

Розділ 1. Біобезпека та біозахист у ветеринарній медицині, емерджентні трансмісивні та транскордонні хвороби тварин

Таблиця 3 – Діагностична специфічність екскреторно-секреторного антигену *D. immitis* в РІД

Сироватки крові собак	Кількість проведених досліджень	Результати РІД		Специфічність %
		позитивні	негативні	
Сироватка крові собак хворих на серцевий дирофіляріоз	25	25	–	100
Сироватка крові собак хворих на підшкірний дирофіляріоз	5	–	5	100
Сироватки крові собак вільних від інвазій	10	–	10	100
Сироватка крові собак хворих на токсокароз	15	1	14	93

Як видно з таблиць 2 та 3, специфічність соматичного антигену *D. immitis* з сироватками крові дослідних собак становила 100 %, тоді як при використанні екскреторно-секреторного антигену специфічність склала тільки 93 %.

Активність отриманих антигенів дирофілярій визначали в РІД. Для цього антигени титрували з позитивною до *D. immitis* сироваткою крові собаки та інкубували за температури 24 °С. Реакцію враховували за 48-72 години.

Було встановлено, що обидва антигени були активними та давали лінію преципітації. Більш активним виявився соматичний антиген, його активність визначалася в розведенні 1:2. При цьому екскреторно-секреторний антиген був активним лише в нативному (нерозведеному) стані.

Перспектива подальших досліджень. У подальшому планується провести фракціонування екскреторно-секреторного та соматичного антигенів, вивчити антигенні властивості отриманих білкових фракцій з метою створення тест-системи ІФА для діагностики дирофіляріоза.

Висновки. 1. Досліджено екогеографію дирофіляріозу міст Харкова, Одеси, Дніпропетровська за період з січня по листопад 2011 р. Позитивний діагноз на дирофіляріоз був поставлений в 28 % від собак підозрюваних в захворюванні. Дирофіляріоз собак реєстрували в м. Харкові та Харківській області (Великобурлуцькому та Балаклєвському районах) в 59 випадках, в 14 випадках реєстрували в м. Одесі, та 7 випадках в м. Дніпропетровськ.

2. Вивчено видовий склад дирофілярій, які паразитують у собак на території Південно-східного регіону України. У зразках крові собак виявлено 89 % інвазування *D. immitis*, 9 % – *D. repens* та у 2 % – одночасне інвазування обома видами збудників.

3. Розроблені методи виготовлення соматичного та екскреторно-секреторного антигенів *D. immitis*. Специфічність соматичного антигену *D. immitis* з сироватками крові дослідних собак становила 100 %, екскреторно-секреторного антигену – 93 %. Обидва антигени були активними та давали чітку лінію преципітації в РІД. Більш активним виявився соматичний антиген, його активність визначалася в розведенні 1:2.

CIRCULATION OF DOG DIROFILARIOSIS IN SOUTH-EASTERN REGION OF UKRAINE AND EFFICIENCY OF IMMUNODIFFUSION TEST IN ITS DIAGNOSIS

Keleberda M.I., Oleshko A.Y., Kuznetsov E.P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Furda I.V.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv

*Data about spread of dog dirofilariosis in Kharkiv, Odessa and Dnipropetrovsk regions is presented in the paper. Dyrofylyariosis was diagnosed in 28 % of examined blood samples of suspected dogs, and in 89 % of cases there was observed invasion by *D. immitis*, in 9 % – by *D. repens* and in 2 % – simultaneous invasion by both types of aetiological agents. There have been received somatic and excretory -secretory antigens *D. immitis*. Specificity of somatic antigen *D. immitis* with blood serum of experimental dogs in immunodiffusion test was 100 %, while at the use of the excretory antigen specificity was only 93 %. Somatic antigen was more active, its activity was detected in dilution 1:2.*

УДК 619:616.98:579:843.96

ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКА САПУ *BURKHOLDERIA MALLEI*

Козій Р.В.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Скрипник А.В.

