

**ВЫЯВЛЕНИЕ *Pasteurella multocida* И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПЯТИ ЕЕ КАПСУЛЬНЫХ ГРУПП ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ****А.В. НЕФЕДЧЕНКО<sup>1</sup>, А.Н. ШИКОВ<sup>2</sup>, А.Г. ГЛОТОВ<sup>1</sup>, Т.И. ГЛОТОВА<sup>1</sup>,  
В.А. ТЕРНОВОЙ<sup>2</sup>, Р.А. МАКСЮТОВ<sup>1, 2</sup>, А.П. АГАФОНОВ<sup>2</sup>, А.Н. СЕРГЕЕВ<sup>2</sup>**

Респираторные болезни молодняка крупного рогатого скота причиняют значительный экономический ущерб животноводству. В этиологии этих болезней существенная роль принадлежит бактерии *Pasteurella multocida*, у которой выявлено 5 капсульных групп (А, В, D, E, F), имеющих разное эпизоотологическое значение. Идентификация бактерий, основанная на результатах изучения их культурально-морфологических и биохимических свойств, — трудоемкий и длительный процесс. Методы молекулярной биологии, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяют быстро обнаружить и идентифицировать микроорганизмы непосредственно в пробах биологического материала, смешанных или чистых культурах. Целью нашего исследования стала разработка и изучение эффективности мультиплексной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для выявления культур *Pasteurella multocida* и генотипирования пяти капсульных групп (А, В, D, E, F). В работе использовали референтные штаммы *P. multocida* (1231, 681 и T80), культуры бактерий, выделенные от больных животных в 2013-2014 годах, а также 260 проб биоматериала (легкие, селезенка, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы), отобранных от павших телят в возрасте от 4 сут до 6 мес с признаками респираторных болезней. Олигонуклеотидные праймеры и зонды были разработаны на высококонсервативный ген *kmt1* и гены локуса капсульного синтеза (*hyaD*, *fcbD*, *dcfB*, *bcbD* и *ecbJ*), специфичные для капсульных групп. Для проверки чувствительности реакции использовали разработанные положительные контрольные образцы и суспензии культур референтных штаммов и изолятов. Специфичность реакции подтверждали секвенированием ампликонов. Чувствительность выявления ДНК бактерии для разных групп составила от  $1,6 \times 10$  до  $5,9 \times 10^2$  геномных эквивалентов на реакцию, неспецифических реакций не наблюдали. Диагностическая чувствительность разработанного метода составила при исследовании чистых культур  $10^3$  КОЕ/мл, при исследовании биологического материала —  $10^5$  КОЕ/г. Методом ПЦР типировали 11 культур бактерий, ранее охарактеризованных серологически и бактериологически, относящихся к капсульным группам А, В и D. Анализ последовательности гена *kmt1* подтвердил результаты ПЦР. При исследовании 260 проб биоматериала от больных животных обнаружили *Pasteurella multocida* в 63,3 % проб легких, 42,6 % — лимфатических узлов, 8,8 % — селезенки. Не установлена циркуляция среди восприимчивого поголовья животных бактерии *Pasteurella multocida* генотипов В и E. В большинстве исследованных проб были выявлены генотипы А, реже — D, в одном случае — F.

**Ключевые слова:** *Pasteurella multocida*, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, гены, капсульные группы.

*Pasteurella multocida* — грамотрицательная, неподвижная, факультативно анаэробная коккобактерия, входящая в состав комменсальной микрофлоры верхних дыхательных путей домашних и диких животных. Возбудитель вызывает септические и респираторные болезни крупного рогатого скота (КРС), которые причиняют значительный экономический ущерб животноводству во всем мире (1-2), в том числе в Российской Федерации (3-5). У бактерии выявлено пять капсульных групп (А, В, D, E, F), имеющих разное эпизоотологическое значение. Штаммы капсульных групп А и D участвуют в возникновении респираторных болезней телят и взрослых животных, В и E — геморрагической септицемии КРС и буйволов; F — в развитии септических и респираторных болезней телят (редко) (6-8).

Идентификация бактерий, основанная на изучении их культурально-морфологических и биохимических свойств, — трудоемкий и длительный процесс. Методы молекулярной биологии, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяют быстро обнаружить и идентифицировать микроорганизмы непосредственно в пробах биологического материала, смешанных или чистых культурах (9).

