

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ
И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *PASTEURELLA MULTOCIDA*

A.V. Nefedchenko, A.G. Glotov,
T.I. Glotova, T.E. Sudorgina

PRACTICAL IMPORTANCE OF POLYMERASE CHAIN REACTION
FOR THE DETECTION AND GENOTIPIVING *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Неведченко А.В. – д-р ветеринар. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. биотехнологии – диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р. пос. Краснообск.

E-mail: homeovet@yandex.ru

Гловов А.Г. – д-р ветеринар. наук, проф., зав. лаб. биотехнологии – диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р. пос. Краснообск.

E-mail: glotov_vet@mail.ru

Глотова Т.И. – д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. биотехнологии – диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р. пос. Краснообск.

E-mail: t-glotova@mail.ru

Судоргина Т.Е. – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр. лаб. биотехнологии – диагностического центра Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р. пос. Краснообск.

E-mail: tatjana177@mail.ru

Nefedchenko A.V. – Dr. Veterinary Sci., Assoc. Prof., Senior Staff Scientist, Lab. of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFRCA RAS, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk.

E-mail: homeovet@yandex.ru

Glotov A.G. – Dr. Veterinary Sci., Prof., Head, Lab. of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFRCA RAS, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk.

E-mail: glotov_vet@mail.ru

Glotova T.I. – Dr. Biol. Sci., Prof., Chief Staff Scientist, Lab. of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFRCA RAS, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk.

E-mail: t-glotova@mail.ru

Sudorgina T.E. – Cand. Veterinary Sci., Assoc. Prof., Senior Staff Scientist, Lab. of Biotechnology – Diagnostic Center, Siberian Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SFRCA RAS, Novosibirsk Region, Novosibirsk District, Krasnoobsk.

E-mail: tatjana177@mail.ru

Представлены результаты изучения практической значимости способа выявления и определения принадлежности к генотипу патогенных вариантов культур бактерии *Pasteurella multocida*. Он включает проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией, перенос продуктов амплификации на гель и анализ проведения реакции. Исследование проб проводят в двух реакциях с помощью подобранных пар олигонуклеотидных праймеров.

Первая дает возможность обнаружить бактерию *P. multocida* и определить серогруппы А и D, а вторая – В, Е и F. Чувствительность метода составила 10^3 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/г ткани соответственно. Этот способ выявляет и типировает бактерию *P. multocida* пяти капсульных групп – А, В, D, Е, и F. Исследовать можно чистые и смешанные культуры, а также пробы биологического материала от животных. Геном бактерии выявили в 126 образцах, что составило 48,5 % от общего количе-

ства исследованных проб биоматериала. В 113 (89,7 %) присутствовали бактерии капсульной группы А, а в 15 (13,3 %) – D. В исследованных образцах не выявили *P. multocida* капсульных групп В, Е и F. *P. multocida* была обнаружена в 73 % проб биоматериала от телят 1–6 месяцев и в 39 % проб от телят до 1 месяца. У взрослых животных было выявлено 12 % положительных проб. У телят чаще всего присутствовала *P. multocida* капсульной группы А, а у взрослых особей – дополнительно D. Чаще *P. multocida* (А) выявляли в легких и бронхиальных лимфатических узлах, в редких случаях – в селезенке. Геном бактерии капсульной группы D был идентифицирован в легких и иногда в лимфатических узлах. Полученные результаты подтверждают практическую значимость ПЦР, которая складывается из ее высокой специфичности, чувствительности и способности выявлять все пять капсульных групп бактерии *P. multocida*, что служит перспективой для ее широкого использования в ветеринарных лабораториях при диагностике пастереллеза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, *Pasteurella multocida*, генотипирование, капсульные группы, крупный рогатый скот.

