

УДК 619:616.98:579:843.96
© 2012

*В.Г. Скрипник,
доктор
ветеринарних наук*

Р.В. Козій

*А.В. Скрипник,
кандидат
ветеринарних наук
Інститут ветеринарної
медицини НААН*

ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ ЗБУДНИКА САПУ *BURKHOLDERIA MALLEI*

*Наведено відомі фактори патогенності *B. mallei* та основні напрями досліджень патогенезу з метою удосконалення методів діагностики та профілактики сапу в коней. Знання структури збудника потрібні для розуміння його взаємодії з організмом та розробки ефективних методів боротьби із захворюванням. Серед відомих факторів патогенності *B. mallei* важливу роль відіграють капсула, ліпополісахарид і система секреції 3-го типу. Роль інших факторів патогенності, таких як система секреції 6-го типу та кворум сенсинг потребує подальшого вивчення.*

Сап — небезпечне зооантропонозне бактеріальне захворювання, що вражає в основному коней, віслуків і мулів. Чутливими також є дрібна рогата худоба, м'ясоїдні та верблюди. Сап також є дуже небезпечною інфекцією для людей. Захворювання вражає легені, шкіру, слизові оболонки та лімфатичну систему. Сап у людей характеризується високою смертністю та є складним у лікуванні. У коней перебіг захворювання найчастіше має хронічну форму, у віслуків і мулів — гострішу. Збудник сапу нестійкий у зовнішньому середовищі, і єдиним резервуаром є хронічно та латентно хворі коні.

Збудник сапу *Burkholderia mallei* — це нерухлива, грамнегативна паличка з заокругленими кінцями, аероб або факультативний анаероб, 2–5 мкм завдовжки та 0,5 мкм завширшки [4]. Спор вона не утворює, але здатна формувати капсулу [3]. *B. mallei* є факультативним внутрішньоклітинним паразитом [13]. У разі потрапляння всередину клітини збудник сапу здатний пригнічувати захисні механізми клітини, виходити з ендосоми чи фагосоми та розмножуватись у цитоплазмі [5]. Незважаючи на те, що *B. mallei* — нерухлива бактерія, вона може активно рухатись усередині інфікованої клітини за рахунок здатності викликати полімеризацію актину, що дає їй змогу швидко інфікувати сусідні клітини.

Збудник сапу вражає різні типи клітин, зокрема епітеліальні та клітини системи мононуклеарних фагоцитів. Існують повідомлення про те, що *B. mallei* має тропність до макрофагів, тому найбільші ураження виявляють в органах і тканинах, багатих на клітини системи мононуклеарних фагоцитів — лімфатичній системі, легенях, печінці, селезінці [3, 11, 12].

Сап належить до особливо небезпечних інфекцій унаслідок ряду факторів: рідкісність хвороби, різноманітність способів зараження, низька інфекційна доза, тяжкий клінічний перебіг і висока смертність, складнощі під час діагностики та лікування у людей, відсутність вакцини [14]. Отже, розробка надійних засобів діагностики та специфічної профілактики проти сапу є актуальною проблемою як у гуманній, так і у ветеринарній медицині. Це потребує детального вивчення структури, факторів патогенності *B. mallei* та особливостей взаємодії збудника з клітинами хазяїна. В останні роки велике значення надається вивченню факторів патогенності та їхніх генетичних детермінант збудника сапу. Глибокі знання у цій сфері потрібні для розуміння патогенезу хвороби, механізмів взаємодії збудника з макроорганізмом та успішної розробки засобів діагностики та боротьби з інфекцією.

Мета роботи — узагальнити сучасні знання про структури *B. mallei*, які визначають патогенність збудника.

У патогенності багатьох бактерій велике значення має капсула. Тривалий час вважали, що *B. mallei* не здатна формувати капсулу [2]. Однак С.Ф. Попов і співав. довели, що *B. mallei* та *B. pseudomallei* є капсулоутворювальними мікроорганізмами [3]. Науковці дослідили типові штами збудника сапу Ц-5, 10230, В-120. За світлової та електронної мікроскопії у частини клітин було виявлено екстрацелюлярну структуру у вигляді капсульного покриття завтовшки 0,5 мкм. На ранній логарифмічній стадії росту капсула мала ніжну структуру у вигляді переплечених фібрил. На початку стаціонарної фази вона мала вигляд бахроми, що щільно приля-

