

УДК 619:579.843.95

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник<sup>1</sup>  
Аникевич Н.Ю., младший научный сотрудник<sup>1</sup>  
Малащенко Н.О., магистрант<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ГУО «Университет Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* В РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

### Резюме

В статье приводятся результаты исследований по выявлению генома *Mannheimia haemolytica* разработанной тест-системой ПЦР. Установлена этиологическая значимость *Mannheimia haemolytica* наряду с другими патогенами, вызывающими респираторную патологию у крупного рогатого скота (КРС). Возбудитель *Mannheimia haemolytica* был обнаружен в 11 из 38 исследованных хозяйств (29 %). Процент выделяемости возбудителя в положительных по манхеймиозу хозяйствах составил 37 %. В большинстве случаев *M. haemolytica* выделялась в ассоциации с другими вирусными и бактериальными инфекциями.

**Ключевые слова:** ПЦР, *Mannheimia haemolytica*, респираторная патология, крупный рогатый скот, бактериальная инфекция, пневмония.

### Summary

The article presents the results of studies using a PCR test system developed to detect the genome of *Mannheimia haemolytica*. The etiological significance of *Mannheimia haemolytica*, along with other pathogens that cause respiratory pathology in cattle, has been established. The pathogen *Mannheimia haemolytica* was detected in 11 of 38 farms studied (29 %). The percentage of pathogen isolation in manheimia-positive farms was 37 %. In most cases, *M. haemolytica* was isolated in association with other viral and bacterial infections.

**Keywords:** PCR, *Mannheimia haemolytica*, respiratory pathology, cattle, bacterial infection, pneumonia.

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Респираторные инфекции крупного рогатого скота представляют серьезную угрозу для животноводства во всем мире [1]. Бактерии семейства *Pasteurellaceae* играют важную роль в возникновении данных патологий. Это семейство включает такие важные патогены, как *Mannheimia haemolytica* и *Pasteurella multocida* [2].

В 1921 г. впервые были охарактеризованы три группы пастерелл крупного рогатого скота. Атипичные штаммы были вынесены в группу *Bacillus bovisepiticus*. В 1932 г. для них было предложено название *Pasteurella haemolytica*. Однако в 1999 г. на основании новых исследований было предложено отнести трегалозонегативных представителей *Pasteurella haemolytica* к новому роду – *Mannheimia*, названному в честь немецкого микробиолога Вальтера Мангейма [3]. Род *Mannheimia* относится к семейству *Pasteurellaceae* и включает в себя

патогенные, условно-патогенные и непатогенные бактерии, ассоциированные с животными. В настоящее время определено 9 патогенных видов: *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia bovis*, *Mannheimia caviae*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia granulomata*, *Mannheimia ovis*, *Mannheimia pernigra*, *Mannheimia ruminalis*, *Mannheimia varigena* [4]. К условно-патогенным видам относят *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia caviae*, *Mannheimia glucosida*, *Mannheimia granulomatis*, *Mannheimia varigena* [3, 5]. *Mannheimia ovis*, *Mannheimia bovis* и *Mannheimia pernigra* выделили в отдельные виды относительно недавно, и на сегодняшний день их относят к потенциально патогенным [6, 7, 8]. Единственным непатогенным видом является *Mannheimia ruminalis* [3].

Манхеймиоз широко распространен во всем мире. В США и Европе пневмония, вызванная *M. haemolytica*, является

одной из основных причин экономических потерь в животноводстве. Заболеваемость может достигать 35 %, а смертность – 10 %. Ежегодные потери от этого заболевания только в США оцениваются более чем в

25 млн дол. Кроме того, стоимость лечения животных также приводит к значительным убыткам [9]. Заболевания, вызываемые бактериями рода *Mannheimia*, представлены в таблице 1 [3, 5, 6, 7, 8].

