

**АКТУАЛЬНОСТЬ БОРДЕТЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОБЛЕМА
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОВ В КАЧЕСТВЕ
СЕЛЕКТИВНОГО КОМПОНЕНТА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ
*BORDETELLA BRONCHISEPTICA***

Ломакин А.А., 1 курс факультета ветеринарной медицины
Научные руководители: к.б.н., ст. преподаватель Мاستиленко А.В.,
к.в.н., доцент Васильева Ю.Б.
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *Bordetella*, микроорганизмы, антибиотики, селективные компоненты

Работа посвящена вопросам актуализации бордетеллезной инфекции в настоящее время и проблеме выбора антибактериальных препаратов в качестве селективного компонента при разработке дифференциально-диагностических и селективных сред для индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*. Авторами установлена их множественная резистентность к β -лактамным пенициллинам, макролидам, линкозамидам. В то же время все исследуемые культуры *B. bronchiseptica* проявляют высокую чувствительность в отношении β -лактамных цефалоспоринов, аминогликозидов, фторхинолонов.

Актуальность

Долгое время *Bordetella bronchiseptica* считалась возбудителем оппортунистических инфекций респираторного тракта у кошек и собак, в отличие от свиней, где этиологическая роль этого возбудителя была доказана при атрофическом рините. Данный микроорганизм изолируют со слизистой верхних дыхательных путей большинства видов млекопитающих, однако далеко не у всех регистрируют клинические проявления бордетеллеза.

Чем же так опасен данный возбудитель? Вспышки бордетеллеза у домашних животных регистрировались еще в первой половине XX века, и считалось, что вакцинация вполне способна решить данную проблему. Однако и в наше время наблюдается рост данного заболевания, несмотря на иммунопрофилактику, особенно среди собак и кошек. Содержание в питомниках, дефицитные состояния иммунной системы животных, наличие очагов инфекционного агента, контакты с инфицированными животными и т.п. только усугубляют эпидемическую ситуацию. Сегодня не редки случаи изоляции *B. bronchiseptica* и от людей с явными клиническими признаками бордетеллезной инфекции. Конечно, стоит оговориться, что пока это дети дошкольного и младшего школьного возраста (с несовершенной иммунной системой), а также старики (с признаками иммунодефицита). Не стоит забывать, что пагубное влияние экологических и стрессовых факторов, а также рост вирусных заболеваний далеко не способствуют защите человека

от инфицирования *B. bronchiseptica*. Учитывая, что возбудители коклюша (*B. pertussis*) и паракоклюша (*B. parapertussis*) являются всего лишь независимыми производными *B. bronchiseptica*, предполагается, что полный геном сохранен лишь у *B. bronchiseptica*, и имеет весь арсенал факторов патогенности, имеющийся у *B. pertussis* и *B. parapertussis*. Во время эволюционного развития этих видов произошла крупномасштабная геновая потеря и инактивация некоторых генов (с возможным отсутствием промоторов и генетических регуляторов). Предполагаемое время генетического обособления видов 0,27-1,4 млн. лет назад для *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*, 0,7-3,5 млн. лет назад для *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* [1].

Пристальное внимание исследователей к проблеме патогенных видов *Bordetella* было уделено только возбудителям коклюша и паракоклюша, которые считались эталонными. Поэтому основные разработки прошлых лет, касающиеся бактериологических схем идентификации, дифференциально-диагностических и селективных сред, агглютинирующих специфических сывороток и т.п. относились именно к этим видам. *B. bronchiseptica* в данных разработках либо не рассматривалась вовсе, либо имела к ним косвенное отношение. Однако некоторые аспекты индикации и дифференциации вышеуказанного возбудителя были достаточно хорошо освещены в связи с инфекционными заболеваниями свиней, т.к. экономические потери от инфекционного атрофического ринита свиней в ведущих европейских странах, США, России и т.д. были значительными. В нашей стране более глубоко вопросами бордетеллеза домашних животных (в частности изоляции *B. bronchiseptica* от собак и кошек) стали заниматься в начале 2000гг. Так коллектив авторов под руководством проф. Васильева Д.А. разработал схему бактериологического исследования, молекулярно-генетической идентификации и фагоиндикации при бордетеллезе домашних животных [2, 3, 4, 5, 6]. В данных исследованиях при бактериологической идентификации авторы используют дифференциально-диагностические среды, в том числе разработанную ВВР-57, в которой в качестве селективного компонента используется цефазолин в количестве 0,004 г/л. S. Lariviere et al. (1993) в своих исследованиях также показал, что использование в среде цефалексина позволяет повысить селективность среды Smith-Baskerville (SB) в отношении *B. bronchiseptica* [7]. По данным более ранних исследований известно, что возбудители бронхисептикоза, коклюша и паракоклюша устойчивы к антибиотикам пенициллинового ряда, что в ряде исследований даже позволяло повысить продуктивность среды [8]. L. Stauffer et al. (1983) и в последствии С. Parker et al. (1985) в своих исследованиях указывали на наличие чувствительности к пенициллину и цефалексину у некоторых штаммов патогенных бордетелл [9, 10]. М. Fiizi (1973) для получения чистой культуры *B. bronchiseptica* из биоматериала, полученного из пораженных очагов дыхательных путей животных с клиническими признаками бордетеллеза в качестве селективных компонентов использовал сочетание пенициллина, стрептомицина и нистатина [11]. Согласно исследованиям К.

