

УДК 619:616-076(619:616.98:578.831.31)

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2022-1-61-67>

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

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

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* И *HAEMOPHILUS PARASUIS*

Резюме

Сконструированы отечественные ПЦР-системы для обнаружения геномов возбудителей актинобациллярной плевропневмонии и гемофильного полисерозита, проведен скрининг нуклеотидных последовательностей, подобраны специфические праймеры, указаны параметры проведения ПЦР. Приведены данные чувствительности, специфичности ПЦР и повторяемости результатов.

Ключевые слова: ПЦР, свиньи, диагностика, гемофильный полисерозит, актинобациллярная плевропневмония, респираторная инфекция, респираторная патология.

Summary

Domestic PCR systems have been designed to detect the genomes of the pathogens of actinobacillary pleuropneumonia and hemophilic polyserositis, screening of nucleotide sequences has been carried out, specific primers have been selected, and PCR parameters have been worked out. Sensitivity, specificity and repeatability results are given.

Keywords: PCR, pigs, diagnostics, hemophilic polyserositis, actinobacillary pleuropneumonia, respiratory infection, respiratory pathology.

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудители актинобациллярной плевропневмонии (АПП) и гемофильного полисерозита входят в состав так называемого комплекса респираторной патологии свиней [1, 2, 3].

Интенсификация производства свинины привела к тому, что возбудители АПП и гемофильного полисерозита стали выделяться из пораженных легких свиней на всех этапах их выращивания [2].

Эти заболевания чаще регистрируются в крупных свиноводческих хозяйствах, в стадах с иммунодефицитом и характеризуются при остром течении геморрагическим воспалением лёгких и фибринозным плевритом, а при подостром и хроническом – развитием очагово-гноной некротической плевропневмонии и фибринозным плевритом [3].

Возникновение в стаде этих инфекций ведет к снижению прибыли за счет увеличения смертности (20–40 %), заболеваемости (до 90 %), дополнительных затрат на корма и антибиотики, снижения привесов, а в итоге приводит к значительному экономическому ущербу. Взрослые животные являются носителями этих инфекций и поддерживают стационарность [4, 5, 6].

Для АПП и гемофильного полисерозита характерны сезонность (осенне-зимний и весенний период), а также цикличность (смена периода спада заболеваемости фазой резкого ухудшения эпизоотической ситуации, при которой удельный вес АПП на вскрытии достигает 69 %) с интервалом 2,5–3 года.

При первичном заносе возбудителей в хозяйство заболеваемость доходит до

90 %, в том числе у подсвинков на откорме, что значительно увеличивает экономический ущерб.

Диагностика методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* позволяет за короткий промежуток времени оценить эпизоотическую ситуацию в хозяйстве и скорректировать методы лечения и профилактики.

Цель работы – изучить чувствительность и специфичность сконструированных наборов реагентов для ПЦР-диагностики *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для подбора праймеров использовали данные Национального центра биотехнологической информации GenBank (NCBI), программы Vector NTI и Primer 3 Plus.

Выделение ДНК осуществляли на мини-колонках набором ДНК-ВК, ИБОХ (Минск), в соответствии с прилагаемой к набору инструкцией. Наличие в субнатанте ДНК и ее чистоту (наличие белковых и химических примесей) проверяли на спектрофотометре Nanodrop (Германия). В качестве положительных контрольных микроорганизмов использовали *Actinobacillus pleuropneumoniae* (АТСС 270088) и *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170).

Выявление геномов возбудителей АПП и гемофилезного полисерозита проводили методом ПЦР, праймеры подбирали на область генома, консервативную для каждого возбудителя. Для проведения ПЦР с 2 мкл ДНК формировали смеси (объем 25,0 мкл): 2,5 мкл буфера ПЦР (10×) смешивали с 0,12 мкл каждого праймера (50 мкМ), 0,18 мкл зонда (10 мкМ), 10 мМ дНТП, 1Ед Tag-полимеразы и не содержащей нуклеазы водой.

