

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
Мальчик О.В., научный сотрудник¹
Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск

²ЗАО «Консул», г. Брест

КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СЕРОВАРИАНТОВ A, B, D *PASTEURELLA MULTOCIDA* В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Резюме

В статье приведены данные по конструированию «Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* (A, B, D)», описание генов, кодирующих факторы патогенности пастерелл серовариантов A, B, D. Определена специфичность и чувствительность multiplex ПЦР тест-системы.

Summary

The article presents data on the design of «Multiplex PCR *Pasteurella multocida* (A, B, D)», a description of the genes encoding factors of the pathogenicity of *Pasteurella multocida* serovariants A, B, D. The specificity and sensitivity of multiplex PCR test systems are determined.

Поступила в редакцию 03.05.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез – заболевание животных и птиц, опасное и для людей, распространенное во всех странах мира. Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение оздоровительных и профилактических мероприятий. Летальность при этой болезни составляет от 10 до 75 %.

В животноводстве ситуация по пастереллезу также остается весьма напряженной. Пастереллез возникает среди телят 1–6 месячного возраста и охватывает до 70 и более процентов поголовья. Ежегодно выявляются от 7,1 до 13,6 % неблагополучных пунктов по пастереллезу крупного рогатого скота. У пушных зверей заболеваемость пастереллезом достигает 42 % [1, 2].

Возбудитель болезни относится к роду *Pasteurella*. Все пастереллы паразитируют на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, а также пищеварительного тракта и часто являются возбудителями

вторичных инфекций [3, 4].

Выделяют 5 серовариантов *Pasteurella multocida* по капсульному антигену, которые обозначаются заглавными латинскими буквами A, B, D, E, F, и 16 серовариантов по соматическому антигену, обозначаемых арабскими цифрами от 1 до 16 [3, 4, 5]. Широкое распространение пастереллоносительства, циркуляция слабовирулентных штаммов *Pasteurella multocida* обуславливают актуальность решения проблемы проведения эффективной диагностики пастереллеза.

Бактериологические методы диагностики по определению серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* достаточно сложны, трудоемки, длительны и требуют проведения манипуляций с лабораторными животными.

Наиболее современным методом, позволяющим идентифицировать микроорганизмы за сравнительно короткий промежуток времени, считается ПЦР (полимеразная цепная реакция). Относительная простота

исполнения сделала метод ПЦР незаменимым для решения различных задач клинической диагностики, таких как прямое обнаружение и идентификация возбудителей заболеваний, молекулярное типирование и исследование свойств патогенных микроорганизмов. Определение серовариантов возбудителя пастереллеза животных является обоснованием для использования вакцин, включающих конкретный серовариант *Pasteurella multocida* [1, 6, 7, 8].

Цель работы – конструирование тест-системы «Multiplex ПЦР *Pasteurella Multocida* (A, B, D)», выявляющей *Pasteurella multocida* и ее серовариантную принадлежность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры музейных штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», перечень которых представлен в таблице 1.

Название штамма	Идентификационный номер
<i>Pasteurella multocida</i> серовариант А	КМИЕВ-67
<i>Pasteurella multocida</i> серовариант В	КМИЕВ-68
<i>Pasteurella multocida</i> серовариант D	КМИЕВ-69
<i>Mannheimia haemolytica</i>	КМИЕВ-B200
<i>Salmonella choleraesuis</i>	КМИЕВ-B126
<i>Salmonella typhimurium</i>	КМИЕВ-B130
<i>Salmonella dublin</i>	КМИЕВ-B124
<i>Escherichia coli</i>	КМИЕВ-B38
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	КМИЕВ-B141
<i>Haemophilus parasuis</i>	КМИЕВ-B171
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	КМИЕВ-B120
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	КМИЕВ-B129
<i>Proteus mirabilis</i>	КМИЕВ-B44

Штаммы культивировали на сердечно-мозговом агаре в чашках Петри в термостате при температуре 37 °С.

Выделение ДНК проводили колоночным методом набором «ДНК-ВК» фирмы ИБОХ (г. Минск). Концентрацию ДНК измеряли прибором «Nanodrop».

