анализ литературы показывает противоречивые данные по устойчивости бордетелл во внешней среде. По данным D.A. Bemis (1986) *B.bronchiseptica* вне организма чувствительных животных и человека не проявляет высокой устойчивости к факторам внешней среды и быстро разрушается вне дыхательного тракта или вне фагоцитов, при ультрафиолетовом облучении, при воздействии вы-

сокой температуры, снижении уровня pH, воздействии моющих средств или обычных дезинфектантов. По данным других исследователей во влажных, бедных необходимыми для бактерии питательными веществами субстратах (например, в стоячей воде или фосфатно-буферном растворе) агент сохраняет жизнеспособность на протяжении минимум 6-ти месяцев. В зарубежных источниках есть сообщения об установленном факте роста *B.bronchiseptica* в соленой воде без добавления каких-либо питательных веществ (J.F. Porter, 1991, 1993; S.L. Brockmeier, 1999).

По нашим данным, бактерии *B.bronchiseptica* культивируется при температуре 35-37°C в диапазоне pH от 4 до 8.

В зарубежных литературных источниках сведения о чувствительности бордетелл к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам разнятся, что, по-видимому, связано с различными методиками исследований и многообразием штаммов *B.bronchiseptica*. Данные исследований одной группы авторов показывают, что изоляты *B.bronchiseptica* in vitro устойчивы к веществам пенициллинового ряда и сульфаниламидам (P. Roudebush, 1981; D.C. Hirsch, 1986; B.F. Woolfrey, 1991, A.C. Graham, 1982), другие ученые регистрируют среднюю или высокую чувствительность к ним (D.A. Bemis et al., 1977; R.J.Fass, 1980; R.J. Yancey, 1987; Hannan, 1999). (A.J. Speakman et al., 1997).

Наряду с этим, большинство исследователей отметили высокую чувствительность бордетелл к аминогликозидам, полимиксинам, тетрациклину, среднюю – к амоксициллину, эритромицину и резистентность к нитрофуранам, стрептомицину и ко многим препаратам цефалоспоринового ряда (D.A. Bemis et al., 1977; R.J.Fass, 1980; P. Roudebush, 1981; A.C. Graham, 1982; D.C. Hirsch, 1986; R.J. Yancey, 1987; B.F. Woolfrey, 1991; A.J. Speakman et al., 1997; P.C.T. Hannan, 1999).

Нами зарегистрирован высокий уровень устойчивости бордетелл к фузидинам, противогрибковым препаратам и антибиотикам цефалоспоринового ряда.

Анализ полученных результатов показывает, что штаммы *B.bronchiseptica* выдерживают высокие концентрации хлорида

бария и мочевины, которые можно использовать в качестве селективных компонентов. Так на качество роста изучаемых штаммов бордетелл не влияют концентрации мочевины в субстрате в количестве 10 г/дм³ и хлорида бария – 10 г/дм³. Мочевина, как и хлорид бария полностью подавляет рост бордетелл в количестве 100 г/дм³ бульона.

Анализ полученных результатов по изучению предельных концентраций индикаторов и красителей в субстрате для *B.bronchiseptica* показывает, что штаммы *B.bronchiseptica* выдерживают высокие концентрации индикаторов и красителей, которые можно использовать в качестве селективных компонентов и индикаторов рН сред. Так феноловый красный в количестве не более 1 г/дм³; бромтимоловый синий в количестве не более 10 г/дм³; метиловый оранжевый 0,1 г/дм³; фуксин кислый не более 0,1 г/дм³; водный голубой не более 10 г/дм³; бриллиантовый зеленый не более 0,1 г/дм³; конго красный – 100 г/дм³; сафранина не более 0,1 г/дм³; генциан виолет не более 1 г/дм³; мурексид не более 10 г/дм³.

Нами установлено, что *B.bronchiseptica* возможно дифференцировать от бактерий рода *Alcaligenes* по уреазной активности. От бактерий рода *Haemophilus* – по ферментации углеводов (*Haemophilus* ферментирующие микроорганизмы), подвижности (*Haemophilus* неподвижны), по отношению к кислороду (*Haemophilus* факультативные анаэробы). От бруцелл и в частности *B.canis* 82, *B.bronchiseptica* можно отличить по способности ферментировать глюкозу и подвижности. От энтеробактерий *B.bronchiseptica* отличает – наличие цитохромоксидазы, отсутствие способности ферментировать сахара и многоатомные спирты, отношение к кислороду.

На сегодняшний день, предлагаемые промышленностью селективные среды достаточно дорогие, а культивирование на них занимает длительное время (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Нами разработана селективно-диагностическая среда для *B.bronchiseptica* УГСХА ВВР 57, упрощающая выделение и идентификацию бактерий данного вида. Разработана схема выделе-

ния бактерий вида *B.bronchiseptica* состоящая в посеве материала на поверхность селективно-диагностической среды, оценки роста и изменения цвета среды и колоний спустя 48 часов инкубации при 37°C, отбора не менее 3-х характерных колоний в мясопептонный бульон и культивирование в течении 24 часов при 37°C. Приготовление мазков и окрашивание по Граму и по Ольту. Посев на скошенный мясопептонный агар штрихом для наращивания бактериальной массы, используемой в дальнейшем для проведения дополнительных тестов на наличие ферментов оксидазы, каталазы, нитритредуктазы, определения способности утилизировать цитрат.

Анализируя литературные данные, можно сделать вывод, что разработанные в настоящее время серологические методы лабораторной диагностики бордетеллёза недостаточно специфичны, а применение иммунно-ферментного анализа ограничено особыми условиями воспроизведения, когда цельные бактериальные клетки должны иметь особую чистоту антигенных компонентов, их специфичность и афинность (Б.Ф. Шуляк, 2003).

Для повышения специфичности серологических методов необходимо первоначально провести иммунохимические исследования.

Иммунохимические методы позволяют подробно изучить серологическую характеристику бордетелл, выявить родо- и видоспецифические антигены. Ряд авторов в своих работах описывали антигены, которые были изолированы из бактериальных клеток, изучены и сопоставлены между различными представителями рода *Bordetella* в иммунохимических реакциях. Большинство исследователей описывают эксперименты, касающиеся антигенных различий трех представителей рода *Bordetella*: *B.pertussis*, *B.parapertussis* и *B.bronchiseptica*.

В реакциях агглютинации и преципитации были исследованы термолабильные токсины (D.G. Evans, H.B. Maitland. 1937; Andersen E.K., 1953; G. Eldering, 1962), капсульные агглютиногены (E.W. Flosdorf, A.C. Kimball, 1940), эндотоксины (W.E. Ehrich et al., 1942), гемагглютинин (S. Fisher, 1950), гистамин-чувствительный

фактор (I.A. Parfentjev, 1955), липополисахарид (A.P. MacLennan, 1960).

В реакции двойной радиальной иммунодиффузии по Ouchterlony различными авторами были идентифицированы от 12 до 14 антигенов представителей рода *Bordetella* (G. Eldering, C. Hornbeck, J. Baker, 1957; J. Munoz, 1959, 1963). Для изучения антигенных комплексов описаны технологии проведения иммуноблотинга (S.C. Redd et al., 1988), диффузной преципитации в агаровом геле и иммуноэлектрофореза (R. Ross et al., 1969; N. Holby et al., 1977).

Несогласованность данных различных авторов и отсутствие стандартных методик изучения антигенного состава *B.bronchiseptica* подтолкнуло нас к проведению исследований по определению наиболее эффективного иммунохимического метода, позволяющего выявлять наибольшее количество специфичных для возбудителя антигенов.

Вследствие этого мы провели сравнительный анализ использования трех различных иммунохимических метода, отличающихся друг от друга технологическими приемами: двойной радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony (1948), встречного электрофореза, по G. Bedarida et al. (1969) и иммуноэлектрофореза по методу Р. Grabar и С. Williams, описанного Х. Фримель (1979).

Предлагаемая нами схема анализа антигенной структуры *B.bronchiseptica* включает:

- получение антигенов с помощью ультразвука с режимом дезинтеграции - частота 23 кГц, амплитуда колебаний 5 микрон, в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом;
- гипериммунизацию лабораторных животных для получения иммунных сывороток;
- реакцию иммуноэлектрофореза по методу Р. Grabar и С. Williams, описанному Х. Фримель (1979).

Метод иммуноэлектрофореза позволяет выявить 8 антигенов, причем 3 из них являются общими для грамотрицательных бак-

терий других видов, а 5 являются видоспецифичными для возбудителя бордетеллеза.

Разработан биопрепарат для антигенной идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе УЗ-антигенного препарата и гипериммунной сыворотки необходимой для идентификации бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* методом пластинчатой реакции агглютинации.

Метод ПЦР, применительно к бордетеллам был впервые описан в 1990 году в исследованиях Е.М. Glare et al.

В настоящее проблемными остаются вопросы, связанные с выбором участка генома возбудителя в качестве мишени, методики выделения нуклеиновой кислоты, а также методологии системы детекции амплифицированного фрагмента.

Относительно выбора мишеней для амплификации участка генома различные исследователи чаще используют консервативные участки генов, ответственных за экспрессию факторов патогенности бордетелл: промоторную область коклюшного токсина (Е. Grimprel et al., 1993; Е. Reizenstein et al., 1993; N.H. Birkebaek et al., 1994), участки ДНК гена порина (Z.M. Li. et al., 1994; N. Schnitzler et al., 1997), консервативные области гена аденилатциклазы-гемолизина (Е. Douglas et al., 1993). Данные тест-системы отличались высокой чувствительностью (80-100%) и низкой видоспецифичностью (F.-M.C. Muller, J.E.Hoppe, C.-H. Wirsing von Konig, 1997).

Важной особенностью наших исследований было то, что адаптированная ПЦР для выявления *B.bronchiseptica* по чувствительности не должна уступать диагностическим системам, разработанным зарубежными исследователями для идентификации *B. pertussis* и *B. parapertussis*.

Определив все этапы проведения полимеразной цепной реакции, методы и характеристики последующей детекции, на основании данных баз нуклеотидных последовательностей были подобраны потенциальные гены-мишени (BfrA и BfrZ) для выявления *B.bronchiseptica*. Для них были определены праймеры и оптимизирован протокол исследования.

Проанализировав литературные данные, основанные на исследованиях генома рода *Bordetella*, видов *B. pertussis* и *B. parapertussis*, которые являются ответвлениями от *B. bronchiseptica*, мы поставили задачу разработать систему, основанную на полимеразной цепной реакции, которая могла бы выявить участок гена, общего для этих трех представителей рода. Таким общим геном, не встречающимся у других видов *Bordetella*, является ген, кодирующий фермент цитохром-С-оксидазу (Cytochrom-C-oxidase). Аналогично, был выбран общий для рода *Bordetella* ген. Нами была оптимизирована методика проведения полимеразной цепной реакции с системами праймеров к участкам генов *BfrA* и *BfrZ* *B. bronchiseptica*, гену Cytochrom-C-oxidase трех представителей рода *Bordetella* (*B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis*) и общеродовому гену 16S rRNA для *Bordetella* spp.

После подбора и синтеза праймеров были подобраны условия и оптимизирован протокол проведения полимеразной реакции при идентификации *B. bronchiseptica*: для электрофоретической детекции – 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.

Нами создана универсальная программа амплификации для проведения ПЦР-исследования с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени чувствительности полимеразной цепной реакции для выявления *B. bronchiseptica* по сравнению с другими методами, что позволяет рекомендовать ее в качестве точного диагностического метода исследования.

В 2004 году S.K. Poddar использовал интеркалирующий краситель SYBR Green I для детекции ДНК возбудителя бордетеллеза при проведении полимеразной цепной реакции с регистрацией в режиме «реального времени».

Нами предложена методика проведения ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» с интеркалирующим красителем SYBR Green I для количественного определения содержания ДНК

B.bronchiseptica в биологическом материале. Определены абсолютные концентрации ДНК *B.bronchiseptica* на примере участка гена BfrZ с применением интеркалирующего красителя SYBR Green I и стандартных образцов ДНК культур *B.bronchiseptica* с известными значениями КОЕ/мл. В экспериментах данной работы они составили от $2,3 \times 10^3$ до $6,8 \times 10^8$ копий ДНК/мл для участка гена BfrZ.

В ходе исследований различных штаммов представителей 4 видов бордетелл (*B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.holmesii* и *B.bronchiseptica*) голландскими учеными было обнаружено, что IS481, общепринятые для обнаружения возбудителя коклюша, также встречаются в составе геномной ДНК *B.holmesii* и *B.bronchiseptica*; IS1001, применяемые для выявления ДНК возбудителя паракоклюша, также входит в состав ДНК некоторых штаммов *B.bronchiseptica*. Исследователи разработали новую систему праймеров для мишени IS1002, которую предложено использовать для повышения специфичности тестов совместно с системами для IS481 и IS1001 (L. Roorda et al., 2011).

Рядом ученых для видовой дифференцировки трех представителей рода *Bordetella* были использованы две системы праймеров BSPP и BB, мишенью одной из которых служила последовательность гена флагеллина, отличающегося по нуклеотидному составу у этих возбудителей, а другая система содержала праймеры к консервативному участку генома *B.bronchiseptica* (D. Hozbor, F. Fouque, N. Guiso, 1999).

В 2010 году была апробирована мультиплексная ПЦР «в одной пробирке». В качестве мишеней были использованы промотор коклюшного токсина и вставочный элемент IS481 генома *B.pertussis*, а также вставочный элемент IS1001 ДНК *B.parapertussis* (Y.Xu, Q.Нou, 2010).

Исходя из этого видно, что у исследователей разных стран, относительно возбудителя бордетеллеза нет стандартизированных праймерных систем, способных однозначно идентифицировать виды внутри рода *Bordetella*, так как мобилен не только их генетический материал, но и различные варианты вставочных элементов, например IS481 или IS1001.

Поэтому нашей задачей был подбор праймерных систем для специфической идентификации возбудителя бордетеллёза, а также адаптация их для проведения мультиплексной ПЦР с одновременным выявлением фрагментов ДНК и фрагмента специфического для представителей рода.

Для повышения специфичности мы разработали мультиплексную ПЦР-систему, которая позволяет одновременно выявлять несколько фрагментов ДНК *B.bronchiseptica*. Предложенная методика проведения ПЦР в мультиплексном формате выявляет 3 специфических фрагмента ДНК *B.bronchiseptica*, один из которых является общим для представителей рода *Bordetella*.

В результате проведенных экспериментов была доказана высокая эффективность метода полимеразной цепной реакции при идентификации *B.bronchiseptica*.

При статистических расчетах была определена чувствительность и специфичность метода ПЦР при идентификации *B.bronchiseptica* в сравнении с микробиологическим методом. Оценка чувствительности (доля «+» штаммов, точно идентифицированных микробиологическим методом) составила 97%, оценка специфичности (доля «-» штаммов, точно идентифицированных микробиологическим методом) - 95%.

Отечественными и зарубежными исследовательскими коллективами были выделены и описаны бактериофаги бактерий *B.bronchiseptica* - 214, BPP-1, BMP-1 и BIP-1; *B.pertussis* - фТ, фК, 134, 41405; *B.parapertussis* 66₂₋₂; *B.avium* B1 и B2 (И.А. Лапаева и др., 1982; Каратаев Г.И., 2004; Shelton C.B. et al., 2000; Liu M. et.al., 2004). Все баркетиофаги *B.bronchiseptica* имели одинаковую по строению икосаэдрическую головку и хвостовой отросток с базальной пластинкой и нитями. Размер генома составил 42,6 т.п.н. Однако изученные фаги обладали разным тропизмом к клеткам *B.bronchiseptica*, находящимся в разных фазовых состояниях (M. Liu et.al., 2004).

Результаты, полученные Г.И. Каратаевым (2008) показывают, что бактерии двух представителей рода *Bordetella* - *B.bronchiseptica* и *B.pertussis* полилизогенны и содержат два профага. Геномы од-

ного из профагов обнаружены в хромосомах клеток-хозяев. Геномы второго профага присутствуют только в части популяции лизогенных бактерий в автономном состоянии и утрачиваются в процессе культивирования *in vitro* большей частью бактериальной популяции. Ко второй группе относятся и бактериофаги BPP-1, BMP-1 и BIP-1 *B.bronchiseptica*, имеющие различный тропизм к бактериям, находящимся в разных фазовых состояниях (M. Liu et.al., 2004).

