
Библиографический список:

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) // - М., - 1961. -521С.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие – Ульяновск. – 1988. – С.45.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// -М.: Медгиз. -1961. – С.297.
4. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. - 125 с., Ульяновск., -2004.
5. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск. – 2005. – С.48-51.
6. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: «Урожай», 1978. –С.20-21.

DESCRIPTION OF BACTERIOPHAGES PROVIDENCIA

Bart N.G., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.

Key words: *Bacteriophages, Providencia, lytic activity, thermoresistance, specificity.*

The summary: In given article results of work on allocation and studying of some biological properties of bacteriophages Providencia are presented. As a result of researches have been studied: lytic an active-nost, thermoresistance and specificity.

УДК 619:579.62

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ БОРДЕТЕЛЛЕЗА

Ю.Б. Васильева, кандидат ветеринарных наук, доцент
8(8422) 55-95-47, vet_yulia@mail.ru

А.В. Мастиленко, кандидат биологических наук, старший преподаватель
8(8422) 55-95-47, mav0608@mail.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422) 55-95-47, fvm.zol@yandex.ru
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: *инфекции животных, бордетеллэз, Bordetella bronchiseptica, методы детекции, лабораторная диагностика, идентификация*

*В статье представлены результаты разработки тест-системы индикации и идентификации бактерий вида *B.bronchiseptica*. Тест-система включает наборы для бактериологических, иммунологических, молекулярно-генетических и фагоидентификационных исследований. Использование тест-системы позволяет значительно сократить время исследования по сравнению с традиционными методами.*

Введение. Бактерии вида *Bordetella bronchiseptica* являются этиологическим агентом респираторных заболеваний у многих видов животных и людей. Длительное время дискуссионными были вопросы, связанные с патогенностью возбудителя и

его способностью самостоятельно вызывать инфекционный процесс. В настоящее время бордетеллэз признан нозологической единицей, как высококонтагиозное инфекционное заболевание животных, характеризующееся сухим, болезненным кашлем,

рвотой, замедленным ростом и развитием, прогрессирующим исхуданием и высокой гибелью молодняка. У домашних животных (собак, кошек, грызунов) заболевание в основном протекает с явлениями ларинготрахеита («питомниковый кашель»), у свиней – атрофического ринита [1, 2, 14, 17].

Важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение бордетеллёза обусловлено длительным бессимптомным носительством возбудителя в организме животных с возможностью межвидовой и зооантропонозной передачи. У людей возбудитель в основном вызывает коклюшеподобное заболевание с поражением респираторного тракта. Описаны также случаи развития 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 [1-4].

Несмотря на то, что бордетеллёз является актуальной проблемой во всем мире, в нашей стране до сих пор отсутствуют высокочувствительные, строго специфичные, малозатратные и легко воспроизводимые методы диагностики этой инфекции, которые удовлетворяли потребностям практической ветеринарии [6-11].

Тогда как ранняя лабораторная диагностика бордетеллёза должна занимать основное место в системе противозoonотических мероприятий и способствовать предупреждению и своевременной локализации очага инфекции [11-12].

В настоящее время для выделения бактерий вида *B. bronchiseptica* используют бактериологический метод с подтверждением в реакции агглютинации [13]. При этом детекция занимает минимум 4-5 суток, а её эффективность редко превышает 20-40% [15, 16]. В клинической практике неэффективность и длительность диагностики инфекции обуславливает запоздалое назначение курса антибактериальной терапии [1, 2, 20].

Для ранней детекции бордетелл возможно применение методов, используемых для детекции родственных бактерий *Bordetella bronchiseptica*: иммунофлуоресцентного, блот-ELISA, ИФА, различных вариантов ПЦР [18, 20].

Следовательно, на сегодняшний день крайне актуальными остаются совершенствование классических и разработка современных методов детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, обладающих высокой чувствительностью, специфичностью и экономической эффективностью [16, 19].

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

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в лаборатории научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии кафедры микробиоло-

гии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Результаты исследований и их обсуждение.

Разработанная нами тест-система индикации и идентификации бактерий вида *B. bronchiseptica* (ТСИИ ББР) содержит бактериологический, иммунологический, молекулярно-генетический и фаговый наборы.

Бактериологический набор ТСИИ ББР включает: дифференциально-диагностическую среду (состав, г/л: пептон сухой ферментативный – 10.0, железа сульфат – 0.02, магния сульфат – 0.4, натрия хлорид – 4.5 ± 0.5 , мочевины – 5.0, крахмал – 2.5, лактоза – 5.0, бромтимоловый синий - 0.02, агар микробиологический – 12.0 ± 2.0); селективную добавку (состав, г/л: ампициллин – 0.0025, цефазолин – 0.004, флуконазол – 0.002).

Иммунологический набор ТСИИ ББР включает: антигенный препарат, полученный ультразвуковой дезинтеграцией при частоте 23 кГц, амплитуде колебаний 7 микрон в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом; иммунную сыворотку, полученную гипериммунизацией кроликов по схеме: в/м введение полного адьюванта Фрейнда с антигеном по 0.5 мл и в/в инъекции 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 мл антигена с интервалом 3-4 дня с забором крови через 30 дней с момента начала инъекций. Иммунологический компонент используется в качестве подтверждающего теста в бактериологической схеме детекции.