Connor et al. (1996) среда МВМ с заменой амфотерицина В и бензилпенициллин на спектиномицина и циклогексимида в конечной концентрации 100 мг/мл и 0,5 мг/мл, соответственно, существенно увеличивает селективность в отношении патогенных микроорганизмов рода *Bordetella* [12]. S.Armstrong and M. Clements (1993) в своих исследованиях показали селективность налидиксовой кислоты (35 мкг/мл) и канамицина (30 мкг/мл) для возбудителя бордетеллеза [13].

Очевидно, что мнения большинства современных исследователей в отношении селективного компонента для дифференциально-диагностических сред при идентификации *B. bronchiseptica* неравнозначны. Таким образом, актуальность исследования чувствительности к антибактериальным препаратам указанного возбудителя для выбора их оптимальных комбинаций при разработке транспортной, накопительной и селективной сред очевидна.

Исследование чувствительности к антибактериальным препаратам является важным как в отношении разработки селективных и дифференциально-диагностических сред, так и в отношении видового и штаммового типирования выделенных бактериальных культур [14]. Поэтому результаты проведенных исследований могут быть положены в основу разработки схемы типирования *B. bronchiseptica*.

Целью данной работы являлось исследование чувствительности к антибактериальным препаратам культур *B. bronchiseptica*.

Материалы и методы

В работе были использованы 9 культур *B. bronchiseptica* из коллекции музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА (№ 1, 7, 101, 157, 163, 207, 214, 22067, 8344) которые в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В работе использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ п. Оболенск, ТУ 9398-020-78095326-2006, Рег. № ФСР 2007/00001), ГРМ-бульон (ГНЦ ПМБ п. Оболенск, ТУ 9398-021-78095326-2006, Рег. № ФСР 2007/00002), диски с антибиотиками (НИИ им. Пастера г. Санкт-Петербург). На всех этапах работы был использован 0,9% р-р NaCl.

В данной работе была использована 6 часовая бульонная культура *B. bronchiseptica*, после инкубации в ГРМ-бульоне при 37°C. Для определения чувствительности к антибактериальным препаратам был использован диско-диффузионный метод (ДДМ), согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Результаты исследований

Бульонные культуры в количестве 1,0 мл были перенесены на чашки с плотной питательной средой и равномерно распределены на поверхности агара. После 15 минут инкубации при комнатной температуре на поверхность среды с культурой *B. bronchiseptica* в асептических условиях были помещены диски с антибактериальными препаратами. Условия культивирования посевов были следующими – 24 часа при 37°C.

После окончания инкубации чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете) (см. рис. 1, 2). Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм (см. таблицу 1).

