

УДК 619:579.843.95

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Мальчик О.В., научный сотрудник
Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *PASTEURELLA MULTOCIDA* СЕРОВАРИАНТОВ А, В, D

Резюме

В статье приведены данные по биохимическим свойствам музейных штаммов *Pasteurella multocida* серовариантов А, В, D, установлены отличительные особенности ферментирования отдельных веществ. Серовариантная принадлежность *Pasteurella multocida* подтверждена в полимеразной цепной реакции с помощью разработанной РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого» тест-системы для обнаружения и определения серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* (А, В, D) в полимеразной цепной реакции «Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* (А, В, D)».

Summary

The article presents data on the biochemical properties of museum strains of *Pasteurella multocida* serovariants А, В, D, and distinguishes distinctive features of the fermentation of individual substances. The serovariate affiliation of *Pasteurella multocida* was confirmed in the polymerase chain reaction using the RUE «Institute of experimental veterinary medicine nam. of S.N. Vyshellessky» test system for detection and determination of serovariant affiliation of *Pasteurella multocida* (А, В, D) in the polymerase chain reaction «Multiplex PCR *Pasteurella multocida* (А, В, D)».

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Pasteurella multocida является возбудителем, вызывающим заболевание животных и птиц, которое наносит большой экономический ущерб животноводческим, звероводческим, свиноводческим и птицеводческим хозяйствам. Оно опасно и для людей, работающих в животноводстве, птицеводстве, звероводстве. Все пастереллы паразитируют на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, а также пищеварительного тракта и часто являются возбудителями вторичных инфекций. Широкое распространение пастереллоносительства, циркуляция слабовирулентных штаммов *Pasteurella multocida* обуславливают актуальность решения проблемы проведения эффективной диагностики пастереллеза [1, 2, 3].

Возбудитель болезни неоднороден в антигенном отношении. Выделяют 5 серовариантов *Pasteurella multocida* по капсуль-

ному антигену, которые обозначаются заглавными латинскими буквами А, В, D, Е, F, и 16 серовариантов по соматическому антигену, обозначаемых арабскими цифрами от 1 до 16 [2, 4].

Антигенный состав пастерелл во многом зависит от типа их колоний. Как известно, пастереллы, кроме трех типов колоний S, М и R, образуют промежуточные формы. Капсульный антиген характерный для гладкого типа S-колоний, никогда не встречается у штаммов с шероховатыми R-типа колониями. Это осложняет реакцию между антигенной субстанцией и капсульной антисывороткой. У слизистых культур капсульный антиген либо совсем отсутствует, либо имеется в недостаточном количестве, потому что этот вариант бактерий имеет гиалуроновую кислоту, которая входит в состав слизи. Данная кислота препятствует взаимодействию К-антигена с соответствующими антителами. Поэтому

потеря способности капсульного антигена культуры реагировать с капсульной антитысывороткой может быть одним из объективных признаков диссоциации, о чем свидетельствует существование «SR»-форм бактерий [5].

По данным литературных источников, *Pasteurella multocida* ферментирует без выделения газа глюкозу, галактозу, сахарозу, ксилозу, маннит, сорбит; микроорганизм неактивен в отношении раффинозы, мальтозы, арабинозы, дульцита, лактозы; образует индол, не всегда выделяет сероводород, молоко не пептонизирует, желатину не разжижает. По отношению к другим углеводам и многоатомным спиртам свойства пастерелл непостоянны и различны. Внутривидовая классификация пастерелл по их отношению к сахарам и близким к ним соединениям в принципе возможна по ферментации трегалозы, сорбита, мальтозы, но большее значение имеет при первичном выделении культуры и видовой идентификации пастерелл [6].