Блек енд Вітч Спешіал Проджектс Корп., м. Київ

Скрипник В.Г.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Сапу – небезпечне зооантропоозне захворювання. До сапу чутливі коні, м'ясоїдні, верблюди і людина. Хоча на території ЄСРП та розвинених країн Заходу сапу було ліквідовано у першій половині ХХ ст., інтерес до вивчення цього захворювання в останні роки суттєво зріс. Унаслідок розвитку міжнародної торгівлі, а також загрози біотероризму, існує небезпека занесення збудника сапу, *Burkholderia mallei*, на вільні території [1]. Розвиток генетичних та молекуло-біологічних методів дослідження дозволив краще зрозуміти патогенез хвороби, ультраструктуру будову збудника, розробити більш надійні методи лабораторної діагностики сапу, міжвидової диференціації та внутрішньовидового типування. Однак, багато факторів патогенності, антибіотикорезистентності, генетичної варіабельності залишаються не до кінця з'ясованими. Тому подальші генетичні дослідження збудника сапу залишаються

актуальною темою наукових пошуків. У даній роботі представлено огляд досліджень геному збудника сапу, присвячених цій темі.

Збудника сапу відносять до типу *Proteobacteria*, класу *Beta-Proteobacteria*, порядку *Burkholderiales*, родини *Burkholderiaceae*. Історично, збудник відносили до різних родів: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Loefflerella*, *Pfeifferella*, *Malleomyces*, *Actinobacillus* та *Pseudomonas*. У 1992 році на основі результатів секвенування гена 16S рРНК, показників гомології ДНК, складу клітинних ліпідів і жирних кислот та врахування фенотипових характеристик зі складу роду *Pseudomonas* було виокремлено новий рід *Burkholderia* [2]. До нового роду увійшли декілька патогенних видів мікроорганізмів, у тому числі збудник сапу *B. mallei*, збудник меліоїдозу *B. pseudomallei* та комплекс опортуністичних патогенів *B. ceracia* (особливо *B. cenoceracia* та *B. multivorans*), що може викликати хронічну інфекцію, а іноді й смертельну пневмонію та септицемію у людей, хворих на муковісцидоз (кістозний фіброз) та з послабленим імунітетом [3].

При вивченні генетичної структури збудника сапу Niernan W.C. та співавтори [4] провели повне секвенування геному високопатогенного штаму *B. mallei* ATCC23344. Науковці встановили, що геном цього збудника складається з двох циркулярних хромосом. Хромосома 1 містить 3510148 пар нуклеотидів (пн), хромосома 2 – 2325379 пн, а загальна величина геному складає 5,8 мільйонів пн (Мпн). Однак ці значення дещо відрізняються між різними штамами *B. mallei* [5]. Автори нарахували 5535 відкритих рамок читування (open reading frames, ORF), які потенційно можуть кодувати білки. На рисунку зображено діаграми хромосом *B. mallei*, вказані місця розташування генів відомих (чорний напис) та передбачуваних (сірий напис) факторів патогенності [7].

Хромосома 1 містить відносно велику частку генів, що кодують основні метаболічні функції бактерій, тоді як хромосома 2 містить більше генів, що відповідають за вірулентність *B. mallei* і кодують такі структури, як система секреції третього типу, система секреції шостого типу, адгезини [8].

За результатами мультилокусного секвенування (MLST – multilocus sequence typing) Godoy D. та співав. [9] дійшли висновку, що *B. mallei* є нащадком *B. pseudomallei*, який еволюціонував і пристосувався до умов облігатного паразитизму. У порівнянні з *B. pseudomallei* збудник сапу втратив більше 1000 генів [8]. Однак решта генів *B. mallei* має 99 % гомології з відповідними генами *B. pseudomallei*. Така висока гомологія призводить до того, що інфекцію *B. mallei* неможливо віддеференціювати від інфекції *B. pseudomallei* серологічними методами.

Геном *B. mallei* характеризується значною кількістю (близько 170) інсерційних елементів. Ці короткі мобільні ділянки ДНК у *B. mallei* відповідають за перебудову та редукцію геному. Як наслідок, у геномі *B. mallei* відмічають втрату частини генів, а також утворення псевдогенів у порівнянні з *B. pseudomallei* [10]. Так, *B. mallei*, на відміну від *B. pseudomallei*, не здатна до активного руху, а також володіє значно нижчою ферментативною активністю та не секретує протеази, ліпази та фосфоліпазу С. З іншого боку, у геномі збудника сапу виявили багато гомологічних генів, які відповідають за утворення джгутиків, хемотаксис, секрецію ензимів. Більшість із цих генів інтактні, проте у ряді важливих генів (*fliP*, *motB*, *gspJ*) були встановлені мутації-вставки викликані інсерційними елементами, що призвели до зміщення рамки читування гену і його інактивації [4].

