

**ДИАГНОСТИКА ПАСТЕРЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ВОЗМОЖНОСТЬЮ ШТАММОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ СЕРОТИПОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ****Красочко П.П., Гвоздев С.Н., Корочкин Р.Б., Красочко В.П.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

В последние годы производство свинины увеличилось благодаря увеличению размеров стада. Выращивание животных в скученных условиях способствовало росту заболеваемости респираторными заболеваниями. Переполненность и/или неправильная вентиляция могут привести к перегреву или охлаждению, повышенному стрессу и повышению уровня аммиака и пыли – все это негативно сказывается на защите органов респираторного тракта, что способствует распространению болезней, и, в частности, пастереллеза свиней. Своевременная диагностика патогенных микроорганизмов позволит ветеринарным специалистам хозяйства в более короткие сроки приступить к лечению больных животных и провести профилактические мероприятия по предотвращению заболевания здоровых животных. В настоящей статье авторы предлагают использовать молекулярно-генетический метод для диагностики пастереллеза свиней. **Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, праймеры, ДНК, РНК, сероварианты, *Pasteurella multocida*, амплификация.

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DIAGNOSING PORCINE PASTEURELLOSIS AND EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF STRAIN DIFFERENTIATION OF PATHOGEN SEROTYPES BY MOLECULAR GENETIC METHODS****Krasochko P.P., Hvozdeu S.N., Korochkin R.B., Krasochko V. P.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

In recent years, pork production has increased due to an increase in the size of the herd. Raising animals in crowded conditions contributed to the increase in the incidence of respiratory diseases. Overcrowding and/or improper ventilation can lead to overheating or cooling, increased stress and increased levels of ammonia and dust - all this negatively affects the protection of the respiratory tract, which contributes to the spread of diseases, and in particular pigs. Timely diagnosis of pathogenic microorganisms will allow the veterinary specialist of the farm to start treating sick animals in a shorter time and carry out preventive measures to prevent the disease of healthy animals. In this article, the authors suggest using a molecular genetic method for the diagnosis of porcine pasteurellosis. **Keywords:** polymerase chain reaction, primers, DNA, RNA, serovariants, *Pasteurella multocida*, amplification.

**Введение.** Известно, что респираторные заболевания являются основной причиной смертности у свиней. Как и в случае с респираторными заболеваниями у людей, респираторные заболевания у свиней часто являются результатом сочетания первичных и условно-патогенных инфекционных агентов. Кроме того, неблагоприятные экологические факторы и условия ведения свиноводства играют важную роль в многофакторной природе респираторных заболеваний у свиней.

Некоторые из бактериальных агентов могут действовать как первичные, так и условно-патогенные захватчики в зависимости от ситуации. Хотя первичные респираторные инфекционные агенты могут вызывать серьезные заболевания сами по себе, но чаще всего неосложненные инфекции, вызванные этими агентами, являются легкими и проходящими самостоятельно. Именно тогда, когда эти первичные инфекции осложняются условно-патогенными бактериями, возникают более серьезные и хронические респираторные заболевания и наносится наибольший экономический ущерб.

Рядом авторов [1, 2] считается, что наиболее распространенным условно-патогенным агентом является *Pasteurella multocida*. Экспериментально трудно заразить свиней чистыми культурами *P. multocida*, хотя исследования показывают, что возбудитель обычно переносится в миндалинах свиней, в результате чего пастереллезная инфекция считается оппортунистической. Однако другие авторы [3] рассматривают данный микроорганизм как первичный респираторный агент. В последнее время поступают сообщения [2] об увеличении числа случаев тяжелой бронхопневмонии, часто с плевритом, ассоциированной с единичной инфекцией *P. multocida* типа А или типа D; поэтому некоторые изоляты могут быть более вирулентными и, возможно, должны рассматриваться как первичные патогены.

