



УДК 619:616.98:579.843.95-07:636.2

Т.Е. ТЕРЕНТЬЕВА, младший научный сотрудник,
Т.И. ГЛОТОВА, доктор биологических наук, заведующая лабораторией,
А.Г. ГЛОТОВ, доктор ветеринарных наук, заведующий отделом,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор

ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири
и Дальнего Востока Россельхозакадемии
e-mail: qlotov_vet@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫЗЫВАЕМЫХ БАКТЕРИЕЙ *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Представлены результаты сравнительного изучения трех методов диагностики болезней крупного рогатого скота, вызываемых бактерией *Pasteurella multocida*: бактериологического и биохимического метода исследований, а также полимеразной цепной реакции. Общепринятые методы бактериологической диагностики и изучения биохимических свойств не дают возможность определять принадлежность культур и штаммов бактерии к генотипу. Для определения эффективности метода ПЦР на различных этапах бактериологической диагностики рассчитывали коэффициент (k) совпадения результатов. В результате бактериологических исследований проб биоматериала от больных животных на искусственных питательных средах выделено 60,4 % культур бактерии *P. multocida*, а методом ПЦР выявили 49,2 % положительных проб ($p > 0,005$, $k = 0,76$). От белых мышей патогенных культур бактерии реизолировали в 52,3 % случаев, что подтверждено повторным исследованием в ПЦР ($k = 1$). У всех изолированных культур бактерий установлены биохимические свойства, характерные для *P. multocida*. По результатам типирования 41,2 % выделенных культур отнесены к виду *P. multocida*, из них 67,2 % принадлежат генотипу А и 26,8% – генотипу D. Установлено, что ПЦР эффективна на всех этапах бактериологической диагностики болезней крупного рогатого скота, вызываемых *P. multocida*, и позволяет определять генотипы бактерий.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, респираторные болезни, пастереллез, полимеразная цепная реакция, *Pasteurella multocida*, генотип.

Болезни, вызываемые бактериями семейства Pasteurellaceae, распространены повсеместно и причиняют значительный экономический ущерб животноводству. Их роль возрастает в связи с интенсификацией молочного скотоводства [1–4]. *Pasteurella multocida* – патогенная грамотрицательная бактерия, классифицированная на 5 капсульных (А, D, В, Е и F) и 16 соматических серотипов (1–16), но бронхопневмонии у телят чаще вызывают бактерии серотипов А и D [5, 6].

Бактериологические исследования часто затруднены из-за возможной контаминации проб материала другими микроорганизмами, и для выделения чистых культур бактерий требуется длительное пассирование на искусственных питательных средах, а для видовой идентификации – изучение культурально-морфологических, биохимических свойств и их патогенности для лабораторных животных [7, 8]. Существенным недостатком также является трудоемкость и длительность исследований.

В последнее время широкое применение в ветеринарии получила полимеразная цепная реакция (ПЦР), имеющая преимущества в скорости, чувствительности и специфичности и обладающая способностью определять генотип бактерии [6, 9, 10], что особенно важно при планировании противоэпизоотических мероприятий, в частности при выборе вакцин.

Цель работы – сравнительное изучение применения бактериологического и биохимического метода исследований, а также полимеразной цепной реакции для диагностики болезней, вызываемых бактерией *P. multocida*, у крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали референтные штаммы *P. multocida* «1231» (серотип А), «681» (В), «Т80» (D), полученные из коллекции культур микроорганизмов ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (Москва), а также 67 культур бактерий, выделенных нами. Пробы биоматериала отбирали от животных различных половозрастных групп, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами, не позднее 4 ч после их гибели или вынужденного убоя. Пробы биоматериала замораживали однократно и транспортировали в течение 12 ч в лабораторию в термосе со льдом во избежание повторного оттаивания и замораживания.

Изучение культурально-морфологических, биохимических и патогенных свойств культур бактерий проводили согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллезов животных и птиц [8]. Биопробу проводили на 187 беспородных белых мышах массой 18–20 г.

