

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы** (пәнаралық) = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2019. - №3 (102). - С.232-240

MORAXELLA BOVOCULI ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТЕ КРС В СЕВЕРНОМ КАЗАХСТАНЕ

М.А.¹ Қуйбазаров, Т.Б.²Қарибаев
Д.К.¹Камалова, А.Ж.Рыскельдина¹, А.Б.¹Шевцов
¹РГП «Национальный центр биотехнологии»

²РГП на ПХВ «Национальный референтный центр по ветеринарии»

В настоящее время инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) крупного рогатого скота стал большой проблемой для животноводов Казахстана. На ряду с другими сопутствующими факторами при этой инфекции, в качестве основного этиологического агента рассматриваются бактерии рода Моракселла. В данной статье представлены результаты по выделению бактерий *Moraxella* spp. из проб биологического материала от крупного рогатого скота с клиническими признаками инфекционного кератоконъюнктивита. Проведен дизайн групповых праймеров гена цитотоксина для выявления *Moraxella* spp. Проведена амплификация фрагмента гена цитотоксина *Moraxella* spp. Впервые в Казахстане был изолирован штамм, который по результатам бактериологических, молекулярно-биологических (секвенирование, филогенетический анализ) исследований, идентифицирован как *Moraxella bovoculi*. Определена чувствительность изолированного штамма к основным антимикробным препаратам.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, *Moraxella bovoculi*, инфекционный кератоконъюнктивит, изолят, ПЦР, праймеры, секвенирование, филогенетический анализ, резистентность

Введение

Инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) или «pink eye» - острое контагиозное заболевание, характеризующееся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, серозно-гнойным истечением, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной

потерей зрения пораженного глаза животного. ИКК является наиболее распространенным заболеванием глаз крупного рогатого скота (КРС), при этом наибольшая заболеваемость регистрируется у пород с отсутствием пигментации в области глаз (в основном линии герефорда) [1,2]. На территории Казахстана эта инфекция, помимо герефорда, чаще всего

регистрируется у аулиеатинской, казахской белоголовой породы [3].

Причиной ИКК КРС является сочетание физического фактора и биологического возбудителя. Основным причинным бактериальным агентом ИКК, как наиболее часто изолируемым от больных животных, считается *Moraxella bovis* [4]. Из других микроорганизмов, способных влиять на патогенез, следует отметить бактерии *M. bovoculi*, *Mycoplasma spp.*, некоторые вирусы, которые могут либо усугублять тяжесть

Материалы и методика исследований

В работе были использованы образцы ДНК, выделенные из проб глазных истечений от крупного рогатого скота хозяйств Акмолинской области с клиническими признаками характерными для ИКК. Взятие проб истечений из пораженных глаз животных (серозно-слизистый или серозно-гнойный экссудат) производили путем введения сухих стерильных ватных тампонов в конъюнктивальный мешок, помещали их в стерильные пробирки и доставляли для исследования в термосе со льдом. Тампоны промывали 2 мл физиологического раствора. ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Россия). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop1000.

Для выделения *Moraxella spp.* использовали питательную среду Колумбийский агар с 5% дефибринированной кровью барана. Чашки Петри со средой

заболевания, либо служить в качестве предрасполагающих факторов для инфекции [5,6,7,8,9,10,11]. Не смотря на разнообразие этиологических агентов приводящих к развитию ИИК, в качестве основного метода лечения рассматривается антибиотикотерапия.

Целью данной работы было изучение видового состава *Moraxella spp.*, являющихся одними из основных патогенов при ИКК у КРС и изучение их лекарственной чувствительности.

инкубировали 48 часов при 37°С для проверки на стерильность. На поверхность питательной среды вносили 0,1 мл биоматериала растирали шпателем, инкубировали при +37°С в течение 24ч. Выпуклые колонии с ровными краями, серовато-белого, белого цвета, S и R формы пересеивали и бактериальную массу использовали для выделения ДНК.