*P. multocida* представляет собой граммотрицательную бактерию, которая является причиной атрофического ринита и пневмонии у свиней. Существует 5 капсульных серотипов *P. multocida*, но у свиней обычно встречаются только А и D. Серотип А чаще всего выделяют из легких, а серотип D — в случае атрофического ринита, но оба из них связаны с обоими заболеваниями [1, 2]. Дермонекротический токсин (токсин пастереллы) является основным фактором вирулентности, ответственным за развитие атрофии носовых раковин, наблюдаемой при атрофическом рините. Считается, что *B. bronchiseptica* предрасполагает к этому состоянию [1]. Роль токсина в легочных поражениях менее выражена. Многие изоляты из легочных поражений не являются токсигенными, но некоторые исследу-

дования показали, что токсигенные штаммы могут быть более вирулентными [2, 4]. Капсула, особенно для капсулярного типа А, может быть важным фактором вирулентности для уклонения от фагоцитоза [5].

Современная классификация штаммов *P. multocida* сочетает капсульное серогрупповое типирование по Картеру с соматическим серологическим типом по Хеддлстону. Таким образом, каждому штамму дано определенное обозначение, в котором первая буква обозначает капсульную серогруппу, а цифра обозначает серотип липополисахаридного антигена.

Диагноз на пастереллез ставят на основании комплекса эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов бактериологического исследования патологического материала с обязательным определением патогенности выделенной культуры на лабораторных животных. В связи с тем, что срок лабораторного исследования на пастереллез составляет до 10 суток, это существенно замедляет диагностику, что, в свою очередь, приводит к экономическим потерям вследствие заболевания большего количества животных как результат несвоевременного проведения мероприятий по лечению и профилактике. Использование молекулярно-генетического метода диагностики пастереллеза свиней позволит значительно ускорить постановку диагноза.

**Материалы и методы исследований.** Исследования по разработке метода диагностики пастереллеза свиней и оценке возможности штаммовой дифференциации серотипов возбудителя молекулярно-генетическими методами проводились в условиях отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ.

Анализ генома и подбор праймеров к консервативным участкам генома *Pasteurella multocida* проводился с использованием банка нуклеотидных последовательностей GenBank Национального центра биотехнологической информации, США.

Выравнивание последовательностей проводили, используя программное обеспечение AlleleID, а подбор праймеров – с помощью SnapGene.

Оценка специфичности праймеров и зондов проводили с использованием ДНК пастерелл, полученных ранее из патологического материала от павших свиней с диагнозом пастереллез, подтвержденным общепринятыми лабораторными исследованиями.

Выделение ДНК/РНК проводили с помощью набора «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» или «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) в соответствии с инструкциями к наборам.

Постановку ПЦР проводили общепринятыми методами, используя реактивы производства ООО «АртБиоТех», РБ.

**Результаты исследований.** В результате анализа литературных данных нами сделан вывод о том, что изоляты *P. multocida*, выделяемые от животных, в антигенном отношении являются достаточно неоднородными. Методом серологической типизации установлено как минимум 16 О-групп (соматических) и 5 капсульных серогрупп. Так, липополисахарид *P. multocida* используется для более детальной серологической идентификации штаммов с использованием двух отличающихся систем типирования по этому соматическому антигену. Система Шигео Намиоки основана на пробирочной реакции агглютинации и способна распознавать 11 серотипов микроорганизма, в то время как система К. Хеддлстона использует тест диффузионной преципитации в геле и способна идентифицировать чуть большее количество серологических типов (16 серотипов). Следует отметить, что система Хеддлстона в настоящее время является предпочтительным методом серотипизации пастерелл. В совокупности система Картера-Хеддлстона (серогруппо-серотипоспецифическая) регулярно использовалась в течение последних 50 лет.

Соматические липополисахаридные антигены, в общем количестве 16 разновидностей, обладают слабыми антигенными свойствами, а выработанные против них антитела не обладают протективными свойствами. В связи с этим на современном этапе типирование пастерелл проводят по капсульным антигенам на следующие сероварианты: А, В, D, Е и F. Данные антигены встречаются у пастерелл, выделенных от разных видов животных. От свиней с признаками поражения респираторного тракта и атрофического ринита выделяют пастереллы серогрупп А и D.

