

**Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий РАН,
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока**

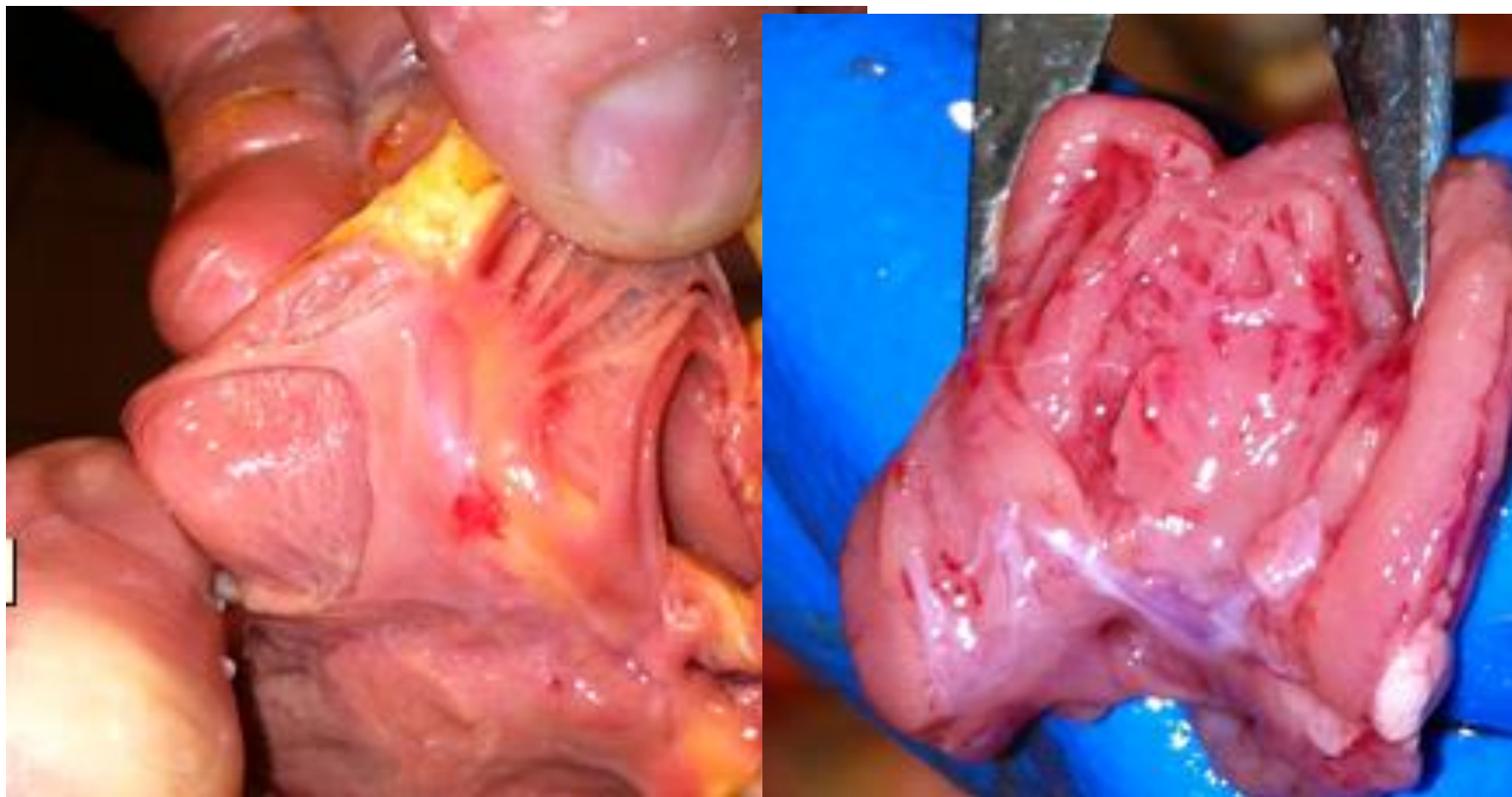
**Иммунофлуоресцентная реакция
агглютинации (ИРА) –инструмент для
контроля вторичных бактериальных
инфекций и разработки аутогенных
вакцин.**

**Зав. сектором молекулярной биологии СФНЦА РАН, к.б.н.
Афонюшкин В.Н.**

г.Новосибирск 2022

Бактериальный эндокардит

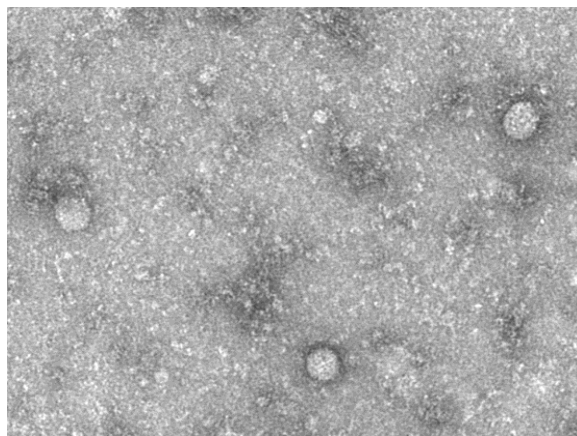
- Ассоциируемость «бактериальных эндокардитов» с гибелью птиц на птицефабриках. Болеют ли люди?



- Кровоизлияния (петехии и экхимозы) на эндокарде, образование тромбов на клапанах

Основной тезис – инфекций на птицефабрике больше чем тест-систем на рынке

Пример вреда от широкого распространения молекулярных методов: флавивирусная инфекция и др.

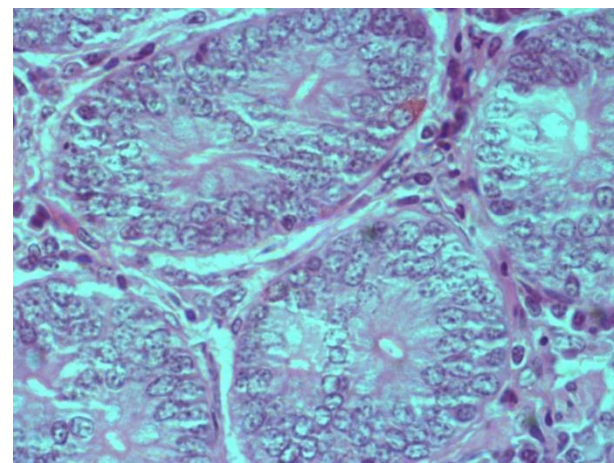


- Язвенные поражения кутикулы мышечного желудка
- Патология ассоциируется с обнаружением в кишечном содержимом вирусных частиц с одинаковой морфологией

изменение патогенности
возбудителя RSS, 2013г.



В этом году мы встретили
рабдовирус у кур –
уникальное явление



Нарушение структуры крипт

Основной тезис – инфекций на птицефабрике больше чем тест-систем на рынке

Что такое молекулярная эпизоотология и почему она нужна для выяснения путей заражения?

Основной тезис – эффективнее выявить источник заражения чем повторять путь Сизифа

В данной ситуации мы использовали анализ микросателлитной ДНК с помощью ПЦР. Однако, во всем мире, золотым стандартом идентификации штаммов сальмонелл является метод RFLP-PFGE.

Есть основания считать что глобальным фактором определяющим эпизоотическую ситуацию по сальмонеллезу является вертикальный путь заражения сальмонеллами от племенной птицы.

