

3. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Moscow region in 2021: State report. M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. - 2022. -159 p.

4. Shishkina M.S., Lobova T.P., Mikhailova V.V., Skvortsova A.N., Varentsova A.A. Analysis of the results of epizootic monitoring of rabies in the Russian Federation in 2020. Agricultural Science. – 2021. - № 7-8.- P. 52-58. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-351-7-8-52-58>

5. Paroshin A.V., Astrakhantsev V.A., Metlin A.E. and other Epizootological features of the manifestation of rabies in animals on the territory of the Moscow region // Veterinarnyvrach. - 2017. - № 4. - P.11-15.

6. Anisina O.V., Romanenko M.N., Barsukov Yu.I. and other Prevention and diagnosis of rabies in dogs // Veterinary and feeding. - 2014. - № 6. - P. 32-33

7. A comprehensive plan for antiepisosocous and anti-epidemic measures for the prevention of diseases by rabies of people and animals for 2017-2020. Approved. 12/30/2016.

УДК 620.3:619

DOI

УДК 619:98

DOI [10.47804/9785899040313_2022_139](https://doi.org/10.47804/9785899040313_2022_139)

РАЗРАБОТКА КОМПОНЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ СЕРОТИПОВ ПАСТЕРЕЛЛ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Красочко П.А., Красочко П.П., Гвоздев С.Н., Корочкин Р.Б.

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

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC COMPONENTS FOR DIFFERENTIATION OF PASTEURELLA SEROTYPES BY MOLECULAR GENETIC METHOD

Krasochko P.A., Krasochko P.P., Gvozdev S.N., Korochkin R.B.

Ключевые слова: ПЦР, праймеры, сероварианты, *Pasteurella multocida*, амплификация.

Key words: PCR, primers, serovariants, *Pasteurella multocida*, amplification.

Резюме. Своевременная диагностика пастереллеза свиней позволяет ветеринарным специалистам хозяйства в более короткие сроки приступить к лечению больных животных и провести профилактические мероприятия по предотвращению распространения заболевания среди здоровых животных. Современная диагностика основана на конвенциональных бактериологических методах, имеющие свои недостатки. В настоящей статье

авторы предлагают использовать молекулярно-генетический метод для диагностики пастереллеза свиней.

Summary. Timely diagnosis of porcine pasteurellosis allows veterinary specialists to start treating sick animals in a shorter time and take preventive measures to curb the spread of the disease among healthy animals. Modern diagnostics is based on conventional bacteriological methods, which have their drawbacks. In this article, the authors propose using molecular genetic method for the diagnosis of porcine pasteurellosis.

Введение. Респираторные заболевания являются основной причиной смертности у свиней. Рядом авторов [1, 2] считается, что наиболее распространенным условно-патогенным агентом является *Pasteurella multocida*. Исследования однозначно показывают, что возбудитель колонизирует миндалины у свиней, в результате чего пастереллезная инфекция считается оппортунистической. Другие авторы [3] рассматривают данный микроорганизм как первичный респираторный агент. Существует 5 капсулных 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 одной инфекцией [1, 2, 4]. Капсула, особенно для капсуларного типа А, может быть важным фактором вирулентности для уклонения от фагоцитоза [5]. Диагноз на пастереллез ставят комплексно, в основе которого лежит бактериологический метод. В связи с тем, что срок лабораторного исследования на пастереллез составляет до 10 суток, это существенно замедляет диагностику и приводит к экономическим потерям вследствие заболевания большого количества животных. Использование молекулярно-генетического метода диагностики пастереллеза свиней позволит значительно ускорить постановку диагноза.

Материалы и методы. Исследования по разработке метода диагностики пастереллеза свиней и оценке возможности 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.

Результаты исследований. В результате анализа литературных данных, нами сделан вывод о том, что изоляты *Pasteurellamultocida*, выделяемые от животных, в антигенном отношении являются достаточно неоднородными. 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 (см.табл. 1):

Таблица 1 – Праймеры к гену *kmt1* *Pasteurellamultocida*

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

При оценке специфичности праймеров была поставлена ПЦР с имеющимся штаммом пастереллы, в результате чего было установлено, что 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 ТаутанРМТ, имеющий следующую последовательность: 5(FAM)-ACCGGCAAATAACAATAAGCTGA-3(BHQ1).

