

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Вербицкий А. А., кандидат ветеринарных наук, доцент *
Рубникович Т.П., научный сотрудник**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

* УО Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины, Витебск

** Белорусский государственный медицинский университет, Минск

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ И ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BORDETELLA* *BRONCHISEPTICA*, ОСНОВАННЫХ НА МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДАХ

ВВЕДЕНИЕ

Bordetella bronchiseptica это небольшие, грамотрицательные, палочковидные бактерии рода *Bordetella* [1]. Данный возбудитель может вызывать инфекционный бронхит у млекопитающих, но редко вызывает заболевание людей [2]. В антигенном отношении *Bordetella bronchiseptica* схожа с *Bordetella pertussis* – облигатными патогенами человека, которые вызывают коклюш. *B. bronchiseptica* может сохраняться в окружающей среде в течение длительного периода времени [3, 4].

У бактерии *B. bronchiseptica* имеется на вооружении множество факторов патогенности: адгезинов (филаментозного гемагглютинина, пертактина и фимбрий) и токсинов (дермонекротического, аденилатциклазы-гемолизина и липополисахарида) (Woolfrey et al., 1991; Gueirard et al., 1995).

В ветеринарии *B. bronchiseptica* приводит к патологии бронхолегочных путей, трахеобронхитам у различных видов животных [5, 6].

B. bronchiseptica является этиологическим агентом заболевания у собак, свиней и кроликов, а также у кошек, лошадей и тюленей. В настоящее время существуют ПЦР тест-системы для идентификации возбудителя [7].

У свиней *B. bronchiseptica* и *Pasteurella multocida* действуют в ассоциации, вызывая атрофический ринит – болезнь, в результате которой происходит задержка роста и искривление носовых раковин (криворылость) [8].

У собак *B. bronchiseptica* вызывает острый трахеобронхит [9], который обычно сопровождается сильным кашлем (кашель питомников). Кашель питомников может быть вызван собачим аденовирусом тип 2, ви-

русом собачьего парагриппа или комбинацией этих патогенов [7].

У кроликов *B. bronchiseptica* часто выделяется из носовых путей при часто встречающейся бессимптомной инфекции, сопровождаясь только насморком [10].

У кошек поражения, вызванные *B. bronchiseptica* сопровождаются трахеобронхитами, конъюнктивитами и ринитами, поражением нижнечелюстных лимфатических узлов и пневмонией. Помимо этого, со схожими клиническими признаками протекают заболевания, вызванные вирусом герпеса, калицивирусом, микоплазмой различных видов или хламидией [7]. Для кошек разработана и внедрена в практическое использование интраназальная вакцина [11].

Целью исследования является применение методических и теоретических приемов индикации и идентификации *B. bronchiseptica*, основанных на молекулярно-генетических методах.

В Республике Беларусь до настоящего времени исследования в этой области не проводились.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение генов и поиск нуклеотидных последовательностей проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США.

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью программы Vector NTI и BLAST online (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

В работе использовался производственный, вакцинный штамм *B. bronchiseptica* – КМИЭВ В–120

В работе были использованы следующие реактивы:

- 10x PCR буфер для Tag ДНК-полимеразы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»)
- 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA);
- ТАЕ: 0,04М трис ацетат, 0,002М ЭДТА;
- маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва);
- термостабильная ДНК-полимераза (Taq-полимераза, 5 ед/мкл) (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»);
- раствор MgCl₂ (50 мМ);
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (25 мМ) (Fermentas, Литва);
- праймеры для определения принадлежности к *B. bronchiseptica*;
- агароза (helicon, Россия);

- буфер для нанесения проб;
- бромистый этидий (SIGMA, США);
- стерильная деионизированная вода.

Приборы и оборудование:

- микротермостат «BIOSAN-CH100»(Латвия);
- амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США);
- персональный компьютер (Windows XP, 2 GHz, 512 Mb RAM, 80 Gb HDD, CD-RW, USB 2.0, мышь);
- микроцентрифуга высокоскоростная (14 000 об/мин) Jouan (Франция);
- комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария), вместимостью 0,1-2 мкл, 0,5-10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1–10 мл и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров);
- пробирки для микропроб типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 мл;
- вортекс «BIOSAN» (Латвия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл для прибора «С 1000 Thermal Cycler»;
- холодильник «Атлант МХМ 1841» (ЗАО «Атлант», РБ);
- система для электрофореза «Consort», (Бельгия);
- Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США);
- термостат SEL LAB (Германия);
- весы RADWAG AS 220/X (Польша);
- система подготовки чистой воды «Crystal В», ADRONA (Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Своевременное выявление возбудителя болезни весьма важно при лечении данного заболевания антибиотиками, а также в цепи мероприятий направленных на борьбу с распространением данного заболевания. Обычные методы обнаружения с применением питательных сред обладают недостаточной чувствительностью.