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК, проводили методом разделения фрагментов ДНК в 1,5% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента - бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере горизонтального электрофореза PowerPac, используя источник тока BioRad Electrophoretic bath. В качестве электродного буфера использовали 1x TAE-буфер. Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей GelDoc (Bio-Rad), с программным обеспечением QuantityOne (Bio-Rad). Размеры

молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали "DNALadder 1kb", (Fermentas).

Подбор и проверку специфических праймеров проводили с использованием программ PrimerSelect (DNASTAR), BioEdit и веб ресурса PrimerBlast (NCBI). При подборе праймеров учитывали основные параметры: близкая температура отжига прямого и обратного праймера, длина праймеров от 18-25 п.н, низкая вероятность образования вторичных структур.

Для определения нуклеотидной последовательности, очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas). Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xIDNA Analyzer (Applied

Biosystems). Нуклеотидные последовательности анализировали и объединяли в общую последовательность в программном обеспечении SeqMan (DNASTAR). Полученные последовательности идентифицировали в GeneBank по алгоритму BLAST. Дополнительно строили филогенетические деревья с последовательностями депонированными в международной базе данных Gene Bank. Для построения филогенетических деревьев использовали программное обеспечение - Mega 5. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли алгоритм ClustalW, построение древ проводили методом присоединения ближайших соседей (Neighbor-JoiningNJ).

Для изучения чувствительности изолятов к антимикробным препаратам использовали диско-диффузионный метод. Для этого на поверхность агара в чашке Петри наносили суточную культуру моракселл эквивалентную стандарту мутности 0,5 по McFarland. Далее на поверхность питательной среды накладывали стерильным пинцетом диски с антимикробными веществами. Чашки помещали в термостат и инкубировали при +37°C в течение 48ч. Учет результатов проводили путем измерения зон полного подавления роста вокруг дисков.

Основные результаты исследований

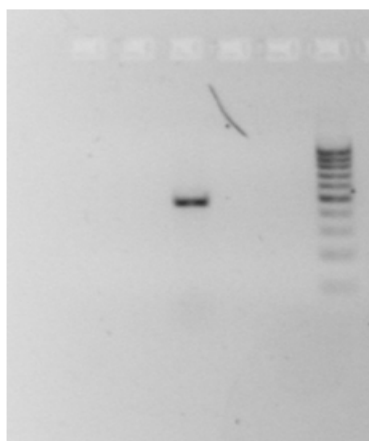
Согласно литературным источникам, основной фактор патогенности моракселл ассоциируется с ворсинками,

которые необходимы для закрепления и цитоксином который повреждает клетки как в условиях *in vitro* так и *in vivo* [12,13,14,15]. Ген

цитотоксичности содержится в трех видах моракселл ассоциированных с развитием кератоконъюнктивита: *M.bovis*, *M.bovoculi*, *M. ovis*, гены называются соответственно *mbxA*, *mbvA* и *movA*. Нуклеотидная идентичности между *mbvA* и *movA* варьирует от 95 до 98%, а между *mbxA* от 77 до 82%. Данный уровень гомологичности позволяет использовать нуклеотидную последовательность цитотоксина для подбора групповых праймеров на выявление трех видов. Для подбора праймеров из международной базы данных были скачаны 52 последовательности генов цитотоксинов моракселл депонированных на период обращения (апрель 2018 года). В результате был проведен дизайн пары праймеров (*Mor_cyto_ F3200_* и *Mor_cyto_ R3675*), которые при проверке на специфичность отжига в

веб ресурсе PrimerBlast <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, были строго специфичны целевому гену трех видов моракселл.

В работе были использованы 5 проб смывов (истечений) с глаз КРС породы «казахская белоголовая», с явно выраженными клиническими признаками ИИК: гиперемия сосудов конъюнктивы, серозно-гнойные истечения, помутнение и изъязвление роговицы, деформация глазного яблока в виде кератоглобуса или кератоконуса. Бактериологическим методом были выделены четыре культуры М3, М5, М6, М7 по морфологическим признакам идентифицированных как *Moraxellas* pp. ПЦР с выделенными ДНК из культур проводили с использованием праймеров *Mor_cyto_ F3200_* и *Mor_cyto_ R 3675* (рисунок 1).