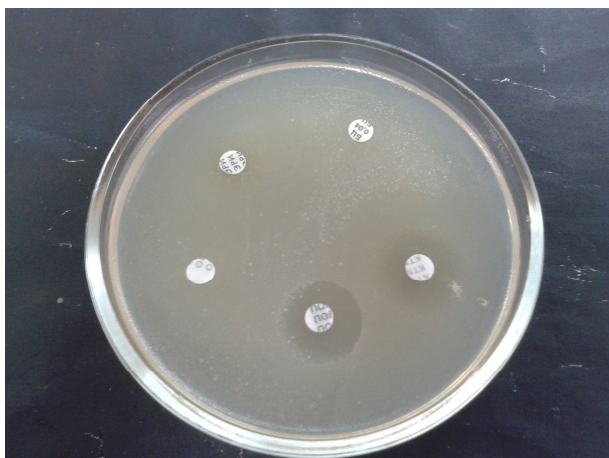


Рис. 1. Множественная резистентность *B. Bronchiseptica* к антибактериальным препаратам

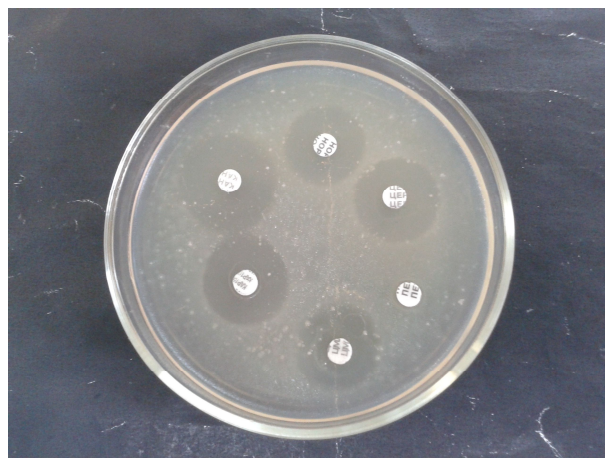


Рис. 2. Чувствительность *B. bronchiseptica* к антибактериальным препаратам

Таблица 1 – Диаметры зон подавления роста штаммов *B. bronchiseptica*

Анти- бактериальные препараты	Содержа- ние в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста (мм)								
		Штаммы <i>Bordetella bronchiseptica</i>								
		1	7	101	157	163	207	214	22067	8344
<i>β-лактамы пенициллины</i>										
Ампициллин	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Амоксициллин	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бензилпенициллин	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Карбенициллин	100	20	17	10	23	18	12	20	17	15
<i>β-лактамы цефалоспорины</i>										
Цефоперазон	75	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Цефалотин	30	15	13	16	15	14	10	17	16	14
Цефтриаксон	30	10	12	10	15	11	15	14	11	10
Цефамандол	30	15	17	14	15	15	17	12	14	16
Цефазолин	30	0	5	7	3	0	0	0	4	0
Цефаклор	30	20	18	24	20	22	16	25	19	20
<i>Природные макролиды</i>										
Эритромицин	----	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Полусинтетические макролиды</i>										
Кларитромицин	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Тетрациклины</i>										
Тетрациклин	30	0	0	0	6	0	0	0	4	0
<i>Аминогликозиды</i>										
Стрептомицин	30	15	14	17	12	18	16	17	17	20

Гентамицин	10	20	17	19	23	22	14	17	20	23
Неомицин	30	24	25	20	19	15	18	15	20	22
Канамицин	30	23	20	21	19	19	17	22	20	18
<i>Левомицетины (синтет. аналоги хлорамфеникола)</i>										
Левомицитин	30	0	0	0	6	0	0	7	0	0
<i>Гликопептидные антибиотики</i>										
Ванкомицин	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Линкозаимды</i>										
Клиндамицин	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Фторхинолоны</i>										
Ципрофлоксацин	5	20	19	21	22	20	19	19	18	20
Левифлоксацин	5	18	16	20	21	19	20	21	18	16
Энрофлоксацин	5	20	18	15	15	15	17	20	18	20
Норфлоксацин	10	20	18	16	20	21	19	17	20	20
<i>Производные нитрофуранов</i>										
Фурадон	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Фуразолидон	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Фурагин	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Прочие</i>										
Оптохин	----	0	0	5	0	0	0	0	6	0

Выводы

В результате проведенных исследований нами обнаружена множественная резистентность *B. bronchiseptica* к β -лактамным пенициллинам (за исключением карбенициллина), макролидам, линкозамидам. В то же время все исследуемые культуры *B. bronchiseptica* проявляют высокую чувствительность в отношении β -лактамных цефалоспоринов (за исключением цефоперазона), аминогликозидов, фторхинолонов. Диаметр зон задержки роста для β -лактамных цефалоспоринов составляет в среднем 17,5 мм (от 10 до 25 мм), для аминогликозидов – 17,5 мм (от 12 до 23 мм), для фторхинолонов – 18,5 мм (от 15 до 22 мм). Согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» величина диаметров зон задержки роста, при которых принято считать, что бактериальная культура чувствительна к антибактериальным препаратам составляет для β -лактамных цефалоспоринов $\geq 18,0$ мм, для аминогликозида канамицина $\geq 18,0$ мм, для аминогликозида гентамицина $\geq 15,0$ мм.

