

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>1</sup>

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук<sup>2</sup>

Лемиш Н.А., микробиолог диагностической ветеринарной лаборатории<sup>2</sup>

Герасимчук С.С., микробиолог диагностической ветеринарной лаборатории<sup>2</sup>

Красникова Е.Л., научный сотрудник<sup>1</sup>

Потапчук Д.В., начальник ветеринарного отдела<sup>2</sup>

Ушаков С., кандидат ветеринарных наук<sup>2</sup>

Пономарев А.И., ветеринарный врач по свиноводству<sup>2</sup>

Пулиш А.В., ветеринарный врач<sup>2</sup>

Чиртик М.В., ветеринарный врач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

<sup>2</sup>ЗАО «Консул», г. Брест

## СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ О СТРЕПТОКОККОВОЙ (*STREPTOCOCCUS SUIS*) КО-ИНФЕКЦИИ В СВИНОВОДСТВЕ

### Резюме

В статье представлены данные о сочетанной вирусно-бактериальной (*Streptococcus suis* и PRRS) инфекции поросят, наиболее распространенной в современном свиноводстве, а также раскрыта система ее диагностики и профилактики.

**Ключевые слова:** *Streptococcus suis*, бактериальные инфекции, свиньи, PPRSS, ко-инфекция, полимеразная цепная реакция, вирусные инфекции, диагностика, геном, ДНК, РНК.

### Summary

The article presents data on a combined viral-bacterial (*Streptococcus suis* and PRRS) infection of piglets, the most common in modern pig farming, as well as a system for its diagnosis and prevention.

**Keywords:** *Streptococcus suis*, bacterial infections, pigs, PRRSS, co-infection, polymerase chain reaction, viral infections, diagnostics, genome, DNA, RNA.

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В современной ветеринарии наиболее распространенной бактерией, вызывающей заболевание у свиней, можно назвать *Streptococcus suis*, которая характеризуется большим разнообразием штаммов. На сегодняшний день известно 35 различных серотипов, классифицированных по их капсульным полисахаридам. *Streptococcus suis* вызывает менингиты, артриты, полисерозиты, эндокардиты, отиты, бронхопневмонии, которые в конечном итоге приводят к значительным экономическим потерям в свиноводстве. Бактерия достаточно хорошо приспособляется к защитным механизмам иммунной системы хозяина, является колонизатором широкого списка слизистых оболочек, а также является постоянным

обитателем верхних дыхательных путей и миндалин. *Streptococcus suis* является генетически и фенотипически гетерогенным видом бактерий. Штаммы, принадлежащие к разным капсулярным серотипам или даже к одному и тому же серотипу, генетически отличаются друг от друга [1, 2], (таблица 1). Этот аспект является ключевым в постоянном присутствии стрептококка как в организме отдельно взятых животных, так и в целом, в стадах хозяйств с различным эпизоотическим состоянием, обуславливающим стационарное неблагополучие.

Поросята впервые сталкиваются с этим возбудителем, находясь еще во внутриутробном состоянии, во время родов, проходя родовые пути свиноматок, а также в постнатальный период, потребляя молоко

и молозиво от вымени, через пуповину, при скалывании клычков, хвостиков, кастрациях и других ветеринарных манипуляциях. Около 98 % поросят получают инфицирование стрептококком в период выращивания. Своего максимального развития и проявления стрептококковые инфекции достигают в период после отъема, перегруппировок, когда материнский имму-

нитет снижается к возрасту с 35 до 60 дня жизни, а также в период откорма. Стрептококковая инфекция может проявляться в любом возрасте и в любой технологической группе поросят и свиноматок, в любом органе и тканях животного. *Streptococcus suis* является зооантропогенным микроорганизмом (рисунок 1).

Таблица 1. – Классификация стрептококков по предложению Ребекки Лэнсфилд (1933 год)

Наименование	Показатель	Вид стрептококка
Тип гемолиза	α	<i>S. suis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. bovis</i> ,
	β	<i>S. porcinus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. equi</i> , <i>S. zooepidermitidis</i> , <i>S. canis</i>
Серогрупповая принадлежность по Лэнсфилд	A	<i>S. pyogenes</i>
	B	<i>S. agalactiae</i>
	C	<i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. suis</i> , <i>S. equi</i> (все подвиды)
	D	<i>S. suis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i> , энтерококки
	G	<i>S. canis</i>
	E	<i>S. porcinus</i> , <i>S. uberis</i>
	R	<i>S. suis</i>
	S	<i>S. suis</i>
	P	<i>S. porcinus</i>
	N	<i>S. porcinus</i>
	V	<i>S. porcinus</i>
	нет	<i>S. pneumoniae</i>

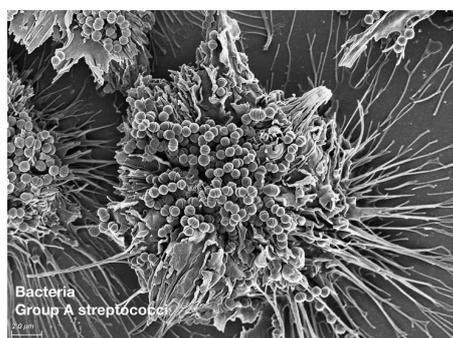


Рисунок 1. – Стрептококки, заселившие миндалины

Дополнительно инфекция *S. suis* встречается у других животных (крупный рогатый скот, овцы, козы, кабаны, лошади, кошки, собаки и птицы).

Индекс контагиозности *S. suis* равен 0,4, т.е. среднее число заболевших равно 40 % из каждых 100 индивидуумов, тем или иным путем соприкасавшихся с больными и инфицированными животными.

Степень тяжести развития болезни зависит от степени вирулентности бактерии, т.е. от заражающей способности.

У стрептококка обширное количество факторов вирулентности. В его клеточной стенке имеются М-, Т-, и R-протеины. М-протеин – один из главных факторов вирулентности. Стрептококки способны продуцировать токсины: эритрогенный токсин (токсин сыпи) обладает цитотоксичным, эритрогенным, симпатикотропным, аллергическим действием; экзо- и эндотоксины: стрептолизин S оказывает иммуносупрессорное действие; стрептолизин O обладает кардиотропностью; энтеротоксин вызывает диарею. Стрептококки продуцируют ферменты: гиалуронидазу, стрептокиназу, амилазу, липопротеиназу и др., которые способствуют распространению инфекции в организме [3] (таблица 2).

