

579.62

DOI 10.18286/1816-4501-2022-4-117-123

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИИ *V. PETRII* ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ломакин Артём Андреевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»
e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Ключевые слова: *Bordetellapetrii*, схема выделения, индикация, идентификации, апробация

Статья посвящена разработке и апробации схемы выделения, индикации и идентификации бактерий *Bordetellapetrii* из объектов окружающей среды. До настоящего времени роль *V. petrii* в инфекционных процессах недостаточно изучена в виду несовершенства алгоритма исследований. Методология исследований строилась на использовании питательных сред оригинальной авторской рецептуры – накопления и дифференциально-диагностической и классических бактериологических тестов для установления физиолого-биохимических свойств микроорганизмов. В результате проведенных исследований предложен алгоритм, позволяющий обнаруживать от 10 бактериальных клеток искомого вида бактерий в биологическом материале, применяя бактериологические и молекулярно-генетические методы. Апробация разработанной схемы позволила нам выделить три новых штамма бактерий *V. petrii* из объектов окружающей среды. Их видовая принадлежность была доказана проведением бактериологических и молекулярно-генетических исследований, в частности была изучена морфология бактериальных клеток, культуральные и биохимические свойства, проведена идентификация видоспецифичного участка генома *V. petrii* методом LAMP и 16S RNA, характерного для бактерий рода *Bordetella*. Полученные результаты позволяют судить о распространении данного инфекционного агента в окружающей среде.

Введение

На протяжении большей части прошлого века бактерии рода *Bordetella* считались патогенами, ограниченными определенным хозяином с различной к нему специфичностью [1-2]. Однако в 2001 г. был выделен из дехлорирующего биореактора, обогащенного речными осадками, штамм бактерий, который был идентифицирован как *V. petrii*. Это был первый описанный в научной литературе вид бактерий рода *Bordetella*, изолированный из объектов окружающей среды [3-4]. Штаммы бактерий *V. petrii* также были обнаружены в морских губках, в травяных консорциумах, в подземных водах и в других объектах окружающей среды [5-7]. Бактерии *V. petrii* экспрессируют гены, которые участвуют в синтезе и секреции факторов, конкретно связанных с вирулентностью патогенных *Bordetellasp.*, а именно, регулятор *BvgAS* и нитевидный гемагглютинин [4]. По литературным

данным описан ряд случаев выделения бактерий *V. petrii* от животных и земноводных [5-9], они были изолированы от людей с ослабленным иммунитетом, больных муковисцидозом и хронической легочной болезнью, с остеомиелитом нижней челюсти [10-13]. Тем не менее, роль *V. petrii* в инфекционных процессах все еще неясна, как и не описан полностью ареал распространения данного инфекционного агента [15-16]. Для решения этой проблемы все чаще стали использовать методы молекулярной диагностики.

Целью нашей работы была разработка и апробация схемы выделения, индикации и идентификации бактерий *V. petrii* из объектов окружающей среды.

Материалы и методы исследований

В работе был использован референс-штамм *Bordetellapetrii* ATCC BAA-461. Питательные среды и реактивы: агар бактериологический

ий(Conda,Испания), агар LB по Lennox с соевым пептоном (Диаэм, Россия), Бульон LB по Lennox (Диаэм, Россия),агар МакКонки с хлоридом натрия, солями желчных кислот и лактозой(Conda, Испания),цетримидный агар(HiMedia, Индия), бульон с лизином / орнитинном / аргинином (HiMedia, Индия),питательная среда для выделения коклюшного микроба- Бордетелагар(ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ),среды Гисса (ООО «Биотехновация», РФ),гидролизат казеина(ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск),глюконат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), сукцинат натрия (Aldrich-Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (PanReasAppliChem, Германия),натрия хлорид (PanReasAppliChem, Германия), бромтимоловый синий (Ленреактив, РФ), глюкоза (Диаэм, РФ), натрий цитрат 2-водный (Диаэм, РФ), селективная добавка для бордетелл(Conda, Испания),N, N-диметил-п-фенилендиамин (Aldrich, США), раствор теллурида калия 1% (Aldrich, США), нитратный агар (HiMedia, Индия), цитратный агар Кристенсена (НПЦ «Биокомпас-С», РФ), уреазный агар Кристенсена (HiMedia, Индия), питательные среды № 14 и № 15 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), L-малат(Aldrich, США), реактивы для окраски по Граму.

