УДК 619:578.832.1

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Васильева Юлия Борисовна, *кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
432017, г. Ульяновск, б.Новый Венец, 1, e-mail: vet_yulia@mail.ru

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке 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).

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica, бордетеллёз, биопрепараты, методы диагностики.*

В статье представлен материал по разработке и усовершенствованию методов индикации и идентификации Bordetella bronchiseptica путём создания диагностических биопрепаратов.

Введение. Сложность лабораторной диагностики бордетеллеза, его распространённость среди кошек и собак с невыясненной этиологией кашля и бессимптомных носителей актуализируют поиск и разработку тест-систем, пригодных для идентификации возбудителя *B.bronchiseptica* [1, 2, 3].

Современные, экспрессные, высокочувствительные и специфичные методы диагностики крайне необходимы в связи с возможностью межвидовой передачи возбудителя среди животных и инфицирования людей.

В настоящее время бактериологический метод индикации и идентификации *B.bronchiseptica* занимает до 8 суток, что связано с медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным обследованием животных с затяжным кашлем, нарушением правил забора и транспортировки материала, несовершенной рецептурой питательных сред, в частности неудовлетворительным выбором селективных компонентов [2].

Бессимптомное течение бордетеллёзной инфекции с длительным носительством возбудителя в организме животных затрудняет эпизоотологический мониторинг. Поэтому актуально применение массовых серологических исследований животных разных возрастов, в том числе и здоровых [1, 3].

Молекулярно-генетические методы исследования генома позволяют осуществлять раннюю, более полную диагностику

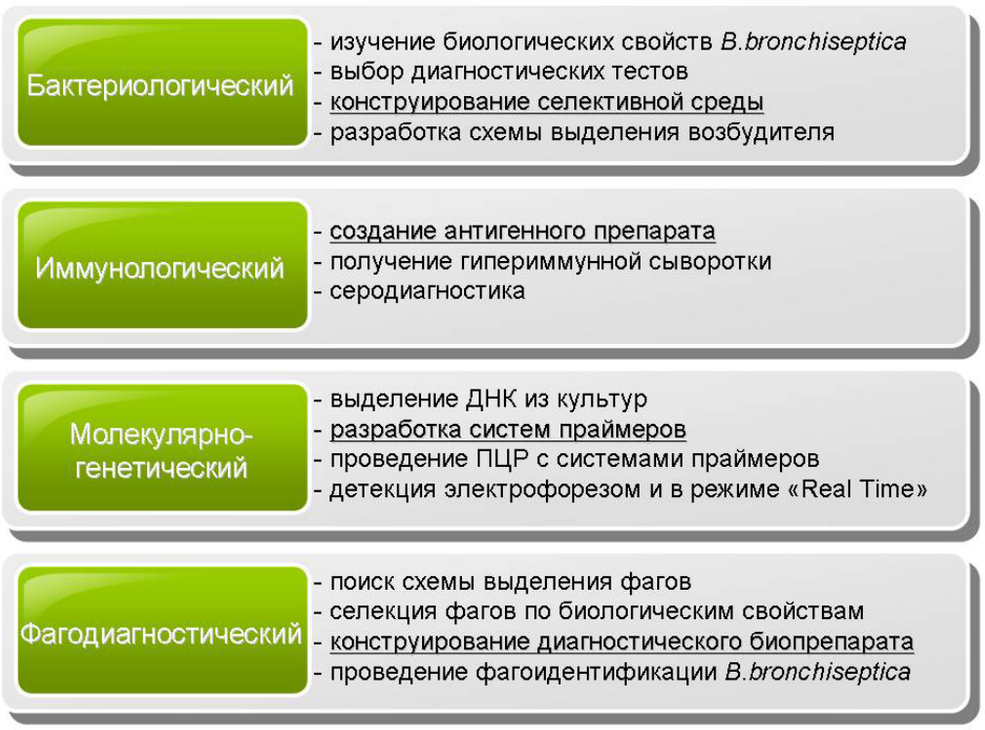

Рис.1- Этапы разработки методов лабораторной диагностики

инфекционных заболеваний и своевременно проводить их дифференциацию. В связи с отсутствием стандартизированных праймерных систем существует проблема идентифицирования *B.bronchiseptica* внутри рода. Поэтому актуально конструирование полипраймерных тест-систем, с сочетаниями двух или более праймеров, которые позволяют проводить точную внутривидовую диагностику. Также перспективна разработка схемы проведения ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени».

