



Рис. 6. Алгоритм действий при оценке биологической безопасности свиноводческого хозяйства

та и контроля содержания свиней в ЛПХ; решить вопросы по управлению популяцией кабана в условиях эпизоотии АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложения по биобезопасности свиноводческих хозяйств сформированы на основе научных знаний о возбудителях инфекционных болезней, их сохранности в окружающей среде, путях передачи и т.д. Как показывает практика ведения свиноводства, соблюдение ветеринарно-санитарных требований в полном объеме позволяет до минимума снизить риски заноса возбудителей АЧС и других инфекционных болезней. Работа хозяйств по принципу «закрытого предприятия» является основой эпизоотического благополучия. Рекомендуемые нормы и правила биобезопасности на свиноводческих фермах (комплексах), постоянный мониторинг состояния биобезопасности — это эффективные меры в арсенале борьбы с экономически значимыми инфекционными болезнями свиней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Африканская чума свиней в России: распространение и клинико-анатомическое проявление / К.Н. Груздев, А.С. Иголкин, А.М. Рахманов, А.А. Шевцов // Ветеринария сегодня. — 2014. — №4 (11). — С. 10–17.
2. Данкверт С.А., Холманов А.М., Осадчая О.Ю. Свиноводство стран мира в конце XX века. — М., 2004. — 142 с.
3. Закон о ветеринарии: Закон РФ № 4979-1 от 14.05.1993: в редакции от 13.07.2015. — М.: КонсультантПлюс, 2015. — 22 с.

4. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации африканской чумы свиней: утв. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 21.11.1980. — М., 1980. — 12 с.

5. Ковалев Ю.И. Перспектива развития российского свиноводства в 2015–2020 гг. // Материалы V Международного ветеринарного конгресса. — М., 2015. — 1 CD-ROM.

6. Кодекс здоровья наземных животных. Т. 1. Общие положения / МЭБ. — 24-е изд. — Paris, France, 2015. — 449 с.

7. Макаров В.В. Африканская чума свиней. — М.: РУДН, 2011. — 268 с.

8. Методические указания по оценке биобезопасности свиноводческих предприятий в Российской Федерации / М.А. Титов, А.К. Караулов, А.А. Шевцов [и др.] // Методические указания по оценке эпизоотической ситуации, превенции и нотификации инфекционных заболеваний животных / ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2015. — С. 127–162.

9. Об утверждении правил определения зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств, а также организаций, осуществляющих убой свиней, переработку и хранение продукции свиноводства: приказ № 258 от 23.07.2010 г. МСХ РФ // Вопр. норм.-прав. регулирования в ветеринарии. — 2010. — № 3. — С. 15–20.

10. Сравнительный анализ свойств изолятов вируса африканской чумы свиней / А.А. Варенцова, С.Г. Ремыга, В.Л. Гаврилова [и др.] // Ветеринария. — 2013. — № 12. — С. 27–32.

УДК 619:616.98:579.843.94

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *HAEMOPHILUS PARASUIS* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В.И. Павелко¹, Ю.Ю. Бабин², А.В. Пискунов³, А.В. Спрыгин⁴, О.В. Прунтова⁵

¹ младший научный сотрудник, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pavelko@arriah.ru

² младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: babin@arriah.ru

³ младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: piskunov@arriah.ru

⁴ старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁵ руководитель Испытательного центра, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для быстрой идентификации полевых изолятов *Haemophilus parasuis*. С помощью программы ClinProTools были выделены 15 пиков в белковом спектре со 100% распознавательной способностью, дифференцирующие 6 представителей *Pasteurellaceae*. Уникальным для *Haemophilus parasuis* является пик массой 8407,92 Да ($p < 0,05$). Дополненная база данных успешно использована для идентификации 8 изолятов *Haemophilus parasuis*. При проверке специфичности метода с 9 видами бактерий семейства *Pasteurellaceae* ложноположительные результаты отсутствовали.

Ключевые слова: гемофильный полисерозит, болезнь Глессера, MALDI-TOF MS, *Haemophilus parasuis*.