Условия термоциклирования: 95 °С в течение 5 мин, затем 30 циклов при 95 °С в течение 60 с и 55 °С (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 60 °С (*Haemophilus parasuis*) в течение 30 с, 72 °С – 7 мин.

Электрофорез проводили при напряжении 150 В в течение 30 мин в 1,6–2%-

ном агарозном геле, после осуществляли регистрацию продуктов амплификации на приборе Gel Doc XR с ImageLab Software, BIO-RAD (США).

Чувствительность ПЦР определяли путем 10-кратных разведений бактериальной массы *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170) 0,85%-ным физиологическим раствором.

Для определения специфичности ПЦР в качестве исследуемых образцов использовали депонированные в музее РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» бактерии и вирусы, вызывающие респираторную патологию у свиней: *Bordetella bronchiseptica* (КМИЭВ-В120), *Streptococcus suis* (КМИЭВ-В184), *Salmonella spp.* (КМИЭВ-В131), *Parvovirus suis* (КМИЭВ-14В), *Pseudorabies virus* (КМИЭВ-В106), а также подтвержденные в ПЦР ранее выделенные ДНК *Circovirus type 2*.

В качестве исследуемых образцов использовали 130 проб легких от свиней разного возраста с патологическими изменениями, характерными для пневмонии. Посев патологического материала проводили на сердечно-мозговой агар с добавлением НАД и сыворотки крови. Выращенные колонии микроорганизмов, имеющих характерные морфологические и микроскопические признаки *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*, параллельно исследовали в ПЦР и на приборе Vitek.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок OmlA является важным фактором вирулентности *Actinobacillus pleuropneumoniae*, участвует в соединении белка с внешней мембраной и функционирует в качестве сигнального пептида [6]. Для выравнивания участка, кодирующего ген белка OmlA, использовали следующие нуклеотидные последовательности, размещенные в NCBI: NZ_CP030753.1; NZ_CP022715.1; NZ_LS483358.1; NZ_LR134515.1; NZ_CP029003.1; NC_010278.1; NC_009053.1; NC_010939.1; NZ_LN908249.

Подбор пары праймеров проводили к участку 960 п.н. в программе Vector NTI.