Существующие серологические тесты не дают различий близкородственных видов *Bordetella*. Только молекулярно-генетические методы обнаружения, основанные на ПЦР, могут за короткий промежуток времени не только идентифицировать возбудителя болезни, но специфически идентифицировать его вид.

Преимущества постановки ПЦР при идентификации *B. bronchiseptica*:

- 1 помощь при подтверждении вида болезнетворных агентов;
- 2 малое количество времени, необходимое для подтверждения клинического диагноза *B. bronchiseptica*;
- 3 позволяет выявить животных, являющихся бактерионосителями и бактериовыделителями;

4 дает возможность минимизировать воздействие *B. bronchiseptica* на человека за счет мониторинга биологических продуктов, произведенных от восприимчивых животных.

Первым этапом в конструировании ПЦР тест-системы является мониторинг генов *B. bronchiseptica*, генотипических профилей кодирующих факторы вирулентности, поиск мишеней (таб.1). Одними из таких факторов у бордетелл являются: жгутики (FLA), dermonecrotoxin (DNT), экзогенный рецептор сидерофор железа (bfrZ), PTX– пертуссис токсин, CYA– ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы, FHA– ген, отвечающий за синтез гемагглютинина, FIM– гены, отвечающие за формирование субъединицы фимбрии, PRN – ген, отвечающий за синтез пертактина, и так далее.

Таблица 1 – Наименование генов, олигонуклеотидных последовательностей и длина мишеней.

№	Праймер	Последовательность**, 5'-3'	П.н.
1	<i>16S rRNA1 (f)</i>	CTACGGGGGAAAGCGGGGGA	711
	<i>(r)</i>	GACCGTACTCCCCAGGCGGT	
2	<i>16S rRNA 2 (f)</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	520
	<i>2 (r)</i>	GCGGCTGCTGGCACG	
3	<i>BfrZ (f)</i>	GGACGACCAGGATCACATCTTCC	298
	<i>BfrZ (r)</i>	GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG	
4	<i>fimX (f)</i>	CACGATCGAGGACCCGAG	123
	<i>fimX (r)</i>	TTGGAGATCGTGGGCAGG	
5	<i>bvgR (f)</i>	TGCTTACCGTCAGCACGTTCTCGA	104
	<i>bvgR (r)</i>	GCATACATGAGTTCTGGCATCAG	
6	<i>Prn (f)</i>	CAATGTCACGGTCCAACGCA	587
	<i>Prn (r)</i>	GCCTGCAAGGTGATCGACAG	
7	<i>CyaA (f)</i>	GTGGCTGGCCTGGTTCATGA	1072
	<i>CyaA (r)</i>	CGTTGTA AAAACAGCGACGCCAACG	
8	<i>FhaS (f)</i>	CCAGCGCGCCCCGCTCAGCC	117
	<i>FhaS (r)</i>	GCCGGCACGCACCGACAGCGCGTT	
9	<i>fhaB(f)</i>	GGAAAAGTCTGAATTCCCGCGC	338
	<i>fhaB (r)</i>	CGGTGCAATGCTCGCTCACGG	

Амплификацию проводили по программе, указанной в таблице 2.
Таблица 2 – Программа амплификации

Амплификатор: С 1000 Thermal Cycler,		Количество повторов
Температура	Время	
95°C	3 мин	1
94°C	30с	40–50
58°C	1 мин	
72°C	30с	
72°C	7 мин	–
10°C	хранение	–

Результат исследования представлен на рисунках 1–2.