UDC 619:616.98:579.843.94

IDENTIFICATION OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* USING MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

V.I. Pavelko¹, Yu.Yu. Babin², A.V. Piskunov³, A.V. Sprygin⁴, O.V. Pruntova⁵

¹ Junior Researcher, PhD Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pavelko@arriah.ru

² Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: babin@arriah.ru

³ Junior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: piskunov@arriah.ru

⁴ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁵ Head of the Testing Centre, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

SUMMARY

The paper covers results of MALDI-TOF mass spectrometry used to rapidly identify *Haemophilus parasuis* field isolates. ClinPro Tools software showed 15 peaks in the protein spectrum with 100% identification capability differentiating 6 *Pasteurellaceae* species. Peak corresponding to mass of 8407.92 Da ($p < 0.05$) is unique for *Haemophilus parasuis*. The updated database was successfully used for identification of 8 *Haemophilus parasuis* isolates. No false-positive results were obtained when the method specificity was tested using 9 bacterial species of *Pasteurellaceae* family.

Key words: hemophilic polyserositis, Glässers Disease, MALDI-TOF MS, *Haemophilus parasuis*.

ВВЕДЕНИЕ

Гемофильный полисерозит, или болезнь Глессера, — инфекционное заболевание свиней, характеризующееся серозно-фибринозным перикардитом, плевритом, перитонитом, артритом и менингоэнцефалитом [5].

Возбудителем болезни Глессера является грамотрицательная палочковидная бактерия *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) из семейства *Pasteurellaceae*. Кроме нее респираторной тракт свиней может быть колонизирован такими бактериями, как *Actinobacillus minor* (*A. minor*), *Actinobacillus indolicus* (*A. indolicus*), *Actinobacillus porcinus* (*A. porcinus*), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*). При бактериологическом исследовании эти виды можно дифференцировать по биохимическим признакам [6], но это требует наличия дорогостоящих бактериальных сред сложного состава и временных затрат [4]. В последнее время MALDI-TOF масс-спектрометрию (MALDI-TOF MS) часто используют в качестве экспресс-метода идентификации бактерий. Данный метод представляет универсальную, высокочувствительную, быструю и де-

шевую альтернативу генетическим и фенотипическим методам идентификации.

Первые исследования с применением MALDI-TOF MS для идентификации бактерий семейства *Pasteurellaceae* продемонстрировали родовую и видовую специфичность. Однако между близкородственными видами и подвидами идентификация была затруднена [1].

Целью данной работы было дополнение базы данных спектрами *H. parasuis* и *A. minor* для расширения возможностей идентификации бактерий семейства *Pasteurellaceae* от близкородственных микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и изоляты. В работе использовали культуры бактерий 23 штаммов семейства *Pasteurellaceae*, которые представлены в табл. 1.

Все культуры выращивали на колумбийском агаре с добавлением 10% экстракта крови лошади, 10% сывротки КРС и 10% дрожжевого экстракта в течение 24 ч при 37°C.

Таблица 1
Идентификация штаммов и изолятов представителей семейства *Pasteurellaceae*

Название штамма	Lq идентификации	Идентифицированный микроорганизм
* <i>A. minor</i> изолят Магнитный+	2,193	<i>A. minor</i> изолят Магнитный
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27088	2,262	<i>A. pleuropneumoniae</i> DSM 1372T DSM
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27089	2,248	<i>A. pleuropneumoniae</i> 351 LAL
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 33377	2,284	<i>A. pleuropneumoniae</i> 351 LAL
* <i>A. paragallinarum</i> изолят Чамзинское	1,985	<i>A. paragallinarum</i> изолят Чамзинское
* <i>H. parasuis</i> ATCC 19417	2,436	<i>H. parasuis</i> ATCC 19417
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ SK1	2,836	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ SK1
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ UR	2,822	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ UR
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ IL1	2,670	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ IL1
* <i>H. parasuis</i> ВГНКИ IN1	2,624	<i>H. parasuis</i> ВГНКИ IN1
<i>H. parasuis</i> BOT2	2,417	<i>H. parasuis</i> IN1
<i>H. parasuis</i> BOT5	2,517	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> KM1	2,417	<i>H. parasuis</i> IN1
<i>H. parasuis</i> KR1	2,294	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> N2	2,583	<i>H. parasuis</i> UR
<i>H. parasuis</i> NAG	2,449	<i>H. parasuis</i> SK1
<i>H. parasuis</i> SW124	2,437	<i>H. parasuis</i> UR
<i>H. parasuis</i> VN	2,496	<i>H. parasuis</i> ATCC 19417
<i>H. somni</i> изолят Колос	2,150	<i>H. somni</i> 512 LAL
<i>M. haemolytica</i> ATCC 29696	2,313	<i>M. haemolytica</i> DSM 5283 DSM
<i>P. multocida</i> 115	2,512	<i>P. multocida</i> FI FLR
<i>P. multocida</i> ATCC 15742	2,453	<i>P. multocida</i> FI FLR
<i>P. multocida</i> TS-8	2,418	<i>P. multocida</i> spp. <i>multocida</i> DSM 16031T DSM