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали: 2,5хреакционная смесь в присутствии красителяSYBRGREEN (Синтол, РФ), 10хтрис-боратный буфер (Bio-Rad, Германия), агароза (Диаэм, РФ), набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, РФ), 1% раствор бромистого этидия (AppliChem,США), Камера для горизонтального электрофорезаMini-SubCellGT (Bio-Rad, Германия), источник питания PowerpacBasic (Bio-Rad, Германия), гельдокументирующая система Bio-printCX4 Edge (Vilber, Франция),центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, РФ), Твердотельный термостатТДВ-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхивательмедицинскаясерииСМ-50М(ELMI, Польша), ПЦР- пробирки объемом 0,2 мл (Диаэм, РФ).

Выделение ДНК бактерий при использовании набора реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, РФ).

Оборудование: ультрафиолетовая лампа марки «Phillips» с длиной волны 253 нм, холодильник бытовой, термостат ТС-80М-2, термостат охлаждающийТСО-1/80 СПУ; микроскоп Zeissprimostarstudentmicroscope.

Для проведения амплификации был

использован ДНК-амплификатор T100 ThermalCycler с термоблоком (BioRad, США). Для электрофореза использовали источник питания PowerPacBasic (BioRad, США) и Электрофорезная горизонтальная камера Mini-SubCell GT(BioRad, США), Трис-боратный электродный буфер (10X) (Thermo, Латвия), 1% раствор бромистого этидия (PanReasAppliChem, Германия).

Для апробации разработанной схемы были исследованы пробы почвы различного назначения (Ульяновская область) и воды из открытых водоемов, сточные воды, пробы почвы с полигона с отходами производства, отстойник для очистки сточных вод «Завода маслосырдельного» (р.п. Сурское Ульяновская область).

Результаты исследований

Разработанная схема представляет собой следующий алгоритм действий.

Первый этап. Для транспортировки собранного материала, предположительно обсемененного искомыми бактериями, необходимо использовать стерильные пробирки, которые должны быть доставлены в лабораторию при температуре 25°C в течение 24-72 часов.

Второй этап. 1 г/мл исследуемого материала переносим в среду накопления, которая имеет следующий состав: цитрат натрия - 3 г, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ - 1 г, KNO_3 - 0,5 г, NH_4Cl - 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г, CaCO_3 - 0,02 г, фуразидин 2000 мг на 1 литр дистиллированной воды. Рекомендуются время культивирования - 48-72 часа при температуре 35°C. Чувствительность разработанной среды составляет 10 микробных клеток.

Третий этап. Производится посев на дифференциально-диагностическую среду со среды накопления при условии наличия роста в виде помутнения всего столбика среды. Эта среда имеет следующий состав: глюконат натрия - 20 г, гидролизат казеина - 6 г, калий фосфорнокислый однозамещенный - 1г, хлорид бария - 2 г, бромтимоловый синий - 0,08 г, агар бактериологический-15 г, цефалексин-0,05 г на 1 литр дистиллированной воды. Время культивирования - 72-120 часов при температуре 35°C. Чувствительность разработанной среды составляет 100 микробных клеток.

Четвертый этап. Для дальнейшего исследования отбираются колонии синие, диаметром 2-3 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем. Для изучения морфологии клеток необходимо произвести окраску по Граму. Клетки бактерий вида *Bordetella pertussis* в бактериологических массах окрашиваются как мелкие, грамотрицательные, коккоподобные палочки.