М3 М5 М6 М7 К- М

Рисунок 1 – Результаты ПЦР ДНК изолятов *Moraxellaspp.*

Как следует из рисунка 1, праймеры специфически отжигались на ДНК только одного изолята – М6 (475bp). Полученный ПЦР продукт секвенировали с теми же праймерами. Нуклеотидные последовательности были

анализированы и объединены в программном обеспечении SeqMap (DNASStar) и идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST(таблица 1).

Таблица 1. Результаты идентификации методом анализа нуклеотидной последовательности

Наименование штамма	Последовательность фрагмента гена	Идентификация нуклеотидных последовательностей в международной базе данных (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) алгоритм BLAST		
		Инвентарный номер GeneBank (Accession number)	Наименование штамма	% совпадения
М6	ATTTAACCATGCCAATGCTCTTGATG AATTTGCACAACAATTCCAAAAATTC GGCTATGATGGAGACCATCTACTGGC TGAATATCAGCGTGGTGTAGGCACTA TTGAAGCTTCGTTAACTACAATTAAT ACGGCATTAGGTGCAGTTTCTGCGGG TGTTTCTGCCGCTGCTGTAGGATCTGC TGTTGGTGCACCTATTGCCCTATTGGT CGCTGGAGTAACGGGATTAATCTCTG GTATTCTAGAGGCATCTAAGCAAGCA ATGTTTGAAAGTGTTCGGAATCGTTT GCAAGGTAGAATTCTAGAGTGGGAA AAGCAAAATGGTGGTCAGAACTATTT TGACAAAGGTTATGACTCTCGTTATG CTGCTTATTGGCTAATAACTTACAAT TTTTGTCTGAGCTAAATAAAGAGTTG GAAGCTGAACAAGGGTCATAA	DQ155439.1	Moraxella bovoculi strain 371 RTX A toxin (mbvA) gene, partial cds	99,77
		CP011158.1	Moraxella ovis strain 199/55, complete genome	98,83
		CP030241.1	Moraxella bovis strain Epp63	89.51

На основании BLAST анализируемый изолят был идентифицирован как *M. bovoculi*, что также отчетливо видно на филогенетическом дереве, построенном с нуклеотидными

последовательностями гена цитотоксичности депонированными в NCBI. Филогенетический анализ показал кластеризацию полученного изолята на одной клade с *M. bovoculi* (рисунок 2).

