

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук, доцент

Струк М.С., старший научный сотрудник

Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук, доцент

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

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме

В статье приведены данные по биохимическим свойствам эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Принадлежность штаммов к виду *Pseudomonas aeruginosa* подтверждена в полимеразной цепной реакции.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, штаммы, биохимические свойства, полимеразная цепная реакция.

Summary

The article presents data on the biochemical properties of epizootic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The belonging of the strains to the species *Pseudomonas aeruginosa* was confirmed by polymerase chain reaction.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, strains, biochemical properties, polymerase chain reaction.

Поступила в редакцию 28.11.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время особую актуальность приобрели так называемые факторные болезни, в этиологии которых участвуют различные условно патогенные микроорганизмы. Особое значение в этом плане занимает *Pseudomonas aeruginosa*, обладающая высокой устойчивостью к условиям внешней среды и резистентностью к ряду применяемых в настоящее время химиотерапевтических и антибактериальных препаратов. На сегодняшний день отмечается усиление роли *Pseudomonas aeruginosa* в этиологии заболеваний и тяжелых инфекционных осложнений не только у пушных зверей, но и других видов животных и птицы [1, 2, 3].

Псевдомоноз – это группа бактериальных болезней, характеризующихся у молодняка септическим процессом, поражением легких, желудочно-кишечного тракта и суставов, а у взрослых особей – репродуктивных органов и молочной железы. Возбудителем псевдомоноза является грамотрицательная аэробная бактерия *Pseudomonas aeruginosa*, которая по антигенной структуре подразделяется на 20 серологических групп [4].

Определение видовой принадлежности штаммов, а также подтверждение их аутентичности (установление подлинности по свойствам, заявленным в паспорте на момент поступления) в процессе воспроизводства с учетом требований современной систематики бактерий является одним из важных направлений деятельности коллекций микроорганизмов [5].

Традиционно установление таксономической принадлежности микроорганизмов основывается на изучении их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и генетических свойств. Ключевым тестом при определении аутентичности является изучение биохимической активности патогена с использованием комбинированных (комплексных) сред Клигlera, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: системы индикаторные бумажные – СИБ (Ниžний Новгород), АПИ стрипы – API® (Bio-Mérieux, Франция) и др. [6, 7]. Это не всегда позволяет окончательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бакте-

рия, идентифицированная по фенотипическим свойствам как определенный вид, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [8].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроизводстве референтных штаммов, используемых в производственной, диагностической и образовательной деятельности, свойства которых недостаточно изучены, т.к. выделение и описание их осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [9].

На сегодняшний день существует ряд методов для идентификации микроорганизмов. Но не все из них могут быть применимы на практике при определении серовариантной принадлежности *Pseudomonas aeruginosa* из-за своей сложности, трудоемкости и длительности.

Поэтому особое внимание в таких исследованиях стоит уделять микробиологическим анализаторам типа Vitek 2 (BioMérieux, Франция), которые позволяют проводить максимально упрощенный процесс идентификации на основе анализа более 40 различных биохимических свойств бактерий. Вторым наиболее современным методом, позволяющим идентифицировать микроорганизмы и выделять их ДНК за сравнительно короткий промежуток времени, считается полимеразная цепная реакция (ПЦР). Она позволяет идентифицировать *Pseudomonas aeruginosa* до вида или подвида с использованием таких молекулярно-биологических тестов, как ERIC и RAPD PCR.

Цель работы – изучение биохимических свойств при идентификации эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры эпизоотических штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выращенные на сердечно-мозговом бульоне (фирма Sigma).

Для изучения биохимических свойств эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* суточную бульонную культуру пересеивали на сердечно-мозговой

агар (Brain Heart Infusion Agar фирмы Bio-olab, 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 культур готовили мазки, которые окрашивали по Граму с использованием готового набора красителей фирмы Sigma-Aldrich.

Исучаемые культуры 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 российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб», согласно инструкции по его применению. Для обнаружения генома *Pseudomonas aeruginosa* использовали смеси для ПЦР, содержащие специфические праймеры к нуклеотидной последовательности гена *gyrB* генома *Pseudomonas aeruginosa*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При микроскопии мазков по Граму, сделанных из бульонных культур, *Pseudomonas aeruginosa* имели вид грамотрицательных палочек размером 0,5–1,0×1,5–3,0 мкм (рисунок 1).



Рисунок 1. – Морфология культуры *Pseudomonas aeruginosa* под микроскопом после окраски по Граму

С помощью микробиологического анализатора Vitek 2 compact проведена расширенная идентификация взятых в исследование эпизоотических штаммов *Pseudo-*

monas aeruginosa по биохимическим свойствам, полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Биохимические свойства эпизоотических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

№ п/п	Тест	Сокраще- ние	Эпизоотические штаммы <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
			1	2	3	4	5
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	Глютамилариламидаза 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-ЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА	NAGA	-	-	-	-	-
35	АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	AGAL	-	-	-	-	-
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	+	+	+	+	+

При анализе биохимических свойств установлено, что все эпизоотические штаммы с вероятностью 99 % определялись как *Pseudomonas aeruginosa* без указания серовариантной принадлежности. При этом эпизоотический штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 1 ферментировал глютаминариламидазу, гамма-глютаминилтрансферазу, бета-аланинариламидазу, l-пролинариламидазу, d-глюкозу, d-маннит, d-маннозу, малонат и кумарат. Утилизировал цитрат (натрия) и подщелачивал L-лактат с сукцинатом. Обладавал способностью роста в присутствии вибриостатического агента O/129R, а также к ассимиляции L-малата и L-лактата.

