

УДК 579.8.06:579.25

К.А. Шораева, Т.М. Тленчиева*, К.Т. Султанкулова,
В.М. Строчков, С.О. Садикалиева, М.Б. Орынбаев, Р.А. Рыстаева,
Н.Т. Сандыбаев, А.Р. Сансызбай

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Республика Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский

*E-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru

Определение типа и серотипа штаммов бактерии рода *Pasteurella*, выделенных от сайгаков на территории Республики Казахстан

В данной работе представлены результаты риботипирования и серотипирования штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, выделенных от павших сайгаков в 2010 – 2011 гг. на территории Республики Казахстан методом ПЦР (полимеразная цепная реакция). С помощью данного анализа определен вид, подтип и серотип бактерии рода *Pasteurella*. Результаты риботипирования и филогенетического анализа по гену 16S показали, что исследуемые казахстанские штаммы относятся к бактериям рода *Pasteurella*, к виду *multocida* и подтипу *multocida*. Также данные сравнительного анализа исследуемых штаммов между собой показали 100% идентичности. Методом серотипирования с использованием капсуло-специфических праймеров для capA, capB, capD, capE и capF выявлено, что штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* относятся к серотипу B.

Ключевые слова: сайгак, *Pasteurella multocida*, ПЦР (полимеразная цепная реакция), типирование, риботипирование.

K.A. Shorayeva, T.M. Tlenchiyeva, K.T. Sultankulova,
V.M. Storchkov, S.O. Sadikaliyeva, N.T. Sandybayev, M.B. Orynbayev,
R.A. Rystayeva, N.T. Sandybayev, A.R. Sansyzbay

Determination of the type and serotype strains of bacteria *Pasteurella* isolated from saigas on the territory Republic of Kazakhstan

This paper presents the results of ribotyping and serotyping of strains *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* and *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, isolated from dead saiga in 2010 – 2011 on the territory of the Republic of Kazakhstan by PCR (polymerase chain reaction). With this kind of analysis is defined subtype and serotype of bacteria of the genus *Pasteurella*. The results of ribotyping and phylogenetic analysis of 16S gene showed that the studied Kazakhstan strains belong to the bacteria of genus *Pasteurella*, to *multocida* and subtype *multocida*. Also, these comparative analyzes of studied strains between themselves showed a 100 % identity. Serotyping method using the Capsule -specific primers for capA, capB, capD, capE and capF is found that the strains *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* and *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* are belongs to the serotype B.

Key words: saiga, *Pasteurella multocida*, PCR (polymerase chain reaction), typing, ribotyping.

К.А. Шораева, Т.М. Тленчиева, К.Т. Султанкулова,
В.М. Строчков, С.О. Садикалиева, М.Б. Орынбаев, Р.А. Рыстаева,
Н.Т. Сандыбаев, А.Р. Сансызбай

Қазақстан Республикасының территориясында киіктерден бөлініп алынған *Pasteurella* тектес бактерия штамдарының типі мен серотипін анықтау

Бұл жұмыста Қазақстан Республикасының территориясында 2010 және 2011 жылдар аралығында киіктерден бөлініп алынған *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* және *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* штамдары ПТР (полимераздық тізбекті реакция) әдісінің көмегімен риботиптеу және серо-

типтеу нәтижелері көрсетілді. Бұл талдаудың көмегімен *Pasteurella* тектес бактерияның түрі, типі және серотипі анықталды. Зерттеліп отырған қазақстандық штамдар 16S гені бойынша риботиптеу және филогенді талдаудың нәтижелері *Pasteurella* тектес бактерия және *multocida* түріне, *multocida* типіне жататынын көрсетті. Сонымен қатар салыстырмалы талдаудың нәтижелері бойынша зерттеліп отырған штамдар бір-бірімен 100%-ға ұқсас екендігі көрсетілді. Серотиптеу әдісімен *capA*, *capB*, *capD*, *capE* және *capF* гендері үшін капсулды-арнайы праймерлерін қолдана отырып киіктерден бөлініп алынған *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* және *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* штамдары В серотипіне жататыны анықталды.

