

УДК 619:616.24-002:578.082.2(476)

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Дубаневич О.В., старший научный сотрудник
Малашенко Н.О., магистрант

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

МОНИТОРИНГ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ С ДИФФЕРЕНЦИАЦИЕЙ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *PASTEURELLACEAE*

Резюме

Статья посвящена комплексному изучению бактериальных и вирусных патогенов, являющихся возбудителями респираторных заболеваний крупного рогатого скота в Беларуси. Основное внимание уделено представителям семейства *Pasteurellaceae* (*Pasteurella*, *Mannheimia*) и молекулярно-генетическим методам диагностики.

Ключевые слова: ПЦР, мониторинг, респираторная патология, крупный рогатый скот, *Pasteurellaceae*.

Summary

The article is devoted to a comprehensive study of bacterial and viral pathogens that cause respiratory diseases in cattle in Belarus. The main attention is paid to representatives of the *Pasteurellaceae* family (*Pasteurella*, *Mannheimia*) and molecular genetic diagnostic methods.

Keywords: PCR, monitoring, respiratory pathology, cattle, *Pasteurellaceae*.

Поступила в редакцию 16.05.2025 г.

ВВЕДЕНИЕ

Респираторные заболевания крупного рогатого скота (КРС) продолжают оставаться одной из наиболее значимых проблем современного животноводства, нанося существенный экономический ущерб хозяйствам во всем мире. Среди возбудителей этой патологии особое место занимают бактерии семейства *Pasteurellaceae*, в частности представители родов *Pasteurella* и *Mannheimia*. Эти микроорганизмы способны вызывать тяжелые бронхопневмонии, часто приводящие к летальным исходам, особенно при смешанных инфекциях с вирусными патогенами [1, 7].

Актуальность данного исследования обусловлена тем, что традиционные методы диагностики (бактериологический посев, серологические тесты) часто оказываются недостаточно эффективными для точной идентификации видов и серотипов этих микроорганизмов, а данные о генетическом разнообразии *Pasteurellaceae* в Республике Беларусь крайне ограничены.

Особую сложность представляет дифференциальная диагностика пастереллеза и манхеймиоза, поскольку эти заболе-

вания имеют схожую клиническую картину, но требуют разных подходов к лечению и профилактике. Кроме того, представители *Pasteurellaceae* часто выступают в качестве секундарных патогенов на фоне вирусных инфекций (вирусной диареи КРС, парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и др.), что значительно осложняет течение болезни.

В последние годы все большее значение приобретают молекулярно-генетические методы исследования, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и HRM-анализ (High Resolution Melting). Эти методы позволяют не только точно идентифицировать возбудителей, но и изучать их генетическое разнообразие, что крайне важно для понимания эпидемиологии заболеваний и разработки эффективных мер контроля.

В настоящее время насчитывается 16 сероваров *Pasteurella multocida*. Данное деление основано на различиях структуры антигена липополисахарида (ЛПС), входящего в их состав. ЛПС формирует значимую часть наружной оболочки, образует гидрофобный барьер клетки. ЛПС может

быть условно разделен на три области (домена): гидрофобный липид А, наружное и внутреннее ядро олигосахарида и О-антиген, состоящий из повторяющихся олигосахаридов. ЛПС имеет прямое значение в защите микроорганизма от врожденного иммунитета носителя. Потеря даже небольшого фрагмента ЛПС, например фосфохолина, существенно повышает чувствительность клетки к противомикробным препаратам, таким как кателицидин [1].

Как и многие другие бактериальные токсины, токсин *Pasteurella multocida* (PTM) – многофункциональная белковая структура со множеством специфических функций, содержащих транслокационный и биологически активный домены в своей структуре. PTM содержит 1285 аминокислот, имеет массу около 145 кДа [1]. N-конец PTM на 20 % гомологичен другому бактериальному токсину – цитотоксическому некротизирующему фактору (CNF), обнаруживаемому у *E. coli* (CNF1, CNF2, CNF3) и *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) (Lemichez et al., 1997; Pullinger et al., 2001) [1].

