

DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-178-184
 УДК 619:616.98:579.843.96:579.887.111:636.4:616-076:615.371



Свойства изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*

В. А. Евграфова, О. В. Прунтова, Н. Б. Шадрова, А. М. Тимина

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения биологических свойств (биохимические, протеомические, антигенные и патогенные) 6 изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных от больных свиней в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. Протеомические свойства определяли посредством масс-спектрометрического анализа с использованием масс-спектрометра Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics Co., Ltd, Китай): были построены белковые профили и определены характерные пики для каждого изолята. Установлено, что все масс-спектры изучаемых изолятов актинобацилл и референтного штамма *Actinobacillus pleuropneumoniae* DSM 13472 находятся в диапазоне m/z 2000–12 000 Да. Для всех изолятов и штамма *Actinobacillus pleuropneumoniae* общими были пики m/z : 2541 ± 2; 4267 ± 2; 5085 ± 2; 6450 ± 2; 7207 ± 4; 9408 ± 3; 11 820 ± 6, при этом самая высокая интенсивность (100%) была зарегистрирована для пика 5085 ± 2, который, как предполагаем, можно считать исключительной особенностью *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Принадлежность всех изолятов к виду *Actinobacillus pleuropneumoniae* и серотипам 2, 5 и 9 была подтверждена методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием видо- и серотип-специфичных праймеров. Патогенные свойства *Actinobacillus pleuropneumoniae* определяли при экспериментальном заражении белых мышей и поросят 2,5–3,0-месячного возраста. Все испытываемые изоляты были патогенны как для белых мышей, так и для свиней. Установлено, что из всех изучаемых изолятов наиболее высокая вирулентность характерна для изолята № 4, который относится к 5-му серотипу. Так, LD_{50} для белых мышей составила 4,19 lg м. к., для поросят – 5,49 lg м. к., что согласуется с данными других авторов, проводивших исследования патогенности актинобацилл, выделенных на территории Российской Федерации. Изоляты депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Ключевые слова: актинобациллезная плевропневмония, изолят, свойства, полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия, патогенность

Благодарности: Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (соглашение № 075-15-2021-1054).

Для цитирования: Евграфова В. А., Прунтова О. В., Шадрова Н. Б., Тимина А. М. Свойства изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (2): 178–184. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-178-184.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: pruntova@arriah.ru.

Properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates

V. A. Evgrafova, O. V. Pruntova, N. B. Shadrova, A. M. Timina

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Results of tests of six *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates recovered from the diseased pigs kept in animal holdings located in the Russian Federation for their biological properties (biochemical, proteomic, antigenic and pathogenic ones) are presented in the paper. Proteomic properties were determined with mass-spectrometry using Autof MS 1000 mass-spectrometer (Autobio Diagnostics Co., Ltd, China): protein profiles were plotted and the peaks characteristic for each isolate were identified. Mass-spectra of tested *Actinobacillus* isolates and reference *Actinobacillus pleuropneumoniae* DSM 13472 strain were found to be in the m/z range of 2,000–12,000 Da. The following peaks (m/z) were common for all *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates and the strain: 2,541 ± 2; 4,267 ± 2; 5,085 ± 2; 6,450 ± 2; 7,207 ± 4; 9,408 ± 3; 11,820 ± 6. Therewith, the highest intensity (100%) was reported for the peak at 5,085 ± 2, that was supposed to be a specific feature of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. All isolates were confirmed to belong to *Actinobacillus pleuropneumoniae* species and to 2, 5 and 9 serotypes by real-time polymerase chain reaction using species-specific and serotype-specific primers. *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates were tested for their pathogenic properties by experimental infection of white mice and 2.5–3 month-old piglets. All tested isolates were pathogenic for both white mice and piglets. Isolate No. 4 belonging to serotype 5 was found to be the most virulent out of tested isolates. Thus, LD_{50} was 4.19 lg microbial cells for white mice and 5.49 lg microbial cells for piglets that was consistent to the data of other authors carried out tests of actinobacilli isolated in the Russian Federation for their pathogenicity. The isolates were deposited to the FGBI "ARRIAH" Collection of Microorganism Strains.

Keywords: porcine (*Actinobacillus*) pleuropneumonia, isolate, properties, polymerase chain reaction, mass-spectrometry, pathogenicity

© Евграфова В. А., Прунтова О. В., Шадрова Н. Б., Тимина А. М., 2023

Acknowledgements: The work was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and performed as part of the Federal Scientific and Technical Program of Genetic Technology Development in 2019–2027 (agreement No. 075-15-2021-1054).

