

УДК 619:616.98:579.843.95:615.371:636.4

О. А. ТАРАСОВ, кандидат ветеринарних наук,

І. А. ЗОЦЕНКО

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

vet@ivm.kiev.ua

ВИВЧЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ STREPTOCOCCUS SUIIS ПРИДАТНИХ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИН ТА ВІДПРАЦЮВАННЯ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ІМУНОГЕННОСТІ

*У статті наведено результати досліджень щодо визначення імуногенності штамів *Streptococcus suis*. Вивчено методи оцінки капсулоутворення та оцінки антигенної активності у відношенні до гомологічних та гетеро логічних сироваток*

Ключові слова: streptococcus suis, антигенні властивості, протективна активність, вакцина, ад'ювант

Streptococcus suis типу 2 є важливим патогеном для свинарства майже в усіх країнах світу. Стрептококову інфекцію пов'язують із менінгітами, артритами, ендокардитами, септицемією, пневмонією та раптовою загибеллю свиней [1,2,5,9]. Більшість випадків припадає на вікову групу на поросят від 3 до 12 тижнів, особливо тварин після відлучення (Lamontetal., 1980) [6].

На сьогодні зареєстровано 35 різних капсулярних серотипів *S. suis* (Perchetal., 1983; Gottschalketal., 1989, 1991; Higginsetal., 1995) [3,4,5,7].

У більшості європейських країн, *S. suis* серотипу 2 (типу 2) є найбільш поширеним, серед ідентифікованих ізолятів від хворих свиней.

Цей мікроорганізм колонізує мигдалики як хворих так і здорових тварин, тому субклінічний перебіг захворювання сприяє поширенню серед чутливого поголів'я (Clifton-Hadleyetal., 1984) [1].

В останні роки підвищилась роль стрептококів як етіологічних факторів при цілому ряді патологій. Спостерігається значне зростання поширеності стрептококових інфекцій а також їх роль як ускладнюючого фактору при ряді захворювань [10, 11, 12].

Враховуючи всі ці посилення, ми вважаємо, що розроблення специфічних засобів профілактики є найважливішим підходом щодо ліквідації даного захворювання.

Комплексні дослідження стануть підґрунтям для подальших фундаментальних та прикладних досліджень щодо даного збудника.

Наступними етапами планується розробка специфічних ветеринарних імунобіологічних засобів проти стрептококозів свиней.

Актуальність теми: реалізація даного завдання надасть змогу забезпечити благополуччя свинарства від захворювання на стрептококоз та підвищить ефективність ведення свинарства

Мета досліджень: Вивчити імуногенні властивості штамів *Streptococcus suis* придатних для виготовлення вакцин.

Об'єкт дослідження: штаміта ізоляти *Streptococcus suis*

Методи дослідження:

Штами та ізоляти *S.suis* культивували у м'ясопептонному бульйоні Хоттінгера з вмістом (%): пептону – 0,5; натрію хлориду – 0,2; калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,3; натрію фосфорнокислого двохраніщеного – 2; детергенту Tween-80 – 0,05; сироватки крові великої рогатої худоби, коней або овець – 8-10; глюкози – 0,4; амінного азоту 180 – 200 мг %. Поживнесередовище мало рН 7,4 – 7,6. Інші дослідження проводили на стандартних середовищах МПА, МПБ, середовищі Сабуро.

Для встановлення гемолітичних властивостей використовували МПА із додаванням стерильної дефібринованої крові ВРХ, а також при проведенні досліджень використовували суху плазму крові (БіоФарма).

Культивування *Streptococci suis* проводили: в МПБ та МПБХ із рН – 7,4 – 7,6 із додаванням інактивованої сироватки крові ВРХ в кількості 8-10 %. при температурі $36,7 \pm 0,3^\circ \text{C}$ протягом 12-24 годин і в МПАХ 58 – 72 години.

Дослідження морфологічних та культуральних властивостей проводили із використанням загальноприйнятих бактеріологічних методів.

Штами культивували на поживному бульйоні (МПБ та ВНІ),а також на твердих поживних середовищах (МПА із додаванням 5% дефібринованої крові або 10% сироватки крові ВРХ).

