

УДК 619:576 887.111.636.4

DOI: 10.31073/vet_biotech38-01

АЙШПУР О.Є., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: olenaayshpur@gmail.com,

МУШТУК І.Ю., канд. вет. наук, e-mail: mushtuk0104@gmail.com,

ГУМЕНЮК В.В.*, e-mail: Volodymyr.Gumeniuk@arterium.ua,

ЄРМОЛЕНКО О.М.*, e-mail: alex-dndi@ukr.net,

ДЕРЕВ'ЯНКО М.М.*, e-mail: direktor.zrdlvm@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО БАКТЕРІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ АКТИНОБАЦИЛЯРНОЇ ПЛЕВРОПНЕВМОНІЇ СВИНЕЙ

*Представлено дані щодо бактеріологічної діагностики актинобацилярної плевропневмонії свиней. Наведено методи мікробіологічного дослідження патологічного матеріалу, ізолювання та ідентифікації збудника – бактерію *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методи зберігання культур.*

Виклад матеріалу зосереджений на представленні чіткої послідовності досліджень та інтерпритації результатів і призначено для спеціалістів лабораторій ветеринарної медицини різних форм власності, науковців, викладачів мікробіології і студентів ветеринарних факультетів.

Ключові слова: бактеріологічна діагностика, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, свині.

Вступ. Актинобацилярна плевропневмонія свиней (APP) – інфекційне захворювання свиней, що характеризується геморагічною та некротизуючою пневмонією і фібринозним плевритом. За гострого перебігу проявляється гарячкою та септицемією, за хронічного – виснаженням і затримкою росту свиней.

Збудник – бактерії *Actinobacillus pleuropneumoniae* відзначається тропізмом до легеневої тканини. Встановлено вірулентність 15 серотипів (біотики – I, II). При цьому до біотипу I відносяться – 13 серотипів, до біотипу II – 2 серотипа. *Actinobacillus pleuropneumoniae* визначають за здатністю до секреції трьох токсинів: АрхI, АрхII, АрхIII; 4-й (RTX-токсин) – Арх IV, продукує усі 15 серотипів даних бактерій та LPS-ендотоксин [1–4].

Захворювання висококонтагіозне, різні серотипи можуть циркулювати в одному стаді. APP – одна із найпоширеніших бактеріальних респіраторних хвороб свиней, яка реєструється майже у всіх країнах світу, що займаються свиноводством. Хвороба завдає значних збитків, особливо в умовах промислового

* Аспіранти – науковий керівник, д-р вет. наук **О.Є. Айшпур**

ведення свинарства. Економічні збитки від розвитку хвороби складаються з високої захворюваності (до 20–30%), летальності (до 100%) та зниження маси тіла. Більше, ніж 80% досліджуваних ферм у Бельгії, Іспанії, Італії мали серопозитивних тварин. Діагноз на плеврити мають від 15 до 25% свиней при забої [2, 5–10].

Діагноз на актинобацилярну плевропневмонію свиней установлюють на основі клінічних симптомів, патологоанатомічних – макроскопічних та гістопатологічних, бактеріологічних досліджень уражених легенів або змивів із гортані, визначенні серологічного профілю (ІФА), за дослідження ізолятів мікроорганізмів або патматеріалів методом ПЛР [11, 12]. Але лабораторна діагностика при цьому досить складна, що пов'язано із вимогливістю цих мікроорганізмів до живильних середовищ та їх швидкою загибеллю поза організмом тварини.

Тому нами були розроблені методичні рекомендації з бактеріологічної діагностики захворювання, в яких представлені найкращі та найновіші методики досліджень та результати власних досліджень.

Метою роботи є викладення чіткої послідовності бактеріологічних досліджень, проведених нами на наявність бактерій *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методологічних підходів та інтерпритації результатів.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії бактеріальних хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини НААН, а також в 10 свинарських господарств України неблагополучних щодо респіраторних бактеріальних хвороб свиней.

Матеріалом для дослідження слугували біоматеріали від хворих, вимушено забитих та загиблих поросят різних вікових груп. Предметом дослідження були: свині, білі миші; кров свині, штами, ізоляти мікроорганізмів; біоматеріал прижиттєвий та від загиблих поросят.

За дослідження біохімічних властивостей, крім висіву на строкатий ряд, використовували тест-системи API для ідентифікації мікроорганізмів (Франція).

