

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

Струк М.С., старший научный сотрудник

Кучвальский М.В., младший научный сотрудник

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ В СИСТЕМЕ КОНТРОЛЯ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ПСЕВДОМОНОЗУ В ЗВЕРОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ

Резюме

Псевдомоноз пушных зверей широко распространен в мире. Заболеваемость может составлять 60 %, летальность – более 70 %. Одним из наиболее быстрых и простых видов диагностики данного заболевания является метод ПЦР. Принимая во внимание широкое разнообразие псевдомон по антигеннной структуре, имеет место изучение данного разнообразия молекулярно-биологическими методами, такими как RAPD и ERIC ПЦР, так как внутривидовое различие между штаммами псевдомон следует учитывать в специфической профилактике псевдомоноза.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, полимеразная цепная реакция, генотипирование, ERIC и RAPD ПЦР.

Summary

*Pseudomonosis of fur-bearing animals is widespread in the world. Morbidity can be 60%, mortality over 70%. One of the fastest and simplest types of diagnosis of this disease is the PCR method. Given the wide diversity of *Pseudomonas* in antigenic structure, there is a study of this diversity by molecular biological methods, such as RAPD and ERIC PCR, since the intraspecific difference between *Pseudomonas* strains should be taken into account in the specific prevention of *Pseudomonas*.*

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, polymerase chain reaction, genotyping, ERIC and RAPD PCR.

Поступила в редакцию 25.11.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Псевдомоноз (геморрагическая пневмония, синегнойная инфекция) – высококонтагиозная болезнь в основном норок, начинающаяся как алиментарная инфекция и быстро переходящая в геморрагическое воспаление легких и сепсис. К псевдомонозу наиболее восприимчивы щенки норок. У песцов и лисиц псевдомоноз обычно проявляется как местная или вторичная инфекция, характеризующаяся гнойными или гноино-септическими процессами, абортами у самок и гибелю молодняка [3, 4].

Впервые псевдомоноз норок был описан в 1945 г. в США. Позднее болезнь регистрировали в других странах. Во второй половине XX в. во многих норководческих хозяйствах СНГ и зарубежных стран псевдомоноз вызывал массовый падеж, исчисляемый нередко десятками тысяч животных. В настоящее время, благодаря по-

всеместной вакцинации норок, заболевание встречается редко [2, 3, 4].

Возбудитель болезни – синегнойная палочка (*лат. Pseudomonas aeruginosa*) – грамотрицательная аэробная неспорообразующая бактерия. Относясь к группе условно-патогенных, психрофильных (холодолюбивых) бактерий, синегнойная палочка способна расти при температуре до плюс 5 °C. По этой причине микроорганизм широко распространен во внешней среде, часто обнаруживается в испражнениях животных и человека, на поверхности тела, в наружных половых органах, в фекалиях, а также в кормах, подстилке и воде даже в благополучных по псевдомонозу зверохозяйствах, причем псевдомоны, обнаруживаемые во внешней среде, относятся к тем же серотипам, которые вызывают заболевание [2].

При вскрытии поражения у норок локализуются в основном в органах дыхания. Легкие увеличены, отечны, темно-вишневого цвета. Легочная ткань уплотнена, имеет большое сходство по консистенции с печенью и при погружении в воду тонет. Иногда поражается одно легкое или только отдельные его участки. В трахее и бронхах находят большое количество пенистой кровянистой жидкости. Бронхиальные лимфатические узлы увеличены, кровенаполнены и отечны [2].

Диагностика. Клиническая картина болезни и патолого-анатомические изменения зачастую являются недостаточными для постановки диагноза, особенно когда к псевдомонам присоединяются эшерихии, пастереллы, сальмонеллы, протей и другие патогены.

У норок болезнь следует дифференцировать от пастереллеза, чумы плотоядных, а у лисиц и песцов — от сальмонеллеза и инфекционного гепатита [4].