For citation: Evgrafova V. A., Pruntova O. V., Shadrova N. B., Timina A. M. Properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (2): 178–184. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-178-184.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: pruntova@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Актинобациллезная плевропневмония (АПП) свиней широко распространена во многих странах мира и в Российской Федерации. Эта высококонтагиозная болезнь характеризуется внезапным началом, непродолжительным клиническим течением с фибрино-геморрагическими поражениями легких при острой форме или кашлем и снижением привеса при хронической инфекции свиней. Нередко АПП приводит к летальному исходу. К болезни восприимчивы свиньи всех возрастов, но наиболее чувствительны поросята 2–4-месячного возраста. Отличительной особенностью данного заболевания является его стационарность, которая обусловлена длительным периодом бактерионосительства в организме животных [1, 2]. Тяжесть заболевания зависит от нескольких факторов, наиболее важными из которых являются серотип *Actinobacillus pleuropneumoniae*, заражающая доза, сопутствующие инфекции и условия содержания животных [3–5].

В последние десятилетия в РФ наметилась тенденция к увеличению числа хозяйств, неблагополучных по АПП свиней, которое может быть объяснено такими причинами, как импорт племенных животных из Западной Европы и Канады и отсутствие АПП в перечне инфекций, от которых, согласно ветеринарным требованиям, должны быть свободны ввозимые в РФ живые свиньи [6–8].

В настоящее время существует ряд вакцин для профилактики АПП, подразделяющихся на бактерино-токсоидные, токсидные и на основе бактерины (цельноклеточных бактерий). Бактерины обеспечивают защиту от гомологичного серовара и не защищают от заражения гетерологичными сероварами [9–13]. Вакцины на основе инактивированных токсинов Арх эффективны в снижении заболеваемости и проявлении клинических признаков, связанных с инфекцией, но они не способны предотвратить колонизацию возбудителя в легких, их использование представляет собой потенциальную угрозу инфицирования стада бессимптомными носителями [9, 11, 14]. Универсализация препарата против АПП, который сможет защитить от всех известных сероваров, является труднодостижимой задачей ввиду отсутствия перекрестного иммунитета. Наилучшим способом искоренения данного заболевания является выделение и идентификация возбудителя в конкретном неблагополучном по АПП хозяйстве, изучение его биологических свойств, изготовление вакцинного препарата и применение аутогенной вакцины в данном хозяйстве. Такие страны, как Франция,

США, Канада и др., применяют аутогенные препараты для борьбы с АПП [9, 15, 16]. Исходя из вышесказанного, выделение изолятов *A. pleuropneumoniae* от больных свиней в животноводческих хозяйствах РФ, изучение их биологических свойств является актуальной задачей. Новизна работы состоит в получении новых изолятов *A. pleuropneumoniae*, изучении их биологических свойств, депонировании в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» для дальнейшего использования их при разработке вакцинных препаратов.

Целью работы было выделение возбудителей АПП от больных свиней в животноводческих хозяйствах РФ, изучение их биохимических, протеомных, антигенных и патогенных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изоляты бактерий. В работе использовали изоляты *A. pleuropneumoniae*, выделенные от свиней с респираторной патологией из свиноводческих хозяйств Российской Федерации:

№ 1 – *A. pleuropneumoniae* «AU-21» 2-го серотипа, выделен в Курской области;

№ 2 – *A. pleuropneumoniae* «N-21» 2-го серотипа, выделен в Курской области;

№ 3 – *A. pleuropneumoniae* «VT-22» 2-го серотипа, выделен в Рязанской области;

№ 4 – *A. pleuropneumoniae* «KG-21» 5-го серотипа, выделен в Белгородской области;

№ 5 – *A. pleuropneumoniae* «OE-22» 9-го серотипа, выделен в Курской области;

№ 6 – *A. pleuropneumoniae* «DI-22» 9-го серотипа, выделен в Кировской области.

База данных масс-спектрометра MALDI Autoflex III (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Масс-спектр референтного штамма *A. pleuropneumoniae* DSM 13472.

Подопытные животные. Патогенные свойства изолятов *A. pleuropneumoniae* определяли на белых мышах массой 16–18 г и поросятах 2,5–3,0-месячного возраста, доставленных из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям.

Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с межгосударственными стандартами по содержанию и уходу за лабораторными животными, принятыми Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