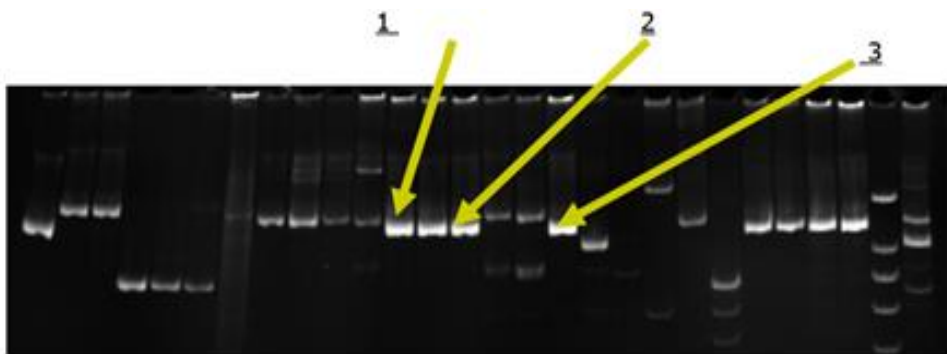


Рис. 1. Результаты типирования *S. enteritidis*, выделенной на разных птицефабриках с помощью VNTR-ПЦР:
1. Голубь из кормоцеха. 2. Цыпленок-бройлер. 3. Суточный цыпленок до поступления на птицефабрику

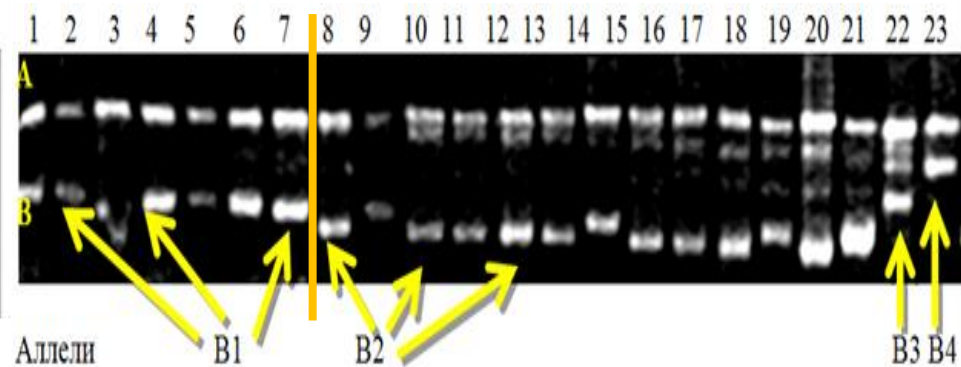
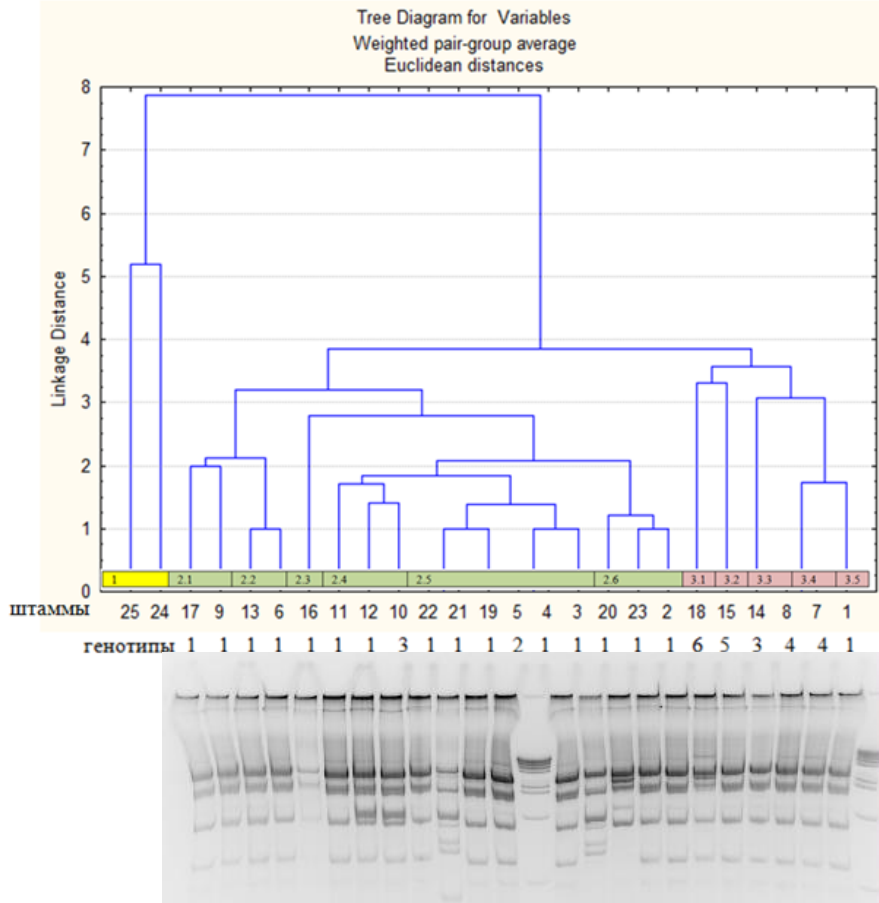


Рис. 2. Штаммы сальмонелл, выделяемые до (№ 1-7) и после (№ 8-23) смены кросса птицы на птицефабрике. Мультилокусное VNTR-типирование

Зачем нужна молекулярная эпидемиология ? Какое имеет она отношение к эффективности антибиотикотерапии?

Антибиотикограмма 7 изолятов E.coli, мм

Антибиотик	1	2	3	4	5	6	7
1 Тиамулин	0	0	0	0	0	0	0
2 Тилозин	13	14	14	0	0	13	14
3 Флорфеникол	24	20	28	32	30	20	21
4 Дитрим	0	0	0	0	0	0	0
5 Доксациклин	12	12	14	15	12	11	10
6 Окситетрациклин	0	0	0	0	0	0	0
7 Энрофлоксацин	0	0	0	0	0	0	0
8 Гилмикозин	0	0	0	0	0	0	0
9 Гентамицин	12	12	0	0	0	12	13
10 Норфлоксацин	0	0	0	0	0	0	0
11 Амоксицилин	0	0	0	0	0	0	0
12 Колистин	16	16	16	15	15	14	17

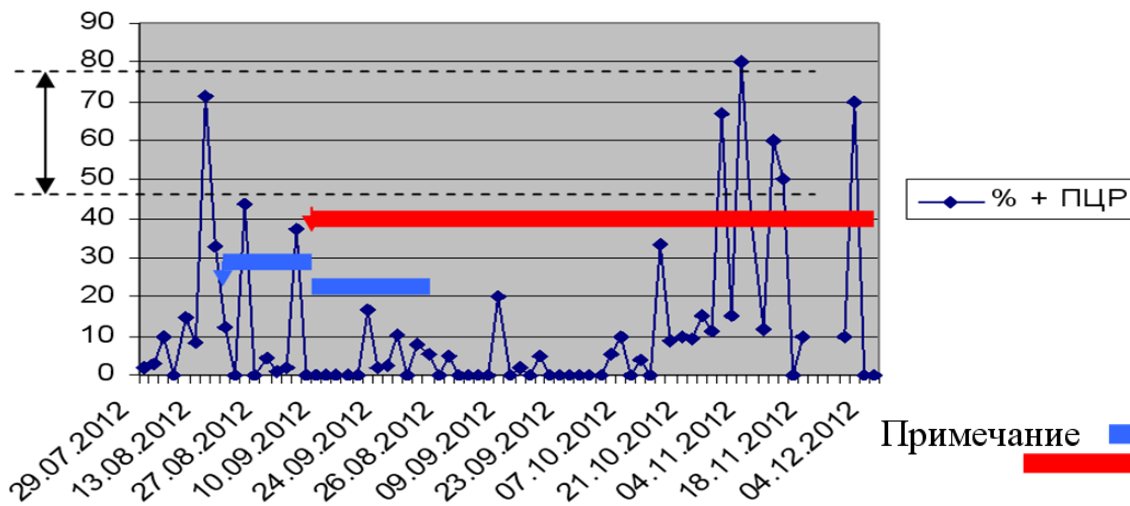




В кишечнике много биоваров E.coli – если при сходных патологиях выделяется преимущественно один биовар то, скорее всего, он имеет эпизоотическое/эпидемическое значение