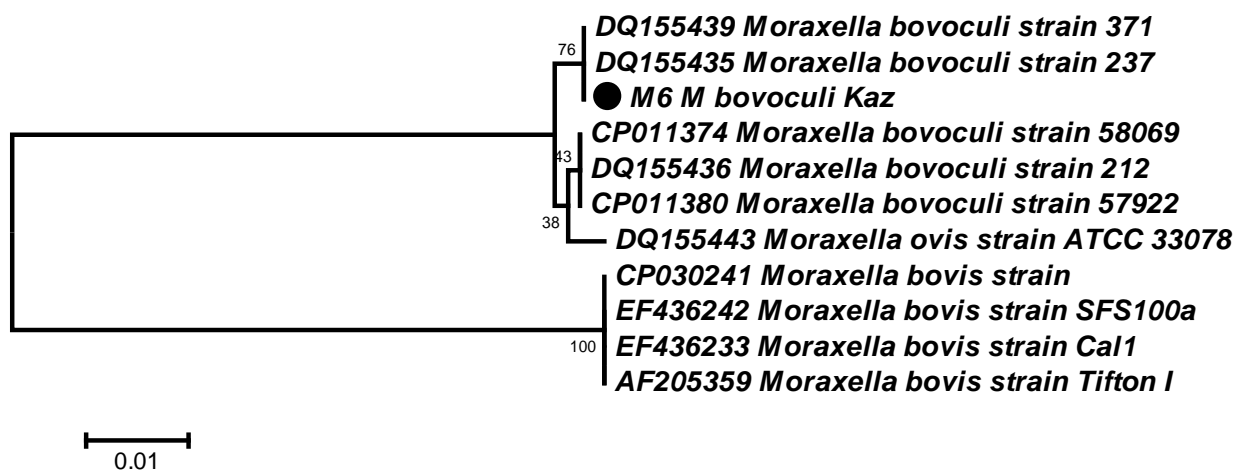


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа нуклеотидной последовательности *cytotoxin A* гена *Moraxella* spp

Имеется достаточно большое количество сообщений о чувствительности *Moraxella* spp к различным антимикробным препаратам [16,17,18,19,20,21]. Однако, аналогическая информация по *M.bovoculi*, ограничена всего лишь несколькими публикациями

[22,23]. Для изучения чувствительности полученного изолята к антимикробным препаратам применяли диско-диффузионный метод. Всего в работе использовали 29 наименований препаратов (таблица 2).

Таблица 2. Результаты определения чувствительности изолята *M. bovoculi* (М6) к антимикробным препаратам

№ п/п	Наименование	Сокращенное наименование	Зона задержки роста, мм
1.	Пенициллин	P	4
2.	Амоксициллин	AMX	5
3.	Цефокситин	CX	13
4.	Кларитромицин	CLR	11
5.	Клиндамицин	CD	9
6.	Триметопримсульфаметоксазол	COT	7
7.	Доксициклин	DO	7
8.	Ванкомицин	VA	4
9.	Тетрациклин	TE	7
10.	Линезолид	LZ	8
11.	Офлоксацин	OF	11
12.	Моксифлоксацин	MO	11
13.	Хлорамфеникол	C	11
14.	Гентамицин	GEN	10
15.	Ципрофлоксацин	CIP	12
16.	Нитрофурантоин	NIT	8
17.	Триметоприм	TR	4
18.	Пиперацилин	PI	8
19.	Амоксициллин/клавуанат	AMC	10
20.	Ампициллин/сульбактам	AS	13
21.	Пиперацилин/тазобактам	PIT	14
22.	Цефтазидим	CAZ	10
23.	Цефепим	CPM	6
24.	Цефтриаксон	CTR	13
25.	Эртапенем	ERT	12
26.	Амикацин	AK	9
27.	Ципрофлоксацин	CIP	13
28.	Тикарциллин	TI	7

29.	Азтреонам	АТ	10
-----	-----------	----	----

Как следует из таблицы 2, наибольшую чувствительность изолят *M. bovoculi* проявил к препаратам цефокситин, ципрофлоксацин, ампициллин/сульбактам, пиперацилин/тазобактам, цефтриаксон, ципрофлоксацин (диаметр зон подавления роста 12-14 мм). Выраженная резистентность зафиксирована к препаратам пенициллина, амоксициллина, ванкомицина, триметоприма (4-5 мм).

Обсуждение полученных данных и заключение

В настоящий момент имеется мало информации о видовом составе бактерий, изолированных от животных с клиническими признаками ИКК на территории Казахстана. В имеющихся редких публикациях приводятся данные о выделении только штаммов *M. bovis* с идентификацией бактериологическими и серологическими методами [3, 24]. Долгое время считалось, что возбудителем ИКК бактериальной этиологии являются только *M. bovis*. Однако, в связи с тем, что вакцины на основе только *M. bovis* не всегда были достаточно эффективны, продолжались исследования и поиск других бактерий, возможных участников инфекционного процесса. Новый вид *M. bovoculi* был изолирован и признан относительно недавно. Летом 2002 г., в Северной

Калифорнии, *Angelos J.A.* выделил гемолитические грамотрицательные коккиот телят с признаками конъюнктивита. После проведения обширных бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических анализов было предложено отнести их к новому виду *M. bovoculi*, номенклатура которого была опубликована 5 апреля 2005 г [25].