The results of the study of practical significance of the method of identifying and determining the genotype of pathogenic variants of *Pasteurella multocida* bacteria were presented. It included carrying out polymerase chain reaction (PCR) with subsequent electrophoretic detection, transfer of amplification products to the gel and analysis of the reaction. The study of samples was carried out in two reactions using selected pairs of oligonucleotide primers. The first made it possible to detect the *P. multocida* bacterium and determine the serogroups A and D, and the second B, E and F. The sensitivity of the method was 103 CFU / ml and 105 CFU / g of tissue, respectively. This method identified and typed the bacterium *P. multocida* of five capsular groups – A, B, D, E and F. One can examine pure and mixed cultures, as well as samples of biological material from animals. The bacteria genome was detected in 126 samples, which accounted for 48.5 % of the total number of studied biomaterial samples. The bacteria of capsular

group A were present in 113 (89.7 %) and 15 (13.3 %) – in D. In studied samples *P. multocida* was not revealed, the capsular groups B, E and FP *P. multocida* were detected in 73 % of biomaterial samples from calves 1–6 months and in 39 % of the samples from calves up to 1 month. In adult animals 12 % of positive samples were detected. In calves, *P. multocida* of capsular group A was most often present, and in adults, additionally D. Most often, *P. multocida* (A) was detected in the lungs and bronchial lymph nodes, in rare cases – in the spleen. The bacterial genome of the capsular group D was identified in the lungs and sometimes in the lymph nodes. Obtained results confirm practical significance of PCR, which is based on its high specificity, sensitivity and ability to identify all five capsule groups of *P. multocida*, which is a prospect for its wide use in veterinary laboratories for cattle pasteurization diagnostics.

Keywords: polymerase chain reaction, *Pasteurella multocida*, genotyping, capsular groups, cattle.

Введение. *Pasteurella multocida* – факультативно анаэробная, грамотрицательная и неподвижная бактерия, которая является одним из обитателей слизистых оболочек верхнего респираторного тракта. Она может вызывать вторичные инфекции и болезни при воздействии различных факторов, снижающих резистентность организма. Ее роль в патологии респираторных органов значительно увеличивается в связи с интенсификацией молочного животноводства [1–6].

В настоящее время у бактерии *Pasteurella multocida* описано 5 капсульных групп: А, В, D, Е и F. Установлено, что они имеют различное эпизоотологическое значение для животноводства [7]. Представители серогрупп А и D вызывают пневмонии у крупного рогатого скота (КРС), овец и свиней; В и Е – геморрагическую септицемию у КРС и буйволов; F – пневмонию и перитонит у телят, но чаще всего выделяют от птиц и иногда от свиней [8–9]. Для установления принадлежности к определенной серогруппе бактерии принято использовать сложные тесты с использованием гиалуронидазы стафилококка (А) и акрифламина (D).

В научной литературе описано несколько тест-систем на основе полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией полученных результатов, предназначенных для выявления *Pasteurella multocida* и определения ее серогрупп, однако не все из них обладают высокой диагностической эффективностью [7, 10].

Для повышения эффективности диагностики пастереллеза КРС нами был разработан более чувствительный способ, который позволяет не только обнаружить геном бактерии *Pasteurella multocida*, но и определить ее генотип. Он основан на использовании мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией полученных результатов и дает возможность выявлять пять капсульных групп бактерии [11].

Цель исследования: определение эффективности и практического значения разработанной ПЦР для изучения культур бактерии *Pasteurella multocida* и проб биологического материала, отобранных от животных при вспышках респираторных болезней.

Материалы и методы исследования. В работе использовали референтные штаммы: «1231» (серотип А), «681» (В) и «Т80» (D) бактерии *P. multocida*; а также штамм «16» бактерии *Mannheimia haemolytica* (A1), принадлежащие биоресурсной коллекции ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Кроме того, для исследования были взяты чистые культуры бактерии *P. multocida*: «СР-57», «АГМ» (А); «Л-33», «К-35» (D) из коллекции лаборатории биотехнологии-диагностический центр ИЭВС и ДВ СФНЦА РАН.

Практическое значение ПЦР оценивали во время анализа 67 культур бактерий, выделенных нами из проб биологического материала от КРС с различными клиническими проявлениями респираторных болезней. Эти культуры бактерий были получены нами при проведении стандартных бактериологических и биохимических исследований проб биоматериала.