По литературным данным установлено, что для пастерелл всех серотипов видоспецифическим геном является ген *kmt1*, кодирующий белок клеточной стенки. Используя последовательности KX449352.1, DQ233649.1, DQ233648.1, MK802880.1, AY225347.1, AY225346.1, KP212391.1, KP212389.1, KP212387.1, FJ986389.1 и другие, были подобраны следующие праймеры (таблица 1).

**Таблица 1 – Праймеры к гену *kmt1* *Pasteurella multocida***

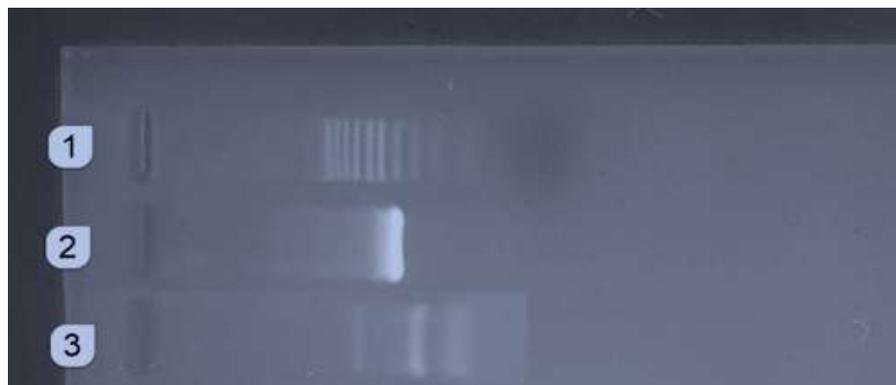
Наименование	Последовательность	Длина ампликона
KMT1-1F	5'-ATAAGAAACGTAACCTCAACATGGAAA-3'	208
KMT1-1R	5'-GAGTGGGCTTGTTCGGTAGTCT-3'	
KMT1-2F	5'-TCGACCCTGACTTATATGCCT-3'	258
KMT1-2R	5'-CACATGGGGTGTGGAGCTAA-3'	

При оценке специфичности праймеров была поставлена ПЦР с имеющимся штаммом пастереллы. Для этого использовали следующие параметры:

- реакционная смесь: 2,5 мкл 10X премикса «ArtMix», по 10 пмоль прямого и обратного праймера, деионизированная вода до 20 мкл;
- условия реакции: первоначальная денатурация 94°C – 2 мин., далее 40 циклов: денатурация 94°C - 30 сек., отжиг 60 °C (53 °C – для праймеров KMT1-1F и KMT1-1R) – 30 сек., элонгация 72 °C – 30 сек.; финальная элонгация 72 °C – 5 мин.

Электрофорез проводили по стандартной методике в 2% агарозном геле с напряжением 5 В/см.

Результаты электрофореза приведены на рисунке 1.