Пятый этап. Если в бактериологических масках обнаружены бактерии с выше описанным морфотипом, то их пересевают на LB-агар с добавлением 10% раствора глюкозы и 0,008% бромтимолового синего. После этого в течение 48-72 часов культивирования при температуре 35°C необходимо провести изучение морфологии колоний. Бактерии вида *B. petrii* на данной среде через 48-72 часа имеют следующую морфологию: синие, диаметры 1-2 мм, выпуклые, глянцевые с ровным краем. На этой модификации LB-агара бактерии, не ферментирующие глюкозу, растут с изменением цвета среды на синий из-за того, что утилизируют триптон и дрожжевой экстракт в качестве основных источников углевода. В свою очередь, бактерии, обладающие ферментативной активностью в отношении глюкозы, будут изменять цвет среды на желтый. Если выделенный изолят не ферментирует глюкозу, то изучается оксидазная активность.

Шестой этап. Для изучения биохимических и морфологических свойств выделенных изолятов рекомендуется производить посев на цитратный агар Кристенсена, уреазный агар Кристенсена, определять способность к утилизации глюконата (Gluconatetestmedium) и подвижности, определять сахаролитические свойства на средах Гисса с глюкозой, мальтозой, лактозой и сахарозой. Для получения достоверных результатов необходимо снимать результаты в течение 72-96 часов при температуре культивирования 35°C. Это обусловлено тем, что у некоторых штаммов *Bordetellapetrii*, описанных в литературе, оптимальной температурой культивирования является 30°C. Выделенный штамм можно будет отнести с высокой долей вероятности к виду *Bordetellapetrii*, если он утилизирует цитрат и глюконат натрия. Отрицательными должны быть следующие показатели: подвижность, уреазная активность, окислительная и ферментативная по отношению к углеводам (глюкоза, мальтоза, лактоза, сахараза).

Однако, следует отметить, что даже все описанные выше исследования не гарантируют точную идентификацию искомого вида бактерий, поэтому в дополнение рекомендуем использовать праймерную систему для детекции бактерий рода *Bordetella*, основанную на детекции гена 16s rRNA методом ПЦР (Мастиленко, 2014): Forward primer- 5' CTACGGGGGAAAGCGGGGA 3', Reverse primer- 5' GACCGTACTCCCCAGGCGGT 3'.

В результате исследования объектов внешней среды на наличие бактерий *B. petrii*, используя авторскую схему выделения, инди-

кации и идентификации, было идентифицировано три новых штамма из пробы отстойника для очистки сточных вод. В других образцах искомые бактерии обнаружены не были. Далее в работе выделенные штаммы будут обозначены: *B.petrii-6*, *B.petrii-7*, *B.petrii-8*.

Все выделенные изоляты *B.petrii-6*, *B.petrii-7*, *B.petrii-8* - это грамотрицательные кокоподобные неподвижные палочки. В бактериологических мазках, окрашенных по методу Грама, бактерии располагались единично, парами или цепочками. В результате исследований установлено, что штаммы способны к росту при температуре 30 и 35°C как в аэробных, так и в анаэробных условиях. На дифференциально-диагностических средах данные штаммы имеют схожий рост с представителями рода *Bordetella*. На бордетелагаре колонии бактерии *B.petrii-6*, *B.petrii-7*, *B.petrii-8* через 24 часа культивирования при 35°C бело-серые, мелкие (менее 1 мм), выпуклые, глянцевые с ровным краем. В течение 48-96 часов бактерии сохраняют такую же морфологию колоний, при этом происходит увеличение диаметра колоний до 2-3 мм. На агаре МакКонки через 24 часа культивирования при t=35°C образовывались прозрачные, мелкие (менее 1 мм), выпуклые, глянцевые с ровным краем колонии, через 48-96 часов наблюдалось увеличение диаметра до 2-3 мм. Отмечено отсутствие роста на агаре МакКонки, содержащем 320 мг/л теллурита, и на цетримидном агаре в течение 96 часов при 35°C.

