

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

САВЧЕНЮК МИХАЙЛО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 579.62:616.993:577.2(477)(043.3)

**МІКРОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА *STREPTOCOCCUS SUIIS*, ЙОГО
ІДЕНТИФІКАЦІЯ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ,
АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА ПОШИРЕНІСТЬ У
ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ**

Спеціальність: 211 – “Ветеринарна медицина”

Галузь знань: 21 – “Ветеринарна медицина”

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



(підпис)

Михайло САВЧЕНЮК

Наукові керівники:

КОРНІЄНКО Леонід Євгенович

доктор ветеринарних наук, професор

ЗОЦЕНКО Володимир Миколайович

кандидат ветеринарних наук, доцент

АНОТАЦІЯ

Савченко М.О. “Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом полімеразної ланцюгової реакції, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України”. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 – Ветеринарна медицина). Білоцерківський національний аграрний університет. Біла Церква, 2023.

Стрептококова інфекція в Україні з часом стає однією із найбільш важливих проблем свинарства. Носійство збудника стрептококозу в підсвинків досягає майже 100 % усього через два-три тижні після відлучення їх від свиноматок. За захворюваності 60–75 % летальність може становити 65 %. небезпека зберігається у зв’язку зі здатністю збудника набувати резистентності до антибіотиків, що ускладнює антимікробну терапію хворих тварин.

Виявлено, що епізоотична ситуація, пов’язана зі стрептококовою інфекцією, має важливий сигнальний характер стосовно формування стійкого нозоареалу, що може наслідувати розповсюдження на раніше невражені території. Важливо наголосити, що в Україні патерн епізоотичної ситуації стосовно стрептококозу відзначається певною стабільністю, але динаміка показує невинне зростання кількості зафіксованих випадків протягом останнього десятиліття, загалом підраховано понад 300 випадків цієї недуги.

Дослідження, здійснені на відібраних фермах впродовж періоду 2017–2021 років, демонструють певні позитивні зрушення, а саме, відмічається зниження частоти виявлення *Str. suis*. Тим не менше, на тлі цього спостерігається незворотне збільшення патогенних штамів серед виділених ізолятів. Така ситуація робить актуальним завдання запровадження науково обґрунтованих та ефективних стратегій боротьби та ерадикації на локальному та національному рівнях. Зазначена необхідність посилюється не лише через загрозу для тваринництва, але й через потенційну негативну динаміку в економічному вимірі.

Під час наших досліджень ми провели докладний аналіз штамів та місцевих ізолятів *Str. suis*, що дозволило нам здобути значну кількість інформації стосовно їхніх антигенних та молекулярно-генетичних характеристик. Ми також детально дослідили морфологію цих мікроорганізмів, їх культуральні властивості, біохімічні особливості, ферментативну активність та біологічну поведінку. Цей комплексний аналіз надав нам глибоке розуміння цих мікроорганізмів та їхньої ролі у патогенезі захворювань.

У ході нашого дослідження ми проаналізували 5 ізолятів *Str. suis*, які виявили схожі морфологічні характеристики, включаючи форму та розмір колоній, а також морфологію бактерій. Крім того, ми докладно вивчили культуральні властивості цих ізолятів, включаючи забарвлення, агарні штампи, додаткові ростові фактори та вимоги до середовища, і помітили значну подібність серед них.

Додатково, ми провели аналіз ферментативної активності цих ізолятів, що дозволило нам виявити їхню здатність синтезувати певні ферменти, які можуть впливати на їхню вірулентність та інфекційний потенціал. Ці дослідження відкрили важливі відмінності та подібності між ізолятами *Str. suis*, що в майбутньому можуть бути використані для класифікації та типування цих мікроорганізмів.

Наш аналіз дозволив виявити як відмінності, так і схожості між ізолятами *Str. suis*, що створює базу для подальшої класифікації та типування цих мікроорганізмів. Ця інформація є ключовою для розуміння різноманітності та варіабельності цього виду бактерій, а також може бути важливою для розробки стратегій контролю та лікування захворювань, пов'язаних із *Str. suis*.

Молекулярно-генетичні дослідження, які включали аналіз генетичних маркерів та виявлення вірулентних генів, значно поглибили наше розуміння основних механізмів вірулентності *Str. suis*. Ці дослідження мають потенціал сприяти розробці нових методів діагностики, профілактики та лікування захворювань, пов'язаних з цим мікроорганізмом.

Отримані результати досліджень, які були проведені у рамках дисертаційної роботи, допомагають уточнити характеристику *Str. suis* та розкривають взаємозв'язки між його морфологічними, культуральними та генетичними властивостями. Це значуще розширює наше загальне розуміння патогенезу інфекційних захворювань, які спричинюються цим мікроорганізмом, та може мати практичне застосування у вдосконаленні стратегій боротьби з ними.

Під час наших досліджень ми встановили, що чотири ізоляти *Str. suis* демонстрували ферментацію рафінози з утворенням кислоти, при цьому не виділяли газ, що є характерною реакцією для серотипу 2 *Str. suis*. У той час один із ізолятів не проявив ферментацію рафінозу, що вказує на його віднесення до серотипу 1. Всі ізоляти проявляли активність ферментів, таких як аргініназа, глікогеназа, D-глюкозидаза, цукрозидаза, галактозидаза, мальтозидаза, саліциназа, трегалозидаза та інуліназа. Під час проведення досліджень також спостерігали позитивні реакції мікроорганізмів на α -галактозидазу, β -глюкуронідазу і лейцин-ариламідазу, що свідчить про їхню віднесеність до виду *Str. suis* та правильну диференціацію культури збудника.

Слід відзначити, що ізоляти *Str. suis*, отримані від свиней, демонстрували відсутність ферментації маніту, що відповідає результатам ідентифікації за використання визначника Берджі (Bergey) та співпадає з даними, які подані в науковій літературі (більше 70 % ізолятів не ферментують маніт). Під час вивчення біохімічних характеристик ізолятів *Str. suis* за допомогою системи API 20 STREP (виробництва "bioMérieux", Франція), було виявлено та ідентифіковано серотипи 1, 2 та 1/2. Однак варто зауважити, що ця система не є придатною для ідентифікації інших серотипів *Str. suis*.