Таблица 2. – Основные факторы вирулентности стрептококка

Факторы вирулентности	Биологический эффект
Капсула (основной фактор)	антифагоцитарная активность
Протеин-адгезин	адгезия (прикрепление) к эпителию
Протеаза секреторных антител (IgA)	разрушает секреторные антитела (IgA)
Пневмолизин	вызывает гемолиз. Разрушает реснички мерцательного эпителия, активирует комплемент по классическому пути, подавляет «дыхательный взрыв» при фагоцитозе
Тейхоевая кислота клеточной стенки	активирует комплемент по альтернативному пути
Фрагменты пептидогликана клеточной стенки	
Пирогенные экзотоксины (эритрогенины А,В,С)	пирогенный эффект, усиление ГЗТ, иммуносупрессивный эффект на В-лимфоциты, появление сыпи, суперантиген
Стрептолизины: S (устойчив к кислороду) и О (чувствителен к кислороду)	разрушают лейкоциты, тромбоциты, эритроциты. Стимулируют освобождение лизосомальных ферментов.
Гиалуронидаза	облегчает инвазию, дезинтегрируя соединительную ткань
Стрептокиназа (фибринолизин)	разрушает кровяные сгустки (тромбы), способствует распространению микроба в тканях
ДНК-аза	демолимеризует внеклеточную ДНК в гное
С5а-пептидаза	разрушает С5а-компонент комплемента, хемоаттрактант

Недавние исследования выявили, что штаммы стрептококка серотипов 2 и 9 экспрессируют гены, кодирующие многомодальные белки адгезины, известные как антиген I / II (AgI / II). В присутствии гликопротеинов слюны ротовой полости эти адгезины (AgI / II) приводят к агрегации *S. suis*, адгезии и колонизации верхних дыхательных путей свиней. Сообщается, что особенно серотип 9 благодаря своей повышенной адгезии (AgI / II) способен к легкой агрегации и образованию биопленки, что в свою очередь способствует проникновению бактерий в нижележащие отделы пищеварительной системы. В агрегированном состоянии они защищены от низкого pH желудка, что приводит к дальнейшей колонизации кишечника [4]. *S. suis* также имеет адгезин, известный как фактор Н-связывающий белок, Fhb. Фактор Н обильно начинает синтезироваться бактериями, находящимися в плазме крови, отвечает за защиту бактерий от воздействия иммунной системы, в частности комплемента [8]. Связывание *S. suis* с фактором Н приводит к

усилению прилипания бактерий к эпителиальным и эндотелиальным клеткам животных, также защищает *S. suis* от фагоцитоза и опосредованного комплементом уничтожения [5, 6, 7].

Наиболее значимой антигенной структурой *S. suis*, как и у большинства стрептококков, является полисахаридная капсула, которая и определяет столь обширное разнообразие серогрупп и серотипов стрептококка. Бактериальная капсула покрывает всю поверхность бактериальной клетки, частично препятствуя адгезии к эпителиальным клеткам хозяина. Некоторые исследования показали, что отсутствие (или подавление синтеза) капсулы увеличивает взаимодействие адгезинов и последующее прикрепление бактерий [9, 10, 11]. Толщина капсулы зависит от окружающей бактерию среды, а также среды обитания бактерии в тканях восприимчивых животных. Установлено, что капсула тоньше во время колонизации и инвазии в клетках дыхательного эпителия [12, 13], также что капсула препятствует

адгезинам и гидрофобным компонентам клеточной стенки *S. suis*, которые ответственны за образование биопленки. Однако в кровотоке толщина капсулы выше, и это позволяет *S. suis* избежать фагоцитоза. Бактериальная капсула является эффективным средством противостояния бактерий влиянию антибиотиков.

Некоторые микроорганизмы избегают агрессивных сред путем агрегации в виде биопленок, которые позволяют им сохраняться и колонизировать ткани, противостоять вымыванию из организма хозяина и воздействию противомикробных препаратов, а также облегчают обмен генетической информацией [14]. *S. suis* способен образовывать биопленки, которые объединяют бактерии в так называемый информационно-биохимический кворум. Это сигнальная сеть, регулируемая геном *LuxS*, кодирующим фермент S-рибозилгомоцистеиназа, *LuxS*, который был обнаружен у вирулентных штаммов *S. suis*. Сообщалось, что *LuxS* играет важную роль благодаря его способ-

ности усиливать биосинтез аутоиндуктора 2 (AI-2), адгезии, образования биопленок, клеточного метаболизма и устойчивости к иммунным реакциям хозяина и антимикробной терапии [15, 16]. Производство биопленки *S. suis* индуцируется активностью опосредованного фибриногеном поперечного мостика *S. suis*. Присутствие фибриногена может стимулировать экспрессию адгезинов, тем самым облегчая прилипание бактерий друг к другу [17]. Кроме того, муцин, продуцируемый бокаловидными клетками эпителия, может усиливать образование биопленок и способствовать выживанию бактерий даже в условиях ограниченных питательных веществ [18]. Бактериальные биопленки эффективно защищают бактерии от противомикробных препаратов. Сообщалось, что вирулентные штаммы *S. suis* обладают более высокой способностью продуцировать биопленки, чем авирулентные штаммы [19, 20] (рисунок 2).