Для выявления бактерии и генотипирования ее капсульных групп разработано несколько тест-систем на основе ПЦР с электрофоретической детекцией результатов исследований (10-11), обладающих различной диагностической эффективностью (12). В отличие от них, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет повысить достоверность результатов диагностики за счет практически полного исключения контаминации, а также проводить количественную оценку ДНК-мишеней в анализируемом образце. В настоящее время описана одна ПЦР-РВ для выявления последовательности гена *est* у *P. multocida* серотипов В:2 и Е:2, ассоциированных с геморрагической септициемией крупного рогатого скота (13). Эта методика основана на использовании интеркалирующего красителя SYBR Green, с ее помощью невозможно дифференцировать капсульные группы бактерий.

Расшифровка нуклеотидной последовательности второго региона локуса синтеза капсулы *P. multocida* позволила идентифицировать уникальные для каждой капсульной группы гены, кодирующие белки, которые вовлечены в синтез группоспецифических капсульных полисахаридов. Ген *hyaD* отвечает за синтез гиалуроновой кислоты и уникален для штаммов группы А, *fcfD* — за синтез хондроитинсинтазы у F, *dcfF* — за синтез гликозида гепарана у D. Гены *bcfD* и *ecfJ* кодируют гликозилтрансферазу соответственно у штаммов капсульных групп В и Е. Также был идентифицирован высококонсервативный и уникальный для *P. multocida* ген белка клеточной стенки *kmt1* (14).

Нами впервые выполнен дизайн праймеров и TaqMan-зондов, которые позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью выявлять и генотипировать серогруппы бактерии *P. multocida* в мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Цель наших исследований состояла в разработке быстрого и высокочувствительного метода выявления *Pasteurella multocida* и генотипирования пяти ее капсульных групп в бактериальных суспензиях и пробах биологического материала от больных животных.

**Методика.** В работе использовали референтные штаммы *P. multocida* (1231, 681 и T80), а также *Mannheimia haemolytica* (штамм 16), полученные из коллекции культур микроорганизмов Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (г. Москва). Другие культуры бактерии *P. multocida* были выделены в Сибирском федеральном научном центре агробιοтехнологий РАН в 2013-2014 годах.

При исследовании внутренних органов животных биоматериалом служили 260 проб (легкие, селезенка, средостенные и бронхиальные лимфатические узлы), из которых готовили 10 % суспензии. Пробы были отобраны на шести крупных молочных комплексах в Тюменской, Новосибирской областях и Красноярском крае от павших телят голштино-фризской породы (возраст от 4 сут до 3 мес) с признаками респираторных болезней. Телята содержались в индивидуальныхдомиках или клетках при температуре от -5 до -9 °С («холодный метод»). Условия кормления и содержания соответствовали физиологическим и зоотехническим нормам.

ДНК из бактериальных суспензий и проб внутренних органов животных выделяли при помощи коммерческого набора Рибо-преп («ЦНИИ эпидемиологии», Россия).

Специфические праймеры и зонды подбирали в программе Vector NTI 9.0.0 («InforMax, Inc.», США) с использованием последовательностей генов *kmt1* и *cap locus* бактерии *P. multocida* (капсульные группы А, В, D, Е, F), депонированных в международной базе данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Реакцию амплификации проводили в режиме реального времени в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл ДНК-матрицы, 1× Taq буфер без Mg<sup>2+</sup> (ООО «Лаборатория Медиген», Россия), 3,3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTP, 150 нМ каждого праймера, 200 нМ каждого зонда, 1,5 е.а. SmartTaq ДНК-полимеразы (ООО «Лаборатория Медиген», Россия) и стерильную деионизированную воду. Все реакции осуществляли в следующем режиме: 5 мин при 95 °С; 15 с при 94 °С, 20 с при 53 °С, 20 с при 72 °С (45 циклов). Использовали амплификатор CFX96 («Bio-Rad», США); каналы детекции амплифицированных фрагментов — FAM/Green, ROX/Orange, Cy5/Red и R6G/Yellow при шаге циклирования 53 °С.

Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации *Escherichia coli* (штамм Top 10) плазмидами pCR<sup>®</sup> 2.1 («Invitrogen», США), содержащими специфические ДНК вставки амплифицированных генов бактерий. В качестве ДНК-вставок, специфичных для *P. multocida* капсульных групп E и F, использовали синтетические фрагменты ДНК. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли с помощью набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS («Invitrogen», США) на флуориметре QUBIT («Invitrogen», США).

Аналитическую чувствительность метода оценивали отдельно для каждого определения. Образцами служили 10-кратные разведения положительных контрольных проб. Диагностическую чувствительность метода устанавливали с использованием 10-кратных разведений культур *P. multocida* (CP-57, 681, МСК-13), концентрацию которых предварительно определяли стандартными бактериологическими методами. Чувствительность ПЦР оценивали при исследовании тканевого материала. Для этого к 900 мкл 10 % суспензии легкого или лимфатического узла добавляли 100 мкл разведения культуры бактерий, перемешивали, отстаивали и исследовали верхнюю водную фазу. Количество бактерий выражали в пересчете на число колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г ткани. ДНК из образцов выделяли, как описано выше.

Для подтверждения специфичности реакции амплифицированные фрагменты генов секвенировали с использованием набора реагентов BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits («Applied Biosystems», США). Полученные продукты анализировали методом капиллярного электрофореза в автоматическом секвенаторе ABI PRISM<sup>®</sup> 3130xl («Applied Biosystems», США).

**Результаты.** В ПЦР с помощью разработанных нами праймеров и зондов (табл. 1) были идентифицированы все исследованные референтные штаммы и культуры *P. multocida*; никаких неспецифических реакций мы не наблюдали (табл. 2).

### 1. Последовательности праймеров и флуоресцентно меченных зондов для выявления бактерии *Pasteurella multocida* и генотипирования ее капсульных групп

Ген-мишень	Праймер и зонд	Последовательность (5'→3')	Позиция	Референтная последовательность
Первая реакция				
<i>kmt1</i>	P.m.-Kmt1 F	ATAAGAAACGTAACSTCAACATGGAAATA	266-292	FJ986389
<i>(Pasteurella multocida)</i>	P.m.-Kmt1 R	GAGTGGGCTTGTCCGGTAGTCTT	456-477	
	P.m.-Kmt1 Z	(FAM)-AAACCGGCAATAACAATAAGCTGA-(BHQ1)	322-346	
<i>hyaD</i>	P.m.-A F	TTCGTTAAAAATGACAGCTATGC	9165-9187	AF067175
(капсульная группа A)	P.m.-A R	ATAATCGTCAGAAGCTCATGCG	9388-9367	
	P.m.-A Z	(R6G)-ATTTCTCAGCATTAACACATGATTGGAT-(BHQ1)	9217-9244	

<i>dcbF</i> (капсульная группа D)	P.m.-D F	ATCGCATCCAGAATAGCAAACCTC	3306-3328	AF302465
	P.m.-D R	TCCGATGCTTTGGTTGTGC	3661-3643	
	P.m.-D Z	(Cy5)-CCGATTTAAACTCAAATCTAGGGACATACTT-(BHQ2)	3350-3379	
Вторая реакция				
<i>bcbD</i> (капсульная группа B)	P.m.-B F	GCGTGTATAACCTACATCTTCCCA	12541-12564	AF169324
	P.m.-B R	CGTCCATCAACACCTTTACTGC	12708-12687	
<i>ecbI</i> (капсульная группа E)	P.m.-B Z	(FAM)-TAGGGACAGAATATTTCAAACCCCGT-(BHQ1)	12618-12643	
	P.m.-E F	TGGGCACATGCTCGCTTA	4539-4556	AF302466
	P.m.-E R	CTGCTTGATTTTGTCTTTCTCCTAA	4896-4872	
	P.m.-E Z	(ROX)-ATGTGGCAAAGCGATCAATTCAGA-(BHQ2)	4631-4654	
<i>fcbD</i> (капсульная группа F)	P.m.-F F	CGGAGAACGCAGAAATCAGAA	2885-2905	AF302467
	P.m.-F R	CAACAACGACTTCAAATGGGTAG	3142-3120	
	P.m.-F Z	(R6G)-CTTGCTCCATTGCCAGATCATGTT-(BHQ1)	2947-2970	

Примечание. Каждую пробу исследовали одновременно в двух реакциях. В первой выявляли бактерию *Pasteurella multocida* и генотипировали серогруппы А и D, во второй — генотипировали серогруппы В, Е и F.