Түйін сөздер: киік, *Pasteurella multocida*, ПТР (полимераздық тізбекті реакция), типтеу, риботиптеу.

Введение

В настоящее время основная роль в развитии смешанных септических и респираторных инфекций сайгаков отводится бактериям, прежде всего *Pasteurella multocida*, *Clostridium perfringens*. В связи с этим представляется актуальным усовершенствование методов выявления вышеуказанных микроорганизмов, основанных на применении методов молекулярной биологии и генной диагностики [1].

В современное время в мире основное поголовье сайгаков – подвид *Saiga tatarica*, благодаря принимаемым мерам по их охране, сохранилось только в Казахстане. Сайгаки исчезли в Китае, Туркменистане, около 5 тыс. сайгаков мигрирует из Казахстана на сопредельную территорию Узбекистана, и более десятка тысяч сайгаков содержится в питомнике в Калмыкии. Другой подвид сайгака – *Saiga tatarica tatarica* (порядка 3,5 тыс. особей) – восстанавливается в Монголии [1, 2].

Эпидемию, которая буквально косит ценных животных, в Казахстане уже назвали трагедией национального масштаба. Болезнь всего за несколько дней значительно сократила популяцию сайги в Казахстане. В ряде научных источников *Pasteurella multocida* представлена гетерогенным видом возбудителя, способного продуцировать септические или респираторные инфекции у сайгаков [2].

Пастереллез – инфекционная болезнь домашних и диких животных, вызываемая бактериями рода *Pasteurella*, относящихся к семейству *Pasteurellaceae*, включающий 9 видов. Вид *Pasteurella multocida* является типичным представителем рода. В зависимости от конкретного типа капсульных антигенов *Pasteurella multocida* имеет серологические различия и подразделяется на капсульные серогруппы (A, B, D, E, F) [3-6].

Целью данной работы является определение типа и серотипа штаммов бактерии рода *Pasteurella*, выделенного от павших сайгаков

на территории Республики Казахстан в 2010-2011 гг. молекулярно-генетическим методом.

Материалы и методы

Биоматериалы. Объектом для исследований являлись штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, выделенные от павших сайгаков в 2010 – 2011 гг. на территории Республики Казахстан.

Выделение бактериальной ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческого набора «PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent» фирмы Applied Biosystems, согласно протоколу производителя.

Риботипирование. Для риботипирования штаммов бактерии рода *Pasteurella* использовали праймеры P16Sf: 5'-AGAGTTTGTATYMTGGC-3' и P16Sr: 5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3' [7]. При амплификации смесь ПЦР содержал: 1x ПЦР-буфера 4мМ MgCl₂ и 1,25 U Taq ДНК-полимеразы, 200 мкМ дНТФ, по 10 пмоль праймера и 2,5 мкл исследуемых ДНК образца. Начальная денатурация прошла при 95°C в течение 5 минут, после 35 циклов денатурации при 94°C в течение 30 сек, отжиг при температуре 55°C в течение 30 сек и репликация при 68°C в течение 1 мин. Пост-репликация ПЦР прошла при 68°C в течение 7 мин [8]. Детекцию ПЦР продуктов провели на 2% агарозном геле в 1 x TAE буфере с бромистым этидием.

Капсульное типирование *Pasteurella multocida*. Типирование исследуемых штаммов проводили с помощью ПЦР анализа с использованием капсуло-специфических праймеров для *capA*, *capB*, *capD*, *capE* и *capF* [7].

Секвенирование. ДНК бактерий *Pasteurella* секвенировали методом дидеоксисеквенирования с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов (метод Сенгера) на автоматическом 16-капиллярном секвенаторе Genetic Analyser 3130 xl, Applied Biosystems.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время для дифференциации штаммов семейства *Pasteurellaceae* эффективным инструментом является риботипирование. Применяемость риботипирования бактерии рода *Pasteurella* на основе генов P16S и P23S рРНК высоко оценивается в исследовании молекулярной эпидемиологии [8].

Известно, что все бактериальные рРНК локусы содержат гены 16S и 23S фрагментов. Эти гены обладают изменчивостью на уровне родов и видов.