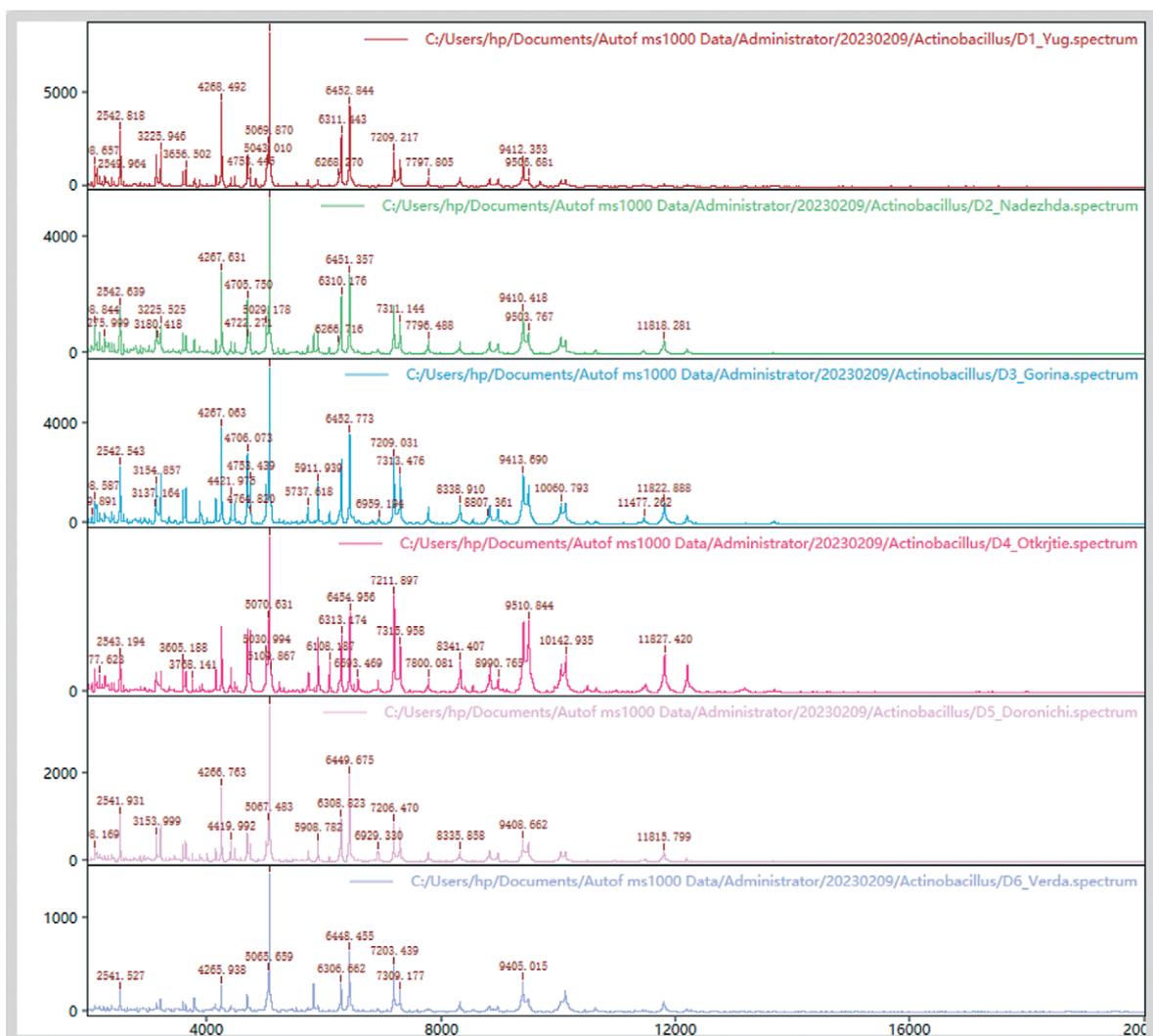


Рис. 1. Протеомические свойства (белковые профили) изолятов *A. pleuropneumoniae*

Fig. 1. Proteomic properties (protein profiles) of *A. pleuropneumoniae* isolates

Питательные среды и реактивы. Для выделения *A. pleuropneumoniae* из патологического материала использовали сердечно-мозговой агар (Becton, Dickinson and Company, США), содержащий 5% сыворотки крови лошади (АО «НПО «Микроген», Россия), 10% дрожжевого экстракта (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия). Биохимические свойства изолятов изучали при помощи коммерческого набора API NH (bioMérieux, Франция).

Методы. Пробы отбирали в соответствии с «Методическими рекомендациями по отбору проб биологического материала от животных для бактериологических исследований»¹. Морфологию бактерий изучали методом микроскопии мазков, окрашенных по Граму. Культивирование бактерий на плотных агаровых средах проводили в течение 24–48 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Идентификацию бактерий *A. pleuropneumoniae* и определение их протеомических свойств проводили на масс-спектрометре Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics Co., Ltd, Китай). Применяли метод прямого на-

несения, при котором стерильной пластиковой петлей наносили единичные колонии суточной культуры на металлический планшет-мишень. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор СНСА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) в 50%-м водном ацетонитриле с 2,5%-й трифторуксусной кислотой. Калибровку прибора проводили ежедневно, используя реагент Calibrator Autobio Diagnostics (Autobio Diagnostics Co., Ltd, Китай). Масс-спектрометрический анализ изолятов *A. pleuropneumoniae* осуществляли с применением линейного режима лазера [17]. Параметры анализа оптимизировали для диапазона масс m/z (масса/заряд) от 2000 до 20 000 Да, записывали спектр, полученный в результате суммирования 20 одиночных спектров в программе Autof Acquirer V2.0.130. Анализ полученных масс-спектров проводили в программе Autof Analyzer V2.0.14 (Autobio Diagnostics Co., Ltd, Китай).

Полимеразную цепную реакцию выполняли в соответствии с методическими рекомендациями по обнаружению *A. pleuropneumoniae* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени².