Бактеріологічні дослідження патматеріалу від загиблих і вимушено забитих свиней різних вікових груп, проводили згідно з загальноприйнятими методиками. За мікроскопічних досліджень використовували методи фарбування мазків за Грамом, Гінсом.

За культивування мікроорганізмів використовували живильні середовища: м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, ГМФ-бульйон, сироватковий агар, триптиказо-соевий бульйон, серцево-мозковий бульйон, напіврідкі середовища з вуглеводами й багатоатомними спиртами, середовище Сімонса, середовище Олькеницького, середовище Гіса, до яких перед посівом

культур додавали фактори росту – V- та X-фактори, середовище Мак-Конкі, Ендо, Левіна, Каламбія агар, кров'яний агар, агар Мюллер-Хінтона, шоколадний агар, МПА та МПБ з додаванням 10% екстракту дріжджів та з 10% еритроцитів коня (V- та X-факторів), для визначення уреазної активності використовували середовище Заксе [13, 14]. Придатність середовищ для культивування мікроорганізмів визначали перевіркою їх ростових властивостей за допомогою тест-культур мікроорганізмів згідно «Методичних рекомендацій щодо бактеріологічного контролю якості поживних середовищ», розроблених співробітниками ДНКІБШМ та ІВМ НААН (2011 р.).

Бактеріологічний діагноз на актинобацилярну плевропневмонію свиней встановлювали на основі Методичних рекомендацій щодо бактеріологічної діагностики актинобацилярної плевропневмонії свиней, розроблених науковцями ІВМ НААН.

Результати досліджень та їх обговорення. Бактеріологічний діагноз на актинобацилярну плевропневмонію свиней встановлювали на основі результатів бактеріологічних досліджень патологічного матеріалу від загиблих та вимушено забитих тварин, а також біологічної проби.

Відбір і транспортування матеріалу. Матеріал для дослідження відбирали не пізніше 4–6 годин з моменту забою/загибелі тварин, від 2–3 трупів поросят, що мали на розтині характерні ознаки актинобацилярної плевропневмонії і не лікувались антибіотиками. При розтині поверхню шкіри обробляли дезінфікуючим розчином і стерильним інструментом розтинали черевну порожнину і стінки грудної клітини. Після розтину стерильною пастерівською піпеткою набирали ексудат із перитонеальної, плевральної, перикардіальної порожнини і переносили в стерильну пробірку або флакон.

Для бактеріологічного дослідження також відбирали кров із серця, уражені легені на межі із здоровою тканиною (шматочки уражених легень розміром 5×5 см), середостінні, бронхіальні, заглоткові лімфовузли, слиз носової порожнини і трахеї, печінку, селезінку, нирку від 2–3 свіжих трупів.

Патматеріал розміщували в стерильний посуд разом із пробами ексудату в термосі з льодом (або в термоконтейнері із холододим агентом).

Послідовність бактеріологічного дослідження матеріалу.

1-ий день. Шматочки легенів, лімфовузлів й іншого патматеріалу опускали у спирт та обпалювали. Стерильним скальпелем або ножицями вирізали шматочок паренхіми і робили на двох предметних скельцях мазки-відбитки. Після висихання на повітрі і фіксації над полум'ям один мазок фарбували за Грамом, а інший – на капсулу, за Гінсом і мікроскопували. У позитивних випадках у мазках збудник має форму дрібних поліморфних, грамнегативних кокобактерій, коротких паличок, оточених капсулою.

Бактеріологічне дослідження проводили у відповідній послідовності (рис. 1). Поверхню легенів, лімфовузлів й іншого патматеріалу обпалювали шпателем, набирали пульпу в пастерівську піпетку, вносили її в пробірку з 1–2 см³ МПБ, перемішували і висівали.

Для росту на штучних живильних середовищах кокобактерії потребують специфічного ростового фактора – дифосфопіридиннуклеотиду (V-фактор росту). Збудник добре росте на модифікованому PPLO-агарі, шоколадному агарі Мюллер-Хінтона-II, колумбійському агарі з додаванням НАД.

Висіви на живильні середовища повинні бути проведені не пізніше як через 24 години після взяття патологічного матеріалу.

