

ресурсы] <https://www.aspergillus.org.uk/content/treatment-mycotic-rhinitis-itraconazole-three-horses> [Доступен 17.03.2020]

11. Latimer FG, Colitz CM, Campbell NB, et al. Pharmacokinetics of fluconazole following intravenous and oral administration and body fluid concentrations of fluconazole following repeated oral dosing in horses. [Электронный ресурс] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592327> [Доступен 17.03.2020]

12. Centers for Disease Control and Prevention: Sources of Aspergillosis [Электронный ресурс] <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/causes.html> [Доступен 17.03.2020]

13. van Nieuwstadt RA, Kalsbeek HC. Air sac mycosis: topical treatment using enilconazole administered via indwelling catheter [Электронный ресурс] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8291049> [Доступен 17.03.2020]

УДК: 619:579.833.1:577.212.3

DOI: 10.17238/issn2072-2419.2020.3.14

ИДЕНТИФИКАЦИЯ PASTEURELLA MULTOCIDA МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ.

Семина А.Н. – к.в.н., вед. науч. сотрудник.

«Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» - филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (ВНИВИП).

Ключевые слова: пт ица, паст ереллэз, ПЦР, праймеры, проба
Key words: poultry, pasteurellosis, PCR, primers, sample



РЕФЕРАТ

Пастереллез имея достаточно широкое распространение может являться причиной, сдерживающей успешное развитие птицеводства. Причины и условия возникновения данного заболевания в хозяйствах за частую носит не определенный характер. *Pasteurella multocida* может проявлять себя от крайне ослабленного при пастереллоносительстве до сильновирулентного возбудителя болезни. Переболевшая птица является скрытым носителем данного заболевания и в дальнейшем подлежит выбраковке. Все это в конечном итоге приводит к значительным экономическим потерям.

Быстрое и достоверное обнаружение данного возбудителя позволит снизить или совсем предотвратить экономические потери. Клиническое проявление заболевания в виде молниеносного течения вызывает затруднения его прижизненной диагностики.

Целью нашей работы явилась разработка уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей праймеров специфичных к возбудителю *P. multocida*. Предлагаемый метод обеспечит выявление *Pasteurella multocida* в течение 3-4 часов, а также быстрое и высокоспецифичное определение типа этой бактерии.

Проведя анализ генома *Pasteurella multocida* нами была выбрана область гена *ptfA* для конструирования олигонуклеотидов. Для проведения ПЦР была отобрана пара праймеров: Pm0567, Pm1321. Сиквенсы генов выравнивали, подбирая схожие у абсолютно всех исследованных изолятов *Pasteurella multocida*. Используя специальные компьютерные программы была оценена специфичность подобранных праймеров. В результате поиска в базе данных последовательностей выявлена 100% гомология выбранных праймеров лишь с гомологичными последовательностями в геноме *Pasteurella multocida*. Исследование проб, содержащих патологические агенты бактериальной природы методом ПЦР, подтвердило специфичность выбранных праймеров. Положительные ре-

зультаты были получены только с пробами, содержащими *Pasteurella multocida*. Таким образом, подобранные праймеры могут быть предложены для исследования проб разного состава для выявления генома *Pasteurella multocida*.

ВВЕДЕНИЕ

Геморегическая септицемия – острая системная болезнь, характеризующаяся высоким (до 100%) уровнем смертности заболевших животных и птиц. Эндемична во всех странах Азии (тип В) и Африки (типы В и Е). Бронхопневмонии и пневмонии, обусловленные *P. multocida* типа А, распространены по всему миру и считаются одной из экономически наиболее важных респираторных болезней птиц. К данному возбудителю восприимчивы все виды птиц в любом возрасте. *P. multocida* может вызывать заболевания как эпизодического характера, так и проявляться в виде опустошительных эпизоотии [1].

Геном *P. multocida* представлен примерно 104 генами, большинство из которых обуславливают факторы вирулентности бактерии. Данные гены осуществляют разнообразные функции: от возможности проникновения в макроорганизм до продукции ферментов вирулентности [2]. Наличие капсулы данного микроорганизма определяет его вирулентность. В настоящее время различают пять капсульных (А, В, D, Е, F) и шестнадцать соматических (1-16) серотипов этой бактерии. Характер заболевания определяется капсульным типом: серотип А является возбудителем холеры птиц; тип F был выделен от индеек [3].