¹ Евграфова В. А., Кононов А. В., Яшин Р. В., Брянцева М. С., Степанова И. А., Бирюченков Д. А. Методические рекомендации по отбору проб биологического материала от животных для бактериологических исследований. № 03-22. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2022. 11 с.

² Щербаков А. В., Тимина А. М., Яковлева А. С., Ковалишин В. Ф. Методика обнаружения *Actinobacillus pleuropneumoniae* методом полимеразной цепной реакции. № 38-05. Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2005. 8 с.

Определение патогенных свойств изолятов возбудителя АПП на белых мышах проводили согласно «Методическим рекомендациям по оценке иммуногенности актинобациллезных антигенов в составе инактивированных вакцин»³. Для оценки патогенности каждого изолята использовали по 50 белых мышей (по 10 мышей на каждое разведение) массой 16–18 г. Мышей заражали внутрибрюшинно суточной культурой бактерий *A. pleuropneumoniae* в следующих концентрациях: 1×10^8 ; 1×10^7 ; 1×10^6 ; 1×10^5 ; 1×10^4 м. к./см³ в объеме 0,5 см³. Наблюдение за животными вели в течение 5 сут.

Расчет Ig LD₅₀ производили по формуле Кербера в модификации Ашмарина:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \lg \delta (\Sigma L_i - 0,5),$$

где $\lg D_N$ – логарифм максимальной заражающей дозы;
 $\lg \delta$ – логарифм кратности разведения культуры возбудителя;

L_i – отношение количества павших к количеству зараженных животных в опыте;

ΣL_i – сумма значений L_i для всех испытанных доз.

Определение патогенных свойств изолятов возбудителя АПП на поросятах 2,5–3,0-месячного возраста. Поросят заражали интратрахеально суспензией бактерий, содержащей 1×10^8 м. к. в объеме 1,0 см³. Наблюдение за животными вели в течение 10 сут.

Для статистической обработки данных использовали приложение Microsoft Excel и стандартные статистические приемы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом данной работы было выделение возбудителя АПП из проб патологического материала, которые отбирали от павших и вынужденно убитых животных с признаками респираторной патологии в хозяйствах, неблагополучных по АПП в Белгородской, Кировской, Курской и Рязанской областях. В результате проведенных исследований для дальнейшей работы были получены 6 изолятов *A. pleuropneumoniae*, перечень которых представлен в разделе «Материалы и методы».

При определении биохимических свойств выявили, что все исследуемые изоляты ферментируют глюкозу, сахарозу, мальтозу, фруктозу и активны в отношении щелочной фосфатазы, уреазы и β -галактозидазы. При сравнении полученных данных с характеристиками референтных штаммов из определителя Берджи [18] было установлено соответствие по всем проведенным тестам, что свидетельствует о принадлежности изолятов к виду *A. pleuropneumoniae*.

На следующем этапе работы были определены протеомические свойства всех изолятов *A. pleuropneumoniae*, построены белковые профили, представленные на рисунке 1, сформированы масс-листы, по которым стало возможным определение характерных пиков для каждого изолята (табл. 1).

В ходе анализа полученных результатов было установлено, что все масс-спектры изучаемых изолятов актинобацилл и референтного штамма *A. pleuro-*

Таблица 1

Анализ масс-спектров изолятов *A. pleuropneumoniae*

Table 1

Analysis of mass-spectra of *A. pleuropneumoniae* isolates

m/z	Интенсивность (%) спектра изолятов <i>A. pleuropneumoniae</i> и референтного штамма DSM 13472						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	DSM 13472
2541 ± 2	45	35	41	29	33	18	38
4267 ± 2	56	53	61	48	49	22	70
5085 ± 2	100	100	100	100	100	100	100
6450 ± 2	52	51	54	55	51	43	67
7207 ± 4	22	30	39	66	24	33	24
9408 ± 3	14	25	29	38	13	22	26
11 820 ± 6	2	8	11	25	6	8	5

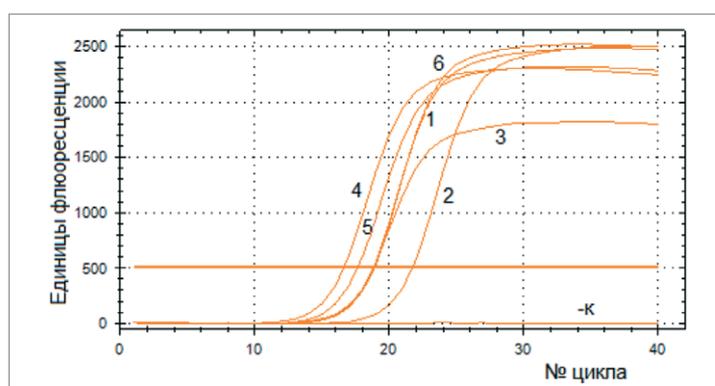


Рис. 2. Подтверждение принадлежности изолятов № 1, 2, 3, 4, 5, 6 к виду *A. pleuropneumoniae* в ПЦР-РВ («-к» – отрицательный контроль)