Сопоставление изолятов кишечной палочки по профилю антибиотикорезистентности, мм

Основной тезис – очень часто микробиологи выделяют «не ту бактерию» и тогда врачи назначают «не тот антибиотик». Выявление эпидемически значимых штаммов позволяет сформировать группу антибиотиков первого выбора для определенной территории

Основной тезис – кишечная палочка есть всегда, вопрос в выявлении патогенного штамма



Примечание  - выпаивание бактериофага
 - применение фторхинолонов

- Применение противосальмонеллезного бактериофага. Процент инфицированности

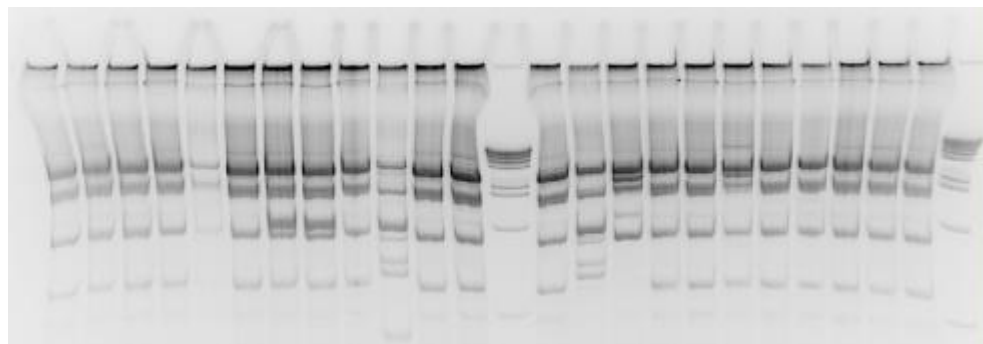


А **Б** **В**

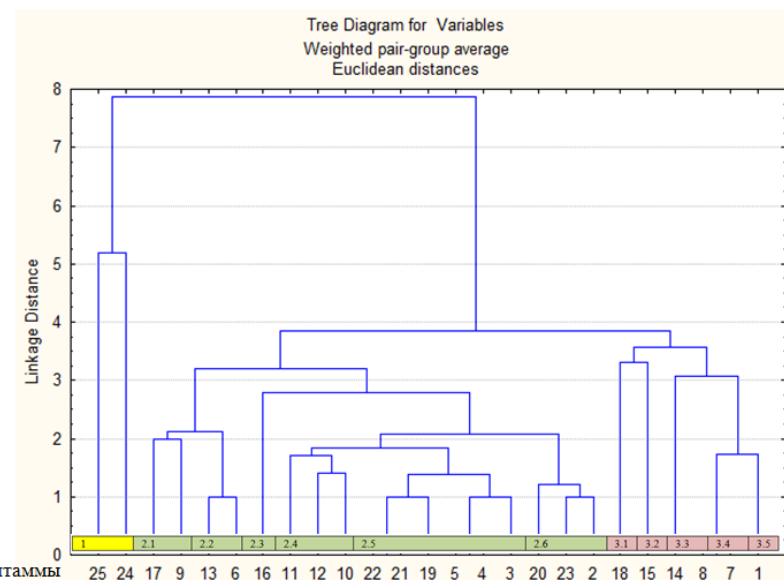
Рис.4 Фаговые бляшки вокруг зон задержки роста в присутствии антибиотиков: ципрофлоксацина (А), энрофлоксацина+ триметоприма(Б), доксициклина (В).

Основной тезис – бактериофаги узкоспецифичны, в этом они уступают антибиотикам

Что делать с полирезистентными сальмонеллами и кишечной палочкой?



Молекулярная эпизоотология кишечной палочки



штаммы 25 24 17 9 13 6 16 11 12 10 22 21 19 5 4 3 20 23 2 18 15 14 8 7 1
генотипы 1 1 1 1 1 1 1 1 3 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 6 5 3 4 4 1

Зоны задержки роста к штамму *S. enteritidis* №25, мм

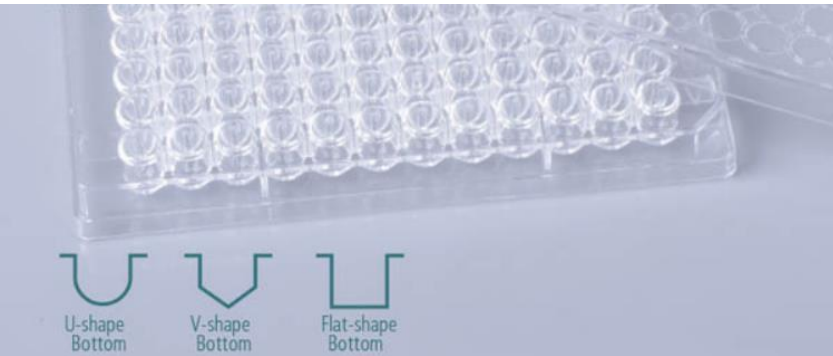
Антибиотик	Интактный контроль	Бактериофаг №23	Бактериофаг № 44
	M+m	M+m	M+m
Мизоксин (доксциклин)	23,5±0,29	33±0,58***	26±1,16
гентамицин КРКА	17,5±0,29	19±0,58	20,5±0,29**
энроксил (энрофлоксацин)	14,5±0,29	25±0,58***	20,5±0,29***
флорон (флорфеникол)	24,5±0,29	22,5±0,29**	25±0,58
Трисульфон (Триметоприм +сульфаметоксазол)	21,25±0,14	29±0,58***	27±0,58***
флубактин (флумеквин)	12,5±0,29	19,5±0,87**	17,5±0,29***
спектиномицин	26,5±0,29	14,5±0,29***	19±0,58***
Тиавалт (тиамулин)	0±0,00	0±0,00	0±0,00
ципрофлоксацин	0±0,00	34,5±0,29***	30,5±0,29***
Аматиб (амоксциллин)	0±0,00	13±0,58***	0±0,00
Егоцин (окситетрациклин)	0±0,00	0±0,00	0±0,00

Дендрограмма группировки культур кишечной палочки и сальмонеллы по результатам фаготипирования. Цветная шкала – результат деление на кластеры. Первая цифра – номер ветви, вторая цифра – номер кластера

Иммунофлуоресцентная реакция агглютинации (ИРА)

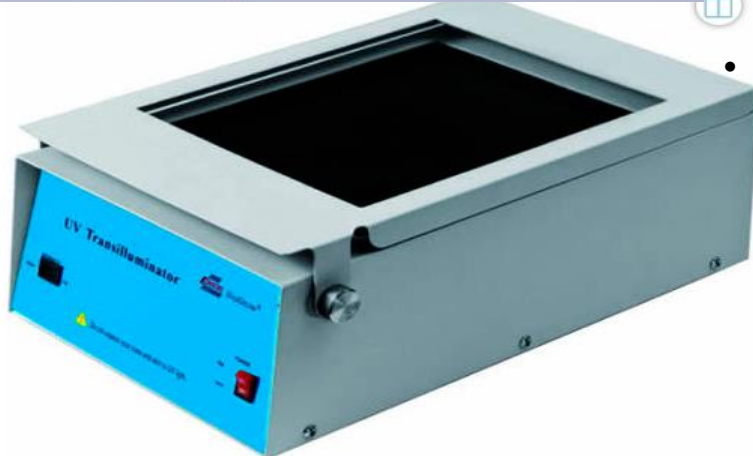


- Антиген получали из предварительно убитой кипячением взвеси бактериальных клеток. Использовали инактивированные культуры сальмонелл серотипов Hamburg, Enteritidis, Reading, Typhimurium Virchow, Infantis а также культуру сальмонеллы которая была выделена из пищевой продукции. Для получения флуоресцентно-меченых антигенов, к взвеси инактивированных бактериальных клеток добавляли 0,1% раствор флуоресцентного красителя – акридиновый оранжевый.