AGCG	GAGCAGCCAA	AAAAAGAGGA	AGTCCACAA	GCGGATAAT	CGAAAGCGGA	AGAACCARAA	GAGATGGCTC	CGCAAGTAGA	TAGCCCGAAA
TCGC	CTCGTCGGTT	TTTTCTCCT	TCAAGGTGTT	CGCCTATTA	GCTTTCGCCT	TCTTGGTTTT	CTCTACCGAG	CGCTTCATCT	ATCGGGCTTT
GAAC	CAAAAATAT	GGCTCCACAA	ATGGSTAATC	CAAACTAAA	TGACCCACAA	GTAATGGCTC	CGAAAATGGA	TAATCCGCAA	AAAGATGCCC
CTTG	GTITTTTATA	CCGAGGTGTT	TACCCATTAG	GTTTTGATTT	ACTGGGTGTT	CATTACCGAG	GCTTTTACCT	ATTAGGCGTT	TTTCTACGGG
GAGA	AGAACTAAGT	AAGGATAAAA	GTAATGCGGA	AATTCTTAAG	GAATTAGGGG	TTAAGGATAT	TAATTCAGGT	ATCATTAAATA	ATGCTGATGT
CTCT	TCITGATCA	TCCTATTTT	CATTACGCCT	TTAAGAAATC	CTTAATCCCC	AATTCCTATA	ATTAAGTCCA	TAGTAATTAI	TACGACTACA
GAAT	TTAAAATAG	ATGAAAAGA	TCAGATTAAA	ATTGTATTAG	ATAAGAGTGA	AATAAATCGT	GACAGCTTGA	AAGTAACGAA	TGCAATTCOA
CTTA	AATTTTATC	TACTTTTTCT	AGTCTAATTT	TAACATAATC	TATTCICACT	TTATTTAGCA	CTGTGGAAT	TTCATTGCTT	ACGTTAAGGT
GATA	TTAAAACCTT	AAAAGATTCT	TCAGGTAAT	TATTAGGTTA	TTATGGATAT	ATGCAACTTA	GTCAAAGTAA	ACAAGATGAG	TCITTATAGTA
CTAT	AATTTTGAA	TTTTCTAAGA	AGTCCATTTA	ATAATCCAAT	AATACCTATA	TACGTTGAAT	CAGTTCATTC	TGTTCTACTC	AGAATATCAT
GTCT	AAATCTTCT	AATTACTATC	TATTATCAAT	GAATGAACAA	GAAAAACCTC	GTCCGTCTAA	ATCACATAAG	TATAAAGGGA	CAATGATTTA
CAGA	TTTAGAAGA	TTAATGATAG	ATAATAGTTA	CTTACTTGT	CTTTTTTGAG	CAGGCAGATT	TAGTGATTGC	ATATTTCCCT	GTTACTAAAT
TTCG	AGTGTAGCAA	ATAATAAAT	AGAAGCGGAA	GTTAAGGCGC	AATATGACCA	TTCTAGTAAA	AAACTATCTA	TGCAAGTTTT	CGGACAAGAT
AAGC	TCACATCGTT	TATTATTTAA	TCITTCGCTT	CAATTCGCG	TTATACTGGT	AAGATCATT	TTTGATAGAT	ACGTTCAAAA	GCCTGTCTA
CATT	GGAGATTAGC	AGAGGCATCA	GGAAATAATA	ATGTTAAACT	ACCAGCAAGC	AAATTACGTG	ACGTTATAGT	TTCTGATAAA	GGAGATATAA
GTA	CCTCTAATCG	TCCTCGTAGT	CCTTATTTAT	TACAATTTGA	TGGTCTGTCG	TTAATGACAC	TGCAATATCA	AAGACTATTT	CCTCTATATT
TATT	ATATTTAGAA	GATAGTAGCC	CATCAAAAT	TACTCCAAAC	GCAAACTTCT	CGGTGGTTTT	TTTTGGTAAA	AACGGTGAAG	TACTGGCAGG
ATAA	TATAAATCTT	CTATCATGCG	GTAGTTTTAA	ATGAGGTTTG	CGTTTTGAAGA	GGCCACCAA	AAAACCATTT	TGCCACTTC	ATGACCCGTC
GGAA	AGCATTAAAG	GAGAATGGCA	AGGCGTAATC	GGTGCTACGG	CAACACAAA	AGAAGATAAA	AAATAAACGC	TTTGCTTACC	AAACTAAAAG
CCTT	TCGTAATCC	CTCTTACCGT	TCGCGATTAG	CCACGATGCC	GTTGTTGTTT	TCTTCTATTT	TTTATTTGCG	AAACGAATGG	TTGATTTTC
TTCC	GGATAGCTTT	TTTATTTGTT	AATCAGTCT	AA					
AAGC	CCTATCGAAA	AAATAACAA	TTAGTCAGGA	TT					

Рисунок 1. – Фрагмент участка мишени гена белка OmlA с выбранной парой праймеров

Теоретические характеристики выбранных пар праймеров оценивали с использованием программного обеспечения Primer 3. Специфичность праймеров прове-

рили по всем последовательностям в GenBank с использованием программного обеспечения BLAST в NCBI.

