

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕТЕКЦИИ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

Васильева Юлия Борисовна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1, тел.: 8(8422)55-95-47,

e-mail: vet_yulia@mail.ru

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, индикация, бактериологическая схема, фаги, идентификация.

В статье представлены материалы по разработке новых схем бактериологической индикации и идентификации бактерий вида *Bordetella bronchiseptica*. Авторами предложены усовершенствованные схемы с применением разработанной дифференциально-диагностической среды, селективной добавки и биопрепарата, содержащего фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*.

Введение

Сложность лабораторной диагностики бордетеллеза, его распространённость среди животных актуализируют поиск и разработку схем, пригодных для быстрой и точной индикации и идентификации возбудителя.

Истинная заболеваемость бордетеллезом домашних животных (кошки, собаки, грызуны) значительно выше за счет частого протекания инфекции в атипичных формах (латентная, abortивная, носительство). Трудности клинической диагностики инфекции на ранних стадиях заболевания или его проведение на поздних сроках, а также после продолжительного лечения антибиотиками, отсутствие обследования кашляющих более 1-2 недель взрослых животных приводит к низкому проценту выявляемости возбудителя бордетеллеза. Уровень бактериологического подтверждения диагноза составляет 10 - 20% [1, 2].

Современные экспрессные, высокочувствительные и специфичные методы лабораторной диагностики крайне необходимы в связи с эпизоотологической возможностью межвидовой передачи возбудителя среди животных (собаки, кошки, свиньи, грызуны) и эпидемиологическим значением в инфи-

цировании людей [3-13].

Метод фагодиагностики широко используется в лабораторной практике для идентификации различных видов микроорганизмов. Фагоидентификация возбудителей инфекций основана на учете лизиса выделяемых культур, вызванного фагом с известным диапазоном действия. Феномен лизиса является основой для использования фага в диагностических целях. Следовательно, бактериофаг представляет собой инструмент, устанавливающий видовую принадлежность микроорганизма, выделенного из исследуемого материала при помощи бактериологического метода.

В настоящее время проба с бактериофагами, в силу их специфичности и избирательности действия, является надёжным методом детекции возбудителей инфекций животных и человека из доступных рядовой лаборатории [14, 15, 16].

В связи с этим, целью нашего исследования явилась разработка новых бактериологических схем детекции бактерий вида *Bordetella bronchiseptica*.