Птичья холера – системное заболевание, которое вызывается преимущественно *Pasteurella multocida* типа А, хотя отмечаются случаи, когда возбудителем послужил другой тип, например тип F [1]. Птичья холера поражает все виды птиц, но отдельные виды более чувствительны к данному заболеванию, в частности индейки.

Атрофический ринит – синдром, который включает в себя деформацию морды, разрушение костей носовых раковин и задержку роста у молодняка свиней. Данный синдром длительное время считался обычным состоянием для одомашненных свиней во всех странах. С некоторой частотой данный синдром наблюдается у кроликов. Также имеются случаи заболевания диких кабанов, коз, КРС [1]. Клинические проявления обусловлены так называемым дермонекротоксином, токсином PMT (*Pasteurella multocida* toxin), который отмечается у некоторых серотипов *P. multocida* [1].

Геморрагическая септицемия – системное заболевание, к которому восприимчивы все копытные. Заболевание, как правило, поражает КРС, свиней, бизонов, верблюдов. Его причиной являются серотипы В и Е, однако отмечались случаи заболеваний, похожие по клинической картине на вызванные типом А [1].

Histophilus somni является причиной sporadической заболеваемости КРС по всему миру, а также вызывает заболевания у мелких жвачных, снежных баранов и северо-американских бизонов [6].

Pasteurella trehalosi является важным патогеном в популяции овец. Данный микроорганизм преимущественно ассоциирован с серьезными системными инфекциями у ягнят, однако связан также с развитием пневмонии у овец (Gilmour & Gilmour, 1989) [2].

Вид *Mannheimia haemolytica* представлен 12 серотипами: А1, А2, А5–А9, А12–А14, А16 и А17 [4]. Наиболее значимым является серотип А1, т.к. составляет около 60 % всех штаммов, выделенных из дыхательной системы КРС. При этом серотипы А2 и А6 составляют 7 % и 26 % соответственно [8].

Целью настоящего исследования было выявление и молекулярно-генетическая характеристика бактерий семейства *Pasteurellaceae* в биологическом материале от КРС с признаками респираторной патологии с использованием современных методов диагностики и выявление ассоциаций бактериальных и вирусных патогенов. Для достижения этой цели решались следующие задачи: изучение генетической вариативности бактерий с помощью специально подобранных праймеров; анализ отдельных локусов генома методом HRM; оценка распространенности бактерий семейства *Pasteurellaceae* в сочетании с вирусными патогенами в хозяйствах Беларуси.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись в период с 2024 г. по начало 2025 г. в отделе молекулярно-генетической диагностики и генной инженерии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеславского» в рамках задания 3.15 «Изучение бактерий, вызывающих респираторную патологию крупного рогатого скота в Республике Беларусь, молекулярно-биологическими методами и создание банка идентифицированных изолятов инфекционных биологических агентов» ГПНИ «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность», подпрограмма «Животноводство и племенное дело».

Проведенное исследование охватило 414 биологических образцов биоматериала

крупного рогатого скота из 93 сельскохозяйственных предприятий Республики Беларусь. В работе использовались патологический материал, носовая слизь и сыворотка крови от животных с клиническими признаками респираторных заболеваний, а также эталонные штаммы из коллекции КМИЭВ.

На первом этапе анализировали праймеры (прямой 1P-911 и обратный 2P-962), специфичные к гену 16S рРНК бактерий семейства *Pasteurellaceae*. Праймеры были выбраны таким образом, чтобы захватывали (фланкировали) участок гена 16S рРНК, содержащий изменчивые (вариабельные) области. На втором этапе готови-

лись пробы биологического материала, которые отбирались у КРС с признаками респираторной патологии прижизненно и посмертно. Посмертно отбирался патологический материал (внутренние органы), прижизненно – как правило, носовая слизь и фекалии, сыворотка крови и др. На третьем этапе выделялась ДНК/РНК российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению. Четвертый этап – постановка ПЦР согласно протоколу (рисунок 1), пятый – фореуз в 2%-ном геле (агароза растворялась в ТАЭ буфере) при 120 В, 60 мА и 7 W, время проведения фореуза – 40 минут.