Разработка методов комплексной диагностики псевдомоноза является актуальной задачей для ветеринарной практики. Так как наиболее быстрым, точным и чувствительным методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), нами была поставлена задача разработать тест-систему ПЦР для детекции ДНК генома *Pseudomonas*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения уникальных участков генома *Pseudomonas aeruginosa*, пригодных в качестве мишени для ПЦР-диагностики был проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* *Pseudomonas aeruginosa* и других видов псевдомон, бактерий и вирусов. Для этого использовали нуклеотидные базы данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ –

Национального института генетики и программу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Подбор праймеров проводили с помощью программы Vector NTI.

Температуры плавления праймеров рассчитывали по формуле:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Для работы использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «C 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), автоклав, микроцентрифуга высокоскоростная (14000 об/мин) Jouan (Франция), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 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 типа Эппendorф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 мл для прибора «C 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort», (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша).

б) реагенты: лабораторные образцы тест-систем для детекции генома *Pseudomonas aeruginosa*, разработанные в отделе молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», маркер молекулярного веса «GeneRuler 50 bp Ladder» (Fermentas, Литва), агароза (helicon, Россия), бромистый этидий (SIGMA, США), буфер для нанесения проб.

Выделение ДНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорт», согласно инструкции по его применению.

Амплификацию с праймерами (F1, R1)_{P. aer.} и (F2, R2)_{P. aer.} проводили согласно протоколу (таблица 1).

Таблица 1. – Программа амплификации

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке)		Кол-во повторов
температура	время	
95 °C	3 мин	1
95 °C	20 с	
57 °C	30 с	40
60 °C	30 с	
10 °C	хранение	—

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*, кодирующего фермент ДНК-гиразу, у различных

штаммов псевдомон и других бактерий подобраны две пары праймеров для *Pseudomonas aeruginosa* (таблица 2).

Таблица 2. – Описание гена-мишени *gyrB Pseudomonas aeruginosa*

Название	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Штамм	CP069177	
Продукт	ДНК-гираза, субъединица В (<i>gyrB</i>)	
Функция	участвует в репликации ДНК, поддержании отрицательной суперспирализации бактериальной ДНК	
Праймер прямой	F1_P.aer.	F2_P.aer.
Праймер обратный	R1_P.aer.	R2_P.aer.
Последовательность, 5'-3' прямого праймера	CCTGACCATCCGTCGCCACAA	GAACAGGTCTACCACCAACGG
Последовательность, 5'-3' обратного праймера	CGCAGCAGGATGCCGACGC	TTGAACAGCTCCTCCTTGCC
Температура плавления (Tm), °C прямого праймера	68	60
Температура плавления (Tm), °C обратного праймера	66	60
GC, % прямого праймера	62	60
GC, % обратного праймера	73	55
Ампликон, п.н.	222	224

Подобранные праймеры специфичны, так как не совпадали с нуклеотидными последовательностями гена *gyrB* других бактерий, таких как *Pseudomonas fluorescens* (CP081968.1), *Pseudomonas syringae* (CP068034.2), *Pseudomonas putida* (CP014343.1), *Escherichia coli* (CP014273.1), *Klebsiella pneumoniae* (CP030313.1), *Staphy-*

lococcus aureus (AP024730.1), *Salmonella typhimurium* (CP034968.1).

На рисунке 1 представлена электрофорограмма результатов испытания лабораторных образцов тест-систем № 1 и № 2 для обнаружения генома *Pseudomonas aeruginosa* методом ПЦР с праймерами (F1, R1)_P.aer. и (F2, R2)_P.aer.

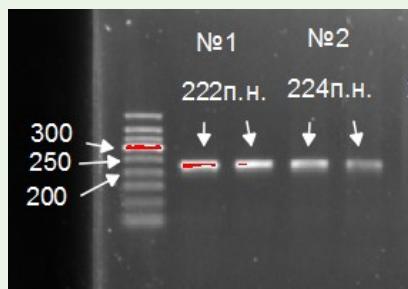


Рисунок 1. – Электрофорограмма амплификаторов, полученных при выделении ДНК из бульонной культуры *Pseudomonas aeruginosa* (тест-система № 1, амплифицируемый продукт 222 п.н., тест-система № 2, амплифицируемый продукт 224 п.н.)

Наибольшее количество ПЦР-продукта образовывалось с праймерами (F1, R1)_P.aer.