Остаются открытыми вопросы изучения взаимодействия фаг – бактерия – макроорганизм. Возможно, бактериофаги участвуют в формировании вирулентных бактерий.

Анализ литературных источников показал отсутствие данных по применению методов фагодиагностики бордетеллёза домашних животных.

В связи с тем, что изучение бактериофагов может оказаться полезным для понимания механизмов изменчивости и эволюционной адаптации бактерий, а также для разработки методов индикации и идентификации бордетелл задачами нашего научного исследования явились разработка схемы выделения фагов *B.bronchiseptica*, изучение их биологических свойств с селекцией для конструирования диагностического биопрепарата.

Согласно научной информации, изложенной в литературных источниках, бактериофаги можно выделить из тех субстратов, где находятся бактерии – их хозяева. Но наиболее специфичными являются бактериофаги, выделенные из культур микроорганизмов, присутствующие в них в виде профагов.

Мы не нашли описания стандартизированной методики выделения бактериофагов *B.bronchiseptica*, вследствие этого разработали собственную схему, включающую 3-х дневное облучение бактерий *B.bronchiseptica* ультрафиолетовыми лучами с получением профагов. Процесс облучения УФЛ бактерий проводился в стерильном боксе при отсутствии освещения для исключения возможности фотореактивации профага в бактериальную клетку.

В результате проведенных исследований нами было выделено 8 изолятов бактериофагов *B.bronchiseptica*. На основании из-

ученных биологических свойств выделенных фагов (морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к воздействию хлороформом) были отобраны два штамма бактериофагов V.br.-110 УГСХА и V.br.-107 УГСХА, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой 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. Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к V.Bronchiseptica, проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в течение 30 минут и выдерживали 30 минутное нагревание при 60°С.

Выделенные изоляты фагов формировали прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными четкими краями, диаметром от 1,5 до 4,0 мм, с вторичным ростом и зоной лизиса, а также округлые колонии без вторичного роста диаметром с зоной лизиса от 0,5 до 2,0 мм.

Далее были разработаны оптимальные технологические параметры для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов V.bronchiseptica составляет 1:2, время инкубации при температуре 37°С - 7 ч. Для инактивации жизнеспособных бактерий в фаголизате проводится обработка хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут.

Нами разработана и предложена схема ускоренной идентификации V.bronchiseptica с помощью индикаторных фагов V.br. - 110 УГСХА и V.br. - 107 УГСХА. Чувствительность культуры к указанным индикаторным фагам (феномен лизиса) служит основанием для дифференциации исследуемой культуры как вида V.bronchiseptica. При этом срок исследования по сравнению с бактериологическим методом сокращается до 66 ч при меньшем расходе сред, реактивов и лабораторной посуды.

Реакция нарастания титра фага позволяет за относительно короткий срок обнаружить возбудителя в различных субстратах в

присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры, что имеет важное значение при исследовании носоглоточных выделений животных.

Эффективность применения реакции нарастания титра фага для индикации возбудителей во внешней среде подтверждают многие исследователи (Е.А. Бульканова, 2006; С.Н. Золотухин, 2007; Н.П. Катмакова, 2010).

Для выявления оптимальных условий РНФ мы определили количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение; и установили режимы постановки РНФ (оптимальное время, обеспечивающее наиболее полное взаимодействие корпускул фага с бактериями).

Оптимальным, по нашим данным, является режим РНФ при 7-часовой экспозиции исследуемого материала с фагами, когда удается провести индикацию *B. bronchiseptica* в количестве 10^3 микробных клеток в 1 мл исследуемого субстрата. Время исследования при этом составляет 19 часов.

РНФ результативно апробировали при индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды, а также из проб биоматериала клинических образцов от животных.

В результате проведенных исследований предложен диагностический биопрепарат «*B.br. – 117 УГСХА*», изготовленный на основе бордетеллёзных фагов *B.br. – 110 УГСХА* и *B.br. – 107 УГСХА* для индикации и идентификации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды и от предположительно инфицированных животных.

Реакция нарастания титра фага по технике выполнения является простым и удобным, чувствительным и специфическим методом диагностики, позволяющим в течение 26 ч обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры.

На основании проведенных нами исследований мы разработали тест-систему индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* (ТСИИ), включающую бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компо-

ненты. Возможно как самостоятельное использование отдельных компонентов тест-системы, так и их сочетанное применение.

Использование ТСИИ рекомендуется для подтверждения клинического диагноза, выявления атипичных форм заболевания, обнаружения бактерионосителей в окружении больных животных, а также для установления ретроспективного диагноза.

Таким образом, разработанные нами методические подходы с применением тест-системы индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica* обеспечивают качественную детекцию инфекционного агента в биологическом материале или во внешней среде.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абдусаматов М.А. Сравнительное изучение реакции нарастания титра фага и бактериологического метода при диагностике брюшного тифа у больных и рековалесцентов / М.А. Абдусаматов // ЖМЭИ. – 1960. – № 1. – С. 23-27.
2. Аврех В.В. О понятии «Серологический тип бактериофагов» / В.В. Аврех // 13 Всесоюзный съезд гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов и инфекционистов. – Ленинград, 1959. – Т.2. – С. 537-540.
3. Аврех В.В. О применении бактериофагов в диагностике сальмонеллезов / В.В. Аврех // ЖМЭИ. – 1954. – № 7. – С. 93-96.
4. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
5. Адельсон Л.И. Современное состояние проблемы теории бактериофага и его практическое применение / Л.И. Адельсон, В.Д. Гуторова, Г.Г. Ключарева // Тез. докл. юбилейной научной сессии Ленинградского сан.-гиг. мед. ун-та. – Л., 1958. – С. 123-131.
6. Арский В.Г. Применение реакции нарастания титра фага для диагностики хронической дизентерии / В.Г. Арский, З.З. Ахметов, А.В. Ясенский // Здравсохранение Таджикистана. – 1961. – № 2. – С. 5-11.
7. Архангельский И.И. Фаготипирование патогенных стафилококков, выделенных из молока коров / И.И. Архангельский, Б.А. Степанов // Ветеринария. – 1966. – № 3. – С. 27.
8. Афонин Э.А. Разработка бактериологического метода выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* / Э.А. Афонин // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 1999 – 18 с.
9. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / Ашмарин И.П., Воробьев А.А. – Л.: Гос. изд-во мед. литературы. – 1962. – С.160.
10. Башмаков Г.А. Индикация дизентерийных бактерий на поверхности методом реакции нарастания титра фага / Г.А. Башмаков // Военно-медицинский журнал. – 1961. – № 4. – С. 39-42.
11. Борисов Л.Б. Энтеропатогенные кишечные палочки и их фаги. / Л.Б. Борисов // Л.: Медицина, 1976. – С. 191.
12. Букринская А.Г. Вирусология / А.Г. Букринская // М.: Медицина, 1986. – С. 336.
13. Бульканова Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров их применения / Е.А. Бульканова // Автореферат. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2006. – 20 с.
14. Быкова З.И. Некоторые свойства чумных фагов / З.И. Быкова // Тр. Армянской противочумной станции. – М., 1964. – №3. – С. 171-175.
15. Васильев Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никулина // Ульяновск, 1998. – 151 с.
16. Васильев Д.А. Выделение бактериофагов *Yersinia enterocolitica* из объектов внешней среды / Д.А. Васильев, Б.М. Коритняк, С.Н. Золотухин // Сб. тр. межрегион. научно-практ. конф. – Самара, 2005. – С. 192-194.
17. Васильев Д.А., Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б., Зайнудинова Л., Тарасова Л. Изучение биологических свойств *Bordetella bronchiseptica*. Ветеринарная медицина домашних животных: Сборник статей. – Выпуск 4. – Казань: Печатный двор, 2007. – 121-124.
18. Васильев Д.А., Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б., Стеанова Т.А., Семанин Е.А., Казакова А.С., Никулина Е.Н. Бордетеллез кошек и собак. Материалы II-й Открытой Всероссийской конференции молодых ученых «Молодёжь и наука XXI века». – Ульяновск, 2007. – Ч.1. – С. 222-225.
19. Васильев Д.А., Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Хлынов Д.Н., Никулина Е.Н. Технология конструирования селективной среды для *Bordetella bronchiseptica*. Материалы II-й Открытой Всероссийской конференции молодых ученых «Молодёжь и наука XXI века». – Ульяновск, 2007. – Ч.1. – С. 219-222.
20. Васильев Д.А. Технология конструирования селективной, транспортной, накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica*. // Васильев Д.А. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г. Мاستиленко А.В. Семанин Е.Г. Хлынов Д.Н. / Труды Международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ВНИИВВиМ. Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных. – Покров. – 2008. – С. 13-14.
21. Васильев Д.А. К вопросу о бактериологической диагностике бордетеллеза / Д.А. Васильев, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Никульшина, А.В. Мاستиленко // Актуальные вопросы аграрной науки и образова-

- ния: Материалы Международной научно-практической конференции, 20-22 мая, 2008. –Ульяновск, 2008. – С. 92-94.
22. Васильев Д.А. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Bordetella bronchiseptica* с помощью ПЦР в режиме «реального времени». // Васильев Д.А. Мاستиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Никульшина Ю.Б. / Сборник научных трудов. Современный мир, природа и человек. – Томск. – 2009. – С. 115-117.
23. Васильев Д.А. Разработка методики идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: Материалы конференции молодых ученых, посвященной памяти члена-корреспондента РАСХН Вишнякова И.Ф. 70-летию со дня рождения, 3-4 декабря, 2009. – Покров, 2009. – С. 78-80.
24. Васильев Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных. // Васильев Д.А. Мастиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Васильева Ю.Б. / Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 230-232.
25. Васильев Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Васильев Д.А. Мастиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Васильева Ю.Б. / Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 233-235. Васильев В.Ю. Циклический аденозинмонофосфат — биологическая роль и механизм действия / В.Ю. Васильев, Н.Н. Гуляев, Е.С. Северин // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева. – 1975. – № 3. – С.15-19.
26. Васильев Д.А. Разработка методики антигенной идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью иммуноэлектрофореза. // Васильев Д.А. Васильева Ю.Б. Мастиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Семанин Е.Г. / Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых / Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации». – ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров. – 2011. – С. 185-188.
27. Васильев Д.А. Использование количественной ПЦР для идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Молекулярная диагностика – 2010: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24-26 ноября, 2010. – Москва, 2010. – С.68-70.
28. Васильева Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанин, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59-62.
29. Васильева Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции / Васильева Ю.Б. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
30. Васильева Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза / Васильева Ю.Б. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С.51-56.
31. Васильева Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллеза / Васильева Ю.Б. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.
32. Васильева Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* / Васильева Ю.Б. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.
33. Васильева Ю.Б. Эффективность иммунохимических методов для анализа антигенного состава *Bordetella bronchiseptica* / Васильева Ю.Б. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.1.
34. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* / Васильева Ю.Б. // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.1.
35. Васильева Ю.Б. Диагностическая эффективность тест-системы индикации и идентификации бактерий *Bordetella bronchiseptica* / Васильева Ю.Б. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23).
36. 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.
37. 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.

38. Взаимосвязь состава питательных сред с ростовыми и биохимическими свойствами *B. Pertussis*. / В.Н. Степаншина [и др.] // ЖМЭИ. . – 1994. – №6. – С. 26-27.
39. Викторов Д.А. Разработка биопрепарата на основе бактериофагов бактерии *Pseudomonas putida* для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Всероссийский симпозиум с международным участием, Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 27-29 января 2011. – Москва, 2011. – С. 24.
40. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* / Д.А. Викторов // Автореферат. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 22 с.
41. Висконти Р. Генетика бактериофага / Р. Висконти // Онтогенез вирусов. – М., 1956. – 141 с.
42. Владимиров В.Г., Карпищенко А.И., Сковцов С.В., Казаков С.П. и др. Медицинские лабораторные технологии. С.-Пб. Интермедика, 2002, т.2, гл.25.
43. Воронцова А.А. Применение метода реакции нарастания титра фага при эпидемиологическом и санитарном обследовании / А.А. Воронцова // Кишечные инфекции: Тез.докл. на межинстит.конф. – М., 1961. – С. 127-128.
44. Габрилович И.М. Лизогения / И.М. Габрилович // Минск: Белозерс. – 1970. – 72 с.
45. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
46. Габрилович И.М. Сравнительное изучение бактериофагов *Morganella* и *Providencia* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1998. – № 5. – С. 20-22.
47. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги *Salmonella choleraesuis*, сравнительная характеристика и практическое применение / В.Я. Ганюшкин // Автореф. дис. ... докт. вет. наук. – М., 1984. – С. 13-34.
48. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин // уч. пособие. – Ульяновск. – 1988. – 45 с.
49. Ганюшкин В.Я. Реакция нарастания титра фага при диагностике паратифа поросят / В.Я. Ганюшкин // Ветеринария. – 1967. – №3. – С. 69-71.
50. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Гланц С. – М.: изд. Практика. – 1999. С.461.
51. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
52. Гольдфарб Д.М. Индикация брюшнотифозной палочки в воде с помощью реакции нарастания титра фага / Д.М. Гольдфарб, З.С. Островская // ЖМЭИ. – 1957. – №5. – С. 17.
53. Гольдфарб Д.М. Опыт применения реакции нарастания титра фага для диагностики дизентерии / Д.М. Гольдфарб, В.Н. Кузнецова // ЖМЭИ. – 1957. – №8. – С. 90-94.
54. Гордина Р.В. Фаготипирование паратифозных бактерий и действие на них бактериофагов / Р.В. Гордина // Автореф. дис. ... докт. вет. наук. – М., 1954. – С. 24-27.
55. Гуторова Л.Д. Фаготипирование бреславской палочки / Л.Д. Гуторова // ЖМЭИ. – 1958. – № 12. – С. 53-55.
56. Давиденко Т.А. Фаготипирование *S.typhimurium*, выделенных в Киеве в 1966-1970 / Т.А. Давиденко, А.М. Зарицкий // Кишечные инфекции. – Киев. – 1972. – С. 41.
57. Дегтярев Ю.А. Реакция нарастания титра фага и ее применение для диагностики брюшного тифа и выявления бактерионосителей / Ю.А. Дегтярев // Тез. докл. ин-та эпидемиол. и гигиены. – Душанбе, 1960. – С. 12.
58. Доман Н. Г. Биологическая роль циклического АМФ / Н.Г. Доман, Е.П. Феденко // Успехи биологической химии. – 1976. – С. 240-245.
59. Домарадский И.В. Методика быстрого обнаружения чумного микроба при помощи бактериофага / И.В. Домарадский, О.Н. Мосолова, Л.К. Денисенко // Иркутск. – 1957. – С. 44-51.
60. Душкин Д.В. Бордетеллэз собак. Учебное пособие. Ульяновск, ГСХА, 1998. – 20с.
61. Жугова Т.Ч. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica* / Т.Ч. Жугова // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Минск, 1985. – 21 с.
62. Земцова И.Н. Применение реакции нарастания титра специфического бактериофага для индикации спор сибиреязвенных бактерий в почве / И.Н. Земцова // Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций: Сб. научн. работ противочумных учреждений. – Саратов. – 1965. – С. 171.
63. Золотухин С.Н. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157:H7 и O157 в патологическом материале, кормах, пищевом сырье с применением специфических бактериофагов / С.Н. Золотухин // М., 2005. – 16 с.
64. Золотухин С.Н. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий вида *Morganella morganii* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье с применением специфических бактериофагов / С.Н. Золотухин // М., 2005. – 15 с.