Визначення кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в добових бульйонних культурах проводили шляхом висівання аліквоти культури в послідовних розведеннях 1×10^{-6} ; 1×10^{-7} і 1×10^{-8} в кількостях по $0,2 \text{ см}^3$ кожного розведення на поверхню МПАХ в трьох чашках Петрі і наступного культивування за температури $(36,7 \pm 0,3)^\circ \text{C}$ протягом 48 – 72 годин з наступним підрахунком колоній, що вирости, та середньої кількості живих мікроорганізмів в 1 см^3 культури.

Результати досліджень Відомо, що імуногенні властивості *Streptococcus suis* обумовлені головним чином, сукупністю полісахаридно-білкових компонентів капсули. Тому, при культивуванні вакцинних культур ми контролювали капсулоутворення (стандартна методика Нейфельда).

При проведенні досліджень нами встановлено, що найбільш розвинена капсула спостерігалась у стрептококів після 12-16 годин культивування (оптимально 14 годин). Але слід мати на увазі, що швидкість капсуло утворення може варіювати на різних поживних середовищах.

Визначаючи оптимальний час культивування, ми велику увагу приділяли накопиченню кількості мікробних клітин, яка була максимальною в експоненціальній фазі росту, яка припадала на період 12-16 годин від початку культивування.

Нами було експериментально встановлено, що у культур при інкубуванні до 7-10 годин та більше 16-20 годин капсула стає менш вираженою, що негативно впливає на імуногенні властивості.

Протягом 2013 року проведено серію дослідів з вивчення антигенних властивостей ізолятів збудника стрептококозів свиней 17 патогенних ізолятів із застосуванням гомологічних та гетерологічних сироваток та відібрано 6 ізолятів *S.suis*, які проявили найвищу антигенну активність у відношенні як гомологічних, так і гетерологічних сироваток крові лабораторних тварин.

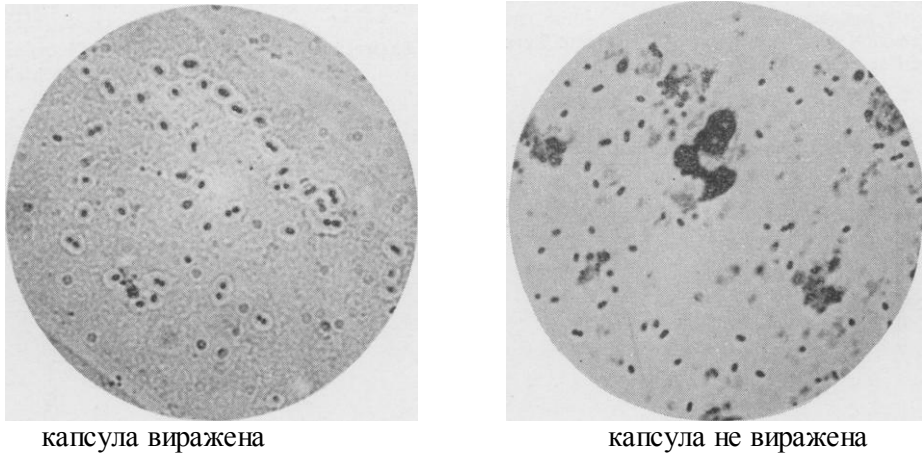


Рис.1. Вираженість капсули стрептококів за методикою Нейфельда

У результаті проведених дослідів встановлено низьку антигенну активність ізолятів № 8, 14, 20, 31 в реакції з гомологічною сироваткою, в той час як їх активність з сироваткою на референт-штам виявилася високою. Ізоляти 11, 19 та 21 проявили однаково високу активність як на сироватку крові, отриману на гомологічний антиген, так і на гетерологічні антигени.

Для більш повного порівняння антигенної активності 6 найбільш антигенноактивних ізолятів *S.suis*, відповідні антигени вносили у лунки планшет в кількостях 0,5 та 1,0 мкг та додавали гіперімунну сироватку крові мишей, отриману на штами *S.suis* в розведенні 1: 320.