* штаммы бактерий, которые использовали для создания профиля спектра и расширения базы данных.

Пробоподготовка. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с методикой, описанной А. Calderaro в 2014 г. [2].

MALDI-TOF MS анализ. Получение и анализ спектров проводились на масс-спектрометре Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия) с помощью программы MALDI Biotyper (версия 3.0) с базой спектров (версия 3.1.2.0; 4111 спектров, Bruker Daltonics, Германия) с параметрами по умолчанию (линейный положительный режим; частота лазера 60 Гц; напряжение источника ионов №1 20 кВ; напряжение источника ионов №2 16,7 кВ; напряжение линзы 7,0 кВ; диапазон масс от 2000 до 20000 Да).

Белковую экстракцию наносили на 3 лунки. Для каждой лунки создавали 15 спектров. Одиночные спектры суммировали из 20 выстрелов лазера. Прибор калибровали с помощью белкового стандарта с точно известными массами белков Bacterial Test standard (BTS) (Bruker Daltonics, Германия) согласно инструкции производителя.

Идентификация. При помощи программы Biotyper сравнивали каждый из полученных спектров с профилями спектров базы данных по наличию и интенсивности пиков. При этом вычислялся показатель сходства, выражающийся логарифмическим коэффициентом от 0 до 3. Производителем установлены три порога: score < 1,7 — микроорганизм не идентифицирован, 1,7 ≤ score ≤ 2,0 — идентификация до рода, score ≥ 2,0 — вид микроорганизма достоверно идентифицирован.

База спектров MALDI-TOF MS для идентификации *H. parasuis*. Для автоматического создания профиля спектра (Main Spectrum Profile, MSP) в программе Biotyper software с помощью Biotyper MSP Creation Standard Method использовали 20 спектров интенсивностью более 10⁴ у.е.

Статистический анализ. Спектры, использованные ранее для создания MSP, импортировали в программу ClinProTools версия 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) для статистического анализа. Программу использовали для визуального сравнения спектров и для идентификации пиков, специфично дифференцирующих *H. parasuis*.

Анализ проводили в диапазоне от 2000 до 20000 Да. Все спектры, загруженные в программу, рекалибровали в автоматическом режиме. Затем проводили анализ данных с помощью метода главных компонент и по результатам анализа строили трехмерный график.

Кроме того, на основе спектров построили классифицирующие модели с помощью 3 статистических алгоритмов: Quick Classifier (QC), Supervised Neural Network (SNN) и Genetic Algorithm (GA). Алгоритмы выделили дифференцирующие пики для каждого микроорганизма. Классификации, полученные с помощью 3 моделей, сравнили друг с другом по значениям параметров «распознавательная способность» («Recognition Capability», RC) и «перекрестная проверка» («Cross Validation», CV). Модель с наивысшим значением параметров RC и CV выбрали для поиска дифференцирующих пиков, представленных в статье. Наличие или отсутствие каждого пика проверили при сравнении 5 усредненных спектров, созданных из 20 одиночных спектров штаммов.

Построение дендрограмм. Кластерный анализ выполняли с помощью построения дендрограмм на основе MSP, используя соответствующую функцию в статистическом пакете Matlab 7.1 (MathWorks Inc.), встроенную в программу MALDI Biotyper. Использовали параметры «Distance Measure Euclidian» и «Linkage complete». Значения нормализовали по шкале от 0 (полное совпадение) до 1000 (отсутствие совпадений).