1	95.0 C for 3:00
2	95.0 C for 0:10
3	55.0 C for 0:35
4	60.0 C for 0:50
	+ Plate Read
5	GOTO 2, 27 more times
6	95.0 C for 0:30
7	Melt Curve 82.0 to 95.0 C, increment 0.2 C, for 0:05 + Plate Read
	END

Рисунок 1 – Протокол амплификации

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Чтобы убедиться, что используемые праймеры специфично связываются с ДНК различных видов семейства *Pasteurellaceae* и что между участками связывания праймеров находятся участки ДНК, отличающиеся между видами (вариабельные области), мы

провели анализ с помощью программного обеспечения BLAST (в базе данных NCBI) и BioEdit к некоторым из бактерий сем. *Pasteurellaceae* и подтвердили специфичность в ПЦР с различными штаммами микроорганизмов (рисунок 2).

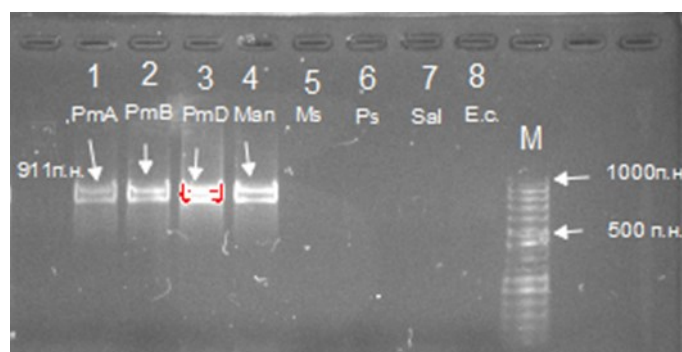


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации праймеров 1P-911 и 2P-962 с ДНК штаммов *Pasteurella multocida* типов A, B, D, *Mannheimia haemolytica*, *Mycoplasma species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella dublin* и *E. coli*

С использованием праймеров 1P-911 и 2P-962 в ПЦР был проведен HRM-анализ (анализ по кривым температур плавления) 414 образцов биологического материала

(рисунок 3), из них в 64 (69 %) выявили генетические маркеры сем. *Pasteurellaceae*, при этом положительный результат получен в 169 исследуемых пробах (41 %).

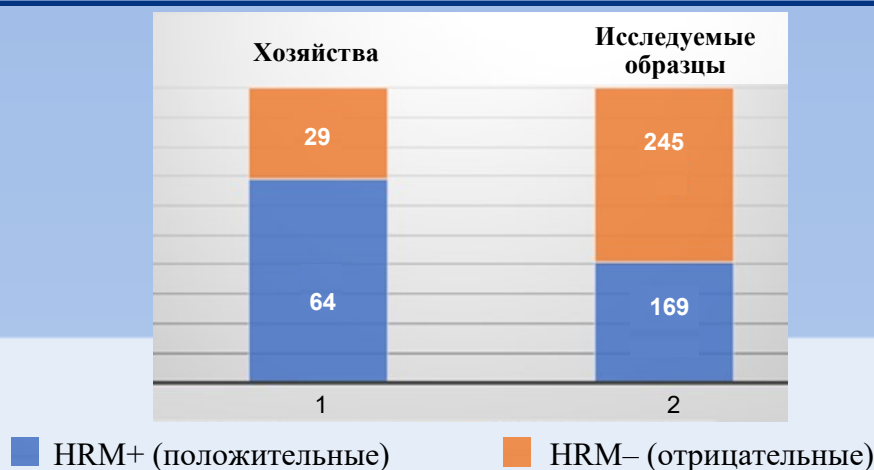


Рисунок 3 – Соотношение HRM+ и HRM– результатов по температурам кривых плавления в хозяйствах Республики Беларусь в исследованных образцах