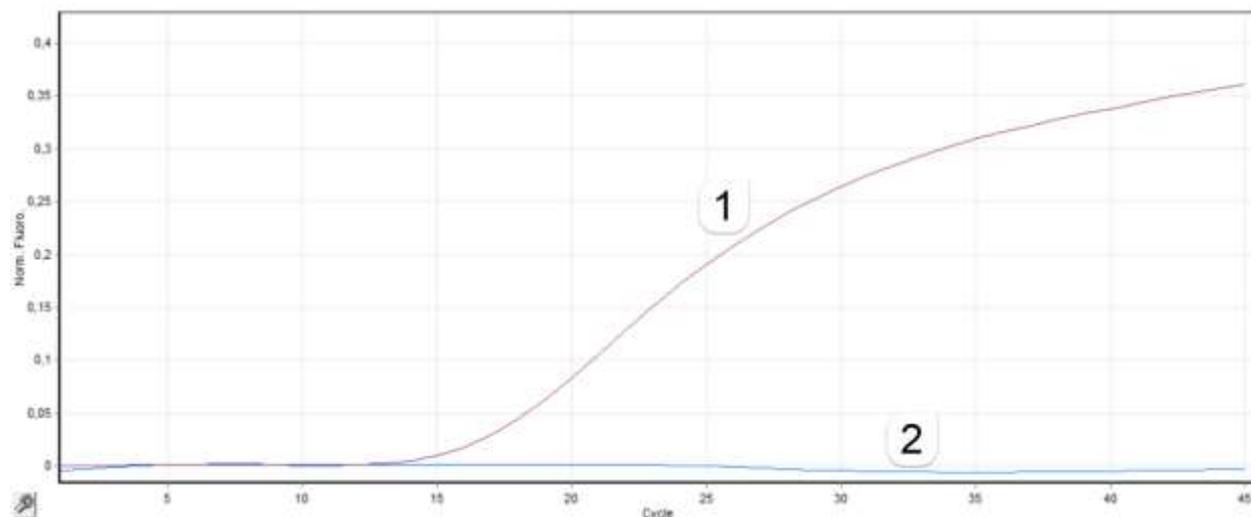


**Рисунок 1 – Электрофорез продуктов амплификации гена kmt1**

Примечание: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – праймеры KMT1-1F и KMT1-1R; 3 – праймеры KMT1-2F и KMT1-2R

Как видно из рисунка, специфичностью к искомому гену обладает первая пара праймеров (KMT1-1F и KMT1-1R), которая дает четкую полосу на уровне 208 п.н. К данной паре праймеров был подобран олигонуклеотидный зонд технологии Taqman PMT, имеющий следующую последовательность: 5(FAM)- ACCGGCAAATAACAATAAGCTGA-3(BHQ1). Проверку специфичности отжига проверяли постановкой ПЦР в режиме «реального времени». Зонд PMT вносили в количестве 10 пмоль на реакцию. Условия реакции и температурно-временные циклы оставались те же. Детекцию флуоресценции проводили после этапа элонгации.

Результат амплификации представлен на рисунке 2.



**Рисунок 2 – График амплификации ДНК *Pasteurella multocida***

Примечание: 1 – ДНК *Pasteurella multocida*; 2 – отрицательный контроль

График амплификации показывает специфичность полученного зонда PMT к гену kmt1.

Серотипизация пастерелл проводится с помощью специфических сывороток к капсульным антигенам. Однако данные антигены детерминированы генетически, в связи с чем имеется возможность их выявления с помощью ПЦР. Перечень генов и их функциональное назначение приведены в таблице 2.

**Таблица 2 – Гены, отвечающие за капсульные антигены *Pasteurella multocida***

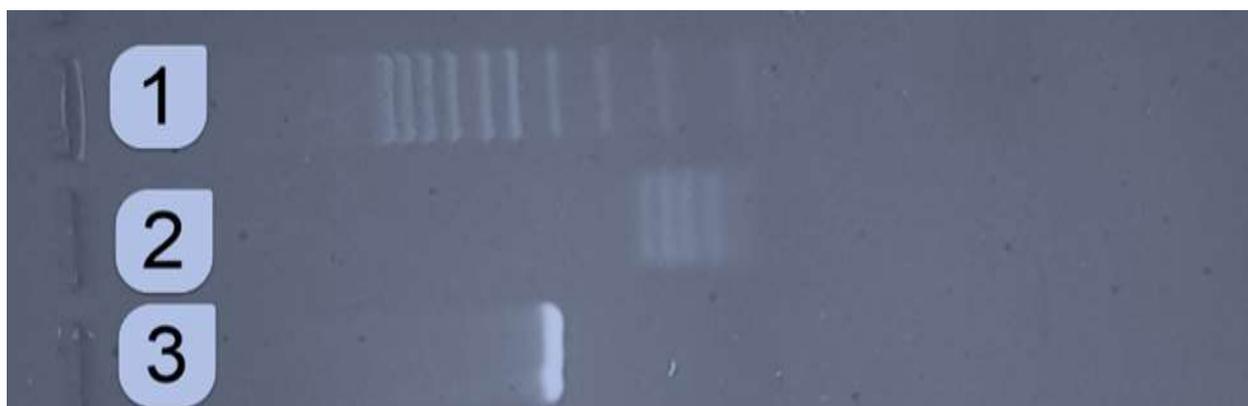
Серотип	Наименование гена	Функциональное назначение
A	hyad	Синтез гиалуроновой кислоты
B	bcbd	Синтез гликозилтрансферазы
D	dcbf	Синтез гликозид гепарана
E	ecbj	Синтез гликозилтрансферазы
F	fcbd	Синтез хондроитин эстеразы