Интерес к бактериофагам *B.bronchiseptica* вызван их строгой специфичностью и различным тропизмом к бактериям, находящимся в разных фазовых состояниях, как во внешней среде, так и in vivo. Изучение бактериофагов может оказаться полезным для понимания механизмов изменчивости и эволюционной адаптации бактерий, а также для разработки метода индикации и идентификации *B.bronchiseptica*. Мы считаем, что конструирование фагового биопрепарата для диагностики бордетеллеза животных представляет научный и практический интерес.

Вследствие этого, целью нашей работы явилась разработка биопрепаратов для усовершенствования бактериологических, иммунологических, молекулярно-генетических и фагодиагностических методов индикации и идентификации *B.bronchiseptica*.

Материалы и методы. Работа выполнена в период с 2006 по 2013 годы на базе научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии (НИИЦМиБ) ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» (№ государственной регистрации темы НИР 01201161409).

Объектами исследований послужили референс-штаммы *B.bronchiseptica* № 1, № 7, № 214, № 22067, № 8344, штамм *B.parapertussis* № 119; 24 референс-штамма близкородственных бактерий, полученные из музея кафедры; 48 штаммов *B.bronchiseptica,* выделенных из клинических образцов биоматериала от собак и кошек; 8 штаммов индуцированных фагов.

Для получения гипериммунных сывороток к антигенам *B.bronchiseptica* было использовано 15 беспородных кроликов весом 2,5–3,0 кг.

Разрабатываемые методы лабораторной диагностики показаны на рис.1.

В работе использовали общепринятые в микробиологии, иммунологии, молекулярной генетике методики [4-11].

Результаты и обсуждение. Исследования биологических свойств возбудителя позволили выбрать диагностические тесты для бактериологической дифференциации *B.bronchiseptica*.

Конструирование среды для *B.bronchiseptica* включало подбор питательной основы и селективных компонентов, оценку её продуктивности, эффективности и диагностических качеств. Для подбора питательной основы провели анализ культивирования *B.bronchiseptica* на 18 агаровых средах с оценкой времени появления колоний и их размера. Поиск селективных компонентов вели среди антимикробных и химических средств, индикаторов и красителей. Была составлена селективно-диагностическая среда УГСХА, основанная на результатах исследований и литературных данных. BBR 57. Состав среды: пептон ферментативный в количестве 20,0 г/дм^3; метионин - 0,3 г/дм^3; и цистеин - 0,3 г/дм^3; никотиновая кислота - 0,1 г/дм^3; цефазолина натриевая соль - 0,004 г/дм^3; хлорид бария - 0,4 г/дм^3; глюкоза – 0,7 г/дм^3; лактоза - 0,7 г/дм^3; сахароза - 0,7 г/дм^3; мальтоза - 0,7 г/дм^3; маннит - 0,7 г/дм^3; бромтимоловый синий - 0,2 г/дм^3. Методика приготовления среды: в дистиллированную воду добавляют все компоненты по предложенной прописи, кроме термонеустойчивого цефазолина. Компоненты растворяют и нагревают на водяной бане до кипения. Доводят pH среды 0,1 N раствором NaOH до 7,2. Среду автоклавируют при температуре 110-112ºС 15 минут. Повторно измеряют pH среды и разливают по чашкам Петри. Готовая среда зеленого цвета. На среде к 48 часам вырастают только штаммы *B.bronchiseptica* с ожидаемым видом колоний (синие, цвета измененной среды, при длительным культивировании с темным центром), рост же культур других видов отсутствует или сопровождается окрашиванием среды в желтый цвет.