Аналіз результатів досліджень патологічного матеріалу вказує, що у 26,5 % випадків захворювань, спричинених *Str. suis*, спостерігалася моноінфекція. Також у 14,7 % випадків спільно з *Str. suis* було виявлено *E. coli*, у 11,8 % – *Pasteurella multocida*, а у 8,8 % – *Haemophilus parasuis*. Змішані інфекції були виявлені у 29,4 % випадків. Ці дані свідчать про важливі аспекти патологічного

процесу та можуть мати значення для розробки ефективних стратегій контролю та лікування захворювань, пов'язаних з цими мікроорганізмами.

Дослідження чутливості ізолятів *Str. suis* до антибіотиків, проведені у 2017 і 2021 роках, показали, що всі ізоляти були чутливими до пеніциліну та амоксициліну. Однак варто зауважити, що спостерігалася зростаюча стійкість до фторхінолонів, цефалоспоринів та гентаміцину, що свідчить про підвищення рівня стійкості до антибіотиків у вказаному періоді. У той же час тенденція до зниження стійкості досліджуваного збудника до тетрациклінів була малозначною. Кількість помірно чутливих ізолятів за цей період, із 2017 по 2021 рік, залишилася практично незмінною. Ці дані свідчать про важливість постійного моніторингу чутливості *Str. suis* до антибіотиків та можливості впливу на стратегії лікування цих інфекційних захворювань.

У ході дослідження взаємодії протимікробних речовин із мікроорганізмом *Str. suis* NCTC 10234 було виявлено синергію лише між окситетрацикліном і такими препаратами, як тилозин, ципрофлоксацин, канаміцин та поліміксин. Ці результати вказують на потенційну ефективність комбінованого застосування цих антибіотиків для боротьби з інфекціями, спричиненими *Str. suis*.

Дослідження поверхневого антигена високовірулентної та слабовірулентної культур *Str. suis* підтвердило, що вони проявляють антигенну активність як відносно гомологічних сироваток, так і сироваток, отриманих із досліджуваних ізолятів, що відрізняються за патогенністю. Однак варто відзначити, що поверхневі антигени високовірулентного *Str. suis* виявили більш виражену антигенну активність щодо обох типів сироваток. Ці результати можуть вказувати на різні антигенні властивості між різними культурами *Str. suis* і мати важливе значення для подальших досліджень у галузі вивчення вірулентних властивостей цього мікроорганізму.

Для проведення комплексу мікробіологічних, культурально-біохімічних, серологічних та молекулярно-генетичних досліджень ми відібрали та детально охарактеризували ізоляти *Str. suis*. Крім того, було проведено оптимізацію умов

культивування з метою отримання максимального виходу біомаси цього мікроорганізму.

Важливим етапом дослідження був підбір набору праймерів для полімеразної ланцюгової реакції з урахуванням їхньої температури відпалу. Важливо було забезпечити однакову температуру відпалу для всіх праймерів у наборі, оскільки оптимальна температура відпалу сприяє ефективній ампліфікації цільових ДНК-послідовностей. Для виконання цього завдання дослідження із літературних джерел було підбрано набори праймерів для ідентифікації та диференціації *Str. suis*.

Під час дослідження також проводилася оцінка можливих небажаних ефектів, зокрема утворення димерів та неспецифічних реакцій. Димери є неконтрольованими ампліфікаційними продуктами, які можуть утворюватися при використанні неправильно підібраних праймерів. Важливо було переконатися, що праймери не утворюють димерів між собою, що може призвести до неконтрольованого збільшення фонового сигналу.

З метою підвищення достовірності ідентифікації *Str. suis* проводились дослідження, спрямовані на оптимізацію протоколу реакції та забезпечення оптимальної температури відпалу. Це дозволило забезпечити високу специфічність та ефективність ПЛР-реакції при діагностиці *Str. suis* і зробити її надійним інструментом для досліджень та діагностики цього мікроорганізму.

У процесі розробки методики діагностики, велику увагу приділяли підбору праймерів з оптимальною температурою відпалу, забезпечуючи однакову температуру відпалу для всіх використовуваних праймерів. Це було важливою складовою для досягнення ефективної ампліфікації цільових ДНК-фрагментів. Особлива увага приділялася уникненню небажаних результатів при застосуванні праймерів у реакціях, і це досягалося шляхом аналізу можливого утворення димерів та неспецифічних реакцій.

Внутрішньолабораторна валідація методики діагностики *Str. suis* включала оцінку кількох ключових показників, що підтверджують надійність та

ефективність методу. Аналітичну чутливість методики визначали, проводячи аналіз на низьких концентраціях цільового геному. Це дозволяло встановити межу виявлення методики і переконатися, що вона здатна надійно реєструвати навіть мінімальну кількість цільової ДНК. Специфічність методики перевіряли, досліджуючи відсутність позитивних реакцій при застосуванні методики до зразків, що не містять цільової ДНК. Збіжність результатів оцінювали шляхом порівняння результатів однієї і тієї ж реакції, яку проводили в різних умовах. Це вказує на стабільність та повторюваність результатів методики.

Виявлена висока збіжність результатів досліджень підтверджується вражаюче низьким коефіцієнтом варіації, який склав всього 1,30 %. Цей значення виявилось нижчим за прийнятий стандартний показник для даного методу, який складає $CV \leq 2,28$. Це надзвичайно важливий результат, який свідчить про стабільність і повторюваність отриманих результатів при застосуванні розробленої методики.

Низький рівень коефіцієнта варіації свідчить про високу точність та надійність методики для діагностики *Str. suis*. Це важливо в контексті мікробіологічних досліджень, оскільки висока точність дозволяє отримувати консистентні та достовірні результати, що є важливими для діагностики та контролю за цим патогеном.

У ході нашого дослідження ми детально аналізували EF-протеїн, який служить як маркер вірулентності, а також ген *epf*, який є інструментом для оцінки вірулентних властивостей ізолятів. Крім цього, ми провели аналіз наявності генів *mtrp*-протеїну. Варіанти вірулентних штамів включають в себе 136 кДа мурамідазовивільняючий протеїн (MRP+) та 110 кДа позаклітинний білковий антиген (EF+). Слабовірулентні штами, натомість, продукують MRP та EF- протеїни (MRP+EF+), а невірулентні штами не синтезують ці протеїни (MRP-EF-). Під час наших досліджень ми вивчили протеїни MRP, EF та EF+ і виявили, що їхні N-термінальні ділянки ідентичні. Проте С-термінальний фрагмент EF+ протеїну містив кілька тандемних повторів амінокислот, які були

відсутні в менших за масою EF-протеїнах. За фенотиповим поділом, штами і ізоляти *Str. suis* типу 1 були розділені на дві групи: MRP+EF+ та MRP–EF–. Ізоляти фенотипу MRP+EF+ характеризувалися продукцією MRP– протеїну меншої маси (приблизно 120 кДа) та 110 кДа EF-протеїну, і вони були високовірулентними для поросят.

