

6. Mayr, A. Control of acute virus diseases of calves in the Federal Republic of Germany / A. Mayr // Veterinary Research Communications. – 1979. – Vol. 3, № 1. – P. 3–19.
7. Moustafa, A.H. Study on bacterial causes of diarrhoea in neo-nate calves in Dakahlia Province / A.H. Moustafa, M.E. Hatab, M.M.A. El-Latif // Assiut Veterinary Med. J. – 2007. – Vol. 53, № 114. – P. 155–166.

SELECTION AND STUDY OF ANTIGENIC STRAINS OF ACTIVITY FOR THE DEVELOPMENT OF THE MEANS OF SPECIFIC PROPHYLAXIS OF VIRAL AND BACTERIAL RESPIRATORY DISEASES OF CALVES

Krasochka P. A., Lamaka Y. V., Barysavets D. S., Zujkevich T. A., Novikava O. N., Amosava L. A.
RUE «Institute of experimental Veterinary Medicine named of S.N. Vyshelessky» Minsk, Belarus

The aim of research is to carry out the selection and study of antigenic activity of strains to develop a preparation for specific prophylaxis of viral and bacterial respiratory diseases of calves.

Materials and methods. The avirulent vaccine strains of viruses of infectious bovine rhinotracheitis, viral diarrhea, and parainfluenza-3, grown in MDBK cells culture were used for these researches. The bacterial strains of Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida, grown on Hottinger broth were selected as the bacterial components.

Study of antigenic activity of strains was carried out in calves. Titers of antiviral antibodies in blood serum were determined with use of the indirect hemagglutination test prior to the immunization with viruses and 14 days after it.

The results of research. Adaptation of the attenuated strains of IBR virus KMIEV-6, BVD virus KMIEV-7, and parainfluenza-3 virus KMIEV-8 through 10 passages of each strain on a culture of MDBK cells was carried out.

The results showed that the adaptation of IBR, BVD and the parainfluenza-3 viruses to MDBK cells line not affect to their antigenic activity. Selected strains were not reactogenic, causing the active production of antiviral antibodies in calves in sufficiently high titers – 4.0-4.5 log₂. M. haemolytica and Pasteurella multocida type A strains which their biological and antigenic properties characteristic of the genera of Mannheimia and Pasteurella were isolated and identified from the respiratory diseased calves.

Conclusions. As a result of studying the antigenic activity the strains of infectious bovine rhinotracheitis (KMIEV-V123), viral diarrhea (KMIEV – V120), parainfluenza-3 (KMIEV – V124), Mannheimia haemolytica (KMIEV – V158) and Pasteurella multocida type A (KMIEV – V166) were selected for the development of a preparation for specific prophylaxis of viral and bacterial respiratory diseases of calves.

Keywords: calves, respiratory diseases, prophylaxis, vaccine, strains, antigenic activity

УДК: 616.981.455:616-093/-098

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ГЕНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ FRANCISELLA TULARENSIS

**Нехороших З. Н., Джуртубаева Г. Н., Галаев А. В., Пилипенко Н. В.,
Процышина Н. М., Егорова Е. А., Выдайко Н. Б., Загоруйко М. А.**

ГУ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова МЗ
Украины», г. Одесса, Украина, e-mail: info_urapi@odessa.gov.ua

Представлены материалы по разработке двух вариантов отечественных генодиагностических ПЦР тест-систем (монодиагностической и мультиплексной) для индикации и идентификации возбудителя туляремии. Аprobация экспериментальных образцов авторских генодиагностических ПЦР тест-систем подтвердила их специфичность и чувствительность.

Ключевые слова. Туляремия, штаммы, индикация, идентификация, праймеры, ПЦР тест-системы

Туляремия – зоонозная природноочаговая особо опасная инфекция (ООИ), широко распространенная на территории многих стран, в том числе Украине. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), являющийся высоковирулентным патогеном категории «А» и потенциальным агентом биологического оружия, поражает более 250 видов животных [1, 2, 3]. Инфицирование людей происходит различными путями (алиментарный, трансмиссивный, аспирационный), при этом, туляремийная инфекция человеку от человека не передается [4, 5].

В Украине в настоящее время эпидемиологическая обстановка по туляремии остается сложной. Эндемичные территории зарегистрированы в 177 административных районах и расположены в основных ландшафтно-географических зонах страны (Полесье, Лесостепь, Степь).