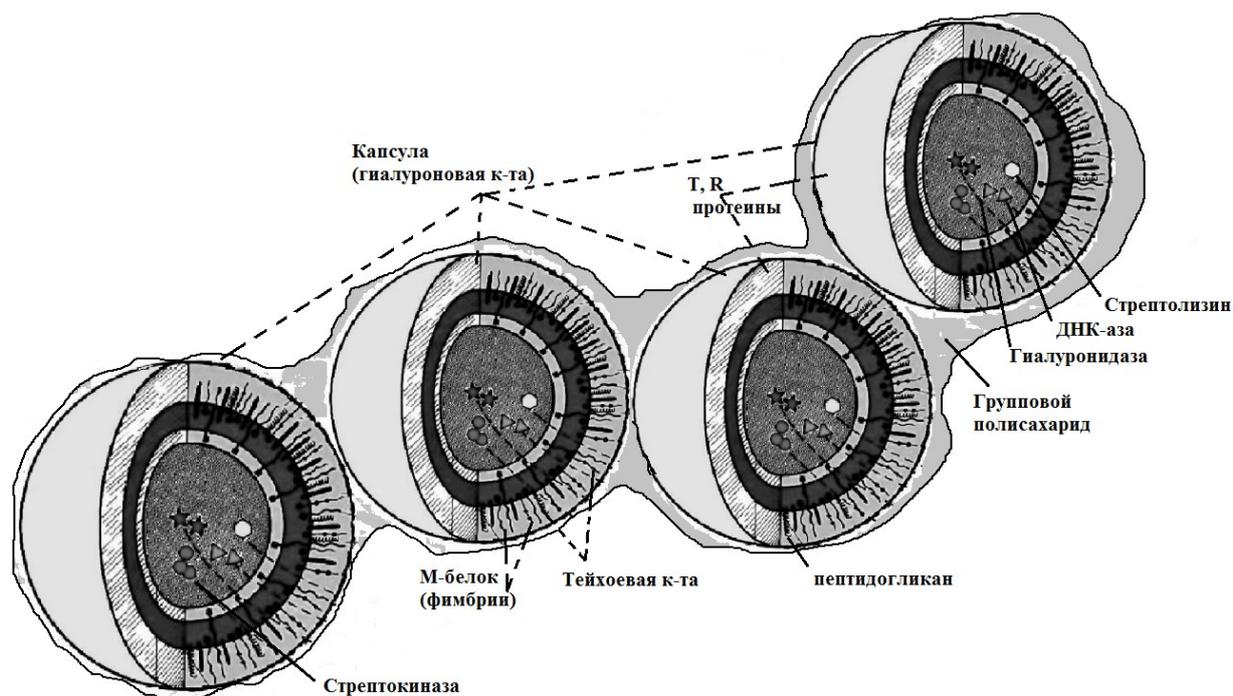


Рисунок 2. – Схематическое расположение факторов вирулентности

**Цель работы** – изучение значимости вирусно-бактериальной инфекции (*S.suis* и РРСС) в свиноводческих хозяйствах, влияние на иммунитет, профилактическая эффективность вакцины «СтрептоВаК-С».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы, оборудование и средства измерения поверены и аттестованы, технически исправны, подвергнуты метрологическому контролю в установленные сроки, имеются технические паспорта.

Диагностические питательные среды (питательные среды первичного посева, среды накопления, дифференцирующие питательные среды, бульонные и агаровые) готовили на электрической плитке. Изменение и коррекцию pH проводили при помощи pH-метра. Стерилизацию питательных сред проводили в стерилизаторе паровом серии LAC, модель LAC-5040S. Разливали среды по чашкам Петри и пробиркам в отдельном ламинарном шкафу, после застывания проводили контроль стерильности в отдельном термостате. После испытания среды до использования хранили в холодильнике.

Подготовку проб, взятие навесок, проведение разведений и посева для дальнейшего культивирования проводили в отдельном боксовом помещении (бокс 1) в ламинарном шкафу. Далее посева помещали в термостаты с оптимальными температурами и CO<sub>2</sub>-инкубатор, анаэробический для обеспечения оптимальных условий роста соответствующих микроорганизмов. Учет их роста проводили ежедневно, рассев и выделение чистых культур осуществлялся в отдельном помещении и отдельном ламинарном шкафу. Здесь же проводили определение антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов.

Весь процесс исследований соответствует методическим указаниям и методикам, описанным в справочнике по бактериологическим методам исследования под редакцией А.Э. Высоцкого и З.Н. Барановской, 2008 г.

Иммунологические реакции, включая ИФА, проводятся согласно методическим указаниям по постановке серологических реакций при диагностике инфекционных болезней животных, утвержденным ГУВ МСХиП РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/129).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводится согласно методическим указаниям по постановке полимеразной цепной реакции в ветеринарных диагностических лабораториях, утвержденным ГУВ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/127).

Отработанный материал проходит обеззараживание в автоклаве (паровом стерилизаторе LAC-05060S) при температуре 132 °C в течение 60 минут и проведении контролей эффективности стерилизации биологическими тестами (бактериальная

культура *Pseudomonas aeruginosa* КМИЭВ В-129), одноразовыми индикаторами воздушной стерилизации и максимальными термометрами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сегодняшний день известно 35 серотипов, основанных на серологических различиях капсульных полисахаридов, но предполагается, что некоторые из них принадлежат к различным бактериальным видам.

В течение пяти лет мы проводили бактериологическую диагностику с выявлением чистых культур стрептококка, подвергали его ПЦР-детекции на основе определения генома, отвечающего за формирование капсульных особенностей, а также серологический мониторинг. Результаты нашей работы легли в основу создания вакцины против стрептококкоза свиней «СтрептоВаК-С».

Известно, что естественным резервуаром стрептококка являются свиньи и дикие кабаны, однако не стоит забывать и о носительстве среди людей. Субклиническое течение инфекции является ключевым в закреплении и распространении стрептококка среди восприимчивых животных, а также играет важную роль как в эпизоотологии, так и эпидемиологии.

Как факультативно-патогенная бактерия *S. suis* способна вызывать различную силу и степень клинического проявления болезни в зависимости от тех или иных факторов, способствующих усилению клинического проявления болезни. Не новостью является и то, что основную и главенствующую роль таких факторов занимает окружающая среда. К ним относятся скученное содержание, частые перегруппировки, плохая вентиляция, ненадлежащие параметры микроклимата, плохие санитарно-гигиенические условия, высокая вирусно-бактериальная, газовая (CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) нагрузка на воздух. К прочим факторам стресса можно с уверенностью отнести наличие в стаде циркулирующих вирусов, вызывающих сильную иммуносупрессию/депрессию (PPCS, KCS, PCV2, PCV3, Грипп тип А и другие). Именно поэтому наиболее восприимчивой группой к стрептококку является группа поросят-отъемышей и более старшие поросята. Причиной

этому служит в первую очередь полное снижение к возрасту 35–40 дней защитных материнских антител, в то время как адаптивный иммунный ответ еще не успевает сформироваться. Ситуация осложняется еще и тем, что во время отъема поросят от свиноматок дыхательные пути начинают усиленно заселяться патогенной микрофлорой и другими видами бактерий, такими как *Haemophilus parasuis*, *M. Hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica*. В сумме все эти факторы вызывают комплекс бронхо-легочных заболеваний у поросят, достаточно трудно поддающихся лечению.

Наиболее сложному лечению поддаются вирусно-бактериальные ко-инфекции, например РРСС, КЧС, РСВ2, РСВ3 и *S. suis*,

а на более поздних сроках откорма дополнительно *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*.

Наши исследования показали, что при воздействии иммуносупрессивных вирусов происходит в значительной степени подавление фагоцитарной активности дендритных клеток и макрофагов, а также торможение антигенпрезентирующей функции плазматических клеток, Т- и В-лимфоцитов, что приводит к последующему клиническому проявлению стрептококковой инфекции, вызванной *S. suis*. Ниже представлены гистограммы цитокинового профиля поросят 20-, 40-, 60- и 80-дневного возраста, выраженные в процентах. За 100 % было взято максимальное значение физиологически нормального количества уровня того или иного цитокина (рисунок 3).