## 2. Бактериальные культуры, использованные в работе, и результаты их генотипирования

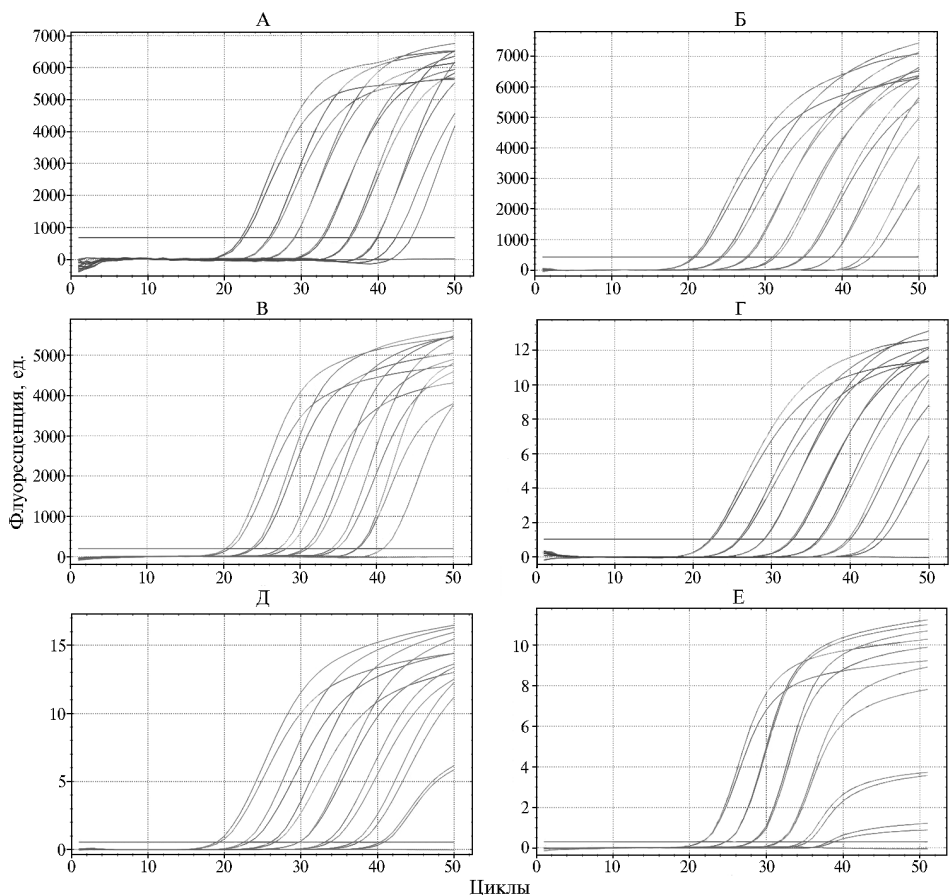
Вид бактерий	Штамм	Источник	Тестирование в ПЦР	
			<i>Pasteurella multocida</i>	генотип
<i>Pasteurella multocida</i>	1231	Коллекция культур микроорганизмов Всероссийского НИИ	+	A
	681	экспериментальной ветеринарии	+	B
	T-80	им. Я.Р. Коваленко	+	B
<i>Mannheimia haemolytica</i>	16		-	
<i>Escherichia coli</i>	F-50		-	
<i>Pasteurella multocida</i>	T-14	Коллекция Сибирского федерального центра агробиотехнологий	+	A
	MCK-13	РАН	+	D
	Sib-13		+	A
	Омск-13		+	A
	УК-59		+	A
	CP-57		+	A
	AGM/2013		+	A
	OB-58		+	A
	T-14		+	A
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Sib-13		-
Омск-13			-	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	УК-59		-	
<i>Clostridium perfringens</i>	CP-57		-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AGM/2013		-	
<i>Salmonella typhimurium</i>	OB-58		-	
<i>Salmonella paratyphimurium</i>			-	

Примечание. «+» — положительная реакция, «-» — отрицательная реакция.