Разработана схема выделения бактерий вида *B.bronchiseptica,* состоящая в посеве материала на поверхность селективно-диагностической среды УГСХА BBR 57, оценки роста и изменения цвета среды и колоний спустя 48 часов инкубации при 37ºС, отбора не менее 3-х характерных колоний в МПБ и культивирование в течение 24 ч при 37ºС. Приготовление мазков, окрашивание по Граму и по Ольту. Посев на скошенный МПА штрихом, проведение биохимических тестов на наличие оксидазы, каталазы, нитритредуктазы, способности утилизировать цитрат. Предварительный диагноз можно поставить через 48 часов, окончательный через 120 часов.

При получении антигенов для иммунологической диагностики были апробированы различные режимы ультразвуковой дезинтеграции. Оптимальный режим: 5 микрон – 1 минута – на 1 мл бактериальной взвеси. Контроль антигенов проводили с помощью световой микроскопии (полное разрушение клеток) и количественным определением белка (сохранение нативности белка).

Иммунизацию кроликов проводили следующим образом. Внутримышечно, в область бедра, вводили 0,5 см^3 антигенного препарата с разными титрами антигенов с добавлением 0,5 см^3 полного адъюванта Фрейда. Затем проводили внутримышечные инъекции через каждые 3 дня по 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл антигенного препарата. Спустя 10, 15, 20 дней после начала инъекций брали кровь по 5 мл от каждого кролика и готовили сыворотку. В результате постановки реакции пластинчатой агглютинации доказано, что предлагаемый нами диагностикум, состоящий из УЗ-антигена и гипериммунной сыворотки, можно использовать для антигенной идентификации *B.bronchiseptica*.

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 (ПЦР), которая могла бы выявить участок гена, общего для этих трех представителей рода. Таким общим геном, не встречающимся у

