

УДК 619:578.832.1

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

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, бульвар 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*, индикация, идентификация, лабораторные исследования.

В статье представлен материал по разработке тест-системы индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, включающей бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты.

Введение. *Bordetella bronchiseptica* (*B.bronchiseptica*) – возбудитель бордетеллёза животных обнаруживается и вызывает заболевание у подавляющего большинства теплокровных животных: собак, лошадей, свиней, коз, кроликов, кошек, хорьков, хомяков, крыс, морских свинок, обезьян, лис, птиц и мн. др. [1, 2, 3, 4]. Важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение бордетеллёза обусловлено возможностью межвидовой передачи возбудителя, перемещениями очага из природных в антропоургические зоны [2, 5, 6, 7]. Ареал распространения бактерий данного вида, по-видимому, повсеместен. Однако строгий учет вспышек бордетеллёзной инфекции ведут только в странах Западной Европы и США [4, 8]. В России заболевание недоста-

точно изучено и в основном диагностируется как респираторная патология невыясненной этиологии, что обусловлено слабым изучением указанного микроорганизма.

Согласно МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептикозных бактерий» (2008) для учета штаммов *B.bronchiseptica* используют бактериологический метод с серологическим подтверждением в реакции агглютинации [9]. Эти методы имеют ряд существенных недостатков. Эффективность бактериологического метода редко превышает 40%, длительность анализа до 8 суток. Это связано со слабой устойчивостью бордетелл во внешней среде, медленным ростом возбудителя, несвоевременным и неполным



Рис. 1 - Разработка тест-системы индикации и идентификации бактерий *Bordetella bronchiseptica* (ТСИИ ББР)

обследованием животных с затяжным кашлем, нарушением правил забора и транспортировки материала, несовершенной рецептурой питательных сред, в частности, неудовлетворительным выбором селективных компонентов. При этом среды являются достаточно дорогостоящими [10].

Низкая эффективность иммунологической идентификации *B. bronchiseptica* обусловлена трудностями внутриродовой дифференциации различных видов бордетелл по антигенным свойствам [11, 12]. Следовательно, микробиологические методы недостаточно чувствительны, а серологические – слабо специфичны.

Все большее распространение находит лабораторная диагностика, основанная на молекулярно-генетических исследованиях. Широкое применение полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для идентификации *B. bronchiseptica* в нашей стране ограничено

в связи с отсутствием стандартизированных праймерных систем, позволяющих проводить точную внутривидовую дифференциацию бордетелл [10]. Зарубежные компоненты для ПЦР дорогостоящи, малоспецифичны и доступны. В связи с этим актуальным направлением является проведение ПЦР в моно- и мультиплексном формате, с регистрацией в электрофорезе и в режиме «реального времени».

Перспективна разработка методов фагоидентификации *B. bronchiseptica*, позволяющая быстро и точно выявить возбудителя при минимальных затратах на расходные материалы, оборудование и специалистов.

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

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на базе научно-иссле-

довательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии (НИИЦМиБ) ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

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

Объектами исследований явились 5 референс-штаммов *B.bronchiseptica*, 3 штамма *B.pertusis*, 1 штамм *B.parapertusis*, 27 референс-штаммов близкородственных бактерий из кафедральной музейной коллекции; а также 52 штамма *B.bronchiseptica*, выделенных от животных и 8 полевых штаммов фагов. В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения и типирования бактерий и фагов, соответствующие им среды, оборудование и реагенты [13, 14, 15, 16, 17].

Результаты исследований. Для выявления и типизации бактерий *B.bronchiseptica* мы сочли оптимальным применение комплексного подхода путем создания тест-системы индикации и идентификации *B.bronchiseptica* (ТСИИ ББР), включающей бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый компоненты (рисунок 1).

Разработка бактериологического компонента ТСИИ ББР включала изучение комплекса морфологических, культуральных и биохимических свойств бактерий *B.bronchiseptica* с подбором минимального набора идентификационных тестов, позволяющих провести максимально точную дифференциацию среди близкородственных бордетелл и возможных носоглоточных ассоциантов. Учитывали существующие внутривидовые различия между штаммами и при выборе идентификационных тестов использовали характерные для вида *B.bronchiseptica*. Так как сложности выделения возбудителя из биоматериала связаны с ростом сопутствующей микрофлоры, влияющей ингибирующе на возбудителя, мы сочли оптимальной разработку селективно-диагностической питательной среды, позволяющей обеспечить преимуществен-

ный рост бактерий *B.bronchiseptica* при одновременном подавлении ассоциантов. С помощью тестов и разработанной среды подобрали наиболее эффективные бактериологические схемы индикации и идентификации *B.bronchiseptica*.