Результаты капсульного генотипирования культур бактерий (см. табл. 2) совпадали с данными, полученными в ранее проведенных исследованиях (15). Анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов гена *kmtI* у изученных культур показал, что они имели 99-100 % идентичности с фрагментами гена *P. multocida*, представленными в базе данных GenBank (KP212385, KP212386, KP212387, KP212388, KP212389, KP212390, KP212391).

За аналитическую чувствительность теста принимали последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный. Образцы со значением порогового цикла  $C_t$ , не превышавшим 40, считали положительными. Аналитическая чувствительность метода составляла от  $1,6 \times 10$  до  $5,9 \times 10^2$  геномных эквивалентов (ГЭ) на реакцию (рис.).

Подобранные нами праймеры и зонды с одинаковой эффективностью выявляли *P. multocida* и позволяли генотипировать капсульные группы А, В и D. Диагностическая чувствительность тест-системы при исследовании бактериальной суспензии составила  $10^3$  КОЕ/мл, тканевого материала —  $10^5$  КОЕ/1 г ткани.



**Результаты оценки аналитической чувствительности тест-системы с использованием разведений положительных контрольных образцов (ПКО), полученных методом молекулярной трансформации *Escherichia coli* (штамм Top 10) плазмидами pCR® 2.1:** А — кривые флуоресценции на канале FAM/Green образцов ПКО/P.m.-Kmt1; Б — кривые флуоресценции на канале R6G/Yellow образцов ПКО/P.m.-А; В — кривые флуоресценции на канале Cy5/Red образцов ПКО/P.m.-D; Г — кривые флуоресценции на канале FAM/Green образцов ПКО/P.m.-B; Д — кривые флуоресценции на канале ROX/Orange образцов ПКО/P.m.-E; Е — кривые флуоресценции на канале R6G/Yellow образцов ПКО/P.m.-F. ПЦР и учет результатов осуществляли на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США). Исследования проводили в двух повторностях. Аналитическая чувствительность (в геномных эквивалентах — ГЭ) составила для ПКО/P.m.-Kmt1 —  $1,6 \times 10^3$ , ПКО/P.m.-А —  $7,2 \times 10^3$ , ПКО/P.m.-D —  $1,5 \times 10^2$ , ПКО/P.m.-B —  $9,0 \times 10^3$ , ПКО/P.m.-E —  $8,1 \times 10^3$ , ПКО/P.m.-F —  $5,9 \times 10^2$  ГЭ/реакцию.

### 3. Выявление *Pasteurella multocida* и генотипирование ее капсульных групп при исследовании органов павших телят голштино-фризской породы

Биоматериал	Число исследованных проб	Результаты исследования			
		выявление	капсульная группа		
			А	D	F
Легкие	161	102/63,3	89/88,2	12/10,8	1/0,9
Лимфатические узлы	54	24/42,6	20/86,9	3/13,0	1/4,3
Селезенка	45	4/8,8	3/75,0	0	1/25,0
<b>Всего</b>	<b>260</b>	<b>130/50,0</b>	<b>112/86,2</b>	<b>15/11,5</b>	<b>3/2,1</b>

Примечание. До и после косой — соответственно число положительных проб и доля от числа исследованных проб (выявление) или доля от числа проб, в которых была выявлена ДНК *P. multocida* (для капсульных групп).

Разработанный протокол постановки ПЦР применяли для анализа проб биологического материала от больных животных. Геном *P. multocida* был выявлен в 63,3 % проб легких, 42,6 % — лимфатических узлов, 8,8 % —

селезенки (табл. 3). В 82,6 % положительных проб выявили бактерию *P. multocida* генотипа А, 11,5 % — генотипа D, в трех пробах (2,1 %) — генотипа F. Обнаружение в большем количестве проб биологического материала бактерий капсульной группы А свидетельствует о том, что она играла более важную роль в развитии эпизоотической ситуации в обследованных нами хозяйствах, чем штаммы капсульной группы D. У одного животного в трех пробах генотипировали бактерию *P. multocida* капсульной группы F. Циркуляция генотипов В и Е среди восприимчивого поголовья не была установлена.

