

производства нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции телят, протекающей с участием клебсиелл. В качестве исследуемого материала использовали 13 проб фекалий от больных диареей телят в возрасте от 2 – 15 суток, принадлежащих учебно-опытному хозяйству УГСХА. При исследовании проб фекалий методом реакции нарастания титра фага с использованием фагов К - 10 и К - 81 клебсиеллы были обнаружены в 38% случаях (5 проб). Бактериологическим методом данные бактерии были обнаружены в 15 % случаях (в 2 пробах) с затратой времени от 96 часов и более. Таким образом, диагностическая чувствительность РНФ позволяет обнаруживать бактерии рода *Klebsiella* в концентрации 10^3 - 10^4 м.к./мл за 18-22 часа.

Для усовершенствования предложенного метода установлена возможность использования биопрепарата, состоящего из двух вышеуказанных бактериофагов.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований, предложен биопрепарат-диагностикум, состоящий из фагов К - 10 и К - 81 серии УГСХА, для идентификации и индикации с помощью РНФ бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале.

Литература:

1. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
2. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями // Ульяновск ГСХА. – 2005. – С. 43 – 48.

УДК 619:579

ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО УЧАСТКА ДНК *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* С ПОМОЩЬЮ ПЦР «REAL-TIME»

Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б., Васильев Д.А.
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия»

In article the characteristics of a specific plot of DNA Bordetella bronchiseptica by means of PCR «Real-Time» is given.

В статье дана характеристика специфического участка ДНК Bordetella bronchiseptica с помощью ПЦР «Real-Time».

Введение

Человек так устроен, что ему для нормальной жизнедеятельности нужно трудиться, но вместе с тем еще и активно отдыхать. Каждый выбирает отдых по своему вкусу и настроению, но, чаще всего, мы любим отдыхать со своими

любимцами – собаками и кошками. Играя с ними, кормя или купая, мы даже не задумываемся: А безопасно ли это для нашего здоровья? Ведь они являются носителями бактерий и вирусов, чуждых нашему организму. Существует масса литературы и статей, где авторы занимают прямо противоположные позиции. Но верно одно – необходимо самое тщательное изучение потенциальных биологических и вирулентных свойств этих микроорганизмов, которые сегодня считаются безопасными для нас, а завтра могут стать источниками эпидемий. Лучше быть готовым к отражению подобных ударов эволюции, чем тешить себя смутными надеждами.

Все чаще в западной литературе стали обращать внимание на заболевание, развивающееся у домашних животных – бордетеллёз.

Бордетеллез – инфекционное заболевание, вызванное мелкой (0,2-0,3x0,5-1,0 мкм) грамотрицательной коккобациллой и характеризующееся развитием острого или хронического воспалительного процесса слизистой оболочки респираторного тракта, сухим кашлем, который часто принимает пароксизмальный характер, снижением общей активности организма, а в совокупности осложнений другими бактериальными или вирусными инфекциями – развитием тяжелых симптомов, характерных для пневмонии (1).

Следует отметить, что указанная болезнь в нашей стране не изучена и диагностируется как патология неясной этиологии (3). Методы лабораторной диагностики бордетеллеза животных не разработаны, что создает большую сложность в своевременной и точной диагностике (4).

Приоритетными методами микробиологических исследований считают такие, которые дают заключение в более короткие сроки. Зачастую, от скорости такого анализа зависит вся тактика лечения. Сейчас все более широко входит в практику использование полимеразной цепной реакции для срочной идентификации возбудителя.

ПЦР, являясь точкой интеграции биофизики, физики, химии, биохимии, медицины и математики, вместе с тем является точным биологическим инструментом в решении задач микробиологии.

Вместе с тем, следует отметить, что данный метод исследования, позволяет судить лишь о присутствии короткого участка наследственной информации возбудителя (ДНК или РНК), который ограничивает исследователь выбранными праймерами (5). Поэтому на основании результатов ПЦР нельзя судить о жизнеспособности микроорганизма, его резистентности к химиотерапевтическим средствам, дезинфектантам и т.д. Все это находится в ведении классического микробиологического исследования.