65. Золотухин С.Н. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье с применением специфических бактериофагов / С.Н. Золотухин // М., 2005. – 15 с.
66. Золотухин С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.
67. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
68. Иммунологические методы / Х. Фримель [и др.] – М.: Мир, 1979. – 515 с.
69. Иммунология и аллергология / А.А. Воробьев [и др.] – М.: Практическая медицина. – 2006. – 288 с.
70. Камбаров П.И. Клиническая оценка РНФ как метода лабораторной диагностики острой дизентерии / П.И. Камбаров // ЖМЭИ. – 1963. – № 4. – С. 29.
71. Капырина Н.А. Идентификация возбудителя листериоза с помощью бактериофага / Н.А. Капырина, И.А. Бакулов, // Симпозиум “Профилактика и меры борьбы с лептоспирозом и листериозом с/х животных”. – Новочеркасск. – 1972. – С. 76-78.
72. Катмакова Н.П. Изучение основных биологических свойств фагов бактерий вида *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Катмакова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Матер. междунар. научно-практ. конф. «Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных». 13-14 ноября, 2008. – Покров, 2008. – Т. I. – С. 212-214.
73. Катмакова Н.П. Разработка и применение диагностического биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Катмакова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2010 – 24 с.
74. Катмакова Н.П. Селекция псевдотуберкулезных бактериофагов для создания диагностического препарата // Н.П. Катмакова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Матер. междунар. научно-практ. конф. «Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчел». 9-10 октября, 2008. – Москва, 2008. – С. 129-131.
75. Кац-Черновостова Л.Я. Проблема фаготипирования брюшнотифозных и паратифозных микробов и ее эпидемиологическое значение / Л.Я. Кац-Черновостова // ЖМЭИ. – 1947. – № 8. – С. 312-315.
76. Килессо В.А. Идентификация сальмонеллезных культур с помощью О-бактериофага / В.А. Килессо // Тез. докл. конф. Таллин. научн.-иссл. ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены. – Таллин. – 1960. – С. 5.
77. Книрель Ю.А. Липополисахариды / Ю.А. Книрель // Материалы Российско-Немецкого семинара по липополисахаридам бактериальных патогенов человека. – М. – 2002. – С. 59-74.
78. Ковалева Е.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Enterococcus* / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин // Ломоносов: материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. 8-11 апреля, 2008. – Москва, 2008. – С. 7.
79. Ковалева Е.Н. Подбор штаммов бактериофагов *Enterococcus* для конструирования диагностического препарата / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2008. – Т. 195. – С. 123-128.
80. Ковалева Е.Н. Создание биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Enterococcus faecalis* / Е.Н. Ковалева // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. / – Саратов, 2009. – 20 с.
81. Козелько О.А. Применение метода РНФ для контроля качества дезинфекции в очагах кишечных инфекций / О.А. Козелько // ЖМЭИ. – 1961. – №2. – С. 36-40.
82. Коклюш (микробиология, иммунология, специфическая профилактика) / В.И. Иоффе [и др.] // М.: Медицина; 1964.
83. Колпикова Т.И. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: матер. научн. конф. ВНИИВиМ. – Покров, 1992. – Ч. 11. – С. 211 - 212.
84. Колпикова Т.И. Фаготипирование листерий / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 31-32.
85. Коритняк Б.М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и их применение в диагностике / Б.М. Коритняк // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2005. – 20 с.

86. Коритняк Б.М. Обнаружение бактерий вида *Yesinia enterocolitica* в сточных водах хозяйств Самарской области при помощи РНФ / Б.М. Коритняк // Матер. междунар. научно-практ. конф. – Ульяновск, 2006. – С. 363-366.
87. Корнилова Г.В. РНФ при индикации дизентерийных бактерий в воде в сопоставлении с бактериологическим методом / Г.В. Корнилова // Матер. 16 межобластн. научн.-практической конф. лабор. работников в Зап. Сибири. – Томск, 1960. – С. 20-21.
88. Красильников А.П. Микробиологический словарь – справочник / А.П. Красильников, Т.Р. Романовская // Минск: Асар. – 1999. – 310 с.
89. Кременчук Г.А. Применение реакции нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Г.А. Кременчук, М.А. Гицевич, К.П. Бояршинова // ЖМЭИ. – 1961. – № 7. – С. 124.
90. Кривиский А.С. Вирусы против микробов / Кривиский А.С. // М., – 1962. – 162 с.
91. Крылова М.Д. Перспективы и возможности метода фаготипирования бактерий / М.Д. Крылова // Матер. симпозиума, посвящен. 50-летию Тбилисского НИИВС. – Тбилиси, 1974. – С. 276-280.
92. Крылова М.Д. Применение бактериофагов для типирования бактерий / М.Д. Крылова // Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 220-257.
93. Крылова М.Д. Фаготипирование / М.Д. Крылова // БМЭ. – 1963. – Т.33. – 97 с.
94. Кудрятова Т.А. Каталог бактериофагов патогенных бактерий и тест-штаммов / Т.А. Кудрятова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина // Ростов-на-Дону, 1998. – 71 с.
95. Кузнецова В.Н. Применение реакции нарастания титра фага для индикации дизентерийных бактерий в условиях внешней среды / В.Н. Кузнецова, М.И. Хазанов, Т.Н. Ремова // ЖМЭИ. – 1960. – № 6. – С. 59.
96. Лабинская А.С. Микробиология с техник микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. – 394с.
97. Лапаева И.А., Мебель С. М., Переверзев Н.А., Синяшина Л.Н. Бактериофаг *Bordetella pertussis* II Ж. Микробиол. -1980. - Т. 5. -С. 85-90.
98. Лапаева И.А., Мебель С. М., Синяшина Л.Н., Шахватова О.Ю. Конверсия токсигенности коклюшными фагами у *Bordetella parapertussis* II Ж. микробиол. -1982. -Т. 9. - С. 60-64.
99. Лебедев В.И. Опыт применения РНФ в эпидемиологической практике / В.И. Лебедев // ЖМЭИ. – 1963. – № 12. – С. 29.
100. Лебедев В.И. РНФ как ранний метод индикации дизентерии в детских учреждениях / В.И. Лебедев // Тр. науч. конф. аспирантов и ординаторов. – М., 1964. – С. 105-107.
101. Ленев С.В. Бактериофаги энтеропатогенных эшерихий, их биологические свойства и практическое применение / С.В. Ленев // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1988. – 21 с.
102. Ленев С.В. Способ выделения и свойства бактериофагов / С.В. Ленев // Сб. науч. трудов Всеросс. науч. ин-та вет. препаратов. – М., 1991. – С. 24.
103. Летаров А.В. Реконструкция возможных путей происхождения и морфологии эволюции бактериофагов / А.В. Летаров // Генетика. – 1998. – № 11. – С. 14.
104. Летиев К.Ю. О фаготипировании бактерий рода *Enterobacter* / К.Ю. Летиев // Вопросы теоретической и клинической медицины. – Нальчик, 1993. – С. 70.
105. Лешкович Н.Л. О диапазоне и специфичности действия чумных фагов 1701, 1710 и их мутантов / Н.Л. Лешкович, В.П. Ермилова // Проблемы особо опасных инфекций. – М., 1974. – С. 38-41.
106. Лихачев Н.В. Метод диагностики паратифа свиней при помощи бактериофага / Н.В. Лихачев // Ветеринария. – 1948. – №7. – С. 32.
107. Ляшенко В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев. – М.: Медицина, 1982. – 269 с.
108. Мазурин Н.Д. РНФ при диагностики дизентерии / Н.Д. Мазурин, Ц.С. Розина-Япкина // ЖМЭИ. – 1963. – № 1. – С. 113-115.
109. Мاستиленко А.В. Разработка идентификации *B.bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов / А.В. Мاستиленко // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2010. – 21 с.
110. Мастиленко А.В. Разработка методики серологической идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью электрофореза // Мастиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Семанин Е.Г. Васильева Ю.Б. / Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых / Молодежь и наука XXI века / Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии. – Ульяновск. - 2010. - Т. 1. – С 47-49.
111. Мастиленко А.В. Разработка системы дифференциации *B.bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, О.Ю.

- Борисова, Ю.Б. Васильева / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 50-54.
112. Матвеева С.М. РНФ в диагностике брюшного тифа / С.М. Матвеева // Кишечные инфекции: тез. докл. межинстит. конф. – М., 1961. – С. 146-147.
113. Машенюк О.Ю. Идентификация бактерий *Pseudomonas mallei* с помощью бактериофагов / О.Ю. Машенюк, И.В. Воложанцев // Микробиология. – 1994. – № 3. – С. 537-544.
114. Медицинские лабораторные технологии / В.Г. Владимиров [и др.] – С.-Пб.: Интермедика, 2002. – Т.2. – С.319-384.
115. Методические указания по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. М., 1981.
116. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Д.И. Скородумов [и др.] // М.: ИзографЪ, 2005. – 656 с.
117. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний / Е.П. Красноженов [и др.] – Ростов н/Д.: Феникс, 2006. – С. 123-130.
118. Миланко А.Я., Ребенко Г.И., Душкин Д.В. Бордетеллез свиней // Ветеринария. – М., 1996. - №3. - С.22-24.
119. Миланко А.Я., Герилович П.П., Душкин Д.В. Бордетеллезная инфекция собак / Матер.науч. конф.Харьков.зоовет.института. - Харьков, 1995. - С.34-35.
120. Миланко А.Я., Холодило Е.В., Душкин Д.В. Роль *Bordetella bronchiseptica* в диагностике коклюшеподобных заболеваний / Материалы IV съезда паразитологов Украины. - Харьков, 1995. - С.14.
121. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Пер. с англ. / С. Херрингтон [и др.] – М.: Мир, 1999. – 193 с.
122. Молофеева Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* O157 и их применение в диагностике / Н.И. Молофеева // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 20 с.
123. 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.
124. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Васильев Д.А. Изучение антимикробной чувствительности *Bordetella bronchiseptica* in vitro. Материалы научно-практической конференции молодых ученых ПФО «Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК». – Саратов, 2007. – С.144-147.
125. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Васильев Д.А., Хлынов Д.Н. Выделение бактерий рода *Bordetella bronchiseptica* от домашних животных / Роль молодых ученых в развитии национального проекта «Развитие АПК». Москва. МГАУ. – 2007. – Ч 1. с. 281-284.
126. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Никулина Е.Н. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». /Ветеринарная патология/ Международный научно-практический журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии №4. (23). – 2007. – С. 103-106.
127. Никульшина Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах // Никульшина Ю.Б. Сверкалова Д.Г. Васильев Д.А. Мاستиленко А.В. Хлынов Д.Н. / Материалы Международной научно-практической конференции / Актуальные вопросы аграрной науки и образования. - Ульяновск. - Т. IV. - 2008. – С. 57-59.
128. Никульшина Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах // Никульшина Ю.Б. Сверкалова Д.Г. Васильев Д.А. Мастыленко А.В. Хлынов Д.Н. / Материалы Международной научно-практической конференции / Актуальные вопросы аграрной науки и образования. - Ульяновск. - Т. IV. - 2008. – С. 57-59.
129. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Хлынов Д.Н., Никулина Е.Н. [и др.] Изучение возможности зооантропонозной передачи бордетеллеза // тр. Всероссийского совета молодых ученых аграрных образовательных и науч. учреждений. М.: Академия кадрового обеспечения АПК, 2008. Т.1. С. 152–155.
130. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Головин И.Н., Казакова А.С., Степанова Т.А., Хлынов Д.Н., Никулина Е.Н., Семанин Е.Г. Поиск селективных компонентов для выделения *Bordetella bronchiseptica* // материалы 60-ой науч. студ. конф. Ульяновск, 2007. С. 97–100.
131. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. - М.: Медицина, 2004. – 576 с.
132. Определитель Бактерий Берджи. М, 1997.

133. О специфичности листериозных бактериофагов / И.А. Бакулов [и др.] // Ветеринария. – 1990. – № 7. – С. 26-27.
134. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман // Практическое пособие. – Наука. – 1981. – С. 283.
135. Островская З.С. Ускоренный метод диагностики брюшного тифа Vi-фагом / З.С. Островская, Б.Н. Папкова // ЖМЭИ. – 1951. – № 2. – С. 37-40.
136. Островская Н.Н. К использованию метода нарастания титра фага для выявления бруцелл во внешней среде / Н.Н. Островская, Д.М. Гольдфарб // ЖМЭИ. – 1961. – № 5. – С. 145.
137. Павлова И.П. Изучение морфологии и биологических свойств фагов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* / И.П. Павлова // ЖМЭИ. – 1971. – №7. – С. 147.
138. Переверзев Н.А., Синяшина Л.Н Структурная организация бактериофага, выделенного из *Bordetella pertussis* II Ж. Микробиол.-1981. -Т.5. - С. 54-57.
139. Петри А. Наглядная статистика в медицине / А. Петри, К. Сэбин. – М.: Гэотар-мед, 2003. -139 с.
140. Пожарникова Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / Е.Н. Пожарникова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2006. – 20 с.
141. Попхадзе М.З. Использование бруцеллезного фага для диагностики бруцелл / М.З. Попхадзе // ЖМЭИ. – 1968. – № 2. – С. 119-124.
142. Пульчеровская Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике / Л.П. Пульчеровская // Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.П. Пульчеровская. – Саратов, 2004. – 21 с.
143. Пустовалова Л.М. Основы биохимии для медицинских колледжей. Ростов н/Д: Феникс, 2003.
144. ПЦР «в реальном времени» / Д.В.Ребриков [и др.] – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
145. Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусаинов М.Ш. Микробиологические среды. Казань: Фэн, 1999.- 398 с.
146. Разработка технологии приготовления бактериофаговых препаратов для лечения птиц / В.В. Перелыгин [и др.] // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: Матер. междунар. семинара. – Тбилиси, 2005. – С. 32.
147. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко // Киев: Урожай, 1978. – С. 88.
148. Рубашкина Б.К. Применение метода нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Б.К. Рубашкина, С.Ф. Казакова // ЖМЭИ. – 1959. – №6. – С. 110-112.
149. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. / Под ред. А.С. Лабинской и Е.Г. Волиной // М.: Бином – 2008. – 1080 с.
150. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этнологическая диагностика инфекций / Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой // М.: Бином, 2010. – 1152 с.
151. Русалиев В.М. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий / В.М. Русалиев // Ветеринария. – 1990. – № 8. – С. 29-30.
152. Сверкалова Д.Г. Разработка биопрепарата и бактериологической тест-системы для типирования *Bordetella bronchiseptica* / Д.Г. Сверкалова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2011. – 24 с.
153. Сверкалова Д.Г., Васильев Д.А., Никульшина Ю.Б., Никулина Е.Н., Хлынов Д.Н. Выделение бактерий рода *Bordetella bronchiseptica* от домашних животных. Материалы Межд. научно-практ. конференции «Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК». –МГАУ, 2007.–Ч.- С.281-284.
154. Сверкалова Д.Г., Степанова Т.А., Василева Ю.Б., Казакова А.С., Никулина Е.Н. Бордетеллез кошек и собак // Материалы II-й Открытой Всероссийской конференции молодых ученых / Молодежь и наука XXI века. – Ульяновск, 2007. - Ч. 1. – С. 222-225.
155. Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б., Хлынов Д.Н., Никулина Е.Н. Технология конструирования селективной среды для *B. bronchiseptica* // Материалы II-й Открытой Всероссийской конференции молодых ученых / Молодежь и наука XXI века. – Ульяновск, 2007. - Ч. 1. – С. 222-225.
156. Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б., Степанова Т.А., Никулина Е.Н. Изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств бордетелл // материалы 60-ой науч. студ. конф. Ульяновск, 2007. С. 94–97.