Таблица 1. – Теоретические характеристики и специфичность выбранных пар праймеров к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*

<p>Последовательность: CACCGATTACGCCTTGCCA</p> <p>Длина: 19 п.н.</p> <p>Tm: 65,3 °C</p> <p>GC: 57,9%</p>	<p>Последовательность: AAGGTTGATATGTCGCACT</p> <p>Длина: 20 б.п.</p> <p>Tm: 59,8 °C</p> <p>GC: 50,0%</p>
<p>Описание</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> NCTC10976, геномная сборка, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм S4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 1 ул. 4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм KL 16, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV279, внешний мембранный ген липопротеина A (omlA), час: <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 7 ул. AP76, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> клон SC-A ген липопротеина внешней мембраны (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 серотипа 5b полный геном 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> NCTC11384, геномная сборка, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 1 ул. 4074 хромосома, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамм KL 16, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 8, геномная сборка MIDG2331, хромосома: 1 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: 3906 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: N-282 <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> omlA для липопротеина внешней мембраны, полный cds, штамм: N-273 <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм 3606, ген липопротеина A, долобный внешней мемbrane (omlA), полная <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV512, внешняя мембрана, липопротеин A (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> Ген <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> штамма HS143 с липопротеином A, долобным наружной мемbrane (omlA) <input type="checkbox"/> Штамм <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV235, внешняя мембрана, липопротеин A (omlA), частичный. <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV279, внешний мембранный ген липопротеина A (omlA), частичная г <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV5237, ген липопротеина A, долобный внешней мемbrane (omlA), ча <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>, штамм MV5651, ген наружной мембраны, липопротеин A (omlA), частичный, с <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 7 ул. AP76, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> серовар 3 ул. JL03, полный геном <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> клон SC-A ген липопротеина внешней мембраны (omlA), полный cds <input type="checkbox"/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 серотипа 5b полный геном

С целью выявления большинства серовариантов *Haemophilus parasuis* нами был выбран участок ДНК, кодирующий последовательность гена малой субъедини-

цы рибосомальной РНК 16S. Из литературных источников [7] подобраны праймеры, ограничивающие участок ДНК длиной 821 п.н. (таблица 2).

Таблица 2. – Теоретические характеристики и специфичность выбранных пар праймеров к участку ДНК *Haemophilus parasuis*

5* agcgggcaacc cttaatcct3*	5* tcgtcacccctctgtatgcac3*
<p>описание</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Штамм <i>Glaeserella parasuis</i> XH01 16S ген рибосомальной РНК, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Grimontia sp. ген рибосомальной РНК штамма TNAF87 16S, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Enterobacter sp. штамм Unkn789 16S ген рибосомальной РНК, частичная последовательность <input type="checkbox"/> Pyricularia oryzae изолят MZ5-1-6 хромосома 1, полная последовательность 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain XH01 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis D74 chromosome, complete genome <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain LYC2 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain LYW1 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain LY02 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain LYH5 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> Glaeserella parasuis strain LYD1 16S ribosomal RNA gene, parti <input type="checkbox"/> [Haemophilus] parasuis strain CL120103, complete genome <input type="checkbox"/> [Haemophilus] parasuis strain SC1401, complete genome

В стандартной ПЦР нами проверены подобранные и синтезированные фирмой «Праймтех» (Минск) праймеры к участку генома *Actinobacillus pleuropneumoniae*, в качестве положительного контрольного образца использовался штамм ATCC 270088. Амплификацию проводили в амплификато-

ре С 1000 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Положительные пробы видны в ультрафиолетовом свете при длине волны, равной 254 нм или 310 нм, в виде полосы, соответствующей маркеру на уровне 960 п.н. красно-оранжевого цвета. Результаты представлены на рисунке 2.