В результате HRM-анализа 169 положительных проб (41 %), где были выявлены генетические маркеры сем. *Pasteurellaceae*, результаты распределились по температурам плавления от 87,4 °C до 92,4 °C (температурный диапазон – 5 °C). Получено 18 значений по температурным кривым плавления: 87,4 °C, 88,6 °C, 88,8 °C, 89 °C, 89,2 °C, 89,4 °C, 89,6 °C, 89,8 °C, 90 °C, 90,2 °C, 90,4 °C, 90,6 °C, 90,8 °C, 91 °C, 91,2 °C, 91,4 °C, 91,6 °C и 92,4 °C (рисунки 4, 5).

В рамках скрининга методом ПЦР с анализом Tm-кривых была подтверждена циркуляция нескольких генетических вариантов *Pasteurellaceae*, что согласуется с ожидаемым разнообразием. Распределение секторов демонстрирует распространен-

ность различных групп: доминирующие (наиболее значимые) маркеры занимают наибольшую площадь в секторах, что обеспечивает наглядность интерпретации данных и отражает гетерогенность бактерий семейства *Pasteurellaceae* в пробах, косвенно указывая на присутствие генетически различных видов.

Выявление генетического материала, принадлежащего сем. *Pasteurellaceae* в 41 % проб с распределением по кластерам с различными температурами плавления при HRM-анализе, подтверждает эпидемиологическую значимость полученных данных и необходимость дальнейшего углубленного исследования, включая видовую типизацию возбудителей, что запланировано в рамках продолжения исследований.

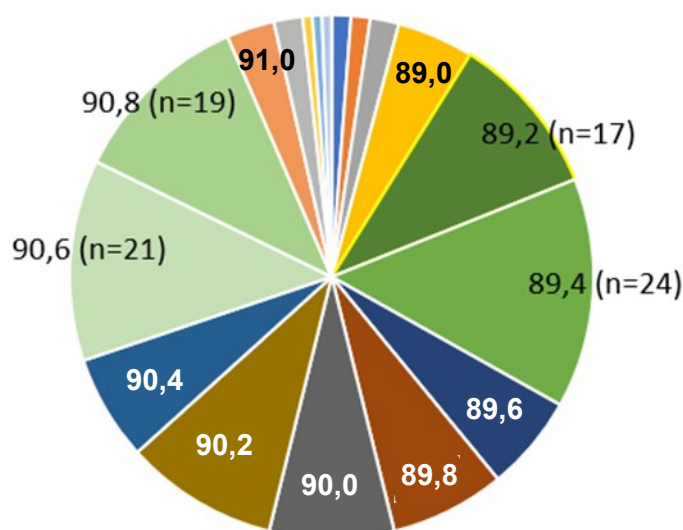


Рисунок 4 – Анализ исследуемых образцов по кривым температур плавления (n=169)