Выделение ДНК бактерий осуществляли при помощи набора «Рибо-преп» (ООО «Интерлабсервис», Москва). Исследовали суспензии внутренних органов крупного рогатого скота и выделенных культур бактерий; внутренних органов белых мышей и реизолированных от них культур. Для определения эффективности метода ПЦР на различных этапах бактериологической диагностики рассчитывали коэффициент (k) совпадения результатов [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все выделенные от животных культуры бактерий имели одинаковые морфологические свойства. В большинстве случаев в мазках, окрашенных по Граму, они располагались изолированно, реже парами и короткими цепочками, были грамотрицательными. В мазках-отпечатках из органов животных, окрашенных по Романовскому – Гимзе, пастереллы чаще всего имели биполярность – более интенсивное окрашивание полюсов бактериальной клетки. Они представляли собой короткие эллипсоидные кокко-овоидные палочки.

Культуры *P. multocida*, выделенные от животных различных половозрастных групп, существенно не различались между собой и референтными штаммами по биохимическим свойствам и имели стабильные признаки, которые можно использовать для их видовой идентификации [12, 13].

При патологоанатомическом вскрытии у белых мышей, зараженных высокопатогенными культурами бактерий *P. multocida*, отмечали септи-

ко-токсические изменения разной интенсивности. Возможно, высокая патогенность (50,9 %) части культур связана с выделением их из легких, отобранных от больных животных с острой стадией бронхопневмонии, когда у культур бактерий присутствовала капсула и функционировал ген *Kmt*, предположительно отвечающий за их патогенность. Наличие слабопатогенных (38,5 %) и непатогенных культур *P. multocida* (8,9 %) может быть связано с отсутствием у них капсулы или выделением других представителей семейства Pasteurellaceae, циркулирующих среди животных.

Известно, что вирулентность культур пастерелл зависит от наличия капсульного антигена, присутствие которого установлено лишь у высоковирулентных штаммов. Максимальное количество жизнеспособных бактерий, сохраняющих характерные культурально-морфологические, биохимические свойства и капсулу, обладающих высокой патогенностью, выявляют у 10–12-часовых культур, что соответствует фазе их логарифмического роста. Более длительное культивирование на питательных средах сопровождается снижением количества капсул и гибелью бактерий [3, 4].

Всего при помощи ПЦР генотипировано 67 культур бактерии *P. multocida*, изученных ранее бактериологическими и биохимическими методами; 67,2 % из них отнесли к генотипу А, 26,8 % – D. В 5,9 % культур, выделенных из легких крупного рогатого скота, выявили одновременно два генотипа (см. таблицу). У исследованных культур бактерий не выявили принадлежность к генотипам В, Е и F.

Таким образом, генотипирование методом ПЦР 67 культур бактерии *P. multocida*, охарактеризованных ранее бактериологическими и биохимическими методами, прошедших не менее трех-четырех пассажей на искусственных питательных средах и хранящихся при температуре 4 °С, подтвердило их родовую и видовую принадлежность. Исследование в ПЦР 10 культур, прошедших пять–восемь пассажей на искусственных питательных средах, дало отрицательный результат. Возможно, это связано со снижением или утратой функционирования у них капсульного гена *Kmt1*, на который были синтезированы использованные в работе праймеры, что косвенно подтверждается отсутствием или низкой патогенностью 8,9 % исследованных культур. Наши результаты согласуются с данными Э.А. Шегидевича (1993 г.) о том, что длительное пассирование культур пастерелл приводит к потере их вирулентности. Они могут быть полезными при изучении функционирования генов патогенности бактерий и сохранения вирулентных свойств в лабораторных условиях.