Fig. 2. Real-time PCR confirmation of isolate No. 1, 2, 3, 4, 5, 6 identification as *A. pleuropneumoniae* species (“-к” – negative control)

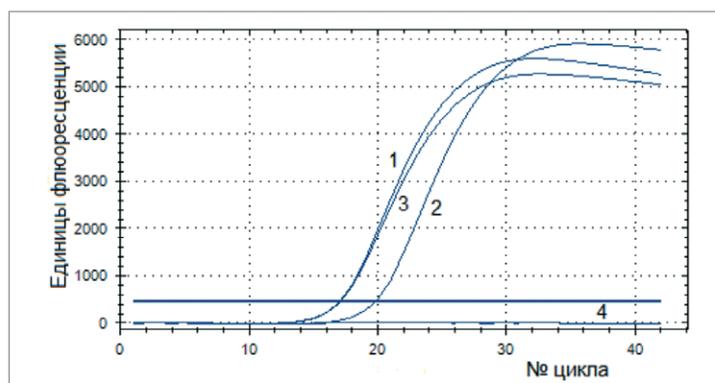


Рис. 3. Определение принадлежности изолятов *A. pleuropneumoniae* к серотипу 2 в ПЦР-РВ (1, 2, 3 – изоляты № 1, 2 и 3; 4 – изолят № 4 и отрицательный контроль)

Fig. 3. Real-time PCR identification of *A. pleuropneumoniae* isolates as serotype 2 ones (1, 2, 3 – isolates No. 1, 2 and 3; 4 – isolate No. 4 and negative control)

pneumoniae DSM 13472 находятся в диапазоне m/z 2000–12 000 Да. Для всех изолятов и референтного штамма *A. pleuropneumoniae* общими оказались пики m/z 2541 ± 2; 4267 ± 2; 5085 ± 2; 6450 ± 2; 7207 ± 4; 9408 ± 3; 11 820 ± 6, при этом самая высокая

³ Бирюченков Д. А., Русалеев В. С., Фроловцева А. А., Потехин А. В. Методические рекомендации по оценке иммуногенности актинобациллезных антигенов в составе инактивированных вакцин. № 69–08. Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2008. 17 с.

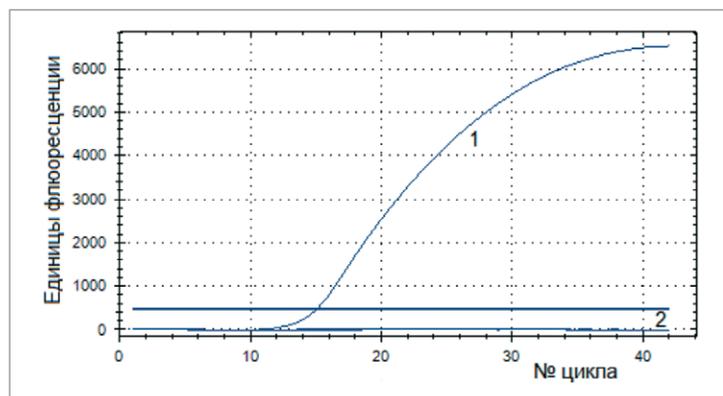


Рис. 4. Определение принадлежности изолятов *A. pleuropneumoniae* к серотипу 5 в ПЦР-РВ (1 – изолят № 4; 2 – изолят № 5 и отрицательный контроль)

Fig. 4. Real-time PCR identification of *A. pleuropneumoniae* isolates as serotype 5 ones (1 – isolate No. 4; 2 – isolate No. 5 and negative control)

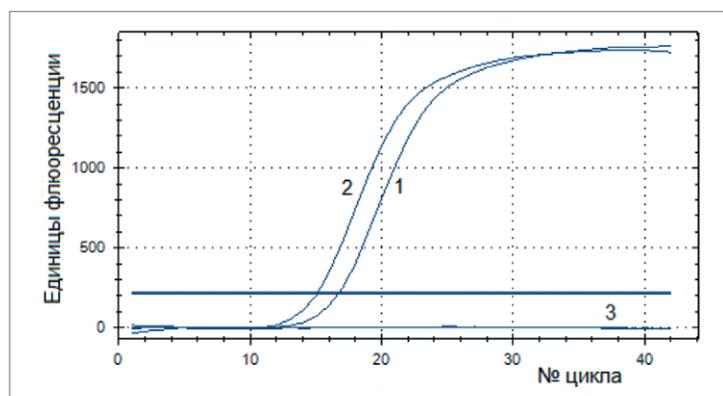


Рис. 5. Амплификация ДНК изолятов *A. pleuropneumoniae* серотипа 9 в ПЦР-РВ (1 – изолят № 5; 2 – изолят № 6; 3 – изолят, отрицательный в отношении серотипа 9, и отрицательный контроль)