Изучение биохимических свойств возбудителя имеет значение для иммунобиологической оценки штаммов. Так, для разграничения штаммов *P. multocida*, выделенных от млекопитающих и птиц, предлагают использовать тест на определение фосфатазной активности выделенной культуры на твердых средах с участием фенолфталеина дифосфата натрия. Согласно данным Л. Караиванова (1984), выделенные от млекопитающих пастереллы обладают положительной фосфатазной активностью, выделенные от птиц – отрицательной. Автор рекомендует одновременно использовать и тест сбраживания арабинозы, и ксилозы. Выделенные изоленты пастерелл в случаях острой холеры птиц оказывают положительную реакцию на арабинозу и отрицательную на ксилозу, выделенные от млекопитающих пастереллы – наоборот. Ферментативная активность культур не зависит от степени содержания типоспецифического капсульного антигена [5, 7, 8].

Цель работы – изучение биохимических свойств музейных штаммов *Pasteurella multocida* серовариантов А, В, D.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры музейных штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выращенные на сердечно-мозговом бульоне:

- штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЕВ-67) – штамм-антиген;
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЕВ-68) – штамм-антиген;
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЕВ-69) – штамм-антиген.

Восстановление бактериологических культур из леофильной сушки проводили следующим образом: флакон с сухой культурой обрабатывали 70°-ным спиртом, обжигали в пламени спиртовки, вскрывали резиновую пробку, растворяли культуру в 1–2 см³ сердечно-мозгового бульона (Brain Heart Infusion Broth фирмы Biolab, Венгрия) и вносили ее в бактериологическую пробирку с сердечно-мозговым бульоном. Культивировали в течение 18–24 часов при температуре от +37 до +38 °С.

Для изучения биохимических свойств музейных штаммов *Pasteurella multocida* суточные бульонные культуры пересеивали на сердечно-мозговой агар (Brain Heart Infusion Agar фирмы Biolab, Венгрия) и культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм (фирма Бион, г. Минск) в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов.

Для оценки чистоты культуры готовили мазки, которые окрашивали по Граму с использованием готового набора красителей фирмы Sigma-Aldrich.

Изучаемую культуру в виде бактериальной суспензии изолированной колонии готовили в 3 см³ специального солевого раствора производства фирмы Biomerieux (кат. № V1204). Концентрацию измеряли прибором DensiCHEK plus фирмы Biomerieux.

Готовую суспензию с оптической плотностью 0,5–0,63 McF по шкале МакФарланда исследовали для изучения биохимических свойств на приборе Vitek 2 compact, используя кассеты Vitek 2 GN.

Выделение ДНК проводили колоноч-

ным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Концентрацию ДНК измеряли прибором «Nanodrop». Для обнаружения генома *Pasteurella multocida* серовариантов А, В, D использовали разработанную РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» тест-систему для обнаружения и определения серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* (А, В, D) в полимеразной цепной реакции

«Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* (А, В, D)» (ТУ BY 600049853.148-2015, г. Минск).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные прибора Vitek 2 compact по биохимическим свойствам музейных штаммов *Pasteurella multocida* объединили в таблицу для проведения сравнительного анализа.