Зважаючи на вищезазначене, варто відзначити важливість комплексного підходу до контролю та запобігання стрептококової інфекції. Науково обґрунтовані стратегії, розроблені на основі глибокого аналізу епізоотичної динаміки та факторів ризику, відіграють ключову роль у забезпеченні здоров'я тварин та ефективного управління цією серйозною проблемою у сільськогосподарському виробництві.

Для виконання завдань дисертаційної роботи проведено епізоотологічні дослідження (епізоотологічне обстеження 5-ти господарств та спостереження за ними); бактеріологічні – згідно із затвердженими методиками та стандартами (культурально-морфологічні, ферментативні, антигенні властивості ізолятів *Str. suis*); досліджено чутливість до антибіотиків методом дифузії в агар із застосуванням дисків, що містять антибіотики – згідно з ТУ 9398–001–39484474–2000 та методом послідовних розведень; молекулярно-генетичні (ПЛР) та проведено статистичну обробку результатів досліджень.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в тому, що вперше в Україні досліджено сучасну епізоотичну ситуацію щодо захворювання свиней на стрептококоз, з'ясовано етіологічну структуру захворювання тварин цього виду, вивчено чутливість *Str. suis* до антибіотиків, антигенні та імуногенні властивості *Str. suis*, апробовано молекулярно-генетичні дослідження за геном основного протективного білка, оптимізовано й апробовано протоколи проведення ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та детекцією результатів у реальному часі.

Практичне значення отриманих результатів: визначено поширеність стрептококозу серед поголів'я свиней у різних областях України, співвідношення

різних патогенних і непатогенних стрептококів виду *Str. suis* в етіологічній структурі стрептококозу свиней, а також оптимізовано протоколи проведення ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та детекцією результатів у реальному часі.

За результатами досліджень розроблено “Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції”, призначені для ветеринарних лікарів свиноферм, спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини, науковців, аспірантів, викладачів вищих навчальних закладів зі спеціальності 211 – “Ветеринарна медицина”.

Ключові слова: епізоотологічний моніторинг, *Streptococcus suis*, мікроорганізми, стрептококоз свиней, полімеразна ланцюгова реакція, антимікробна резистентність, антибактеріальні препарати, антибіотики, антиген, сироватка, імуноферментний аналіз, бактеріологічне дослідження.

SUMMARY

Savcheniuk M. Microbiological characteristics of *Streptococcus suis*, its identification by polymerase chain reaction, antibiotic resistance and prevalence in Ukrainian farms. – Qualifying scientific work as a manuscript.

This is for the scientific degree of Philosophy Doctor in the specialty 211 – Veterinary medicine (21 – Veterinary medicine). Bila Tserkva National Agrarian University. Bila Tserkva, 2023.

Over time, streptococcal infection in Ukraine is becoming one of the most important problems of pig production. The carriage of the streptococcal pathogen in gilts reaches almost 100 % in two to three weeks after weaning them from sows. With an incidence of 60–75 %, the mortality rate can be as high as 65 %. The danger persists due to the pathogen’s ability to acquire antibiotic resistance, which complicates antimicrobial therapy of sick animals.

This study has shown that the epidemiological situation associated with streptococcal infection has an important signaling character regarding the formation of a stable nosodefense, which can be followed by the spread to previously unaffected areas. It is important to emphasize that in Ukraine, the pattern of the epidemiological situation with regard to streptococcosis is characterized by a certain stability, but the dynamics shows a steady increase in the number of recorded cases over the past decade, with more than 300 cases of this disease.

Studies conducted on selected farms during the period 2017–2021 show some positive changes, namely, a decrease in the frequency of *Str. suis* detection. Nevertheless, against this background, there is an irreversible increase in pathogenic strains among the isolates. This situation makes it urgent to implement scientifically sound and effective control and eradication strategies at the local and national levels. This need is intensified not only because of the threat to livestock production, but also because of the potential negative dynamics in the economic dimension.

In the course of our research, we conducted a detailed analysis of *Str. suis* strains and local isolates, which allowed us to obtain a significant amount of information on their antigenic and molecular genetic characteristics. We also studied in detail the morphology of these microorganisms, their culture properties, biochemical features, enzymatic activity and biological behavior. This comprehensive analysis provided us with a deep understanding of these microorganisms and their role in disease pathogenesis.

In the course of our study, we analyzed 5 isolates of *Str. suis* that showed similar morphological characteristics, including colony shape and size, as well as bacterial morphology. In addition, we studied in detail the culture properties of these isolates, including coloration, agar stains, additional growth factors, and media requirements, and noticed significant similarities among them.

Additionally, we analyzed the enzymatic activity of these isolates, which allowed us to identify their ability to synthesize certain enzymes that may affect their virulence and infectious potential. These studies have revealed important differences

and similarities between *Str. suis* isolates, which can be used in the future to classify and type these microorganisms.

Our analysis has revealed both differences and similarities between *Str. suis* isolates, which provides a basis for further classification and typing of these microorganisms. This information is key to understanding the diversity and variability of this bacterial species and may also be important for developing strategies to control and treat *Str. suis*-related diseases.

Molecular genetic studies, which included the analysis of genetic markers and the identification of virulent genes, have significantly deepened our understanding of the underlying mechanisms of *Str. suis* virulence. These studies have the potential to contribute to the development of new methods of diagnosis, prevention and treatment of diseases associated with this microorganism.

The results of the research conducted in this thesis help to clarify the characteristics of *Str. suis* and reveal the relationships between its morphological, cultural and genetic properties. This significantly expands our overall understanding of the pathogenesis of infectious diseases caused by this microorganism and may have practical applications in improving control strategies.