Для риботипирования проведена ПЦР с использованием пар праймеров P16Sf (AGAGTTT-GATYMTGGC) и P16Sr (GYTACCTTGTTAC-GACTT). Электрофореграмма ПЦР продуктов размером 1480 п.о. по гену P16S штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* представлена на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, при проведении ПЦР наработаны продукты размером 1480 п.о. на ген 16S рРНК, размер продукта совпадает с литературными данными [7]. Для дальнейших исследований отдельные полосы ДНК элюировали из геля с целью их секвенирования.

Методом прямого секвенирования нами была определена нуклеотидная последовательность гена P16S исследуемых штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, выделенных от сайгаков на территории Республики Казахстан в 2010-2011 гг. Сравнительный анализ исследуемых штаммов между собой показали 100% идентичности.

Дальнейшие исследования были направлены на проведение сравнительного анализа и составления филогенетического родства гена P16S исследуемых штаммов с имеющимися в международном банке генов Genbank различными видами и подвидами бактерии *Pasteurella*. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых генов проводили с помощью компьютерных программ Vector NTI Suite 9, BioEdit и BLAST (на сайте NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Результаты исследований по филогенетическому анализу представлены на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, казахстанские штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* отнесены к виду *multocida* и подтипу *multocida*. В эту группу входят такие штаммы, как «PM 30» *Pasteurella* sp. *multocida multocida*, выделенный от КРС в Канаде [4], и «PM 36» *Pasteurella* sp. *multocida multocida*, выделенный от птиц в Австралии [5]. А также штаммы видов и подтипов *Pasteurella* sp. *multocida septica* и *Pasteurella* sp. *multocida gallicida* находятся в отдельной ветке.

Таким образом, сравнительный филогенетический анализ бактериальных штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, выделенных от павших сайгаков в 2010-2011 гг. на территории Республики Казахстан с данными международной базы Генбанка показал, что штаммы имеют высокую степень гомологичности с пастереллезными штаммами вида *multocida* и подтипа *multocida*.

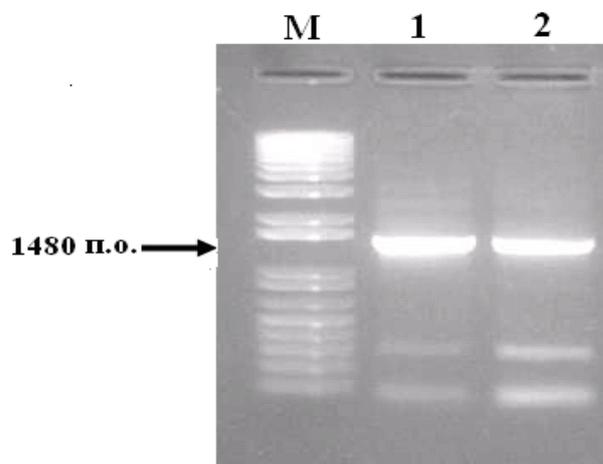


Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов по гену P16S штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*

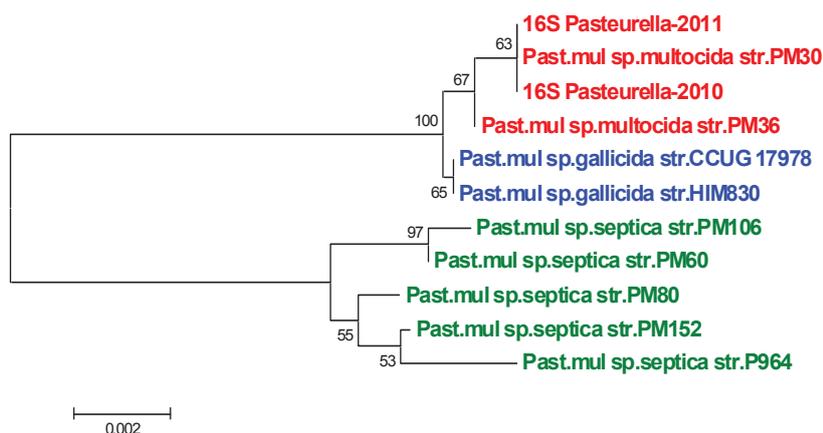


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево штаммов и изолятов *Pasteurella multocida* по гену 16S