Объекты и методы исследований

Работа выполнена на базе научно-исследовательского инновационного центра

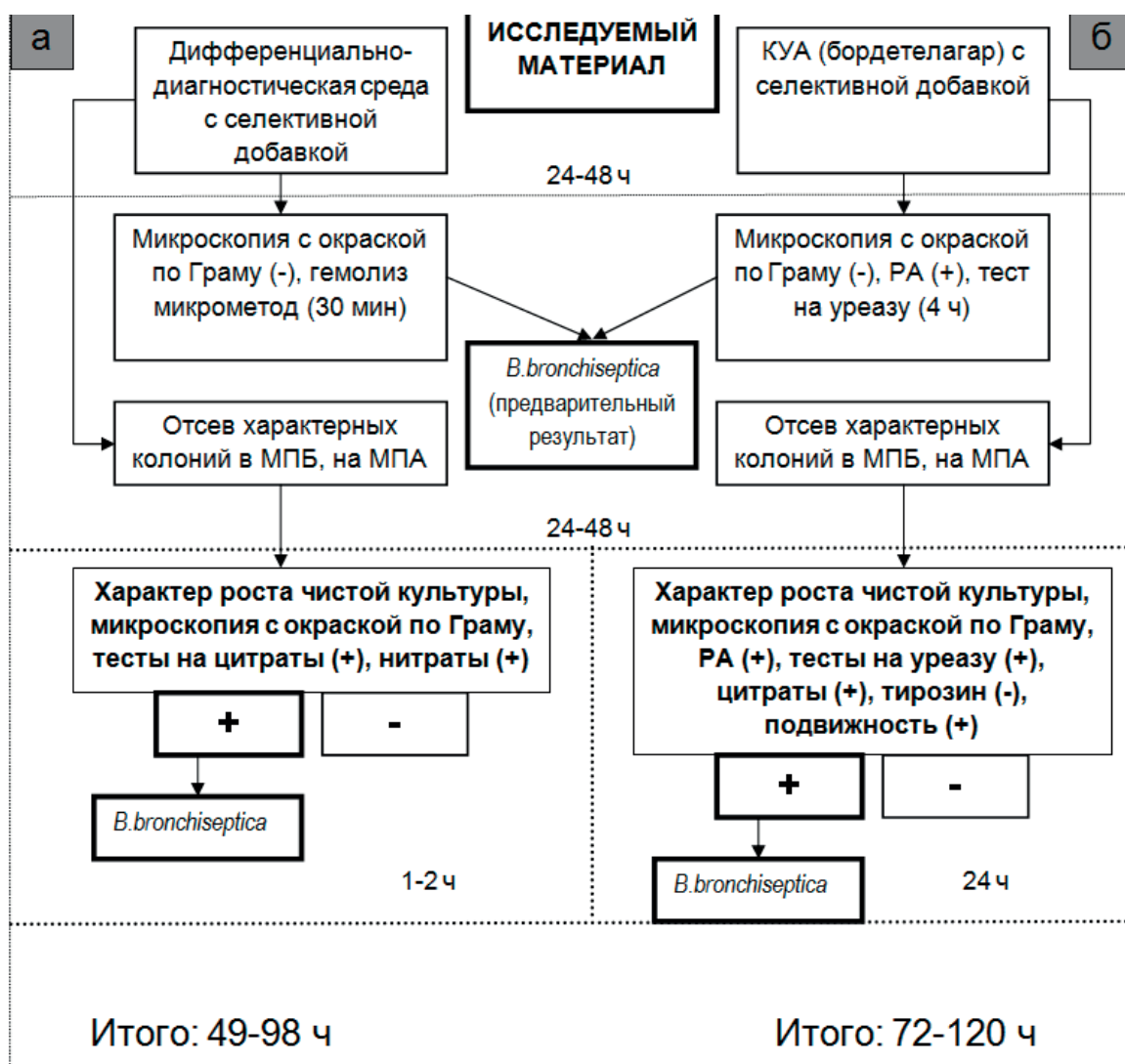


Рис. 1 – Схемы бактериологической детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, где: а – разработанная нами схема №1; б – схема, изложенная в МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий» [1]

микробиологии и биотехнологии (НИИЦ-МиБ) ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Объектами исследований были 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica*, 3 штамма *B. pertusis*, 1 штамм *B. parapertusis*, 27 референс-штаммов близкородственных бактерий из музейной коллекции кафедры. Использовали тонзиллитные и назофагингеальные мазки от животных, искусственно контаминированные индикаторными штаммами концентрации $10^5 - 10^1$ м.к. в 1 мл. Пробы предварительно исследовали бактериологическим методом на отсутствие *B. bronchiseptica*.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы, а также авторские усовершенствованные методики [2-17].

Нами были апробированы схемы бак-

териологической детекции *B. bronchiseptica* в сравнении с изложенной в МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий» [1].

Результаты исследований

На первом этапе экспериментальной работы испытания проводили на лабораторных штаммах. Схема №1 включала следующие исследования (рис. 1).

1-е сутки: исследуемый материал высеивали на 2 чашки с дифференциально-диагностической средой без и с селективной добавкой. Инкубировали 24-48 ч в термостате при температуре 36-37°C до появления визуально различных колоний.