During our research, we found that four *Str. suis* isolates demonstrated fermentation of raffinose to produce acid, but did not produce gas, which is a characteristic reaction of *Str. suis* serotype 2. At the same time, one of the isolates did not show fermentation of raffinose, indicating that it belongs to serotype 1. All isolates showed the activity of enzymes such as argininase, glycogenase, D-glucosidase, sucrose synthase, galactosidase, maltosidase, salicinase, trehalosidase, and inulinase. During the study, positive reactions of microorganisms to α -galactosidase, β -glucuronidase and leucine arylamidase were also observed, indicating that they belong to the *Str. suis* species and that the pathogen culture was correctly differentiated.

It should be noted that isolates of *Str. suis* obtained from pigs showed the absence of mannitol fermentation, which corresponds to the results of identification by the Bergi method and is consistent with the data presented in the scientific literature

(more than 70 % of isolates do not ferment mannitol). During the study of the biochemical characteristics of *Str. suis* isolates using the API 20 STREP system (manufactured by bioMerieux, France), serotypes 1, 2 and 1/2 were detected and identified. However, it should be noted that this system is not suitable for the identification of other *Str. suis* serotypes.

The analysis of the results of pathological material shows that 26,5 % of cases of diseases caused by *Str. suis* were acute monoinfection. Also, in 14,7 % of cases, *E. coli* was detected together with *Str. suis*, in 11,8 % – *Pasteurella multocida*, and in 8,8 % – *Haemophilus parasuis*. Mixed infections were detected in 29,4 % of cases. These data indicate important aspects of the pathological process and may be important for the development of effective strategies for the control and treatment of diseases associated with these microorganisms.

Studies of antibiotic susceptibility of *Str. suis* isolates conducted in 2017 and 2021 showed that all isolates were susceptible to penicillin and amoxicillin. However, it is worth noting that there was an increase in resistance to fluoroquinolones, cephalosporins, and gentamicin, indicating an increase in antibiotic resistance in this period. At the same time, the tendency to decrease the resistance of the tested pathogen to tetracyclines was insignificant. The number of moderately sensitive isolates remained virtually unchanged during this period, from 2017 to 2021. These data indicate the importance of continuous monitoring of *Str. suis* susceptibility to antibiotics and the possibility of influencing treatment strategies for these infectious diseases.

In the study of the interaction of antimicrobial agents with *Str. suis* NCTC 10234, synergy was found only between oxytetracycline and such drugs as tylosin, ciprofloxacin, kanamycin and polymyxin. These results indicate the potential efficacy of the combined use of these antibiotics to combat infections caused by *Str. suis*.

The study of the surface antigen of highly virulent and low virulent cultures of *Str. suis* confirmed that they exhibit antigenic activity both against homologous sera and sera obtained from the studied isolates that differ in pathogenicity. However, it is worth noting that the surface antigens of highly virulent *Str. suis* showed more pronounced

antigenic activity against both types of sera. These results may indicate different antigenic properties between different cultures of *Str. suis* and are important for further research in the field of studying the virulence of this microorganism.

To conduct a set of microbiological, culture, biochemical, serological and molecular genetic studies, we selected and characterized *Str. suis* isolates in detail. In addition, we optimized the cultivation conditions in order to maximize the biomass yield of this microorganism.

An important step in the study was the selection of a set of primers for the polymerase chain reaction based on their annealing temperature. It was important to ensure the same annealing temperature for all primers in the set, since the optimal annealing temperature contributes to the efficient amplification of target DNA sequences. To accomplish this task, primer sets for the identification and differentiation of *Str. suis* were selected from the literature.

The study also assessed possible undesirable effects, including the formation of dimers and nonspecific reactions. Dimers are uncontrolled amplification products that can form when incorrectly selected primers are used. It was important to make sure that the primers did not form dimers with each other, which could lead to an uncontrolled increase in the background signal.

In order to increase the reliability of *Str. suis* identification, studies were conducted to optimize the reaction protocol and ensure the optimal annealing temperature. This allowed to ensure high specificity and efficiency of the PCR reaction in the diagnosis of *Str. suis* and make it a reliable tool for research and diagnosis of this microorganism.

In the process of developing the diagnostic methodology, great attention was paid to the selection of primers with the optimal annealing temperature, ensuring the same annealing temperature for all primers used. This was an important component to achieve efficient amplification of target DNA fragments. Particular attention was paid to avoiding undesirable results when using primers in reactions, and this was achieved by analyzing the possible formation of dimers and nonspecific reactions.

The in-laboratory validation of the *Str. suis* diagnostic method included the evaluation of several key parameters confirming the reliability and efficiency of the method. The analytical sensitivity of the method was determined by performing the analysis at low concentrations of the target genome. This allowed us to set the limit of detection of the method and make sure that it is able to reliably detect even a minimal amount of target DNA. The specificity of the methodology was tested by examining the absence of positive reactions when the methodology was applied to samples that did not contain target DNA. The convergence of the results was assessed by comparing the results of the same reaction performed under different conditions. This indicates the stability and repeatability of the method.

The high convergence of the research results is confirmed by the strikingly low coefficient of variation, which was only 1,30 %. This value was lower than the accepted standard for this method, which is $CV \leq 2,28$. This is an extremely important result, which indicates the stability and repeatability of the results obtained when applying the developed methodology.

The low level of coefficient of variation indicates the high accuracy and reliability of the methodology for the diagnosis of *Str. suis*. This is important in the context of microbiological research, as high accuracy allows for consistent and reliable results, which are important for the diagnosis and control of this pathogen.

In the course of our study, we analyzed in detail the EF protein, which serves as a virulence marker, as well as the *epf* gene, which is a tool for assessing the virulence properties of isolates. In addition, we analyzed the presence of *mrp* protein genes. The variants of virulent strains include 136 kDa muramidase-releasing protein (MRP+) and 110 kDa extracellular protein antigen (EF+). Low virulence strains, on the other hand, produce MRP and EF proteins (MRP+EF+), and non-virulent strains do not synthesize these proteins (MRP-EF-). In our research, we examined MRP, EF, and EF+ proteins and found that their N-terminal regions are identical. However, the C-terminal fragment of the EF+ protein contained several tandem amino acid repeats that were absent in the smaller EF proteins. According to the phenotypic division, *Str. suis* type 1 strains and

isolates were divided into two groups: MRP+EF+ and MRP-EF-. Isolates of the MRP+EF+ phenotype were characterized by the production of a smaller MRP protein (approximately 120 kDa) and 110 kDa EF protein, and they were highly virulent to piglets.