Установлено, что выделенные штаммы бактерии обладают оксидазой и каталазной активностью, способны утилизировать цитрат, сукцинат, малат, глутамат, окислять глюконат. При этом стоит отметить, что штамм *B.petrii-6* дал рост с изменением цвета среды на цитратном агаре Симмонса через 96 часов культивирования при 35°C, а на цитратном агаре Кристенсена - через 48 часов. Штамм *B.petrii-7* растет на цитратном агаре Симмонса без изменения цвета среды в течении 96 часов культивирования, на цитратном агаре Кристенсена через 48 часов произошло изменение цвета среды. Подобные свойства характерны для изолята *B.petrii* DSM 12804. Отличительным признаком штамма *B.petrii-6* является его способность продуцировать аргининдекарбоксилазу. Как и другие представители рода *Bordetella*, *B.petrii-6*, *B.petrii-7*, *B.petrii-8* не ферментируют и не окисляют сахара: глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза, рамноза, сорбит, маннит, салицин, фруктоза, арабиноза, инозит, дульцит, раффиноза. В таблице

Бактериологическая характеристика штаммов *Bordetella petrii*

Характеристики	Штаммы			
	<i>B. petrii</i> -6	<i>B. petrii</i> -7	<i>B. petrii</i> -8	<i>B. petrii</i> *
Окраска по Граму	-	-	-	-
Подвижность	-	-	-	-
Рост:				
Бордетелагар	+	+	+	ND
АгарМакКонки	+	+	+	+
АгарМакКонки, содержащий 320 мг / л теллурита	-	-	-	-
Цитремидный агар	-	-	-	-
Цитратный агарСиммноса	-	+	+	+
Рост при t=30°C	+	+	+	+
Рост при t=35°C	+	+	+	+
Анаэробный рост при t=35°C	+	+	+	ND*
Оксидазная активность				
Реактив Ковача	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Восстановление нитратов	-	+	+	V*
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-
Аргининдекарбоксилаза	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-
Уреазная активность	-	-	-	-
Индол	-	-	-	-
Брожение глюкозы	-	-	-	-
Ассимиляция:				
Глюкоза	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-
Сорбит	-	-	-	ND*
Маннит	-	-	-	+/-
Салицин	-	-	-	ND*
Фруктоза	-	-	-	ND*
Арабиноза	-	-	-	-
Инозит	-	-	-	-
Дульцит	-	-	-	ND*
Раффиноза	-	-	-	-
Глюконат	+	+	+	+
Утилизация:				
Сукцинат натрия	+	+	+	+
Глутаматнатрия	+	+	+	+
L-Лактат	-	-	-	-
L-Малат	+	+	+	+
Цитратный агарКристенсена	+	+	+	ND*

«+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, V-вариабельная реакция, «ND»- недостаточно данных, «*»- свойства референс-штамма *Bordetellapetrii* Se-1111R, согласно сайту BacDive(<https://bacdive.dsmz.de/strain/382>)

представлены сводные данные по изучению физиолого-биохимических свойств выделенных бактерий.

Для подтверждения принадлежности выделенных бактерий к роду *Bordetella* было проведено исследование генома выделенных штаммов методом ПЦР, основанное на детек-

ции специфичного участка гена 16srRNA *Bordetella*spp. Экспериментально было установлено, что выделенные бактерии *B. petrii*-6, *B. petrii*-7, *B. petrii*-8 относятся к вышеназванному роду.

Обсуждение

В отечественной литературе нет информации о схемах выделения бактерии *B. petrii*. Ос-

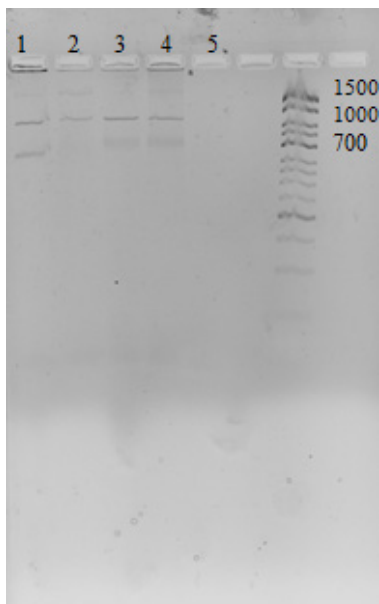


Рис. - Результаты амплификации праймерной системы, направленной на детекцию участка гена 16srRNA рода *Bordetella*: 1 - *B. pertussis* ATCC 49619, 2 - *B. pertussis*-6, 3 - *B. pertussis*-7, 4 - *B. pertussis*-8