Fig. 5. Real-time PCR amplification of DNAs of serotype 9 *A. pleuropneumoniae* isolates (1 – isolate No. 5; 2 – isolate No. 6; 3 – isolate negative for serotype 9 and negative control)

Таблица 2

Патогенные свойства изолятов *A. pleuropneumoniae* 2, 5 и 9-го серотипов для лабораторных и естественно восприимчивых животных

Table 2

Pathogenic properties of serotype 2, 5 and 9 *A. pleuropneumoniae* isolates for laboratory and naturally susceptible animals

Вид животных	Значение Ig ЛД ₅₀ м. к. изолятов					
	2-го серотипа			5-го серотипа		9-го серотипа
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Белые мыши	4,99	5,09	4,89	4,19	5,59	5,19
Свиньи	6,99	7,49	6,69	5,49	7,89	7,29

интенсивность (100%) была зарегистрирована для пика 5085 ± 2 , который, как предполагаем, можно считать исключительной особенностью *A. pleuropneumoniae*.

Принадлежность изолятов к виду *A. pleuropneumoniae* также была подтверждена в полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с видоспецифичными праймерами.

На рисунке 2 показаны графики амплификации ДНК в образцах исследуемых изолятов в ПЦР-РВ, которые подтверждают принадлежность всех образцов к виду *A. pleuropneumoniae* [19–21].

Затем были определены серотипы изолятов *A. pleuropneumoniae* с использованием серотип-специфичных праймеров (рис. 3–5).

На рисунке 3 показаны графики амплификации ДНК в ПЦР-РВ изолятов № 1, 2 и 3 *A. pleuropneumoniae*, которые подтверждают их принадлежность к серотипу 2. Графики амплификации ДНК других исследуемых изолятов совпадают с отрицательным контролем, то есть не относятся ко 2-му серотипу.

На рисунке 4 представлены график амплификации ДНК в ПЦР-РВ изолята № 4 *A. pleuropneumoniae*, который подтверждает его принадлежность к серотипу 5, и графики амплификации ДНК других исследуемых изолятов, которые совпадают с отрицательным контролем и не относятся к данному серотипу.

Графики амплификации ДНК изолятов серотипа 9 представлены на рисунке 5, по результатам ПЦР-РВ к этому серотипу относятся изоляты № 5 и 6, в то время как графики других изолятов совпадали с отрицательным контролем.

Таким образом, в ПЦР-РВ было установлено, что изучаемые изоляты *A. pleuropneumoniae* № 1, 2 и 3 относятся к серотипу 2, изолят № 4 – к серотипу 5, а изоляты № 5 и 6 – к серотипу 9.

Следующим этапом работы было определение патогенных свойств изолятов *A. pleuropneumoniae* на лабораторных и естественно восприимчивых животных. Для этого 50 белых мышей массой 16–18 г и поросят 2,5–3,0-месячного возраста экспериментально заражали согласно методике, представленной выше. Все испытуемые изоляты были патогенны для белых мышей и свиней, так как во всех группах, кроме контрольных, наблюдали падеж зараженных животных. Специфичность падежа была подтверждена выделением чистых культур изучаемых изолятов из посевов патологического материала от павших животных на сердечно-мозговой агар с добавками (сыворотка и дрожжевой экстракт). Через 5 сут наблюдения за белыми мышами и через 10 сут – за поросятами результаты были учтены и интерпретированы.

В таблице 2 представлены значения Ig ЛД₅₀, позволяющие провести сравнительную оценку вирулентности изолятов *A. pleuropneumoniae*. Полученные данные свидетельствуют о том, что значение Ig ЛД₅₀ при экспериментальном заражении белых мышей составило $4,99 \pm 0,1$ Ig ЛД₅₀ м. к. для изолятов № 1, 2, 3 (2-го серотипа); $4,19$ Ig ЛД₅₀ м. к. – для изолята № 4 (5-го серотипа) и $5,39 \pm 0,2$ Ig ЛД₅₀ м. к. – для изолятов № 5 и 6 (9-го серотипа). При экспериментальном заражении поросят 2,5–3,0-месячного возраста значение этого показателя было минимальным также у изолята № 4 5-го серотипа и составило $5,49$ Ig ЛД₅₀ м. к. и максимальным у изолята № 5 9-го серотипа – $7,89$ Ig ЛД₅₀ м. к., что подтверждает более высокую вирулентность изолята 5-го серотипа.

Таким образом, было установлено, что из всех изучаемых изолятов более высокая вирулентность характерна для изолята № 4, который относится к 5-му серотипу, что согласуется с данными других авторов [1], проводивших исследования патогенности актинобацилл, выделенных на территории РФ.