В построении дендрограммы использовали как MSP, полученные в ходе данной работы, так и присутствующие в базе данных Bruker Biotyper.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью дополнения базы данных спектрами бактерий семейства *Pasteurellaceae* использовали суточные культуры 5 штаммов *H. parasuis* (ATCC 19417, IN1, SK, IL1 и UR).

Для формирования профиля спектра в базе данных с помощью автоматической функции в программе Biotyper использовали 20 спектров (рис. 1). Шесть полученных MSP объединили с оригинальной базой данных для дальнейшей «слепой» идентификации близкородственных бактерий семейства *Pasteurellaceae*.

При проверке специфичности методики с применением изолятов *H. parasuis* VN, KM1, BOT2, KR1, NAG, SW124, LUB и N2 не зафиксировано ложноотрицательных результатов.

Дополнительно, для исключения ложноположительных результатов, метод MALDI-TOF тестировали на специфичность с близкородственными бактериями семейства *Pasteurellaceae*. Для достижения поставленной задачи использовали суточные культуры *A. pleuropneumoniae* ATCC 27088, *A. pleuropneumoniae* ATCC 27089, *A. pleuropneumoniae* ATCC 33377, *H. somni* изолят Колос, *M. haemolytica* ATCC 29696, *P. multocida* 115, *P. multocida* ATCC 15742, *P. multocida* TS-8. Результаты оценки специфичности разработанной методики представлены в табл. 1. По результатам исследования не выявлено ложноположительных результатов.

Для визуализации и идентификации дифференцирующих пиков бактерии рода *Haemophilus* и близкородственных представителей рода *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Avibacterium* и *Histophilus* импортировали в программу

Рис. 1. Трехмерный график спектров штаммов *H. parasuis*, построенный с помощью метода главных компонент
зеленый — *A. minor* изолят Магнитный; желтый — *A. pleuropneumoniae* ATCC 27088; красный — *A. paragallinarum* Чамзинское; синий — *H. somni* Колос; голубой — *H. parasuis* ATCC 19417; розовый — *H. parasuis* IL1; розовый — *H. parasuis* IN1; розовый — *H. parasuis* SK; розовый — *H. parasuis* UR; красный — *P. multocida* 115.

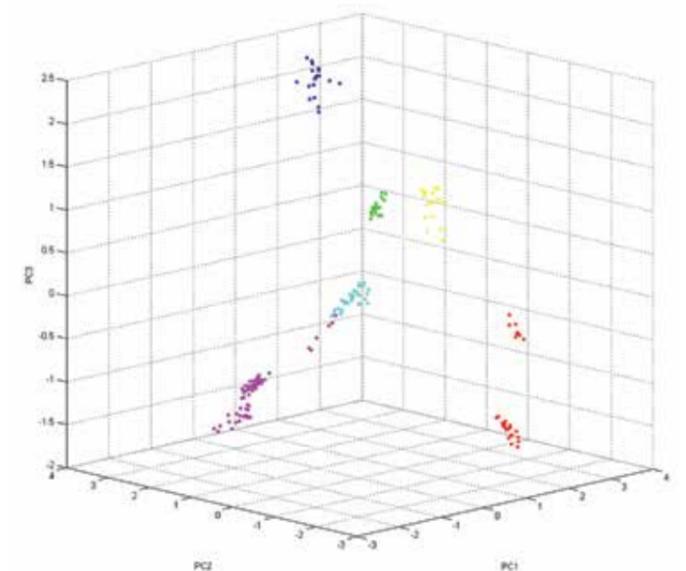


Таблица 2
Дифференцирующие пики модели SNN

№ п/п	Соотношение масса/заряд белкового пика	<i>A. minor</i>	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. paragallinarum</i>	<i>H. somni</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
1	2562,52	-	-	-	+	-	-
2	3478,49	-	-	+	-	-	-
3	3600,84	+	-	-	-	-	-
4	3844,7	-	-	-	-	-	+
5	4187,6	+	-	-	+	-	+
6	4266,02	-	+	-	-	-	-
7	4595,82	-	-	+	-	-	-
8	4666,73	-	-	+	-	-	-
9	6304,33	+	+	-	-	-	+
10	7149,08	-	-	-	-	+	+
11	7201,39	+	-	-	-	-	-
12	8407,92	-	-	-	-	+	-
13	9189,56	-	-	+	-	-	-
14	12803,31	+	-	-	-	-	-
15	19476,08	-	-	-	+	-	-