Разработка иммунологического компонента ТСИИ ББР включала подбор оптимальной технологии получения специфического антигена и гипериммунной сыворотки, с помощью которых определяли эффективность идентификации *B.bronchiseptica* в иммунологических реакциях.

Молекулярно-генетическую идентификацию бактерий *B.bronchiseptica* проводили на основании исследования геномов референс-штаммов *B.bronchiseptica* с выявлением видоспецифических участков, не встречающихся у других представителей рода *Bordetella* и остальных бактерий. На основе уникальных участков «генов-мишеней» конструировали системы праймеров для создания универсального протокола ПЦР. Требования к праймерам: длина 20–32 пары нуклеотидов, температура плавления 60–70°C, размер фланкируемого участка гена – 100-1000 п.о. Праймеры выравнивали и определяли димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно. Далее экспериментальным путем подбирали эффективную методику экстрагирования ДНК, оптимизировали параметры ПЦР, учитывая число циклов, временные и температурные характеристики процесса, концентрацию праймерных систем и других компонентов реакции. Апробировали ПЦР с разработанными системами праймеров при использовании моноплексного формата ПЦР с детекцией в горизонтальном электрофорезе или в режиме «реального времени», а также мультиплексного формата реакции с одновременным выявлением двух или трех специфических участков генома.

Фаговый компонент тест-системы включал подбор эффективного способа выделения бактериофагов *B.bronchiseptica*, изучение их специфичности, литической активности и спектра литического действия.

Затем проводили отбор наиболее вирулентных штаммов для создания диагностического биопрепарата. Качество биопрепарата определяли устойчивостью бактериофагов к воздействию внешних агрессивных факторов (физических, химических). Повышением температуры или обработкой хлороформом фаги освобождали от оставшихся бактериальных клеток и детрита, оказывающих негативное влияние на препарат при хранении. Также изучали совместную активность отобранных фагов, чтобы исключить антагонистический эффект при их взаимодействии и учесть спектр их совместного литического действия. С целью фагоиндикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica* апробировали СПОТ-тест и реакцию нарастания титра фага.

Разработанная тест-система представлена на рисунке 2.

Разработанная нами методика бактериологического исследования включает

взятие глубоких мазков из глотки животных на селективно-диагностическую среду ББР-7 УГСХА с культивированием 24-48 ч (состав среды г/л: пептон ферментативный 20,0; метионин - 0,3; и цистеин - 0,3; никотиновая кислота - 0,1; цефазолина натрияевая соль - 0,004; хлорид бария - 0,4; лактоза - 0,7; сахароза - 0,7; мальтоза - 0,7; маннит - 0,7; бромтимоловый синий - 0,02). Далее проводят отбор не менее 3-х характерных колоний бирюзового цвета, возможно с темным центром в МПБ и культивирование в течение 24 ч при 37°C. Исследование включает микроскопию мазков, окрашенных по Граму, посев на среду Симмонса, тесты на оксидазу и каталазу, экспресс-метод оценки гемолитической активности. Бактериологическое выделение и типизация *B.bronchiseptica* занимает 3-4 дня. Заключение возможно на 2-е – 3-и сутки, с условием сочетанного применения бактериологической идентификации с другими компонентами тест-системы.