новными параметрами для дифференциальной диагностики, представленными в МР 3.1.2.0072-13 Диагностика коклюша и паракоклюша, служат следующие признаки: рост на кровяном агаре, оксидазная активность, уреаза, тирозиназа, восстановление нитратов, утилизация цитратов и подвижность. В качестве питательной среды для посева исследуемого материала применяют картофельно-глицериновый агар (среда Борде-Жангу) и казеиново-угольный агар (КУА). Так же к среде добавляют в среды дефибрированную лошадиную или баранью кровь: в среде Борде-Жангу - 20%, в КУА - 10%. В качестве селективных добавок используют пенициллин или цефалексин (*Bordetella selective supplement*). В Лабораторном руководстве по диагностике коклюша, вызванного *Bordetella pertussis* / *Bordetella parapertussis* всемирной организации здравоохранения транспортной средой служит Regan-Lowe Agar (угольный агар). Для дифференциальной диагностики используют Regan-Lowe Agar с добавлением цефаликсина 0,4 мг/мл и 2,5 мл крови. Так же используют среду Борде-Жангу с добавлением крови и цефалексина. Характеристиками для дифференциации *B. pertussis* от других видов служат: неподвижность, рост на колумбийском агаре, среде МакКонки, и образование желтого пигмента. В UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Bordetella species* представлена схема идентификации

бордетелл. На первом этапе посев полученного материала производится на угольный агар с добавлением цефалексина и культивируют в течение 3-7 суток при температуре 35-37°C. Колонии бордетелл гладкие, выпуклые, жемчужные, блестящие, серовато-белые, имеют маслянистую консистенцию. Следующим этапом проводят окраску по Граму и проверку наличия у выделенной бактерии фермента оксидазы. После этого этапа проводят серологическое типирование. Так же в ряде случаев проводят MALDI-TOF масс-спектрометрию и амплификации нуклеиновых кислот (NAAT), электрофорез в пульсирующем поле, MLVA и секвенирование 16s РНК.

Благодаря разработанной схеме в течение 120-336 часов можно идентифицировать бактерии *B. pertussis* в объектах окружающей среды. Для подтверждения результата эксперимента, полученного бактериологическим методом, мы предлагаем использовать праймерную систему на основе метода полимеразной цепной реакции, нацеленной на участок гена 16sRNA специфичного для рода *Bordetella*.

Заключение

После апробации предложенной схемы, были выделены три новых штамма бактерии *B. pertussis*: *B. pertussis*-6, *B. pertussis*-7, *B. pertussis*-8, которые проявляли свойства, характерные для бактерий этого вида. Принадлежность к роду *Bordetella* выделенных штаммов была доказана проведенной ПЦР, нацеленной на участок 16SRNA, характерной для представителей этого рода.

Полученные результаты помогут упростить выделение, индикацию и идентификацию, а также дать более полную картину о распространении бактерии *B. pertussis* в объектах окружающей среды.

Библиографический список

1. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella* / B. Linz, L. Ma, I. Rivera, E.T. Harvill // Current opinion in infectious diseases. – 2019. – Vol. 32. – No. 3. – P. 223.
2. Kamanova J. *Bordetella* type III secretion injectosome and effector proteins / J. Kamanova // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. -
3. *Bordetella pertussis* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / F. von Wintzingerode, A. Schattke, R. A. Siddiqui, U. Rösick, U.B. Göbel, & R. Gross // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Vol. 51. – No.

4. – P. 1257-1265.

4. *Bordetellapetrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis/ L. Biederman, M.R. Rosen, B. S. Bobik & A. L Roberts //ID-Cases. – 2015. – Vol. 2. – №. 4. – P. 97-98.

5. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella sp.* and its bioremediation potential in soil/ F. Wang, S. Grundmann, M. Schmid, U. Dörfler, S. Roherer, J.C. Munch, R. Schroll //Chemosphere. – 2007. – Vol. 67. – №. 5. – P. 896-902.