In above mentioned material, it is worth noting the importance of an integrated approach to the control and prevention of streptococcal infection. Scientifically based strategies developed on the basis of in-depth analysis of epizootic dynamics and risk factors play a key role in ensuring animal health and effective management of this serious problem in agricultural production.

To fulfill the tasks of the dissertation, epizootic studies were conducted (epizootic survey of 5 farms and observation of them); bacteriological studies - according to approved methods and standards (culture-morphological, enzymatic, antigenic properties of isolates of bacteria of streptococcosis of pigs); sensitivity to antibiotics by the method of diffusion into agar using disks containing antibiotics - according to TC 9398-001-39484474-2000 and the method of serial dilutions; molecular genetic (PCR) and statistical processing of research results.

The scientific novelty of the dissertation is, that for the first time in the country the current epizootic situation of streptococcosis in pigs in Ukraine was investigated and the etiological structure of the disease of animals of this species was found out, the sensitivity of *Str. suis* sensitivity to antibiotics, antigenic and immunogenic properties of *Str. suis*, molecular genetic studies on the gene of the main protective protein were tested, PCR protocols with electrophoretic detection of research results and real-time detection of results were optimized and tested.

Practical significance of the results: the prevalence of streptococcosis among pigs in different regions of Ukraine, the ratio of different pathogenic and non-pathogenic streptococci of *Str. suis* in the etiological structure of streptococcosis in animals of this species, and optimized PCR protocols with electrophoretic detection of research results and real-time detection of results were determined.

Based on the results of the research, “Methodological recommendations for the typing of the pathogen of swine streptococcosis by polymerase chain reaction” were developed for veterinarians of pig farms, specialists of regional state laboratories of veterinary medicine, scientists, graduate students, teachers of higher education institutions in the specialty 211 – “Veterinary Medicine”.

Key words: epizootological monitoring, *Streptococcus suis*, microorganisms, porcine streptococcosis, polymerase chain reaction, antimicrobial resistance, antibacterial drugs, antibiotics, antigen, serum, enzyme-linked immunosorbent assay, bacteriological examination.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Савченко М.О., Корнієнко Л.Є., Тарасов О.А., Довгаль О.В., Білик С.А., Довгенко В.В., Царенко Т.М. Мікробіологічна характеристика та антибіотикорезистентність польових ізолятів *Streptococcus suis*. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2022. Вип. 1. С. 72–80. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-72-80> (здобувач провів мікробіологічні дослідження з вивчення *Streptococcus suis*).

2. Тарасов О. А., Гудзь Н. В., Савченко М. О. Вивчення біологічних властивостей збудника стрептококозів свиней в Україні. Ветеринарна біотехнологія. 2021. Вип. 38. С. 155–165. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-13 (дисертант брав участь у проведенні морфологічних і культуральних досліджень, формулюванні висновків та написанні статті).

3. Тарасов О. А., Терещенко С. М., Савченко М. О. Вивчення особливостей поверхневих антигенів збудника стрептококозу свиней (*Str. suis*) за культивування *in vitro*. Ветеринарна біотехнологія. 2020. Вип. 36. С. 166–175. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech36-17 (здобувач вивчив особливості

антигенного складу *Streptococcus suis*, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

4. Тарасов О. А., Захарова О. М., Гудзь Н. В., Савченко М. О. Поширення серотипів *Streptococcus suis* на території України. Ветеринарна біотехнологія. 2021. Вип. 39. С. 117–127. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-11 (дисертант брав безпосередню участь у проведенні епізоотологічного моніторингу поширення *Streptococcus suis* та підготував статтю до друку.).

5. Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М., Білик С. А., Савченко М. О. Антибіотикорезистентність збудників стрептококозу поросят і телят. Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32. С. 377–386. Doi: [https://doi.org/10.31073/vet_biotech32\(1\)-50](https://doi.org/10.31073/vet_biotech32(1)-50) (здобувач брав безпосередню участь у вивченні антибіотикорезистентності збудників стрептококозу та підготував статтю до друку).

6. Савченко М. О., Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М. Стрептококова інфекція свиней, актуальні проблеми утворення антибіотикорезистентності (Оглядова стаття). Науковий вісник ветеринарної медицини. 2017. Вип. 1. С. 5–15 (дисертант брав безпосередню участь у аналізі наукової літератури, узагальненні результатів та написанні статті).

**Статті в наукових фахових виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних
Scopus та/або Web of Science Core Collection**

7. Savcheniuk M. O., Tarasov O. A., Zakharova O. M., Korniienko L. Y., Zotsenko V. M., Tsarenko T. M. Detection of *Streptococcus suis* using the optimized real-time polymerase chain reaction protocol. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 13(2). 2022. P. 168–173. Doi: <https://doi.org/10.15421/022221> (Scopus) (здобувач брав безпосередню участь в оптимізації протоколу проведення ПРЛ-РЧ та підготував матеріали до друку).

Матеріали науково-практичних конференцій:

8. **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є., Зоценко В. М., Тарасов О. А. Моніторинг поширення *Streptococcus suis* у свинарських господарствах. *Біобезпека, захист та благополуччя тварин: матеріали міжнародної науково-практичної конференції*. Київ, 2022. С. 127–130 (здобувач виконав збір даних та провів епізоотологічний моніторинг поширення *Streptococcus suis* на свинофермах України).

9. **Савченко М. О.,** Білик С. А., Довгаль О. В., Царенко Т. М. Дослідження польових ізолятів *Streptococcus suis*. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини, ПНУ, 12–13 жовтня 2022 р. Житомир, 2022. С. 273–274 (здобувач організував проведення дослідів, провів дослідження культуральних властивостей *Streptococcus suis*).*

10. **Савченко М. О.,** Довгаль О. В., Довгенко В. В. Вивчення біологічних властивостей місцевих ізолятів *Streptococcus suis*. *Аграрна освіта і наука: досягнення, роль, фактори росту: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, БНАУ, 21 жовтня 2021 р. Біла Церква, 2021. С. 33–35 (здобувач організував проведення дослідів, щодо локалізації *Streptococcus suis* в тканинах організму свиней).*

11. **Савченко М. О.,** Білик С. А., Новік О. В. Особливості поверхневих антигенів *Streptococcus suis* за культивування *in vitro*. *Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, БНАУ, 30 жовтня 2020 р. Біла Церква, 2020. С. 53–55 (здобувач організував проведення дослідів, було вивчено особливості антигенного складу *Streptococcus suis*).*

12. **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є. Бактеріологічні дослідження за стрептококозу у поросят. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, ІВМ НААН, 19 липня 2018 р. Київ, 2018. С. 82–83*

(здобувач провів відбір досліджуваних проб від молодняку поросят у різних господарствах України, а також виділив із них чисту культуру *Streptococcus suis*, кількість друкованих аркушів).