Дві-три краплі суспензії із ексудату, зшкребків серозних оболонок або іншого матеріалу наносили на поверхню підсушеного кров'яного агару в чашку Петрі. Стерильною пастерівською піпеткою матеріал висівали та шпателем розподіляли по всій поверхні агару і дрібно розсівали на три чашки Петрі з вказаним живильним середовищем. Після 30–40-хвилинного підсушування в термостаті за температури $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ бактеріологічною петлею хрестовидно або Т-подібно штрихом робили посіви по діаметру чашки культуру штаму білого стафілокока або негемолітичної *E. coli* – «бакгодівницю». Посіви інкубували в аеробних умовах за температури $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ впродовж 24 годин.

Субкультури негемолітичних штамів білого стафілокока або ешеріхій підтримують в лабораторії. Для досліджень використовують агарову культуру, яку зберігають в холодильнику за температури від 4 до 8°C не більше 20 діб [3, 15, 16].

2-ий день. Перегляд висівів. На кров'яному МПА ріст *Actinobacillus pleuropneumoniae* спостерігали в зоні, що прилягає до культури-«годівниці» у вигляді дрібних (0,1–0,2 мм), випуклих, правильної округлої форми, слизової консистенції гемолітичних колоній з рівними краями. Макроскопічно видимі колонії бактерій *Actinobacillus pleuropneumoniae* ростуть на відстані не більше 1–2 см від посіву «бакгодівниці». На рідкому середовищі з додаванням ростового фактору зумовлює помутніння.

При виявленні сателітних гемолітичних (наявність зони β -гемолізу) колоній, із них готували мазки, які фарбували за Грамом та Гінсом. В мазках із культури бактерії мають форму дрібних (0,2–0,5 мкм) грамнегативних кокобактерій та зернистих тонких паличок, розташованих поодинокі, попарно, зрідка – у вигляді коротких ланцюжків із 3–5 клітин. При фарбуванні за Гінсом на темному фоні знаходили дрібні бактерії червоного кольору, оточені вузькою світлою зоною (капсулою).

Відсів характерних колоній на 2–3 пробірки або чашки Петрі шоколадного агару.

3-й день. Визначення біохімічних властивостей. Ферментативні особливості *Actinobacillus pleuropneumoniae* вивчали в напіврідких середовищах, до яких додавали 0,2% вуглеводів та 10% дріжджового екстракту. Можна використовувати сухі середовища Гіса промислового виробництва. Уреази активність визначали висівами на середовище Заксе.

Для визначення залежності виділених культур від V- та X-факторів висівали їх на МПА з 10% екстракту дріжджів та на МПА з 10% еритроцитів крові коня, на МПА та МПБ без ростових факторів.

Для визначення патогенних властивостей *Actinobacillus pleuropneumoniae* біопробу проводили на білих мишах. Для цього культуру, що досліджували, висівали на шоколадний агар і вирощували за температури $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 24 години. Вирощену культуру змивали стерильним 0,85% розчином NaCl і доводили концентрацію бактеріальної зависі до 10 одиниць каламутності за оптичним стандартом (1 млрд. мікробних клітин). Для точного визначення заражаючої дози використовувати метод висіву на рекомендовані середовища в чашки Петрі з наступним підрахунком і визначенням кількості колоній, що виросли в 1 см^3 . Визначену заражаючу дозу в об'ємі $0,5\text{ см}^3$ вводили внутрішньочеревно 3-м білим мишам (масою 16–18 г).

Культуру визнавали патогенною у випадках загибелі не менше 2-х білих мишей впродовж 24–72 годин з послідуєчим бактеріологічним дослідженням патматеріалу і виділенням з них культури збудника [17, 18].

4-й день. Облік висівів та біопоби.

Для *Actinobacillus pleuropneumoniae* характерна β -гемолітичність, наявність капсули, уреази активність, ферментація маніту, ксилози, сорбіту з утворенням кислоти без газу. Інші ферментативні ознаки слід розглядати як додаткові. *Actinobacillus pleuropneumoniae* V-залежна, тому росте на дріжджовому МПА, на шоколадному агарі, тоді як на кров'яному МПА з еритроцитами коня – ріст відсутній і на МПА та МПБ без ростових факторів також.

5–6-й день. Облік висівів та оцінка результатів.

Культури мікроорганізмів, що мали характерну морфологію, β -гемолітичні властивості, не росли на МПА і МПБ, а росли на кров'яному агарі з «бакгодівницею», проявляли уреази активність, мали капсулу, при ферментації маніту, ксилози, сорбіту, утворювали кислоту і були патогенні для білих мишей, відносили до *Actinobacillus pleuropneumoniae* (табл. 1).