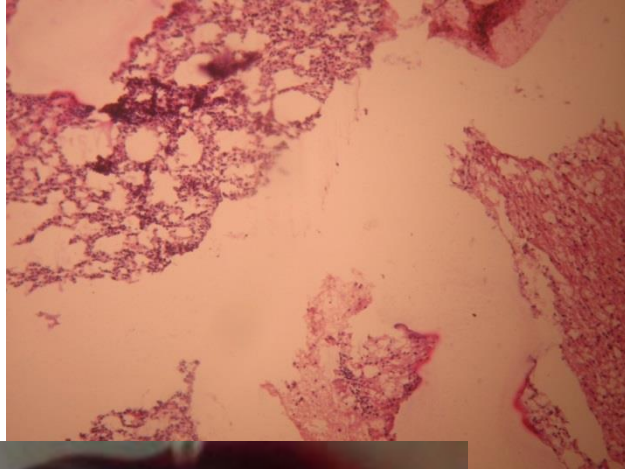


- Изучали уровень антител в реакции иммунофлуоресцентной агглютинации. Предварительно определили оптимальную концентрацию антигенов. Для этой цели антигены разводили с шагом 1:2 и вносили в лунки 96 луночного микропланшета с V – образным дном, через 16 часов инкубации оценивали светимость антигенов с помощью трансиллюминатора GelDok BioRad. Затем проводили реакцию агглютинации с сыворотками крови, которые разбавляли с шагом 1:2.

- Для оценки процента серопозитивной птицы. исследовали 24 пробы сыворотки крови от цыплят-бройлеров в возрасте 40 дн в ИРА с антигеном сальмонеллы выделенной ранее на этой же птицефабрике. Часть положительных образцов были протестированы в РА с флуоресцентномеченными антигенами Hamburg, Enteritidis, Reading, Typhimurium, Virchow, Infantis для выявления перекрестных реакций с полевым штаммом. Реакцию ставили по методу [1].

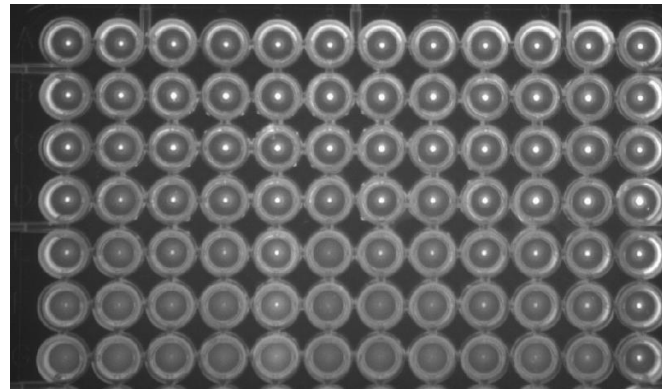


Learning new problems - creating new markets



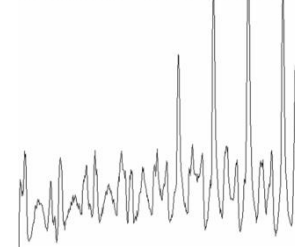
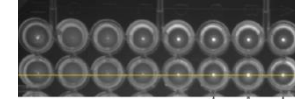
- Изменения в легких и селезенках у инфицированных мышей

1:512
1:256
1:128
1:64
1:32
1:16
1:8

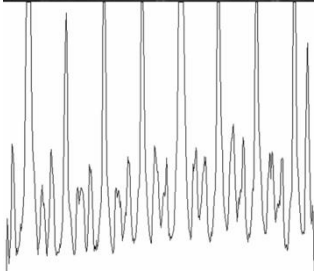
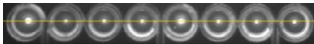


▶ ОПЫТ

▶ КОНТРОЛЬ



▶ -

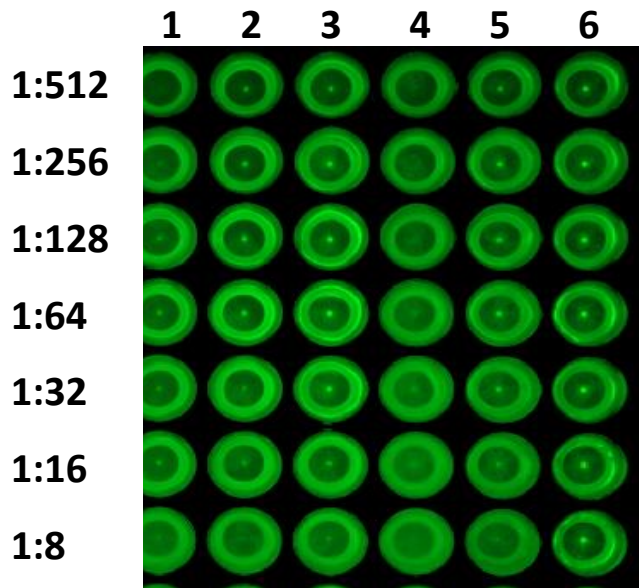


▶ +

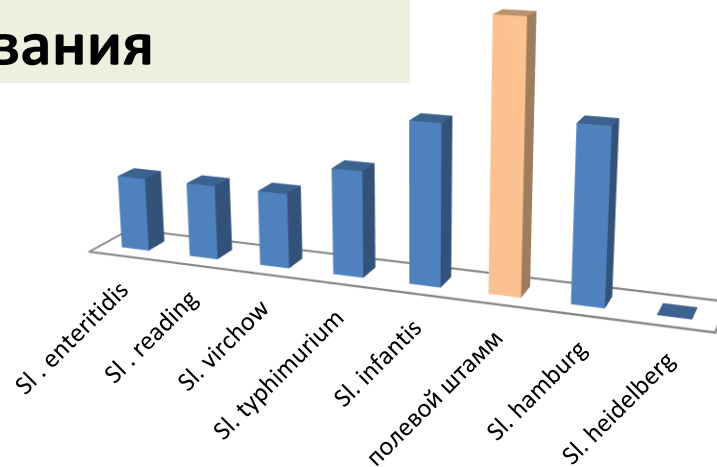
Появление специфических антител в иммунофлюоресцентном варианте РА

Как оценить эффективность противосальмонеллезных мероприятий?