13. **Савченко М. О.**, Корнієнко Л. Є. Антибіотикорезистентність *Streptococcus suis*: сучасні проблеми та епізоотична ситуація. *Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів, БНАУ, 18 та 23 травня 2017 р. Біла Церква, 2017. С. 59–60 (здобувач провів аналіз щодо антибіотикорезистентності *Streptococcus suis*).

14. **Савченко М. О.**, Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М. Основні фактори вірулентності *Streptococcus suis*. *Ветеринарне забезпечення інтенсивних технологій у тваринництві, безпека та якість харчових продуктів*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, БНАУ, 23 листопада 2017 р. Біла Церква, 2017 (здобувач провів дослідження факторів вірулентності *Streptococcus suis*).

15. **Савченко М. О.** Стрептококова інфекція свиней, актуальні проблеми антибіотикорезистентності. *Актуальні проблеми ветеринарної біртехнології та інфекційної патології тварин*: матеріали щорічної науково-практичної конференції молодих вчених, ІВМ НААН, 22 червня 2017 р. Київ, 2017. С. 77–79 (здобувач провів аналіз проблематики антибіотикорезистентності за стрептококозу у свиней).

Методичні рекомендації

16. Тарасов О. А., Захарова О. М., **Савченко М. О.**, Корнієнко Л. Є. Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції. К., ІВМ НААН, 2021. 22 с. (дисертант є автором ідеї, яка покладена в основу розробки, а також брав безпосередню участь у проведенні досліджень, підготовці та написанні рекомендацій).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	33
1.1. Епізоотологічні особливості поширення стрептококозу поросят	33
1.2. Характеристика <i>Streptococcus suis</i>	34
1.3. Актуальність проблеми стрептококозу поросят та формування у бактерій антибіотикорезистентності	38
1.4. Методи визначення чутливості бактерій до АМП	45
1.5. Застосування методу ПЛР за діагностики <i>Streptococcus suis</i> та визначення його генотипу	55
1.6. Висновки з розділу огляд літератури	56
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	57
2.1. Епізоотологічні методи дослідження.....	58
2.2. Штами мікроорганізмів	58
2.3. Культивування мікроорганізмів	59
2.4. Ідентифікація чистих культур виділених мікроорганізмів	59
2.5. Оцінка активності антибіотичних субстанцій	61
2.6. Нуклеотидні послідовності	63
2.7. Проведення класичного варіанта ПЛР з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації	66
2.8. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР	68
2.9. Проведення ПЛР у реальному часі	69
2.10. Валідація методу ПЛР	69
2.11. Приготування цілюноклітинного антигена	71
2.12. Електрофорез білків у денатуруючих умовах	71
2.13. Імуноферментний аналіз (ІФА)	72
2.14. Отримання гіперімунної сироватки	72

	21
2.15. Статистичні методи.....	73
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	74
3.1. Вивчення епізоотичних особливостей та біологічних властивостей <i>Streptococcus suis</i>	74
3.2. Виділення чистих культур та дослідження морфологічних, культуральних та ферментативних властивостей ізолятів <i>Streptococcus suis</i>	83
3.3. Вивчення чутливості отриманих ізолятів збудника стрептококозу до антимікробних речовин	87
3.4. Вивчення молекулярно-генетичних властивостей <i>Streptococcus suis</i>	93
3.5. Виявлення <i>Streptococcus suis</i> за допомогою оптимізованого протоколу ПЛР у реальному часі	99
3.6. Дослідження особливостей поверхневих антигенів збудника стрептококозу поросят під час культивування <i>in vitro</i>	107
3.7. Вивчення антигенної спорідненості ізолятів <i>Streptococcus suis</i>	110
3.8. Висновки з розділу результати власних досліджень.....	117
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ ..	118
ВИСНОВКИ	134
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	138
ДОДАТКИ	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ І СКОРОЧЕНЬ

АМП	– антимікробний препарат
ДНДІЛДВСЕ	– Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи
БНАУ	– Білоцерківський національний аграрний університет
ДНКІБШМ	– Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ІВМ НААН	– Інститут ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук
ІФА	– імуноферментний аналіз
кДНК	– комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
мкл	– мікролітр
НВІ	– Національний ветеринарний інститут
НКЗ	– негативний контрольний зразок
нм	– нанометр
п.н.	– пар нуклеотидів
ПКЗ	– позитивний контрольний зразок
ПЛР–РЧ	– полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу
РНК	– рибонуклеїнова кислота
М	– середнє вибірки
m	– стандартне відхилення середнього результату
П	– помірно чутливий до антибіотиків штам
Р	– резистентний до антибіотиків штам
Ч	– чутливий до антибіотиків штам
t	– критерій Стьюдента

р	– достовірна вірогідність
ЗФР	– забуферений фізіологічний розчин
АБС	– антибіотична субстанція
МПА	– м'ясо-пептонний агар
МПАХ	– м'ясо-пептонний агар Хотінгера
МПБ	– м'ясо-пептонний бульйон
МПБХ	– м'ясо-пептонний бульйон Хотінгера
МППБ	– м'ясо-пептонний печінковий бульйон
МПК	– мінімальна пригнічуюча концентрація
МІК	– мінімальна інгібуюча концентрація
LOD	– межа виявлення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Антибіотикорезистентність *Str. suis* є досить поширеною проблемою, що виникла в результаті неконтрольованого використання антибактеріальних препаратів для лікування інфекційних захворювань. Цей фактор сприяє селекції та поширенню штамів бактерій, які стали стійкими до антибіотиків, що призводить до відсутності терапевтичного ефекту від лікування [117].