Результаты изучения биохимических, протеомических, серологических и патогенных свойств изолятов

позволили депонировать их в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» под соответствующими названиями:

- изолят № 1 – штамм *A. pleuropneumoniae* «AU-21», серотип 2;
- изолят № 2 – штамм *A. pleuropneumoniae* «N-21», серотип 2;
- изолят № 3 – штамм *A. pleuropneumoniae* «VT-22», серотип 2;
- изолят № 4 – штамм *A. pleuropneumoniae* «KG-21», серотип 5;
- изолят № 5 – штамм *A. pleuropneumoniae* «OE-22», серотип 9;
- изолят № 6 – штамм *A. pleuropneumoniae* «DI-22», серотип 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения биологических свойств культур, выделенных в неблагополучных по АПП свиноводческих хозяйствах Белгородской, Кировской, Курской и Рязанской областей, было установлено, что все изучаемые изоляты относятся к виду *A. pleuropneumoniae*. При изучении протеомических свойств определены характерные пики m/z : 2541 ± 2; 4267 ± 2; 5085 ± 2; 6450 ± 2; 7207 ± 4; 9408 ± 3; 11 820 ± 6, аналогичные характеристикам референтного штамма *A. pleuropneumoniae*. По антигенным свойствам изоляты № 1, 2 и 3 относятся к серотипу 2; № 4 – к серотипу 5; № 5 и 6 – к серотипу 9. Все изоляты были патогенны для лабораторных и естественно восприимчивых животных. Значение Ig ЛД₅₀ при экспериментальном заражении белых мышей составило 4,99 ± 0,1 Ig ЛД₅₀ м. к. для изолятов 2-го серотипа; 4,19 Ig ЛД₅₀ м. к. – для изолята 5-го серотипа и 5,39 ± 0,2 Ig ЛД₅₀ м. к. – для изолятов 9-го серотипа. На основании полученных результатов изоляты были депонированы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» с целью использования их для создания вакцин против АПП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skorodumov D. I. Актинобациллезная (гемофильная) плевропневмония и гемофильный полисерозит свиней (этиология, лабораторная диагностика, основы специфической профилактики актинобациллезной плевропневмонии): автореф. дис. ... д-ра вет. наук. М.; 1997. 38 с.
2. Desrosiers R., Moore C. Indirect transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Swine Health and Production*. 1998; 6 (6): 263–265.
3. Jacobsen M. J., Nielsen J. P., Nielsen R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet. Microbiol.* 1996; 49 (3–4): 159–168. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00184-0.
4. Jobert J. L., Savoye C., Cariolet R., Kobisch M., Madec F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2000; 64 (1): 21–26. PMID: 10680652.
5. Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. *Proc. AASV*. 2007; 381–384.
6. Русалеев В. С., Бирюченков Д. А., Фроловцева А. А. Актинобациллезная плевропневмония свиней: профилактика и меры борьбы. *Свиноводство*. 2007; 4: 28–29. EDN: IBOJBB.
7. Skorodumov D. I. Актинобациллезная пневмония свиней. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2008; 12: 10–13.
8. Тимина А. М., Бирюченкова М. В., Щербаков А. В. Генодиагностика актинобациллезной плевропневмонии свиней. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2010; 8: 114–121. EDN: NDHHLN.
9. Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 1997; 58 (2–4): 239–249. DOI: 10.1016/S0378-1135(97)00162-4.
10. Фроловцева А. А. Получение антигенов *Actinobacillus pleuropneumoniae* для инактивированных вакцин: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2008. 25 с.

11. Cruijnsen T., van Leengoed L. A., Ham-Hoffies M., Verheijden J. H. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.* 1995; 63 (6): 2341–2343. DOI: 10.1128/iai.63.6.2341-2343.1995.
12. Loera-Muro A., Angulo C. New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2018; 217: 66–75. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.028.
13. Ramjeet M., Deslandes V., Gouré J., Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 2008; 9 (1): 25–45. DOI: 10.1017/S1466252307001338.
14. Потехин А. В., Лебедев Н. В., Русалеев В. С. Антигенные и иммуногенные свойства анатоксина *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ветеринария и кормление*. 2013; 5: 42–43. EDN: RCBGQR.
15. Stancheva S. G., Frömbling J., Sassu E. L., Hennig-Pauka I., Ladinig A., Gerner W., et al. Proteomic and immunoproteomic insights into the exproteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. *Microb. Pathog.* 2022; 172:105759. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105759.
16. Antenucci F., Magnowska Z., Nimtz M., Roesch C., Jänsch L., Bojesen A. M. Immunoproteomic characterization of outer membrane vesicles from hyper-vesiculating *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 188–194. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.07.001.
17. Kuhnert P., Bisgaard M., Korczak B. M. Schwendener S., Christensen H., Frey J. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. 2012; 89 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.02.001.
18. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уилльямс С. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. М.: Мир; 1997. 800 с.
19. Xiao G., Cao S., Huang X., Wen X. DNA microarray-based identification and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 2009; 73 (3): 190–199. PMID: 19794891.
20. Angen O., Ahrens P., Jessing S. G. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Vet. Microbiol.* 2008; 132 (3–4): 312–318. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.05.010.
21. Zhou L., Jones S. C., Angen Ø., Bossé J. T., Nash J. H., Frey J., et al. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (2): 800–803. DOI: 10.1128/JCM.01787-07.