Підтвердити наявність збудника і навіть визначити його серологічний варіант можна за допомогою РА на склі або в РНГА [15]. Індикацію збудника в матеріалі можна проводити із застосуванням ІФА і ПЛР. Ретроспективна

діагностика (встановлення титрів антитіл) включає застосування РА, РНГА та ІФА.

Таблиця 1

Результати ізолювання *Actinobacillus pleuropneumoniae* із патологічного матеріалу від вимушено забитих свиней

№ п/п	Кількість досліджуваних свиней	Вік тварин	Кількість виділених ізолятів	Назва органу, із якого виділена культура
1	10	80–88 діб	2	легені
2	12	45–50 діб	3	легені

Культури *Actinobacillus pleuropneumoniae* можна зберігати на шоколадному агарі за температурі від 4 до 8°C (15–30 діб), в ліофілізованому вигляді (до 1 року), найбільш тривала життєздатність культур відзначається під час зберігання в заморожених згустках крові за мінус 40°C (до 6 місяців). *Actinobacillus pleuropneumoniae* краще зберігають життєздатність і ростуть на сироватково-дріжджовому МПА, МПБ, 0,3%-ному напіврідкому агарі, ніж на «шоколадному» МПА; оптимальна температура зберігання 5–8°C; культури на щільних середовищах під вазеліновим маслом (сироватково-дріжджовий МПА, «шоколадний» МПА) зберігають життєздатність довше. Таким чином, залежно від типу живильного субстрату і режиму зберігання необхідність періодичних пересівів культур указаних бактерій коливається в межах 7–42 доби.

Схема бактеріологічних досліджень представлена на рисунку 1.

Як додаткове дослідження для ідентифікації актинобацил використовували диски із с сапоніном – 750 мкг/диск, бацитрацином – 10 мкг/диск, еритроміцином – 15 мкг/диск, азитроміцином – 15 мкг/диск.

Диски із сапоніном накладали на 5% кров'яний агар, засіяний 500 млн. зависю досліджуваної культури в ізотонічному розчині хлориду натрію. Через 48–72 години інкубації висівів в термостаті за температури 37°C вели облік результатів. Ріст колоній навкруги дисків із сапоніном и його відсутність поза зоною гемолізу слугувало диференціальною ознакою, що культура відноситься до гемофільних бактерій.

Диски з бацитрацином, азитроміцином и еритроміцином також використовують для ідентифікації гемофільних культур. Шоколадний агар засівали 500 млн. зависю досліджуваної культури. Накладали диски із антибіотиками та розміщали у термостат на 48–72 годин за температури 37°C. Бацитрацин інгібує ріст багатьох грампозитивних бактерій – стафілококів,

стрептококів, мікрококів та ін. Колонії гемофільних паличок ростуть навколо диску з бацитрацином у зоні затримки росту інших бактерій.

Гемофільні бактерії стійкі до еритроміцину та чутливі до азитроміцину.



Рис. 1. Схема бактеріологічного дослідження на актинобацилярну плевропневмонію.

Ріст культури навкруги диску з еритроміцином або утворення зон затримки росту не більше 14 мм може слугувати одним із видових ознак культури. Навкруги диску з азитроміцином утворюється зона затримки росту ≥ 15 мм. Результат оцінювали за сукупністю ознак (табл. 2).

Результати дослідження ідентифікації актинобацил

Диск	Диференціальна ознака	Штам App Rav	Штам App 4226	Штам App C-A
Сапонін	Ріст навколо диску	Ріст навколо диску	Ріст навколо диску	Ріст навколо диску
Бацитрацин 10 ОД/диск	_____ " _____	Ріст навколо диску	Ріст навколо диску	Ріст навколо диску
Еритроміцин 15 мкг/диск	Зона затримки росту ≤ 14 мм	10 мм	8 мм	12 мм
Азітроміцин 15 мкг/диск	Зона затримки росту ≥ 15 мм	10 мм	12 мм	23 мм