Раціональне використання антимікробних препаратів у ветеринарії та гуманній медицині має велике значення для збереження їхньої ефективності. Недбале використання цих препаратів може зумовити розвиток антибіотикорезистентності та поширення стійких штамів бактерій [148].

Проблеми патогенності, вірулентності та мінливості мікроорганізмів, особливо стрептококів, є складними для медичної та ветеринарної мікробіології. Особливий інтерес становлять умовно-патогенні бактерії, які мають кілька факторів патогенності й можуть спричиняти інфекції за відсутності нозологічної специфічності [101].

Str. suis є причиною значних економічних утрат у тваринництві та становить загрозу для здоров'я людини, оскільки викликає широкий спектр захворювань у свиней, включаючи безсимптомне носійство, клінічну інфекцію та раптову смерть. *Str. suis* належить до родини грампозитивних коків роду *Streptococcus*. Швидка адаптація й еволюція бактерій зумовлюють появу нових механізмів, які забезпечують стійкість до антибіотиків. Це становить серйозну загрозу для ефективності лікування інфекційних хвороб як у ветеринарії, так і в гуманній медицині. Особливо це стосується *Str. suis*, який завдає значних економічних збитків у свинарстві та загрожує здоров'ю людей [4, 12, 41].

Нераціональне використання антибіотиків, зокрема як стимуляторів росту, спричинює появу штамів мікроорганізмів, стійких до різних класів антибактеріальних речовин. Часто антибіотики застосовують у неточних дозах, порушуються терміни їх застосування, а також неправильно підбираються

препарати. Хвороби, зокрема інфекційні захворювання, виникають не лише внаслідок зараження мікроорганізмами, але й через порушення умов утримання тварин та неправильну або незбалансовану годівлю [59, 65].

На сьогодні відсутні ефективні вакцини проти *Str. suis* через його антигенні варіації. Сучасні вакцини забезпечують лише частковий та специфічний захист. Оскільки ефективних вакцин не існує, протимікробні препарати все частіше використовують для лікування та контролю інфекції. Стійкість штамів *Str. suis* до антибіотиків науковці різних країн досліджували з використанням бета-лактамів, тетрациклінів, сульфаніламідів та макролідів, які часто застосовують для профілактики та лікування стрептококових інфекцій у свиней. При цьому виявляли різні рівні стійкості до протимікробних препаратів. Зокрема, ізольовані штами цього мікроорганізму, отримані від заражених або клінічно здорових свиней, усе частіше проявляють стійкість до використовуваних антимікробних препаратів. Безладне використання антибіотиків призводить до появи резистентності *Str. suis* до цих препаратів у всьому світі. Дослідження поширеності й антимікробної чутливості *Str. suis*, проведені на клінічно здорових та хворих свинях, мають важливе значення для боротьби зі спалахами цієї інфекції та дозволяють виявити ефективні протимікробні препарати й резистентні штами мікроорганізму. Результати таких досліджень допомагають визначити оптимальну схему лікування й контролю інфекції, викликані *Str. suis* у свиней [59, 86, 104].

За даними ВООЗ, *Streptococcus suis* є збудником стрептококозу – одного з найпоширеніших зоонозних захворювань серед працівників свинарства. Ця інфекція становить серйозну проблему, що супроводжується значними економічними втратами для тваринницьких господарств і зумовлює зростання кількості випадків захворювання та спалахів цієї хвороби в багатьох країнах світу, включаючи Україну. Інфекційні хвороби у тварин становлять значну частку серед усіх захворювань. У свинарстві особливої уваги заслуговує *Str. suis*, який не лише може інфікувати людей, але й викликає такі захворювання, як артрит, ендометрит,

менінгіт, сепсис та пневмонію в молодняку, а також може призводити до системних інфекцій, зокрема до маститу та ендометриту в дорослих тварин. Поросята можуть заражатися не тільки внаслідок контакту із хворими свиньми, але й здоровими, які є носіями, оскільки збудник може перебувати безсимптомно на мигдаликах тварин. Люди можуть заражатися через контакт із хворими свиньми або споживання контамінованого м'яса. *Str. suis* є широко розповсюдженим у всьому світі. Наразі відомо близько 35 типів цього збудника, але другий тип вважається найбільш патогенним [41, 86, 88].

Виявлення раптових спалахів стрептококозу у всіх групах відлучених поросят, підсвинків та тих, що на відгодівлі, свідчить про проблемний стан стрептококової інфекції у свинарстві. *Str. suis* є найбільш поширеним у місцях, де вирощують свиней. Незалежно від типу ферми (традиційної або великотоварної), цей збудник зумовлює значні економічні збитки, переважно через втрату тварин. Носійство *Str. suis* в підсвинків може досягати майже 100 % протягом двох-трьох тижнів після їх відлучення від свиноматки. Захворюваність у цих випадках становить від 60 % до 75 %, а летальність може досягати 65 % [4, 6, 133].

Швидка адаптація й еволюція бактерій спричиняють появу нових механізмів стійкості до антибіотиків, що ставить під загрозу ефективність лікування інфекційних захворювань як у ветеринарній, так і в гуманній медицині. Стійкість мікроорганізмів до антибіотиків є серйозною проблемою, яку необхідно негайно вирішувати, оскільки вона зумовлює значні економічні збитки у тваринництві та становить загрозу для здоров'я людей. Молодняк сільськогосподарських тварин може заражатися стрептококозом як у неонатальному періоді розвитку, так і в утробі матері [29, 30, 117].

З огляду на вищезазначене, боротьба із *Str. suis* і його стійкістю до антибіотиків є надзвичайно важливою проблемою галузі свинарства.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота виконувалась у межах програми з підготовки доктора філософії та є складовою науково-дослідної роботи "Вивчення ролі умовно

патогенних мікроорганізмів в етіології та патогенезі хвороб тварин” №0121U110291 та “Молекулярна діагностика та генотипування збудників інфекційних хвороб тварин” №0121U110290, у яких дисертант був виконавцем підрозділів.

Мета і завдання дослідження. Метою досліджень було провести епізоотичний моніторинг спалахів стрептококозу свиней в Україні, вивчити культуральні, молекулярно–генетичні властивості, а також особливості антигенного складу *Str. suis* за його культивування в різних живильних середовищах, дослідити чутливість *Str. suis* до антибіотиків та теоретично обґрунтувати й удосконалити методи діагностики стрептококозу та запропонувати нові засоби та схеми діагностики та специфічної імунопрофілактики стрептококозу свиней.