Проверку специфичности отжига проверяли постановкой ПЦР в режиме «реального времени». Результат амплификации позволил выстроить график амплификации, который показал специфичность полученного зонда РМТ к гену *kmt1*.

В диагностике серотипизация пастерелл особенно важна, и в рутинной практике она проводится с помощью специфических сывороток к капсульным антигенам. В связи с тем, что данные антигены детерминированы генетически, возникает возможность их выявления с помощью ПЦР. Для этого мы провели анализ перечня генов пастерелл и их функционального назначения. Среди них были выбраны два гена. Используя ряд (таблица 2) геномных последовательностей для гена *hyad*, специфичного серотипу А, и последовательностей для гена *dcbf*, специфичному серотипу D, в последующем были подобраны необходимые варианты праймеров.

Таблица 2 – Праймеры к генам *hyad* и *dcbf* *Pasteurellamultocida*

Наименование	Последовательность	Длина ампликона
PMA-1F	5-AGAAAAGAAAACCGGCCATGT-3	262
PMA-1R	5-AAACCAACATAGCCAGCCCC-3	
PMA-2F	5-CGTTAAAAATGACAGCTATGC-3	219
PMA-2R	5-AATCGTCAGAAGCTCATGCG-3	
PMD-1F	5-CGCATCCAGAACATAGCAAACTC-3	351
PMD-1R	5-CGATGCTTGGTTGTGC-3	
PMD-2F	5-ACTGCACAAACCAAGCATCG-3	317
PMD-2R	5-AGGGTTGCTGAGCTTAACCAT-3	

Специфичность выбранных праймеров проверяли с помощью ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. В результате было обнаружено, что высокой специфичностью обладают 2 праймера (PMA-2F и PMA-2R), формирующие четкую полосу на уровне 219 п.н. Другая пара праймеров (PMA-1F и PMA-1R) формировала ряд нечетких полос в диапазоне 50–150 п.н.

К данной паре праймеров был подобран олигонуклеотидный зонд технологии TaqmanPMAz, имеющий следующую последовательность: 5(R6G)-ATTTCTCAGCATTAACACATGATTGGAT-3(BHQ 1). Проверку специфичности отжига проверяли постановкой ПЦР в режиме «реального времени». Построенный график амплификации доказал специфичность полученного зонда PMAz к гену *hyad*. Выбрать и проверить специфичность праймеров к гену *dcbf*, кодирующего капсулный антиген серотипа D, на данной этапе не представляется возможным ввиду отсутствия соответствующего штамма *Pasteurellamultocida*.

Заключение.

1. Полевые изоляты микроорганизма *P. 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 *P. 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 А.

3. Разработка компонентов диагностикума для генотипической идентификации пастерелл серотипа D на данный момент является перспективным направлением исследования, но требует дальнейшей детализации по причине текущего отсутствия полевого изолята.

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. – № 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. *J. Vet. Med. Ser. B.* 1986;33:418–424.
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. – No 1/2. – P. 13-29. – DOI 10.1017/S1466252307001211.
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.

УДК 619:615.37
 DOI 10.47804/9785899040313_2022_144

ИЗУЧЕНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ИЗ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПЕРЕВИВАЕМЫМИ КЛЕТКАМИ

¹Красочки И.А., ²Борисовец Д.С., ¹Красочки П.А.,
¹Волосюк Е.И., ²Зуйкевич Т.А.

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь

STUDY OF AMINO ACID CONSUMPTION FROM CULTURE MEDIA BY TRANSPLANTED CELLS

¹Krasochko I.A., ²Borisovets D.S., ¹Krasochko P.A.,
¹Volosyuk E.I., ²Zuykevich T.A.

Ключевые слова: культуры клеток, аминокислоты, метаболизм, потребление.

Key words: cell cultures, amino acids, metabolism, consumption.