В современной бактериологии основная роль в диагностике бордетеллёза принадлежит микробиологическим методам (7). Несмотря на неприхотливость роста на простых и селективных средах, остаются некоторые сложности культивирования *Bordetella bronchiseptica*. Одним из простых и довольно быстрых методов лабораторной диагностики бордетеллёза является высокочувствительная и специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР)(4).

Целью настоящей работы была разработка специфических праймеров к ДНК *Bordetella bronchiseptica*, создание и апробация ПЦР-протокола.

Материалы и методы

С целью выявления специфических для *Bordetella bronchiseptica* генов была использована публикация «Comparative analysis of genom sequences of Bor-

detella pertussis, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*» журнала «Nature genetics» 2003г (6). На основе анализа данных этой статьи были изучены гены, встречающиеся у *Bordetella bronchiseptica* и отсутствующие у *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis*.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *Bordetella bronchiseptica* были использованы базы данных GeneBank и Afsa. Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast.

Для подбора праймеров были использованы программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

Для проведения амплификации был использован детектирующий термодериватор «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология», г.Москва, позволяющий проводить амплификацию и флуоресцентную детекцию в режиме «реального времени».

После синтеза олигонуклеотидов были подобраны оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции (концентрация праймеров, температурные параметры и количество циклов амплификации). Для проведения амплификации использована коммерческая стандартизированная реакционная смесь для проведения ПЦР в режиме реального времени с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активность антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компани Синтол» (г.Москва). Для выделения ДНК применялись реактивы «Проба ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва). Для проведения детекции продуктов амплификации были использованы коммерческие наборы содержащие готовые 2,3 % агарозные гели с сухой навеской буферной смеси для проведения элетрофореза производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва).

Для апробации предложенной методики были использованы полевые штаммы *Bordetella bronchiseptica* НИИЦМБ Ульяновской УГСХА и культура *Bordetella bronchiseptica* -штамм № 8344, предоставленный Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб».

Результаты исследований

На первом этапе нашей работы была проанализирована публикация «Comparative analysis of genom sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*» журнала «Nature genetics» 2003г с целью изучения секвенированного генома *Bordetella bronchiseptica*. Были найдены два уникальных гена VfrA и VfrZ системы TonB-комплекса наружных мембранных протеинов-рецепторов железа

Bordetella bronchiseptica. Примечательно, что у *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis*, по данным авторов статьи, данные два гена не встречаются.

В базе данных GeneBank была найдена полная нуклеотидная последовательность гена VfrZ. Затем она была просканирована системой Blast этой базы данных на предмет совпадения с существующими данными секвенирования других микроорганизмов. 100 % совпадения более не встречалось, следовательно осталось выбрать только уникальные последовательности, фланкирующие участок гена VfrZ. После ряда проведенных анализов программами Gene Runner v.3.05 и Primer-Blast (в режиме on-line) эти последовательности были определены.

ны; они фланкировали участок гена *VfrZ* размером 298 пар нуклеотидных оснований (п.о.).

Праймеры (PR3-1 размером 20 п.о. и PR3-2 размером 20 п.о.) были синтезированы в «Компании «Синтол» (г.Москва).

Для самой полимеразной цепной реакции было решено использовать коммерческий набор с оптимизированной буферной системой, Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активностью антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (г.Москва), который содержал смесь: 125 мкМ dNTP, 1,25 у Taq-ДНК-полимеразу с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25 мМ MgCl₂, а также 10x ПЦР-буфер и минеральное масло. Объем реакционной смеси без матричной ДНК в конечном виде составлял 25 мкл. Объем пробы с матричной ДНК, вносимой в реакционную смесь, составил 5 мкл.

Культуры *Bordetella bronchiseptica* были подвергнуты этапу выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с сорбентной технологией очистки.

Затем нами был проведен ряд экспериментов для оптимизации протокола ПЦР.