В сложившейся в стране неудовлетворительной ситуации по профилактике туляремии, обусловленной резким ограничением противоэпизоотических мероприятий, а также, практически, отсутствием вакцинации и ревакцинации «групп эпидриска», можно предположить, что она и в последующие годы может ухудшаться [6].

В связи с непатогномоничностью клинической симптоматики различных форм туляремии, указанная патология часто скрывается под другими диагнозами (лимфаденит, пневмония, ангина и др.), из-за чего регистрируемая заболеваемость значительно ниже истинной и зависит от уровня и качества специфической диагностики.

Известно, что традиционные биологические, бактериологические и биохимические методы индикации и идентификации возбудителя туляремии сложны и длительны. Вместе с тем, контроль за эпидемической и эпизоотической ситуацией требует применения экспрессных высокочувствительных методов выявления возбудителя туляремии с целью оценки и прогнозирования эпидпотенциала природных очагов.

За рубежом разработаны молекулярно-генетические методы детекции и идентификации возбудителей различных ООИ, в том числе туляремии, отличающиеся высокой специфичностью и чувствительностью. Наиболее широко для этих целей используется полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на прямом определении специфических фрагментов генома возбудителя. Применение ПЦР, являющейся в настоящее время стандартом лабораторной диагностики, позволяет в короткий промежуток времени (5-7 часов) с помощью амплификационных технологий выявлять ДНК возбудителя туляремии в биологическом материале и объектах внешней среды [7].

В Украине генодиагностические ПЦР тест-системы для диагностики туляремии не разработаны. В то же время, наличие в стране многочисленных стойких, длительно функционирующих природных очагов туляремии (в 23 из 25 областей) диктует необходимость разработки ПЦР тест-систем для детекции *F. tularensis*.

Цель работы – создание отечественных генодиагностических ПЦР тест-систем для индикации и идентификации возбудителя туляремии с последующей их апробацией.

Материалы и методы. Для решения поставленной цели при конструировании двух вариантов генодиагностических ПЦР тест-систем (монодиагностической и мультиплексной) нами были выбраны специфические последовательности генома возбудителя туляремии (ДНК-мишени), характеризующие его принадлежность на уровне вида и подвида. Известно, что специфичность и чувствительность ПЦР тест-систем определяется подбором праймеров, комплементарных к соответствующим участкам ДНК-мишеней.

Для создания монодиагностической ПЦР тест-системы была использована одна пара праймеров к фрагменту гена *lpaA* (386 п.н.), кодирующего белок 17 кД наружной мембраны туляремийного микроба, видоспецифичного для *Francisella tularensis*.

При конструировании мультиплексной ПЦР тест-системы синтезировано две пары праймеров, комплементарных к специфическим ДНК-мишеням – фрагменту гена *lpaA* (белок 17 кД) и *VNTR*-локусу *FT-M19*, размер ампликонов которого отличается на 30 пар нуклеотидов у вирулентных для человека подвидов *F. tularensis tularensis* (250 п.н.) и *F. tularensis holarctica* (220 п.н.), что позволяет дифференцировать возбудителя на уровне субвида [8].

Выбранные ДНК-мишени и нуклеотидные последовательности праймеров, использованные при разработке генодиагностических ПЦР тест-систем, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность специфических праймеров к ДНК-мишеням *F. tularensis*

ДНК-мишени	Праймеры	
	Название	Нуклеотидная последовательность
гена <i>lpaA</i>	tul-4 - 435 tul-4 - 863	F- 5'-GCTGTATCATCATTTAATAACTGCTG-3' R- 5'- TTGGGAAGCTTGATCATGGCACT-3'
<i>VNTR</i> -локуса <i>FT-M19</i>	FT-M19	F- 5'- AGGCGGAGATCTAGGAACCTTT-3' R- 5'- AGCCCAAGCTGACTAAATCTTT-3'

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер

Праймеры синтезировали фосфоамидитным методом на автоматическом синтезаторе ДНК «ASM-800» («Biosset», Россия).

В работе исследованы 197 природных изолятов возбудителя туляремии, выделенных на территории различных регионов Украины. Для определения специфичности разрабатываемых ПЦР тест-систем использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 Гайского (положительный контроль), штаммы гомологичных (*F. tularensis holarctica*) и гетерологичных микроорганизмов (*J. pseudotuberculosis*, *St. aureus*, *J. pestis EV*, *E. coli*, *V. cholerae*). Все вышеперечисленные штаммы находятся на хранении в коллекции музея культур ГУ «УНИПЧИ МЗ УКРАИНЫ» [9].