Таким образом, нами разработан метод выявления и генотипирования пяти капсульных групп (А, В, D, Е, F) бактерии *Pasteurella multocida* на основе полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. Предложенный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью при тестировании бактериальных культур и проб биологического материала от больных животных. Бактерии капсульной группы А были обнаружены в наибольшем числе проб. Разработанный протокол постановки ПЦР может быть использован в ветеринарных диагностических лабораториях как простой, доступный и легко воспроизводимый аналог серологического типирования, позволяющий выявлять бактерию *P. multocida* и генотипировать пять ее капсульных групп на всех этапах бактериологических исследований. Применение ПЦР в режиме реального времени позволит сократить длительность постановки диагноза, что будет способствовать оптимизации противоэпизоотических мероприятий, в частности выбору вакцин и разработке высокоэффективной программы профилактической иммунизации животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dabo S.M., Taylor J.D., Confer A.W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim. Health. Res. Rev., 2007, 8(2): 129-150 (doi: 10.1017/S1466252307001399).
2. Rimler R.B., Rhoades K.R. *Pasteurella multocida*. In: *Pasteurella and pasteurellosis* /С. Adlam, J.M. Rutter (eds.). Academic Press Limited, London, 1989.
3. Глотов А.Г., Петрова О.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В., Ветров Г.В., Сергеев А.Н. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. Ветеринария, 2002, 3: 17-21. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22435011>. Без даты.
4. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Котенева С.В., Будолов Н.Р., Кунгурцева О.В. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2008, 3: 72-78. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=9899939>. Без даты.
5. Шибяев М.А., Дудников С.А., Прохвятилова Л.Б. Выявление *Pasteurella multocida* у крупного рогатого скота в Центральном Федеральном округе: клинико-эпизоотологическая оценка. Ветеринарная патология, 2009, 4: 50-55. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=16769773>. Без даты.
6. Taylor J.D., Fulton R.W., Dabo S.M., Lehenbauer T.W., Confer A.W. Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. J. Vet. Diagn. Invest., 2010, 22(3): 366-375 (doi: 10.1177/104063871002200304).
7. Wilkie I.W., Harper M., Boyce J.D., Adler B. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2012, 361: 1-22 (doi: 10.1007/82\_2012\_216).
8. Haemorrhagic septicaemia, Chapter 2.4.12. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7 Edition. OIE, 2012: 732-744.
9. Терентьева Т.Е., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Сравнительная эффективность различных методов диагностики болезней крупного рогатого скота, вызываемых бактерией *Pasteurella multocida*. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2014, 3: 90-95. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=21732890>. Без даты.
10. Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M., Dawkins H.J. Development of PCR assays for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J. Clin. Microbiol., 1998, 36(4): 1096-1100.

11. Dziva F., Muhairwa A., Bisgaard M., Christensen H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol., 2008, 128(1-2): 1-22 (doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.018).
12. Adhikary S., Bisgaard M., Foster G., Kiessling N., Fahlén A.R., Olsen J.E., Christensen H. Comparative study of PCR methods to detect *Pasteurella multocida*. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 2013, 126(9-10): 415-22.
13. Petersen A., Bisgaard M., Townsend K., Christensen H. MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with hemorrhagic septicemia and development of a real-time PCR specific for hemorrhagic septicemia associated isolates. Vet. Microbiol., 2014, 170(3-4): 335-341 (doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.022).
14. Townsend K.M., Boyce J.D., Chung J.Y., Frost A.J., Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J. Clin. Microbiol., 2001, 39(3): 924-929 (doi: 10.1128/JCM.39.3.924-929.2001).
15. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Неведченко А.В., Терентьева Т.Е. Типирование культур бактерий *Pasteurella multocida*, выделенных от крупного рогатого скота, при помощи ПЦР. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2013, 2: 88-93. Режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=19080328>. Без даты.

