

УДК 619:579.843.95

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-3-6>

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

Григорян В.Е., биолог

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

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНОГО ШТАММА *HAEMOPHILUS PARASUIS*

Резюме

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

Ключевые слова: *Haemophilus parasuis*, штаммы, биохимические свойства, полимеразная цепная реакция.

Summary

The article provides data on the biochemical properties of museum strains of *Haemophilus parasuis*. The belonging of the strains of *Haemophilus parasuis* was confirmed in the polymerase chain reaction using the developed RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellesskiy» test system for detecting the genome of *Haemophilus parasuis*.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, strains, biochemical properties, polymerase chain reaction.

Поступила в редакцию 03.12.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Гемофилезный полисерозит (болезнь Глессера) – инфекционная септическая болезнь поросят отъемного возраста, характеризующаяся преимущественным серозно-фибринозным воспалением перикарда, плевры, брюшины, суставов и негнойным менингоэнцефалитом.

По антигенной структуре различают 4 серологические группы: А, В, С, Д, которые включают 15 серовариантов возбудителя. Наиболее патогенными являются 2, 4, 5, 12, 13, 14 сероварианты [1, 2].

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 специалистов, формирующих коллекции микроорганизмов [3].

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 Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: систем индикаторных бумажных СИБ (Нижний Новгород), АПИ стрипов API® («Bio-Mérieux», Франция) и др. [4, 5]. Это не всегда позволяет окон-

чательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам как определенный вид, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [6].

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 [7].

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 гемофилов, идентифицировать их на видовом и серогрупповом уровнях и подтвердить принадлежность какого-либо штамма определенному сероварианту.

Цель работы – изучение биохимических свойств музейного штамма *Haemophilus parasuis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали суточную культуру музейного штамма *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамма-антигена коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», выращенную на сердечно-мозговом бульоне с добавлением никотинамиддинуклеотида (НАД) («Sigma», США).

Восстановление бактериологической культуры из лиофильной 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 в течение 18–24 часов при температуре от +37 до +38 °С.

Для изучения биохимических свойств музейного штамма *Haemophilus parasuis* суточную бульонную культуру 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 часов.

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

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

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 колоночным методом набором «ДНК-ВК» (ИБОХ, г. Минск). Концентрацию ДНК измеряли прибором Nanodrop. Для обнаружения генома *Haemophilus parasuis* использовали смеси, содержащие специфические праймеры к участку генома 16S *Haemophilus parasuis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные прибора Vitek 2 compact по биохимическим свойствам музейного штамма *Haemophilus parasuis* внесены в таблицу для проведения сравнительного анализа.

Таблица. – Биохимические свойства музейного штамма *Haemophilus parasuis*

№ п/п	Тест	Сокращение	КМИЭВ-В171
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	Глютаминариламидаза рNA	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 рNA	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-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 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	-

Исходя из полученных данных было установлено, что музейный штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамм-антиген сбраживает адонитол, D-целлобиозу, сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Элмана.

В связи с необходимостью подтверждения принадлежности штамма *Haemophilus parasuis*, использованного в исследованиях, была проведена ПЦР.

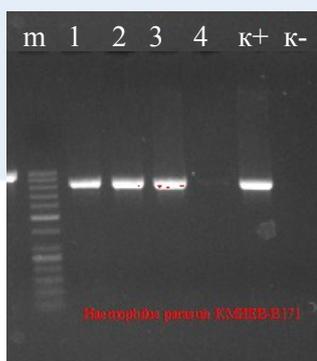
Аmplификацию ДНК проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей

2 мкл выделенной ДНК, 10 mM дНТП, 0,2 мкМ каждого праймера, 3 mM хлорида магния и 1 ЕД Таg-полимеразы (ОДО «Праймтех», Минск).

Параметры амплификации были следующими:

- | | |
|-------------------|-------------|
| 1. 95 °С – 5 мин | } 30 циклов |
| 2. 95 °С – 60 с | |
| 3. 60 °С – 60 с | |
| 4. 72 °С – 60 с | |
| 5. 72 °С – 7 мин. | |

Электрофоретическую детекцию проводили в 2%-ном агарозном геле (рисунок).



- m – маркер молекулярного веса;
 1–4 – штамм *Haemophilus parasuis* КМИЕВ-В171;
 k+ – положительный контроль;
 k- – отрицательный контроль

Рисунок. – Результаты электрофоретической детекции продуктов амплификации выделенной ДНК из музейного штамма *Haemophilus parasuis*

В результате проведения ПЦР установлено, что штамм *Haemophilus parasuis* КМИЕВ-В171 содержит геном *Haemophilus parasuis*.

ВЫВОДЫ

1. Проведены биохимические исследования музейного штамма *Haemophilus parasuis* на приборе Vitek 2 compact и под-

тверждена его принадлежность с помощью тест-системы методом ПЦР.

2. Штамм *Haemophilus parasuis* (КМИЕВ-В171) – штамм-антиген сбраживает адонитол, D-целлобиозу, сахарозу, расщепляет бета-галактозидазу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-маннит, D-маннозу, D-тагатозу, фосфатазу, продуцирует уреазу, положительно реагирует с реактивом Элмана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоров, М. А. Гемофилезы животных / М. А. Сидоров, Д. И. Скородумов. – М. : Агропромиздат, 1986. – 130 с.
2. Сидоров, М. А. Специфическая профилактика гемофилезной плевропневмонии свиней / М. А. Сидоров // Ветеринарные проблемы пром. свиноводства. – 1983. – № 4. – С. 102–106.
3. Smith, D. Culture Collections / D. Smith // Microbiology. – 2012. 79:73–118. – DOI: 10.1016 / B978-0-12-394318-7.00004-8.
4. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и ви-русологическим методам исследования / М. О. Биргер. – М. : Медицина, 1982. – 464 с.
5. 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.
6. Леванова, Г. Ф. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл / Г. Ф. Леванова, Е. И. Ефимов. – Н. Новгород : изд. Ю.А. Николаев, 2009. – 248 с.
7. Белова, Л. Н. Биологические коллекции российской Федерации / Л. Н. Белова, В. Н. Мошенцева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2013. – Т. 5. – С. 8–10.