Таблица 1 – Заболевания, вызываемые бактериями рода *Mannheimia*

Вид	Хозяин	Среда обитания	Заболевание
<i>M. haemolytica</i>	КРС, овцы	респираторный тракт	пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы, мастит
<i>M. bovis</i>	КРС	респираторный тракт	пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы
<i>M. caviae</i>	морские свинки	слизистые оболочки	конъюнктивит, отит
<i>M. glucosida</i>	овцы	респираторный тракт	мастит, пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы
<i>M. granulomatis</i>	КРС, олени, кролики	респираторный тракт	пневмония, конъюнктивит, гранулематозные поражения кожи КРС
<i>M. ovis</i>	овцы	респираторный тракт	пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы
<i>M. pernigra</i>	КРС	респираторный тракт	пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы
<i>M. ruminalis</i>	КРС, овцы	рубец	не выявлено
<i>M. varigena</i>	свиньи, КРС	респираторный тракт	септицемия, пневмония и другие заболевания бронхолегочной системы, мастит, менингит, энтерит

Среди всего рода вид *Mannheimia haemolytica* является наиболее патогенным возбудителем пневмонии КРС [10].

Факторы вирулентности *Mannheimia haemolytica* представлены адгезинами, белками внешней мембраны, капсульными полисахаридами, лейкотоксином и секретуемыми ферментами [11, 12]. При этом лейкотоксин, производимый всеми серотипами *M. haemolytica*, является наиболее существенным фактором вирулентности. Он играет ключевую роль в повреждении легочных тканей [13].

Ранее вид *Mannheimia haemolytica* включал 17 серотипов. Однако серотипы T3, T4, T10 и T15 были выделены в отдельный вид под названием *Bibersteinia trehalosi* (ранее *Pasteurella trehalosi*), а серотип A11 был классифицирован как *Mannheimia glucosida*. В результате *M. haemolytica* теперь включает лишь следующие серотипы: A1, A2, A5–A9, A12–A14, A16 и A17 [14].

Наиболее этиологически значимые серогруппы могут отличаться в зависимо-

сти от конкретного региона и популяции животных. Согласно литературным данным, основную роль в возникновении пневмоний КРС играет серотип A1, который составляет примерно 60 % от общего числа штаммов, изолированных из легких крупного рогатого скота. Серотип A6 был выделен в 26 % случаев, а серотип A2 – только в 7 % [14].

Лечение манхеймиоза КРС основано на применении антибиотиков широкого спектра действия. Благоприятный исход наблюдается у 85–90 % больных животных в случае использования эффективных противомикробных препаратов, таких как окситетрациклин, триметоприм, сульфадоксин и сульфаниламиды [15].

Профилактика манхеймиоза КРС основана на минимизации предрасполагающих факторов и вакцинации. Вакцинация может снизить заболеваемость, но следует подчеркнуть, что защита далека от абсолютной. Вероятно, это связано со сложным многофакторным возникновением болезни. Также вакцины в основном ориентированы

на один или только на небольшое количество серотипов, и перекрестная защита не всегда возникает [16].

Идентификация возбудителя пневмонии КРС на основе клинических признаков заболевания, как правило, невозможна. Изменчивость и сложность фенотипических характеристик бактерий рода *Mannheimia* в значительной степени затрудняют классификацию изолятов с помощью рутинных лабораторных методов, основанных на общепринятых описательных критериях, что делает невозможным точную таксономическую классификацию. Кроме этого, классические бактериологические методы отличаются трудоемкостью, и постановка диагноза занимает более длительное время [16] по сравнению с современными методами молекулярно-генетической диагностики, обладающими высокой чувствительностью и специфичностью [17].

**Целью** работы было разработать тест-систему для выявления генома бактерий рода *Mannheimia haemolytica* методом ПЦР и оценить этиологическую значимость *Mannheimia haemolytica*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении молекулярно-генетических исследований в качестве положительного контроля использовали штаммы КМИЭВ РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского» *Mannheimia haemolytica* и других вирусов и бактерий. Для подтверждения чистоты культуры *Mannheimia haemolytica* была проведена окраска по Граму с использованием комплекта реагентов «Микро-ГРАМ-НИЦФ».

В качестве исследуемого материала для выделения ДНК и изучения распространения заболеваний респираторной этиологии использовались патологический

материал, сыворотка крови и носовая слизь от крупного рогатого скота с признаками респираторной патологии из различных регионов Республики Беларусь. Выделение нуклеиновых кислот проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению.