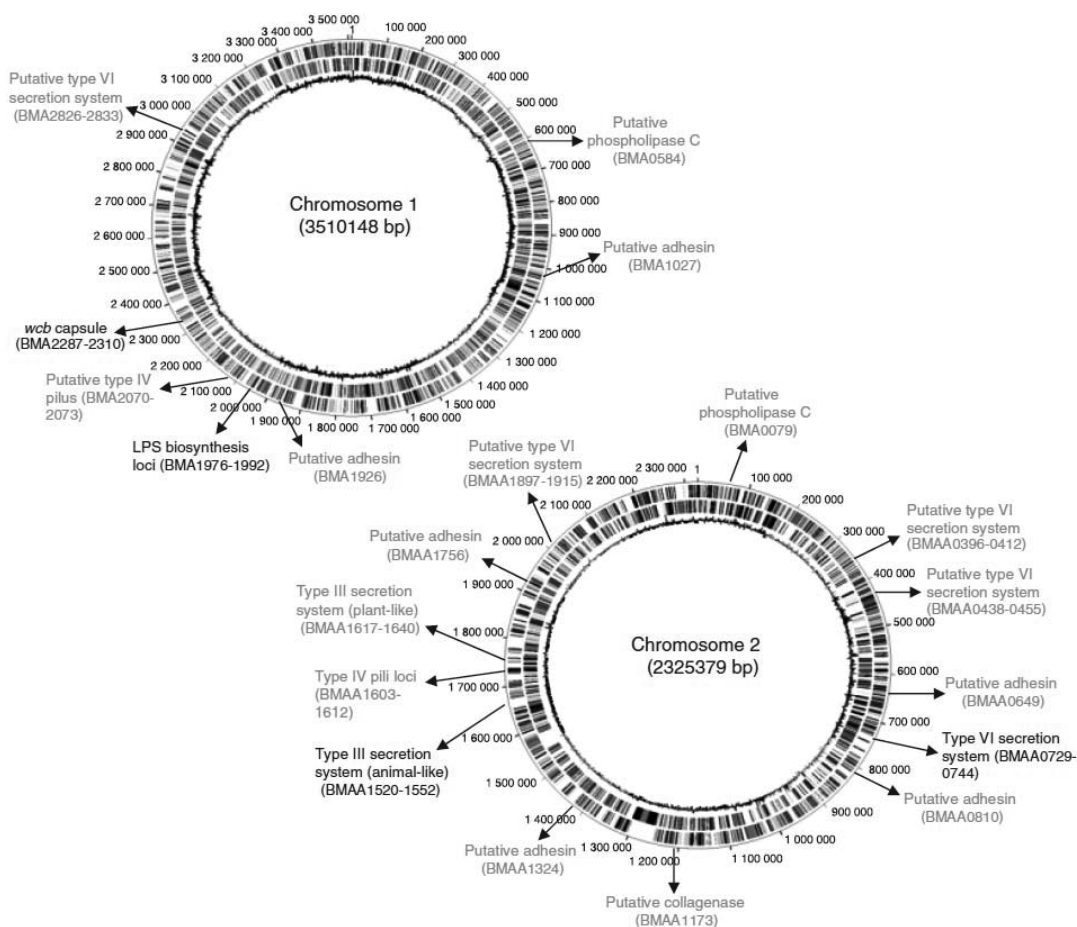


Рис. Діаграма хромосом *B. mallei* [6, 7]

Штами *B. mallei* надзвичайно гомологічні за вмістом генів [10]. Варіабельність геному цього збудника зумовлена мутаціями, викликаними інсерційними елементами та мікросателітами (короткими простими повторами послідовності нуклеотидів у ДНК). Romero C. M. та співав. [11] вивчали зміни геному *B. mallei* при культивуванні та пасажуванні через організм ссавців. Вони встановили, що рівень варіабельності геному *B. mallei* у порівнянні з іншими патогенними бактеріями є досить високим і пов'язаний з наявністю великої кількості мікросателітів, яких у кодуючих ділянках ДНК *B. mallei* налічується більше 12000. Тому при інфекційному процесі популяція *B. mallei* складається не з ідентичних клонів, а з генетично відмінних між собою бактерій. Автори дійшли висновку, що це є важливою характеристикою генетичної структури цієї бактерії, яка сприяє пристосуванню *B. mallei* до умов всередині організму господаря і дозволяє уникати дії факторів імунітету [11].