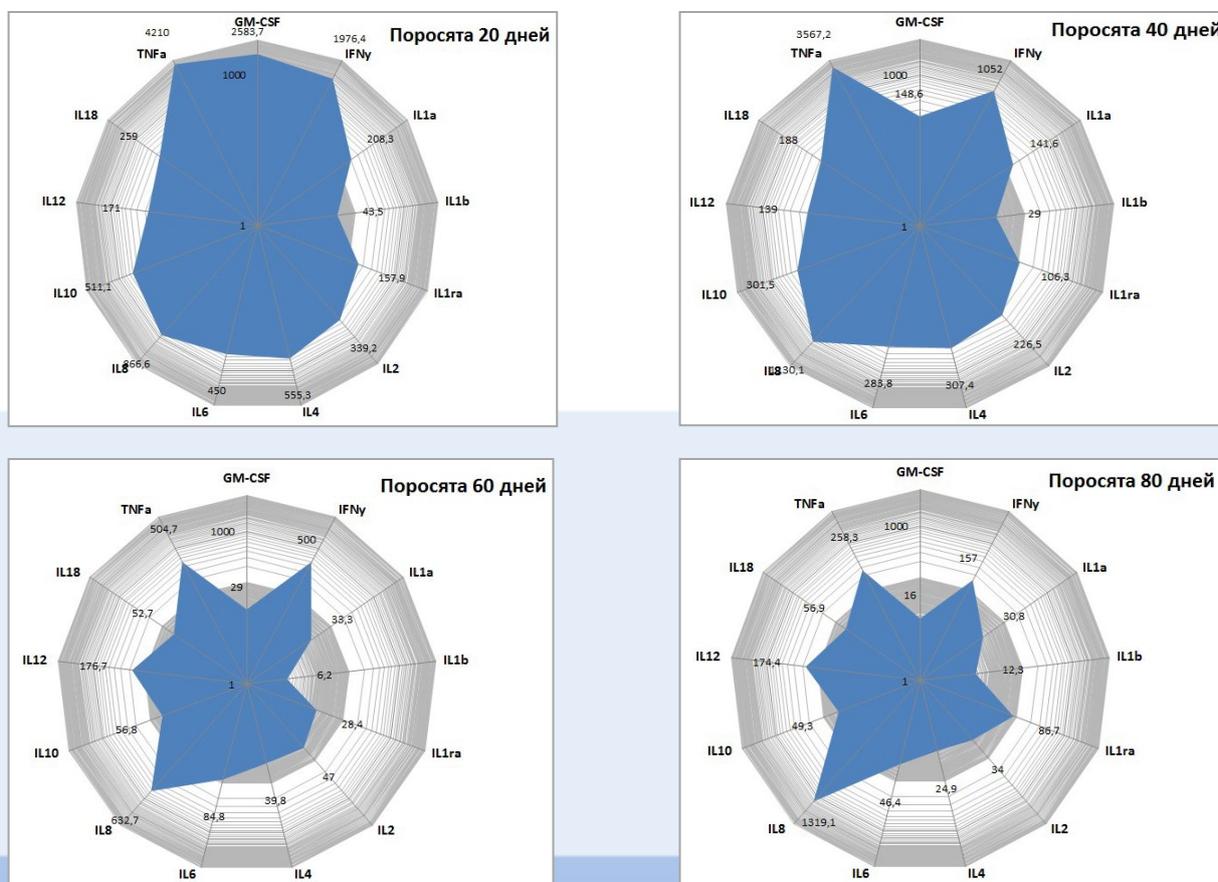


Рисунок 3. – Цитокиновый профиль поросят в возрасте 20–80 дней

GM-CSF – гранулоцитарномacroфагальный колониестимулирующий фактор, стимулирует рост и дифференцировку лимфоцитов (гранулоциты, эозинофилы

и макрофаги). Секретируется макрофагами, Т-клетками (Т-киллерами), тучными клетками, эндотелиальными клетками и фибробластами. Этот цитокин является

начальным этапом иммунного воспалительного каскада, благодаря которому осуществляется активация небольшого количества макрофагов, что в дальнейшем приводит к значительному увеличению их числа и является решающим в дальнейшей борьбе с инфекцией. Нами установлено, что при влиянии вируса РРСС после 40 дней жизни в последующий 40-дневный период происходит значительное угнетение синтеза этого фактора.

IFN $\gamma$  – интерферон типа II, является цитокином, фактором адаптивного и врожденного противовирусного и частично антибактериального иммунного ответа. IFN $\gamma$  – наиболее важный активатор макрофагов. Интерферон способен напрямую ингибировать репликацию любого вируса. Цитокин синтезируется в основном натуральными киллерами NK-клетками, а также дифференцированными Т-клетками CD4 (Th1) и CD8 (цитотоксическими Т-лимфоцитами), эффекторными Т-клетками после развития антиген-специфического иммунного ответа. Также относительно недавно (2010) установлен новый тип ранее неизвестных клеток, синтезирующих интерферон (IFN $\gamma$ ) нецитотоксическими врожденными лимфоидными клетками (ILC). Проведенные нами исследования показывают, что под влиянием вируса РРСС и прочих функция интерферон-синтезирующих клеток претерпевает несколько этапов изменений, проходя поэтапное снижение уровня к возрасту 80 дней.

Семейство интерлейкинов IL-1 представляет собой сложную сигнальную систему синтезируемую лейкоцитами и эндотелиальными клетками, регуливающую воспалительные реакции в тканях. Основными представителями этого семейства являются IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , а также их внутриклеточный антагонист, тормозящий эффекторы воспаления – IL-1Ra.

К суперсемейству IL-1 также можно отнести и IL-18. Данный интерлейкин синтезируется макрофагами, выполняет роль регулятора воспалительных реакций. В значительной степени усиленный синтез IL-18 обуславливается бактериальными антигенами, а именно липополисахаридными комплексами клеточных стенок бактерий (LPS). IL-18 как и IL-12 стимулируют созревание и дифференцировку Т-клеток CD4<sup>+</sup> (Th2), CD8 и NK-клеток, усиливает

синтез IFN $\gamma$ . В сочетании IL-18 и IL-12 ингибируют синтез IL-4, а также продукцию IgE и IgG1, но увеличивает синтез IgG2a в В-клетках. Функция IL-4 играет ключевую роль в дифференцировке и активной пролиферации В-клеток и Т-клеток.

Интерлейкин IL-6 считается важным медиатором лихорадки и острой фазы воспаления. Данный интерлейкин преодолевает гематоэнцефалический барьер, воздействуя на регуляторный центр гомеостаза температуры тела в гипоталамусе, вызывая ее повышение. IL6 стимулирует рост нейтрофилов, В-клеток, но тормозит развитие Т-клеток.

Интерлейкин IL-8 – хемокин, синтезируемый в основном макрофагами, но также эндотелиальными клетками, клетками гладкой мускулатуры дыхательных путей. IL-8 обеспечивает в основном направленный хемотаксис нейтрофилов, гранулоцитов к месту направленного воспаления, усиливает фагоцитоз. При взаимодействии первого макрофага с вирусом или бактерией, любым антигеном происходит выброс IL-8 с целью привлечения внимания других макрофагов. IL-8 является маркерным цитокином, указывающим на вирусные воспалительные реакции, происходящие именно в легких. Проведенные нами исследования указывают, что воспалительные реакции в легких не только не уменьшаются, а наоборот усиливаются к возрасту 80 дней.