Відносно низька антигенна активність по відношенню до власної сироватки та висока – до іншої досліджуваної, на нашу думку, свідчить про те, що мікроорганізми високовірулентних ізолятів несуть на своїй поверхні приблизно таку ж кількість антигенних детермінант, але вони, ймовірно, значно гірше презентовані (антигени занурені вглиб капсули, невідгидне просторове розташування білкових антигенів).

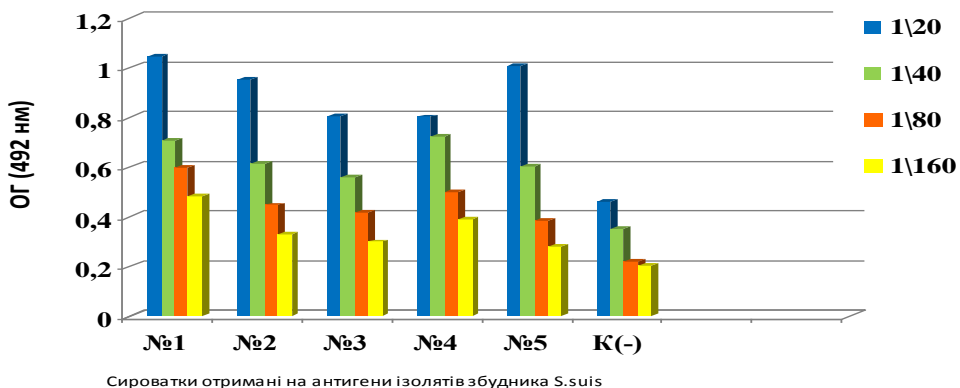


Рис. 2 Антигенна активність *S.suis* (ізолят 11) у відношенні до сироваток на антиген п'яти польових ізолятів (8,14,20,31,21)

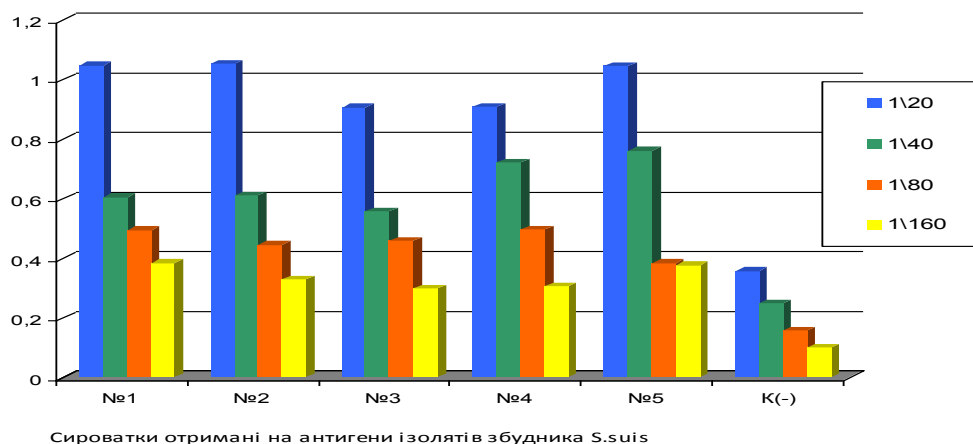


Рис. 3 Антигенна активність *S.suis* (ізолят 19) у відношенні до сироваток на антиген п'яти польових ізолятів (19,14,20,11,31)

У результаті проведених досліджень нами було встановлено пряму кореляцію між біологічними властивостями (ступінь вірулентності для лабораторних тварин) та антигенними властивостями у реакції ІФА (непрямий варіант). Антигени високопатогенних ізолятів *S.suis* 11, 19 та 21, характеризувались вираженою антигенною активністю як по відношенню до гомологічних сироваток, так і по відношенню до сироваток, отриманих на досліджувані 17 патогенних ізолятів, які відрізнялися за ознаками патогенності.

Висока антигенна активність (спорідненність) з гомологічними та гетерологічними специфічними сироватками є однією з ознак високої імуногенності.