2-3-е сутки: отбирали не менее 3-х ха-

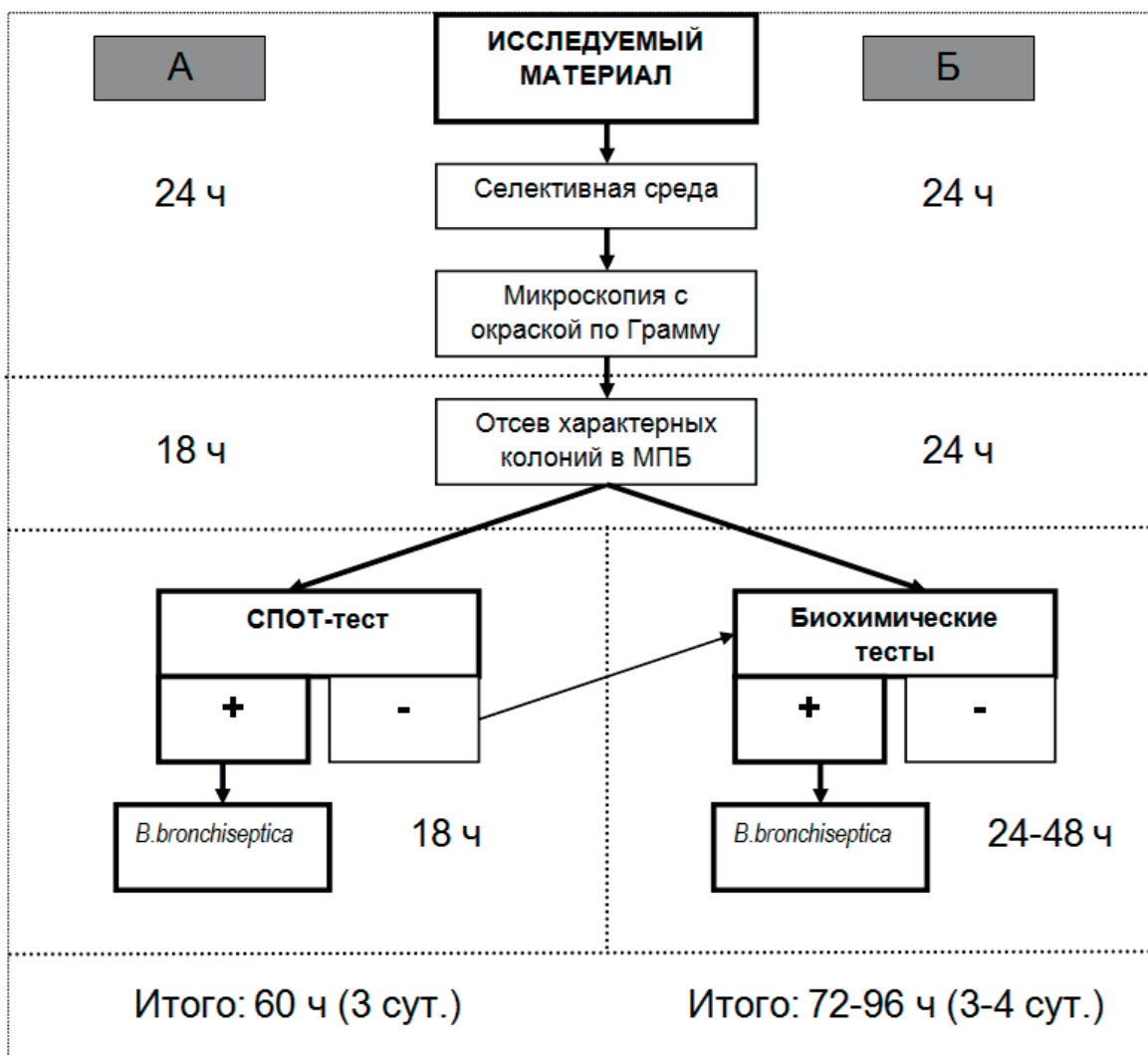


Рис. 2 - Схемы бактериологической детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, где: а – разработанная схема №2; б – разработанная схема № 1

рактерных колоний бирюзового цвета. Проводили микроскопию окрашенных по Граму мазков с выявлением грамотрицательных мелких коккобацилл, равномерно располагающихся в мазке одиночно, по парам или короткими цепочками. Гемолитическую активность устанавливали на стекле микрометодом. Для выделения чистой культуры и наращивания бактериальной массы отсеивали колонии в МПБ и на МПА. Учитывали предварительный результат. При отсутствии подозрительных колоний продолжали культивирование.

3-4-е сутки исследования: изучали чистую культуру, проводили микроскопию, экспресс-тесты на цитраты и нитритредуктазу. Учитывали окончательный результат.

В результате многократных испытаний установили, что проведение бактериологического анализа по общепринятой

схеме занимает 72-120 ч, тогда как проведение исследования по предлагаемой нами схеме №1 – 49-98 ч. При использовании разработанной дифференциально-диагностической среды и селективной добавки сокращается количество биохимических идентификационных тестов. Усовершенствованный метод определения гемолитической активности ускоряет анализ. Испытанные схемы показали 100% специфичность по отношению к бактериям *B. bronchiseptica*.

Следующим этапом исследований явилось включение в разработанную схему №1 метода «стекающая капля» с нанесением специфичных бактериофагов на газон роста культуры – схема №2 (рис. 2).