Для определения уникальных участков генома *Mannheimia haemolytica*, пригодных в качестве мишеней для ПЦР-диагностики, был проведен анализ нуклеотидных последовательностей локуса гена, кодирующего белок «ДНК метилтрансферазы». Для этого использовали нуклеотидные базы данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики и программу BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)). Подбор праймеров проводили с помощью программы Vector NTI. Праймеры были проверены на специфичность «in silico» с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST ([ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)), а также опытным путем (постановка ПЦР с ДНК и РНК различных вирусов и бактерий).

Температуры плавления праймеров рассчитывали по формуле [18]:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T),$$

где  $T_m$  – температура плавления праймеров;

G – гуанин;

C – цитозин;

A – аденин;

T – тимин.

ПЦР проводили с использованием реакционной смеси, представленной в таблице 2.

Таблица 2 – Состав ПЦР-смеси на 1 пробу

Компоненты реакционной смеси	Объем, мкл
ArtMix ДНК-полимераза (ООО «АртБиоТех»)	12,5
Прямой праймер (ОДО «Праймтех»)	0,2
Обратный праймер (ОДО «Праймтех»)	0,2
Вода	10,5
ДНК-матрица	1,5

Амплификацию проводили согласно протоколу, представленному в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке)		Кол-во повторов
температура	время	
95 °С	5 мин	1
95 °С	30 с	45
55 °С	25 с	
60 °С	30 с	
12 °С	хранение	–

Визуализацию результатов проводили после электрофоретического разделения продуктов амплификации и детекции их на приборе Gel Doc XR+ (BioRad, США), а также с помощью HRM-анализа (анализ кривых плавления продуктов ПЦР).

Для определения чувствительности тест-системы ПЦР при детекции специфического участка ДНК *Mannheimia haemolytica* исследовали десятикратные разведения суспензии *Mannheimia haemolytica*. Определение исходной концентрации клеток *Mannheimia haemolytica* проводили с использованием стандарта мутности МакФарланда.

Для определения специфичности тест-системы ПЦР использовали РНК и ДНК *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella dublin*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma*

*pneumoniae*, вирусов вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате анализа нуклеотидных последовательностей локуса гена, кодирующего белок «ДНК метилтрансферазы» различных штаммов *Mannheimia haemolytica* и других микроорганизмов, подобраны две пары праймеров (таблица 4).

Оценку чувствительности ПЦР тест-системы проводили в соответствии с протоколом, представленным в таблице 3.

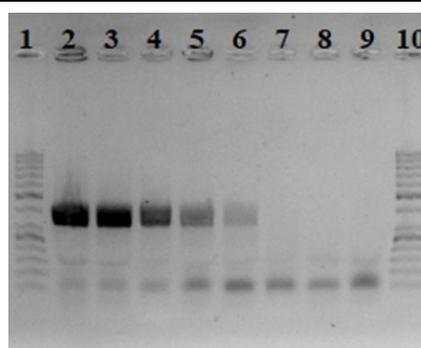
Концентрация микробных клеток *Mannheimia haemolytica* (рисунок 1) в эксперименте составила  $1,5 \times 10^6$  КОЕ,  $1,5 \times 10^5$  КОЕ,  $1,5 \times 10^4$  КОЕ,  $1,5 \times 10^3$  КОЕ,  $1,5 \times 10^2$  КОЕ,  $1,5 \times 10^1$  КОЕ,  $1,5 \times 10^0$  КОЕ (рисунок 2).

Таблица 4 – Описание праймеров

Праймер	Последовательность	Длина	Tm	ГЦ-состав
Прямой	GGCTGGGTGAAATTGGTGCGTGAG	24 н.п.	60 °С	58 %
Обратный	AAAACCCAGCTTACCACCCCGAAA	25 н.п.	59 °С	52 %



Рисунок 1 – Культура *Mannheimia haemolytica* (окраска по Граму)