При помощи общепринятых методов не удастся установить принадлежность штаммов бактерии к конкретным серотипам, поскольку они

Генотипирование культур бактерии *P. multocida* по гену *Kmt1*

Культуры бактерии <i>P. multocida</i>	Число исследованных культур	Результаты генотипирования культур бактерии, всего/%		
		А	D	А + D
Выделенные из легких животных	33	21/63,6	10/3	2/6
Реизолированные от мышей	34	24/70,5	8/23,5	2/5,8
Всего...	67	45/67,2	18/26,8	4/5,9



Сравнительная эффективность методов выявления *P. multocida* от животных

чаще всего дают видоспецифические характеристики. Возможной альтернативой может стать метод генотипирования при помощи ПЦР, позволяющий выявлять и типировать культуры бактерии на всех стадиях выделения и изучения их свойств [9, 10].

Для изучения эффективности ПЦР на разных этапах бактериологической диагностики провели исследования суспензии внутренних органов крупного рогатого скота и белых мышей, а также культур бактерий, выделенных на искусственных питательных средах и реизолированных из органов белых мышей (см. рисунок). В среднем в 49,2 % исследованных проб биоматериала от больных животных выявлены бактерии *P. multocida*, а на питательных средах их выделили из 60,4 % проб ($p > 0,005$, $k = 0,76$). От белых мышей реизолировали патогенные культуры бактерии в 52,3 % случаев, что подтверждено повторным исследованием в ПЦР ($k = 1$). Разница между первичным и повторным исследованиями в ПЦР не достоверна ($p > 0,005$, $k = 1$).

Количество выделенных культур превышало на 11,2 % положительные результаты первичного исследования проб биоматериала методом ПЦР, что можно объяснить выделением на питательных средах непатогенных (бескапсульных) культур бактерий или представителей других родов, имеющих сходную с *P. multocida* морфологию и биохимические свойства. Не все выделенные на питательных средах культуры бактерий были патогенными для белых мышей. В связи с этим количество положительных проб биоматериала на этапе бактериологических исследований выше на 8,1 % проб, патогенных для белых мышей. Разница между выявлением положительных проб при первичном и повторном исследованиях в ПЦР составила 3,1 %, что можно объяснить погрешностью метода или техническими причинами. Результаты исследования патогенных культур, реизолированных от белых мышей и ПЦР, полностью совпали.

ВЫВОДЫ

1. Культуры *P. multocida*, выделенные от животных различных половозрастных групп, по культурально-морфологическим и биохимиче-

ским свойствам не отличались между собой и референтными штаммами бактерии. Из них 50,9 % были высокопатогенными для белых мышей, 38,5 % – слабо патогенными. Количество непатогенных культур составило 8,9 %.

3. ПЦР эффективна на всех этапах бактериологических исследований болезней крупного рогатого скота, вызванных *P. multocida*. При первичном исследовании проб биоматериала от больных животных она выявляла 49,2 % положительных проб, а при исследовании культур бактерий, выделенных из этих проб на искусственных питательных средах, – 60,4% ($p > 0,005$, $k = 0,76$). Результаты исследования патогенных культур, реизолированных от белых мышей и ПЦР, полностью совпали.

4. ПЦР дает возможность определить генотип у выделенных культур *P. multocida*: 67,2 % культур бактерий были отнесены к генотипу А и 26,8 % – D; 5,9 % культур содержали генетический материал двух генотипов.