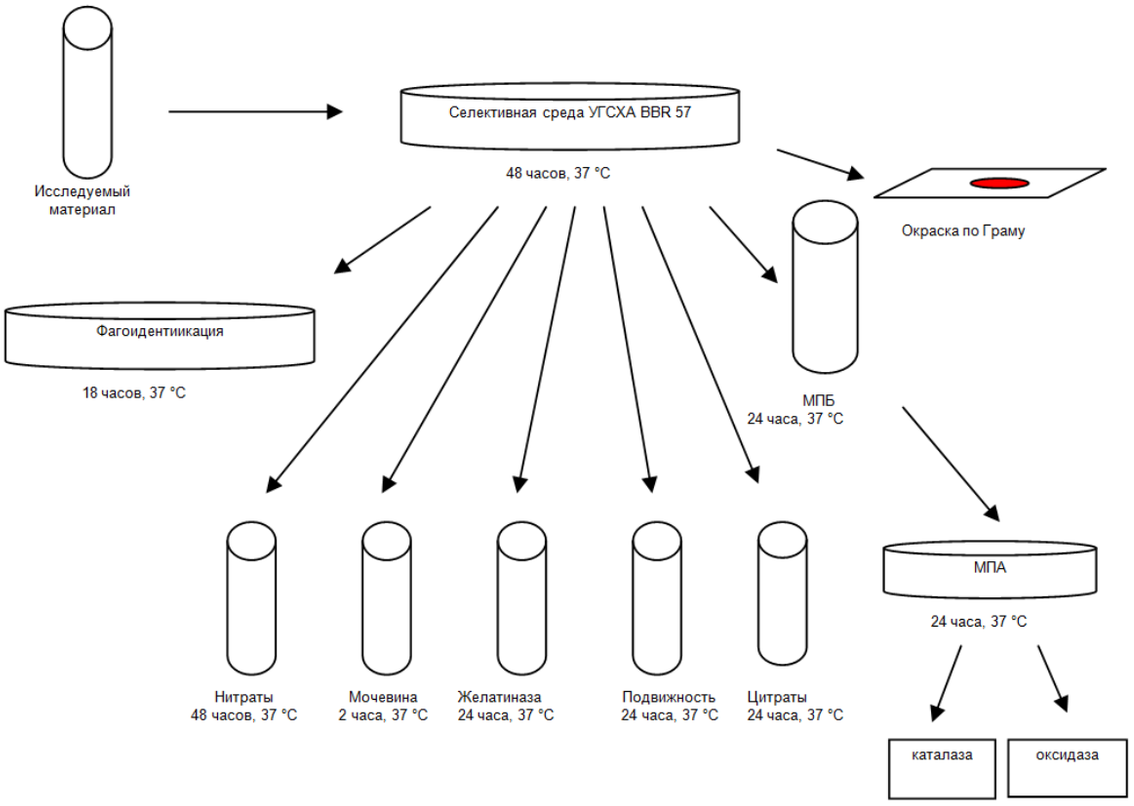

Рис. 2 – Бактериологический и фагодиагностический метод идентификации

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 ПЦР 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* .

Нами создана универсальная программа амплификации для проведения ПЦР-исследования с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и 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 $2{,}3x10^3$ до $6{,}8x10^8$ копий ДНК/мл для участка гена BfrZ.

В результате проведенных экспериментов была доказана высокая эффективность метода ПЦР при идентификации *B.bronchiseptica*.

Мы не нашли описания стандартизированной методики выделения бактериофагов *B.bronchiseptica*, вследствие этого разработали собственную схему, включающую 3-дневное облучение бактерий *B.bronchiseptica* ультрафиолетовыми лучами с получением профагов.

В результате проведенных исследований нами было выделено 8 изолятов бактериофагов *B.bronchiseptica,* из которых были отобраны два штамма, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой литической активностью по Аппельману 10^{-7} – 10^{-8} и 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 *B.Bronchiseptica*, проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в тече-

ние 30 минут и выдерживали 30-минутное нагревание при 60˚С. Фагоидентификация *B.bronchiseptica* с помощью данных индикаторных бактериофагов позволяет идентифицировать гомологичные бактерии за 66 ч (рис.2).

Далее были разработаны оптимальные технологические параметры для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *B.bronchiseptica* - 1:2, время инкубации при температуре 37ºС - 7 ч. Для инактивации жизнеспособных бактерий в фаголизате - обработка хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 мин.

Для апробации биопрепарата «B.br.–11 УГСХА» нами были разработаны параметры постановки реакции нарастания титра фага. Метод РНФ позволяет обнаружить *B.bronchiseptica* в концентрации от 10^3 м.к. в 1 мл исследуемого материала за 26 ч. РНФ с использованием сконструированного нами биопрепарата даёт возможность обнаружить возбудителя в различных субстратах в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры, что имеет большое значение при исследовании носоглоточных выделений животных.

Выводы. Таким образом, разработанные нами селективно-диагностическая среда BBR 57 УГСХА, диагностические биопрепараты УЗ-антиген + гипериммунная сыворотка, система праймеров для ПЦР и фаговый диагностикум «B.br.–11 УГСХА» рекомендуются для индикации и идентификации *B.bronchiseptica* в биологическом материале и во внешней среде с применением бактериологических, иммунологических, молекулярно-генетических и фагодиагностических методов.

Библиографический список

1. Bjornstad, O.N. Evolution and emergence of Bordetella in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Harvill // Trends Microbiol. – 2005. – N 13. – P. 355-359.

2. Goodnow, R.A. 1980. Biology of *B.bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 44:722-738.

3. Yuk M.H. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-кB activation by the *Bordetella* type III secretion system / M.H. Yuk, E.T. Harvill, P.A. Cotter, J.F. Miller // Mol. Micmbiol. – 2000. - №35. – P.991-1004.

4. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.

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

6. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.

7. 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.

8. Иммунологические методы / Х. Фримель [и др.] - М.: Мир, 1979. – 515 с.

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

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

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