гала до клітинної стінки, водночас поверхневі шари були більш розпушеними, легко відривалися і формували позаклітинний слиз. Установлено, що основою капсульної речовини є полісахаридні біополімери. Для підтвердження бактеріальної природи капсульної речовини автори спостерігали за реакцією між бактеріальними клітинами збудників сапу та меліоїдозу та міченими пероксидазою імуноглобулінами кроля, отриманими на цілі клітини цих збудників. Виявлено, що антитіла з'єднувались з антигеном і підсилювали контрастність капсул. Це дало авторам змогу зробити висновок про бактеріальну природу капсульної речовини. Під час проведення досліджень авторам також вдалося довести тропність збудників обох хвороб до клітин ретикулоендотеліальної системи макроорганізму та антифагоцитарну властивість капсули у цих бактерій.

D. DeShazer та співав. визначили кластер генів, відповідальних за продукування капсульних полісахаридів, та встановили ген, що є основним — *wcbF* [9]. За мутації цього гена автори отримали мутант *B. mallei*, не здатний формувати капсулу. Для визначення ролі капсули у патогенності збудника автори провели зараження лабораторних моделей (хом'яків і білих мишей) польовим і безкапсульним штамом *B. mallei*. Зараження безкапсульним штамом призводило до значного зниження вірулентності збудника: у хом'яків у 100 тис. разів, у білих мишей — у 1 тис. разів. Отже, авторам вдалося довести, що капсула є ключовим фактором вірулентності у *B. mallei*.

Важливим фактором патогенності грамнегативних бактерій є ендотоксин — ліпополісахарид (ЛПС). Зовнішній моношар зовнішньої мембрани клітинної стінки грамнегативних бактерій на 2/3 складається з ЛПС [1]. ЛПС складається з полісахариду (О-антиген), олігосахаридного ядра та ліпиду А. Токсичність ЛПС пов'язана з дією ліпиду А, який викликає гіперімунну відповідь. Імуногенність ЛПС пов'язана з О-специфічним полісахаридом, який є найваріабельнішою частиною ЛПС. ЛПС активує Toll-подібний рецептор 4 (TLR-4), стимулює продукування цитокінів і хемокинів антиген-презентувальними клітинами — макрофагами та дендритними клітинами [6].

M.N. Burtnick і співав. виявили кластер генів завдовжки близько 20 тис. пар нуклеотидів, відповідальний за синтез ЛПС [8]. Цей кластер містить 16 ORF. Порівняння послідовності О-полісахарид-кодувальної ділянки ДНК *B. mallei* та *B. pseudomallei* виявило 99% ідентичності, що ще раз підтверджує генетичну спорідненість цих мікроорганізмів. Гени О-полісахарид-кодувального оперону *B. mallei* було названо відповідно до ідентичних генів *B. pseudomallei* (*apaH*,

rmlA–D, *wzm*, *wzt*, *wbiA–I*). Під час дослідження резистентності штамів *B. mallei* до бактерицидного ефекту нормальної людської сироватки (NHS — normal human serum) установлено, що типовий штам *B. mallei* ATCC23344 резистентний до дії 30% NHS, тоді як штами, які не продукують О-полісахарид, були повністю убиті через 2 год після інкубації. Наведені дані свідчать про те, що ЛПС є важливим фактором захисту *B. mallei*, що може істотно додавати до його патогенності.

Різноманітні грамнегативні бактерії використовують систему секреції 3-го типу (TTSS, CCTT — type three secretion system) як механізм вірулентності. Це система мембранних білків, яка має голкоподібну форму. Роль цієї системи полягає у транслокації білків патогенності у цитозоль-еукаріотичних клітин [15]. Доведено, що *B. mallei* має CCTT, подібну до тієї, яку має *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* [17].

R.L. Ulrich і D. DeShazer довели, що функціональна CCTT є фактором патогенності *B. mallei* ATCC 23344 для білих мишей і золотистих хом'яків [23]. Мутації у генах *bsaQ* та *bsaZ*, які кодують структурні білки цієї системи, призводили до зниження вірулентності збудника сапу, що підтверджується підвищенням виживаності піддослідних тварин, менш вираженим проявом клінічних симптомів захворювання, зменшення кількості бактерій у легенях, печінці та селезінці.

W.J. Ribot і R.L. Ulrich установили, що система секреції 3-го типу потрібна для внутрішньоклітинного росту збудника сапу, оскільки вона здатна призводити до формування вип'ячувань мембрани макрофага та бере участь у руйнуванні фагосоми [18]. Результати досліджень цих учених також свідчать про те, що ця система сприяє міжклітинному поширенню збудника завдяки активній рухливості (рух бактерії всередині клітини за рахунок стимуляції полімеризації актину).