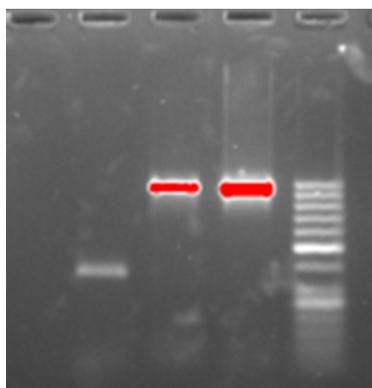


Рисунок 2. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации с праймерами к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* длиной 960 п.н., слева направо: отрицательный контроль; патологический материал; штамм *Actinobacillus pleuropneumoniae*; положительный контроль; маркер молекулярного веса

Далее нами определялась чувствительность ПЦР путем 10-кратных разведений лиофильно высушенной культуры *Actinobacillus pleuropneumoniae* (10^{-1} – 10^{-6}), количество клеток в исходном образце из-

мерялось по МакФарланду и составило 500 тыс. клеток/мл, при измерении количество ДНК составило 0,7 нг/мкл. Результаты представлены на рисунке 3.

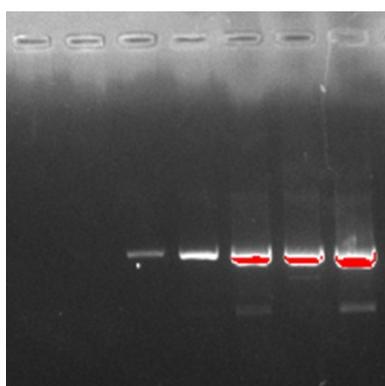


Рисунок 3. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* в ПЦР в 10-кратных разведениях, слева направо: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 500 тыс. микробных тел/мл

Согласно полученным результатам ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* выделяется методом ПЦР в разведении до 10^{-4} (500 микробных клеток).

Кроме того, нами проведены исследования специфичности ПЦР с ДНК выде-

ляемых при респираторной патологии свиней возбудителей. Согласно полученным результатам (рисунок 4) ПЦР с выбранными праймерами специфична для ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

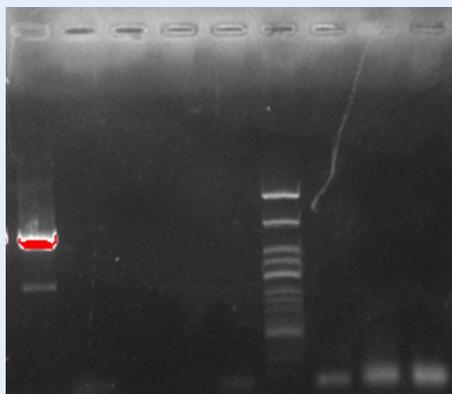


Рисунок 4. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации в ПЦР амплификационных смесей, содержащих праймеры к участку генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* с ДНК возбудителей респираторной патологии свиней, слева направо: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; *Bordetella bronchiseptica*; *Streptococcus suis*; *Circovirus* type 2; маркер молекулярного веса; *Salmonella* spp.; *Parvovirus suis*; *Pseudorabies virus*

Далее в ПЦР нами проверены подобранные и синтезированные фирмой «Праймтех» (Минск) праймеры к участку генома *Haemophilus parasuis*. В качестве положительного контроля использовался

штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЭВ-170). Результаты, представленные на рисунке 5, указывают на то, что смеси пригодны для выявления генома *Haemophilus parasuis*.

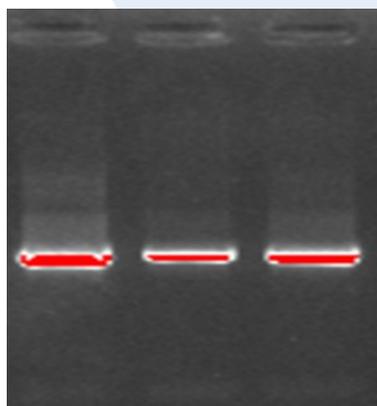


Рисунок 5. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации с праймерами к участку ДНК *Haemophilus parasuis* длиной 821 п.н.

Далее нами определялась чувствительность ПЦР путем 10-кратных разведений лиофильно высушенной культуры *Haemophilus parasuis*. Согласно полученным результатам (рисунок 6) ДНК *Haemo-*

philus parasuis выделяется методом ПЦР в разведении до 10^{-3} (5000 микробных клеток). Количество клеток в исходном образце составило 500 тыс. клеток/мл, при измерении количества ДНК составило 1,5 нг/мкл.