Висновки. В результаті аналізу проведеної науково-дослідної роботи описано послідовність дослідження розроблено та удосконалено методичні вказівки щодо бактеріологічної діагностики актинобацилярної плевропневмонії свиней, представлено схему досліджень, ізольовано культури *Actinobacillus pleuropneumoniae* із патологічного матеріалу.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи, що нами доведено поширеність актинобацилярної плевропневмонії свиней у вітчизняних господарствах, бактеріологічне дослідження на наявність її збудника залишається актуальним. Існуючі схеми профілактики не завжди дають очікувані результати. Антибіотикотерапія є одним із засобів контролю захворювання. Для раціональної антибіотикотерапії потрібне пряме ізолювання бактерії *Actinobacillus pleuropneumoniae* та визначення її чутливості до антибактеріальних препаратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айшпур Е.Е. Актинобацилярная плевропневмония свиней в свиноводческих хозяйствах Украины / Е.Е. Айшпур // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – Минск. – 2014. – № 1. – С. 9–13.
2. Айшпур О.Є., Актинобацилярна плевропневмонія свиней – проблема сучасного свинарства / О.Є. Айшпур, Є.Г. Павлов, О.П. Іваненко, В.М. Коваленко // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 7. – С. 11–12.
3. Сидоров М.А. Гемофилезы животных / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов. – Москва. – Агропромиздат. – 1986. – 175 с.
4. Jacques M. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae* / M. Jacques // Can. J. Vet. Res. – 2004. – Vol. 68. – P. 81–85.
5. Айшпур О.Є. Бактеріальний респіраторний симптомокомплекс в свинарських господарствах України / О.Є. Айшпур // Вет. біотехнологія. – 2012. – № 20. – С. 18–19.

6. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark / V. Fussing, K. Barfod, R. Nielsen [et al.] // Veterinary Microbiology. – 1998. – Vol. 62. – P. 145–162.
7. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Diseases of Swine / A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D’Allaire and D.J. Taylor [ed.]. Ames, Iowa U.S.A: Iowa State University Press, 1992. – P. 401–408.
8. A descriptive study of acute outbreaks of respiratory disease in Norwegian fattening pig herds / L.M. Cohen, C.A. Grontvedt, T.B. Klem [et al.] // Acta Vet Scand. – 2020. – Vol. 62(1). – P. 35. <http://doi.org/10.1186/s13028-020-00529-z>.
9. A cross-sectional survey on respiratory disease in a cohort of Irish pig farms / M. Rodrigues da Costa, R.M. Fitzgerald, E.G. Manzanilla [et al.] // Ir Vet J. – 2020. – Vol. 73(1). – P. 24. <http://doi.org/10.1186/s13620-020-00176-w>.
10. Etiology of acute respiratory disease in fattening pigs in Finland. M. Haimi-Hakala, O. Hälli, T. Laurila [et al.] // Porcine Health Manag. – 2017. – Vol. 3. – P. 19. <http://doi.org/10.1186/s40813-017-0065-2>.
11. The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b) / S.J. Foote, J.T. Bosse, A.B. Bouevitch [et al.] // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190. – P. 1495–1496.
12. The genetic organisation of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12 / S.G. Jessing, P. Ahrens, T.J. Inzana, and O. Angen // Vet. Microbiol. – 2008. – Vol. 129. – P. 350–359.
13. Anderson Cindy. Great Adventures in the Microbiology Laboratory: 7th ed. / Cindy Anderson – Pearson, 2013. – P. 175.
14. Ronald M. Atlas. Handbook of microbiological media: 3rd ed. – USA: CRC Press, 2004. – 2056 p.
15. Скородумов Д.И. Актинобациллярная (гемофилезная) плевропневмония и гемофилезный полисерозит свиней (этиология, лабораторная диагностика, основы специфической профилактики актинобациллезной плевропневмонии: автореф. дисс. ... д-ра вет. наук: 16.00.03 / Дмитрий Иванович Скородумов. – Москва, 1997. – 40 с.
16. Бактериологическая диагностика актинобациллярной плевропневмонии свиней / А.А. Фроловцева, О.В. Прунтова, О.И. Ручнова, Д.А. Бирюченков // Лабораторная диагностика. – М. – №1. – 2007. – С. 15–17.
17. Сидоров М.А. Патогенность *Actinobacillus pleuropneumoniae* для животных / М.А. Сидоров, Ш.Ш. Мицаев, Д.И. Скородумов // Ветеринария. – № 11. – 1989. – С. 39–41.
18. Jacobsen M.J. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model / M.J. Jacobsen, J.P. Nielsen, R. Nielsen // Vet. Microbiol. – 1996. – Vol. 49. – P. 159–168.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АКТИНОБАЦИЛЛЯРНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ / Айшпур Е.Е., Муштук И.Ю., Гуменюк В.В., Ермоленко А.Н., Деревянко Н.Н.