Интерлейкин IL-10 – фактор, ингибирующий синтез цитокинов и является противовоспалительным цитокином, подавляющим экспрессию и синтез других цитокинов иммунной системы, презентацию антигенов и активацию CD4 + Т-клеток. Так- же установлена роль IL-10 в стимулировании синтеза антител уже активированными и дифференцированными В-клетками, осуществлении ингибирования и торможения индуцированной бактериями (LPS) продукции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 и секреции IFN $\gamma$ .

Установлено, что у исследуемых групп животных на протяжении всего опыта резко увеличен уровень IL8 (+1319 %) и снижен уровень IL10 (-51 %).

Фактор некроза опухоли (TNF, кахексин или кахектин), однажды названный как фактор некроза опухоли альфа или

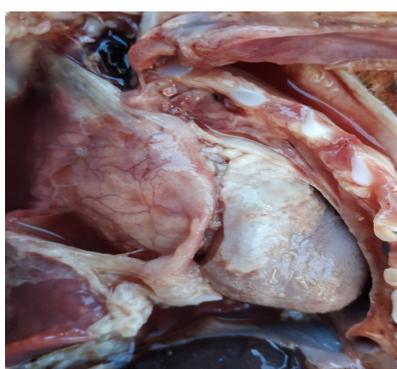
TNF $\alpha$ , синтезируется в основном макрофагами. Однако недавние исследования показали, что его синтез осуществляется широким перечнем клеток: тучные клетки, эндотелиальные клетки, сердечные миоциты, фибробласты и нейроны. Наибольшее количество этого цитокина синтезируется в ответ на бактериальные антигены (LPS). Высокое содержание в крови кахексина вызывает признаки воспаления, которые в последующем приводят к истощению животных.

На протяжении нескольких лет в хозяйстве велось наблюдение и сбор данных

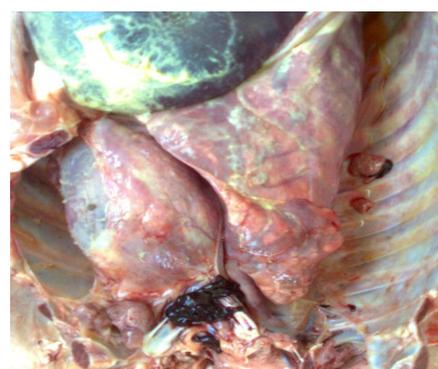
о причинах непроизводительного выбытия поросят. На фотографиях представлены патологоанатомические изменения внутренних органов (легкие, сердце). Следует отметить, что патологоанатомические изменения зависят прежде всего от стадии и продолжительности инфекционного процесса. На представленных фотографиях выраженный хронический воспалительный процесс, характеризующийся крупозной и фибринозно-катаральной пневмонией, плевритом и перикардитом. Также отмечаются кровоизлияния в оболочке головного мозга (рисунки 4–8).



**Рисунок 4. – Фибринозно-катаральная пневмония и перикардит**



**Рисунок 5. – Фибриновый перикардит**



**Рисунок 6. – Крупозная пневмония**



**Рисунок 7. – Фибриновый плеврит**



**Рисунок 8. – Кровоизлияния в головном мозге**

При бактериологическом и вирусологическом исследовании патологического материала от поросят (легкие, сердце, головной мозг) была выделена микрофлора, представленная в таблице 3.

При исследовании методом полимеразной цепной реакции выявлен геном *Streptococcus suis* (серотипы 2, 3, 7, 12, 16, 18, 24, 29, 30, 31). Результаты электрофоре-

тической детекции ПЦР представлены на рисунке 9.

В результате вирусологического исследования методом полимеразной цепной реакции выявлен геном вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней (таблица 4, рисунок 10).

Таблица 3. – Результаты микробиологического исследования патологического материала

Группа животных	Вид патологического материала	Выделенная микрофлора	Микология
Поросята	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> , единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	лёгкое, сердце	<i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , единичные <i>Escherichia coli</i> , единичные <i>Staphylococcus spp.</i>	не выявлено
	головной мозг	<i>Streptococcus suis</i>	не выявлено

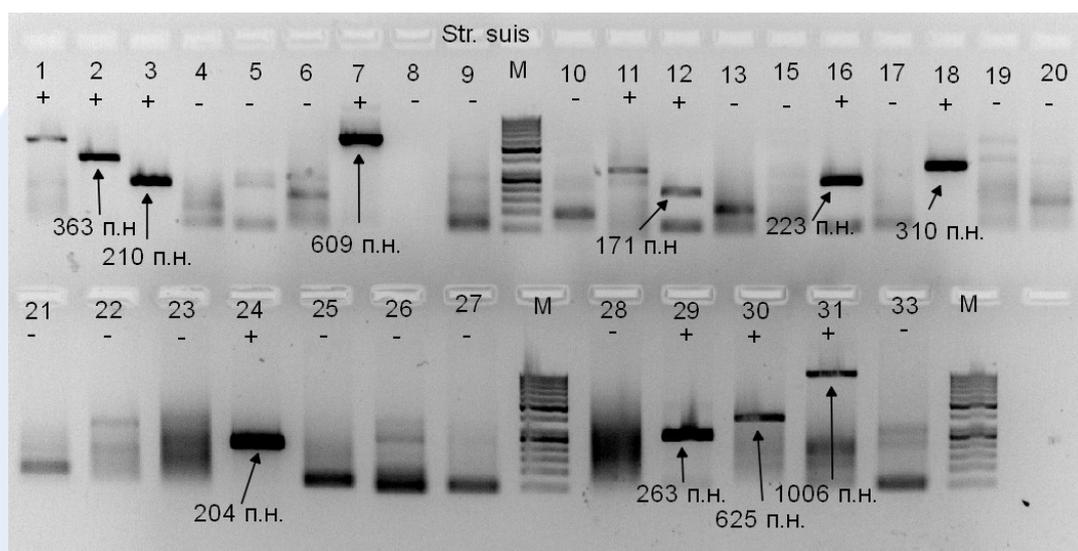
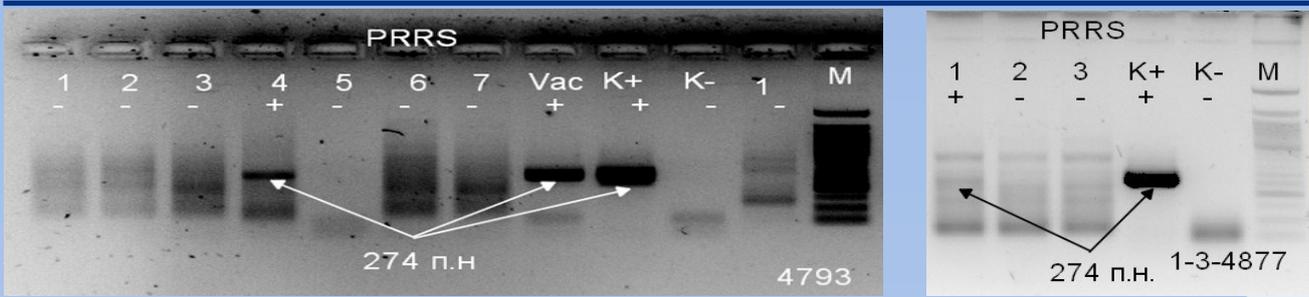