5. Метод ПЦР экономически целесообразен и по эффективности в 1,3 раза превосходит стандартный метод бактериологической диагностики, а по срокам постановки – в 2,5 раза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Терентьева Т.Е. и др. Особенности проявления легочного пастереллеза молодняка КРС в хозяйствах по производству молока // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2012. – № 2. – С. 55–61.
2. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В. и др. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2008. – № 3. – С. 72–78.
3. Стрельчя И.И. Изучение определяющей роли серовариантов *Pasteurella multocida*, выделенных от телят в инфекционной патологии // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2006. – № 2. – С. 32–34.
4. Шегидевич Э.А. Роль пастерелл в респираторной патологии овец и крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – М., 1993. – 42 с.
5. Dabo S.M., Taylor J.D., Confer A.W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease // Animal Health Research Reviews. – 2008. – Vol. 8(2). – P. 129–150.
6. Ewers C., Lubke-Becker A., Bethe S. et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status// Veterinary Microbiology. – 2006. – Vol. 114. – P. 304–317.
7. Джупина С.И., Колосов А.А. Особенности течения пастереллеза у животных в Западной Сибири // Ветеринария. – 1992. – № 5. – С. 37–40.
8. Методические указания по лабораторной диагностике пастереллезов животных и птиц. – М.: МСХ РФ, 1992. – № 22-7/82. – 10 с.
9. Kuhnert P., Christensen P., Kuhnert H. *Pasteurellaceae*: Biology, Genomics and Molecular Aspects // Horizon Scientific Press. – 2008. – 267 p.
10. Townsend K.M., Frost A.J., Le C.W. et al. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – P. 1096–1100.
11. Fleiss J.L. Statistical methods for rates and proportions // 2nd ed. John Wiley & Sons. – New York, 1981. – 103 p.
12. Сидоров М.А., Геведзе В.И. Пастереллез животных // Ветеринария. – 1983. – № 10. – С. 3–5.
13. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник. – М.: Колос, 1995. – С. 227–233.

Поступила в редакцию 13.05.2014

T.E. TEREYTYEVA, Junior Researcher,
T.I. GLOTOVA, Doctor of Science in Biology, Laboratory Head,
A.G. GLOTOV, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Department Head,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East,
Russian Academy of Agricultural Sciences
e-mail: qlotov_vet@mail.ru*

COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT METHODS FOR DIAGNOSING DISEASES IN CATTLE CAUSED BY BACTERIUM PASTEURELLA MULTOCIDA

Results are given from a comparative study on effectiveness of three methods for diagnosing cattle diseases caused by bacterium *Pasteurella multocida*, which are bacteriological and biochemical analyses as well as the PCR method. Conventional bacteriological methods and study of biochemical properties do not make possible to determine genotypes of cultures and strains. To evaluate the effectiveness of the PCR method at different stages of bacteriological diagnosis, we calculated the coefficient of coincidence, k . By bacteriological analyses of samples from sick animals on artificial nutrient media were isolated 60.4 percent of *P. multocida* cultures, by the PCR method were detected 49.2 percent of positive samples ($p > 0.005$, $k = 0.76$). From white mice were reisolated 52.3 percent of pathogenic cultures that was confirmed by reinvestigation with PCR tests ($k = 1$). All isolated bacteria cultures demonstrated biochemical properties, characteristic of *P. multocida*. As a result of typing, 41.2 percent of isolated cultures were attributed to *Pasteurella multocida*, 67.2 percent of them belonged to genotype A, and 26.8 percent genotype B. It has been found that PCR is effective at all stages of bacteriological diagnosis of diseases in cattle caused by *P. multocida* and allows us to determine genotypes of bacterium.

Keywords: cattle, respiratory diseases, pasteurellosis, polymerase chain reaction, *Pasteurella multocida*, genotype.

УДК 619-615.099.092

С.А. БОЛЯХИНА, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник,
Г.Ф. НАСАРТДИНОВА, научный сотрудник,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор,
Е.А. КОРОБКОВА*, начальник отдела,
А.Н. ДЕНИСОВ*, председатель совета директоров,
Ю.А. КРУТЯКОВ**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник

*ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока
Россельхозакадемии,*

**Группа компаний «АгроХимПром»,*

***ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
e-mail: hohl08@rambler.ru*

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА АРГУМИСТИН

Приведены данные по токсическим свойствам ветеринарного лекарственного средства Аргумистин с массовым содержанием коллоидного серебра 10 и 50 мкг/мл, хлорида бензил-диметил[3-(миристоиламино)-пропил]аммония моногидрата 100 мкг/мл в лекарственной форме раствора для местного и внутреннего применения. Препарат Аргумистин относится к малоопасным химическим веществам при введении в желудок лабораторным животным со-