157. Сверкалова Д.Г., Мاستиленко А.В., Хлынов Д.А., Никульшина Ю.Б., Васильев Д.А. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica*. // Материалы Международной научно-практической конференции / Актуальные вопросы аграрной науки и образования. - Ульяновск. - Т. IV. - 2008. - С. 134-136.
158. Семанина Е.Н., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Получение антигенного препарата путем ультразвуковой дезинтеграции клеток *Bordetella bronchiseptica*. // Материалы конференции молодых ученых, посвященной памяти члена-корреспондента РАСХН Вишнякова И.Ф. 70-летию со дня рождения / Актуальные вопросы инфекционной патологии ветеринарной медицины. - Покров. - ГНУ ВНИИВВиМ. - 2009. - С. 226-229.
159. Семанина Е.Н., Васильева Ю.Б., Васильев Д.А. [и др.] Метод выделения фагов *Bordetella bronchiseptica* при помощи ультрафиолетового облучения // Ветеринарная медицина домашних животных: сб. статей. Казань, 2010. Вып.7. С. 244–246.
160. Семанина Е.Н., Васильева Ю.Б., Васильев Д.А. Выделение фагов *Bordetella bronchiseptica* // Молодежь и наука XXI века: материалы междунар. науч. практ. конф. молодых ученых. Ульяновск, 2010. Т.3. С. 60–62.
161. Семанина Е.Н., Васильева Ю.Б., Васильев Д.А. Выделение бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* // Биологически активные вещества микроорганизмов: Всероссийский симпозиум с междунар. участием. Москва. МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 27-29 января 2011. М.: МАКС Пресс, 2011. С. 25.
162. Семанина Е.Н. Разработка биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов для диагностики, лечения и профилактики бордетеллёзной инфекции животных и людей // Актуальные проблемы физической и функциональной электроники: материалы 12-й региональной научн. школы-семинара. Ульяновск, 2009. Т.2. С. 140–141.
163. Синяшина Л.Н., Лапаева И.А., Мебель С. М. Прозрачная плотная питательная среда для изучения литического спектра бактериофагов микробов рода *Bordetella* // Ж. микробиол. -1982. -Т.6. - С. 53-55.
164. Синяшина Л.Н., Лапаева И.А., Мебель С. М. Характеристика основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella* // Ж. микробиол. -1982. -Т. 8. - С. 66-69.
165. Стронговская Н.В. Сравнительное изучение РНФ для выявления носительства дизентерийных бактерий / Н.В. Стронговская // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Симферополь, 1964. – 17 с.
166. Тимаков В.Д. Об условиях взаимодействия фага и бактериальной клетки / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Вестник АМН СССР. – 1958. – №2. – С. 37.
167. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // М., 1962. – С. 65-71.
168. Тимаков, В.Д. Экспериментальное обоснование нового принципа обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий с помощью фага / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // ЖМЭИ. – 1956. – № 10. – С. 3-7.
169. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко // М.: Наука, 1968. – С. 89-168.
170. Туманов А.К. Сывороточные системы крови / А.К.Туманов. – М.: Медицина, 1968. – С.18-22, 163-178.
171. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / Н.А. Феоктистова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2006. – 22 с.
172. Фримель, Х. и др. Иммунологические методы. М.: «Мир», 1979.
173. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов / У. Хейс // М.: «Мир», 1965. – С. 288-294.
174. Цветков К.И. Применение специфического фактериофага для диагностики паратифозного аборта кобыл / К.И. Цветков // Ветеринария. – 1941. – №6. – С. 4-6.
175. Чарный В.И. Установление видовой специфичности белков крови / В.И. Чарный. – М.: Медицина, 1976. – 127 с.
176. Шестаков А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2010 – 22 с.
177. Шуляк Б.Ф. Руководство по бактериальным инфекциям собак. Т.2. Грамотрицательные бактерии. М.: ОЛИТА, 2003. – 608с.
178. Adaptive responses of human monocytes infected by *B. pertussis*: The role of adenylate cyclase hemolysin / E. Njamkepo [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2000. – V.183. – P.91-99.

179. Adenylate Cyclase Toxin from *B.pertussis* Synergizes with Lipopolysaccharide To Promote Innate Interleukin-10 Production and Enhances the Induction of Th2 and Regulatory T Cells / P.J. Ross [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2004. – V.72. – №3. – P.1568-1579.
180. Agiato-Foster, L. A. & Dyer, D. W. (1993) A siderophore production mutant of *B.bronchiseptica* cannot use lactoferrin as an iron source. *Infection and Immunity* 61, 2698-2702.
181. Alcerley, B.J., Monack, D.M., Falkow, S. and Miller, J.F. (1992) The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *B.bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 172, 980-990.
182. Akerley, B.J. and Miller, J.F. (1993) Flagellin gene transcription in *B.bronchiseptica* is regulated by the *BvgAS* virulence control system. *J. Bacteriol.* 175, 3468-3479.
183. Akerley, B.J., Cotter, P.A. and Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* 80, 611-620.
184. Alkire LT, Chladek DW: Field evaluation of an intranasally administered canine parainfluenza-B. *bronchiseptica* vaccine. *Vet Med/Small Anim Clin* 75:1003, 1980.
185. Allen, A.G., R.M.Thomas, J.T. Cadisch, and J.Maskell. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *B.pertussis*, *B.parapertussis* and *B.bronchiseptica*. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(1):27-38.
186. Amino-terminal maturation of the *B.pertussis* filamentous haemagglutinin / F. Jacob-Dubuisson [et al.] // *Mol Microbiol.* – 1996. – V.19. – P.65-78.
187. Amis TC: Chronic bronchitis in dogs. In Kirk RW (ed): *Current Veterinary Therapy IX*. Small Animal Practice. Philadelphia, WB Saunders, 1986, p. 247-250.
188. Analysis of a repetitive DNA sequence from *B.pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction / E.M. Glare [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – V.128. – P.1982-1987.
189. Analysis of antibody profiles in children with whooping cough / P. Novotny [et al.] // *Dev. Biol. Stand.* – 1991. – V.73. – P.267-273.
190. Analysis of the *alcABC* operon encoding alcaligin biosynthesis enzymes in *B.bronchiseptica* / P.C. Giardina [et al.] // *Gene*. – 1997. – V.194. – P.19-24.
191. Andersen E.K. Serological studies on *H. pertussis*, *H. parapertussis*, and *H.bronchisepticus* / E.K. Andersen // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* – 1953. – V.33. – P.202-224.
192. Angus JC, Jang SS, Hirsh DC. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc* 1997 ;210:55-58.
193. Antoine R., Loch T. Isolation and molecular characterization of a novel broadhost-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram- positive organisms // *Mol Microbiol* -1992. - V.6. - P. 1785-99.
194. Aoyama T. Acellular pertussis vaccines developed in Japan and their application for disease control. *J Infect Dis* 1996; 174:S264-S269.
195. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *B. species* by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements / L. Roorda [et al.] // *BMC Res Notes*. – 2011. – V.21. – P.4-11.
196. Arico B., Scarlato V., Monack D. et al. (1991) Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol. Microbiol.* 5, 2481-2491.
197. Arico B. & Rappuoli, R. 1987. *B.parapertussis* and *B.bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.*, 169:2847-2853.
198. Arskog R. 1967. *B.bronchiseptica* and piglet pneumonias. *Nord. Veterinaarmed.* 19:58-61.
199. Azechi H. Sensitivity in vitro to antibacterial drugs of *B.bronchiseptica* isolated from swine / H. Azechi, N. Koyama, N. Terakado. // *J.Jpn. Vet. Med. Assoc.* – 1973. – V.26. – P.75-79.
200. Azetaka M., Konishi S. Kennel cough complex: confirmation and analysis of the outbreak in Japan. *Jpn] Vet Sri* 1988; 50:851-858.
201. Baker D.G. Natural pathogens of laboratory animals: their effects on research / D.G. Baker // *ASM Press*, Washington, D.C. - 2003.
202. Banemann, A. and Gross, R. (1997) Phase variation affects long-term survival of *B.bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect. Immun.* 65, 3469-3473.
203. Banerjee A. Antigens of *B.pertussis* II. Purification of heat-labile toxin / A. Banerjee, J. Munoz // *J. Bacteriology*. – 1962. – V.84. – P.269-274.
204. Barry, E. M., Weiss, A. A., Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Hewlett, E. L., and Goodwin, M. S. *B.pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol.*, 1991, January; 173(2): 720-726.
205. Bassinet L., Gueirard P., Maitre B. et al. (2000) Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *B.pertussis*. *Infect. Immun.* 68,1934-1941.

206. Batey R.G, Smits A.F: The isolation of *B.bronchiseptica* from an outbreak of canine pneumonia. *Aust Vet J* 52:184-186, 1976.
207. Bauditz R: Results of clinical studies with Baytril in dogs and cats. *Vet Med Rev* 2:137-140, 1987.
208. Bauwens J. E., Spach, D. H., Schacker, T. W., Mustafa, M. M. & Bowden, R. A. (1992). *B.bronchiseptica* pneumonia and bacteraemia following bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2474-2475.
209. Bedarida G. The detection of Australia antigen and anti-Au antibodies by a rapid procedure combining electrophoresis and immunoprecipitation / G. Bedarida, G. Trinchieri, A. Carbonara // *Haematologica*. – 1969. – V.54. – P.591.
210. Bemis D.A., Carmichael L.E., Appel M.J.G. (1977). Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *B.bronchiseptica*. *Cornell Veterinarian* 67, 282-293.
211. Bemis D.A., Greisen H.A., Appel M.J.G. 1977. Bacteriological variation among *B.bronchiseptica* isolates from dogs and other species. *J. Clin. Microbiol.* 5:471-480.
212. Bemis D.A., Appel M.J.G. 1977. Aerosol, parenteral, and oral antibiotic treatment of *B.bronchiseptica* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170:1082-1086.
213. Bemis D.A, Greisen H.A, Appel M.J. Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis* 1977; 135:753-762.
214. Bemis D.A, Kennedy J.R: An improved system for studying the effect of *B.bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cells. *J Infect Dis* 144:349-357, 1981
215. Bemis, D.A., Plotkin B.J. 1982. Hemagglutination by *B.bronchiseptica*. *J. Clin. Microbiol.* 15:1120-1127.
216. Bemis, D.A., Wilson S.A. 1985. Influence of potential virulence determinants on *B.bronchiseptica*-induced ciliostasis. *Infect. Immun.* 50:35-42.
217. Bemis, D.A. (1986) *Bordetella*. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Eds C. L. Gyles and C. O. Thoen. Iowa State University Press, Iowa, pp 137-146
218. Bemis D.A: Current strategies for the control of canine infectious tracheobronchitis in canine cough. In *Proceedings of the 5th Annual Eastern States Veterinary Conference*, Orlando, FL, 1988, pp 22-35
219. Bemis D.A. *Bordetella* and mycoplasma respiratory infections in dogs and cats. *Vet Clin North. Am Small Anim Pract* 1992; 22:1173-1186.
220. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria / Garrity [et al.] // New York, New York: Springer. – 2005. – P. 354-361.
221. Bergman J.G., Vernooij J., Zegers E.M. (1997) Prevalence of antibodies against *B.bronchiseptica* in cats with a history of respiratory disease. *Veterinary Quarterly* 19, S50-S51.
222. Bert F. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica* / F. Bert, J. Woolfrey, A. Moody // *J. Clinical Microbiology Reviews*. – 1991. – N 3 P. 243-255.
223. Bergogne-Berezin E, Vallee E. Pharmacokinetics of antibiotics in respiratory tissues and fluids. In: Pennington J.E., ed. *Respiratory infections: diagnosis and management*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994; 715-740.
224. Betsou F., Sismeiro O., Danchin A. et al. Cloning and sequence of the *B.bronchiseptica* adenylate cyclase hemolysin encoding gene: comparison with the *B.pertussis* gene. *Gene* 1995; 162:165-166.
225. Bey R.F., Shade F.J., Goodnow R.A., Johnson R.C. (1981) Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *B.bronchiseptica*: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *American Journal of Veterinary Research* 42,1130-1132.
226. Bhargava, A., Leininger E., Roberts M., Li Z. M., Stibitz S., Charles I., Fairweather N., Novotny P., Manclark C. R., and Brennan M. J. Filamentous hemagglutinin and the 69-kDa protein, pertactin promote adherence of *B.pertussis* to epithelial cells and macrophages, p. 137-138. In C. R. Manclark (ed.), *Sixth International Symposium on Pertussis Abstracts*. DHHS publication no. (FDA) 90-1162. Department of Health and Human Services, U.S. Public Health Service, Bethesda, Md., 1990.
227. Binns, S. H., Dawson, S. (1995) Feline upper respiratory tract disease. *In Practice* 17, 458-461.
228. Binns, S. H., Dawson, S., Speakman, A. J., Cuevas, L., Hart, C.A., Bennett, M., Morgan, K. L. & Gaskell, R. M. (1999) Feline bordetellosis: prevalence and risk factors for infection. *Veterinary Record* 17, 458-461.
229. Biochemical tests used for identification of *Bordetella bronchiseptica*. / A. L. Dénes [et al.] // *Buletinul USAMV-CN*, – 2006. – N 63. – P.67-70.
230. Birkebaek N.H. *B.pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction / N.H. Birkebaek, I. Heron, K. Skjodt // *APMIS*. – 1994. – V.102. – P.291-294.

231. Bjornstad O.N. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Harvill // *Trends Microbiol.* – 2005. – N 13. – P. 355-359.
232. Bordet J. Le diagnostic de la coqueluche fruste par la méthode de la fixation de l'alexine / J. Bordet, O. Gengou // *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* – 1911. – V.11. – P.58-68.
233. *Bordetella* / M. J. Marcon [et al.] // *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1995. – P. 566-573.
234. *Bordetella* / M.J. Gilchrist [et al.] // *Manual of clinical microbiology*. 5th ed., Washington: ASM Press; 1991. – 471 p.
235. *Bordetella* / R. Parton [et al.] // *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*, Washington, DC, USA. – 2005. – P. 1786-1817.
236. *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds / K. Kersters [et al.] // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1984. – N 34. – P. 56-70.
237. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats / H. Egberink [et al.] // *ABCD guidelines on prevention and management. J. Feline Med. Surg.* – 2009. – N 11(7) Jul. – P. 610-614.
238. *Bordetella bronchiseptica* infection in cats following contact with infected dogs / S. Dawson [et al.] // *Vet. Rec.* – 2000. – N 146. – P. 46-48.
239. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation / J.E. Bauwens [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1992. – N 30(9). – P. 2474-2475.
240. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans / P. Vandamme [et al.] // *International Journal of Systematic Bacteriology* – 1995. – N 45. – P. 37-45.
241. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia / R. S. Weyant [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology* – 1995. – N 33. – P. 1-7.
242. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia / R. S. Weyant [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology* – 1995. – N 33. – P. 1-7.
243. *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B.bronchiseptica* / D.A. Diavatopoulos [et al.] // *PLoS. Pathog.* – 2005. – N 1(4). – P.373-383.
244. *Bordetella* / M.J. Loeffelholz [et al.] // *Manual of Clinical Microbiology* Washington DC: ASM Press. – 2007. – P. 803-814.
245. Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R. 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
246. Brockmeier, S .L. (1999) Early colonization of the rat upper respiratory tract by temperature modulated *B.bronchiseptica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 225-229.
247. Bromberg K., Tannis G., Steiner P. (1991) Detection of *B.pertussis* associated with the alveolar macrophages of children with immunodeficiency virus infection. *Infect. Immun.* 59, 4715-719.
248. Boucher, P.E. & Stibitz, S. 1995. Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *B.pertussis*. *J. Bacteriol.*, 177:6486-6491.
249. Brickman T.J. *B.pertussis* fur gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *B.bronchiseptica* mutants / T.J. Brickman, S.K. Armstrong // *J Bacteriol.* – 1995. – V.177. –P.268-270.
250. Brickman T.J. Purification, spectroscopic analysis and biological activity of the macrocyclic dihydroxamate siderophore alealigin produced by *B.pertussis* and *B.bronchiseptica* / T.J. Brickman [et al.] // *Biometals.* – 1996. – V.9. – P.191-203.
251. Brickman T.J. The ornithine decarboxylase gene *odc* is required for alealigin siderophore biosynthesis in *Bordetella* spp. / T.J. Brickman, S.K. Armstrong // *J Bacteriol.* – 1996. – V.178. –P.54-60.
252. 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.
253. Buggy B.P., Brosius F.C., Bogin R.M., Roller C.A., Schaberg D.R. 1987. *B.bronchiseptica* pneumonia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *South. Med. J.* 80:1187-1189.
254. Burns,V.C., E. J. Pishko, A. Preston, D. J. Maskell, and E. T. Harvill. Role of *Bordetella* O Antigen in Respiratory Tract Infection. *Infection and immunity*, Jan. 2003, p. 86–94 Vol. 71, No. 1.
255. Bussard A. Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynérèse / A. Bussard. – *Biochim. Biophys. Acta*, 1959. – V.34. – P.258.
256. Byrd L.H., Anama L., Gutkin M., Chmel H. 1981. *B.bronchiseptica* peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J. Clin. Microbiol.* 14:232-233.
257. Canine respiratory disease in an animal facility / H.D. Snow [et al.] // *Viral and bacteriology survey, Arch. Surg.* – 1969. – N 99. – P. 126-128.