Библиографический список

1. Comparative analysis of the genome sequences of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* / J. Parkhill [et al.] // Nature genetics Advance online publication. – 2003. – V.10. – P.1038-1227.
2. Никульшина Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, 20-22 мая, 2008. – Ульяновск, 2008. – С. 57-59.

3. Васильев Д.А. К вопросу о бактериологической диагностике бордетеллеза / Д.А. Васильев, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Никульшина, А.В. Мاستиленко // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, 20-22 мая, 2008. –Ульяновск, 2008. – С. 92-94.
4. Сверкалова Д.Г. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* / Д.Г. Сверкалова, А.В. Мاستиленко, Д.Н Хлынов, Ю.Б. Никульшина, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, 20-22 мая, 2008. –Ульяновск, 2008. – С. 134-136.
5. Васильев Д.А. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Bordetella bronchiseptica* с помощью ПЦР в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Никульшина // Современный мир, природа и человек: Сборник научных трудов. – Томск, 2009. – С. 115-117.
6. 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(49). – С. 233-235.
7. Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets / S. Lariviere [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1993. – V.31. – №.2. – P. 364-367.
8. Identification of *B. pertussis* infection by shared-primer PCR / Z. Li [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1994. – V.32. – P.783-789.
9. *Bordetella*. Manual of clinical microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington / C.D. Parker [et al.] // D.C. – 1985. – P.394-399.
10. Stauffer, L.R. Cephalixin-supplemented Jones-Kendrick charcoal agar for selective isolation of *Bordetella pertussis*: comparison with previously described media / L.R. Stauffer, D.R. Brown, and R.E. Sandstrom // J. Clin. Microbiol. – 1983. – №17. – P.60-62.
11. Fiizi, M. Selective isolation of *Bordetella bronchiseptica* / M. Fiizi // Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. – 1973. – №24. – P.270-272.
12. Moredun *Bordetella* Medium, an improved selective medium for isolation of *Bordetella parapertussis* / K.M. Connor [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 1996. – V.34. – №.3. – P.638-640.
13. Armstrong S. K., Clements M. O. Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* mutants deficient in siderophore activity / S.K. Armstrong, M.O. Clements // Journal of bacteriology. – 1993. – V.175. – № 4. – P.1144-1152.
14. Гринева Т.А. Определение антибиотикочувствительности *Pseudomonas chlororaphis* / Т.А. Гринева, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 11 июня 2013. – Т. 2. – С. 31-33.
15. Шестаков А.Г. Соотношение бактериофагов в биопрепарате полифага / А.Г. Шестаков, Н.И. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин / Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - 2013. - С. 205-210.
16. Сосина Ю.А. Выявление остаточных количеств антибиотиков в мясе убойных животных и птицы / Ю.А. Сосина, Е.А. Карцева, Е.И. Карамышева, Е.А. Ляшенко / Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, кафедра МВЭиВСЭ. - 2012. - С. 178-180.

17. Антибиотики / Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Власов Н.А. / Учебно-методический комплекс. Методические указания к выполнению лабораторно-практических занятий / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. Ульяновск, 2009. – Т.2.
18. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии вида *Pseudomonas putida* / Д.А. Викторов, И.И. Богданов // В книге: Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыркаев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А., Шестаков А.Г. и др. Ульяновск, 2013. С. 241-262.

**RELEVANCE OF INFECTION AND THE PROBLEM
BORDETELLEZNOY USE OF ANTIBIOTICS AS SELECTIVE
COMPONENT IN IDENTIFICATION *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*
Lomakin A.A., Mastilenko A.V.**

Keywords: *Bordetella*, bacteria, antibiotics, selective components

Work is devoted to mainstreaming bordetelleznoy infection at the moment and the problem of choice of antimicrobials as a selective component in the development of differential diagnostic and selective media for display and identification of *Bordetella bronchiseptica*.