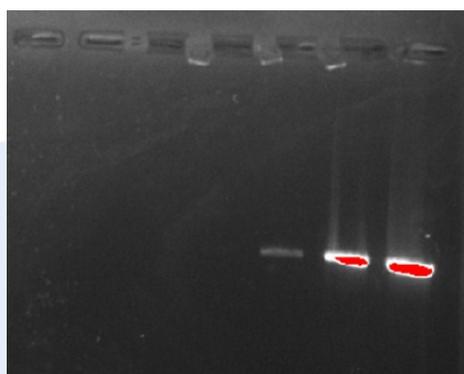


Рисунок 6. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации генома *Haemophilus parasuis* в ПЦР в 10-кратных разведениях, слева направо: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 500 тыс. микробных тел/мл

Кроме того, нами проведены исследования специфичности ПЦР с ДНК часто встречающихся при респираторной патологии свиней возбудителей. Согласно полу-

ченным результатам (рисунок 7) ПЦР с используемыми праймерами специфична для ДНК *Haemophilus parasuis*.

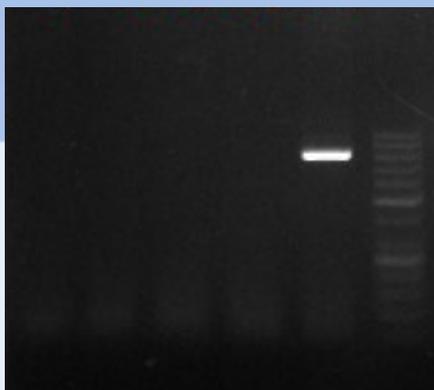


Рисунок 7. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации в ПЦР амплификационных смесей, содержащих праймеры к участку генома *Haemophilus parasuis* с ДНК возбудителей респираторной патологии свиней, слева направо: *Bordetella bronchiseptica*; *Actinobacillus Pleuropneumoniae*; *Streptococcus suis*; *Salmonella spp.*; *Haemophilus parasuis* (положительный контроль); маркер молекулярного веса

Все исследования с выделенной ДНК *Haemophilus parasuis* и *Actinobacillus pleuropneumoniae* проводились при одинаковых условиях амплификации трижды с целью учета повторяемости результатов. Согласно проведенным исследованиям идентичность результатов по чувствительности и специфичности составила 100 %.

Кроме того, проведена корреляция выделяемости возбудителей методом посева на питательных средах с последующей идентификацией изолятов в Vitek и ПЦР. Выросшие на сердечно-мозговом агаре культуры, сходные по морфологическим и культуральным признакам, смывали физраствором, ДНК выделяли по вышеописанной методике и проводили исследования ПЦР. Параллельно проводили пересев отдельных колоний с целью получения чистой культуры для дальнейшей идентификации полученных изолятов при помощи прибора Vitek.

Согласно полученным результатам, из всех изолятов (70 проб), выросших на сердечно-мозговом агаре и идентифицированных в Vitek как *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методом ПЦР выделен геном *Actinobacillus pleuropneumoniae*. В 10 % изолятов, имеющих морфологические и культуральные свойства, близкие *Actinobacillus*, в ПЦР геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* не обнаружен. Из 30 проб патологического материала первоначально выделен геном *Actinobacillus pleuropneumoniae*, морфологически схожие колонии на сердечно-мозговом агаре не выросли.

Возбудитель гемофильного полисерозита выделен только в 20 из 130 проб патологического материала, и в 100 % случаев результаты Vitek и ПЦР совпадали.

Результаты обнаружения генома *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis* в изолятах, выросших на сердечно-мозговом агаре одной из экспертиз, представлены на рисунке 8.