258. Carbonetti N.H., Fuchs T.M., Patamawenu A.A. et al. (1994). Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase α subunit on regulation of virulence factors in *B.pertussis*. *J. Bacteriol.* 176, 7267-7273.
259. Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice / R.J. Yancey [et al.] // *Am. Vet. Res.* – 1987. – N 48. – P. 1050-1053.
260. Chang K.C., Zakheim R.M., Cho C.T., Montgomery J.C. Posttraumatic purulent meningitis due to *B.bronchiseptica*. *J Pediatr* 1975; 86:639-40.
261. Chang S.M. 1950. Pertussis due to *Brucella bronchiseptica*. Case report. *Pediatrics* 6:227-228.
262. Characterisation of *Bordetella bronchiseptica* strains using phenotypic and genotypic markers / L. E. Friedman [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2006. – N 117. – P. 313-320.
263. Characterization of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica* / A. J. Speakman [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemo-therapy* – 1997. – N 40. – P. 811-816.
264. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. / T. Coenye [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – N 6. – P. 2062-2069.
265. Charles, I. G., J. L. Li, M. Roberts, K. Beesley, M. Romanos, D. J. Pickard, M. Francis, D. Campbell, G. Dougan, M. J. Brennan, et al. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *B.pertussis*. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21:1147-1153.
266. Chhatwal G.S., Walker M.J., Yan H. et al. (1997) Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *B.bronchiseptica*: role in intracellular survival. *Microb. Pathog.* 22, 257-264.
267. Chladek D.W., Williams J.M., Gerber D.L.: Canine parainfluenza-B.bronchiseptica vaccine: Immunogenicity. *Am J Vet Res* 42:266-270, 1981
268. Comparative analysis of the genome sequences of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B.bronchiseptica* / J. Parkhill [et al.] // *Nature genetics Advance online publication.* – 2003. – V.10. – P.1038-1227.
269. Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing / U. Heininger [et al.] // *Infect. Immun.* – 2002. – N 70. – P. 3777–3784.
270. Cookson B.T., Cho H., Herwaldt L.A., et al. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *B.pertussis*. *Infect Immun* 1989; 57:2223-2229.
271. Cookson B.T., Vandamme P., Carlson L.C. et al. Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, '*B. hinzii*' // *J Clin Microbiol*-1994. - V. 32. - P. 2569-2571.
272. Coote J.G. (1996) The RTX toxins of Gram-negative bacterial pathogens: modulators of the host immune system. *Rev. Med. Microbiol.* 7, 53-62.
273. Corbel M.J., Xing D.K.L. (1997) The current status of acellular pertussis vaccines. *J. Med. Microbiol.* 46, 817-818.
274. Cotter P.A., Miller J.E. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *B.bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 1994; 62:3381-3390.
275. Cotter R.A., Miller J.R (1997). A mutation in the *B.bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol. Microbiol.* 24, 671-685.
276. Cotter R.A., Yuk M.H., Mattoo S. et al. (1998). Filamentous haemagglutinin of *B.bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect. Immun.* 66, 5921-5929.
277. Cotter R.A., Miller J.F. (2000). *Bordetella*. In: *Principles of Bacterial Pathogenesis*, ch. 13, pp. 619-674. Academic Press, London.
278. Coutts A.J., Dawson S., Binns S., Hart C.A., Gaskell C.J., Gaskell R.M. (1996) Studies on natural, transmission of *B.bronchiseptica* in cats. *Veterinary Microbiology* 48, 19-27.
279. Crowcroft N. S., C. Stein, P. Duclos, M. Birmingham. How best to estimate the global burden of pertussis? // *Lancet Infect. Dis* - 2003.- V. 3. - P. 413-418.
280. Cullinane L.C., Alley M.R., Marshall R.B, Manktelow B.W. *Bordetella parapertussis* from lambs *IIN.Z. Vet. J.* -1987. - V. 35. P. 175.
281. Dallman M.J., McClure R.C., Brown E.M. Histochemical study of normal and collapsed tracheas in dogs. *Am. J Vet Res.* 1988; 49:2117-2125.
282. Darcy D.A. Antigen and antibody concentration in relative units on diffusion plates / D.A. Darcy // *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press, New York and London. – 1971. – P.200-209.
283. Datz C. *Bordetella* Infections in Dogs and Cats / C. Datz // *Pathogenesis, Clinical Signs, and Diagnosis. VetLearn.* – 2003. – N 12.
284. Deeb B.J., DiGiacomo R.F., Bernard B.L., Silbernagel S.M. 1990. *Pasteurella multocida* and *B.bronchiseptica* infections in rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 28:70-75.

285. De Jong M.F. (Progressive) atrophic rhinitis. Diseases of swine, 7th ed. / M.F. De Jong // Wolfe, Ames, Iowa. – 1992. – P.415-435.
286. Der Mikroagglutinationstest: eine einfache und empfindliche Methode für die Serodiagnostik des Keuchhustens / U. Heininger [et al.] // Klin. Padiatr. – 1995. – V.207. – P.277-280.
287. DeShazer D., Wood G.E., Friedman R.L. (1995) Identification of a B.pertussis regulatory factor required for transcription of the pertussis toxin operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 177, 3801-3807.
288. Di Fabio, J. L., M. Caroff, D. Karibian, J. C. Richards, and M. B. Perry. Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O chains produced by B.bronchiseptica and B.parapertussis. FEMS Microbiol. Lett., 1992, 97:275-282.
289. Dixon P.M., Jackson D.M., Richards I.M. The effect of a respiratory tract infection on histamine induced changes in lung mechanics and irritant receptors discharge in dogs. Am Rev Respir Dis 1979; 120:843-848.
290. Dixon P.M. Intratracheal antibiotic treatment. Vet Rec 1988; 122:443.
291. Domenighini, M., Reiman, D., Capiou, C., Falkow, S., Prugnola, A., Scarlato, V. & Rappuoli, R. Genetic characterization of B.pertussis filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. Mol Microbiol., 1990, 4:787-800.
292. Dorset, M., C. N. McBryde, and W. B. Niles. 1922. Remarks on «hog flu.» J. Am. Vet. Med. Assoc. 62:162-171.
293. Douglas E. Identification of B.pertussis in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene / E. Douglas, J.G. Coole, R. Parton // J. Med. Microbiol. – 1993. – V.38. – P.140-144.
294. Dugal, F., Girard C., Jacques M. (1990) Adherence of B.bronchiseptica 276 to porcine trachea maintained in organ culture. Applied and Environmental Microbiology 56, 1523-1529
295. Dunne H.W., Kradel D.C., Doty R.B. 1961. B.bronchiseptica (Brucella bronchiseptica) in pneumonia in young pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 139:897-899.
296. Dworkin M.S., Sullivan P.S., Buskin S.E. et al. B.bronchiseptica infection in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin Infect Dis 1999; 28:1095-9.
297. Edwards D.F., Kennedy J.R., Toal R.L. et al. Kartagener's syndrome in a chow chow dog with normal ciliary ultrastructure. Vet Pathol 1989; 26:338-340.
298. Edwards J.A. B.bronchiseptica Adherence to Cilia Is Mediated by Multiple Adhesin Factors and Blocked by Surfactant Protein A / J.A. Edwards, N.A. Groothouse, S. Boitano // Infection and Immunity. □ 2005. – V.73. – №6. – P.3618-3626.
299. Eldering G., Kendrick P. 1938. Bacillus parapertussis: a species resembling both Bacillus pertussis and Bacillus bronchisepticus but identical with neither. J. Bacteriol. 35:561-572.
300. Eldering G. 1941. A study of the antigenic properties of Hemophilus pertussis and related organisms. I. An antigenic fraction obtained from Brucella bronchiseptica. Am. J. Hyg. 34:1-7.
301. Eldering G. Serological study of B.pertussis and related species / G. Eldering, C. Hornbeck, J. Baker // J. Bacteriol. – 1957. – V.74. – P.133-136.
302. Eldering G. Attempts to separate the protective antigen and agglutinin of B.pertussis / G. Eldering // Round table conference on pertussis immunization, Prague. – 1962. – V.1. – P.81-96.
303. Eldering G. Fluorescent antibody staining and agglutination reactions in B.pertussis cultures / G. Eldering, W.C. Eveland, P.L. Kendrick // J. Bacteriol. – 1962. – V.83. – P.745-749.
304. Elias B., Boros G., Albert M., Tuboly S., Gergely P., Papp L, Barna Vetro, Rafai I.P., Molnar E. (1990) Clinical and pathological effects of the dermonecrotic toxin of B.bronchiseptica and Pasteurella multocida in specific-pathogen-free piglets. Japanese Journal of Veterinary Science 52, 677-688
305. Elliott H. B.bronchiseptica in a closed cat colony. Vet Rec 129-174, 1991.
306. Eman M. E. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples / M. E. Eman, A. M. Heba, F. A. Afify // Journal of Medical Microbiology, 2003. – N 52. – P.331-335.
307. Emsley P., I.G.Charles, N.F.Fairweather, and N.W. Issaacs. Structure of B.pertussis virulence factor P.69 pertactin. Nature, 1996, 381:90-92.
308. Endoh M. Adenylate cyclase activity of Bordetella organisms. I. Its production in liquid medium / M. Endoh, T. Toshiyuki, Y. Nakase // Microbiol. Immunol. – 1980. – V.24. – P.95-104.
309. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki [et al.] // Science. – 1985. – V.230. – P.1350-1354.
310. Evans D.G. The preparation of the toxin of H.pertussis; its properties and relation to immunity / D.G. Evans, H.B. Maitland // J. Pathol. Bacteriol. – 1937. – V.45. – P.715-731.
311. Evans G. The toxin of B.bronchiseptica and the relationship of this organism to H. pertussis / G. Evans, H.B. Maitland // J. Pathol. – 1939. – V.48. – P.67- 78.

312. Everest, P., J.Li, G.Douce, I.Charles, J.De Azavedo, S.Chatfield, G.Dougan, and M.Roberts. Role of the B.pertussis P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology*, 1996, 142:3261-3268.
313. Fass R.J., Barnishan J. 1980. In vitro susceptibilities of nonfermentative gram-negative bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* to 32 antimicrobial agents. *Rev. Infect. Dis.* 2:841-853.
314. Ferry N.S. 1910. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am. Vet. Rev.* 37:499-504.
315. Ferry N.S. 1911. Etiology of canine distemper. *J. Infect. Dis.* 8:399-20.
316. Ferry N.S. 1912. *Bacillus bronchisepticus* (bronchicanis): the cause of distemper in dogs and a similar disease in other animals. *Vet. J.* 68:376-391.
317. Ferry N.S. 1913. Bacteriology and control of acute infections in laboratory animals. *J. Pathol.* 18:445-455.
318. Ferry N.S. 1917. Canine distemper. *Proc. Wis. Vet. Med. Assoc.* 1917:80-88.
319. Filamentous hemagglutinin and the 69-kDa protein, pertactin promote adherence of *B.pertussis* to epithelial cells and macrophages. In C. R. Manclark (ed.), *Sixth International Symposium on Pertussis Abstracts*. DHHS publication no. (FDA) 90-1162 / A. Bhargava [et al.] // Department of Health and Human Services, U.S. Public Health Service, Bethesda, Md. – 1990. – P.137-138.
320. Filamentous hemagglutinin of *B.bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization / P.A. Cotter [et al.] // *Infect. Immun.* – 1998. – V.66. – P.5921-5929.
321. Fimbrial phase variation in *B.pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation / R. Willems [et al.] // *EMBO J.* – 1990. – V.9. – P.2803-2809.
322. Finlay B.B., Falkow S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Bbl. Rev.* 61, 136-169.
323. Fier Radovan, Ji í Ma ín, Marek Basler, Jan Kr ek, Veronika puláková, Ivo Konopásek, and Peter ebo. Third Activity of *Bordetella Adenylate Cyclase (AC) Toxin-Hemolysin*. *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, Issue 5, 2808-2820, February 2, 2007.
324. Fisher S. The haemagglutinin of *Haemophilus pertussis*. II. Observations on the structure of the haemagglutinating complex of culture supernatants / S. Fisher // *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.* – 1950. – V.28. – P.509-516.
325. Fisk S.K., Soave O.A. *B.bronchiseptica* in laboratory cats from central California. *Lab Anim Sci* 23:33-35, 1973.
326. Flosdorf E.W. Separation of the Phase I agglutinin of *H.pertussis* from toxic components / E.W. Flosdorf, A.C. Kimball // *J. Immunol.* – 1940. – V.39. – P.475-494.
327. Ford R.B., Vaden S.L. Canine infectious tracheobronchitis. In: Greene CE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1990; 259-265.
328. Forde C.B., Parton R., Coote J.G. (1998) Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *B.bronchiseptica* in murine phagocytes. *Infect. Immun.* 66, 3198-3207.
329. Forde C.B., Shi X., Li J., Roberts M. (1999) *B.bronchiseptica*-m&d mX&d cytotoxicity to macrophages is dependent on bvg-regulated factors, including pertactin. *Infect. Immun.* 67, 5972-5978.
330. Gallagher G. L. Isolation of *Bordetella bronchiseptica* from horses / G. L. Gallagher // *Vet. Rec.*, 1965. – N 77. – P.632-633.
331. Gaskell R.M., Dawson S., Jacobs, A.A., Sewell B.W. (1997) The role of *Bordetella* in feline respiratory disease. In: *Consultations in Feline Internal Medicine*. Ed J. R. August. W. B. Saunders, Philadelphia, pp 34-36.
332. Gaskell R.M., Hart CA. (1998) The use of pulsed-field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *B.bronchiseptica* isolated from cats and other species. *Epidemiology and Infection* 120, 201-208.
333. Genetic Basis for Lipopolysaccharide O-Antigen Biosynthesis in *B.e* / A. Preston [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – V.67. – №8. – P.3763-3767.
334. Genetic characterization of *B.pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor / M. Domenighini [et al.] // *Mol Microbiol.* – 1990. – V.4. – P.787-800.
335. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp / J.M Musser [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1986. – V.166. – P.230-237.
336. Gentry-Weeks, C.R., Provence, D.L., Keith, J.M. and Curtiss, R. (1991) Isolation and characterization of *Bordetella avium* phase variants. *Infect. Immun.* 59, 4026-4033.
337. Gerlach G., von Wintzingerode F., Middendorf B., Gross R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella* // *Microbes Infect.* - 2001. - V. 3. - P. 61-72.
338. Ghosh H.K., Tranter J. 1979. *Bordetella bronchicanis* (*bronchiseptica*) infection in man: review and a case report. *J. Clin. Pathol.* 32:546-548.