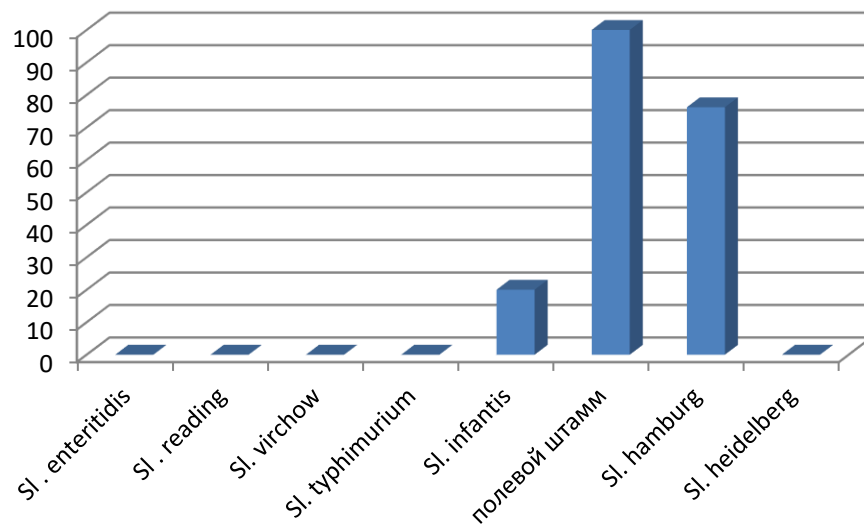
Вариант 1 - Серологические исследования



Реакция агглютинации с флуоресцентно-меченым антигеном *S. infantis*



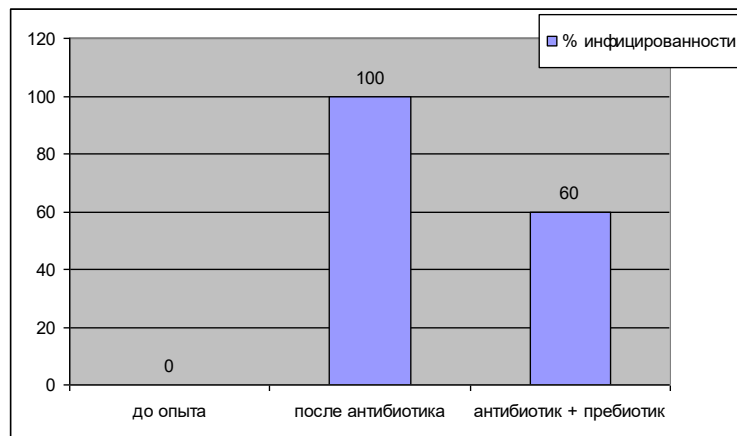
Средний титр в РА с антигенами сальмонелл разных серотипов, Log2



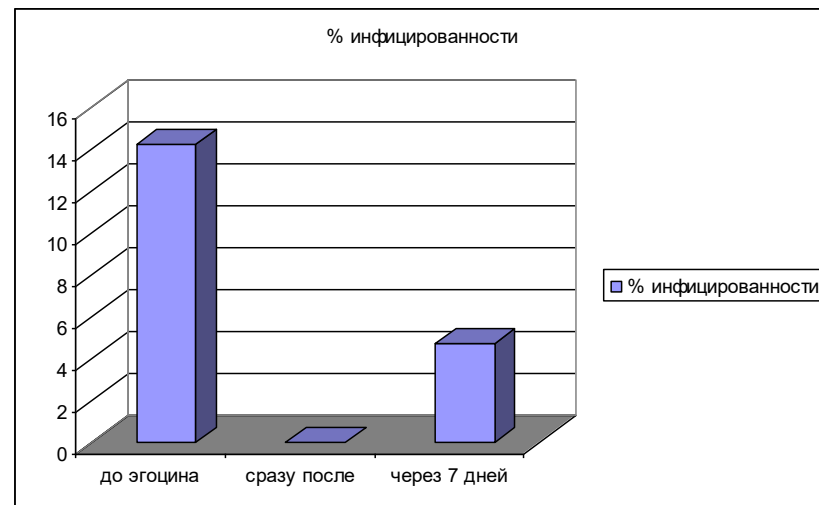
Процент серопозитивной птицы в РА к антигенам сальмонелл разных серотипов, %

Использование серологических тестов на бройлерах – можно по разнице процента серопозитивной птиц и/или среднего титра между опытными и контрольными птичниками оценить эффективность противосальмонеллезных мероприятий за 10-14 дн до отбора проб крови

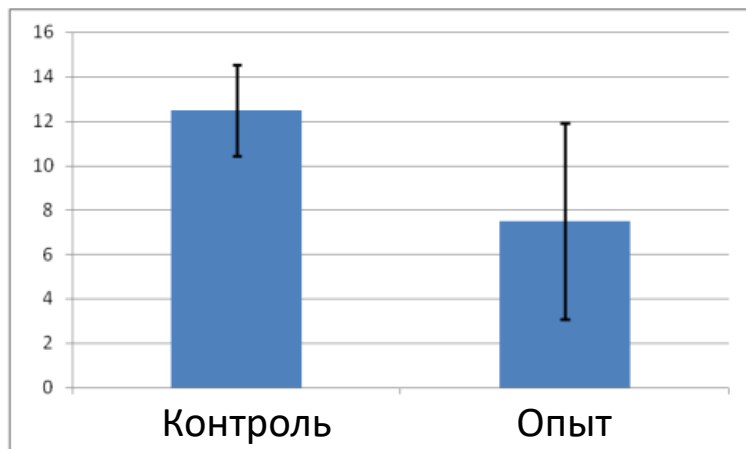
Примеры ПЦР мониторинга эффективности мероприятий



Инфицированность желудочно-кишечного тракта при использовании антибиотика широкого спектра действия в моноварианте и в сочетании с пребиотиком



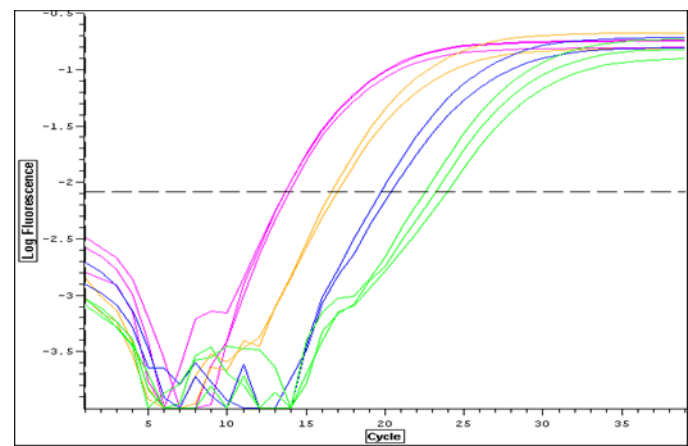
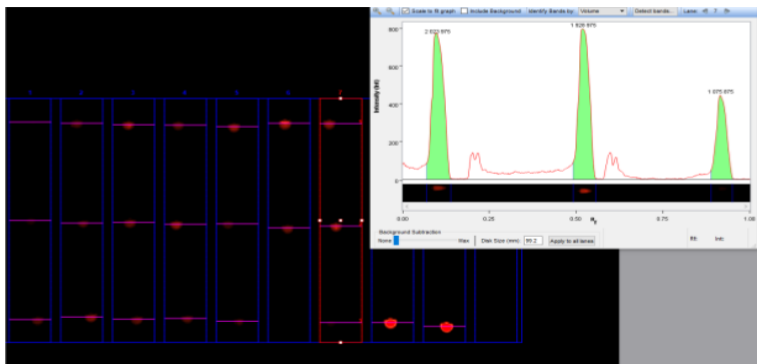
Динамика инфицированности клоаки кур до и после использования эгоцина.