Культуры *F. tularensis* и гетерологичных микроорганизмов выращивали на соответствующих питательных средах. Микробные взвеси готовили в 0,9 % растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П).

Выделение ДНК из инактивированных культур (термолизатов) осуществляли методом нуклеосорбции с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» производства ФБУНЦНИИЭГ Роспотребнадзора.

Постановку ПЦР проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Организация работы в лаборатории при исследовании биоматериала методом ПЦР» (Киев, 2007 г.) [10].

Амплификацию специфических ДНК-мишеней генома *F. tularensis* осуществляли с использованием амплификатора модели «Терцик» производства фирмы ДНК-Технология (Россия).

Продукты ПЦР двух разработанных тест-систем анализировали методом вертикального электрофореза в 6% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием азотистым серебром. Оценку результатов осуществляли при сравнении специфических полос исследуемых штаммов с положительным контролем и маркером длины *PUC 19DNA/Msp1*.

Результаты работы. Экспериментально при проведении многократных серий опытов нами на модели эталонного штамма *F. tularensis* 15 Гайского и природных изолятов туляремийного микроба были отработаны оптимальные соотношения концентрации праймеров к фрагменту гена *lpnA*, *VNTR*-локусу *FT-M19* и составы реакционных смесей.

В результате проведенных исследований были определены эффективные условия амплификации всех исследуемых фрагментов ДНК-мишеней в разрабатываемых ПЦР тест-системах. Условия режима термоциклирования (температура и продолжительность циклов ПЦР) были следующими:

начальная стадия денатурации – 95 °С, 5 минут,	} всего 42 цикла,
95 °С – 20 сек. (денатурация)	
61 °С – 30 сек. (отжиг праймеров)	
72 °С – 30 сек. (элонгация)	

завершение достройки комплементарной цепи ДНК 72 °С – 3 минуты.

На основе проведенных исследований были разработаны два варианта авторских генодиагностических ПЦР тест-систем (монодиагностическая и мультиплексная).

Монодиагностическая ПЦР тест-система обеспечивает индикацию *F. tularensis* до уровня вида, а мультиплексная – индикацию и идентификацию *F. tularensis* до уровня вида и субвида одновременно в одной пробе.

Специфичность разработанных ПЦР тест-систем оценивали на модели эталонного штамма *F. tularensis* 15 Гайского, природных изолятах туляремийного микроба и гетерологичных штаммах различных микроорганизмов.

Данные по определению специфичности монодиагностической тест-системы с ДНК эталонного штамма *F. tularensis* 15 Гайского, природных изолятов *F. tularensis* и гетерологичных штаммов разных микроорганизмов представлены на электрофореграмме ампликонов фрагмента гена *lpnA* (белок 17 кД) (рис. 1).