В результате проведенных нами исследований, от животных с клиническими признаками ИКК, изолирован штамм, который был определен как *M. bovoculi*. Определена чувствительность штамма к основным антимикробным препаратам. Полученные данные могут быть использованы в разработке способов генетической диагностики, профилактики и лечения ИКК.

Источник финансирования

Исследования проводились в рамках научно-технической программы О.0810 «Создание новых препаратов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018-2020 годы.

Список литературы

1. Webber JJ, Selby LA. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. J Am Vet Med Assoc 1981;179:823–6.
2. Ward JK, Neilson MK. Pinkeye (bovine infectious keratoconjunctivitis) in beef cattle. J AnimSci 1979;49:361–6.

3. Ivanov N.P., Sultanov A.A., Bakiyeva F.A., Sattarova R.S., Egorova N.N. Moraxellosis of cattle in Kazakhstan. // 2016. - № 5, PSU named after S. Toraigyrov. News of NAS Republic of Kazakhstan. A series of agricultural sciences.
4. Alexander, D., 2010. Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review of cases in clinical practice. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26,487–503.
5. O'Connor, A.M., Shen, H.G., Wang, C., Opriessnig, T., 2012. Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Veterinary Microbiology* 155, 374–380.
6. Pugh, G.W., Jr., McDonald, T.J., 1986. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *American Journal of Veterinary Research* 47, 2343–2345.
7. Rosenbusch, R.F., 1983. Influence of mycoplasma preinfection on the expression of *Moraxella bovis* pathogenicity. *American Journal of Veterinary Research* 44, 1621–1624.
8. Angelos, J.A., 2010. *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: Cause or coincidence? *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26, 73–77.
9. Angelos, J.A., Spinks, P.Q., Ball, L.M., George, L.W., 2007. *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 57, 789–795.
10. Barber, D.M., Jones, G.E., Wood, A., 1986. Microbial flora of the eyes of cattle. *Veterinary Record* 118, 204–206.
11. Galvão K, Angelos JA. Ulcerative blepharitis and conjunctivitis in adult dairy cows and association with *Moraxella bovoculi*. *Can Vet J*, in press.
12. Clarridge III J. E.. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2004. - Vol. 17. - P. 840–862.
13. Jayappa HG, Lehr C. Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. *Am J Vet Res* 1986; 47:2217–21.
14. Høien-Dalen PS, Rosenbusch RF, Roth JA. Comparative characterization of the leukocidic and hemolytic activity of *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res* 1990;51:191–6.
15. Kagonyera GM, George LW, Munn R. Light and electron microscopic changes in corneas of healthy and immunomodulated calves infected with *Moraxella bovis*. *Am J Vet Res* 1988;49:386–95.
16. Angelos JA, Dueger EL, George LW, Carrier TK, Mihalyi JE, Cosgrove SB, Johnson JC. Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc*. 2000 Jan 1;216(1):62-4.
17. Zielinski G, Piscitelli H, Perez-Monti H, Stobbs LA. Antibiotic sensitivity of an Argentine strain collection of *Moraxella bovis*. *Vet Ther*. 2000 Summer;1(3):199-204.
18. Shryock TR, White DW, Werner

19. CS. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 1998 Apr 15;61(4):305-9.
20. McConnel CS, Shum L, House JK. Antimicrobial susceptibility of Australian bovine *Moraxella* isolates. *Aust Vet J.* 2007 Jan-Feb;85(1-2):70-1. No abstract available.
21. Webber JJ, Fales WH, Selby LA.
22. Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis* determined by agar disk diffusion and broth microdilution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982 Apr;21(4):554-7.
23. Allen LJ, George LW, Willits NH. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc.* 1995 Apr 15;206(8):1200-3.
24. Angelos J.A, Ball LM, Byrne BA. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest.* 2011 May;23(3):552-5. doi: 10.1177/1040638711404154.
25. Maboni G, Gressler LT, Espindola JP, Schwab M, Tasca C, Potter L, de Vargas AC. Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. *Braz J Microbiol.* 2015 Jun 1;46(2):545-9. doi: 10.1590/S1517-838246220140058. eCollection 2015 Jun.
26. Uskenov, R. B., Domanov, D.I., Mukhanbetkaliev, E.E., Eshzhanov T.E. Monitoring of infectious keratoconjunctivitis in the northern region of Kazakhstan // Proceedings of the International Scientific Conference «Modern Methodology of Science and Education». September 18, 2017, Warsaw, Poland. – Vol.4. – P. 93-95.
27. Angelos, J.A. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA/J.A. Angelos, L.M. Ball // *J. Vet. Diagn. Invest.* - 2007a. - V 19. - P. 532-534.