Рисунок 9. – Результаты ПЦР выделенного в патологическом материале *Streptococcus suis*

Таблица 4. – Результаты ПЦР детекции вируса PRRS

№ ПЦР пробы	Материал, группа животных	PRRS
1	Кусочки селезенки от поросят	положительно
2	Кровь от подвинков 40 дней, объединенная проба	положительно



К+ – положительный контроль реакции, РНК вируса РРСС– 274 п.н.;  
 К- – отрицательный контроль реакции; М – маркер;  
 1–7 – РНК исследуемых проб

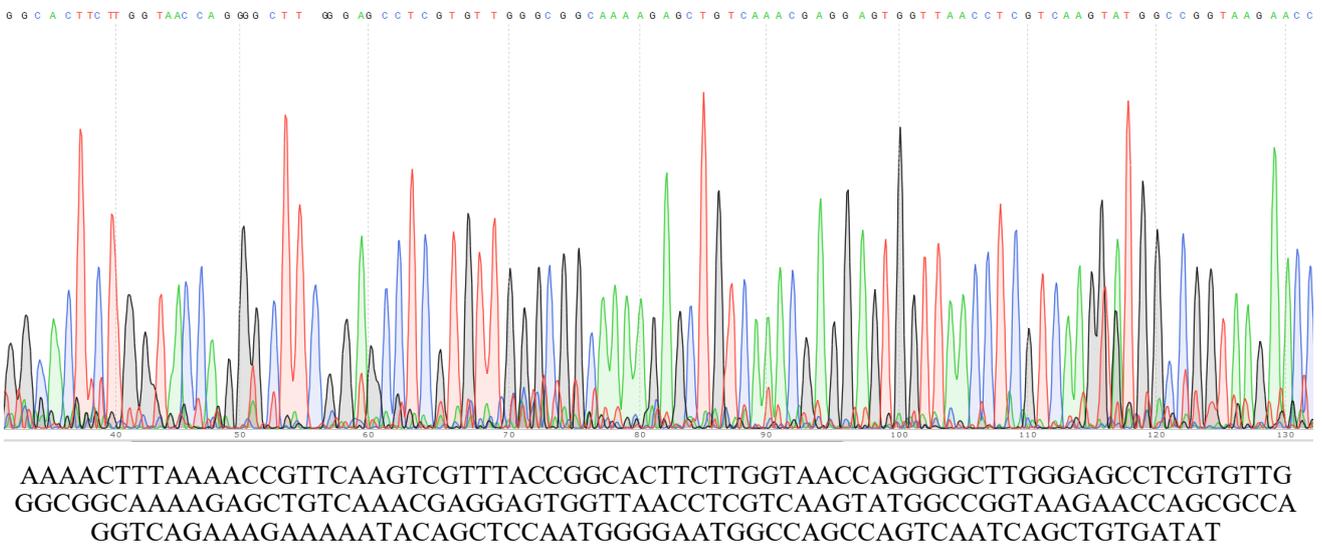
**Рисунок 10. – Результаты постановки ПЦР с праймерами, специфичными в отношении возбудителя РРСС**

Также нами было проведено исследование уровней иммуноглобулинов (IgG) в отношении вируса РРСС, а также *Streptococcus suis* до вакцинации и после вакцинации животных вакцинами СтрептоВаК-С и Porcilis PRRS.

На диаграммах 1 и 2 представлен уровень иммуноглобулинов до и после программы вакцинации против вируса РРСС. Как видно, состояние иммунного ответа против вируса РРСС стабилизировано, неконтролируемой циркуляции вируса в стаде после применения вакцинных мероприятий не происходит. Уровень иммуноглобулинов до вакцинации под действием патогенного и высоковирулентного вируса РРСС составлял у поросят с 90-го дня жизни – 6-й титр-балл и выше, после вакцинации – не выше 3-4 титр-балла. Следует отметить, что наибольшее клиническое проявление в

виде бронхо-легочных заболеваний у поросят отмечалось именно в период с 35–40 дня жизни. Помимо этого, была применена вакцина СтрептоВаК-С свиноматкам и поросятам, после применения которой микробиологическим методом, а также в ПЦР стрептококк не выделялся, а значит данный этиологический агент был купирован. Результаты проведенной работы представлены на диаграммах 1–3.

Следующей задачей было проанализировать вариабельность нуклеотидной последовательности выявленного в анализируемом хозяйстве гена вируса (РРСС), кодирующего протеин капсида вируса. Белок капсида является важным объектом в организме поросят, за счет которого осуществляется выработка иммунитета и обеспечивается защита (рисунок 11).



**Рисунок 11. – Нуклеотидная последовательность анализируемой мишени вируса (РРСС), выделенного из объединенной пробы крови от поросят в возрасте 40 дней**