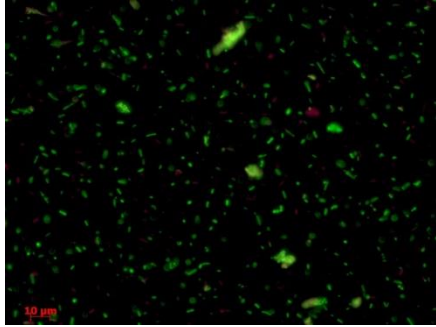
Опыт с применением противосальмонеллезного бактериофага (Опытная группа 3 птичника (проанализировано 60 проб), контрольная группа (3 птичника), также проанализировано 60 проб на убое)

Как оценить эффективность противосальмонеллезных мероприятий? (ПЦР или LAMP мониторинг)

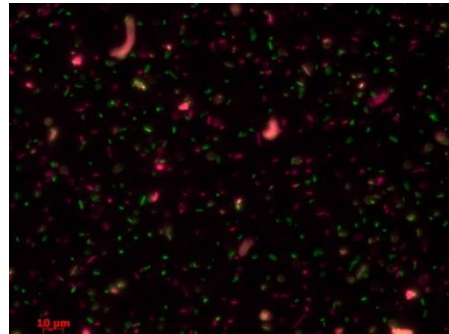
- ПЦР мониторинг (20 проб клоакальных смывов или кишечного содержимого на птичник/возраст). Для птицы в возрасте до 20 дней следует сравнивать опытные и контрольные группы. Для птицы со сформировавшейся кишечной микробиотой и небольшим сроком эксперимента рациональнее сравнивать изменение инфицированности сальмонеллой до и после опыта на одной и той же птице.
- Варианты тестируемых проб
- А) клоакальные смывы (пред-обогащение на питательных средах)
- Б) кишечное содержимое (слепая кишка 0,1-0,2 мл). Можно зафиксировать спиртом



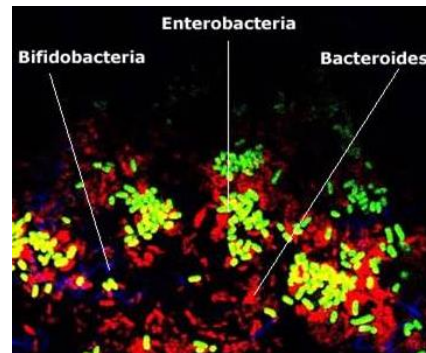
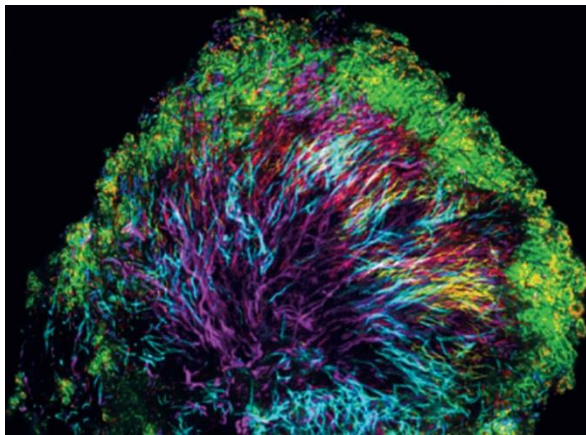
Оценка устойчивости микробиоценозов к антибактериальным препаратам



- Кишечное содержимое до выпойки антибактериального препарата

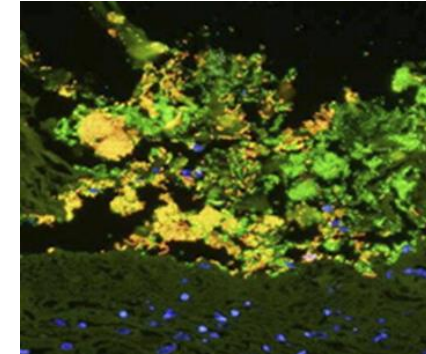
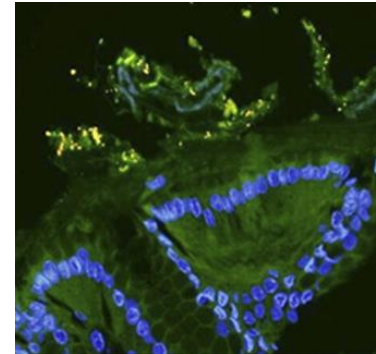


- Кишечное содержимое после выпойки антибактериального препарата



Microbial consortium in human dental plaque. Image courtesy of G. G. Borisy and [dx.doi.org/10.1073/pnas.1522149113](https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113) (2016) J. L. Mark Welch, The Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts, USA.

FISH

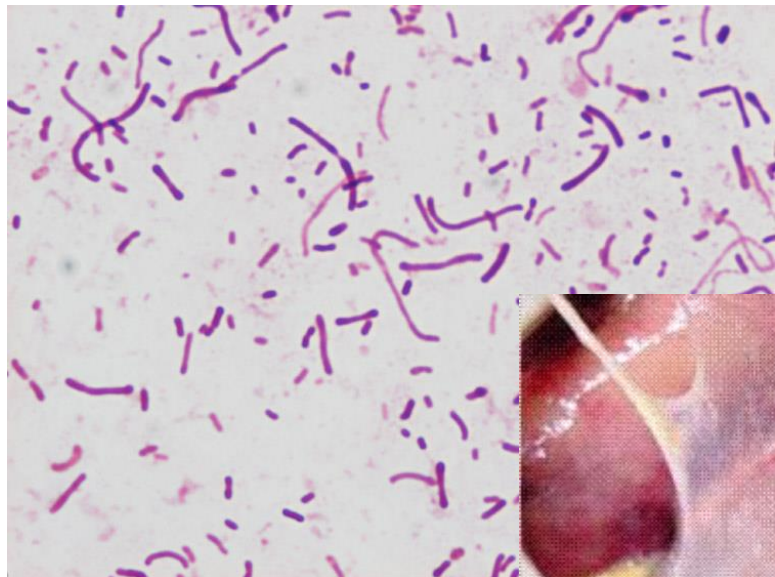


FISH shows abundant bacteria in close apposition to the equine gastric mucosa. Histologic sections from the glandular, and ulcerated mucosa were examined using labeled oligonucleotide probes directed against bacteria in general (EUB-338, 6-FAM, green) in combination with probes directed against *Streptococcus* spp. (Cy-3).

- Appl. Environ. Microbiol. April 2012 vol. 78 no. 8 2522-2532

Выявление кишечных бактерий отдельных родов в искусственной среде, моделирующей кишечную микробиоту. Применен метод FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) – гибридизация тестовой ДНК непосредственно в пробе с окрашиванием различными флюоресцентными метками (заимствовано с сайта University of Dundee, Scotland)