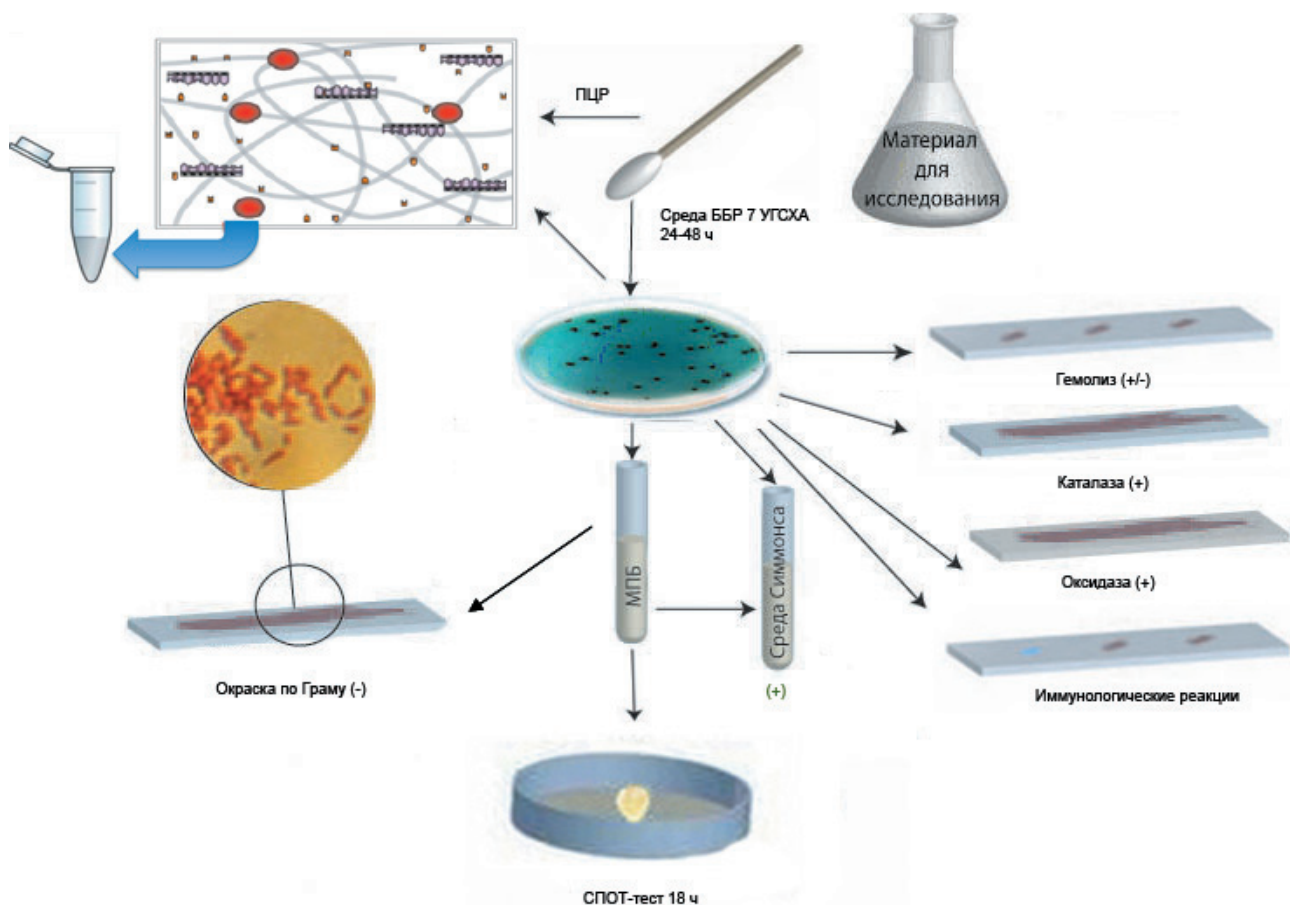


Рис. 2 - Тест-система индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica*

Иммунологическая индикация и идентификация *B. bronchiseptica* включает получение антигенов ультразвуковой дезинтеграцией (режим: 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); иммунной сыворотки гипериммунизацией лабораторных животных (предварительное внутримышечное введение смеси адьюванта Фрейнда с бордетеллезным 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) и проведение иммунологических реакций (РА, РИД, РДП). Учет результатов иммунологического исследования производят в течение суток. Возможно проведение массовых обследований подозреваемых в заражении и носительстве животных.

Молекулярно-генетическая индикация и идентификация *B. bronchiseptica* включает использование праймерных систем (Pr1-1 (5' ccttccagcacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' cccctgtgccgggtgcctggacctgggcg 3') для гена *BfrA* ДНК *B. bronchiseptica*; Pr3-1 (5'ggacgaccaggatcacatcttcc 3'), Pr3-2 (5' gcttctcctgtagttgg-cgtagg 3') для гена *BfrZ*; Pr4-1 (5' gcattgctccatcctgtgtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcgc 3') для гена *Cytochrome-oxidase* и Pr5-1 (5' ctacgggggaaagcggggga 3'), Pr5-1 (5' gaccgtactcccaggcggt 3') для гена *16S rRNA*); сорбентный способ экстракции ДНК, температура отжига праймеров 62°C, универсальная концентрация каждого из праймеров – 5 pmol на реакцию объемом 25 мкл; проведение ПЦР в моно- и мультиплексном формате. ПЦР в мультиплексном формате позволяет одновременно выявить 3 участка генов *bfrA*, *bfrZ* и *ssox*, с соотношением праймерных систем – 1:1:3,5 соответственно. Мультиплексный формат ПЦР позволяет проводить массовые исследования, удешевляет и ускоряет лабораторный процесс. ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» с интеркалирующим красителем SYBR Green I дает возможность провести количественную оценку содер-