Специфичность реакции определяли на культурах следующих бактерий: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, а также *Escherichia coli*.

Пробы биологического материала отбирали от животных разных половозрастных групп в тех животноводческих хозяйствах, где не были использованы антибактериальные препараты для лечения животных. При этом соблюдали следующие условия: отбор проб не позже 4 ч после

гибели или вынужденного убоя животного, однократная заморозка, их доставка в термосе со льдом в течение не более 12 ч с момента отбора, без повторного оттаивания и замораживания. Пробы биоматериала сразу, в день поступления в лабораторию, исследовали бактериологическими и биохимическими методами.

Для определения диагностической чувствительности метода готовили 10-кратные разведения референтных штаммов бактерии *P. multocida* с установленной концентрацией. Кроме того, анализировали тканевой материал, приготовленный из проб биоматериала. Для этого в 900 мкл 10%-й суспензии пробы биоматериала вносили 100 мкл разведения штамма «1231» *P. multocida*. Исследовали верхнюю водную фазу, полученную после тщательного перемешивания и отстаивания этой смеси, в которой пересчитывали концентрацию *P. multocida* и выражали ее в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г ткани.

Из проб внутренних органов, взятых от больных животных, брали для исследования легкие, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы, селезенку.

ДНК из культур бактерий и внутренних органов животных выделяли при помощи комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК «Ампли Прайм РИБО-преп» («НекстБио», Россия). Выделенную ДНК растворяли в 100 мкл 1хТЕ-буфера и использовали для постановки ПЦР.

При подборе специфических праймеров использовали программу Vector NTI 9.0.0 (InforMax) и последовательности генов *cap locus* бактерии *Pasteurella multocida* серогрупп А, В, D, Е, F из базы данных GeneBank [11].

ПЦР проводили в 30 мкл реакционной смеси. Она включала: 1,5 е. а. SmartTaq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия), 5 мкл выделенной нуклеиновой кислоты, 3,3 mM MgCl₂, 1хTaq буфер без Mg²⁺ (Медиген, Россия), 0,2 mM dNTP, по 150 nM каждого праймера, стерильную деионизованную воду. Использовали прибор Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и программу: 95 °С – 5 мин, затем 40 циклов 94 °С – 15 с, 53 °С – 20 с, 72 °С – 40 с, заключительный цикл 72 °С – 5 мин. Для выявления нуклеиновых кислот использовали 2 % агорозный гель и бромистый этидий.

Для визуализации ампликонов в ультрафиолетовом свете применяли Molecular Imager ChemiDoc XRS System 170-8170 (Bio-Rad, США).

Результаты исследования и их обсуждение. Предложен способ, который включает проведение полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результатов, перенос продукта амплификации на гель, оценку проведения реакции. Исследование каждой тестируемой пробы проводили в двух реакциях с помощью подобранных олигонуклеотидных праймеров. Первая реакция позволяла выявить бактерию *Pasteurella multocida* и определить ее принадлежность к двум серогруппам А и D. Вторая реакция давала возможность обнаружить серогруппы В, Е и F. Таким образом, этот способ предназначен для выявления и генотипирования бактерии *Pasteurella multocida* пяти серогрупп – А, В, D, Е и F.

Одним из важных условий для широкого практического использования любой диагностической тест-системы является ее высокая чувствительность. Для определения диагностической чувствительности ПЦР использовали суточные культуры референтных штаммов «1231», «680», «Т-80» бактерии *Pasteurella multocida*, выращенные на мясопептонном агаре с добавлением 5 % дефибрированной крови барана. Их переносили в бактериологические пробирки со 1000 мкл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, разводили до концентрации 10^{11} КОЕ/мл. Полученную таким образом бактериальную суспензию титровали методом 10-кратных разведений до разведения 10^1 КОЕ/мл.

При исследовании суспензий чистых бактериальных культур чувствительность ПЦР составила 10^3 КОЕ/мл, а при анализе проб тканевого материала – 10^5 КОЕ/г ткани.