Ornithobacterium rinothoraceale

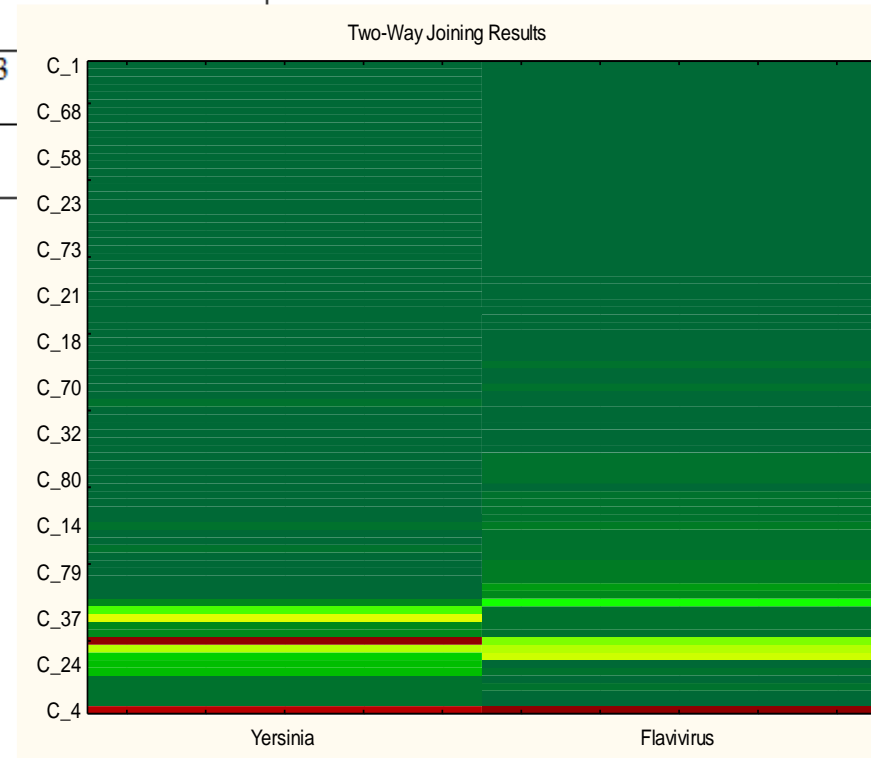


**Выявление данного микроорганизма
это не повод ставить диагноз –
орнитобактериоз!!!**

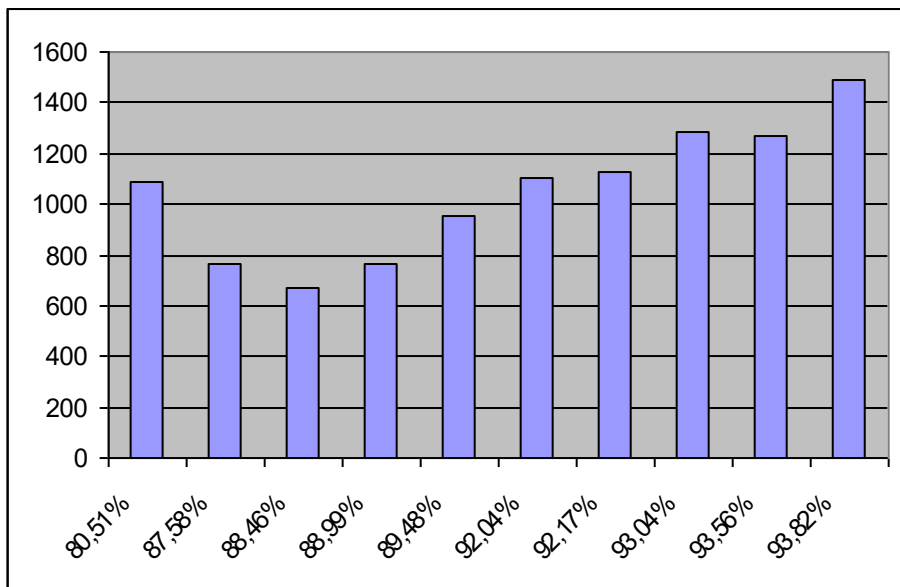
Частоты ассоциаций наличия антител к группоспецифичному антигену флавивирусов и наличия антител к антигенам *Y. enterocolitica*

	Наличие антител в ИФА к <i>Y. enterocolitica</i>	Отсутствие антител в ИФА к <i>Y. enterocolitica</i>
Наличие антител к флавивирусам в ИФА (n=15)	11	4
Отсутствие антител к флавивирусам в ИФА (n=25)	2	23
	хи ² =18,24 (достоверно различается)	

Результаты кластеризации титров антител к группоспецифичному антигену флавивирусов и антигенам *Y. enterocolitica* методом Two-Way Joining



- OR (отношение шансов)=31,63 (CI 5,01-199,77)
- ассоциация статистически достоверна (P=0,00024).



Различия уровней антител (igM) к вирусу МПВИ в птичниках с разным уровнем смертности

Так как метапневмовирусная инфекция проявляется у бройлеров незадолго до убоя, то обнаружение антител класса igY(G) представляется проблематичным а их уровни в большей степени зависят не от вирусной нагрузки, а от времени контакта птицы с возбудителем

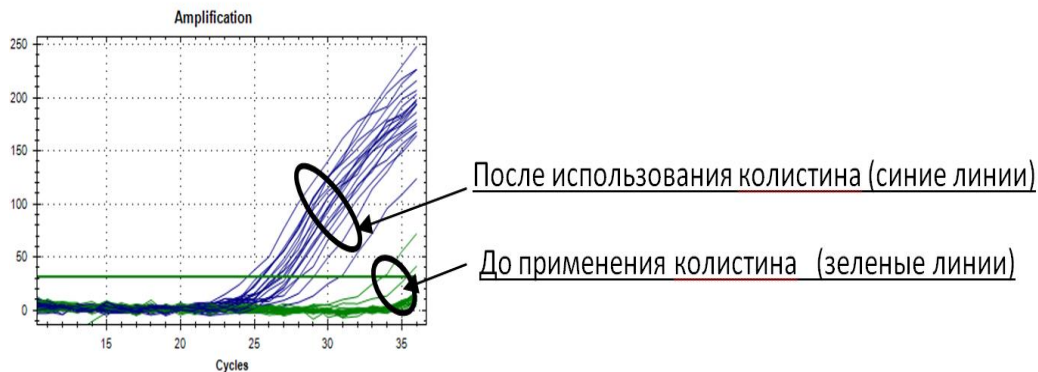
Разные варианты статистического анализа

Параметр	Низкая сохранность	Высокая сохранность
M сохранность	87,00%	92,93%
M титры	849,6	1254,2
P (титры)=	0,0044128	
корреляция (по Пирсону)	0,491737	
корреляция (по Спирмену)	0.85	
Odds ratio (отношение шансов)	33.0000	P = 0.0460

Odds ratio (отношение шансов) можно рассчитать на этом сайте

https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php

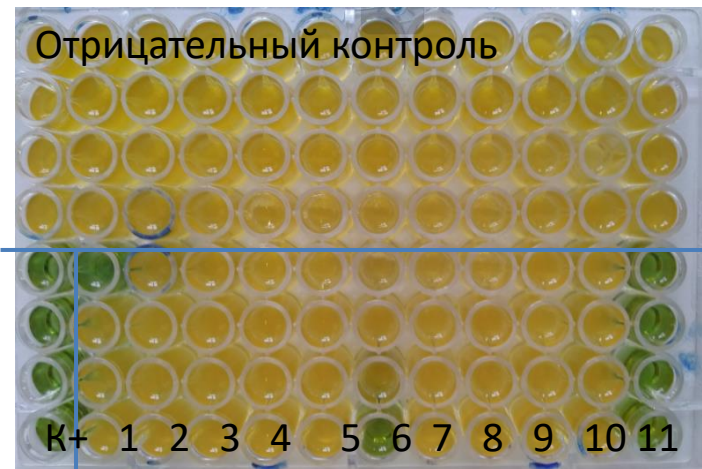
Корреляцию по Спирмену можно рассчитать на этом сайте <http://math.semestr.ru/corel/spirmen.php>



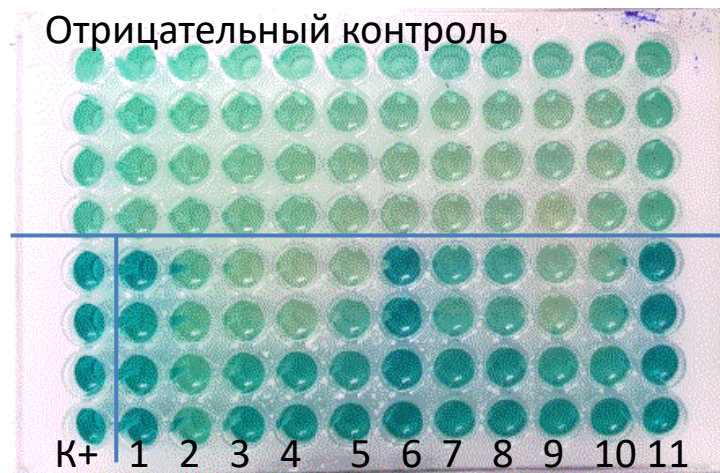
Кривые роста флуоресценции при реалтайм ПЦР на наличие геномной ДНК сальмонелл.