Молекулярно-генетический набор ТСИИ ББР включает: комплект реагентов для выделения ДНК из биопроб – «Проба ГС»; комплект реагентов для проведения амплификации участка ДНК, с уникальными системами праймеров: Pr1-1 (5' ccttccagcacctggcggtacgagttgctcc 3'), Pr1-2 (5' ccccgctccggggtgcctggacctggcgcg 3') для гена *BfrA* ДНК *B. bronchiseptica*; Pr3-1 (5' ggacgaccaggatcacatcttcc 3'), Pr3-2 (5' gctttcctgtagttgg-cgtagg 3') для гена *BfrZ*; Pr4-1 (5' gcattgctccatcctgtgtgcg 3'), Pr4-2 (5' gatgggttatctgagcgcgc 3') для гена *Cytochrom-C-oxidase*; флуоресцентный зонд для системы праймеров участка гена *bfrZ*; комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза.

Фаговый набор ТСИИ ББР включает биопрепарат на основе выделенных методом 3-х кратного ультрафиолетового облучения лизогенных штаммов *B. bronchiseptica* и селекционированных бактериофагов, обладающих общим спектром литического действия 92,5%; 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.

Тест-система индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* позволяет провести лабораторную диагностику в 4-х вариантах.

1. Бактериологическая детекция включает взятие глубоких назофарингеальных мазков на разработанную нами дифференциально-диагностическую среду с селективной добавкой и без неё на 2 чашки

Петри с культивированием 24 ч при 36±1°C; отбор не менее 3-х характерных колоний бирюзового цвета, возможно с темным центром; микроскопию мазков, окрашенных по Граму; подтверждение в реакции агглютинации на стекле и методом “стекающей капли” (СПОТ-тест) со специфическими бактериофагами. В сомнительных случаях схему дополняют тестами на оксидазную, каталазную и гемолитическую активность. Гемолиз проводят, разработанным нами экспресс-методом. Готовят препарат по типу “висячая капля” с эритроцитарной взвесью в разведении физраствором не более 2×10⁴ эритроцитов в мл и суточной агаровой культурой *B. bronchiseptica*. Адсорбцию клеток бордетелл на поверхности эритроцитов и обесцвечивание последних регистрируют под увеличением ×100×15 в течение 15-30 минут. Длительность бактериологического анализа 60-96 ч.

2. ПЦР в мультиплексном формате с электрофоретической детекцией по программе 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 с одновременным выявлением 3-х участков генов: *bfrA*, *bfrZ* и *ssox* в соотношении праймерных систем – 1:1:3,5 соответственно. Длительность анализа не более 24 ч.

3. ПЦР в режиме «реального времени» с флуоресцентным зондом к гену-мишене *bfrZ* по программе: 1) 95°C–5 мин, 2) 95°C–10 сек, 62°C–15 сек – 40 циклов, 3) 72°C–1 мин. Длительность анализа несколько часов.

4. Реакция нарастания титра фага (РНФ). Технологические параметры реакции: оптимальное время подращивания индикаторной культуры – 7 ч, экспозиции фага с индикаторной культурой – 19 ч, температурный режим - 36±1°C, количественный показатель увеличения титра фага, имеющий диагностическое значение – в 5 и более раз. Длительность анализа 26 ч.

Заключение. Традиционная схема детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*, включающая бактериологическую идентификацию с иммунологическим подтверждением, занимает минимум 96-120 ч.

С помощью разработанной нами тест-системы индикации и идентификации бактерий вида *B. bronchiseptica* возможна постановка диагноза в течение 60-96 ч при использовании усовершенствованной бактериологической схемы. При проведении ПЦР или РНФ возможна постановка диагноза на бордетеллез в течение суток.

Библиографический список:

1. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина, О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко // Монография. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.
2. Васильев, Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 233-235.
3. Васильев, Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 233-235.
4. Васильев, Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59–62.
5. Васильев, Д.А. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т. II. – С. 18-22.
6. Васильев, Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 230-232.
7. 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. I. – С. 28-32.
8. 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. II. – С. 99-104.
9. Васильева Ю.Б. Алгоритм использования тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, Е.И. Суркова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14900> (дата обращения: 15.10.2014).
10. 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. Васильев, Р.Р.

- Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, А.С. Скорик // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14770> (дата обращения: 06.10.2014).
11. Мاستиленко, А.В. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Инфекция и иммунитет. - 2013. - Т. III. - № 2. - С. 152.
 12. 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.
 13. Методические указания «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий». – М. – 2008.
 14. 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.
 15. Никульшина, Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Д.А. Васильев, А.В. Мастиленко, Д.Н. Хлынов // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск: УГСХА. - Т. IV. - 2008. – С. 57-59.
 16. Никульшина, Ю.Б. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Никулина // Ветеринарная патология. - 2007. - №4. (23). — С. 103-106.
 17. Райчинец, Ю.А. Методика выделения *Paenibacillus larvae* / Ю.А. Райчинец, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Р.Р. Бадаев, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14787>.
 18. Сверкалова, Д.Г. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* // Д.Г. Сверкалова, А.В. Мастиленко, Д.Н. Хлынов, Ю.Б. Никульшина, Д.А. Васильев / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск: УГСХА. - Т. IV. - 2008. – С. 134-136.
 19. Vasylyeva, Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.
 20. 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.

IMPROVEMENT OF DIAGNOSTICS OF BORDETELLA SHE VASILIEVA, A.V., PESTILENCE

Vasylyeva, Y.B., Mastilenko A.V., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.

Keywords: *infection of animals, Bordetella, Bordetella bronchiseptica, methods of detection, laboratory diagnostics, identification*

The article presents the results of the development of the test system of indication and identification of bacteria of the species B.bronchiseptica. The test system includes kits for bacteriological, immunological, molecular genetic and parodistically research. The use of the test system can significantly reduce the time of the research compared to traditional methods.