Рисунок 1 –
50 циклов амплификации:
1 – 16S rRNA1,
2– 16S rRNA 2,
3–Prn,
4 – fhaB,
5 – BfrZ,
6 – FhaS,
7 – bvgR,
8 – fimX,
9 – CyaA

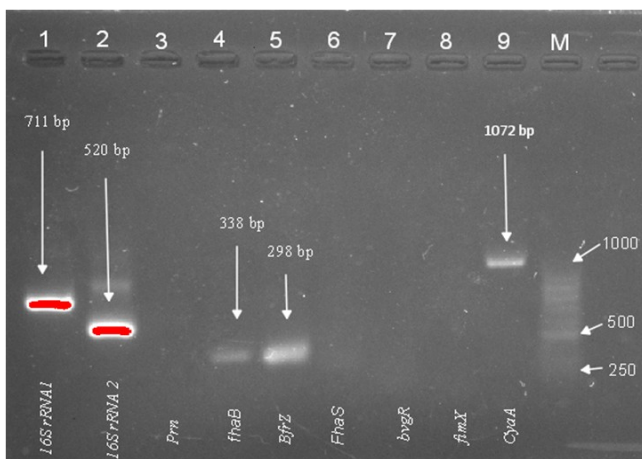
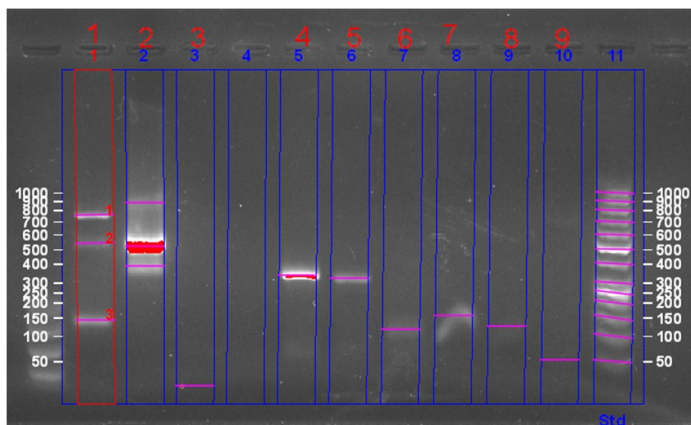


Рисунок 2 –
40 циклов амплификации:
1 – 16S rRNA1,
2– 16S rRNA 2,
3 – Prn,
4 – fhaB,
5 – BfrZ,
6 – FhaS,
7 – bvgR,
8 – fimX,
9 – CyaA

Светящаяся полоса на соответствующем уровне длины фрагмента подтверждает наличие у штамма *B. bronchiseptica*, соответствующего гена, мишени.

Уже в 1931 году Лесли и Гарднер отметили, что при выращивании штаммов *Bordetella* в пробирке на обычной питательной среде, то со временем выращенные штаммы спонтанно теряли свои вирулентные свойства и в большинстве случаев необратимо. Это явление называется вариационной фазой (*phase variation*) (Лесли и Гарднер, 1931). Авирулентные бактерии можно также получить, изменяя условия роста, и это явление было названо фенотипической модуляцией (*phenotypic modulation*) (Lacey, 1960). Фенотипические модуляции у бактерий можно получить под действием различных стимуляторов, таких как сульфат ионы, никотиновой кислоты или культивировании бактерий при температуре сопоставимой с температурой тела. Проведенный генетический анализ показывает, что так называемый *bvg* locus отвечает за регуляцию таких явлений. Вставки транспозонов в locus *bvg* приводит к формированию авирулентных вариантов *B. bronchiseptica*. Показано, что locus *bvg*, содержит делеции (Monack и др., 1989; Weiss и Falkow, 1984). Кроме того, фенотипические модуляции не происходят как у вирулентных, так и авирулентных штаммов содержащих мутации по *bvg* locusу (Gross and Rappuoli, 1989; Miller et al., 1992). Locus *bvg* кодирует синтез двух молекул белка, BvgA и BvgS, принадлежащих большому семейству двухкомпонентной системы передачи сигнала от раздражителя к бактерии (Aricò et al., 1989; Gross et al., 1989; Stibitz and Yang, 1991).