Хоча у мутантів *B. mallei*, які не мають функціональної системи секреції 3-го типу, вірулентність знижена, вони не спричиняють протективний імунний захист [24]. Це дає змогу зробити припущення про те, що серед складників цієї системи (ефекторних чи структурних білків) є можливі кандидати для розробки вакцини.

Систему секреції 6-го типу (CC6T, T6SS — type six secretion system) було відкрито нещодавно [10]. Ця система бере участь у секреції деяких ефекторних білків. Через CC6T секретуються білки родини Hcp (Haemolysin A coregulated protein). Роль цих білків до кінця не з'ясовано. J.D. Mougous і співав. зробили припущення, що цей білок формує зовнішній канал, через який транспортуються інші макромолекули [16].

B. mallei має 4 кластери генів, які кодують CC6T. Усі ці кластери розташовані на плазміді 2 і мають певні функціональні відмінності. М.А. Schell і співав. установили, що CC6T, яку кодує кластер 1 (CC6T-1), потрібна для вірулентності *B. mallei* [19]. Мутанти, у яких ця система не функціональна, є авірулентними для золотистих хом'яків і коней. Крім того, М.Н. Burtnick і співав. установили, що нефункціональна CC6T-1 призводить до дефектів у внутрішньоклітинному розмноженні та міжклітинному поширенні *B. mallei* [7]. Отже, CC6T є важливим фактором патогенності і потребує подальшого вивчення.

Кворум сенсинг (QS від quorum sensing — відчуття кворуму) це здатність клітин регулювати експресію певних генів залежно від щільності бактерій у популяції. Отже, бактерії здатні пристосовуватися до умов середовища завдяки координованій взаємодії (наприклад, не проявляти вірулентних властивостей до досягнення певної порогової концентрації). У грамнегативних бактерій така здатність поєднувати екстра- та інтрацелюлярні сигнали відбувається за участі сигнальних молекул — N-ацил-гомосеринлактонів (AHL). Функціонуючі системи

QS виявлено у деяких представників роду *Burkholderia*: *B. cepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei*. Ці системи виявляли як позитивну, так і негативну регуляцію різноманітних процесів, зокрема синтез сидерофорів, формування біоплівки, ліпазну та β-гемолітичну активність, утилізацію субстрату [20–22]. Крім того, розрив цієї сигнальної системи істотно знижував патогенність *B. cepacia* та *B. pseudomallei* [20, 22]. R.L. Ulrich і співав. установили, що мутація генів *B. mallei*, відповідальних за QS, особливо генів *Bma11*, *Bma13*, *BmaR5*, сприяє зниженню смертності серед заражених мишей, а LD₅₀ для хом'яків зростає у 100 разів [22]. Результати цих досліджень також свідчать, що система QS у *B. mallei* не регулює фактори ліпазної, β-гемолітичної, протеазної та фосфоліпазної С активності. Мутація генів QS також не впливала на формування капсули.

Отже, хоча результати досліджень на тваринах-моделях свідчать про важливу роль QS у патогенності *B. mallei*, потрібні подальші дослідження для визначення факторів патогенності, пов'язаних з цією складною сигнальною системою.

Висновки

Дослідженнями встановлено, що серед відомих факторів патогенності *B. mallei* важливу роль відіграють капсула, ліпополісахарид, система секреції 3-го типу. Інші фактори патогенності (система секреції 6-го

типу та кворум сенсинг) потребують подальшого вивчення. Глибокі знання з молекулярних механізмів патогенезу необхідні для розробки нових методів діагностики та профілактики сапу.