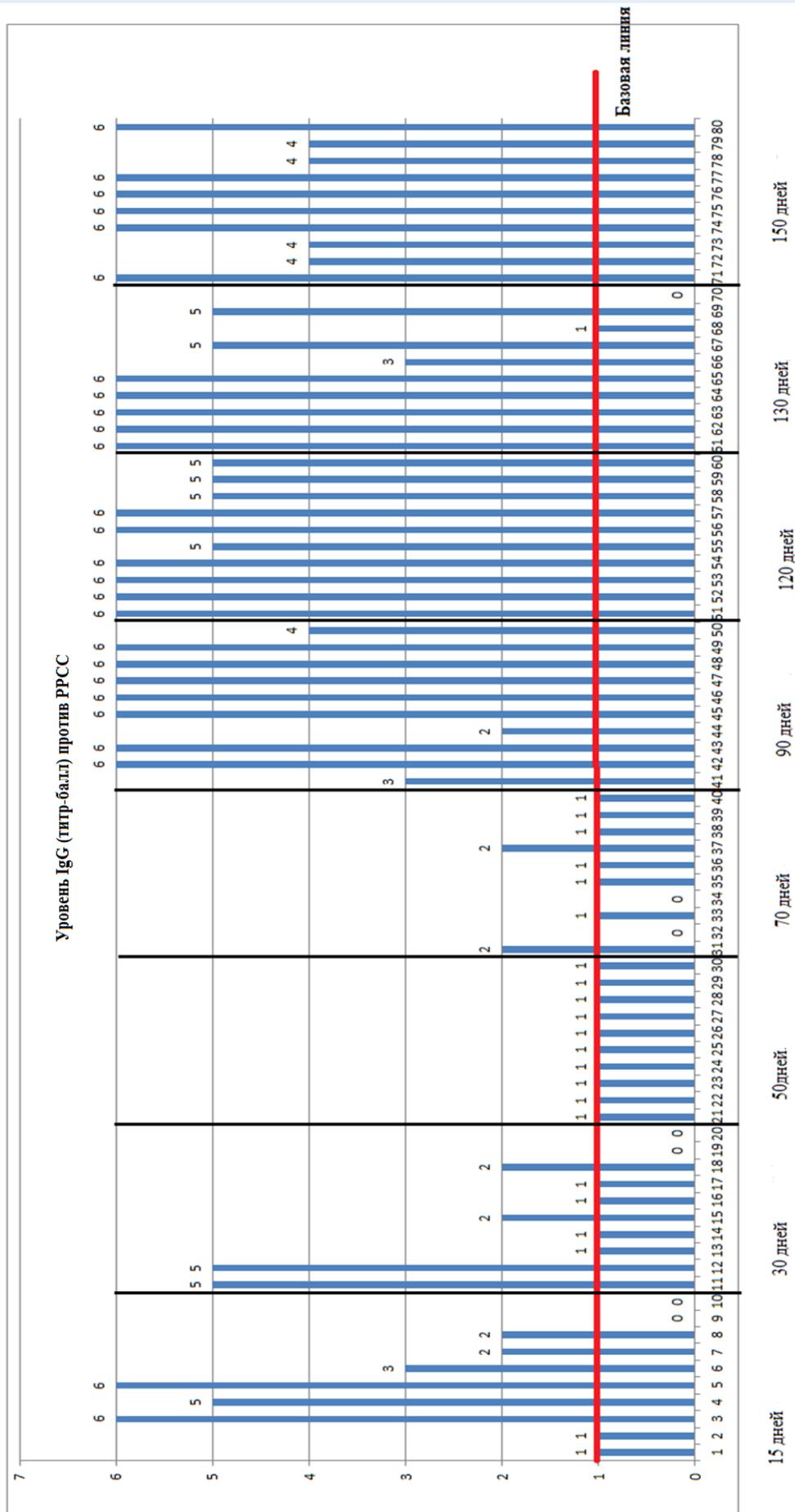


Диаграмма 1. – Серологический профиль (IgG) против PRSS, выраженный в титр-баллах, до вакцинации





При сопоставлении сиквенса-последовательностей в качестве референсных были взяты несколько последовательно-

стей из базы данных геномов БД GenBank (таблица 5).

Таблица 5. – Наиболее близкородственные вирусы (PPCC) по отношению к выделенному в свиноводческом хозяйстве

Наименование	Номер в библиотеке	Белковый продукт	Генотип	% идентичности
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain <b>SU1-Bel</b> partial genome sequence	GenBank: KP889243.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 3	94,76 %
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain <b>lena</b> , complete genome	GenBank: JF802085.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 3	94,76 %
<b>Lelystad virus</b> , complete genome	NCBI Reference Sequence: NC_043487.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 1	89,53 %
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate <b>MLV-DV</b> , complete genome	GenBank: KJ127878.1	ORF6 membrane protein M ORF7 nucleocapsid protein N	genotype 1 subtype 1	89,53 %

Анализ образца выявленного в хозяйстве вируса PPCC с прямым праймером подтвердил, что образец содержит кДНК вируса PPCC (участок последовательности, кодирующей мембранный протеин ORF6 membrane protein M, ORF7 nucleocapsid protein N). Сравнение выделенного вируса

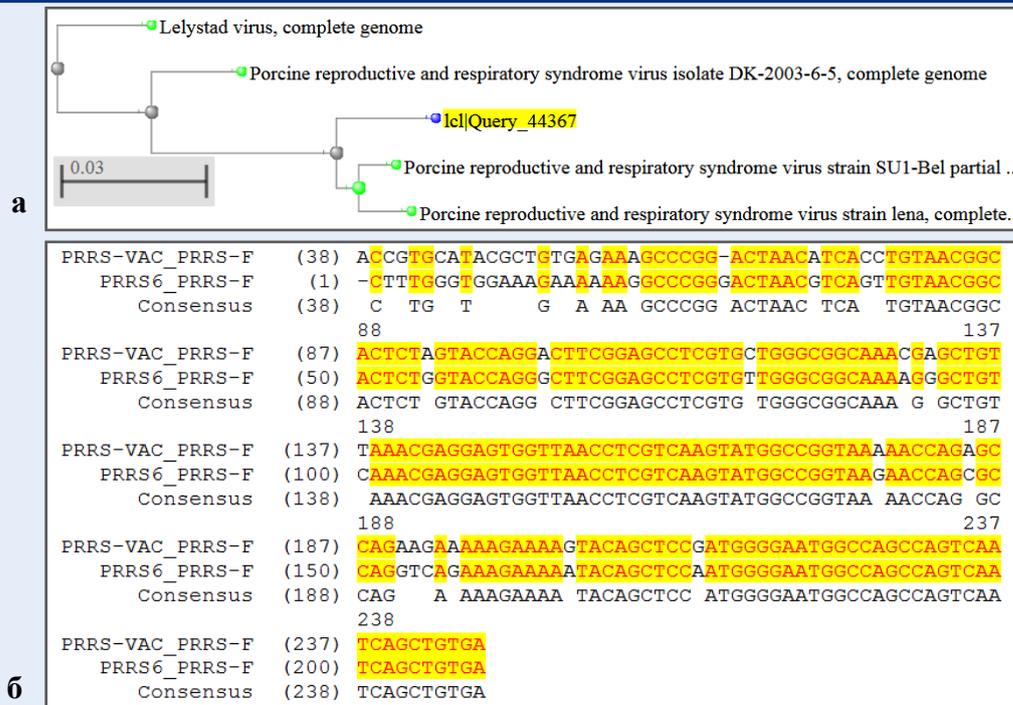
между собой в различном материале показывает идентичность циркуляции полевого вируса в различных технологических группах животных. Выявленный вирус относится к вариантному штамму strain **SU1-Bel**, strain **lena** genotype: 1, subtype: 3; (рисунок 12).