6. Species and metabolic pathways involved in bioremediation of Vietnamese soil contaminated with Agent Orange. *Bordetellapetrii* emerges as a key player in degradation of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid/ T. L. A. Nguyen, T. C. H. Dang, J. Koekoek, M. Braster, J. Parsons, B. Brouwer, T. de Boer, R. J. M. van Spanning //Authorea Preprints. – 2020.

7. External Ear Canal Evaluation in Dogs with Chronic Suppurative Otitis Externa: Comparison of Direct Cytology, Bacterial Culture and 16S Amplicon Profiling/ C. Leonard, D. Thiry, B. Taminiau, G. Daube & J. Fontaine // Veterinary Sciences. – 2022. – Vol. 9. – №. 7. – C. 366.

8. Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs/S. McGrath-Blaser, M. Steffen, T.U. Grafe, M. Torres-Sánchez, D.S. McLeod & C.R. Muletz-Wolz //Animal microbiome. – 2021. - Vol. 3. – P.83.

9. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region/ M. F.Samy,

E.H.Yasser, A.L. Othman & S.A.Amer //Journal of Camel Practice and Research. – 2017. – Vol. 24. – №. 1. – P. 89-98.

10. Evolution and Conservation of *Bordetella* Intracellular Survival in Eukaryotic Host Cells / I.Rivera, B.Linz, E.T. Harvill //Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 2318.

11. *Bordetellapetrii* clinical isolate / N. K.Fry, J.Duncan, H.Malnack, M.Warner, A.J.Smith, M.S. Jackson & A. Ayoub // Emerging infectious diseases. – 2005. – Vol. 11. – №. 7. – P. 1131.

12. *Bordetellapetrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis// L.Biederman, M.R.Rosen, B.S.Bobik & A.L. Roberts //ID-Cases. – 2015. – Vol. 2. – №. 4. – P. 97-98.

13. *Bordetellapetrii* sinusitis in an immunocompromised adolescent// Nagata, J. M., Charville, G. W., Klotz, J. M., Wickremasinghe, W. R., Kann, D. C., Schwenk, H. T., & Longhurst, C. A. //The Pediatric infectious disease journal. – 2015. – Vol. 34. – №. 4. – P. 458.

14. Environmental origin of the genus *Bordetella*/ I.HamidouSoumana, B.Linz, E.T. Harvill // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 28.

15. Adaptability and persistence of the emerging pathogen *Bordetellapetrii*/ A.M.Zelazny, L.Ding, J.B.Goldberg, L.A.Mijares, S.Conlan, P.S.Conville, S.M. Holland //PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – №. 6. – P. e65102.

16. Septic arthritis and osteomyelitis due to *Bordetellapetrii*/ M.Nogi, M. J.Bankowski, F.D. Pien //Journal of clinical microbiology. – 2015. – Vol. 53. – №. 3. – C. 1024-1027.

DEVELOPMENT AND APPROVAL OF THE SCHEME OF ISOLATION, INDICATION AND IDENTIFICATION OF B.PETRII BACTERIA FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS

Lomakin A. A.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, building 1: tel.: 89603621517
e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Key words: *Bordetella petrii*, isolation scheme, indication, identification, approbation

The article is devoted to development and testing of a scheme for isolation, indication and identification of *Bordetella petrii* bacteria from environmental objects. Until now, the role of *B. petrii* in infectious processes has not been sufficiently studied, due to the imperfection of research procedure. The research methodology was based on usage of nutrient media of the original author's formulation - accumulation and differential diagnostic and classical bacteriological tests for establishment of physiological and biochemical properties of microorganisms. As a result of the research, an algorithm was proposed that allows to detect from 10 bacterial cells of the desired bacterial species in biological material using bacteriological and molecular genetic methods. Approbation of the developed scheme allowed to isolate three new strains of *B. petrii* bacteria from environmental objects. Their species identity was proved by bacteriological and molecular genetic studies, in particular, the morphology of bacterial cells, cultural and biochemical properties were studied, the species-specific region of *B. petrii* genome was identified by LAMP method and 16S RNA, characteristic of bacteria of *Bordetella* genus. The obtained results allow to judge the spread of this infectious agent in the environment.