Для конструирования тест-системы на основании проведенного ранее анализа нуклеотидных последовательностей в международных базах данных ДНК подобраны праймеры, позволяющие идентифицировать видовую принадлежность *Pasteurella multocida*, на основе обнаружения гена, кодирующего синтез 23S rRNA, и

праймеры, кодирующие участки генов, отвечающие за факторы патогенности серовариантов – CAP(A)fwd/rev 1044 bp, CAP(D) fwd/rev 657 bp, CAP(B)fwd/rev 760 bp.

При отработке вариантов постановки ПЦР, использовались реактивы фирмы Праймтех (г. Минск) и Fermentas (Литва). Синтез праймеров осуществляли в фирме Праймтех (г. Минск).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно литературным данным выделяют ряд генов, кодирующих факторы патогенности пастерелл.

Таблица 2. – Характеристика праймеров и определяемых ими генов, кодирующих факторы патогенности *Pasteurella multocida*

Последовательность, 5'-3'	Назначение	Антиген кодирующие гены	Функция гена	Размер
CAP(A)fwd CAP(A)rev	GenBank: AF067175.2 (серовариант А)	phyB hyaD hyaE hyaC	- гликозилтрансфераза HyaВ/HyaА гибридный белок - гликозилтрансфераза - протеин hyaЕ, гомологичен белку KfiВ, участвующему в биосинтезе капсульных полисахаридов - UDP-глюкоза дегидрогеназа	1044 bp
CAP(B)fwd CAP(B)rev	GenBank: AF169324.1 (серовариант В)	bcbA bcbB bcbC bcbD bcbE bcbF bcbG bcbH bcbI lipA lipB	- UDP-N-ацетил-D-глюкозамина 2-эпимераза (синтезе капсулы), предшественник UDP-ManNAcA. - UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase (биосинтезе антигена) - putative glycosyltransferase участвует в липо-и экзополисахаридном биосинтезе поверхности бактериальной клетки - функция неизвестна (протеин) - функция неизвестна (протеин) - функция неизвестна (протеин) - функция неизвестна (протеин) - функция неизвестна (протеин) - функция неизвестна (протеин) - подобные на <i>Neisseria meningitidis</i> LipA - подобные на <i>Neisseria meningitidis</i> LipB	760 bp
CAP(D)fwd CAP(D)rev	GenBank: AF302465.1 (серовариант D)	dcbE dcbF dcbC dcbB	- протеин dcbE - гликозилтрансфераза DcbF - UDP-глюкоза дегидрогеназа DcbC - гликозилтрансфераза DcbB	657 bp

Из таблицы 2 видно, что в настоящее время уже известны и расшифрованы некоторые гены серовариантов пастерелл. Однако функция генов, кодирующих синтез поверхностных, капсульных антигенов, установлена лишь у нескольких из них.

Так, ген phyB у *Pasteurella multocida* серовариант А кодирует синтез фермента клеточной стенки (гликозилтрансфераза HyaВ/HyaА) и по своей природе является гибридным белком, состоящим из двух частей HyaВ и HyaА, что позволяет изменять антигенную структуру бактерии.

Ген bcbC у *Pasteurella multocida* серовариант В участвует в синтезе переносчика, гликозилтрансферазы, благодаря которой происходит липо- и экзополисахаридный биосинтез поверхности бактериальной клетки.

Ген dcb F у *Pasteurella multocida* серовариант D кодирует синтез гликозиламинотрансферазы.

Участки ДНК вышеописанных генов *Pasteurella multocida* использовались для создания специфических праймеров.

Оптимальный объем реакционной смеси рассчитывали на 50 и 25 мкл.

Было определено, что оптимальным является использование реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2,5 мкл 10хПЦР-буфер, 3мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 5 пмоль/мкл каждого праймера, 2Ед Tag ДНК-полимеразы. В реакционную смесь добавляли 1–3 мкл выделенной ДНК.