Эпизоотический штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 2, в отличие от *Pseudomonas aeruginosa* № 1, не ферментировал глютаминариламидазу, d-маннит и малонат, но сбрасывал липазу. Также в присутствии вибриостатического агента O/129R не обладал способностью роста.

В свою очередь эпизоотический штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 3 обладал теми же биохимическими свойствами, что и *Pseudomonas aeruginosa* № 1, за исключением способности к ферментации тирозинариламидазы.

Эпизоотический штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 4 по своим биохимиче-

ским свойствам схож с предыдущими штаммами, но имел ряд своих особенностей. В отличие от *Pseudomonas aeruginosa* № 2, ферментировал глютаминариламидазу и малонат, обладал способностью роста в присутствии вибриостатического агента o/129R. Но, в свою очередь, как и *Pseudomonas aeruginosa* № 2, не ферментировал d-маннит, чем отличался от *Pseudomonas aeruginosa* № 1 и *Pseudomonas aeruginosa* № 3.

Pseudomonas aeruginosa № 5 обладал большинством биохимических свойств всех предыдущих штаммов, но наибольшее отличие имел от *Pseudomonas aeruginosa* № 2.

Для подтверждения данных о принадлежности эпизоотических штаммов к виду *Pseudomonas aeruginosa*, полученных с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 compact, нами была проведена ПЦР, результат которой показал, что все исследованные штаммы содержат геном *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 2).

Амплификацию ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл выделенной ДНК. 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 2 mM хлорида магния, и 1 ЕД Tag-полимеразы (ОДО Праймтех, Минск), таблица 2.

Таблица 2. – Программа амплификации

Амплификатор с активным регулированием (по раствору в пробирке)		Кол-во повторов
температура	время	
95 °C	3 мин	1
95 °C	20 сек	40
57 °C	30 с	
72 °C	30 с	
10 °C	хранение	—

Электрофоретическую детекцию проводили в 2%-ном агарозном геле (рисунок 2), где М – маркер молекулярного

веса, 2–5 штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, К+ – положительный контроль, К- – отрицательный контроль.

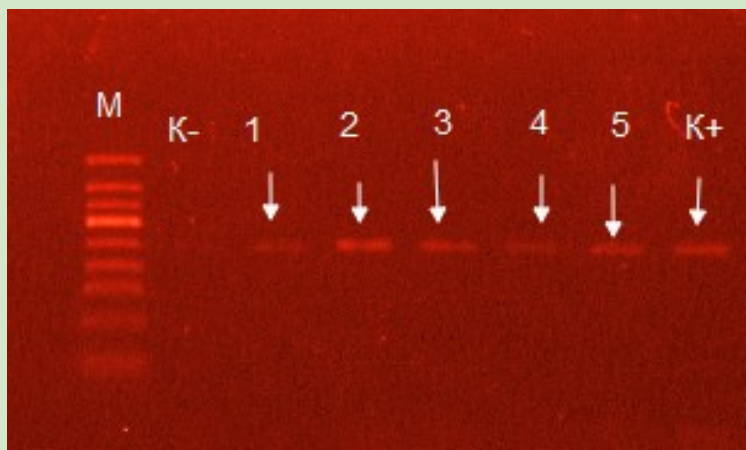


Рисунок 2. – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК, выделенных из музейных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в агарозном геле

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы установлена видовая принадлежность всех взятых в исследование эпизоотических штаммов как *Pseudomonas aeruginosa*. Благодаря анализу результатов по взаимодей-

ствию изучаемых штаммов с дифференцирующими субстратами можно предположить, что они относятся к разным серовариантам за счет аутентичности их биохимических свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африканов, С. Г. Роль синегнойной палочки в патологии птиц / С. Г. Африканов, А. К. Силин, Г. И. Пилинко // *Современные средства и методы борьбы с заразными болезнями с.-х. птиц.* – 1988. – Т. 4. – № 2. – С. 89–91.
2. Корж, Б. А. Роль синегнойной палочки в патологии новорождённых телят / Б. А. Корж, Я. Д. Злотквич, И. И. Гевкан // *Ветеринария.* – Вып. 65. – Киев, 1990. – С. 37–41.
3. Селиванов, А. В. Псевдомоноз норки / А. В. Селиванов, Н. К. Седов // *Инфекционные болезни животных: справочник*; под ред. Д. Ф. Осидзе. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 255–256.
4. Псевдомоноз животных / И. А. Болоцкий [и др.] – М.: Колос, 2010. – 223 с.
5. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // *Microbiology.* – 2012; 79:73–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
6. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
7. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
8. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика лактобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород: изд. Ю.А.Николаев, 2009. – 248 с.
9. Белова, Л. Н. Биологические коллекции Российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты.* – 2013. – Т. 5. – С. 10–8.