339. Giardina P.C., Foster L.A., Musser J.M. et al. (1995) bvg repression of alcaligin synthesis in *B.bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. / *Bacteriol.* 177, 6058-6063.
340. Glickman L.T., Appel M.J. Intranasal vaccine trial for canine infectious tracheobronchitis (kennel cough). *Lab Anim. Sci.* 31:397-399, 1981.
341. Goodnow R.A., Shade F.J. 1979. Control of bordetellosis in the dog. *Canine Pract.* 6:43-46.
342. Goodnow R.A. 1980. Biology of *B.bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44:722-738.
343. Goodnow R.A., Shade F.J. Control of canine bordetellosis. *Mod Vet Pract* 61:597-598, 1980.
344. Graham A.C., Abruzzo G.K. Occurrence and characterization of plasmids in field isolates of *Bordetella bronchiseptica* // *Am J Vet Res* - 1982. - V.43. - P. 1852-1855.
345. Grabar P. *Biochim. / P. Grabar, C. Williams // Biophys. Acta.* - 1953. - V.10. - P.193.
346. Graigie J. Demonstration of types of *b tyfosus* by means of preparations of types / J. Graigie, C. Yan // *Canad. Publ. Hith. J.* - 1938. V. 29. - N 9. - P. 448.
347. Greig A.S. The significance of a pleuropneumonia - like organism in kennel cough. *Can J Comp Med* 18:275-278, 1954.
348. Gueirard P., Guiso N. Virulence of *B.bronchiseptica*: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 1993; 61: 4072-4078.
349. Gueirard P., Weber C., Le Coustumier A. et al. Human *B.bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2002-2006.
350. Gueirard P., Minoprio P., Guiso N. (1996) Intranasal inoculation of *B.bronchiseptica* in mice induces long-lasting antibody and T cell-mediated immune responses. *Scand. J. Immun.* 43, 181-192.
351. Guzman C.A., Rohde M., Bock M., Timmis K.N. (1994) Invasion and intracellular survival of *B.bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 62, 5528-5537.
352. Hackett I.J. Intratracheal treatment. *Vet Rec* 122:119, 1988.
353. Hackett, M., Walker, C. B., Guo, L., Gray, M. C., Van, C. S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hewlett, E. L., and Sebo, P. Hemolytic, but Not Cell-invasive Activity, of Adenylate Cyclase Toxin Is Selectively Affected by Differential Fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1995, Volume 270, Number 35, Issue of September 01, pp. 20250-20253.
354. Hanski, E. and Z. Farfel. *B.pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, Issue 9, 5526-5532, May, 1985.
355. Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. (1999) Pregenomic comparative analysis between *B.bronchiseptica* RB50 and *B.pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. *Infect. Immun.* 67, 6109-6118.
356. Harvill E.T., Cotter P.A., Yuk M.H., Miller J.F. (1999) Probing the function of *B.bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect. Immun.* 67, 1493-1500.
357. Harvill, E.T., A. Preston, P. A. Cotter, A. G. Allen, D. J. Maskell, J. F. Miller. Multiple Roles for *Bordetella* Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection. *Infection and Immunity*, December 2000, Vol. 68, No. 12, p.6720-6728.
358. Hedges R. W., Jacob A. E., Smith, J. T. Properties of an R factor from *Bordetella bronchiseptica* // *J Gen Microbiol* -1974. - V. 84. - P.199-204.
359. Heiby N. Cross-reactions between *B.pertussis* and twenty-eight other bacterial species / N. Heiby, J.B. Hertz, V.Andersen // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* - 1976. - V.84. - P.395-400.
360. Hemolytic, but Not Cell-invasive Activity, of Adenylate Cyclase Toxin Is Selectively Affected by Differential Fatty-acylation in *Escherichia coli* / M. Hackett [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V.270. - №35. - P.20250-20253.
361. Henderson, I.R., and J.P.Nataro. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infetions Immunology*, 2001, 69:1231-1243.
362. Hirsch D.C. Bacteriology of the lower respiratory tract. In Kirk RW (ed): *Current Veterinary Therapy VIII. Small Animal Practice*. Philadelphia, WB Saunders, 1986, pp 247-250
363. Holby N. Cross-reactions between *B.pertussis* and twenty-eight other bacterial species / N. Holby, J.B. Hertz, V.Andersen // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology.* - 1977. - V.84. - №.6. - P.395-400.
364. Honeybourne D., Baldwin D.R. The site concentrations of antimicrobial agents in the lung. *Antimicrob Chemother* 1992; 30:249-260.
365. Hooper P.T. *Mycoplasma polyarthritidis* in a cat with probable severe immune deficiency / P.T. Hooper, L.A. Ireland, A. Carter // *Vet. J.* - 1985. - N 62. -P. 352.
366. Hoppe J.E. Comparison of three kinds of blood and two incubation atmospheres for cultivation of *Bordetella pertussis* on charcoal agar / J.E. Hoppe, M. Schlagenhauf // *J. Clin. Microbiol.* - 1989. - N 27. - P. 2115-2117.

367. Horiguchi Y., Matsuda H., Koyama H. et al. B.bronchiseptica dermonecrotizing toxin suppresses in vivo antibody responses in mice. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 90:229-234.
368. Horiguchi Y., Inoue N., Masuda M. et al. (1997) B.bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganisation of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *J. Chem.* 94, 11623-11626.
369. Hoskins J.D., Williams J., Roy A.F. et al: Isolation and characterization of B.bronchiseptica from cats in southern Louisiana. *Vet Immunol Immunopathol* 65:173, 1998.
370. Hozbor D. Detection of Bordetella bronchiseptica by the polymerase chain reaction / D. Hozbor, F. Fouque, N. Guiso // *Res. Microbiol.* – 1999. – N 150. – P. 333–341.
371. Hutchison R.V. Intratracheal gentamicin and dexamethasone for treatment of infectious tracheobronchitis in the dog. *Vet Med/Small Anim Clin* 70:943-945, 1975.
372. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from B.pertussis / I.G. Charles [et al.] // *Eur. J. Immunol.* – 1991. – V.21. – P.1147-1153.
373. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from B.pertussis / S.M. Prasad [et al.] // *Infect Immun.* – 1993. – V.61. – P.2780-2785.
374. Identification of B.pertussis infection by shared-primer PCR / Z. Li [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – V.32. – P.783-789.
375. Immunoblot analysis of humoral immune responses following infection with B.pertussis or immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine / S.C. Redd [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1988. – V.26. – P.1373-1377.
376. Inatsuka C.S. B. filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity / C.S. Inatsuka, S.M. Julio, P.A. Cotter // *Pnas.* – 2005. – V.102. – №51. – P.18578-18583.
377. Interaction of Calcium with B.pertussis Adenylate Cyclase Toxin / T. Rose [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V.270. – №44. – P.26370-26376.
378. Isenberg H. D. Clinical microbiology procedures handbook / H. D. Isenberg // American Society for Microbiology, Washington, D.C., – 1992.
379. Iwaki M. Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of B.pertussis adenylate cyclase toxin / M. Iwaki, A. Ullmann, P. Sebo // *Mol. Microbiol.* – 1995. – V.17. – №6. – P.1015-1024.
380. Jacobs A.A.C., Chalmers W.S.K., Pasman J., van Vugt F., Cuenen L.H. (1993) Feline bordetellosis: challenge and vaccination studies. *Veterinary Record* 133, 260-263.
381. Jacob-Dubuisson, F., B. Kehoe, E. Willery, N. Reveneau, C. Loch, and D. A. Relman.. Molecular characterization of B.bronchiseptica filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology*, 2000, 146:1211-1221.
382. Jacob-Dubuisson, F., Buisine, C., Mielcarek, N., Clement, E., Menozzi, F. D. & Loch, C. Amino-terminal maturation of the B.pertussis filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol.*, 1996, 19:65-78.
383. Johnson R., Sneath P.H.A. 1973. Taxonomy of Bordetella and related organisms of the families Achromobacter-aceae, Brucellaceae, and Neisseriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:381-104.
384. Joubert L. Pneumonie enzootique du porc a Bordetella bronchiseptica / L. Joubert, A. L. Courtieu, J. Ouda // *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp. Lyon*, 1960. – N 63. – P. 329-344.
385. Jubb K. The respiratory system, In *Pathology of domestic animals* / K. Jubb, P.C. Kennedy // Academic Press, Inc., New York. – 1963. – V.1. – P.137-145.
386. Julian Parkhill, Mohammed Sebaihia, Andrew Preston et al. (2003) Comparative analysis of the genome sequences of B.pertussis, B.parapertussis and B.bronchiseptica. *Nature genetics* Advance online publication. doi:10.1038/ng1227.
387. Jungnitz H., West N.P., Walker M.J. et al. (1998) A second two-component regulatory system of B.bronchiseptica required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase and in vivo persistence. *Infect. Immun.* 66, 4640-4650.
388. Kadlec K. Detection and organization of antimicrobial resistance genes in B.bronchiseptica isolates from pigs. Institute for Animal Breeding, Federal Agricultural Research Centre (FAL), Neustadt-Mariensee, Germany, 2006.
389. Kamachi K, Sota M, Tamai Y. et al. Plasmid pBP136 from Bordetella pertussis represents an ancestral form of IncP-1 beta plasmids without accessory mobile elements // *Microbiology.* – 2006. – V. 152(Pt12). – P.3477-84.
390. Karlin, S. (2001) Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. *Trends Microbiol.*, 9:335-343.
391. Kattar M.M., Chavez J.F., Limaye A. P. et al. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify Bordetella hinzii as the causative agent of fatal septicemia // *J Clin Microbiol* - 2000. - V. 38. - P. 789-794.

392. Katzenstein D.A., Ciofalo L., Jordan M. C. 1984. B.bronchiseptica bacteremia. West. J. Med. 140:96-98.
393. Keogh E. V. Haemagglutinins of the Haemophilus group / E. V. Keogh, E. A. North, M. F. Warburton // Nature, London, 1947. – P. 160-163.
394. Kersters K., Hinz K.H., Hertle A., Segers P., Lievens A., Siegmann O., J. De Ley (1984). Bordetella avium sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. International Journal of Systematic Bacteriology 34, 56-70.
395. Khelef, N., and Guiso, N. Induction of macrophage apoptosis by B.pertussis adenylate cyclase-hemolysin. FEMS Microbiol. Lett., 1995, 134, 27–32.
396. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol., 1971, 56:341-361.
397. Kobayashi S. Studies on the hemolytic factor of B.bronchiseptica / S. Kobayashi // Jpn. J. Bacteriol. – 1961. – V.13. – P.322-329.
398. Kontor E.J., Wegrzyn R.J., Goodnow R.A. Canine infectious tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine parainfluenza - B.bronchiseptica vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). Am. Vet Res 1981; 42:1694-1698.
399. Kristensen K.H., Lautrop H. 1962. Eri familieepidemi forarsaget af kighostebakterien B.bronchiseptica. Ug-eskr. Laeg. 124:303-308.
400. Kuehn M. J. Establishing communication via Gram-negative bacterial pili / M.J. Kuehn // Trends Microbiol. – 1997. – V.5. – P.130-132.
401. Labaw L.W. Periodic structure in the flagella of Brucella bronchiseptica / L.W Labaw, V.M. Mosley // Biochim. Biophys. Acta. – 1955. – V.17. – P.322-324.
402. Laboratory diagnosis of pertussis infections: the role of PCR and serology / N.K. Fry [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2004. – V.53. – P.519-525.
403. Lacey B.W. The influence of growth conditions on the antigenic structure of H.pertussis, parapertussis, bronchisepticus / B.W. Lacey // In Sixth International Congress of Microbiology, Rome, Italy. – 1953. – V.1 – P.357.
404. Lack of functional complementation between B.pertussis filamentous hemagglutinin and Proteus mirabilis HpmA hemolysin secretion machineries / F. Jacob-Dubuisson [et al.] // J. Bacteriol. – 1997. – V.179. – P.775-783.
405. Lacerda H.M., Pullinger G.D., Lax A.J. and Rozengurt, E. (1997). Cytotoxic necrotizing factor 1 from Escherichia coli and dermonecrotic toxin from B.bronchiseptica induce p21(rho)-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and pax-illin in Swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. III, 9587-9596.
406. Lawrence A.J. Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of B.pertussis infection / A.J. Lawrence J.C. Paton. // J Clin Microbiol. – 1987. – V.25. □ №11. – P.2102-2104.
407. Lax A.J., Walker C.A.. Plasmids related to RSF1010 from Bordetella bronchiseptica // Plasmid -1986. - V. 15. - P. 210-216.
408. Leininger, E., C.A.Ewanowich, A.Bhargava, M.S.Peppler, J.G.Kenimer, and M.J.Brennan. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the B.pertussis adhesions pertactin and filamentous hemagglutinin. Infect.Immunology, 1992, 60:2380-2385.
409. Lenz D.H., Weingart C.L., Weiss A.A. (2000) Phagocytosed B.pertussis fails to survive in human neutrophils. Infect. Immun. 68, 956-959.
410. Leslie P.H. The phases of Haemophilus pertussis / P.H. Leslie A.D. Gardner // J. Hyg. – 1931. – V.31. – P.423-434.
411. Libanore M., Rossi M.R., Pantaleoni M., Bicocchi, R., Carradori S., Sighinolfi L., Ghinelli F. (1995) B.bronchiseptica pneumonia in an AIDS patient: a new opportunistic infection. Infection 23, 312-313.
412. Lichtinghagen R. Identification of B.pertussis in nasopharyngeal swabs using the polymerase chain reaction: evaluation of detection methods / R. Lichtinghagen, R. Diedrich-Glaubitz, B. von Horsten // Eur.J.Clin. Chem.Clin. Biochem. – 1994. – V.32. – P.161-167.
413. Linnemann C.C., Perry E.B. Bordetella parapertussis. Recent experience and a review of the literature //Am. J. Dis. Child. -1977. - V.131. - P. 560-563.
414. Liu M, Deora R., Doulatov S. et.all Reverse Transcriptase-Mediated Tropism Switching in Bordetella Bacteriophage // Science. - 2002. - V. 295. - P. 2091- 2094.
415. Switching Cassettes // J. Bacteriol. - 2004. - V. 186. - P. 503-1517.Locht C. Common accessory genes for the B.pertussis filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families / C. Locht, M.C. Geoffroy, G. Renaud // EMBO J. – 1992. – V.11. – P.3175-3183.
416. Locht, C, Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renaud, G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent Bordetella spp. Mol Microbiol., 1993, 9:653-660.