REFERENCES

1. Skorodumov D. I. Porcine *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* and hemophilic polyserositis (etiology, laboratory diagnosis, basic specific prevention of *Actinobacillus pleuropneumoniae*): Author's Abstract of Thesis for degree of Doctor of Science (Veterinary Medicine). Moscow; 1997. 38 p. (in Russ.)
2. Desrosiers R., Moore C. Indirect transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Swine Health and Production*. 1998; 6 (6): 263–265.
3. Jacobsen M. J., Nielsen J. P., Nielsen R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet. Microbiol.* 1996; 49 (3–4): 159–168. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00184-0.
4. Jobert J. L., Savoye C., Cariolet R., Kobisch M., Madec F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can. J. Vet. Res.* 2000; 64 (1): 21–26. PMID: 10680652.
5. Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. *Proc. AASV*. 2007; 381–384.
6. Rusaleev V. S., Biryuchenkov D. A., Frolovtsseva A. A. Aktinobatsilleznaya plevropnevmoniya svinei: profilaktika i mery bor'by = Porcine (*Actinobacillus*) pleuropneumonia: prevention and control measures. *Pig-breeding*. 2007; 4: 28–29. EDN: IBOJBB. (in Russ.)
7. Skorodumov D. I. Aktinobatsilleznaya pnevmoniya svinei = Porcine (*Actinobacillus*) pleuropneumonia. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 2008; 12: 10–13. (in Russ.)
8. Timina A. M., Biryuchenkova M. V., Scherbakov A. V. Genetic diagnosis of porcine (*Actinobacillus*) pleuropneumonia. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2010; 8: 114–121. EDN: NDHHLN. (in Russ.)
9. Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I., Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 1997; 58 (2–4): 239–249. DOI: 10.1016/S0378-1135(97)00162-4.
10. Frolovtsseva A. A. Preparation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens for inactivated vaccines: Author's Abstract of Thesis for degree of Candidate of Science (Veterinary Medicine). Vladimir; 2008. 25 p. (in Russ.)
11. Cruijnsen T., van Leengoed L. A., Ham-Hoffies M., Verheijden J. H. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against

- a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.* 1995; 63 (6): 2341–2343. DOI: 10.1128/iai.63.6.2341-2343.1995.
12. Loera-Muro A., Angulo C. New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2018; 217: 66–75. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.028.
13. Ramjeet M., Deslandes V., Gouré J., Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 2008; 9 (1): 25–45. DOI: 10.1017/S1466252307001338.
14. Potekhin A. V., Lebedev N. V., Rusaleyev V. S. Antigenicity and immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* toxoid. *Veterinaria i kormlenie.* 2013; 5: 42–43. EDN: RCBGQR. (in Russ.)
15. Stancheva S. G., Frömbing J., Sassu E. L., Hennig-Pauka I., Ladnig A., Gerner W., et al. Proteomic and immunoproteomic insights into the exoproteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. *Microb. Pathog.* 2022; 172:105759. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105759.
16. Antenucci F., Magnowska Z., Nimitz M., Roesch C., Jänsch L., Bojesen A. M. Immunoproteomic characterization of outer membrane vesicles from hyper-vesiculating *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 188–194. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.07.001.
17. Kuhnert P., Bisgaard M., Korczak B. M. Schwendener S., Christensen H., Frey J. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods.* 2012; 89 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.02.001.
18. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. 787 p.
19. Xiao G., Cao S., Huang X., Wen X. DNA microarray-based identification and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 2009; 73 (3): 190–199. PMID: 19794891.
20. Angen O., Ahrens P., Jessing S. G. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. *Vet. Microbiol.* 2008; 132 (3–4): 312–318. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.05.010.
21. Zhou L., Jones S. C., Angen Ø., Bossé J. T., Nash J. H., Frey J., et al. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (2): 800–803. DOI: 10.1128/JCM.01787-07.

Поступила в редакцию / Received 21.04.2023

Поступила после рецензирования / Revised 15.05.2023

Принята к публикации / Accepted 22.05.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Евграфова Валерия Андреевна, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики бактериальных болезней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3053-6976>, e-mail: evgrafova@arriah.ru.

Прунтова Ольга Владиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru.

Шадрова Наталья Борисовна, кандидат биологических наук, заведующий отделом микробиологических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru.

Тимина Анна Михайловна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru.

Valeria A. Evgrafova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Bacterial Disease Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3053-6976>, e-mail: evgrafova@arriah.ru.

Olga V. Pruntova, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3143-7339>, e-mail: pruntova@arriah.ru.

Natalya B. Shadrova, Candidate of Science (Biology), Head of Department for Microbiological Testing, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-7510-1269>, e-mail: shadrova@arriah.ru.

Anna M. Timina, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0109-3507>, e-mail: timina@arriah.ru.