Для определения специфичности реакции исследовали контрольные штаммы бактерий: «16» бактерии *Mannheimia haemolytica* (A1), штаммы F-50 и ATCC 25922 *Escherichia coli*, культуры бактерии *P. multocida*, выделенные от больных животных, а также пробы внутренних органов от телят с симптомами респираторных болезней. Результаты исследования свидетельствовали о высокой специфичности реакции, так как со всеми протестированными в ре-

акции контрольными образцами были получены отрицательные результаты.

Изучение эффективности использования ПЦР для выявления и определения генотипа *P. multocida* проводили при исследовании проб биоматериала от больных животных, отбор которых проводили во время массовых респираторных болезней на молочных комплексах Сибири. Всего было исследовано 260 образцов. Геном бактерии выявили в 126, что составило 48,5 % от общего количества исследованных проб. В 113 (89,7 %) из них установили принадлежность к капсульной группе А, а в 15 (13,3 %) – к D. В исследованных пробах биоматериала не выявили *Pasteurella multocida* капсульных групп В, Е и F.

Чаще всего бактерию *Pasteurella multocida* обнаруживали у телят в возрасте 1–6 мес., реже – у телят до 1 мес. Количество положительных проб биоматериала от них составило 73 и 39 % соответственно. Наименьшее количество положительных проб выявлено у взрослых животных (12 %).

В пробах биоматериала от телят генотипировали *Pasteurella multocida* капсульной группы А. У взрослых животных присутствовали представители двух капсульных групп А и D. Анализ данных указывает на то, что в регионе Сибири среди КРС преимущественно распространены бактерии *Pasteurella multocida* группы А и в редких случаях – D.

Были выявлены некоторые закономерности обнаружения генома бактерии определенной капсульной группы в зависимости от вида исследуемого биоматериала. Так, геном *P. multocida* капсульной группы А чаще находили в следующих органах: легкие и бронхиальные лимфатические узлы. В единичных случаях – в селезенке. Это может быть обусловлено наличием септической формы болезни у животных, от которых отбирали пробы биоматериала для анализа [3]. Геном *P. multocida* (D) выявляли в основном в легких, иногда – в лимфатических узлах.

Наши результаты полностью совпадают с данными отечественных и зарубежных исследователей о том, что *P. multocida* (А) чаще, чем представители других капсульных групп (В, D, Е и F), выявляется при респираторных болезнях телят [3, 6, 12].

Заключение. Разработанный метод мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией результатов позволяет в короткие сроки выявлять бактерию *Pasteurella multocida* при исследовании как чистых, так и смешанных бактериальных культур, а также проб биологического материала от больных животных. Этот метод позволяет проводить одновременную идентификацию пяти капсульных групп у бактерии *P. multocida*, что имеет большое практическое и научное значение, а также перспективу широкого использования.

Чувствительность полимеразной цепной реакции составила 10^3 КОЕ/мл и 10^5 КОЕ/г ткани соответственно при исследовании чистой бактериальной суспензии и тканевого материала.

Полимеразная цепная реакция может быть использована в качестве метода быстрого выявления и генотипирования бактерии *P. multocida* как в пробах биоматериала от больных животных, так и в чистых и смешанных бактериальных культурах.

Литература

1. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 17–21.
2. Frank G.H. Bacteria as etiologic agents in bovine respiratory disease. In: Bovine respiratory disease. Ed. Loan R.W. College Station (TX): Texas A&M University Press; 1984. – P. 342–362.
3. Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2012. – Vol. 361. – P. 1–22.
4. Griffin D., Chengappa M.M., Kuszak J., McVey D.S. Bacterial Pathogens of the Bovine Respiratory Disease Complex // Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. – 2010. – Vol. 26. – P. 381–394.
5. Шегидевич Э.А. Роль пастерелл в респираторной патологии овец и крупного рогатого скота: дис. ... д-ра ветеринар. наук. – М., 1993.
6. Глотов А.Г., Терентьева Т.Е., Нефедченко А.В. и др. Гетерогенность пастерелл, выделенных от крупного рогатого скота на молоч-