Температуру отжига праймеров определяли исходя из температуры их плавления, в связи с этим оптимальными параметрами амплификации были следующие:

1. 95 °C – 5 мин
 2. 95 °C – 60 с
 3. 55 °C – 60 с
 4. 72 °C – 60 с
 5. 72 °C – 7 мин.
- } 30 циклов

На первом этапе мы изучили специфичность подобранных нами и синтезированных в ОДО Праймтех (г. Минск) общевидовых праймеров (23S rRNA) (рисунок 1).

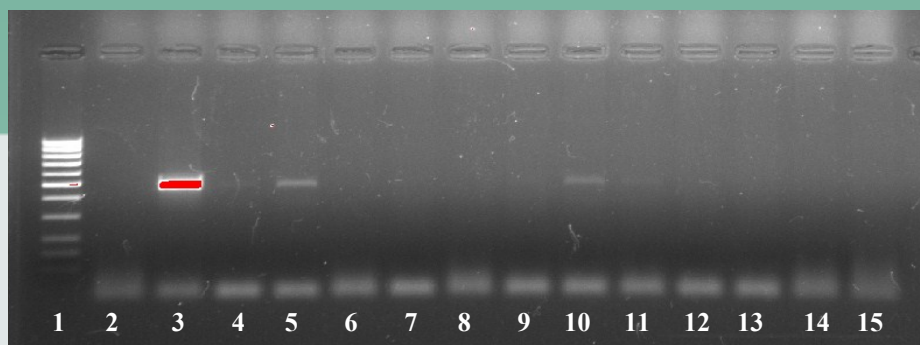


Рисунок 1. – Специфичность общих праймеров (23S rRNA) *Pasteurella multocida*, слева направо: 1 – маркер молекулярного веса (100 bp); 2 – отрицательный контрольный образец; 3 – *Pasteurella multocida* B; 4 – *Salmonella dublin*; 5 – *Pasteurella multocida* D; 6 – *Salmonella typhimurium*; 7 – *E. coli*; 8 – *Salmonella choleraesuis*; 9 – *Pseudomonas aeruginosa*; 10 – *Pasteurella multocida* A; 11 – *Mannheimia haemolytica*; 12 – *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 13 – *Proteus mirabilis*; 14 – *Bordetella bronchiseptica*; 15 – *Haemophilus parasuis*

Как видно на рисунке 1, праймеры (23S rRNA) в ПЦР выявляли только штаммы *Pasteurella multocida* (№ 3, 5, 10, 11).

Вторым этапом было определение серовариантной специфичности праймеров и наличия перекрестных ложноположительных результатов. Исследования проводились на музейных штаммах *Pasteurella multocida* КМИЭВ 67; КМИЭВ 68; КМИЭВ 69.

Для этого нами была приготовлена

смесь, состоящая из суточной культуры 3-х серовариантов *Pasteurella multocida* в соотношении 1:1:1 (*Pasteurella multocida* серовариант А в концентрации 10,8 нг/мкл, *Pasteurella multocida* серовариант В в концентрации 8,3 нг/мкл и *Pasteurella multocida* серовариант Д в концентрации 9,75 нг/мкл).

Полученные результаты представлены на рисунках 2–5.

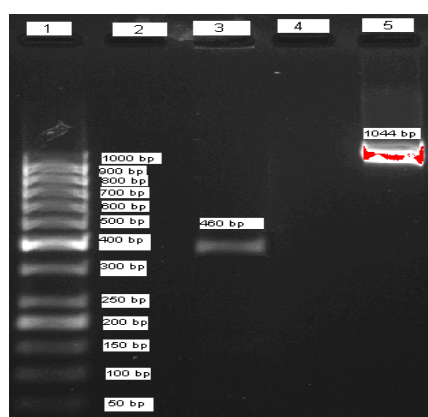


Рисунок 2. – Идентификация *Pasteurella multocida* КМИЭВ 67 с праймерами 23S rRNA и CAP(A)fwd/rev: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – К-; 3 – праймер 23S rRNA; 4 – К-; 5 – ДНК Р.м. КМИЭВ 67