<sup>1</sup>ФГБУН Сибирский ФНЦ агrobiотехнологий РАН,  
Институт экспериментальной ветеринарии Сибири  
и Дальнего Востока,

630501 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н,  
р.п. Краснообск, СФНЦА РАН, а/я 463,  
e-mail: nav-vet@mail.ru, glotov\_vet@mail.ru, t-glotova@mail.ru;

<sup>2</sup>ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»,

630559 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово,  
e-mail: shikov\_nsk@mail.ru, tern@vector.nsc.ru, agafonov@vector.nsc.ru,  
sergeev@vector.nsc.ru, maksyutov\_ra@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию  
30 мая 2016 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, V. 52, № 2, pp. 401-408

## DETECTION AND GENOTYPING *Pasteurella multocida* OF FIVE CAPSULAR GROUPS IN REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

A.V. Nefedchenko<sup>1</sup>, A.N. Shikov<sup>2</sup>, A.G. Glotov<sup>1</sup>, T.I. Glotova<sup>1</sup>, V.A. Ternovoy<sup>2</sup>,  
R.A. Maksyutov<sup>1, 2</sup>, A.P. Agafonov<sup>2</sup>, A.N. Sergeev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Federal Agency of Scientific Organizations, p/b 463, r.p. Krasnoobsk, Novosibirsk Region, Novosibirsk Province, 630501 Russia, e-mail nav-vet@mail.ru, glotov\_vet@mail.ru, t-glotova@mail.ru (corresponding author);

<sup>2</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk Region, Novosibirsk Province, 630559 Russia, e-mail shikov\_nsk@mail.ru, tern@vector.nsc.ru, agafonov@vector.nsc.ru, sergeev@vector.nsc.ru, maksyutov\_ra@vector.nsc.ru

ORCID:

Nefedchenko A.V. [orcid.org/0000-0002-4181-4268](http://orcid.org/0000-0002-4181-4268)

Shikov A.N. [orcid.org/0000-0002-7051-6091](http://orcid.org/0000-0002-7051-6091)

Glotov A.G. [orcid.org/0000-0002-2006-0196](http://orcid.org/0000-0002-2006-0196)

Glotova T.I. [orcid.org/0000-0003-3538-8749](http://orcid.org/0000-0003-3538-8749)

The authors declare no conflict of interests

Received May 30, 2016

Ternovoy V.A. [orcid.org/0000-0003-1275-171X](http://orcid.org/0000-0003-1275-171X)

Maksyutov R.A. [orcid.org/0000-0003-1314-281X](http://orcid.org/0000-0003-1314-281X)

Agafonov A.P. [orcid.org/0000-0003-2577-0434](http://orcid.org/0000-0003-2577-0434)

Sergeev A.N. [orcid.org/0000-0001-7883-6017](http://orcid.org/0000-0001-7883-6017)

doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.401eng

### Abstract

Respiratory diseases in calves cause significant economic losses in livestock. Bacterium *Pasteurella multocida* plays important role in the etiology of these diseases. It is known that five identified *P. multocida* capsular groups (A, B, D, E and F) differently affect animal epizooty. Identification of bacteria based on the cultural, morphological, biochemical properties is very labor-intensive and time-consuming. Molecular biology techniques, in particular, the polymerase chain reaction (PCR), quickly detect and identify microorganisms directly in samples of biological material, mixed or pure cultures. In this regard, the purpose of our research was to develop multiplex real-time PCR for the detection, genotyping and discrimination of five *P. multocida* capsular groups (A, B, D, E and F) in cattle. The target primers and probes to the highly conserved gene *kmt1* and the genes in the loci of capsule synthesis (*hyaD*, *fcvD*, *dcvF*, *bcvD* and *ecvJ*) specific to the capsular groups have been designed. The sensitivity of DNA detection for different bacterial groups ranged from  $1.6 \times 10^2$  to  $5.9 \times 10^2$  genomic equivalents per reaction, non-specific reactions were not observed. The diagnostic sensitivity of the test was  $10^3$  CFU/ml for pure cultures and  $10^5$  CFU/g for biological material. The developed PCR protocol allowed us to type 11 bacterial cultures which were previously characterized serologically and bacteriologically and related to capsular groups A, B, and D. The *kmt1* gene sequencing confirmed the results of PCR analysis. PCR analysis of 260 samples from died

calves detected *P. multocida* in lung (63.3 %), the lymph nodes (42.6 %), and spleen (8.8 %). We did not revealed the circulation of *P. multocida* B and E capsular groups among the tested livestock, the majority of the samples contained *P. multocida* group A, in some cases, there was group D, and, in one case, group F.