Бібліографія

1. Грицай Р.В. Ліпополісахариди грамнегативних бактерій: структурні особливості, біосинтез, застосування в біотехнології/Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанець//Біотехнологія. — 2011. — 4, № 1. — С. 41–59.
2. Ковалев Г.К. Сап (обзор)/Г.К. Ковалев//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1971. — № 1. — С. 63–70.
3. Попов С.Ф. *Pseudomonas pseudomallei* и *Pseudomonas mallei* — капсулообразующие бактерии/С.Ф. Попов, В.Я. Курилов, А.Т. Яковлев//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1995. — № 5. — С. 32–36.
4. Al-Ani F.K. Glanders in horses: a review of the literature/F.K. Al-Ani, J. Roberson//Veterinarski Arhiv. — 2007. — V. 77(3). — P. 203–218.
5. Balder R. Type V Secretion System Exoproteins and their Roles in the Adherence of the Gram-Negative Bacterial Pathogens *Moraxella catarrhalis*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* Dissertation to obtain a Doctor of Philosophy in Biomedical Sciences//Rachel Balder. — University of Toledo, 2007. — 2010 p.
6. Brett P.J. *Burkholderia mallei* expresses a unique lipopolysaccharide mixture that is a potent activator of human Toll-like receptor 4 complexes/P.J. Brett, M.N. Burtnick, D.S. Snyder [et al.]/Molecular Microbiology. — 2007. — V. 63(2). — P. 379–390.
7. Burtnick M.N. *Burkholderia mallei* cluster 1 Type VI Secretion mutants exhibit growth and actin polymerization defects in RAW 264.7 murine macrophages/M.N. Burtnick, D. DeShazer, V. Nair [et al.]/Infection and Immunity. — 2010. — V. 78 — P. 88–99.
8. Burtnick M.N. Molecular and physical characterization of *Burkholderia mallei* O Antigens/M.N. Burtnick, P.J. Brett, D.E. Woods//Journal of Bacteriology. — 2002. — V. 184(3). — P. 849–852.
9. DeShazer D. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene by subtractive hybridization

- ridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant/D. DeShazer, D.M. Waag, D.L. Fritz, D.E. Woods//Microb Pathog. — 2001. — V. 30. — P. 253–269.
10. Filloux A. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes/A. Filloux, A. Hachini, S. Bleves//Microbiology. — 2008. — V. 154. — P. 1570–1583.
11. Fritz D.L. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*)/D.L. Fritz, P. Vogel, D.R. Brown [et al.]/Vet. Pathol. — 2000. — V. 37. — P. 626–636.
12. Fritz D.L. The hamster model of intraperitoneal *Burkholderia mallei* (glanders)/D.L. Fritz, P. Vogel, D.R. Brown, D.M. Waag//Vet. Pathol. — 1999. — V. 36. — P. 276–291.
13. Galyov E.E. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis/E.E. Galyov, P.J. Brett, D. DeShazer//Annu. Rev. Microbiol. — 2010. — V. 64. — P. 495–517.
14. 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. — V. 9. — P. 499–503.
15. Hueck C.J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants/C.J. Hueck//Microbiology and molecular biology reviews. — 1998. — V. 62(2). — P. 379–433.
16. Mougous J.D. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes protein secretion apparatus/J.D. Mougous, M.E. Cuff, S. Raunser [et al.]/Science. — 2006. — V. 312. — P. 1526–1530.
17. Rainbow L. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*/L. Rainbow, C.A. Hart, C. Winstanley//J. Med. Microbiol. — 2002. — V. 51. — P. 374–384.
18. Ribot J.W. The animal pathogen-like type III secretion system is required for intracellular survival of *Burkholderia mallei* within J77.2 macrophages/J.W. Ribot, R.L. Ulrich//Infection and Immunity. — 2006. — V. 74(7). — P. 4349–4353.
19. Schell M.A. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*/M.A. Schell, R.L. Ulrich, W.J. Ribot [et al.]/Molecular Microbiology. — 2007. — V. 64(6). — P. 1466–1485.
20. Sokol P.A. The CeplR quorum-sensing system contributes to the virulence of *Burkholderia cenocepacia* respiratory infections/P.A. Sokol, U. Sajjan, M.B. Visser [et al.]/Microbiology. — 2003. — V. 149. — P. 3649–3658.
21. Ulrich R.L. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*/R.L. Ulrich, D. DeShazer, H.B. Hines [et al.]/Infection and Immunity. — 2004. — V. 72(11). — P. 6589–6596.
22. Ulrich R.L. The role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*/R.L. Ulrich, D. DeShazer, E.E. Brueggemann [et al.]/J. Med. Microbiol. — 2004. — V. 53(11). — P. 1053–1064.
23. Ulrich R.L. Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei*/R.L. Ulrich, D. DeShazer//Infection and Immunity. — 2004. — V. 72(2). — P. 1150–1154.
24. Whitlock G.C. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*/G.C. Whitlock, D.M. Estes, A.G. Torres//FEMS Microbiol Lett. — 2007. — V. 277. — P. 115–122.