Висновки

1. На підставі проведених культурально - біохімічних, мікробіологічних, серологічних і молекулярно-біологічних досліджень, визначення протективних властивостей підібрано та охарактеризовано штами *S.suis* для виготовлення інактивованої вакцини проти стрептококозу свиней.

2. Встановлено пряму кореляцію між біологічними властивостями (ступінь вірулентності для лабораторних тварин), антигенними властивостями у реакції ІФА (непрямий варіант) та протективними властивостями.

Результати досліджень будуть використані при подальшому створенні засобів специфічної профілактики захворювання свиней на стрептококоз.

Список використаної літератури :

1. Clifton-Hadley, F.A., Alexander, T.J.L., Upton, I., Duffus, W.P.H.. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs.// *Vet Rec.* - 1984. - 114, - P. 513-518.

2. Devriese, L.A., Ceysens, K., Hommez, J., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.H., 1991. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method.// *Veterinary Microbiol.* - 1991. - №26. - P.141-150.

3. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H.J., Pijoan, C., Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the

presence of muraminidase-released protein and extracellular factor // Can. J. Vet. Res. – 1996. – №60, 72–74

4. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M., Henrichson, J., Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. // J. Clin. Microbiol. – 1991. – №29. – P. 2590–2594.

5. Lamont, M.H., Edwards, P.T., Windsor, R.S., 1980. Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey // Vet. Rec. – 1980. – №107. – P. 467–469.

6. Mwaniki, C.G., Robertson, I.D., Hampson, D.J., 1994. The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries. // Australian Vet. J. – 1994. – №71. – P. 385–386.

7. Perch, B., Pedersen, K.B., Henrichson, J., Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis* // J. Clin. Microbiol. 1983. – 17. – P. 993–996.

8. Reams, R.Y., Glickman, L.T., Harrington, D.D., Thacker, H.L., Bowersock, T.L., 1994. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. // J. Vet. Diagn. Invest. – 1994 – №6. – P. 326–334.

9. Salasia, S.I., Lammler, C., Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs. // Zentralbl. Veterinarmed. 1995. – № 42. – P. 78–83.

10. Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U., Wisselink, H.J., Van Lieshout, H., Smith, H.E., 1996. Comparative studies on the pathogenicity of different *Streptococcus suis* type 1 strains. Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna., 299.

11. Панин А. Н., Цветков Е. И. Эпизоотологические особенности стрептококкоза свиней в условиях промышленного ведения животноводства // Актуальные вопросы эпизоотологии. Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. – Казань, 1983, с. 116.

12. Панин А. Н., Котлова Л. А. Контроль иммуногенных свойств стрептококков серогруппы к // Совершенствование методов государственного контроля ветеринарных препаратов. Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. – М., 1991, с. 163.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUSSUIS* ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИН И ОТРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ИММУНОГЕННОСТИ / Тарасов А. А., Зоценко И. А.

*В статье приведены результаты исследований определения иммуногенности штаммов *Streptococcus suis*. Исследованы методы оценки капсулообразования и оценки антигенной активности в отношении к гомологичным и гетерологичным сывороткам.*

Результаты исследования сывороток крови методом иммуноферментного анализа подтверждают ранее полученные данные относительно целесообразности применения в качестве вакцинных штаммов с высокой антигенной активностью по отношению к сывороткам, полученным на антигены различных серогрупп.

*Ключевые слова: *streptococcus suis*, антигенные свойства, протективная активность, вакцина, адъювант*

INVESTIGATION OF THE IMMUNOGENIC PROPERTIES OF STREPTOCOCCUS SUIS STRAINS FOR VACCINE PREPARATION AND TESTING OF THE IMMUNOGENECITY CONTROL TESTS/ Tarasov O., Zotcenko I.

The results of investigation of the immunogenic properties of S.suis strains were shown in the title. It was tested the methods and approaches for capsula-manifestation and the specific antibody yields with gomologic and heterologic sera. The obtained results confirmed the previous obtained ones about perspectives of using strains with high activity against sera obtained for antigens of the different serogroups.

Key words: streptococcus suis, antigenic properties, protective activity, vaccine, adjuvant

Рецензент – кандидат ветеринарних наук В. В. Уховський

Рукопис надійшов 27.02. 2014 року.