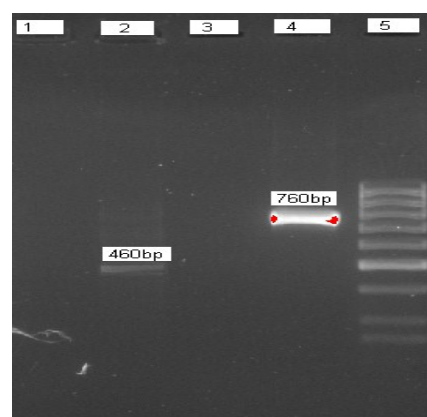


Рисунок 3. – Идентификация *Pasteurella multocida* КМИЭВ 68 с праймерами 23S rRNA и CAP(B)fwd/rev: 1 – К-; 2 – праймер 23S rRNA; 3 – К-; 4 – ДНК Р.м. КМИЭВ 68; 5 – маркер молекулярного веса

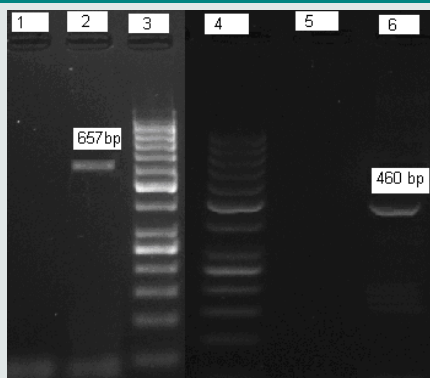


Рисунок 4. – Идентификация *Pasteurella multocida* КМИЭВ 69 с праймерами 23S rRNA и CAP(D)fwd/rev: 1 – К-; 2 – ДНК Р.м. КМИЭВ 67; 3–4 – маркер молекулярного веса; 5 – К-; 6 – праймер 23S rRNA

Как видно из рисунков 2–5, подобранные праймеры (CAP(A)fwd/rev; CAP(D)fwd/rev; CAP(B)fwd/rev) позволяют определять серовариантную принадлежность *Pasteurella multocida* и не имеют перекрестных ложноположительных результатов.

На следующем этапе конструировали мультиплексную ПЦР-систему, позволяющую определять видовую и серовариантную принадлежность *Pasteurella*. Концен-

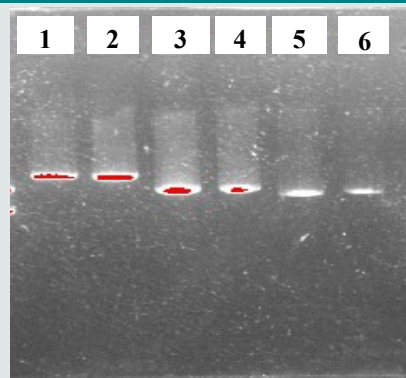


Рисунок 5. – Идентификация *Pasteurella multocida* КМИЭВ 67, 68, 69 с праймерами: 1–2 – CAP(A)fwd/rev; 3–4 – CAP(B)fwd/rev; 5–6 – CAP(D)fwd/rev

трация каждого праймера (CAP(A)fwd/rev; CAP(D)fwd/rev; CAP(B)fwd/rev; 23S rRNA) в реакционной смеси не превышала 5 пмоль/мкл.

Специфичность мультиплекс ПЦР-системы тестировали, используя смесь серовариантов *Pasteurella multocida* в описанных выше концентрациях и музейные штаммы *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*.



Рисунок 6. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации сконструированной мультиплекс ПЦР-системы: 1 – смесь суточной культуры трех серовариантов *Pasteurella multocida* в соотношении 1:1:1; 2 – маркер молекулярного веса 50 bp; 3 – отрицательный контрольный образец; 4 – *Mannheimia haemolytica*; 5 – *Salmonella choleraesuis*; 6 – *Salmonella typhimurium*; 7 – *Salmonella dublin*; 8 – *Escherichia coli*; 9 – *Actinobacillus pleuropneumoniae*; 10 – *Haemophilus parasuis*; 11 – *Bordetella bronchiseptica*; 12 – *Pseudomonas aeruginosa*; 13 – *Proteus mirabilis*

Апробацию мультиплекс тест-системы для определения ДНК *Pasteurella multocida* и их серовариантной принадлеж-

