

Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Мистейко М.М., кандидат ветеринарных наук, доцент
Стрельчяня И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент
Струк М.С., старший научный сотрудник
Мальчик О.В., научный сотрудник

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

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

Резюме

В статье приведены данные по биохимическим свойствам музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Принадлежность штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae* подтверждена в полимеразной цепной реакции с помощью разработанной РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» тест-системы для обнаружения генома *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Ключевые слова: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, штаммы, биохимические свойства, полимеразная цепная реакция.

Summary

The article provides data on the biochemical properties of museum strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The belonging of the strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* was confirmed in the polymerase chain reaction using the developed RUE «Institute of experimental veterinary medicine nam. of S.N. Wyshellessky» test system for detecting the genome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, strains, biochemical properties, polymerase chain reaction.

Поступила в редакцию 24.05.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Актинобациллярная плевропневмония свиней (АПП) – инфекционное контактно-зоонозное заболевание, которое характеризуется при остром течении геморрагическим воспалением лёгких и фибринозным плевритом, а при подостром и хроническом – развитием очагово-гнойной некротической плевропневмонии и фибринозного плеврита.

Возбудитель актинобациллярной плевропневмонии – НАД-зависимые бактерии *Actinobacillus pleuropneumoniae*, относящиеся к семейству *Pasteurellaceae*. Они требовательны к составу питательных сред и для своего роста нуждаются в добавлении сыворотки и никотинамиддинуклеотида (НАД). НАД, или V-фактор, – это фермент, участвующий в клеточном дыхании бакте-

рий, который у актинобацилл отсутствует. Источником его служит дрожжевой экстракт, химически чистый НАД и кровь животных [1, 2].

При серологической идентификации актинобацилл установлено 15 серовариантов данного возбудителя. Пять из них (1, 5, 9, 10, 11) обладают большой вирулентностью [3].

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 в исследовании коллекций микроорганизмов [4].

Традиционно установление таксоно-

мической 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 Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем (системы индикаторные бумажные – СИБ, АПИ-стрипы – API® («Bio-Mérieux», Франция) и др.) [5, 6]. Это не всегда позволяет окончательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам определенным видом, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [7].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроизводстве референтных штаммов, используемых в производственной, диагностической и образовательной деятельности. Их свойства недостаточно изучены, т.к. выделение и описание осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [8].

В ряде случаев для правильной видовой идентификации требуется расширить перечень используемых субстратов с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 («Bio-Mérieux», Франция), позволяющего одновременно изучать более 60 различных биохимических свойств бактерий.

Наиболее полно отвечает требованиям метод выявления ДНК возбудителя, основанный на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью ПЦР удается обнаружить крайне малое количество актинобацилл, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма определенному сероварианту актинобацилл.

Цель работы – изучение биохимических свойств музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточные культуры музейных штаммов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», выращенные на сердечно-мозговом бульоне с добавлением никотинамиддинуклеотида («Sigma», США):

- штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В169) – штамм-антиген;
- штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В170) – штамм-антиген.

Восстановление бактериологической культуры 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, «Biolab», Венгрия) и вносили ее в бактериологическую пробирку с сердечно-мозговым бульоном с добавлением НАД. Культивировали при температуре 37–38 °С в течение 18–24 ч.

Для изучения биохимических свойств музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae* суточные бульонные культуры пересеивали на сердечно-мозговой агар (Brain Heart Infusion Agar «Biolab», Венгрия) с добавлением НАД и культивировали в чашках Петри диаметром 90 мм («Бион», г. Минск) в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч.

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

Изучаемую культуру в виде бактериальной суспензии изолированной колонии готовили в 3 см³ специального солевого раствора производства «Bio-Mérieux» (кат. № V1204). Концентрацию измеряли прибором DensiCHEK plus («Bio-Mérieux», Франция).

Готовую суспензию с оптической плотностью 0,5–0,63 McF по шкале Мак-

Фарланда исследовали для изучения биохимических свойств на приборе Vitek 2 compact, используя кассеты Vitek 2 GN.

Выделение ДНК проводили колоночным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Концентрацию ДНК измеряли прибором «Nanodrop». Для обнаружения генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* использовали смеси, содержащие специфиче-

ские праймеры к участку генома 16S *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные прибора Vitek 2 compact по биохимическим свойствам музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae* внесены в таблицу для проведения сравнительного анализа.

Таблица. – Биохимические свойства музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*

№ п/п	Тест	Сокращение	КМИЭВ-В169	КМИЭВ-В170
1	2	3	4	5
1	Аla-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-глутамилтрансфераза	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	+	-

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5
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	-	-
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 K 0/129 (вибриостат, агент)	O129R	-	-
44	Glu-Gly-Arg-ариламидаза	GGAA	-	-
45	L-малат, ассимиляция	IMLTa	-	-
46	Эллман	ELLM	+	+
47	L-лактат, ассимиляция	ILATa	-	-

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

- музейный штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В169) – штамм-антиген сбраживает сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Эллмана;

- музейный штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В170) – штамм-антиген сбраживает сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Эллмана.

В связи с необходимостью подтверждения принадлежности штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, использованных в

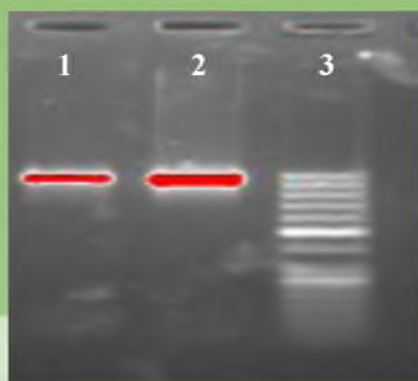
исследованиях, была проведена полимеразная цепная реакция.

Аmplификацию ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл выделенной ДНК, 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 3 mM хлорида магния и 1 ЕД Таg-полимеразы (ОДО «Праймтех», г. Минск).

Параметры амплификации 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 – штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В169), 2 – штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* (КМИЕВ-В170), 3 – маркер молекулярного веса 50 п.н.

Рисунок. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации выделенной ДНК из музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae*

В результате проведения ПЦР установлено, что штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* КМИЕВ-В169 и штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* КМИЕВ-В170 содержат геном *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

ВЫВОДЫ

1. Проведены биохимические исследования музейных штаммов *Actinobacillus pleuropneumoniae* на приборе Vitek 2 сопраст и подтверждена их принадлежность *Actinobacillus pleuropneumoniae* с помощью тест-системы методом полимеразной цепной реакции.

2. Штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* КМИЕВ-В169 сбраживает сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Эллмана.

3. Штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae* КМИЕВ-В170 сбраживает сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Эллмана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоров, М. А. Гэмофилезы животных / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов. – М. : Агротромиздат, 1986.
2. Сидоров, М. А. Специфическая профилактика гемофилезной плевропневмонии свиней / М. А. Сидоров // Ветеринарные проблемы пром. свиноводства. – Киев, 1983. – № 4. – С. 102–106.
3. Amano, H. Serotype and drug susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from the nasal cavities of clinically healthy pigs / H. Amano, N. Kajio, M. Shibata // J. Japan Veter. Med. Assn. – 1989. – Vol. 8, № 3. – P. 179–183.
4. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // Microbiology. – 2012; 79. – P. 73–118.
5. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М. : Медицина, 1982. – 464 с.
6. 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.
7. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород : Изд. Ю. А. Николаев, 2009. – 248 с.
8. Белова, Л. Н. Биологические коллекции российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 10–18.