MORAXELLA BOVOCULI AS CAUSATIVE AGENT OF INFECTIOUS BOVINE KERATOCONJUNCTIVITIS IN NORTH KAZAKHSTAN

*M.A.¹ Kuibagarov, T.B.² Karibaev
D.K.¹ Kamalova, A.Zh.¹ Ryskeldina, A.B.¹ Shevtsov
¹ National Center for Biotechnology
² National Reference Center for Veterinary Medicine*

Summary

As a result of this work, *Moraxella spp.* bacteria were isolated from samples of biological material from cattle with clinical signs of infectious keratoconjunctivitis. The design of group primers for the cytotoxin gene was carried out to identify *Moraxella spp.* Amplification of the *Moraxella spp.* cytotoxin gene fragment was performed. Isolated strain, the DNA of which was sequenced by the cytotoxin gene. The nucleotide sequences were combined in SeqMan software

(DNASar).Based on the GeneBank data using the BLAST algorithm, the analyzed isolate was identified as *Moraxella bovoculi*. Phylogenetic analysis using the nucleotide sequences of the cytotoxin gene deposited in NCBI also showed clustering of the obtained isolate on the same hoard with *Moraxella bovoculi*.The sensitivity of the isolated strain to the main antimicrobial agents was determined.

Key words: *Moraxella bovoculi*, infectious keratoconjunctivitis of cattle, «*Pink eye*», isolate, PCR, DNA, primers, sequencing, phylogenetically analysis, resistance

СОЛТУСТІК ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ СИЫР ЖҰҚПАЛЫ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТІНІҢ ҚОЗДЫРҒЫШЫ MORAXELLA BOVOCULI

М.А.¹ Қойбағаров, Т.Б.²Карибаев,
Д.К.¹Камалова, А.Ж. Рыскельдина, А.Б.¹Шевцов
¹ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы»
²ВБжҚК«Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық»

Түйін

Осы жұмыстың нәтижесі ретінде, сиыр жұқпалы кератоконьюктивиттің клиникалық белгілері бар малдан алынған биологиялық материалдардың үлгілерінен *Moraxella spp* бактериялары бөлініп алынған. *Moraxella spp* анықтау үшін цитотоксин генінің топтық праймерлерінің дизайны жасалды. Цитотоксин генінің фрагменті *Moraxella spp* амплификациясы жүргізілді. Цитотоксин гені арқылы секвенирленген ДНҚ-ының оқшауланған штаммы алынды. Нуклеотидтік тізбектер SeqMan (DNASar) қосымшасы арқылы біріктірілген. BLAST алгоритмін пайдаланып, GeneBank деректеріне негізделген, талданған изолят *Moraxella bovoculi* ретінде анықталды. NCBI-де сақталған цитотоксин генінің нуклеотидтік тізбектерін пайдаланатын филогенетикалық талдау, сондай-ақ, алынған изоляттың *Moraxella bovoculi*-мен бірдей классқа шоғырлануын көрсетті. Негізгі антимикробтық агенттерге ауру малдан бөлініп алынған штамның сезімталдығы анықталды.

Түйінді сөздер: *Moraxella bovoculi*, ірі кара малдың жұқпалы кератоконьюктивиті, «*Pink eye*», изолят, ДНҚ, ПТР, праймерлер, секвенирлеу, резистенттік, филогенетикалық талдау.