ти проводили на 9 штаммах *Pasteurella multocida* РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

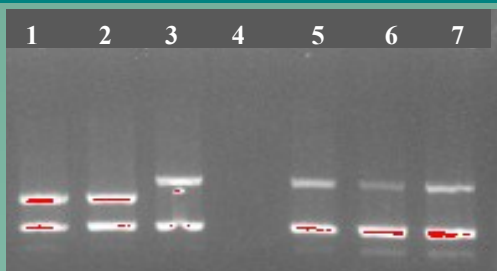


Рисунок 7. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации сконструированной мультиплекс ПЦР-системы:
1–2 – *Pasteurella multocida* B;
3, 5, 6, 7 – *Pasteurella multocida* A;
4 – отрицательный контрольный образец

Установлено, что из 9 исследованных штаммов *Pasteurella multocida* положительную реакцию с общими праймерами 23S rRNA дали 9 штаммов, с праймерами CAP(A)fwd/rev – 5 штаммов, с праймерами CAP(B)fwd/rev – 3 штамма, с праймерами CAP(D)fwd/rev – 1 штамм.

ВЫВОДЫ

Разработанная тест-система «Multiplex ПЦР *Pasteurella Multocida* (A, B, D)» на основе выявления генетических факторов патогенности с праймерами 23S rRNA, CAP (A)fwd/rev; CAP(D)fwd/rev; CAP(B)fwd/rev; CAP(F)fwd/rev; CAP(E)fwd/rev позволяет проводить типизацию видовой и серовари-

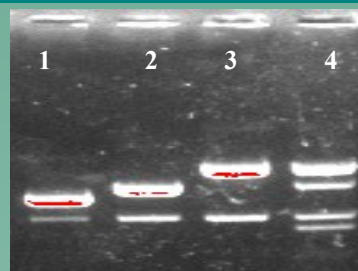


Рисунок 8. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации сконструированной мультиплекс ПЦР-системы: 1 – *Pasteurella multocida* D;
 2 – *Pasteurella multocida* B;
 3 – *Pasteurella multocida* A;
 4 – положительный мультиплекс контроль

антной принадлежности микроорганизмов, относящихся к *Pasteurella multocida*, обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет сократить сроки диагностики пастереллеза с 10 дней (бактериологический метод) до 1 дня.

На тест-систему для обнаружения и определения серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* (A, B, D) в полимеразной цепной реакции «Multiplex ПЦР *Pasteurella Multocida* (A, B, D)» разработаны технические условия ТУ ВУ 600049853.148-2015 и внесены в реестр государственной регистрации Государственного комитета по стандартизации Республики Беларусь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генотипирование штаммов серовариантов *Pasteurella multocida* методом полимеразной цепной реакции / А.П. Лемини [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2011. – № 3. – С. 14–19.
2. Андрусевич, А.С. Пастереллез пушных зверей (этиологическая структура и специфическая профилактика): дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / А.С. Андрусевич. – Минск, 2008. – 154 с.
3. Ставцева, Л.Я. Серологические методы для выявления капсульных антигенов пастерелл / Л.Я. Ставцева, Т.Е. Попова // Науч. основы пр-ва вет. биол. препаратов / ВНИИ защиты животных. – Щелково, 2000. – С. 255–257.
4. Blackall, P.J. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review / P.J. Blackall, J.K. Mifflin // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29. – P. 271–287.
5. Dabo, S.M. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease / S.M. Dabo, J.D. Taylor, A.W. Confer // Animal Health Research Reviews. – 2008. – V. 8(2). – P. 129–150.
6. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70 / B.J. May [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 3460–3465.
7. Чувствительность и специфичность multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* A, B, D для выявления серовариантов пастерелл / Е.Л. Красникова [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2018. – № 2. – С. 53–58.
8. Использование Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* A, B, D для выявления гетерогенности пастерелл в хозяйствах Республики Беларусь / Е.Л. Красникова [и др.] // Интеграция науки и практики для развития Агропромышленного комплекса: материалы всероссийской науч. конф. / ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, Тюмень, 10 ноября 2017. – С. 247–252.