В зависимости от конкретного типа капсульных антигенов *Pasteurella multocida* имеет серологические различия и подразделяется на капсульные серогруппы (A, B, D, E, F). В наших экспериментах капсульное типирование штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и

Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ проводили, используя праймеры на гены *hyaD*, *bcbD*, *dcfF*, *ecbJ*, и *fcfD*, которые соответствуют капсульным группам A, B, D, E, F [9]. Праймеры для определения капсульных серогрупп *Pasteurella multocida* приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры для определения капсульных серогрупп *Pasteurella multocida*

№	Капсульные серогруппы	Праймер	Последовательности праймеров
1	A	<i>hyaDs</i>	GATGCCAAAATCGCAGTCAG
		<i>hyaDa</i>	TGTTGCCATCATGTGTCAGTG
2	B	<i>bcbDs</i>	CATTTATCCAAGCTCCACC
		<i>bcbDa</i>	GCCCGAGAGTTTCAATCC
3	D	<i>dcfFs</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC
		<i>dcfFa</i>	CATCTACCCACTCAACCATATCAG
4	E	<i>ecbJs</i>	TCCGCAGAAAATTATTGACTC
		<i>ecbJa</i>	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC
5	F	<i>fcfDs</i>	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG
		<i>fcfDa</i>	TTCCGCCGTCATTACTCTG

При проведении капсульного типирования исследуемых штаммов с помощью ПЦР, продукт нарабатался с использованием только праймеров *bcbDs* (CATTTATCCAAGCTCCACC) и *bcbDa* (GCCCGAGAGTTTCAATCC) на серогруппу B. Результаты ПЦР продуктов представлены на рисунке 3.

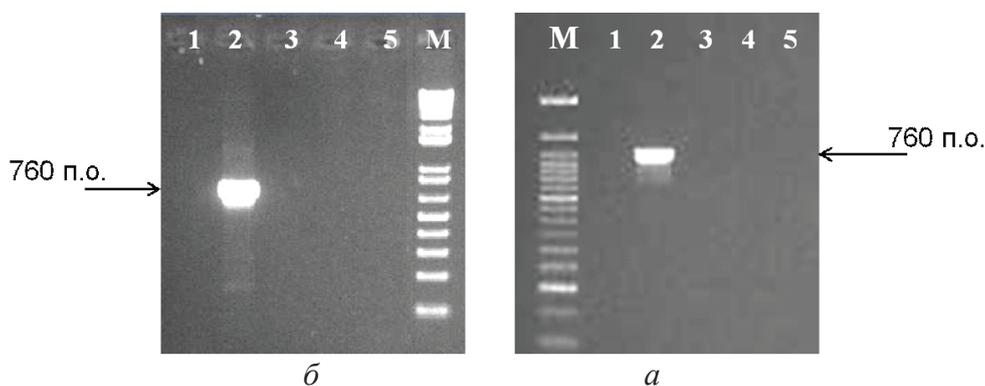
Из рисунка 3 видно, что изоляты *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* относятся к серотипу B, так как при

серотипировании исследуемых изолятов нарабатался ПЦР продукт с размером 760 п.о. на серотип B, размер продукта совпадает с литературными данными [7].

Как известно, бактерии *Pasteurella* серогруппы B размножаются в месте первичного внедрения в макроорганизм, далее попадают в лимфатическую систему и кровь, вызывая септицемию. Тогда как бактерии *Pasteurella* других серогрупп проникают в другие органы, вызывая

воспалительные процессы в организме. Например, бактерии *Pasteurella* серогруппы А проникают в легкие, где размножаются, продукты их жизнедеятельности разрушают стенки кровеносных сосудов, вызывая вначале гиперемию и отек, затем крупозное воспаление легких. Необ-

ходимо отметить, что при создании противопастереллезных вакцин нужно знать, какие серогруппы и серовары циркулируют в том или ином регионе страны, и соответственно, с каким пастереллезом в каждом конкретном случае приходится иметь дело.