417. Locht C. Antoine and F. Jacob-Dubuisson. B.pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects / C. Locht // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2001. – V.4. – P.82-89.
418. Lode H., Kemmerich B. Rational use of new antibiotics in respiratory infections. In: Pennington JE, ed. *Respiratory infections: diagnosis and management*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994;767-777.
419. Lopez M.M. 1952. El genero *Bordetella*. *Microbiol. Esp.* 5:177-181.
420. Luderitz, O., C. Galanos, H. J. Risse, E. Ruschmann, S. Schlecht, G. Schmidt, H. Shulte-Holthausen, R. Wheat, and O. Westphal. Structural relationships of *Salmonella* O and R antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1966, 133:349-374.
421. MacLennan A.P. Specific lipopolisaccharides of *Bordetella* / A.P. MacLennan // *Biochem. J.* – 1960. – V.74. – P.398-409.
422. Magyar T. Atrophic rhinitis vaccine composition triggers different serological profiles that do not correlate with protection / T. Magyar, T. Donkó, F. Kovács // *Acta Vet. Hung.* – 2008. – P. 27–40.
423. Manclark C.R. Serological response to *B. pertussis*. In N. R. Rose and H. Friedman (ed.) / C.R. Manclark, B. Meade // *Manual of clinical immunology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. – 1985. – P.496-499.
424. Mastrantonio P. Polymerase chain reaction for the detection of *B.pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates / P. Mastrantonio, P. Stefanelli, M. Giuliano // *J. Med. Microbiol.* – 1996. – V.44. – P.261-266.
425. Masuda M., Betancourt L., Matsuzawa T. et al. (2000) Activation of Rho through a crosslink with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J.* 19, 521-530.
426. Mattoo S., Miller J.F., Cotter P.A. (2000) Role of *B.bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect. Immun.* 68, 2024-2033.
427. Mattoo, S., Foreman-Wykert, A.K., Cotter, P.A. & Miller, J.F. 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front. Biosci.*, 6: E168-E186.
428. Mattoo S. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies / S. Mattoo, J. D. Cherry // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2005. – N 18(2). – P. 326-382.
429. McArdle H.C, Dawson S., Coutts A.J., Bennen M., Hart C.A., Ryvar, R., Gaskell R.M. (1994) Seroprevalence and isolation rate of *B.bronchiseptica* in cats in the UK. *Veterinary Record* 135, 506-507.
430. McCandlish I.A.P., Thompson H., Wright N.G. Vaccination against canine bordetellosis using an aluminum hydroxide adjuvant vaccine. *Res Vet Sci* 1978; 25:51-57.
431. McCandlish I.A.P., Thompson H. Vaccination against *B.bronchiseptica* infection in dogs using a heat-killed bacterial vaccine. *Res Vet Sci* 25:45-50, 1978.
432. McCandlish I.A.P., Thompson H. Canine bordetellosis: Chemotherapy using a sulfa-diazine-trimethoprin combination. *Vet Rec* 104:51-54, 1979.
433. McGowan, J.P. (1911) Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called 'distemper'. *Journal of Pathology and Bacteriology* 15, 372-426.
434. McKiernan B.C. Principles of aerosol therapy-applications in the canine, in *Proceedings. III Vet Respir Symp* 1978; 110-122.
435. McKiernan B.C., Smith A.R., Kissil M. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20:139-142.
436. McMillan D.J., Shojaei M., Chhatwal G.S. et al. (1996) Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *B.bronchiseptica*. *Microb. Pathog.* 21, 379-394.
437. McMillan D. J. Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica* / D. J. McMillan, M. Mau, M. J. Walker // *Gene.* – 1998. – N 208. – P. 243–251.
438. McMillan D.J., E. Medina, C.A.Guzmán, M.J. Walker. Expression of urease does not affect the ability of *B.bronchiseptica* to colonise and persist in the murine respiratory tract. *FEMS Microbiol Lett.*, 1999, Sep.1;178(1):7-11.
439. Meade B.D. Serodiagnosis of pertussis. In C. R. Manclark (ed.) / B.D. Meade, C.M. Mink, C.R. Manclark // *Proceedings of the 6th International Symposium on Pertussis*, DHHS no. (FDA). – 1990. – V.90 – P.322-329.
440. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis / S. Mattoo [et al.] // *Front. Bioschimie.* – 2001. – V.6. – P.E168-E186.
441. Menozzi F.D. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *B.pertussis* and *B.bronchiseptica* / F.D. Menozzi, C. Gantiez, C. Locht // *Infect Immun.* – 1991. – V.59. – P.3982-3988.
442. Miller J.F. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence / J.F. Miller, J.J. Mekalanos, S. Falkow // *Science.* – 1989. – V.243. – P.916-922.

443. Mingshun L. Genomic and Genetic Analysis of Bordetella Bacteriophages Encoding / L. Mingshun, M. Gingery // Journal of bact. – 2004. – P. 1503-1517.
444. Mishulow L. Beef-heart charcoal agar for the preparation of pertussis vaccines. / L. Mishulow, L. S. Sharpe, L. L. Cohen // Am. J. Public Health. – 1953. – N 43. – 1466 p.
445. Mobley H. L. T. Molecular biology of microbial ureases / H. L. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger // Microbiol. – 1995. – N 59. – P. 451-480.
446. Molecular analysis of the bvg-repressed urease of B.bronchiseptica / D.J. McMillan [et al.]// Microbial Pathogenesis. – 1996. – V.21. – №5. – P.379-394.
447. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus wlb from B.pertussis, B.parapertussis and B.bronchiseptica / A.G. Allen [et al.] // Molecular Microbiology. – 1998. – V.29. – №1. – P.27-38.
448. Molecular characterization of B.bronchiseptica filamentous haemagglutinin and its secretion machinery / F. Jacob-Dubuisson [et al.] // Microbiology. – 2000. – V.146. – P.1211-1221.
449. Molecular characterization of B.bronchiseptica filamentous haemagglutinin and its secretion machinery / F. Jacob-Dubuisson [et al.] // Microbiology. – 2000. – V.146. – P.1211-1221.
450. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic Escherichia coli / J.M. Fleckenstein [et al.] // Infect. Immun. – 1996. – V.64. – P.2256-2265.
451. Monack D.M., Arico B., Rappuoli R., Falkow S. (1989) Phase variants of B.bronchiseptica arise by spontaneous deletions of the vir locus. Molecular Microbiology 10, 545-553.
452. Moxon E.R. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors / E.R. Moxon, J.S. Kroll // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1990. – P. 65–85.
453. 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.
454. Multilocus sequence typing of B.pertussis based on surface protein genes / I.H. Van Loo [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2002. – V.40. – P.1994-2001.
455. Multiple Roles for Bordetella Lipopolysaccharide Molecules during Respiratory Tract Infection / E.T. Harvill [et al.] // Infection and Immunity. – 2000. – V.68. – №12. – P.6720-6728.
456. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of B.pertussis and B.parapertussis in nasopharyngeal specimens / L.M. Sloan [et al.] // J. Clin Microbiol. – 2002. – V.40. – №1. – P.96-100.
457. Munoz J. Activities of B.pertussis antigens I. Immunological and other biological activities of B.pertussis antigens / J. Munoz // Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. – 1963. – V.27. – P.325-340.
458. Munoz J. Antigens of B.pertussis. I. Activities of cell walls and protoplasm / J. Munoz, E. RiBi, C.L. Larson // J. Immunol. – 1959. – V.83. – P.496-501.
459. Munoz J. Comparison of B.pertussis cells and Freund's adjuvant with respect to their antibody inducing and anaphylactogenic properties / J. Munoz // J. Immunol. – 1963. – V.90. – P.132-139.
460. Munoz J. The use and limitations of serum-agar techniques in studies of proteins. Serological approaches to studies of protein structure and metabolism / J. Munoz // Rutgers University Press, New Brunswick, N.J. – 1954. – P.55-73.
461. Nakase Y. Studies on Hemophilus bronchisepticus. II. Phase variation of H. bronchisepticus / Y. Nakase // Kitasato Arch. Exp. Med. – 1957. – V. 30. – P.73-77.
462. Nakase Y. Studies on Hemophilus bronchisepticus. I. The antigenic structures of H. bronchisepticus from guinea pig / Y. Nakase // Kitasato Arch. Exp. Med. – 1957. – V.30. – P.57-72.
463. New species of Bordetella, Bordetella ansorpii sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst / Kwan Soo Ko [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2005. – N 06. – P. 2516-2519.
464. Njamkepo, E., Pinot, F., Francois, D., Guiso, N., Polla, B. S., and Bachelet, M. Adaptive responses of human monocytes infected by B.pertussis: The role of adenylate cyclase hemolysin. J. Cell. Physiol, 2000, 183, 91–99.
465. Nicholson M.L. Disruption of tonB in B.bronchiseptica and B.pertussis prevents utilization of ferric siderophores, hemin and hemoglobin as iron sources / M.L. Nicholson, B. Beall // Microbiology (Reading, United Kingdom). – 1999. – V.145. – P.2453-2461.
466. Novotny P., Chubb A.P., Cowley K., Montaraz J.A. (1985) Adenylate cyclase activity of a 68,000 molecular weight protein isolated from the outer membrane of B.bronchiseptica. Infection and Immunity 50, 199-206.
467. Nucleotide sequence of the fim3 gene from B.pertussis and homology to fim2 and fimX gene products / A. Cuzzoni [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1990. – V.18. – P.1640.
468. Oddy J.G. The effects produced by toxic and nontoxic extracts of H. pertussis and B.bronchiseptica on the blood sugar of rabbits / J.G. Oddy, D.G. Evans // J. Pathol. – 1940. – V.56. – P.11-16.
469. Ostle G.N. Cough associated with canine vaccination? Vet Rec 125:446, 1989.

470. Ouchterlony O., Act. Pathol / O. Ouchterlony // Microbiol. Scand. – 1948. – V.25. – P.186.
471. Padrid P.A., Hornof W.J., Kurpershoek C.J. et al. Canine chronic bronchitis: a pathophysiologic evaluation of 18 cases. J Vet Intern Med 1990; 4:172-180.
472. Papasian C.J., Downs N.J., Talley R.L., Romberger D.J., Hodges G.R. 1987. B.bronchiseptica bronchitis. J. Clin. Microbiol. 25:575-577.
473. Parfentjev I.A. Anaphylaxis and histamine shock in mice / I.A. Parfentjev // Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. – 1955. – V.89. – P.297-299.
474. Parker C. Role of the genetics and physiology of B.pertussis in the production of vaccine and the study of host-parasite relationships in pertussis / C. Parker // Adv. Appl. Microbiol. – 1976. – V.25. – P.258-264.
475. Parton R., Hall E., Wardlaw A.C. (1994) Responses to B.pertussis mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis. J. Med. Microbiol. 40, 307-312.
476. Pearce H.G. Infections porcine atrophic rhinitis: a review / H.G. Pearce, C.K. Roe // Can.Vet. J. – 1966. – V.7. – P.243-251.
477. Parkhill J., Sebaihia M., Preston A. et al. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica// Nat. Genet. - 2003. - V. 35. - P. 32-40.
478. Parton R. (1998) Bordetella. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (A. Balows and B. Duerden, eds), pp. 901-918. Edward Arnold, London.
479. Pedersen K.B. Some factors influencing the haemolysis of B.bronchiseptica / K.B. Pedersen // Pathol. Microbiol. Scand. – 1976. – V.84. – P.75-78.
480. Peppler, M.S., M.E. Schrupf. 1984. Phenotypic variation and modulation in Bordetella bronchiseptica. Infection and Immunity, June, p:681-687.
481. Physiology of B.pertussis / W. Dobrogosz [et al.] // Proceedings of the Third International Symposium on Pertussis U.S., 1978. – Department of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1978. – P.86-93.
482. Pickett M.J., Manclark C.R. 1970. Nonfermentative bacilli associated with man. 1. Nomenclature. Am. J. Clin. Pathol. 54:155-163.
483. Pickett M.J., Greenwood J.R. 1986. Identification of oxidase-positive, glucose-negative, motile species of nonfermentative bacilli. J. Clin. Microbiol. 23:920-923.
484. Pittman M. (1984) Genus Bordetella Moreno-Lopez 1952. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds N. R. Krieg and J. G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 388-393.
485. Poddar S.K. Rapid detection of B.pertussis by real-time PCR using SYBR green I and a LightCycler instrument / S.K. Poddar // J. Clin. Lab. Anal. – 2004. – V.18. – P.265-70.
486. Porter J.F., Parton R., Wardlaw A.C. Growth and survival of B.bronchiseptica in natural waters and in buffered saline without added nutrients. Appl Environ Microbiol 57:1202-1206, 1991.
487. Porter J.F., Wardlaw A.C. Long term survival of B.bronchiseptica in lake water and in buffered saline without added nutrients. FEMS Microbiol Lett 1993; 110:33-36.
488. Preston, A., A. G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C. M. Churcher, K. L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, and D. J. Maskell. Genetic Basis for Lipopolysaccharide O-Antigen Biosynthesis in Bordetellae. Infection and Immunity, August 1999, p. 3763-3767, Vol. 67, No. 8.
489. Probing the function of B.bronchiseptica adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity / E.T. Harvill [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – V.67. – P.1493-1500.
490. Probing the Function of B.bronchiseptica Adenylate Cyclase Toxin by Manipulating Host Immunity / E.T. Harvill [et al.] // Infection and Immunity. – 1999. – V.67. – №3. – P.1493-1500.
491. Proom H. The minimal nutritional requirements of organisms of the genus Bordetella / H. Proom // J. Gen. Microbiol. – 1955. – P. 63-75.
492. Rational medium design for B.pertussis: basic metabolism / M. Thalen [et al.] // J. Biotechnol. – 1999. – V.75. – P.147-159.
493. Redhead K. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of B.pertussis / K. Redhead, T. Hill, H. Chart // J. Gen Microbiol. – 1987. – V.33. – P.891-898.
494. Reed K. E. Restriction enzyme mapping of bacterial urease genes: using degenerate primers to expand experimental outcomes / K. E. Reed // Biochem. Mol. Biol. Edu. – 2001. – N 29. – P. 239-244.
495. Regan J. Enrichment medium for the isolation of Bordetella / J. Regan, F. Lowe // J. Clin. Microbiol. – 1977. – N 6. – P. 303-309.
496. Relationship between functional assays and enzyme immunoassays as measurements of responses to acellular and wholecell pertussis vaccines / B.D. Meade [et al.] // Pediatrics. – 1995. – V.96. – P.595-600.

497. Rennock P.W. Disease of the lower respiratory tract. / P.W. Rennock, J. Archibald // Canine medicine. American Veterinary Publications Inc. – 1968. – P.572-581.
498. Rhodes, C. R., Gray, M. C., Watson, J. M., Muratore, T. L., Kim, S. B., Hewlett, E. L., and Grisham, C. M. Structural Consequences of Divalent Metal Binding by the Adenylyl Cyclase Toxin of *B.pertussis* Arch. Biochem. Biophys., 2001, Volume 395, Issue 2, 15 November 2001, p.169-176.
499. Richter G.W. Electron microscopy of a strain of *B.bronchiseptica* / G.W. Richter, Y. Kress // J. Bacteriol. – 1967. – V.94. – P.1216-1224.
500. Role of B. O Antigen in Respiratory Tract Infection / V.C. Burns [et al.] // Inf. And immune. – 2003. – V.71. – №1. – P.86–94.
501. Role of *B.pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract / B.M. Van den Berg [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – V.67. – P.1056-1062.
502. Role of the *B.pertussis* P.69-pertactin protein and the P.69-pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells / P. Everest [et al.] // Microbiology. – 1996. – V.142. – P.3261-3268.
503. Role of the ceramide-signaling pathway in cytokine responses to P-fimbriated *Escherichia coli* / M. Hedlund [et al.] // J. Exp. Med. – 1996. – V.183. – P.1037-1044.
504. Ross, P. J., E. C. Lavelle, K. H. G. Mills, and A. P. Boyd. Adenylate Cyclase Toxin from *B.pertussis* Synergizes with Lipopolysaccharide To Promote Innate Interleukin-10 Production and Enhances the Induction of Th2 and Regulatory T Cells. *Infection and Immunity*, March 2004, p.1568-1579, Vol.72, No.3.
505. Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., and Ladant, D. Interaction of Calcium with *B.pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.*, 1995, Volume 270, Number 44, Issue of November 3, pp. 26370-26376.
506. Roudebush P., Fales W. Antibacterial susceptibility of *B.bronchiseptica* isolates from small companion animals with respiratory disease. *J Am Anim Hosp Assoc* 17:793-797, 1981.
507. Roudebush P. Bacterial infections of the respiratory system. In: Greene CE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1990; 114-124.
508. Roy C.R. Autogenous regulation of the *B.pertussis* bvgABC operon / C.R. Roy, J.F. Miller, S. Falkow // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V.87. – P.3763-3767.
509. Sacco R.E., Register K.B., Nordholm G.E. Restriction endonuclease analysis discriminates *B.bronchiseptica* isolates. *J Clin. Microbiol.* 2000; 38:4387-93.
510. Sakurai Y., Suzuki H., Terada E. Purification and characterization of hemagglutinin from *B.bronchiseptica*. *J Med Microbiol* 1993; 39:388-392.
511. Savelkoul P.H.M., Kremer B., Kusters J.G. et al. Invasion of HeLa cells by *B.bronchiseptica*. *Microb. Pathog.* 1993; 14: 161-168.
512. Scheer M. Concentrations of active ingredient in the serum and in tissues after oral and parenteral administration of baytril. *Vet Med Rev* 1987; 2:104-118.
513. Schipper H., Krohne G.F., Gross R. Epithelial cell invasion and survival of *B.bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3008-3011.
514. Scheidegger J.J. Une micro-methode de l'immunoelectrophorese / J.J. Scheidegger // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* – 1955. – V.7. – P.103-110.
515. Segment IV of a *Salmonella* flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes / S.M.C. Newton [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 1991. – V.5. – P.419-425.
516. Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme-linked immunosorbent assay using fimbrial hemagglutinin as antigen / M. Granstrom [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1982. – V.146. – P.741-745.
517. Serological response to filamentous hemagglutinin and lymphocytosis promoting toxin of *B.pertussis* / D.G. Burstyn [et al.] // *Infect. Immun.* – 1983. – V.41. – P.1150-1156.
518. Shade F.J., Goodnow R.A. Intranasal immunization of dogs against *Bordetella bronchi-septica*-induced tracheobronchitis (kennel cough) with modified live-*B.bronchiseptica* vaccine: *Am J Vet Res* 40:1241-1243, 1979.
519. Shade F.J., Rapp V.J. Studies of a bacterin incorporating an extracted *B.bronchiseptica* antigen for controlling canine bordetellosis. *VM SAC* 1982; 77:1635-1639.
520. Shelton M.E., Draper D.D., Farington D.O. Control of a tracheobronchitis epizootic associated with *B.bronchiseptica* in a closed dog colony. *Vet Med/Small Anim Clin* 72:189-193, 1977.
521. Shelton C.B., Crosslin D.R., Casey J.L, et al Purification and Characterization of a Temperate Transducing Bacteriophage for *Bordetella avium* // *Journal of Bacteriol.* - 2000. - V. 82. - P. 6130-6136.
522. Shimizu M., Kuninori K., Inoue M., Mitsuhashi S. Drug resistance and R plasmids in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs // *Microbiol Immunol* - 1981.-V. 25.-P. 773-786.
523. Simultaneous detection of *B.pertussis* and *B.parapertussis* using shared-primer PCR including internal control template / N. Schnitzler [et al.] // *Abstract-Band Hygiene und Mikrobiologie.* – 1997. – P.17-18.