Посев материала проводили на разработанную нами питательную среду, с инкубацией в течение 20-24 ч при 36-37°C. При на-

личии визуально различимых однотипных колоний поворачивали микроскопию с окраской по Граму и отсеивали на МПБ с культивацией 18 ч при 36-37°C. Для фагоидентификации на поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 3-4 капли суточной бульонной культуры исследуемых образцов. Культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Газоны подсушивали 15-20 мин в термостате. Чашку Петри делили на сектора и на поверхность культуры пипеткой наносили каплю биопрепарата с бактериофагами. В качестве контроля наносили стерильный МПБ. Наклоняли чашку, чтобы капли стекли. Выдерживали образцы в боксе 15-20 мин для подсушивания, затем культивировали в термостате при 36-37°C в течение 18 ч.

Наличие зоны лизиса на сплошном газоне роста культуры в месте нанесения фагов указывало на принадлежность исследуемого штамма к бактериям вида *B.bronchiseptica*. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне культуры. При наличии отрицательных и сомнительных результатов фагоидентификации проводили дополнительные биохимические тесты.

В результате проведенных исследований установили, что продолжительность анализа при включении в схему «метода стекающей капли» сокращается до 60 ч, при меньшем расходе питательных сред, реактивов, лабораторной посуды.

Испытание схем на близкородственных тест-штаммах во всех экспериментах показало отрицательный результат.

Установили, что аналитическая чувствительность разработанной бактериологической схемы с использованием дифференциально-диагностической среды с селективной добавкой и схемы, изложенной в МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий», составляет 10^4 м.к./мл, схемы с использованием бактериофагов – 10^3 м.к./мл.

Выводы

Усовершенствованная схема бактериологической детекции бактерий вида *B.bronchiseptica* с использованием фагоидентификации включает взятие биоматериала на разработанную дифференциально-диагностическую среду с селективной добавкой и

без неё с культивированием 24 ч при 36-37°C, отбор не менее 3-х характерных колоний бирюзового цвета, микроскопию мазков, окрашенных по Граму, подтверждение методом «стекающей капли» со специфическими бактериофагами. В сомнительных случаях схему дополняют биохимическими тестами. Гемолиз проводят экспресс-методом на стекле в течение 15-30 мин.

Разработанная схема позволяет идентифицировать возбудителя бордетеллёза в течение 60 ч, тогда как продолжительность исследований по традиционной схеме детекции бактерий вида *B.bronchiseptica* составляет 72-120 ч.

Библиографический список

1. Методические указания «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий». МУК 4.2.2317-08. – М. – 2008.
2. Методические рекомендации «Инфекции дыхательных путей. Диагностика коклюша и паракоклюша». МР 3.1.2.0072-13. – М. – 2013.
3. Васильев, Д.А. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. - Т.1. – С. 28-32.
4. Васильев, Д.А. Технология конструирования диагностического биопрепарата на основе бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и перспективы его применения / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т.11. – С. 99-104.
5. Васильева, Ю.Б. Изучение аналитической чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.А. Васи-

льев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, А.С. Скорик // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – С. 596.

6. Васильева, Ю.Б. Биопрепараты для детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. - 2014. - № 5. - С. 70-71.

7. Актуальные вопросы лабораторной диагностики бордетеллёза животных и бронхосептикоза людей / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. 2014. - № 5. - С. 70.

8. Ломакин, А.А. Чувствительность к антимикробным средствам бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* / А.А. Ломакин, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: материалы I-ой Международной заочной научно-практической конференции. - Ульяновск: УлГПУ. - 2014. - С. 144-147.

9. Комплексный биопрепарат на основе фагов / А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С. Скорик, Ю.Б. Васильева, Н.А. Феоктистова, А.Н. Пирюшова, Н.Р. Уралов // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: материалы I-ой Международной заочной научно-практической конференции. - Ульяновск: УлГПУ. - 2014. - С. 79-82.

10. Проблемы лабораторной диагностики бордетеллёза животных и пути их решения / Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, А.Г. Семанин, А.С. Скорик, Е.И. Суркова // Аграрная наука – сельскому хозяйству: сборник статей IX-й Международной научно-практической конференции. - Барнаул: РИО АГАУ. - 2014. - С. 257-259.

11. Наборы для детекции бактерий вида *B.bronchiseptica* / Ю.Б.Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С. Скорик, А.Н. Пирюшова, Н.Р. Уралов // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных: матери-

алы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. - 2014. - С. 48-53.

12. Алгоритмы использования тест-системы индикации и идентификации бактерий *B.bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, Е.И. Суркова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – С. 606.

13. 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.

14. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

15. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 52-56.

16. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.

17. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин, Н.А. Феоктистова, С.В. Мерчина, В.В. Батраков, М.А. Юдина, В.А. Макеев, Н.А. Романова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.