Широкое распространение *P. multocida* и ее важная роль как этиологического агента болезней животных делают актуальной задачу быстрого и достоверного обнаружения этого возбудителя. На фоне все чаще встречающегося атипичного протекания заболевания становится актуальным вопрос о необходимости типовой дифференциации бактерии.

Традиционные бактериологические, серологические методы выявления и типизации пастерелл требуют большого количества времени, поскольку связаны с необходимостью выделения чистой культуры микроорганизма на питательных

средах. Иммуноферментный метод диагностики определять только белки-маркеры, что позволяет косвенно предположить об наличии инфекции. Молекулярно-генетические методы исследования позволяют обнаруживать непосредственно возбудителей заболеваний. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), является молекулярно-генетическим методом исследования, обладает рядом преимуществ поскольку сочетает в себе быстроту и простоту исполнения, а также потенциально высокую специфичность и чувствительность при выявлении патогенных микроорганизмов. Многочисленные исследования в этой области показали, что данный метод исследования обнаружения и типирования *Pasteurella multocida* может быть использован для оценки эпизоотологической ситуации по данному заболеванию в хозяйствах [4, 5].

Нами была определена задача разработать методологию подбора уникальных образцов олигонуклеотидных последовательностей праймеров с помощью которых можно проводить идентификацию *Pasteurella multocida* в исследуемом материале от птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в 2020 г. в отделе диагностики и эпизоотологического анализа Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства.

Основной задачей наших исследований являлся этап подтверждения специфичности выбранных нами праймеров. Для этой цели необходимо было выбрать положительный образец, который содержит в себе ДНК *Pasteurella multocida*. В качестве такого образца были использованы штаммы *Pasteurella multocida* 82, 64, полученные из коллекции отдела микробиологии ВНИВИП. Для получения чистой культуры *Pasteurella multocida* были использованы общепринятые методики, применяемые в бактериологии.

Таблица 1

Протокол амплификации

| Температура °С | Время, сек | Число циклов |
|----------------|------------|--------------|
| 95°С | 300 | 1 |
| 95°С | 30 | 35 |
| 55°С | 20 | |
| 72°С | 30 | |
| 72°С | 60 | 1 |
| 10°С | хранение | |

Выделение нуклеиновых кислот из штамма *Pasteurella multocida* проводили с помощью коммерческих наборов "РИБО-сорб" (Россия). Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «ТЕРЦИК». Для проведения реакции в отдельной пробирке емкостью 0,6 см³ вносили: 5 мкл ПЦР-смеси ScreenMix с Taq ДНК-полимеразой, смесь нуклеотидтрифосфатов с концентрацией 0,2 мМ каждого нуклеотида, 2 мМ Mg²⁺, красный и желтый красители, по 1 мкл прямого и обратного праймера и 9 мкл деионизованной воды. Затем в одну пробирку вносили 10 мкл отрицательного контрольного образца, в другую пробирку положительного контрольного образца, в остальные по 10 мкл ДНК исследуемых образцов. На поверхность водной фазы наносят по капле минерального масла. Образцы помещают в термоциклер в котором устанавливается соответствующий температурный режим (табл. 1).

Высокая чувствительность данного метода требует определенных условий, при которых оптимально будет проходить реакция. Одним из таких условий является правильность подбора нужной рабочей дозы праймеров, а также необходимость выбора оптимальных параметров температуры. Путем многочисленных экспериментов нами была определена рабочая доза праймеров, она составила 20 пмоль, наилучшей температурой при которой проходила максимальная наработка ПЦР-продукта является t 55°С.

С целью дальнейшего диагностирования образовавшихся в процессе амплификации фрагментов ДНК *Pasteurella multocida* использовали метод электрофореза. Учет результатов, полученных в ходе электрофореза, проводился с помощью специальной геледокументирующей системы. Чтобы определить размер фрагмент ДНК полученного в ходе реакции применялись стандартные маркеры. Использование данных маркеров позволяет определить количество пар нуклеотидных последовательностей, содержащихся в исследуемом образце. Заключительным этапом исследований является подтверждение того, что полученные фрагменты ДНК относятся к генотипу *Pasteurella multocida*. Данный этап работы проводился с использованием специального оборудования -секвенатора. Последовательности, полученные в ходе секвенирования анализировались на соответствие принадлежности к генотипу *Pasteurella multocida*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из представлений о геноме *Pasteurella multocida* для конструирования праймеров нами была выбрана область гена *ptfA*. Данная область гена представляет интерес связи с возможностью определять разные штаммы *Pasteurella multocida*.