Keywords: bacteria, *Pasteurella multocida*, real-time PCR, genes, capsular groups.

## ЮБИЛЕЙ Юрия Николаевича Федорова: полвека научной деятельности



18 января 2017 года главному научному сотруднику отдела иммунологии Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности (ВНИТИБП), члену-корреспонденту Российской академии наук, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, доктору биологических наук, профессору Юрию Николаевичу Федорову исполнилось 75 лет, из них 50 — это годы активной научной, производственной и общественной деятельности. Чествование юбиляра прошло в зале ученого совета ВНИТИБП.

Ю.Н. Федоров родился 18 января 1942 года в деревне Белянка Моршанского района Тамбовской области. С отличием окончил Томский сельскохозяйственный техникум, Омский государственный ветеринарный институт и Абаканский государственный педагогический институт (биологический факультет). В 1968 году поступил в аспирантуру при лаборатории иммунитета Всероссийского института экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ) под руководством академика ВАСХНИЛ Якова Романовича Коваленко, где прошел все ступени служебного научного роста. С 1982 года он возглавил лабораторию иммунологии Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, проработав в этой лаборатории со дня ее основания 40 лет. Ю.Н. Федоров — ведущий ученый в отечественной ветеринарной иммунологии, чей значительный вклад во многом определяет научную политику в этой области знаний. С 2008 года по 2010 года Ю.Н. Федоров был заместителем директора ВНИТИБП, с 2011 года — главный научный сотрудник отдела иммунологии. Сфера его научных интересов — иммунология, биотехнология, микробиология, механизмы иммунной защиты, иммунологический мониторинг, оценка иммунного статуса и диагностика иммунодефицитных состояний, иммунокорректирующая терапия и иммунопрофилактика, клиническая ветеринарная иммунология и иммунопатология, иммунобиотехнология.

Ю.Н. Федоров принадлежит к школе выдающегося деятеля отечественной и мировой ветеринарной науки, доктора ветеринарных наук, профессора, академика ВАСХНИЛ, заслуженного деятеля науки РСФСР Якова Романовича Коваленко. Блестящая научная школа и личностные качества сформировали научный стиль Ю.Н. Федоров, в котором интуитивность исследователя сочетается с точностью, тщательностью, ответственностью, научной корректностью и бескомпромиссностью, глубокой образованностью. Им проведены фундаментальные исследования иммунобиологической реактивности организма животных в онтогенезе, роли иммунных механизмов в формировании устойчивости к инфекционным болезням у новорожденных животных, роли колострального иммунитета и его влияния на формирование поствакцинального иммунитета. Под его руководством и при непосредственном участии разработаны унифицированные методы иммунологического мониторинга, получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к отдельным изотипам иммуноглобулинов, определены диагностические и иммунокорректирующие алгоритмы иммунодефицитов животных.

Ю.Н. Федоров — автор и соавтор более 300 фундаментальных работ в области ветеринарной иммунологии и иммунобиотехнологии, опубликованных в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе им написаны шесть монографий. Им разработаны 30 нормативных и методических документов на создание диагностических, вакцинных препаратов, гибридных клеточных культур (гибридом), методов и средств иммунотерапии и иммунокоррекции. Научная новизна исследований защищена 25 авторскими свидетельствами и патентами на изобретения. Ю.Н. Федоровым создана научная школа в области ветеринарной иммунологии и биотехнологии, подготовлены 24 доктора и кандидата наук.

Ю.Н. Федоров награжден дипломами и медалями ВДНХ, ВВЦ, медалью «В память 850-летия Москвы», почетными грамотами Россельхозакадемии, РАМН, Министерства науки и технологий РФ, ВАК Министерства образования и науки РФ за успехи в научной, производственной деятельности, подготовку и аттестацию научных кадров высшей квалификации.

Ю.Н. Федоров многие годы был заместителем председателя экспертного совета по зоотехническим и ветеринарным наукам Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ, он член диссертационных советов, эксперт Российской академии наук, член редколлегии ряда ведущих научных журналов («Ветеринария», «Российский ветеринарный журнал», «Нива Поволжья», «Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии»). Юрий Николаевич Федоров — активный член редакционного совета журнала «Сельскохозяйственная биология» и его постоянный автор.