Используя вышеприведенные последовательности, а также последовательности AY225345.1, JF922885.1, KP036621.1, MN392194.1, JF922885.1 для гена hyad и последовательности CP003313.1, AF302465.1 для гена dcbf, были подобраны последовательности праймеров, отраженные в таблице 3.

**Таблица 3 – Праймеры к генам hyad и dcbf *Pasteurella multocida***

Наименование	Последовательность	Длина ампликона
PMA-1F	5-AGAAAAGAAAACCGCCATGT-3	262
PMA-1R	5-AAACCAACATAGCCAGCCCC-3	
PMA-2F	5-CGTTAAAAATGACAGCTATGC-3	219
PMA-2R	5-AATCGTCAGAAGCTCATGCG-3	
PMD-1F	5-CGCATCCAGAATAGCAAACCTC-3	351
PMD-1R	5-CGATGCTTTGGTTGTGC-3	
PMD-2F	5-ACTGCACAACCAAAGCATCG-3	317
PMD-2R	5-AGGGTTGCTGAGCTTACTCAT-3	

Специфичность праймеров к гену hyad проверяли с помощью обычной ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Результаты приведены на рисунке 3.

**Рисунок 3 – Электрофорез продуктов амплификации гена hyad**

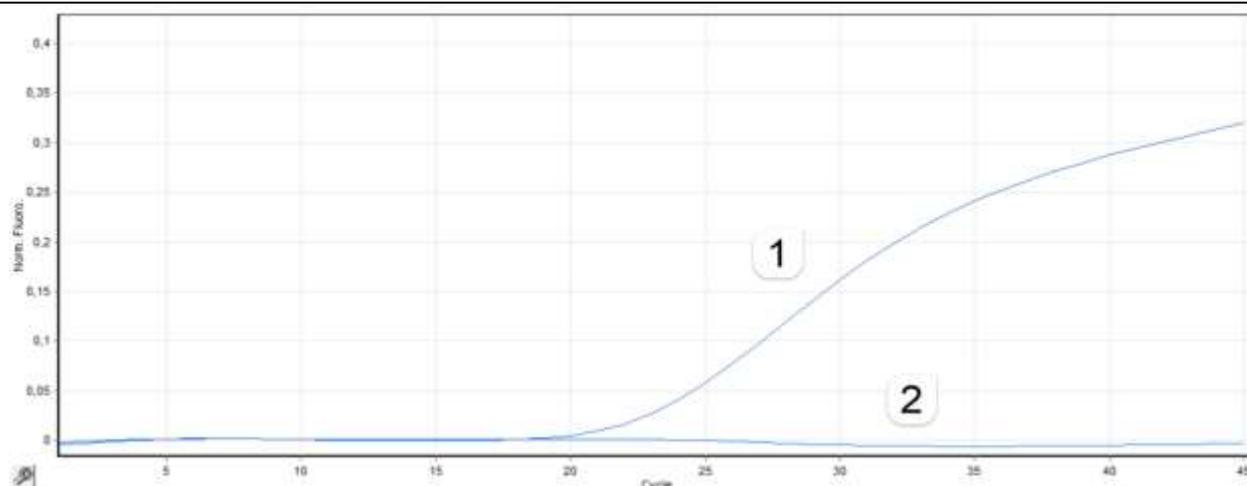
Примечание: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – праймеры PMA-1F и PMA-1R; 3 – праймеры PMA 2F и PMA-2R

Как видно из рисунка 3, специфичностью обладают праймеры PMA-2F и PMA-2R, формируя четкую полосу на уровне 219 п.н. Пара праймеров PMA-1F и PMA-1R формируют ряд нечетких полос в диапазоне 50-150 п.н.