Двухкомпонентные системы белковой регуляции широко распространены в природе и находятся у большинства эубактерий, а также у архебактерий, нескольких представителей низших эукариот и растений (Loomis соавт., 1998; Perraud и др., 1999). Эти системы используются для определения вне- или внутриклеточных раздражителей (стимуляторов) и переводят их в сигнал через активацию клеточных гистидинкиназ. Гистидинкиназа автоматически фосфорилируется сохраняя остаток гистидина выполняющего роль передатчика, характерного для всех двухкомпонентных белковых систем. Высокоэнергетический фосфогистидин очень нестабильное соединение, передающее фосфат аспарагиновой кислоте приемника, области регуляторного белка. BvgAS двухкомпонентная система принадлежит к подсемейству двухкомпонентных систем, так называемых неортодоксальных систем, которые структурно более сложны и характеризуется четырьмя шагами His-Asp-His-Asp фосфорилированием, включая привлечение дополнительных белковых доменов (Parkinson and Kofoid, 1992; Uhl and Miller, 1994; Perraud et al., 1999) рисунок 3.

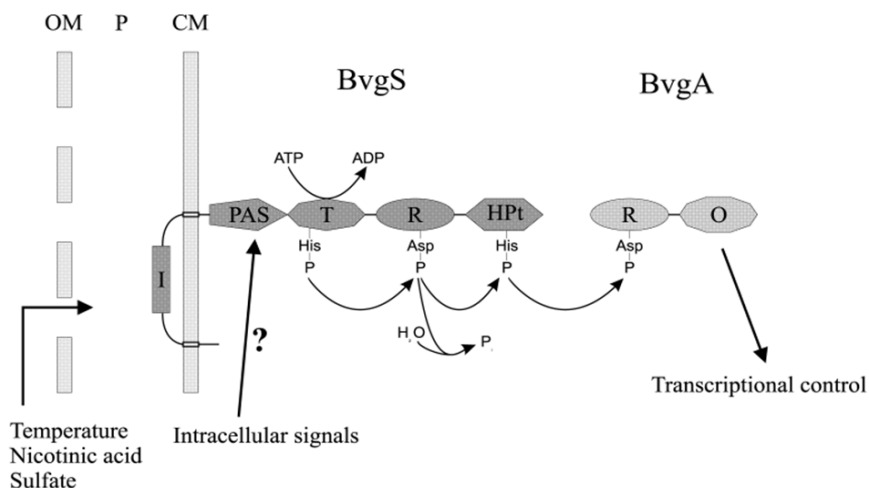
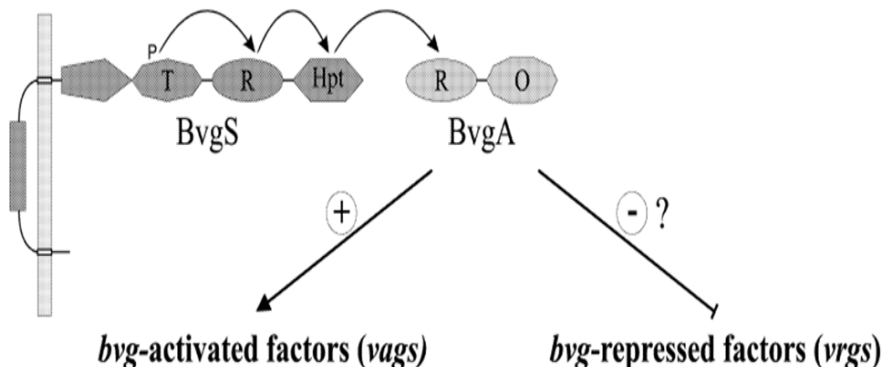


Рисунок 3 – Структурная организация BvgAS двухкомпонентной системы регуляции клетки (детали указаны в тексте). OM – внешняя мембрана бактериальной клетки; P – периплазма; CM – цитоплазматическая мембрана; I – область определения внешнего раздражителя, фактора; PAS – внутриклеточный сигнал; T – трансмиттер (передатчик); R – приемник (ресивер); HPt – гистидин-содержащий комплекс; O – выпускающий домен

При определенных условиях роста бактерий активность множества генов регулируется системой белков BvgAS. Эти гены названы *vag* генами (virulence-activated genes) и бактерии их экспрессирующие должны находиться в Bvg⁺ фазе. Большинство генов отвечающих за вирулентность, включая PTX, CYA, FHA, FIM, PRN, TcfA, BrkA регулируется *vag* генами (рисунок 4).