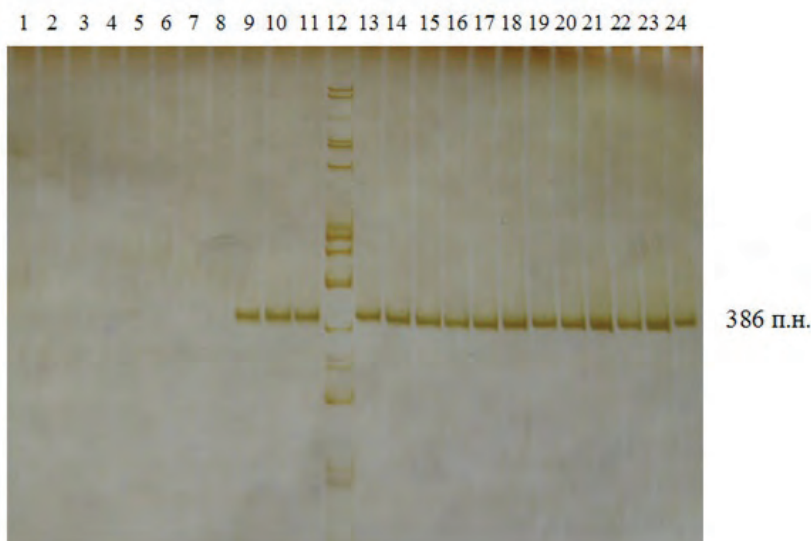


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов фрагмента гена *lpnA* (белок 17кД) ДНК природных изолятов *F. tularensis* и гетерологичных микроорганизмов в 6% полиакриламидном геле: лунки 1, 8 – отрицательный контрольный образец; лунка 2 – *St. aureus*; лунка 3 – *J. pseudotuberculosis*, лунка 4 – *J. pestis EV*, лунка 5 – *E. coli*, лунка 6 – *V. cholerae* № 481, лунка 7 – *V. cholerae* №415; лунка 9 – положительный контрольный образец (штамм *F. tularensis* 15 Гайского); лунки 10, 11, 13–24 – штаммы *F. Tularensis* № 148, 502, 165, 299, 385, 145, 523, 365, 257, 408, 445, 259, 404, 458, соответственно; лунка 12 – маркер молекулярной массы рUC 19 DNA/Msp I

Результаты представленной электрофореграммы свидетельствуют о том, что у всех природных изолятов *F. tularensis* в геле выявлены специфические полосы фрагментов ДНК размером 386 п.н. строго на уровне положительного контрольного образца (штамм *F. tularensis* 15 Гайского), что дало возможность отнести исследуемые изоляты к виду *F. tularensis*.

Данные по определению специфичности мультиплексной тест-системы с ДНК эталонного штамма *F. tularensis* 15 Гайского, природных изолятов *F. tularensis* и гетерологичных штаммов разных микроорганизмов представлены на электрофореграмме ампликонов фрагмента гена *lpnA* и *VNTR*-локуса *FT-M19* (рис. 2).

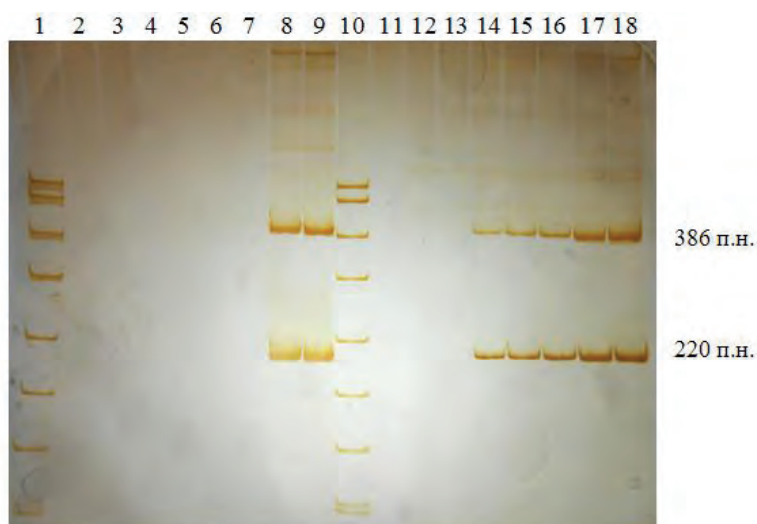


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов фрагмента гена *IpnA* (белок 17 кД) + VNTR-локуса FT-M19 ДНК природных изолятов *F. tularensis holarctica* и гетерологичных микроорганизмов в 6% полиакриламидном геле. Лунки 1 и 10 – маркер молекулярной массы *pUC 19 DNA/Msp I*; лунка 2 – *J. pseudotuberculosis*, лунки 3, 11 – *St. aureus*; лунки 4, 12 – *J. pestis EV*, лунка 5 – *E. coli*, лунка 6 – *V. cholerae* № 481, лунка 7 – *V. cholerae* № 415, лунки 8, 9 – положительный контрольный образец (штамм *F. tularensis* 15 Гайского); лунка 13 – отрицательный контроль (К), лунки 14–18 – штаммы *F. tularensis holarctica* № 170, 210, 21, 455, 365, соответственно

Из данных представленного рисунка видно, что на электрофореграмме выявлены две специфические полосы, совпадающие с положительным контрольным образцом и соответствующие молекулярному весу ампликонов фрагмента гена *IpnA* (386 п.н.) и VNTR-локуса FT-M19 (220 п.н.), что позволило отнести исследуемые штаммы к виду *F. tularensis* и подвиду *F. tularensis holarctica*. Продолжительность проведения ПЦР-анализа составляла 6–8 часов.