К данной паре праймеров (PMA-2F и PMA-2R) был подобран олигонуклеотидный зонд технологии Taqman PMAz, имеющий следующую последовательность: 5(R6G)-ATTTCTCAGCATTAACACATGATTGGAT-3(BHQ 1).

Проверку специфичности отжига проверяли постановкой ПЦР в режиме «реального времени». Зонд PMA вносили в количестве 10 пмоль на реакцию. Условия реакции и температурно-временные циклы оставались те же. Детекцию флуоресценции проводили после этапа элонгации.

Результат амплификации представлен на рисунке 4.



**Рисунок 4 – График амплификации ДНК *Pasteurella multocida***  
 Примечание: 1 – ДНК *Pasteurella multocida hyad*; 2 – отрицательный контроль.

График амплификации показывает специфичность полученного зонда PMAz к гену *hyad*. Специфичность праймеров к гену *dcbf*, кодирующему капсульный антиген серотипа D, не представляется возможным проверить ввиду отсутствия соответствующего штамма *Pasteurella multocida*.

**Заключение.** По результатам проведенных исследований нами сделаны следующие выводы:

1. Полевые изоляты микроорганизма *Pasteurella multocida* отличаются высокой фенотипической изменчивостью, в частности, по антигенным свойствам, однако на геномном уровне характеризуются наличием видоспецифического гена *kmt1*, кодирующего белок клеточной стенки.

2. В результате собственных исследований нами были подобраны праймеры и зонды к специфическим участкам ДНК *Pasteurella multocida*, которые являются высоко видо- и серотипоспецифическими по результатам постановки ПЦР.

3. На основании факта генетической детерминации серотиповой специфичности штаммов пастерелл были подобраны и экспериментально подтверждены видоспецифические праймеры и зонды, позволяющие идентифицировать пастереллы серотипа A.

**Литература.** 1. Effects of atrophic rhinitis and climatic environment on the performance of pigs / P. M. Van Diemen, J. W. Schrama, W. Van Der Hel [et al.] // *Livestock Production Science*. – 1995. – Vol. 43. – No 3. – P. 275-284. 2. Kielstein, P. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella multocida* strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle / P. Kielstein // *J. Vet. Med. Ser. B*. – 1986. - № 33. – P. 418–424. 3. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance / P. Kielstein, H. H. Wuthe, O. Angen [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2001. – Vol. 81. – № 3. – P. 243-255. 4. Ross, R. F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia / R. F. Ross // *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. – 2006. – Vol. 7. – № 1/2. – P. 13-29. 5. Rubies, X. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid / X. Rubies, J. Casal, C. Pijoan // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – Vol. 84. – № 1-2. – P. 69-78.

Поступила в редакцию 12.07.2022.

УДК 57.573.636.5/6:637.5

#### МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА СЕЛЬСКОХЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АДСОРБЕНТОМ НА ОСНОВЕ ЛИГНИНА

Красочко П.П., Мехова О.С., Капитонова Е.А., Павловец Е.С.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
 г. Витебск, Республика Беларусь

Авторами статьи проведен анализ содержимого желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров, которым с комбикормом вводился органический сорбент на основе лигнина. Высокий уровень численности молочнокислых бактерий способствовал развитию устойчивости птицы к экспериментальной инфекции, а также подавлению роста энтерококков и энтеробактерий. Установлено, что в возникновении воспалительных процессов пищеварительного тракта (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*). На основании проведенных исследований было установлено положительное влияние на изучаемые виды микроорганизмов. Добавка адсорбента микотоксинов на основе лигнина «Синерджи Сорб Детокс-мико (Synergy Sorb® Detox-мико)», рекомендуется для применения комбикормах для цыплят-бройлеров из расчета 4 кг/т. **Ключевые слова:** адсорбенты, лигнин, микробиота, лактобактерии, бифидобактерии, энтерококки, энтеробактерии.