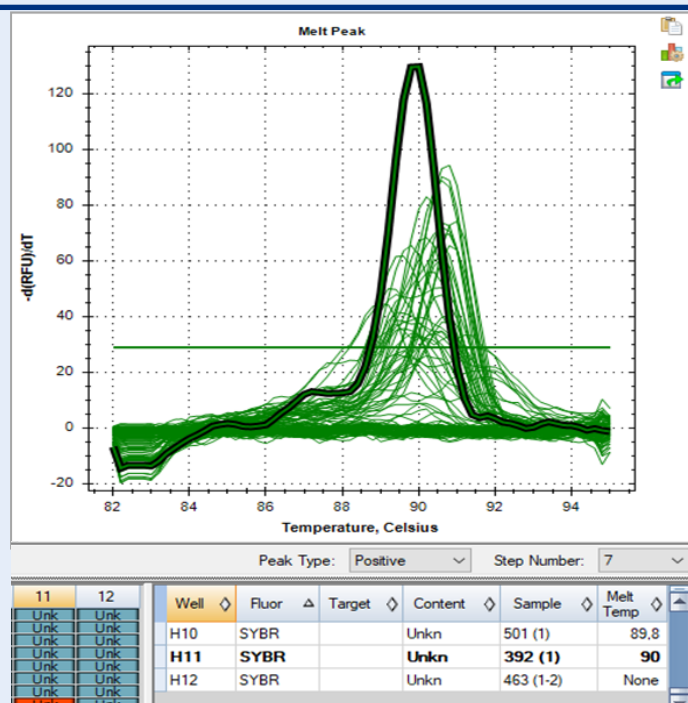


Рисунок 5 – Пример результатов HRM-анализа исследуемых образцов (96 исследуемых образцов, положительные образцы в виде сигмоидных кривых)

Результаты HRM-анализа исследуемых образцов представлены также в виде электрофореграммы (рисунок 6).

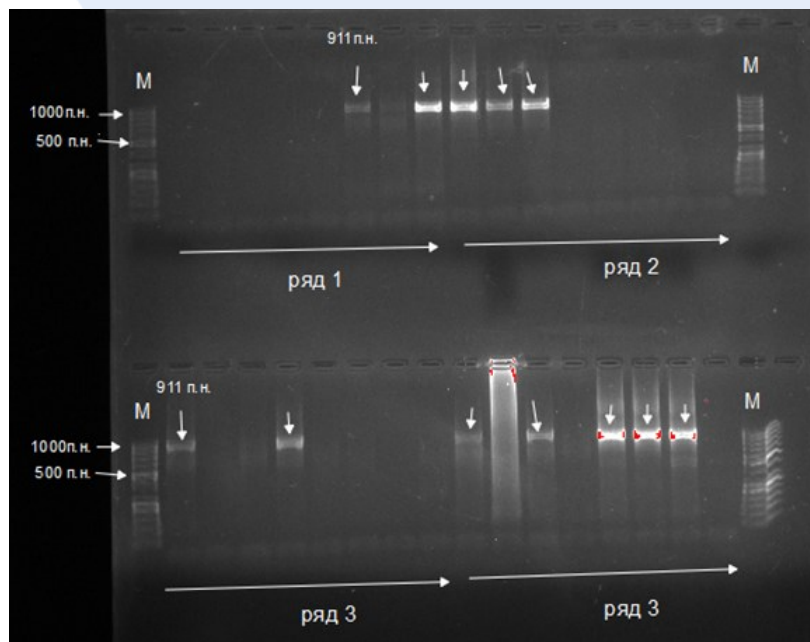


Рисунок 6 – Электрофореграмма исследуемых положительных проб (обозначены короткими стрелками)

Из 169 положительных проб HRM+ (41 %), где выявили генетические маркеры сем. *Pasteurellaceae*, в 114 случаях (68 %) получен положительный результат из патматериала, в 22 (13 %) – из носовой слизи, в 16 (10 %) – из фекалий, 3 % – из сыворотки, 11 % – из других образцов. В 245 отрицательных пробах HRM– (59,2 %), где не были выявлены генетические маркеры сем. *Pasteurellaceae*, биологический материал был представлен в следующем соотноше-

нии: 160 проб (65 %) – из сыворотки, 36 (15 %) – из фекалий, 25 (10 %) – из патматериала, 8 (3 %) – из носовой слизи и 16 (7 %) – из других образцов.

В 155 пробах материала дополнительно выявляли генетические маркеры респираторных патогенов, вызывающих инфекционный ринотрахеит (ИРТ), парагрипп-3 (ПГ-3), вирусную диарею (ВД), респираторно-синцитиальную инфекцию (РСИ), коронавирусную инфекцию (Коро-