Представлено данные относительно бактериологической диагностики актинобациллярной плевропневмонии свиней. Приведены методы микробиологического исследования патологического материала, изолирования и идентификации возбудителя – бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, методы сохранения культуры.

Изложение материала сосредоточено на предоставлении четкой последовательности исследований и интерпретации результатов и предназначено для специалистов лабораторий ветеринарной медицины разных форм принадлежности, научных работников, преподавателей микробиологии и студентов ветеринарных факультетов.

Ключевые слова: бактериологическая диагностика, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, свиньи.

METHODOLOGICAL APPROACHES REGARDING BACTERIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIA IN PIGS / Ayshpur O.Y., Mushtuk I.Yu., Gumenyuk V.V., Ermolenko O.M., Derevianko M.M.

Introduction. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) is an infectious disease of pigs characterized by hemorrhagic and necrotizing pneumonia and fibrinous pleurisy. The acute course is manifested by fever and septicemia, the chronic – by depletion and growth retardation of pigs. The disease is highly contagious, different serotypes can circulate in one herd. APP is one of the most common bacterial respiratory diseases of pigs, which is registered in almost all countries in the world engaged in pig breeding.

The goal of the work is to present a clear sequence of bacteriological studies performed by us for the *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacteria detection, methodological approaches and results interpretation.

Materials and methods. The research was conducted in the laboratory of bacterial diseases of animals of the Institute of Veterinary Medicine of NAAS, as well as in a number of pig farms of Ukraine where respiratory bacterial diseases of pigs registering (10 farms). The material for the study was biomaterials from sick, compulsorily slaughtered and dead piglets of different age groups. The subject of the study were pigs, white mice; pig blood, strains, isolates of microorganisms; biomaterials in vivo and from dead piglets.

Results of research and discussion. Bacteriological diagnosis of APP was established on the basis of the results of bacteriological studies of pathological material from dead and compulsorily slaughtered animals, as well as a biological sample.

Material for the study was taken no later than 4-6 hours after slaughter/death of animals, from 2-3 carcasses of piglets that had at autopsy characteristic signs of APP and were not treated with antibiotics.

Bacteriological examination was performed in the appropriate sequence. The surface of the lungs, lymph nodes and other pathological materials was burned with a spatula, the pulp was collected in a Pasteur pipette, it was transferred into a test tube with 1-2 cm³ of Meat Peptone Agar, mixed and corked. To grow on a nutrient media, coccobacillus need a specific growth factor – diphosphopyridine nucleotide (V-growth factor). The pathogen grows well on modified PPLO-agar, Mueller Hinton Chocolate Agar II, Columbia agar with the addition of NAD. Culturing on nutrient media should be carried out no later than 24 hours after pathological material sampling.

When satellite hemolytic (presence of β -hemolysis zone) colonies were found, Gram and Gins stained smears were prepared from them.

The culture was determined as pathogenic in cases of death of at least 2 white mice within 24-72 hours, followed by bacteriological examination of the pathological material and subsequent isolation of the culture of the pathogen.

As an additional study disks with saponin – 750 µg/disk, bacitracin – 10 µg/disk, erythromycin – 15 µg/disk, azithromycin – 15 µg/disk were used to identify *actinobacillus*.

Conclusions and prospects for further research. As a result of the conducted researches the sequence of research is described, methodical instructions concerning bacteriological diagnosis of APP of pigs are developed and improved, the scheme of researches is presented, cultures of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from pathological material are isolated. Given that we have proven the prevalence of APP in pigs in domestic farms, bacteriological examination for the presence of its pathogen remains relevant.

Keywords: bacteriological diagnosis, *Actinobacillus pleuropneumonia*, pigs.