На основе проведенных исследований установлено, что оба варианта разработанных ПЦР тест-систем выявляли соответствующие фрагменты ДНК возбудителя туляремии, совпадающие с положительным контрольным образцом (штамм *F. tularensis* 15 Гайского), что свидетельствовало об их высокой специфичности. В то же время было выявлено отсутствие перекрестных реакций по двум ДНК-мишеням с исследованными гетерологичными штаммами микроорганизмов. Специфичность разработанных тест-систем подтверждена также при постановке ПЦР с коммерческими аналогами («Микроб», Саратов, «Изоген», Москва).

При определении чувствительности сконструированных тест-систем на модели эталонного штамма *F. tularensis* 15 Гайского, взятого в разведениях 10^2 – 10^9 м. к., установлено, что оба варианта ПЦР тест-систем обнаруживали ДНК возбудителя туляремии при концентрации в пробе не менее 10^3 м. к.

Полученные экспериментальные образцы монодиагностической и мультиплексной ПЦР тест-систем апробированы в лаборатории индикации возбудителей бактериальных ООИ ГУ «УНИПЧИ МОЗ УКРАИНЫ» и референс-лаборатории с функциями мониторинга и диагностики туляремии ГУ «Украинский центр по контролю и мониторингу заболеваний МЗ Украины».

Апробация экспериментальных образцов генодиагностических ПЦР тест-систем подтвердила их специфичность, возможность использования как при проведении индикации *F. tularensis* до уровня вида (монодиагностическая), так и выявления и идентификации до уровня вида и подвида одновременно в одной пробе (мультиплексная), что является основанием для их внедрения в работу практических органов здравоохранения с целью экспресс-диагностики туляремии.

На «Мультиплексную ПЦР тест-систему для детекции возбудителя туляремии» получен патент № 75546 [11]. На основе результатов проведенных исследований издано информационное письмо «Современные молекулярно-генетические методы диагностики туляремии», которое в настоящее время внедряется в учреждения практического здравоохранения Украины [12].

Таким образом, проведенные исследования дали возможность разработать два варианта отечественных генодиагностических ПЦР тест-систем (монодиагностическую и мультиплексную), которые позволят повысить уровень и достоверность специфической диагностики туляремии в Украине.

Выводы. Впервые в Украине разработаны генодиагностические ПЦР тест-системы, обеспечивающие экспресс-диагностику туляремии, своевременное назначение адекватного лечения, проведение рациональных профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Созданные ПЦР тест-системы дадут возможность проводить индикацию и идентификацию штаммов *F. tularensis* до уровня вида и подвида, дифференциацию природных изолятов от агентов биотерроризма, в том числе геномодифицированных вариантов при биотеррористических актах.

Разработанные ПЦР тест-системы могут быть использованы при проведении исследований сотрудниками научно-исследовательских институтов, а также специалистами практических органов здравоохранения и ветеринарной медицины.

Перспективи дальніших досліджень. Внедрення розроблених генодіагностических ПЦР тест-систем дозволить удосконалити систему профілактики туляремії, здійснювати пріоритетні дослідження конкретних ендемічних територій, прогнозувати епідситуацію, що буде сприяти підвищенню біобезпеки населення України.