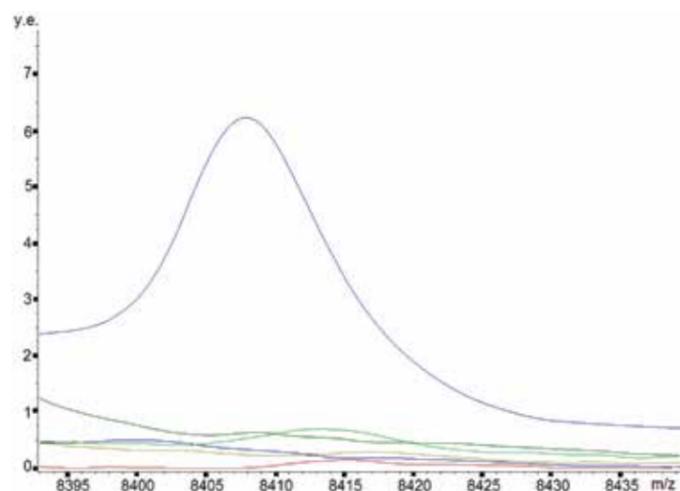
ClinProTools. Для определения гомогенности белковых спектров использовали метод главных компонент. Метод позволяет сократить размерность данных и определить уникальные переменные. На трехмерном графике спектры образуют 6 кластеров. Бактерии вида *H. parasuis* распределяются на 2 группы: в первую груп-

пу вошли спектры штаммов ATCC 19417, IL1 (розовый и голубой цвет), вторая группа состояла из штаммов IN1, SK, UR. *P. multocida* 115 и *A. paragallinarum* Чамзинское вошли в третий кластер (красный цвет). Остальные спектры бактерии вида *A. minor*, *A. pleuropneumoniae*, *H. somni* были отнесены в отдельные кластеры (рис. 1).

Для определения дифференцирующих пиков использовали классифицирующие модели. Для этого использовали 3 алгоритма: Quick Classifier (QC), нейронную сеть, обучающуюся с учителем (Supervised Neural Network, SNN), и генетический алгоритм (Genetic Algorithm, GA). Модели на основе предоставляемых выборочных данных способны классифицировать результаты для новых случаев. QC-модель имела самые низкие значения RC=96,98% и CV=95,95%. Лучший результат со 100% возможностью распознавания и 100% уровнем кросс-валидации продемонстрировала SNN-модель. Модель на основе GA показала чуть более низкое значение CV=99,9%. SNN-модель была основана на 10 областях, представленных в табл. 2, в белковом спектре со 100% специфичностью дифференцирующих *H. parasuis*, *P. multocida*, *A. paragallinarum*, *A. minor*, *A. pleuropneumoniae* и *H. somni*. Классифицирующие алгоритмы широко применяются в масс-спектрометрии для поиска биомаркеров представителей одного рода [2] и для дифференциации патогенных и непатогенных штаммов одного вида [3].

Наличие пиков проверили визуально у одиночных спектров всех 6 бактерий. Пример пика массой 8407,92 Да, дифференцирующего *H. parasuis*, представлен на рис. 2.

Рис. 2. Пример дифференцирующего пика массой 8407,92 Да фиолетовый — *H. parasuis*; красный — *A. minor*; синий — *A. paragallinarum*; светло-зеленый — *A. pleuropneumoniae*; желтый — *H. somni*; темно-зеленый — *P. multocida*.



Способность метода определять клональность изолятов используют для быстрого субтипирования [3]. По сравнению с биохимическими и генетическими методами, такими как секвенирование и типирование на основе мультилокусного секвенирования, дифференциация бактерий с помощью MALDI-TOF MS быстрее, дешевле и менее трудозатратна.