524. Skeeles J. K., Arp, L. H // In Diseases of Poultry, Edited by B. W. Calnck and others. Ames, IA: University of Iowa Press. - 1988. - P. 275-288.
525. Snell J.J.S. 1973. The distribution and identification of non-fermenting bacteria, p. 15. Public Health Lab. Serv., Monogr. Ser. No. 4.
526. Snow H.D., Donovan M.L., Washington J.O. et al: Canine respiratory disease in an animal facility. Viral and bacteriology survey. Arch Surg 99:126-128, 1969.
527. Snyder S.B, Fisk S.K., Fox J.G. et al: Respiratory tract disease associated with B.bronchiseptica infection in cats. J Am Vet Med Assoc 163:293-294, 1973.
528. Sorenmo K.U., Jeglum K.A., Helfand S.C. Chemotherapy of canine hemangiosarcoma with doxorubicin and cyclophosphamide. J Vet Intern Med 1993;7:370-376.
529. Sparks S.E., Jones R.L., Kilgore W.R. In vitro susceptibility of bacteria to a ticarcillin-clavulanic acid combination. Am J Vet Res 49:2038-2040, 1988.
530. Speakman AJ, Binns SH, Dawson S, et al: Antimicrobial susceptibility of B.bronchiseptica isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. Vet Microbiol 54:63, 1997.
531. Speakman A. J., Binns S. H., Osborn A. M. et al. Characterization of antibiotic resistance plasmids from Bordetella bronchiseptica // J Antimicrob Chemother —1997.- V. 40. - P. 811-816.
532. Speakman A.J., Dawson S., Binns S.H., Gaskell C.J., Hart C.A., Gaskell R. M. B.bronchiseptica infection in the cat. Small animal practice. Vol. 40. jone1999.
533. Stibitz, S. & Yang, M.S. 1999. Genomic plasticity in natural populations of B.pertussis. J. Bacteriol., 181:5512-5515.
534. Stoll D.B., Murphey S.A., Ballas S.K. 1981. B.bronchiseptica infection in stage IV Hodgkin's disease. Postgrad. Med. J. 57:723-724.
535. Swango L.J. Infectious canine hepatitis and viral tracheo-bronchitis. In: Castro AE, Hueschele WP, eds. Veterinary diagnostic virology: a practitioners guide. St Louis: Mosby-Year Book Inc, 1992; 143-148.
536. Structural and functional properties of a 69-kilodalton outer membrane protein of B.pertussis / M.J. Brennan [et al.] // Tokai J. Exp. Clin. Med. - 1988. - V.3. - P.211-215.
537. Structural Consequences of Divalent Metal Binding by the Adenylyl Cyclase Toxin of B.pertussis / C.R. Rhodes [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. - 2001. - V.15. □ P.169-176.
538. Structural relationships of Salmonella O and R antigens / O. Luderitz [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1966. - V.133. - P.349-374.
539. Structure of B.pertussis virulence factor P.69 pertactin. / P. Emsley [et al.] // Nature. - 1996. - V.381. - P.90-92.
540. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases / K. Kleppe [et al.]// J. Mol. Biol. - 1971. - V.56. - P.341-361.
541. Studies on the chemical and immunological structure of B.pertussis / H. Billaudelle [et al.] //Acta Pathol. Microbiol. Scand. - 1960. - V.50. - P.208-224.
542. Sutherland I.W. Azurin: a copper protein found in Bordetella / I.W.Sutherland // J. Gen. Microbiol. - 1963. - V.30. - P.105-112.
543. Swango L.G. Canine viral diseases. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of veterinary internal medicine; diseases of the dog and cat. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995; 398-409.
544. Switzer W.P., Mare C.J., Hubbard E.D. Incidence of B.bronchiseptica in wildlife and man in Iowa. Am J Vet Res 27:1134-1136, 1966.
545. Terakado N., Azechi H., Ninomiya K., Shimizu T. Demonstration of R factors in Bordetella bronchiseptica isolated from pigs // Antimicrob Agents Chemther - 1973. - V.3.-P. 555-558.
546. Terakado N., Mitsuhashi, S. Properties of R factors from Bordetella bronchiseptica II Antimicrob Agents Chemother -1974. - V. 6. - P. 836-840.Tillier, E.R. & Collins, R.A. 2000. Genome rearrangement by replication-directed translocation. Nat. Genet., 26:195-197.
547. Thalen, M. et al. Rational medium design for B.pertussis: basic metabolism. J. Biotechnol., 1999, 75:147-159.
548. The bvgAS Locus Negatively Controls Motility and Synthesis of Flagella in B.bronchiseptica / B. J. Akerley [et al.] // Journal of bacteriology. - 1992. - V.174. - No.3. - P. 980-990.
549. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent Bordetella/ C. Loch [et al.] // Mol Microbiol. - 1993. - V.9. - P.653-660.
550. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin / P.P. Freestone [et al.] // J Bacteriol. - 2000. - V.182. - P.6091-6098.
551. The tolerance of rabbits for the agglutinin and the toxins of Hemophilus pertussis / W.E. Ehrich [et al.] // Am. J. Med. Sci. - 1942. - V.204. - P.530-539.
552. Third Activity of Bordetella Adenylate Cyclase (AC) Toxin-Hemolysin / Fi er Radovan [et al.] // J. Biol. Chem. - 2007. - V.282. - P.2808-2820.

553. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *B. pertussis* and *B. parapertussis* / Y. Xu [et al.] // *Appl. Microbiol.* – 2010. – V.118. – P.685-91.
554. Thomas M.G. Human serum antibody responses to *B. pertussis* infection and pertussis vaccination / M.G. Thomas, K. Redhead, H.P. Lambert // *J. Infect. Dis.* – 1989. – V.159. – P.211-218.
555. Thompson H., Wright N.G., Cornwell H.J.C. 1975. Contagious respiratory disease in dogs. *Vet. Bull.* 45:479-488.
556. Thompson H, McCandlish I.A.P., Wright N.G. Experimental respiratory disease in dogs due to *B. bronchiseptica*. *Res Vet Sci* 20:16-23, 1976.
557. Thrusfield M.V., Aitken C.G.G., Muirhead R.H. A field investigation of kennel cough: Efficacy of vaccination. *J Small Anim Pract* 30:550-560, 1989.
558. Thrusfield M.V., Aitken C.G.G., Muirhead R.H. A field investigation of kennel cough: efficacy of different treatments. *J Small Anim Pract* 1991; 32:455-459.
559. Thrusfield M.V., Aitken C.G.G., Muirhead R.H. A field investigation of kennel cough: incubation period and clinical signs. *J Small Anim Pract* 1991; 32:215-220.
560. Thrusfield M.V. Canine kennel cough: a review. *Vet Annu* 1992; 32:1-12.
561. Thys J.P., Aoun M., Klastersky J. Local antibiotic therapy for bronchopulmonary infections. In: Pennington J.E., ed. *Respiratory infections: diagnosis and management*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994; 741-766.
562. Tillier E.R. Genome rearrangement by replication-directed translocation / E.R. Tillier, R.A. Collins // *Nat. Genet.* – 2000. – V.26. – P.195-197.
563. Torrey, J.C., Rahe A.H. 1912. Studies in canine distemper. *J. Med. Res.* 27:291-364.
564. Toshach K., Jackson M., Dubielzig R.R. Hepatocellular necrosis associated with the subcutaneous injection of an intranasal *B. bronchiseptica*-canine parainfluenza vaccine. *J Am Anim Hosp Assoc* 1997;33:126-128.
565. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *B. pertussis* and *B. parapertussis* / Y. Xu [et al.] // *Appl. Microbiol.* – 2010. – V.118. – P.685-91.
566. Turner T. Intratracheal treatment for kennel cough. *Vet Rec* 121:182-183, 1987.
567. Turnquist S.E., Ostlund E. (1997) Calicivirus outbreak with high mortality in a Missouri feline colony. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 195-198.
568. Uhl M.A. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay / M.A. Uhl, J.F. Miller // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V.271. – P.33176-33180.
569. Use of Monoclonal Antibodies To Serotype *B. pertussis* Isolates: Comparison of Results Obtained by Indirect Whole-Cell Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Bacterial Microagglutination Methods / Raymond S.W. [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – V.43. – №5. – P.2449-2451.
570. Use of the polymerase chain reaction to detect *B. pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection / G. Schlapfer [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1993. – V.12. – P.10-14.
- van den Akker W.M.R. (1997) *B. bronchiseptica* has a BvgAS-controlled cytotoxic effect upon interaction with epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 156, 239-244.
571. Van den Akker W.M.R. (1998) Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiology* 144, 1527-1535.
572. Van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J. & Musser, J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J. Bacteriol.*, 1997, 179: 6609-6617.
573. Vandamme P., Hommez J., Vancanneyt M., Monsiers M., Hoste B., Cookson B., Wirsing von Konig C. H., Kersters K., Blackall P. J. (1995) *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 37-45
574. Vandamme P., Heyndrickx M., Vancanneyt M. et al. (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1993. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 849-858.
575. Van der Zee A. A clinical validation of *B. pertussis* and *B. parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population / A. Van der Zee, C. Agterberg, M. Peeters // *J. Infect. Dis.* – 1996. – V.174. – P.89-96.
576. Van der Zee, Groenendijk A.H., Peeters M., Mooi F. R. The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1996. – V.46. – P. 640-647.

577. Van der Zee A. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences / A. Van der Zee, F. Mooi, J. Van Embden // *J. Bacteriol.* – 1997. – V.179. – P.6609-6617.
578. Vanderpool C.K. Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes / C.K. Vanderpool, S.K. Armstrong // *J Bacteriol.* – 2004. – V.186. – P.938-948.
579. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format / Vasylyeva Y.B. / *Вестник Орловского государственного аграрного университета.* - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.
580. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing / Yu.B. Vasylyeva / *Вестник Орловского государственного аграрного университета.* - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.
581. Vojtova J. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense / J. Vojtova, J. Kamanova, P. Sebo // *Current Opinion in Microbiology.* – 2006. – V.9. □ P.69-75.
582. Van Loo, I.H., Heuvelman, K.J., King, A.J. & Mooi, F.R. 2002. Multilocus sequence typing of *B.pertussis* based on surface protein genes. *J. Clin. Microbiol.*, 40:1994-2001.
583. Vojtova Jana, Jana Kamanova and Peter Sebo. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 9, Issue 1, February 2006, Pages 69-75.
584. Wagener J.S., Sobonya R., Minnich L. et al. Role of canine parainfluenza virus and *B.bronchiseptica* in kennel cough. *Am. Vet Res* 1994; 45:1862-1866.
585. Watanabe M., Takimoto H., Kumazawa Y., Amano K.I. (1990) Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *Journal of General Microbiology* 136, 489-493.
586. Welsh R.D. *B.bronchiseptica* infections in cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 32:153, 1996.
587. West N.P., Fitter J.T., Jazubzik U. et al. (1997) Non-motile mini-transposon mutants of *B.bronchiseptica* exhibit altered abilities to invade and survive in eukaryotic cells. *FEMS Micmbiol. Lett.* 146, 263-269.
588. Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Amin M.F.M., Steigerwal T.A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W., Brenner D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1-7.
589. Williams H.M. Jr: Steroid and antibiotic aerosols. *Am Rev Respir Dis* 110:122-127, 1975.
590. Willoughby K., Dawson S., Jones R.C, Symons M., Daykin J., Payne-Johnson C., Gaskell R.M., Bennett M., Gaskell C.J. (1991) Isolation of *B.bronchiseptica* from kittens with pneumonia in a breeding cattery. *Veterinary Record* 129, 407-408.
591. Wilson G.S. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, 4th ed. / G.S. Wilson, A. Miles // *The Willams & Wilkins Co., Baltimore.* - 1957.
592. Wintzingerode F., Schattke A, Siddiqui R.A. et al. *Bordetella petrii* isolated from an anaerobic biorea, and emended description of genus *Bordetella* // *Int. J. Syst Evol. Microbiol.*- 2001.- V. 51.- P. 1257-1265.
593. Winsser J. A study of *B.bronchiseptica*. *Proc Anim Care Panel* 10:87-104, 1960.
594. Wolfson J.S., Hooper D.C. Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical importance. *Rev Infect Dis* 1989; 11:s960-s965.
595. Woodard D.R., Cone L.A., Fostvedt K. *B.bronchiseptica* infection in patients with AIDS. *Ciin. Infect. Dis.* 1995; 20:193-194.
596. Woolfrey B.F, Moody J. Human infections associated with *B.bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:243-255.
597. World Health Organization. Pertussis vaccines: W. H. O. position paper // *Wkly. Epidemiol. Rec.* -1999. - №74. - P. 137-144.
598. Yancey R.J., Kinney M.L., Roberts B.J., et al. Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice. *Am] Vet Res* 1987; 48:1050-1053.
599. Yoda H., Nakayama K., Yusa T. et al: Bacteriological survey on *B.bronchiseptica* in various animal species. *Experimental Animals* 25:7-11, 1976.
600. Yuk M.H., Harvill E.T., Miller J.F. (1998) The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *B.bronchiseptica*. *Mol. Micmbiol.* 28, 945-959.
601. Yuk M.H., Heininger U., Martinez de Tejada G., Miller J.F. (1998) Human but not ovine isolates of *B.parapertussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection* 26, 270-273.
602. Yuk M.H., Harvill E.T., Cotter P.A., Miller J.F. (2000) Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol. Micmbiol.* 35, 991-1004.

Васильев Дмитрий Аркадьевич
Васильева Юлия Борисовна
Мастиленко Андрей Владимирович
Сверкалова Дарья Геннадьевна
Семанина Екатерина Николаевна
Борисова Ольга Юрьевна
Золотухин Сергей Николаевич
Швиденко Инна Григорьевна

**БОРДЕТЕЛЛЁЗ
ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ:
ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВОЗБУДИТЕЛЯ,
РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ**

МОНОГРАФИЯ

Печатается в авторской редакции

Подписано в печать 00.00.2014.
Формат 70х100/16. Усл. печ. л. 6,75.
Тираж 000 экз. Заказ № 0/00/00.

Художественное оформление и компьютерное обеспечение Василькиной М.Н.

Издательство УГСХА им. П.А. Столыпина
Тел.: (8422) 49-55-63. E-mail: dav_ul@mail.ru

Отпечатано в типографии ООО «Колор-Принт»
г. Ульяновск, ул. Ленина, д.75
Тел.: (8422)42-28-45, т/ф 41-82-23
www.color73.ru



ВНИИВВИМ



Кафедра микробиологии Ульяновской ГСХА им. П.А.Столыпина