Учитывая сложную внутривидовую антигенную структуру псевдомон, у которых насчитывается более 20 серотипов, для специфической профилактики псевдомоноза пушных зверей используются несколько

серотипов *Pseudomonas aeruginosa*, так как вакцина не обеспечивает стерильный иммунитет к гетерологичным штаммам *Pseudomonas aeruginosa* [4]. В настоящее время в РБ для профилактики инфекционных болезней норок применяются импортные вакцины, в частности российская вакцина «Бионор», которая содержит 4 сероти-

па *Pseudomonas aeruginosa*: 381-11-06, 1677-08, «Дн»-05 и «Вазуза». До сих пор ситуация в стране по внутривидовому генетическому различию псевдомон не изучена. Чувствительность серологических методов диагностики, РА, РСК составляет не более 70 % [5], поэтому при изучении внутривидового различия целесообразно проводить генотипирование идентифицированных штаммов псевдомон с помощью методов ERIC и RAPD ПЦР, разделяя их по группам в соответствии с генетическими профилями [1, 6, 7]. Выявленные доминирующие серотипы *Pseudomonas aeruginosa* с помощью методов ERIC и RAPD ПЦР, циркулирующие на территории республики, целесообразно включать в состав вакцины. Принципиально новые данные, полученные в ходе выполнения такой работы, позволят разработать эффективные, экономически обоснованные схемы профилактики псевдомоноза на территории Республики Беларусь. Генотипирование штаммов методами ERIC и RAPD ПЦР даст возможность моле-

кулярного мониторинга генофонда *Pseudomonas aeruginosa* на территории Республики Беларусь и на отдельных фермах.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена gyrB штаммов псевдомон и других бактерий и подобраны две пары специфичных праймеров к гену gyrB *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Получены два лабораторных образца тест-систем для выявления генома *Pseudomonas aeruginosa* методом ПЦР с использованием праймеров (F1, R1)_{P.aer.} и (F2, R2)_{P.aer.} Праймеры (F1, R1)_{P.aer.} обеспечили более высокую чувствительность тест-системы ПЦР.

3. Разработанная тест-система позволит проводить быструю (в течение 4 часов) детекцию генома *Pseudomonas aeruginosa* в биологических материалах и может быть использована в качестве вспомогательного теста для внутривидового генотипирования псевдомон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажанов, Д. П. Филогенетическая идентификация флуоресцирующих псевдомонад из фонда белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов / Д. П. Бажанов, К. К. Яценович // Доклады НАН Беларуси (сентябрь-октябрь), институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск (представлено академиком Н.А. Картелем). – 2010. – Т. 54. – № 5. – С. 70–74.
2. Инфекционные болезни животных : учебник / Б. Ф. Бессарабов [и др.]; под ред. А. А. Сидорчука. – М. : Колос, 2007. – 671 с.
3. Инфекционные болезни животных: справочник / сост. : Ю. Ф. Борисович, Л. В. Кириллов ; под ред. Д. Ф. Осидзе. – М. : Агропромиздат, 1987. – 288 с.
4. Сидорчук, А. А. Инфекционные болезни животных : учебник / А. А. Сидорчук, Н. А. Максимов, В. Л. Крупальник. – М. : НИЦ ИНФРА-М, 2018. – 954 с.
5. Akkermans, J.P.W. Complement fixation test in the diagnosis of enzootic pneumonia in pigs / J.P.W. Akkermansu, W.K.W. Hill // Netherlands J. of Veterinary Science. – 1972. – Vol. 5, № 1. – P. 53–59.
6. ERIC-PCR genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from haemorrhagic pneumonia cases in mink. [Electronic resource] / Han M-ming [et al.] // Vet Rec Open. – Mode of access: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/vropen-2014-000043>. – Date of access: July. 2014.
7. RAPD and ERIC-PCR coupled with HRM for species identification of non-dysenteriae *Shigella* species; as a potential alternative method [Electronic resource] / Babak Pakbin [et. al.] // BMC Research Notes. – Mode of access: bmcresearchnotes.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13104-021-05759-6.pdf. – Date of access: September 2021.