Для изучения протеомических свойств построили дендрограмму, демонстрирующую внутривидовые сходства и отличия штаммов и изолятов *H. parasuis*. Как видно на рис. 3, все 14 представителей *H. parasuis* принадлежат к одной кладе. Наиболее близким «соседом» к группе *H. parasuis* является изолят *A. minor*. Протеомические профили бактерий рода *Actinobacillus*, *Haemophilus* и *Pasteurella*, в том числе представленные в базе данных, образуют смешанные клады, как и полногеномные последовательности [7]. Представители *A. paragallinarum*, *H. somni*, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, использованные для поиска дифференцирующих пиков, входят в кластеры, образованные другими представителями соответствующих родов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была дополнена база данных белковых спектров Bruker Biotyper профилями спектров 5 штаммов *H. parasuis*, 1 изолята *A. minor* и изолята *A. paragallinarum*.

При построении классифицирующих моделей наилучший результат показала модель на основе алгоритма SNN. Распознавательная способность модели составила 100%, коэффициент перекрестной проверки 100%. Согласно этой модели, характерным для *H. parasuis* является пик массой 8407,92 Да (p<0,05).

В данной работе впервые были представлены дифференцирующие пики для 6 близкородственных представителей семейства *Pasteurellaceae*. Проверка специфичности дополненной базы данных показала отсутствие ложноположительных результатов.

Метод позволяет идентифицировать *H. parasuis* от близкородственных микроорганизмов семейства *Pasteurellaceae*.

Авторы выражают благодарность И.В. Подколзину за консультативную помощь, Н.Б. Щадровой за техническую помощь и А.В. Потехину за предоставленные изоляты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry / P. Kuhnert [et al.] // J. Microbiol. Methods. — 2012. — Vol. 89, № 1. — P. 1–7.
2. Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database / A. Calderaro [et al.] // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, № 2:e88895. — doi: 10.1371/journal.pone.0088895.
3. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry:

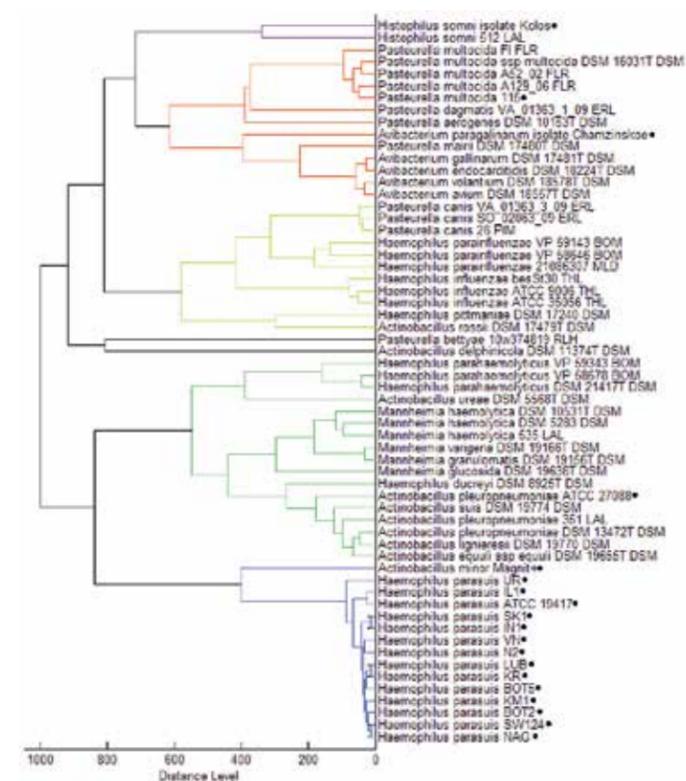


Рис. 3. Дендрограмма на основе MSP *H. parasuis* и близкородственных бактерий

• спектры бактерий, полученные в ходе данной работы.

do we need guidance for data interpretation? / S. Spinali [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2015. — Vol. 53, № 3. — P. 760–765.

4. Olvera A., Segalés J., Aragon V. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods // Vet. J. — 2007. — Vol. 174, № 3. — P. 522–529.

5. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method / H. Amano, M. Shibata, N. Kajio, T. Morozumi // J. Vet. Med. Sci. — 1994. — Vol. 56, № 4. — P. 639–644.

6. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance / P. Kielstein [et al.] // Vet. Microbiol. — 2001. — Vol. 81, № 3. — P. 243–255.

7. Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the polyphyletic *Pasteurellaceae* genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella* / S. Naushad [et al.] // Int. J. Genomics. — 2015. — Vol. 2015. — URL: http://dx.doi.org/10.1155/2015/198560.