Таблица 1. – Биохимические свойства музейных штаммов *Pasteurella multocida*

№	Тест	Сокращение	КМИЭВ-67	КМИЭВ-68	КМИЭВ-69
1	2	3	4	5	6
1	Ala-Phe-Pro-АРИЛАМИДАЗА	APPA	-	-	-
2	АДОНИТОЛ	ADO	-	-	-
3	L-пирролидонАРИЛАМИДАЗА	PyrA	-	-	-
4	L-АРАБИТ	IARL	-	-	-
5	D-ЦЕЛЛОБИОЗА	dCEL	-	-	-
6	БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	BGAL	-	-	-
7	ПРОДУКЦИЯ H ₂ S	H ₂ S	-	-	-
8	БЕТА-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗА	BNAG	-	-	-
9	Глютаминариламидаза pNA	AGLTp	-	-	-
10	D-ГЛЮКОЗА	dGLU	+	+	-
11	ГАММА-ГЛЮТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	GGT	-	-	-
12	СБРАЖИВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ	OFF	-	-	-
13	БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗА	BGLU	-	-	-
14	D-МАЛЬТОЗА	dMAL	-	-	-
15	D-МАННИТ	dMAN	+	-	+
16	D-МАННОЗА	dMNE	+	+	+
17	БЕТА-КСИЛОЗИДАЗА	BXYL	-	-	-
18	БЕТА-аланинариламидаза pNA	BAlap	-	-	-
19	L-пролинАРИЛАМИДАЗА	ProA	-	-	-
20	ЛИПАЗА	LIP	-	-	-
21	ПАЛАТИНОЗА	PLE	-	-	-
22	ТирозинАРИЛАМИДАЗА	TyrA	+	+	+
23	УРЕАЗА	URE	-	-	-
24	D-СОРБИТ	dSOR	-	-	-
25	САХАРОЗА	SAC	+	+	+
26	D-ТАГАТОЗА	dTAG	-	-	-
27	D-ТРЕГАЛОЗА	dTRE	-	-	-
28	ЦИТРАТ (НАТРИЯ)	CIT	-	-	-
29	МАЛОНАТ	MNT	-	-	-
30	5-КЕТО-D-ГЛЮКОНАТ	5KG	-	-	-
31	L-ЛАКТАТ, подщелачивание	ILATk	-	-	-
32	АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА	AGLU	-	-	-
33	СУКЦИНАТ, подщелачивание	SUCT	-	-	-
34	Бета-N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА	NAGA	-	-	-
35	АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	AGAL	-	-	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
36	ФОСФАТАЗА	PHOS	+	+	+
37	ГлицинАРИЛАМИДАЗА	GlyA	-	-	-
38	ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	ODC	-	-	-
39	ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗА	LDC	-	-	-
40	L-ГИСТИДИН, ассимиляция	IHISa	-	-	-
41	КУМАРАТ	CMT	-	+	-
42	БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗА	BGUR	-	-	-
43	УСТОЙЧИВОСТЬ К O/129 (вибриостат, агент)	O129R	-	-	-
44	Glu-Gly-Arg-АРИЛАМИДАЗА	GGAA	-	-	-
45	L-МАЛАТ, ассимиляция	IMLTa	-	-	-
46	ЭЛЛМАН	ELLM	-	+	-
47	L-ЛАКТАТ, ассимиляция	ILATa	-	-	-

Исходя из полученных данных, представленных в таблице 1, было установлено, что:

- музейный штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЕВ-67) расщепляет D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу;

- музейный штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЕВ-68) расщепляет D-глюкозу, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу, кумарат. Положительно реагирует с реактивом Элмана;

- музейный штамм *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЕВ-69) расщепляет D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу.

При проведении сравнительного анализа установлено, что музейный штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЕВ-68), в отличие от *Pasteurella multocida* (КМИЕВ-69) и (КМИЕВ-67), ферментирует кумарат, положительно реагирует с реактивом Элмана, но не ферментирует D-маннит.

В свою очередь, *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЕВ-69), в отличие от *Pasteurella multocida* (КМИЕВ-67) и (КМИЕВ-68), не ферментировал глюкозу.

Согласно полученным результатам, музейные штаммы *Pasteurella multocida* КМИЕВ-67, КМИЕВ-68, КМИЕВ-69, выде-

ленные от млекопитающих, ферментируют фосфатазу и не ферментируют L-арабит, что согласуется с литературными данными Л. Караиванова [7].

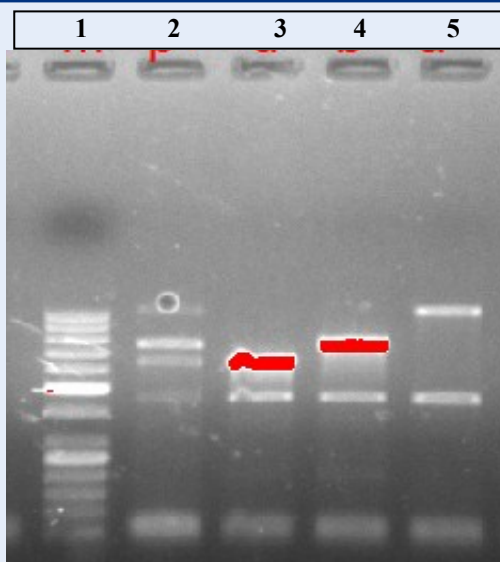
Однако на приборе Vitek 2 compact все три музейных штамма с вероятностью 96–99 % определились как *Pasteurella multocida* без указания серовариантной принадлежности.