Для процесса амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология» (г.Москва) с возможностью флуоресцентной детекции во время амплификации (**Real-Time**). Флуоресценцию дает интеркалирующий краситель SYBR Green I, который связывается в процессе амплификации в двухцепочечной ДНК (детекция по каналу Fam: max поглощения-494 нм, max испускания-521 нм)(2). Таким образом, чем больше ампликонов образуется в процессе реакции, тем сильнее сигнал флуоресценции, а это, в свою очередь, можно применить для количественной оценки исходной матричной ДНК *Bordetella bronchiseptica*. Единственный недостаток применения интеркалирующего красителя заключается в том, что флуоресцирует не только специфический ампликон, но и связавшийся с неспецифическими продуктами SYBR Green I. Поэтому для точной оценки полученных продуктов амплификации, мы применяли также метод горизонтально электрофоретической детекции в 2,3 % агарозном геле.

Одновременный экспериментальный ряд содержал несколько проб, в реакционных смесях которых температура отжига праймеров снижалась с 75 °С до 60 °С шагом в 5 °С. Сам протокол проведения амплификации состоял из трех этапов: денатурации ДНК при 95 °С, отжига праймеров на денатурированной ДНК, элонгации (синтеза новой цепи с помощью фермента Taq-ДНК-полимеразы, наибольшая активность которой проявляется при 72 °С). Нами был выбран классический тип протокола ПЦР без предварительных «посадочных» циклов. Однако, для активации Taq-ДНК-полимеразы требовалась инактивация антигел, ингибирующих ее действие. Таким образом, в конечном варианте он имел следующий температурно-временной режим:

95 °С – 5 минут	– 1 цикл	
95 °С – 10 сек	} 35 циклов	
?? – 20 сек		
72 °С – 20 сек		

3. 72 °С – 2 мин - 1 цикл

(примечание: ?? – температура отжига праймеров эксперимен-

тального ряда)

После ряда проведенных опытов нами было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров оказалась 60 °С. При такой температуре наблюдался максимальный продукт амплификации.

Аналогично опытам по оптимизации температурного режима были проведены эксперименты по оптимизации конечной концентрации праймеров в реакционной смеси. Нами было установлено, что избыток праймеров в реакции приводил к образованию неспецифических продуктов амплификации, имеющие размер продукта, не превышающего 100 п.о. Недостаток праймеров в экспериментальном ряде приводил либо к образованию продуктов амплификации слишком большой длины (>1000-2000 п.о.), либо видимой детекции не наблюдалось вовсе. Таким образом была выявлена оптимальная концентрации праймеров в реакционной смеси – по 15 pmol PR3-1 и PR3-2

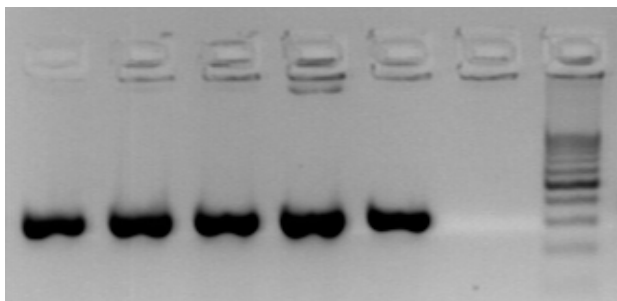


Рис.2 Электрофорез тех же продуктов амплификации в 2,3 % агарозном геле (с конечной концентрацией праймеров по 15 pmol на реакционную смесь): 1,2-ДНК *Bordetella bronchiseptica* штамм №8344; 3-ДНК *Bordetella bronchiseptica* полевой штамм № k1m; 4-ДНК *Bordetella bronchiseptica* полевой штамм № k1kr; 5-ДНК *Bordetella bronchiseptica* полевой штамм – «к-Покров»; 6- отрицательны контроль; 7-маркер молекулярного веса М-100.

Из-за отсутствия количественных стандартов ДНК *Bordetella bronchiseptica*, нами были определены их относительные концентрации в предложенных пробах. В качестве единицы было предложено принять пробу с Cp-max. Таким образом, мы получили величины концентраций ДНК относительно их минимального количества в эксперименте (табл.1).

Таблица 1. Определение относительной концентрации участка гена BfrZ ДНК *Bordetella bronchiseptica*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	C p , Fam	C p , Hex	Концентрация
B5	№8344	17,2		9,8
B6	№8344	16,9		11,8
B7	к1м	17,6		7,2
B8	к1кр	17,5		8,1
C1	к »Покров»	20,5		1,0
C2	К-			

Выводы

1. В результате проведенной нами работы были определены специфичные праймеры, фланкирующие часть гена **VfrZ системы поверхностного рецептора железа *Bordetella bronchiseptica***. Фланкируемый участок гена **VfrZ** имеет длину 298 п.о.