Отже, *B. mallei* є яскравим прикладом пристосування мікроорганізму до облигатного паразитарного способу життя, що відображається у його генетичній структурі. У генах, які втратили селективне значення, відбулись мутації за рахунок інсерційних елементів, або ці гени взагалі були видалені. Song та співавтори вважають, що геном *B. mallei* досі знаходиться на стадії редукції і ерозія геному буде відбуватись й надалі на рівні нуклеотидів [12]. Варіабельність геному збудника є стратегією збудника для виживання в умовах макроорганізму та пов'язана з труднощами при розробці вакцини.

Знання генетичної структури збудника будь-якої хвороби необхідне для вивчення його патогенності та вірулентності, розробки методів діагностики та профілактики хвороби. Визначення специфічних для *B. mallei* ділянок ДНК дозволило розробити праймери та зонди для використання у молекулярних методах дослідження, таких як полімеразна ланцюгова реакція, мультилокусне секвенування, ДНК-мікрочіпи. Визначення функції різних генів шляхом отримання штамів-мутантів *B. mallei* важливе для встановлення механізмів патогенезу, розробки вакцини та засобів лікування. Таким чином, подальше вивчення структури та функції геному *B. mallei* необхідне для ефективної боротьби з сапом.

Список літератури

1. Gilad, J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agent: national aspects of emergency preparedness / J. Gilad, I. Harary, T. Dushnitsky [et al.] // The Israel Medical Association Journal. – 2007. – Vol. 9. – P. 499-503.
2. Yabuuchi, E. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. / E. Yabuuchi, Y. Kosako, H. Oyaizu [et al.] // Microbiol Immunol. – 1992. – Vol. 36(12). – P. 1251-1275.
3. Loutet, S.A. A decade of *Burkholderia cenocepacia* virulence determinant research / S.A. Loutet, M.A. Valvano // Infection and Immunity. – 2010. – Vol.78(10). – P. 4088-4100.
4. Nierman, W.C. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome / W.C. Nierman, D. DeShazer, H.S. Kim [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. – 2004. – Vol. 101(39). – P. 14246-14251.
5. Фушан, А.А. Сравнительный анализ геномов бактерий видов *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* методом вычитающей гибридизации: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.03 / Фушан Алексей Анатольевич. – М., – 2005. – 171 с.
6. Pathema Bioinformatics resource center /http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/shared/CircularGenomeDisplay.cgi.
7. Whitlock, G.C. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei* / G.C. Whitlock, D.M. Estes, A.G. Torres // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – Vol. 277. – P. 115-122.
8. Galyov, E.E. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis / E.E. Galyov, P.J. Brett, D. DeShazer // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. – P. 495-517.
9. Godoy, D. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / D. Godoy, G. Randle, A.J. Simpson [et al.] // Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41(5). – P. 2068-2079.
10. Losada, L. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genom reduction and large-scale rearrangements / L. Losada, C.M. Ronning, D. DeShazer [et al.] // Genome Biol. evol. – 2010. – Vol 2. – P. 102-116.
11. Romero, C.M. Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts / C.M. Romero, D. DeShazer, T. Feldblyum [et al.] // BMC Genomics. – 2006. – Vol. 7. – P. 228-238.
12. Song H. The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host / H. Song, J. Hwang, H. Yi, R.L. Ulrich et al. // PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6. – №5. – P. 1-10.

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF GLANDERS *BURKHOLDERIA MALLEI*

Koziy R.V.

Institute of Veterinary Medicine NAAS, Kyiv

Skrypnyk A.V.

Black & Veatch Special Projects Corp., Kyiv

Skrypnyk V.G.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

*This article reviews the glanders agent *B. mallei* genomic studies. Genetic research has shown that *B. mallei* evolved from *B. pseudomallei* by means of genome reduction and restructuring and has adapted itself to the obligate parasitic life. Knowledge of genetic structure of the glanders agent is necessary for understanding of pathogenesis and developing effective diagnostic, prevention and treatment methods.*