- ных комплексах // Ветеринария. – 2014. – № 12. – С. 23–26.
7. Adhikary S., Bisgaard M., Foster G. et al. Comparative study of PCR methods to detect *Pasteurella multocida* // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. – 2013. – Vol. 126. – P. 415–422.
8. Peng Z., Liang W., Wang Y. et al. Experimental pathogenicity and complete genome characterization of a pig origin *Pasteurella multocida* serogroup F isolate HN07 // Vet. Microbiol. – 2017. – Vol. 198. – P. 23–33.
9. Kim J., Kim J.W., Oh S.I. et al. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea // BMC Vet Res. 2019. – Vol. 15(1). – P. 119.
10. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В. и др. Типирование культур бактерии *Pasteurella multocida*, выделенных от крупного рогатого скота при помощи ПЦР // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2013. – № 2. – С. 88–93.
11. Нефедченко А.В., Шиков А.Н., Глотов А.Г. и др. Разработка метода идентификации и генотипирования бактерий *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* на основе полимеразной цепной реакции и филогенетический анализ культур бактерий, выделенных от крупного рогатого скота // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – № 2. – С. 62–66.
12. Peng Z., Liang W., Wu B. Molecular typing methods for *Pasteurella multocida*-A review // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2016. – Vol. 56 (10). – P. 1521–1529.

Литература

1. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G. i dr. Rasprostranenie vi-rusnyh respiratornyh boleznej krupnogo rogatogo skota // Veterinarija. – 2002. – № 3. – S. 17–21.
2. Frank G.H. Bacteria as etiologic agents in bovine respiratory disease. In: Bovine respiratory disease. Ed. Loan R.W. College Station (TX): Texas A&M University Press; 1984. – P. 342–362.
3. Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida*: dis-eases and

- pathogenesis // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012. – Vol. 361. – P. 1–22.
4. Griffin D., Chengappa M.M., Kuszak J., McVey D.S. Bacterial Pathogens of the Bovine Respiratory Disease Complex // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* – 2010. – Vol. 26. – P. 381–394.
 5. Shegidevich Je.A. Rol' pasterell v respiratornoj patologii ovec i krupnogo rogatogo skota: dis. ... d-ra veterinar. nauk. – M., 1993.
 6. Glotov A.G., Terent'eva T.E., Nefedchenko A.V. i dr. Geterogenost' pasterell, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota na molochnyh kompleksah // *Veterinarija.* – 2014. – № 12. – S. 23–26.
 7. Adhikary S., Bisgaard M., Foster G. et al. Comparative study of PCR methods to detect *Pasteurella multocida* // *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* – 2013. – Vol. 126. – P. 415–422.
 8. Peng Z., Liang W., Wang Y. et al. Experimental pathogenicity and complete genome characterization of a pig origin *Pasteurella multocida* serogroup F isolate HN07 // *Vet. Microbiol.* – 2017. – Vol. 198. – P. 23–33.
 9. Kim J., Kim J.W., Oh S.I. et al. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea // *BMC Vet Res.* 2019. – Vol. 15(1). – P. 119.
 10. Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V. i dr. Tipirovanie kul'tur bakterii *Pasteurella multocida*, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota pri pomoshhi PCR // *Sib. vestn. s.-h. nauki.* – 2013. – № 2. – S. 88–93.
 11. Nefedchenko A.V., Shikov A.N., Glotov A.G. i dr. Razrabotka metoda identifikacii i genotipirovanija bakterij *Pasteurella multocida* i *Mannheimia haemolytica* na osnove polimeraznoj cepnoj reakcii i filogeneticheskiy analiz kul'tur bakterij, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota // *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija.* – 2016. – № 2. – S. 62–66.
 12. Peng Z., Liang W., Wu B. Molecular typing methods for *Pasteurella multocida*-A review // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 2016. – Vol. 56 (10). – P. 1521–1529.