Bibliography:

1. Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus *Bordetella* / B. Linz, L. Ma, I. Rive-

- ra, E.T. Harvill//*Current opinion in infectious diseases*. – 2019. – Vol. 32. – №. 3. – P. 223.
2. Kamanova J. *Bordetella* type III secretion injectosome and effector proteins / J. Kamanova//*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. -
 3. *Bordetellapetrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*/ F. von Wintzingerode, A.Schattke, R. A.Siddiqui, U. Rösick, U.B. Göbel, &R. Gross //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Vol. 51. – №. 4. – P. 1257-1265.
 4. *Bordetellapetrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis/ L. Biederman, M.R. Rosen, B. S. Bobik&A. L Roberts //IDCases. – 2015. – Vol. 2. – №. 4. – P. 97-98.
 5. Isolation and characterization of 1, 2, 4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil/ F. Wang, S. Grundmann, M. Schmid, U. Dörfler, S. Roherer, J.C. Munch, R. Schroll//*Chemosphere*. – 2007. – Vol. 67. – №. 5. – P. 896-902.
 6. Species and metabolic pathways involved in bioremediation of Vietnamese soil contaminated with Agent Orange. *Bordetellapetrii* emerges as a key player in degradation of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid/ T. L. A. Nguyen, T. C. H. Dang, J. Koekkoek, M. Braster, J. Parsons, B. Brouwer, T. de Boer, R. J. M. van Spanning//*Authorea Preprints*. – 2020.
 7. External Ear Canal Evaluation in Dogs with Chronic Suppurative Otitis Externa: Comparison of Direct Cytology, Bacterial Culture and 16S Amplicon Profiling/ C. Leonard, D. Thiry, B. Taminau, G. Daube & J. Fontaine // *Veterinary Sciences*. – 2022. – Vol. 9. – №. 7. – C. 366.
 8. Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs/S. McGrath-Blaser, M. Steffen,T.U. Grafe, M. Torres-Sánchez, D.S. McLeod&C.R. Muletz-Wolz //Animal microbiome. – 2021. - Vol. 3. – P.83.
 9. Microbial Quality and Molecular Identification of Pathogenic Bacterial Strains Collected from Raw Camel's Milk in Taif Region/ M. F.Samy, E.H.Yasser, A.L. Othman & S.A.Amer//*Journal of Camel Practice and Research*. – 2017. – Vol. 24. – №. 1. – P. 89-98.
 10. Evolution and Conservation of *Bordetella* Intracellular Survival in Eukaryotic Host Cells / I.Rivera, B.Linz, E.T. Harvill /*Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 2318.
 11. *Bordetellapetrii* clinical isolate / N. K.Fry, J.Duncan, H.Malnick, M.Warner, A.J.Smith, M.S. Jackson &A. Ayoub// *Emerging infectious diseases*. – 2005. – Vol. 11. – №. 7. – P. 1131.
 12. *Bordetellapetrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis// L.Biederman, M.R.Rosen, B.S.Bobik& A.L. Roberts //IDCases. – 2015. – Vol. 2. – №. 4. – P. 97-98.
 13. *Bordetellapetrii* sinusitis in an immunocompromised adolescent// Nagata, J. M., Charville, G. W., Klotz, J. M., Wickremasinghe, W. R., Kann, D. C., Schwenk, H. T., &Longhurst, C. A. //The Pediatric infectious disease journal. – 2015. – Vol. 34. – №. 4. – P. 458.
 14. Environmental origin of the genus *Bordetella*/ I.HamidouSoumana, B.Linz, E.T. Harvill //Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 28.
 15. Adaptability and persistence of the emerging pathogen *Bordetellapetrii*/ A.M. Zelazny, L. Ding, J.B. Goldberg, L.A. Mijares, S. Conlan, P.S. Conville, S.M. Holland //PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – №. 6. – P. e65102.
 16. Septic arthritis and osteomyelitis due to *Bordetellapetrii* / M. Nogi, M. J. Bankowski, F.D. Pien //Journal of clinical microbiology. – 2015. – Vol. 53. – №. 3. – C. 1024-1027.