2. Был подобран оптимальный режим проведения полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в «реальном времени» в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I:

1. 95 °С – 5 минут – 1 цикл
2. 95 °С – 10 сек
- 60 °С – 20 сек 35 циклов
- 72 °С – 20 сек
3. 72 °С – 2 мин - 1 цикл

3. Детекция флуоресценции во время реакции позволила оценить относительное количество исходной матричной ДНК суточных культур некоторых штаммов *Bordetella bronchiseptica*: оно составило 1-11,8 условных единиц.

4. Метод применения интеркаляторов при проведении ПЦР-Real Time является не столь специфичным, как применение флуоресцентных зондов, но позволяет существенно снизить материальные затраты при проведении количественного исследования. Скомпенсировать этот недостаток мы смогли проведением вторичной детекции полученных амплификатов методом горизонтального электрофореза в агарозном геле: размеры продуктов амплификации соответствуют ограниченному праймерами участку гена **VfrZ** и составляют 298 п.о.

Литература:

1. Красноженов Е.П. и др. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний // Ростов н/Д: Феникс, 2006.
2. Ребриков Д.В., Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. ПЦР в реальном времени. М: Бинوم. Лаборатория знаний, 2009.
3. Daniel J. Keil, DVM, and Brad Fenwick, DVM, PhD. Role of *Bordetella*

bronchiseptica in infectious tracheobronchitis in dogs. Vet Med Today, JAVMA, Vol 212, No.2, January 15, 1998.

4. Guierard, P., Weber, C., Le Coustumier, F., Guiso, N.-1995-Human Bordetella bronchiseptica infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. Journal of Clinical Microbiology 33, 2002-2006.

5. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of DNA sequences. Biotechnology, 1992,10:413-417.

6. Julian Parkhill, Mohammed Sebahia, Andrew Preston at al. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. Nature genetics Advance online publication, 10 August 2003; doi:10.1038/ng1227.

7. Welsh, R. D.-1996- Bordetella bronchiseptica infection in cats. Journal of the American Animal Hospital Association 32, 152-158

СОВРЕМЕННАЯ ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ЭПИЗООТОЛОГИИ БЕШЕНСТВА В УЛЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ
MODERN ESTIMATION OF THE EPIDEMIOLOGY AND
RABIES EPIZOOTOLOGY IN THE ULYANOVSK AREA

Нафеев А.А., Васильев Д.А.

Nafeev A.A., Vasiljev D.A.

*Carrying out of the analysis of risk of distribution of rabies
in the basic populations of animals in the Ulyanovsk area
in comparison with data of the Russian Federation*

Бешенство - вирусная зоонозная инфекция, передающаяся через укусы и слюну плотоядных, сопровождающаяся дегенерацией нейронов головного и спинного мозга. Характерны симптомы глубокого расстройства нервной системы: возбужденность, агрессивность, **деменция**, приводящая к параличу и летальному исходу. Проблема бешенства остаётся актуальной в связи с летальным исходом практически каждого случая и необходимостью проведения беспрецедентно напряжённого (по срокам – последняя иммунизация проводится на 90 день) курса лечебно-профилактических прививок. От бешенства в РФ в отдельные годы умирает от 15 до 30 человек (2008 г. – 28 случаев). Около 40 тысяч человек в России ежегодно имеют травматические контакты с бешеными или подозрительными на эту инфекцию животными, что преследует вакцинацию около 100 тысяч человек и 7-10 млн. животных. Научно обоснованные противоэпизоотические и противоэпидемические мероприятия должны основываться на изучении особенностей краевой эпизоотологии этого зооантропоноза с учётом климатогеографических, метеорологических и экологических факторов, а также своевременном выявлении возбудителя бешенства и изучении его биологических свойств.

Основной целью нашей работы являлось проведение анализа риска распространения бешенства в основных популяциях животных (см. ниже) в Ульяновской области в сравнении с данными Российской Федерации, их подверженности инфекции, Одновременно нами была предпринята попытка решения вопросов, связанных с контролем над факторами риска: предложены мероприя-