Список літератури

1. Андрейчин М. А. Медичні проблеми боротьби з біотероризмом [Текст] / М. А. Андрейчин, В. С. Копча // Сучасні інфекції. – 2004. – №1. – С. 95 – 107.
2. Онищенко Г. Г. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней [Текст] / Г. Г. Онищенко, Б. П. Кузькин, В. В. Кутырев, С. А. Щербаква, Н. Д. Паккина, А. В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – вып. 99. – 2009. – С.5-10.
3. Мокриевич А. Н. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского Края [Текст] / А. Н. Мокриевич, В. С. Тимофеев, Т. Ю. Кудрявцева, Г. И. Уланова, С. Б. Карбышева, Р. И. Миронова Вахрамеева Г. М., Губарева Т. И., Павлов В. М., Дятлов И. А. // Проблемы особо опасных инфекций. – Вып. 1. – 2013. – С. 66-69.
4. Туляремия [Текст] / Под ред. Олсуфьева Н. Г. и Руднева Г. П. – М.: 1960. – 459 С.
5. Мещерякова И. С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика [Текст] / Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №2. – С. 17-22.
6. Головне управління Держсанепідслужби у м. Київ [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.ses.gov.ua/articles/1/27/p-zootologichnii-ta-ep-dem-olog-chnii-prognoz-z-tulare-m-v-kra-n-na-vesnu-2014-r>.
7. Кызыметова Г. М. Применение генетического метода исследований в диагностике особо опасных инфекционных заболеваний [Текст] / Кызыметова Г. М. – РКГА «ВКОЦСЭЭ» КГСЭМ МЗКК. – г. Усть-Каменогорск, 27.10.2014.
8. WHO guidelines on Tularemia. World Health Organization [Text] / 2007. – P.71-115.
9. Нехороших З.М. Генетична різноманітність штамів *F.tularensis*, що ізолювані в різних ландшафтно-географічних зонах України [Текст] / З. М. Нехороших, Г. М. Джуртубаєва, Н. В. Пилипенко, Н. М. Процишина, Н. Б. Пархоменко, Н. Б. Видайко, О. В. Ковбасюк, О. О. Єгорова / Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу. – Львів. – 2015. – вип.12. – С. 51-53.
10. Державні санітарні правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні молекулярно-генетичними методами матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти» [Текст]: методичні рекомендації / Національна медична Академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України. – Київ. – 2007. – 33 с.
11. Пат. №75546 UA, МПК 2006. C12Q 1/68 C12N 15/31 C12R 1/00 Мультиплексна ПЛР тест-система для детекції збудника туляремії [Текст] / Стопчанська А. Г., Джуртубаєва Г. М., Галаєв О. В., Пилипенко Н. В., Пархоменко Н. Б.; заявник ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І. І. Мечникова МОЗ України». – у 2012 04662; заявл. 13.04.2012; опубл. 10.12.2012., Бюл. №23., 2012 р.
12. Сучасні молекулярно-генетичні методи діагностики туляремії: інформаційний лист №336-2013 [Текст] / ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечникова МОЗ України». Автори: Джуртубаєва Г. М., Стопчанська А. Г. Галаєв А. В., Нехороших З. М., Пилипенко Н. В., Пархоменко Н. Б., Процишина Н. М. – К., 2015. – 4 с.

DEVELOPMENT AND TESTING OF GENE-DIAGNOSTIC PCR TEST SYSTEM FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF *FRANCISELLA TULARENSIS*

Nekhoroshykh Z. N., Dzhurtubaeva G. N., Galaev A. V., Pilipenko N. V., Protcyshina N. M., Egorova E. A., Vydayko N. B., Zagoruyko M. A.

SB «Ukrainian Mechnikov Research Anti-Plague Institute of the Ministry of Health of Ukraine», Odessa, Ukraine

The goal of the work is the creation of national gene-diagnostic PCR test systems for indication and identification of the causative agent of tularemia, followed by their approbation.

*Materials and methods. There were studied 197 natural isolates of *F.tularensis*, the *F. tularensis* Gaysky 15 vaccine strain, heterologous strains of microorganisms: *J. pseudotuberculosis*, *St. aureus*, *J. pestis* EV, *E. coli*, *V. cholerae*. The work was conducted with the use of bacteriological and molecular biological research methods.*

*Results. For the first time in Ukraine two versions of the national gene-diagnostic PCR test system for the detection of *F. tularensis* were developed.*

*Mono-diagnostic test system was designed to use a pair of primers to the *lpaA* gene fragment to indicate the tularemia pathogen to the species level. Multiplex PCR test system - use two pairs of primers to the *lpaA* gene fragment and the VNTR locus-FT-M19 for indication and identification of *F. tularensis* to the level of species and subspecies simultaneously in the same sample. The specificity of the developed PCR test systems were evaluated on the model of the reference strain of *F. tularensis* Gaysky 15, tularemia microbe natural isolates, heterologous strains of various microorganisms, as well as commercial gene-diagnostic test systems («Microbe», Saratov).*

Approbation of the experimental samples of the developed PCR test systems confirmed their specificity and sensitivity, as well as the possibility of their use in practical public health authorities for the purpose of rapid diagnosis of tularemia.

Conclusions. Implantation of the developed gene-diagnostic PCR test systems will provide an opportunity to improve the quality and accuracy of the diagnosis of tularemia, which will ensure the timely appointment of pathogenetic therapy of patients and contribute to the improvement of the system of prevention of tularemia in Ukraine.

Keywords: tularemia, strains, indication, identification, primers, PCR test systems