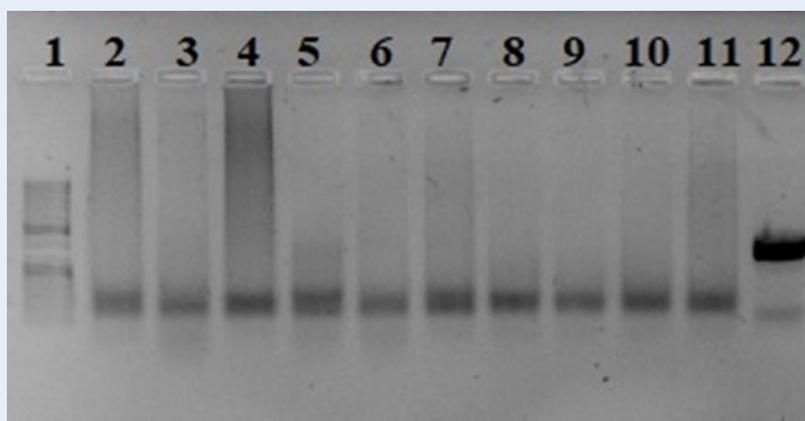
1, 10 – маркер молекулярной массы; 2 –  $1,5 \times 10^6$  КОЕ; 3 –  $1,5 \times 10^5$  КОЕ; 4 –  $1,5 \times 10^4$  КОЕ; 5 –  $1,5 \times 10^3$  КОЕ; 6 –  $1,5 \times 10^2$  КОЕ; 7 –  $1,5 \times 10^1$  КОЕ; 8 –  $1,5 \times 10^0$  КОЕ; 9 – отрицательный контроль

Рисунок 2 – Электрофореграмма ампликонов ПЦР

В результате ПЦР, представленной на рисунке 2, установили чувствительность тест-системы, которая составила  $10^2$  КОЕ в образце (дорожка 6).

Для постановки ПЦР использовали чистую культуру *Mannheimia haemolytica*, ее чистота была подтверждена в результате микроскопирования мазков культуры *Mannheimia haemolytica*.

При визуализации продуктов ПЦР в геле (рисунок 3) видно, что сконструированные праймеры дают четкий положительный результат только на ДНК *Mannheimia haemolytica* (дорожка 12). Это позволяет дифференцировать данный патоген в том числе и от *Pausteurella multocida* (дорожка 2), вызывающего сходное с манхеймиозом заболевание – пастереллез. Неспецифические продукты реакции отсутствуют.



1 – маркер молекулярной массы; 2 – *P. multocida*; 3 – *B. bronchiseptica*; 4 – *Ent. faecalis*; 5 – *S. dublin*; 6 – *P. aeruginosa*; 7 – *Staph. aureus*; 8 – *M. hyopneumoniae*; 9 – ВД+ИРТ+ПГ-3; 10 – рота- +коронавирус; 11 – *E. coli*; 12 – *M. haemolytica*

Рисунок 3 – Электрофореграмма ампликонов ПЦР

В течение 4 месяцев было проведено исследование 135 проб патологического материала, носовой слизи и сыворотки крови от КРС, полученных из 38 хозяйств Республики Беларусь.

В ходе проведенных исследований возбудитель *Mannheimia haemolytica* был обнаружен в 11 хозяйствах, что составило 29 % от общего числа исследуемых хозяйств (рисунок 4).

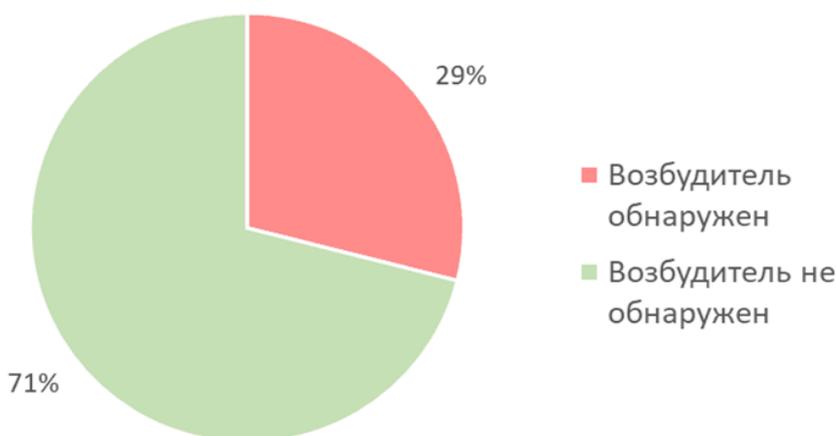


Рисунок 4 – Процент хозяйств, в которых обнаружен возбудитель *M. haemolytica*

В хозяйствах, неблагополучных по манхеймиозу, выделяемость возбудителя

из 54 проб биологического материала составила 37 % (рисунок 5).