1 – А тип; 2 – В тип; 3 – D тип; 4 – E тип; 5 – F тип.
М – 1 kb маркер Invitrogen, М – 50 kb маркер Invitrogen

Рисунок 3 – Капсульное типирование штаммов *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* (А) и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* (Б)

Заключение

Определение подтипа и выявление капсульных серогрупп бактерии рода *Pasteurella* осуществляется с помощью ПЦР анализа. По данным ПЦР анализа, секвенирования ПЦР продуктов и сравнительного анализа по 16S гену штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* относятся к подтипу *Pasteurella multocida*.

По результатам филогенетического анализа по гену 16S штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/*

ZKO/KZ и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ* относятся к виду *multocida* и подвиду *multocida*. Впервые с помощью ПЦР анализа в популяции сайги выявлена циркуляция серотипа В бактерии *Pasteurella multocida* по гену *bcbD*.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что штаммы *Pasteurella/Saigas/2010/ZKO/KZ* и *Pasteurella/Saigas/2011/ZKO/KZ*, выделенных от павших сайгаков в 2010 – 2011 гг. на территории Республики Казахстан относятся к бактериям рода *Pasteurella*, виду *multocida*, подтипу *multocida* и серогруппе В.

Литература

- 1 Орынбаев М.Б., Рыстаева Р.А., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Коспанова М.Н., Кыдырбаев Ж.К. Случаи массовой гибели уральской популяции сайгаков в Казахстане // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. ISSN: 2074-5036. –2013. – №1. – С. 20–26.
- 2 Грачев Ю.А., Бекенов А.Б. Массовая гибель сайгаков в Казахстане – погибло около 12000 особей // Saiga news. – 2010. – С. 2–3.
- 3 Robert L. Davies Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene // Microbiology. – 2004. – P. 4199–4210.
- 4 Patrick J. Blackall et al. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia // Microbiology. – 1998. – P. 279–289.
- 5 Townsend K.M., Dawkins J.S., Paradimitriou J.M. REP PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause hemorrhagic septicemia // Res. Vet. Sci. – 1997. –V. 63 (2). – P.151 – 155.

- 6 Rademaker L.W., De Bruijn F.L. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis // New York. – 1997. – P. 151–171.
- 7 Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M., Dawkins J.S. Development of PCR assays for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates // J. Clin. Microbiol. – 1998. – V. 36 (4). – P. 1096–1100.
- 8 Christensen H., Angen O., Olsen J.E., Bisgaard M. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium* // Microbiology. – 2004. – P. 1757–67.
- 9 Xibiao T., Zhanqin Z., Junyong H., Bin W., Xuwang C., Qigai H., Huanchun C. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – P. 951–958.

References

- 1 Orynbaev M.B., Rystaeva R.A., Kerimbaev A.A., Kopeev S.K., Kospanova M.N., Kydyrbaev Zh.K. Sluchai massovoj gibeli ural'skoj populjacii sajgakov v Kazahstane // Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii. ISSN: 2074-5036. –2013. – №1. – P. 20–26.
- 2 Grachev Ju.A., Bekenov A.B. Massovaja gibel' sajgakov v Kazahstane – pogiblo okolo 12000 osobej // Saiga news. – 2010. – P. 2–3.
- 3 Robert L. Davies Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene // Microbiology. – 2004. – P. 4199–4210.
- 4 Patrick J. Blackall et al. Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia // Microbiology. – 1998. – P. 279–289.
- 5 Townsend K.M., Dawkins J.S., Papadimitriou J.M. REP PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause hemorrhagic septicemia // Res. Vet. Sci. – 1997. – V. 63 (2). – P.151–155.
- 6 Rademaker L.W., De Bruijn F.L. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis // New York. – 1997. – P. 151–171.
- 7 Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M., Dawkins J.S. Development of PCR assays for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates // J. Clin. Microbiol. – 1998. – V. 36 (4). – P. 1096–1100.
- 8 Christensen H., Angen O., Olsen J.E., Bisgaard M. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium* // Microbiology. – 2004. – P. 1757–1767.
- 9 Xibiao T., Zhanqin Z., Junyong H., Bin W., Xuwang C., Qigai H., Huanchun C. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – P. 951–958.