на) и микоплазмоз (*Mycoplasma species*). В 76 пробах выявлены генетические маркеры сем. *Pasteurellaceae*, 43 пробы (56 %) содержали маркеры других патогенов: *Mycoplasma species* – 14 случаев (наиболее часто), ИРТ – 9, ВД и Корона – по 6, РСИ – 5, ПГ-3 – 3. В 79 пробах генетические маркеры *Pasteurellaceae* отсутствовали, при этом 39 проб (49 %) содержали маркеры следующих патогенов: ПГ-3 – 17 случаев (максимальная частота), *Mycoplasma species* – 11 (второе место), ИРТ – 6, Корона – 3, ВД – 2, РСИ – 1. Таким образом, при выявлении генетических маркеров сем. *Pasteurellaceae* чаще всего выявлялись микоплазмы и ИРТ, также значимо присутствовали ВД и коронавирус. Там, где маркеры сем. *Pasteurellaceae* не выявили, преобладал ПГ-3. Его доминирование на фоне отсутствия бактериальных патогенов объясняется тем, что вирус менее патогенен и реже ассоциируется с тяжелыми бактериальными осложнениями на фоне ИРТ, ВД и РСИ, которые вызывают еще и иммуносупрессию, достаточную для развития вторичной бактериальной колонизации [3, 5].

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что нуклеотидные участки, которые фланкируют используемые праймеры, пригодны для выявления внутри- и межвидовой вариабельности бактерий сем. *Pasteurellaceae*.

2. В результате ПЦР-исследования 414 образцов из 93 сельскохозяйственных комплексов Республики Беларусь выявлено 169 генетических маркеров, принадлежащих бактериям сем. *Pasteurellaceae*.

3. По кривым температур плавления выявлено 18 групп с диапазоном температур 5 °С – от 87,4 °С до 92,4 °С, что свидетельствует о генетической вариабельности бактерий. Полученные данные о температурных профилях позволяют выделить перспективные образцы для углубленного филогенетического анализа. Анализ этих вариабельных областей с помощью секвенирования ДНК позволит в дальнейшем выявить видовое и внутривидовое разнообразие бактерий семейства *Pasteurellaceae*. Филогенетический анализ может помочь идентифицировать новые, ранее неизвестные штаммы или виды сем. *Pasteurellaceae*, которые могут обладать высоким потенциалом патогенности.

4. Совместное выявление *Pasteurellaceae* и вирусов (ИРТ, ВД) в 56 % случаев подтверждает значимость комплексного подхода при диагностике респираторных заболеваний КРС.

5. Результаты исследования свидетельствуют о сложном характере респираторных инфекций КРС в Беларуси и необходимости учета возможных микс-инфекций при диагностике, лечении и специфической профилактике.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Aktories, K. *Pasteurella multocida Molecular Biology, Toxins and Infection* / K. Aktories, J. H. C. Orth, B. Adler // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2012. – Vol. 361. – P. 140.
2. Blackall, P. J. *Reclassification of Pasteurella trehalosi as Bibersteinia trehalosi gen. nov., comb. nov.* / P. J. Blackall, A. M. Bojesen, H. Christensen. – 2007. – P. 1–8.
3. Caswell, J. L. *Mycoplasma bovis in Respiratory Disease of Feedlot Cattle* / J. L. Caswell, K. G. Bateman, H. Y. Cai // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2010. – Vol. 26, № 2. – P. 365–379.
4. Christensen, H. *Prediction of Mannheimia haemolytica serotypes based on whole genomic sequences* / H. Christensen // *Veterinary Microbiology*. – 2021. – Vol. 262. – P. 10–32.
5. Ellis, J. A. *Update on viral pathogenesis in BRD* / J. A. Ellis // *Animal Health Research Reviews*. – 2009. – Vol. 10, № 2. – P. 149–153.
6. Inzana, T. J. *Histophilus somni. Biology, Molecular Basis of Pathogenesis, and Host Immunity* / T. J. Inzana // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2016. – Vol. 396. – P. 158.
7. Kaoud, H. A. E.-S. *Bovine Respiratory Disease in Feedlot Cattle: Antimicrobial Resistance in Bovine Respiratory Bacterial Pathogens and Alternative Antimicrobial Approaches* / H. A. E.-S. Kaoud // *Bacterial Cattle Diseases*. – 2019. – P. 16. – DOI: 10.5772/intechopen.81718.
8. 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.