Основной моделью для получения специфичных праймеров к *Pasteurella multocida* были выбраны олигонуклеотидные последовательности на основании информации представленной в банке данных

Таблица 2

Последовательности праймеров

| Определяемый вид | Название праймера | Последовательность | Размер ампликона, п.н. |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------|
| Pasteurella multocida | Pm0567 | GTCATTAATATTGGCTCCCTGAATA | 520 |
| | Pm1321 | CCCTTGCAGCCACTCTTTATGTT-GCCGAGC | |

NCBI. Для определения наиболее постоянных, а также изменчивых областей генома, относящихся к виду *Pasteurella multocida*, проведены сравнения нескольких групп нуклеотидных последовательностей между собой с использованием специализированных программ. Исходя из результатов проведенных исследований нами были отобраны более прогрессивные для определяемого вида области, которые послужили основой для создания праймеров используемых в ПЦР (табл.2).

Результаты исследования амплификации показали, что о наличие ДНК *Pasteurella multocida* в исследуемом материале свидетельствует образующейся в геле фрагмента ДНК длиной 520 п.н. С целью исключения ошибочного результата начиная с этапа выделения ДНК ставился отрицательный контроль реакции. Специфичность образованных фрагментов было установлено путем многократных исследований. Для подтверждения полученных результатов было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей с помощью секвенирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самым ответственным моментом в проведении ПЦР исследований является этап создания праймеров. От него во многом зависит специфичность данной реакции. При создании праймеров нами были учтены все необходимые условия, предьявляемые к олигонуклеотидам используемые в ПЦР.

Проведенные нами экспериментальные исследования показали специфичность метода ПЦР с праймерами Pm0567 и Pm1321, позволяющие определять ДНК

бактерии *Pasteurella multocida*. Таким образом с помощью подобранных нами олигонуклеотидных последовательностей можно проводить идентификацию *Pasteurella multocida* в исследуемом материале от птицы. При проведении исследований нами подтверждена высокая специфичность и чувствительность используемых праймеров.

Статья написана по госзаданию 0599-2019-0025

Identification of *Pasteurella multocida* by polymerase chain reaction. Semina A.N. – PhD of vet.scie, leading researcher, "AllRussian Research Veterinary Institute of Poultry Science" - Branch FNTS "VNITIP" RAS (VNIVIP).

ABSTRACT

Pasteurellosis having a fairly wide distribution can be a reason that hinders the successful development of poultry farming. The causes and conditions for the occurrence of this disease in farms are often not specific. *Pasteurella multocida* can manifest itself from an extremely weakened *Pasteurella* carrier to a highly virulent pathogen. A sick bird is a hidden carrier of this disease and is subject to further culling. All this ultimately leads to significant economic losses.

Rapid and reliable detection of this pathogen will reduce or completely prevent economic losses. The clinical manifestation of the disease in the form of a lightning course causes difficulties in its lifetime diagnosis.

The aim of our work was to develop unique samples of oligonucleotide sequences of primers specific to the pathogen *P. multocida*. The proposed method will provide detection of *Pasteurella multocida* within 3-4

hours, as well as rapid and highly specific determination of the type of this bacterium.

After analyzing the *Pasteurella multocida* genome, we selected a region of the *ptfA* gene for the construction of oligonucleotides. A pair of primers were selected for PCR: Pm0567 and Pm1321. Gene sequences were aligned by selecting similar ones in absolutely all the studied *Pasteurella multocida* isolates. Using special computer programs, the specificity of the selected primers was evaluated. A search in the sequence database revealed 100% homology of the selected primers with only homologous sequences in the *Pasteurella multocida* genome. The study of samples containing pathologic agents of bacterial nature by PCR confirmed the specificity of the selected primers. Positive results were obtained only with samples containing *Pasteurella multocida*. Thus, the selected primers can be proposed for the study of samples of different compositions to identify the genome of *Pasteurella multocida*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова О.Б. Микрофлора, выделяемая в птицеводствах различного технологического направления и контроль бактериальных болезней птиц / Новикова О.Б., Павлова М.А. // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 3. – С. 34-36.
2. Чужебаева Г.Д. Диагностика пастереллеза крупного рогатого скота методом ПЦР / Монография Г. Д. Чужебаевой // Костанай: Костанайский государственный университет имени Ахмета Байтурсынова. - 2017. - 106с.
3. 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.
4. 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. 415422.
5. 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.

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**