В связи с необходимостью уточнения серовариантной принадлежности штаммов *Pasteurella multocida*, использованных в исследованиях, была проведена полимеразная цепная реакция тест-системой для обнаружения и определения серовариантной принадлежности *Pasteurella multocida* (А, В, D) в полимеразной цепной реакции «Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* (А, В, D)».

Амплификацию ДНК проводили в 23 мкл реакционной смеси с 2 мкл выделенной ДНК. Параметры амплификации были следующие:

- | | |
|------------------|-------------|
| 1. 95 °C – 5 мин | } 30 циклов |
| 2. 95 °C – 60 с | |
| 3. 55 °C – 60 с | |
| 4. 72 °C – 60 с | |
| 5. 72 °C – 7 мин | |

Электрофоретическую детекцию проводили в 2%-ном агарозном геле.



1 – маркер молекулярного веса 50 п.н.,
2 – положительный контрольный образец (соответственно сверху вниз – *Pasteurella multocida* A, *Pasteurella multocida* B, *Pasteurella multocida* D, *Pasteurella multocida*), 3 – *Pasteurella multocida* D, 4 – *Pasteurella multocida* B, 5 – *Pasteurella multocida* A

Рисунок 1. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации выделенной ДНК из музейных штаммов *Pasteurella multocida*

В результате проведения ПЦР установлено, что:

- штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЕВ-67) соответствует *Pasteurella multocida* серовариант А;
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЕВ-68) соответствует *Pasteurella multocida* серовариант В;
- штамм *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЕВ-69) соответствует *Pasteurella multocida* серовариант D.

ВЫВОДЫ

Проведенные биохимические исследования музейных штаммов *Pasteurella multocida* на приборе Vitek 2 compact показали, что *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЕВ-67) расщепляет D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу. *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЕВ-68) расщепляет D-глюкозу, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу, кумарат. Положительно реагирует с реактивом Элмана. *Pasteurella multocida* серовариант D (КМИЕВ-69) расщепляет D-маннит, D-маннозу, тирозинариламидазу, сахарозу, фосфатазу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрусевич, А.С. Пастереллез пушных зверей (этиологическая структура и специфическая профилактика): дис. ... канд. ветеринар. наук: 16.00.03 / А.С. Андрусевич. – Минск, 2008. – 154 с.
2. Blackall, P.J. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review / P.J. Blackall, J.K. Mifflin // Avian Pathol. – 2000. – Vol. 29. – P. 271–287.
3. Использование Multiplex ПЦР *Pasteurella multocida* A, B, D для выявления гетерогенности пастерелл в хозяйствах Республики Беларусь / Е.Л. Красникова [и др.] // Интеграция науки и практики для развития Агропромышленного комплекса: материалы всероссийской науч. конф. / ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, Тюмень, 10 ноября 2017 г. – С. 247–252.
4. Dabo, S.M. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease / S.M. Dabo, J.D. Taylor, A.W. Confer // Animal Health Research Reviews. – 2008. – V. 8(2). – P. 129–150.
5. Рустамов, Ю.М. Селекция *Pasteurella multocida* с полноценным капсульным антигеном / Ю.М. Рустамов // Бюл. Всесоюз. НИИЭВ им. Я.П. Коваленко. – 1982. – Вып. 45. – С. 17–19.
6. Мельников, Н.И. Ферменты патогенности и токсины бактерий / Н.И. Мельников, В.Н. Мельников, М.Г. Гирманов. – М.: Медицина, 1969. – 252 с.
7. Караиванов, Л. Биохимични тестове за идентифициране на *Pasteurella multocida* / Л. Караиванов // Вет.-мед. науки. – 1984. – Т. 86, № 8. – С. 38–44.
8. Козарев, А. Биохимично изследване на щамово *P. multocida*, изолирани от преживни животни / А. Козарев, М. Диан Ба // Сб. тр. – Харьков, 1988. – С. 28–29.