<i>bvg</i> -активирующие факторы (<i>vags</i>)	<i>bvg</i> - репрессирующие факторы (<i>vrgs</i>)
Гены и их функция	Гены и их функция
Адгезия и колонизация <i>FIM</i> – гены, отвечающие за формирование субъединицы фимбрии	Поверхностные и секреторные факторы <i>vrg6, vrg18, vrg24, vrg53, vrg73</i> – гены репрессоры вирулентности
<i>PRN</i> – ген, отвечающий за синтез пертактина	Метаболизм Уреаза, Алкалагин
<i>FHA</i> – ген, отвечающий за синтез гемагглютинина	Подвижность <i>frlAB</i> → <i>flaA</i>
Токсины	Транспорт электронов
<i>PTX</i> – пертуссис токсин	Цитохром С оксидаза
<i>SUA</i> – ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы	
<i>DNT</i> – ген, отвечающий за синтез дермoneкротического токсина	

Рисунок 4 – Двухкомпонентная система регуляции активности генов *Bordetella*

Функция большинства *vag* генов известна и раскрыты механизмы их взаимодействия. Однако существует несколько *vag* генов, отношение которых к вирулентности бактерии пока еще не изучено, включая выключение генов «домашнего хозяйства» кодирующих такие факторы, как цитохром и порин (Antoine et al., 2000; Ezzel et al., 1981; Finn and Amsbaugh, 1998; Finn et al., 1995). Интересен и тот факт, что экспрессия *bvgR* гена, усиливается при кодировании белка репрессора вовлеченного в регуляцию так называемых *vrg* генов (*virulence-repressed genes*), так же регулируется системой BvgAS (Beattie et al., 1993; Merkel et al., 1998).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной ПЦР установлено наличие у исследованного вакцинного штамма *B. bronchiseptica* КМИЭВ В-120 следующих генов:

* *16S rRNA1* – ген, отвечающий за формирование *16 S* субъединицу рибосомы;

* *16S rRNA 2* – ген, отвечающий за формирование *16 S* субъединицу рибосомы;

* *VfrZ* – ген отвечающий за формирование рецептора Сидерофора;

* *fhaB* – ген, отвечающий за синтез гемагглютинина;

* *SuaA* – ген, отвечающий за синтез белка аденилатциклазы.

У данного штамма не установлено наличие следующих генов:

* *bvgR* – ген, отвечающий за формирование субъединицы фимбрии;

* *Prn* – ген, отвечающий за синтез пертактина;

* *fimX* – ген, отвечающий за формирование субъединицы фимбрии;

* *FhaS* – ген, отвечающий за синтез гемагглютинина.

ЛИТЕРАТУРА

1 Hewlett, EL (1995). "Bordetella species." In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandel, GL, Bennett, JE, Dolin, R, eds.). Churchill Livingstone, Inc., New York, NY. pp. 2078–2084.

2 Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0–8385–8529–9.

3 Finger H, von Koenig CHW (1996). Bordetella. In: *Barron's Medical Microbiology* (Barron S et al., eds.) (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0–9631172–1–1.

4 Coote JG (2001). "Environmental sensing mechanisms in Bordetella". *Adv Microb Physiol* 44: 141–81. doi:10.1016/S0065–2911(01)44013–6. PMID 11407112.

5 Mattoo S, Foreman–Wykert AK, Cotter PA, Miller JF (2001). "Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis". *Front Biosci* 6: E168–86. doi:10.2741/Mattoo. PMID 11689354.

6 Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR (2005). "*Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human–Associated Lineage of *B. bronchiseptica*". *PLoS Pathog* 1 (4): e45. doi:10.1371/journal.ppat.0010045. PMC 1323478. PMID 16389302.

7 "Bordetella data sheet". Zoologix. Retrieved 2009–03–08.

8 Lawhorn, Bruce. "Atrophic Rhinitis" (PDF). Texas Agricultural Extension Service. Retrieved 2006–11–23.

9 Wagener, J. S., R. Sobonya, L. Minnich and L. M. Taussig (1984). Role of canine parainfluenza virus and Bordetella bronchiseptica in kennel cough. *Am J Vet Res* 45 (9): 1862–6.

10 Burns, E. H., Jr., J. M. Norman, M. D. Hatcher and D. A. Bemis (1993). Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. *J Clin Microbiol* 31 (7): 1838–44.

11 "Prevention and control of Bordetella bronchiseptica infection in cats". Intervet/Schering-Plough Animal Health. Retrieved 2009–03–08.