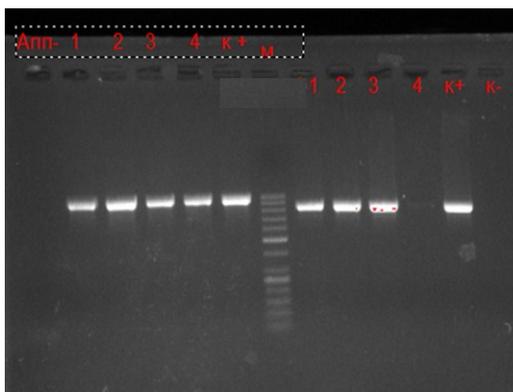


Рисунок 8. – Результаты амплификации ДНК изолятов бактериальных культур с характерными морфологическими и культуральными свойствами *Actinobacillus pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis*, слева направо: App- – отрицательный контроль; 1–4 изоляты из культур *Actinobacillus pleuropneumoniae*; k+ – положительный контроль *Actinobacillus pleuropneumoniae*; m – маркер молекулярного веса 50 п.н.; 1–4 – изоляты из культур *Haemophilus parasuis*; k+ – положительный контроль *Haemophilus parasuis*; k- – отрицательный контроль

ВЫВОДЫ

1. Выбранные и синтезированные праймеры к участку ДНК *Actinobacillus pleuropneumoniae* (белок OmlA) и *Haemophilus parasuis* (участок малой субъединицы рибосомальной РНК 16S) позволяют проводить специфичную для этих возбудителей ПЦР.

2. Сконструированные наборы реагентов для обнаружения возбудителей АПП и гемофилезного полисерозита позволяют выявлять возбудителя в разведениях микробных клеток 10^{-3} *Haemophilus parasuis* и 10^{-4} *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

В ПЦР геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* детектируется на 30 % случаев чаще, чем при проведении бактериологических исследований. Из патологического материала геном *Actinobacillus pleuropneumoniae* выделяется в 52 % от всех исследованных образцов предоставленного биоматериала, что составило 100 % образцов, выросших на питательных средах и определенных прибором Vitek как *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Возбудитель гемофилезного полисерозита выделен только в 15 % проб патологического материала, и в 100 % случаев результаты Vitek и ПЦР совпадали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и серотипизация возбудителя актинобациллярной плевропневмонии от поросят с респираторной патологией / А. С. Андрусевич [и др.] // Экология и животный мир. – 2020. – № 1. – С. 79–83.
2. Красникова, Е. Л. Комплекс респираторных патологий свиней в хозяйствах Беларуси / Е. Л. Красникова, А. С. Андрусевич, О. В. Мальчик // Экология и животный мир. – 2020. – № 2. – С. 37–41.
3. Пейсак, З. Болезни свиней / З. Пейсак ; пер. с польск. – Брест : Брестская типография, 2008. – 406 с.
4. Lung, O. Multiplex PCR and Microarray for Detection of Swine Respiratory Pathogens / O. Lung, S. Ohene-Adjei, C. Buchanan // Transbound Emerg Dis. – 2017. – Jun; 64(3). – S. 834–848.
5. Opriessnig, T. Polymicrobial respiratory disease in pigs / T. Opriessnig, L. G. Gimenez-Lirola, P. G. Halbur // Anim Health Res Rev. – 2011; 12. – S. 133–148.
6. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars / O. W. Stringer [et al.] // Proposal of Veterinary Microbiolog. – 2021. – Vol. 255.
7. Oliveira, S. *Haemophilus parasuis* diagnostics / S. Oliveira // Journal of Swine Health and Production. – 2007. – Vol. 15, № 2. – P. 99–103.


САПОФОР



- ▶ ИММУНОСТИМУЛЯТОР;
- ▶ ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ КОРОВ, БОЛЬНЫХ СУБКЛИНИЧЕСКИМ МАСТИТОМ;
- ▶ КОМПЛЕКСНАЯ ТЕРАПИЯ И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ



www.VIEVM.BY