жания ДНК *B. bronchiseptica* в биоматериале от $2,3 \times 10^3$ до $6,8 \times 10^8$ копий ДНК/мл для участка гена *bfrZ*. Чувствительность ПЦР-исследования с подобранными системами праймеров составила для участков генов *bfrA* и *bfrZ*, $5,5 \times 10^3$ бактериальных клеток/мл; для участка гена *16S rRNA* – $5,5 \times 10^2$ бактериальных клеток/мл. Современные методы молекулярно-генетической диагностики позволяют получить результаты исследований в течение 1-2 часов.

Индикация и идентификация *B. bronchiseptica* с использованием специфичных бактериофагов включает выделение бактериофагов *B. bronchiseptica* воздействием УФЛ на бордетеллы (1 день: t = 5-7 мин; l = 1м. 2 день: t = 7-10 мин; l = 1м. 3 день: t = 7-10 мин; l = 0,5м); изучение и отбор по биологическим свойствам наиболее активных фагов ББР–110 УГСХА и ББР–107 УГСХА (спектр лизиса 92,5%; литическая активность по Апельману 10^7 – 10^8 , по Грациа $3,1 \times 10^8$ – $4,3 \times 10^9$ активных корпускул в 1 мл); изготовление препарата ББР–117 УГСХА (технологические параметры: соотношение количества фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторных штаммов *B. bronchiseptica* – 1:2, время инкубации при температуре 37°C – 7 ч, обработка хлороформом в пропорции 1:10 в течение 15 мин); фагоиндикацию СПОТ-тестом или реакцией нарастания титра фага. СПОТ-тест позволяет идентифицировать *B. bronchiseptica* бактерии за 66 ч, реакция нарастания титра фага – за 26 ч. с детекцией бордетелл в концентрации от 10^3 м.к. в 1 мл.

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

Для эффективной индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* воз-

можно использование как отдельных компонентов тест-системы, так и их сочетанное применение.

Библиографический список

1. McGowan, J.P. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper" / J.P. McGowan // J. Pathol. Bacteriol. – 1911. – V.15. – P.372-430.
2. Woolfrey, B.F. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica* / B.F. Woolfrey, and J.A. Moody // Clin. Microbiol. Rev. – 1991. – V.4. – P.243-255.
3. Guzman, C.A. Invasion and intracellular survival of *B.bronchiseptica* in mouse dendritic cells / C.A. Guzman, M. Rohde, M. Bock, K.N. Timmis // Infect. Immun. – 1994. – V.62. – P.5528-5537.
4. Yuk, M.H. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system / M.H. Yuk, E.T. Harvill, P.A. Cotter, J.F. Miller // Mol. Microbiol. – 2000. – V.35. – P.991-1004.
5. Gueirard, P. Intranasal inoculation of *B.bronchiseptica* in mice induces long-lasting antibody and T cell-mediated immune responses / P. Gueirard, P. Minoprio, N. Guiso // Scand. J. Immun. – 1996. – V.43. – P.181-192.
6. Dworkin, M.S. *B.bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients / M.S. Dworkin, P.S. Sullivan, S.E. Buskin et al. // Clin Infect Dis. – 1999. – V.28. – P.1095-1099.
7. Kattar, M.M. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia / M.M. Kattar, J.F. Chavez, A.P. Limaye et al. // J Clin Microbiol. – 2000. – V.38. – P.789-794.
8. Методические указания «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий». – М. – 2008.
9. Борисова, О.Ю. Молекулярно-генетический метод ускоренного выявления штаммов *B.pertussis*, обладающих различными *ptx* генами / О.Ю. Борисова, С.Ю. Комбарова, Н.Т. Гадуа, И.К. Мазурова // Журнал микробиологии. – 2008. – №5. – С80–83.
10. Мاستиленко, А.В. Разработка методики серологической идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью электрофореза // А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Г. Семанин, Ю.Б. Васильева / 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.
11. Васильев, Д.А. Использование количественной ПЦР для идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Молекулярная диагностика – 2010: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2010. – С.68-70.
12. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
13. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
14. Лабинская, А.С. Микробиология с техников микробиологических исследований. М.: Медицина, 2004. – 394с.
15. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Пер. с англ. / С. Херрингтон [и др.] - М.: Мир, 1999. – 193 с.
16. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // М., 1962. – С. 65-71.
17. 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.