Средние концентрации ингибирующие рост и подвижность бактерий

параметр	МПС	Подавление подвижности
<i>Escherichia coli</i>		
M±m, мкг/мл	387,5±42,08	74,93±13,83
Cv, %	34,06	58
r=	0,95	
<i>Salmonella enterica</i>		
M±m, мкг/мл	119,7±30,75	46,87±9,05
Cv, %	62,6	47
r=	0,161	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
M±m, мкг/мл	83,33±25,61	41,66±12,8
Cv, %	32,27	16,13
r=	1.0	

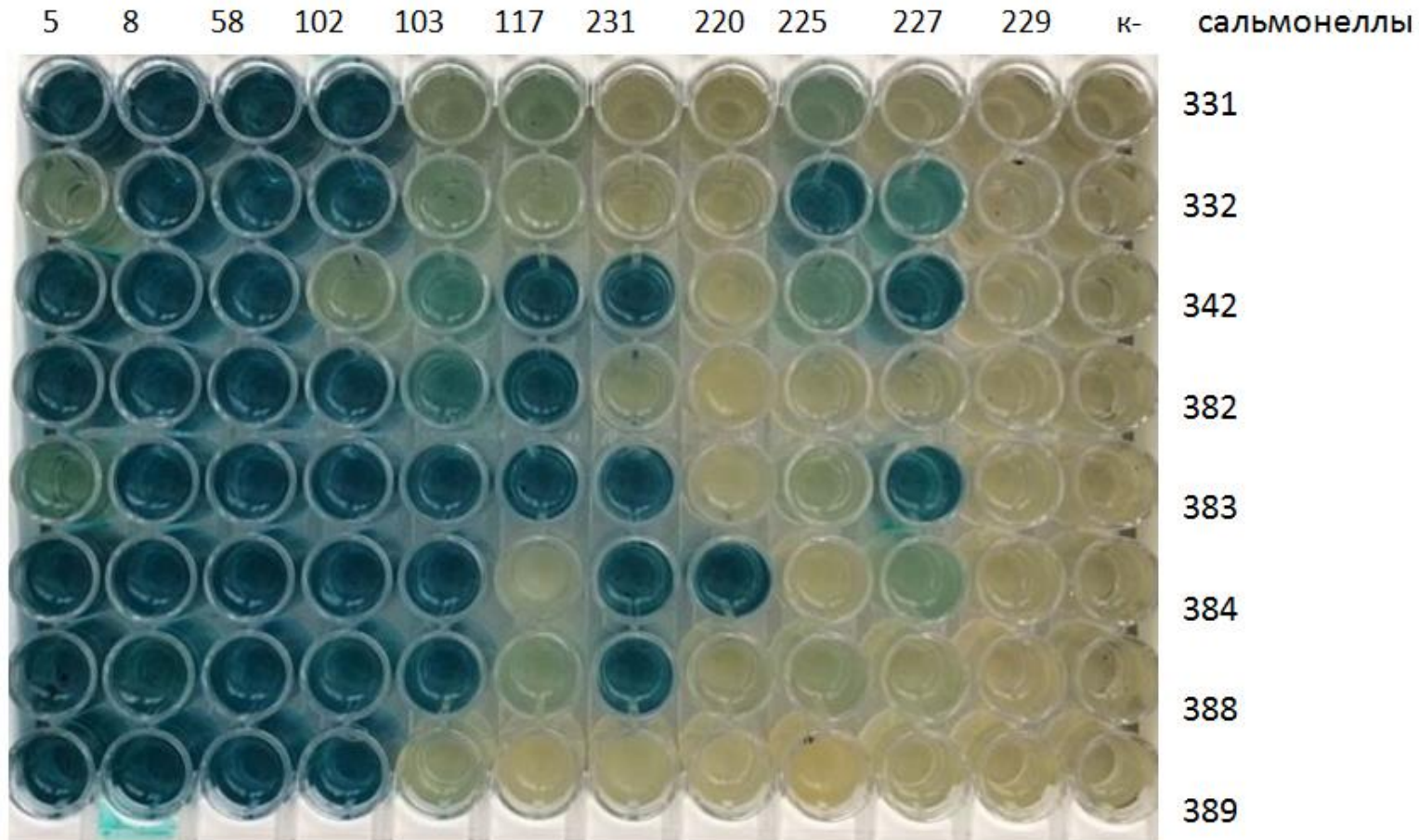


Анализ противозерихиозной активности лактобактерий изолированных от кур неблагополучной птицефабрики



Анализ противосальмонеллезной активности лактобактерий изолированных от кур неблагополучной птицефабрики

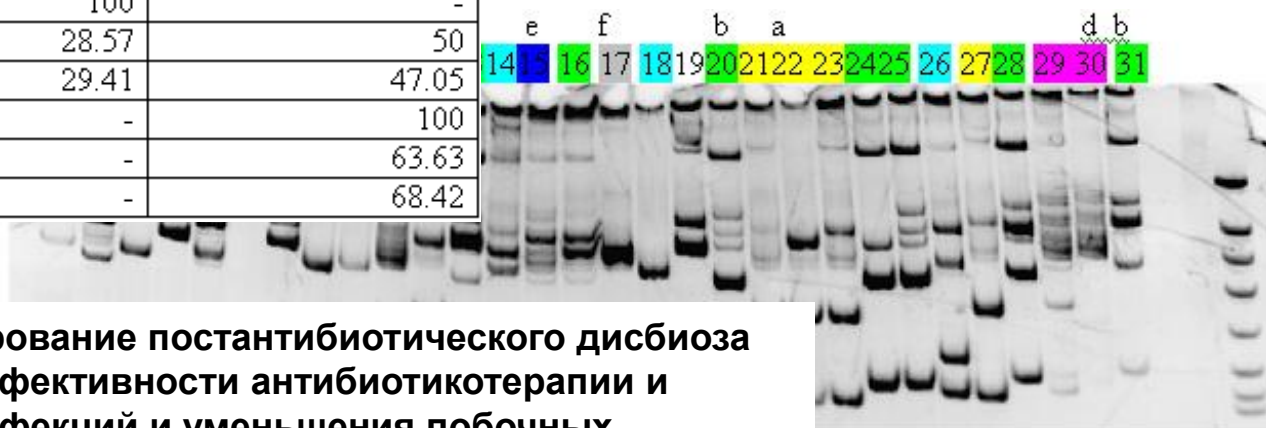
Лактобактерии с других птицефабрик Род стадо неблагополучной ПФ.



Результаты сокультивирования сальмонелл (выделенных на птицефабрике неблагополучной по сальмонеллезу) с лактобактериями (культуры 5-117 депонированы в коллекции ИХБФМ, культуры 220-231 выделены на птицефабрике неблагополучной по сальмонеллезу). Рост на RVS – бульоне после сокультивирования. Зеленая среда – роста сальмонелл нет.

А всегда ли применение антибиотиков вызывает дисбактериоз? Процент выделяемых изолятов лактобактерий с высоким и низким уровнем чувствительности к исследуемым антибиотикам

№ п/п	антибиотик	выборка	% (задержка роста >20 мм.)	% (задержка роста отсутствует)
1	ампициллин	16	75	18.75
2	гентамицин	2	50	-
3	левомицетин	20	40	15
4	неомицин	10	40	10
5	норфлоксацин	5	20	60
6	оксациллин	21	9.523	61.904
7	офлоксацин	20	5	60
8	пенициллин	18	22.22	22.22
9	польодоксин	17	23.52	58.82
10	рифампицин	7	85.71	-
11	тетрациклин	18	16.66	66.66
12	тилозин	3	66.66	-
13	фуразолидон	21	14.28	66.66
14	цефазолин	2	100	-
15	энроколи	14	28.57	50
16	эритромицин	17	29.41	47.05
17	сульфаниламид	2	-	100
18	спектиномицин	11	-	63.63
19	энрофлоксацин	19	-	68.42



Основной тезис – прогнозирование постантибиотического дисбиоза полезно для повышения эффективности антибиотикотерапии и профилактики кишечных инфекций и уменьшения побочных эффектов при антибиотикотерапии

Спасибо за внимание!

Афонюшкин Василий, лаборатория
фармакогеномики, Институт
химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН
lisocim@mail.ru