PPRS4_PRRS-F	(1)	AAAACCTTTAAACCGT---TCAAGTC-GTT-TACCGGCACTTCTTGGTAA
PPRS6_PRRS-F	(12)	AAGAAAAAGGCGCGGACTAACGTCAGTTGTACCGGCACTC--TGGTAA
Consensus	(12)	AA A A CCG T A GTC GTT TA CGGCACT TGGTAA
		62 111
PPRS4_PRRS-F	(46)	CCAGGGGCTTGGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAAGGCTGTCAAACGAG
PPRS6_PRRS-F	(59)	CCAGGG-CTTGGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAAGGCTGTCAAACGAG
Consensus	(62)	CCAGGG CTT GGAGCCTCGTGTTGGGCGGCAAAAAG GCTGTCAAACGAG
		112 161
PPRS4_PRRS-F	(96)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
PPRS6_PRRS-F	(108)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
Consensus	(112)	GAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGTAAGAACCAGCCAGGTCAG
		162 211
PPRS4_PRRS-F	(146)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
PPRS6_PRRS-F	(158)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
Consensus	(162)	AAAGAAAAATACAGCTCCAATGGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGT
		212
PPRS4_PRRS-F	(196)	GA
PPRS6_PRRS-F	(208)	GA
Consensus	(212)	GA

Рисунок 12. – Сравнительный генетический анализ выявленного вируса PPCC и материала от поросят в рамках двух исследований (кусочки селезенки, объединенные пробы крови поросят в возрасте 40 дней)

Далее было проведено сравнение и анализ участков геномов выявленных полевых вирусов с вакцинными штаммами вирусов **Lelystad virus**, **MLV-DV**. Результаты этого сравнения представлены на рисунке

13, а, б. Референс-штамм **Lelystad virus** Sequence: NC\_043487 является типичным европейским представителем (генотип 1, субтип 1).



**Рисунок 13. – Сравнительный генетический анализ выявленного полевого вируса РРС в хозяйстве с вакцинным вирусом *Porcillus*, серия A214CE01, дата изготовления – 08-2018, срок годности – до 08-2020**

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показывает, что длительное применение антибиотиков в схемах лечения как кормовых, так и инъекционных не позволяет в должной степени избавиться свиноводческое поголовье от циркуляции стрептококка *Streptococcus suis*. Стрептококки до настоящего времени являются наиболее распространенными в свиноводстве патогенами бактериальной этиологии, вызывающими артрит, менингит, плеврит, пневмонию, перикардит как у молодняка, так и у взрослого поголовья. В анализируемом хозяйстве наблюдалось стационарное неблагополучие по *Streptococcus suis* серотипами 2, 3, 7, 12, 16, 18, 24, 29, 30, 31. Серотиповое разнообразие, а также значительные антигенные различия стрептококков создают сложности в разработке стратегий сдерживания распространения и профилактики болезни. Эволюционно бактерия *Streptococcus suis* выработала ряд механизмов защиты и ухода от влияния как иммунной системы, так и от действия антибиотиков. Применение интенсивной схемы вакцинации на маточном поголовье и поросятах вакциной «СтрептоВаК-С» позволило купировать распространение и негативное влияние *Streptococcus suis* вплоть

до полного отсутствия его последующей циркуляции в хозяйстве.

Исследования клеточного иммунитета (цитокиновый профиль) поросят указывают на значительное доминирование воспалительных процессов со стороны бронхолегочной ткани, сердца, что приводит к истощению и кахексии поросят, обусловленной ассоциативными ко-инфекциями, преимущественно вирусно-бактериальной этиологии (вирус РРС и *Streptococcus suis*). К сожалению, на рынке стран СНГ не существует зарегистрированных вакцин, в состав которых входят аттенуированные вирусы РРС, тип 1, подтипы 2, 3. Выявленный и генотипированный нами вирус РРС, циркулирующий в анализируемом хозяйстве, наиболее близок к штамму strain SU1-Bel, strain lena genotype 1, subtype 3. Степень гомологии составляет 94,76 %. Реализация программы вакцинации с применением вакцины Porcillus PRRS (MSD) позволила купировать острую фазу клинического проявления РРС, снизив циркуляцию высоко патогенного полевого вируса в хозяйстве. Безусловно, циркуляция полевого вируса полностью не остановлена, и без выполнения минимума обязательных мероприятий,

направленных на контроль распространения полевого вируса РРСС, всегда создает риск повторного обострения болезни. Контроль проведенных мероприятий с применением методов оценки уровней IgG (ELISA), полное отсутствие клинического и

патологоанатомического проявления, а также бактериологического выявления ранее циркулировавшей ко-инфекции РРСС+ *Streptococcus suis* позволяет сделать заключение о наиболее важном среди прочих методов профилактики – вакцинации.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Тимченко, В. Н. Инфекционные болезни у детей / В. Н. Тимченко. – СПб. : СпецЛит, 2017.
2. Genetic and virulence-phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates / V. Blume [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2009. – № 12. – S. 161–166.
3. Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada / M. Gottschalk [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2013. 162, 819–825. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.028.
4. Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis* / S. Chuzeville [et al.] // *Vet. Res.* – 2017. – 48:39. doi: 10.1186/s13567-017-0443-4.
5. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis* / Y. Pian [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. – 80, 2402–2413. doi: 10.1128/IAI.06294-11.
6. Recruitment of factor H to the *Streptococcus suis* cell surface is multifactorial // D. Roy [et al.] // *Pathogens.* – 2016. – 5 : E47. doi: 10.3390/pathogens5030047.
7. Structural basis of the interaction between the meningitis pathogen *Streptococcus suis* adhesin Fhb and its human receptor / C. Zhang [et al.] // *FEBS Lett.* – 2016. 590, 1384–1392. doi: 10.1002/1873-3468.12174.
8. Cordoba, S. R. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H / S. R. Cordoba // *Clin. Exp. Immunol.* 151, 1–13. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03552.x.
9. Properties of a *Streptococcus suis* isolate of serotype 2 and two capsular mutants / S. I. Salasia // *Vet. Microbiol.* – 1995. 45, 151–156. doi: 10.1016/0378-1135(95)00036-A.
10. Esgleas, M. *Streptococcus suis* serotype 2 binding to extracellular matrix proteins / M. Esgleas, S. Lacouture, M. Gottschalk // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – 244, 33–40. doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.017.
11. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells / L. Benga [et al.] // *Cell Microbiol.* – 2004. – 6, 867–881. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00409.x.
12. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: are they all really critical? / M. Segura [et al.] // *Trends Microbiol.* – 2017. 25, 585–599. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.005.
13. Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis* / S. Tanabe [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2010. 74, 65–70.
14. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002, 15, 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.
15. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholera* / J. Zhu // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. 99, 3129–3134. doi: 10.1073/pnas.052694299.
16. Crystal structure and identification of two key amino acids involved in AI-2 production and biofilm formation in *Streptococcus suis* / Y. Wang [et al.] // *LuxS. PLoS One* – 2015. 10:e0138826. doi: 10.1371/journal.pone.0138826.
17. Bonifait, L. Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance / L. Bonifait [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. 74, 4969–4972. doi: 10.1128/AEM.00558-08.
18. Mothey, D. Mucin can enhance growth, biofilm formation, and survival of *Streptococcus mutans* / D. Mothey, B. A. Buttaro, P. J. Piggot // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2014. 350, 161–167. doi: 10.1111/1574-6968.12336.
19. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M. E. Olson [et al.] // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. 66, 86–92.
20. Grenier, D. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate / D. Grenier, L. Grignon, M. Gottschalk // *Vet. J.* – 2009. 179, 292–295. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.005.