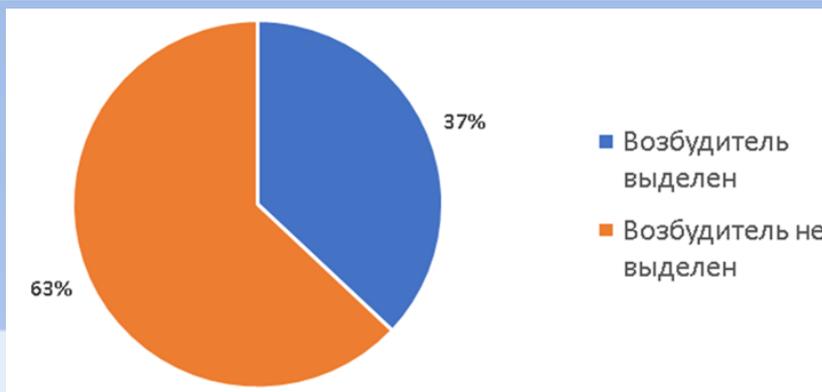


Рисунок 5 – Выделяемость возбудителя *M. haemolytica*

Только в 3 хозяйствах манхеймиоз протекал как моноинфекция. В 8 хозяйствах *M. haemolytica* была выявлена в ассоциации с другими возбудителями инфекций

(рисунок 6). В 10 исследуемых пробах одновременно присутствовало от 2 до 6 видов патогенов.

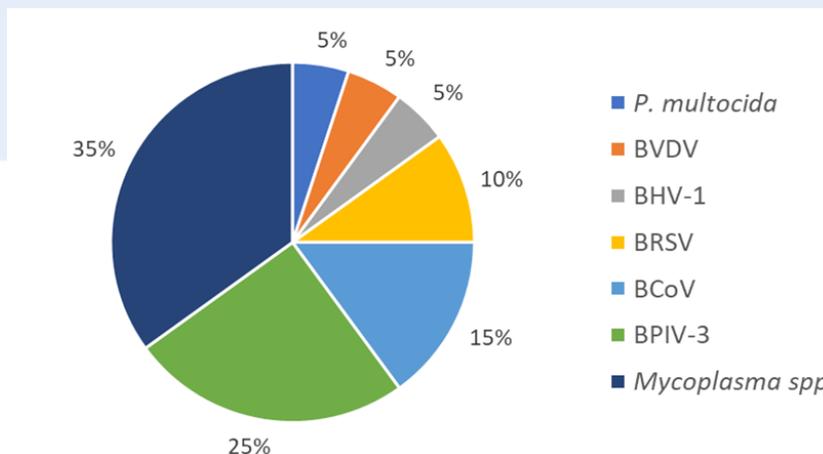


Рисунок 6 – Патогены, выделенные в ассоциации с *M. haemolytica*

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система ПЦР для выявления генома *Mannheimia haemolytica* с чувствительностью не менее 150 КОЭ в исследуемом образце показала удовлетворительные результаты при скрининге 135 проб патологического материала, носовой слизи и сыворотки крови КРС, полученных из 38 хозяйств Республики Беларусь. Возбудитель *Mannheimia haemolytica* был обнаружен в 29 % исследуемых хозяйств. Процент выделяемости возбудителя в этих хозяйствах составил 37 %.

Так как *M. haemolytica* в большинстве случаев является вторичным агентом при респираторных инфекциях, вероятно, активацию инфекционного процесса вызывали другие патогены.

В условиях полимикробной инфекции респираторного тракта, как правило,

наблюдается усугубление клинической симптоматики. Тем не менее, ряд исследований демонстрирует, что при определенных комбинациях патогенных микроорганизмов между ними может возникать негативное взаимодействие.

С.А. Cowick с соавторами установили, что бактерии *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* способны оказывать ингибирующее воздействие друг на друга при совместном формировании биопленки на клетках респираторного эпителия. В рамках данного исследования лишь в 1 из 20 образцов, положительных на *M. haemolytica*, был также обнаружен возбудитель *P. multocida*.