REFERENCES

1. Aishpur, O.Ye. (2014). Aktinobatsilliarnaia plevropnevmoniiia svinei v svinovodcheskikh khoziaistvakh Ukrainy [Actinobacillus pleuropneumonia of pigs in pig farms in Ukraine]. *Epizootologiya, immunobiologiya, farmakologiya, sanitariia – Epizootology, immunobiology, pharmacology, sanitation*, 1, 9-13 [in Russian].
2. Aishpur, O.Ye., Pavlov, Ye.H., Ivanenko, O.P., & Kovalenko, V.M. (2010). Aktynobatsyliarna plevropnevmoniiia svynei – problema suchasnoho svynarstva [Actinobacillary pleuropneumonia of pigs is a challenge of modern pig breeding]. *Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 7, 11-12 [in Ukrainian].
3. Sidorov, M.A., & Skorodumov D.I. (1986). *Gemofilezy zhivotnykh [Glasser's disease of animals]*. Agropromizdat [in Russian].
4. Jacques, M. (2004). Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.*, 68, 81-85.
5. Aishpur, O.Ye. (2012). Bakterialnyi respiratornyi symptomokompleks v svynarskykh hospodarstvakh Ukrainy [Bacterial respiratory symptom complex in pig farms in Ukraine]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology*, 20, 18-19 [in Ukrainian].
6. Fussing, V., Barfod, K., Nielsen, R. et al. (1998). Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. *Veterinary Microbiology*, 62, 145-162.
7. Nicolet, J. (1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Diseases of Swine: ed. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.). (pp. 401-408). Iowa State University Press.
8. Cohen L.M., Grontvedt C.A., Klem T.B., et al. (2020). A descriptive study of acute outbreaks of respiratory disease in Norwegian fattening pig herds. *Acta Vet Scand.*, 62(1), 35. <http://doi.org/10.1186/s13028-020-00529-z>.
9. Rodrigues da Costa, M., Fitzgerald, R.M., Manzanilla, E.G., O'Shea, H., Moriarty, J., McElroy, M.C., Leonard, F.C. (2020). A cross-sectional survey on respiratory disease in a cohort of Irish pig farms. *Ir Vet J.*, 73(1), 24. <http://doi.org/10.1186/s13620-020-00176-w>.
10. Haimi-Hakala, M., Hälli, O., Laurila, T., Raunio-Saarnisto, M., Nokireki, T., Laine, T., Nykäsenoja, S., Pelkola, K., Segales, J., Sibila, M., Oliviero, C., Peltoniemi, O., Pelkonen, S., Heinonen, M. (2017). Etiology of acute respiratory disease in fattening pigs in Finland. *Porcine Health Manag.*, 3, 19. <http://doi.org/10.1186/s40813-017-0065-2>.

11. Foote, S.J., Bosse, J.T., Bouevitch, A.B., Langford, P.R., Young, N.M., & Nash, J.H. (2008). The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). *J. Bacteriol*, 190, 1495-1496.
12. Jessing, S.G., Ahrens, P., Inzana, T.J., & Angen, O. (2008). The genetic organisation of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12. *Vet. Microbiol*, 129, 350-359.
13. Anderson, Cindy. (2013). *Great Adventures in the Microbiology Laboratory*. (7th ed.). Pearson.
14. Ronald, M. Atlas. (2004). *Handbook of microbiological media*. (3rd ed.). CRC Press.
15. Skorodumov, D.I. (1997). Aktinobatsilliarnaia (gemofileznaia) pleuropnevmonii i gemofileznyi poliserozit svinei (etiologii, laboratornaia diagnostika, osnovy spetsificheskoi profilaktiki aktinobatsilleznoi pleuropnevmonii [Actinobacillary (hemophilic) pleuropneumonia and porcine hemophilous polyserositis (etiology, laboratory diagnostics, basics of specific prevention of actinobacillus pleuropneumonia)]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Moscow [in Russian].
16. Frolovtceva, A.A., Pruntova, O.V., Ruchnova, O.I., Biriuchenkov, D.A. (2007). Bakteriologicheskaia diagnostika aktinobatsilliarnoi pleuropnevmonii svinei [Bacteriological diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs]. *Laboratornaia diagnostika – Laboratory diagnostics*, 1, 15-17 [in Russian].
17. Sidorov, M.A., Mitcaev, Sh.Sh., & Skorodumov, D.I. (1989). Patogennost *H.pleuropneumoniae* dlia zhivotnykh [Pathogenicity of *H. pleuropneumoniae* to Animals]. *Veterinariia – Veterinary*, 11, 39-41 [in Russian].
18. Jacobsen, M.J., Nielsen, J.P., & Nielsen, R. (1996). Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Vet. Microbiol*, 49, 159-168.