В 9 положительных на *M. haemolytica* пробах были обнаружены возбудители вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-син-

цитиальной инфекции, коронавирусной инфекции и микоплазмоза. В случае совместного инфицирования животных респираторными патогенами инфекция протекает крайне остро и с высокой степенью летальности.

Полученные данные говорят о необходимости комплексного подхода к диагностике, лечению и профилактике респираторных патологий крупного рогатого

скота. Необходимо проводить комплексную диагностику для выявления всех возможных патогенов, участвующих в развитии респираторных инфекций. При установлении смешанных инфекций с участием нескольких возбудителей требуется применение комбинированной профилактики и лечебной тактики, направленной на все выявленные патогены.

### СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Callan, R. J. Biosecurity and bovine respiratory disease / R. J. Callan, F. B. Garry // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2002. – Vol. 18, № 1. – P. 57–77.
2. Snyder, E. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in Bovine Respiratory Disease / E. Snyder, B. Credille // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2020. – Vol. 36, № 2. – P. 253–268.
3. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. / O. Angen [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1999. – Vol. 49, № 1. – P. 67–86.
4. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Electronic resource]. – Mode of access: <https://lpsn.dsmz.de/genus/mannheimia>. – Date of access: 24.01.2024.
5. Christensen, H. *Mannheimia caviae* sp. nov., isolated from epidemic conjunctivitis and otitis media in guinea pigs / H. Christensen, A.M. Bojesen, M. Bisgaard // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2011. – Vol. 61, № 7. – P. 1699–1704.
6. *Mannheimia ovis* sp. nov., Isolated from Dead Sheep with Hemorrhagic Pneumonia / F. Li [et al.] // *Curr Microbiol*. – 2020. – Vol. 77, № 11. – P. 3504–3511.
7. *Mannheimia bovis* sp. nov., Isolated from a Dead Cow with Hemorrhagic Pneumonia / F. Li [et al.] // *Curr Microbiol*. – 2021. – Vol. 78, № 4. – P. 1692–1698.
8. *Mannheimia pernigra* sp. nov., isolated from bovine respiratory tract / P. Kuhnert [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – Vol. 71, № 2. – P. 1–7.
9. Review on Bovine Pneumonic Pasteurellosis / Jimma University College of Agriculture and Veterinary Medicine, Jimma, Ethiopia // *Austin J Infect Dis*. – 2023. – Vol. 10, № 4. – P. 1–8.
10. Леммиш, А. Наиболее актуальные возбудители бронхолегочной патологии молодняка крупного рогатого скота / А. Леммиш, Н. Леммиш // *Ветеринарное дело*. – 2017. – Т. 69, № 3. – С. 18–23.
11. Confer, A. W. *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines / A. W. Confer, S. Ayalew // *Anim. Health. Res. Rev*. – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 79–99.
12. Highlander, S., K. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* / S. Highlander K. // *Front Biosci*. – 2001. – Vol. 6, № 1. – P. 11–28.
13. Капустин, А. В. Пастереллез крупного рогатого скота, вызванный *Mannheimia haemolytica* / А. В. Капустин, А. И. Лайшевцев // *Российский журнал сельского хозяйства и социально-экономических наук*. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 3–12.
14. Christensen, H. Prediction of *Mannheimia haemolytica* serotypes based on whole genomic sequences / H. Christensen [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2021. – Vol. 262. – P. 10–32.
15. Peek, S. F. Respiratory Diseases / S. F. Peek, T. L. Ollivett, T. J. Divers // *Diseases of Dairy Cattle*. – Elsevier, 2018. – P. 94–167.
16. Jaramillo-Arango, C. J. Bovine manheimiosis: etiology, prevention and control / C. J. Jaramillo-Arango, T. F. J. Trigo, F. Suárez-Güemes // *Vet Mex*. – 2009. – Vol. 40, № 3. – P. 293–314.
17. Орадова, А. Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике / А. Ш. Орадова // *Вестник КазНМУ*. – 2013. – № 4. – С. 307–311.
18. Использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики инфекционных заболеваний: учеб.-метод. пособие / В. И. Дорофеев [и др.]; Ставроп. гос. аграр. ун-т. – Ставрополь, 2008. – 45 с.