Метою проведених досліджень було розширення знань про епізоотичну ситуацію стрептококозу свиней в Україні. Вони включали в себе такі **завдання**:

1. встановити поширеність та етіологічної структури стрептококозу свиней, яке передбачало відбір проб у різних господарствах та лабораторне дослідження їх з метою визначення рівня розповсюдженості захворювання та визначення видів і штамів *Streptococcus suis*, що циркулюють у популяції свиней;

2. вивчити культуральні і молекулярно-генетичні властивості *Str. suis*, яке включало детальний аналіз культур збудників, їх морфологію, фізіологічні властивості та генетичний склад, задля отримання додаткової інформації про цей патоген;

3. встановити особливості антигенного складу *Str. suis* за культивування в різних живильних середовищах з метою виявлення можливих відмінностей у їхньому антигенному складі;

4. визначити чутливість *Streptococcus suis* до антимікробних препаратів, яке включало тестування культур на їхню чутливість до різних антибіотиків.

З метою покращення методів діагностики та специфічної профілактики стрептококозу свиней необхідно було провести теоретичне обґрунтування та

вдосконалення уже існуючих методів. Головним завданням дослідження була розробка ефективної схеми контролю та запобігання поширенню цієї інфекції.

Для досягнення цих цілей можуть бути реалізовані наступні кроки:

1. покращення методів діагностики:

- пошук нових маркерів або антигенів, що дозволять точно й швидко ідентифікувати *Str. suis* у свиней;
- оцінка чутливості та специфічності існуючих методів діагностики й вибір найефективніших із них для раннього виявлення інфекції;
- використання молекулярних методів, таких, як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та імунологічні тести для швидкого й точного виявлення *Str. suis* у свиней.

2. Розробка схеми специфічної профілактики:

- дослідження та ідентифікація штамів *Str. suis*, що циркулюють серед свиней, для розробки ефективних вакцин та засобів імунопрофілактики;
- оцінка ефективності існуючих вакцин проти стрептококозу та визначення їхнього потенціалу щодо запобігання захворюванню та зменшенню його впливу на галузь свинарства;
- впровадження схеми вакцинації та імунопрофілактики, які враховують особливості стрептококозу у свиней, зокрема таких, як розповсюдженість штамів, імунна відповідь свиней та співвідношення з іншими захворюваннями.

Об'єкт дослідження – *Str. suis*, стрептококоз свиней, епізоотичний моніторинг, культуральні та ферментативні властивості ізолятів стрептококів, методи діагностики.

Предмет дослідження – особливості епізоотичного процесу, культурально-морфологічні, молекулярно-генетичні, антигенні властивості ізолятів бактерій *Str. suis* від свиней та їхня чутливість до антибіотиків, праймери та ПЛР, системи діагностики стрептококозу у свиней.

Методи дослідження. Епізоотологічні – епізоотологічне обстеження 5-ти господарств та спостереження за ними; бактеріологічні – проводили згідно із

затвердженими методиками та стандартами (культурально-морфологічні, ферментативні, антигенні властивості ізолятів бактерій *Str. suis*), визначення чутливості до антибіотиків (метод дифузії в агар із застосуванням дисків, що містять антибіотики, – згідно з ТУ 9398–001–39484474–2000 та методом послідовних розведень); молекулярно-генетичні (ПЛР); статистичні (обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Вивчено сучасну епізоотичну ситуацію щодо захворювання свиней на стрептококоз в Україні та з'ясовано етіологічну структуру захворювання тварин цього виду. Досліджено чутливість *Str. suis* до антибіотиків. Апробовано молекулярно-генетичні дослідження за геном основного протективного білка. Вивчено антигенні та імуногенні властивості *Str. suis*. Оптимізовано й апробовано протоколи проведення ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та детекцією результатів у реальному часі.

Отримані результати досліджень мають значну наукову новизну і є внеском у подальший розвиток знань про стрептококоз у свиней. Нижче наведено основні досягнення:

1. епізоотична ситуація: виконано детальний аналіз сучасної епізоотичної ситуації щодо стрептококозу у свиней в Україні. Отримані дані дозволяють зрозуміти поширення захворювання та його вплив на галузь свинарства;

2. етіологічна структура: встановлено етіологічну структуру захворювання тварин, зокрема, виявлено вид *Str. suis* як головного збудника стрептококозу у свиней;

3. чутливість до антибіотиків: оцінено чутливість *Str. suis* до антибіотиків, що дозволяє визначити найефективніші препарати для лікування та контролю захворювання;

4. молекулярно-генетичні дослідження: проведено апробацію молекулярно-генетичних методів досліджень, зокрема, застосування геному основного протективного білка для аналізу штамів *Str. suis*;

5. полімеразна ланцюгова реакція: оптимізовано та апробовано протоколи ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та детекцією результатів у реальному часі, що дозволяє швидко та точно виявляти наявність *Str. suis* у свиней;

6. антигенні та імуногенні властивості: вивчено антигенні та імуногенні властивості *Str. suis*, що сприяє розумінню інтеракції між збудником та імунною системою свиней.

Отримані наукові результати є основою для подальших досліджень та впровадження вдосконалених нами методів діагностики і профілактики стрептококозу у свиней. Відповідно до цих результатів нами розроблені рекомендації для свиноферм, ветеринарних лікарів, науково-дослідних лабораторій та інших зацікавлених сторін з метою ідентифікації *Str. suis*, запобігання поширенню стрептококозу та зменшення його негативного впливу на галузь свинарства (Тарасов О. А., Захарова О. М., Савченко М. О., Корнієнко Л. Є. Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції. – К., ІВМ НААН, 2021. – 22 с.).

Практичне значення одержаних результатів полягає у визначенні поширеності стрептококозу серед поголів'я свиней у різних регіонах України, співвідношення патогенних і непатогенних стрептококів виду *Str. suis* в етіологічній структурі стрептококозу тварин цього виду, а також оптимізовано протоколи проведення ПЛР з електрофоретичною детекцією результатів досліджень та детекцією результатів у реальному часі. Результати досліджень використано при підготовці й написанні “Методичних рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції” (розглянуті і схвалені Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 9 від 16.09.2021 р.).

Одержані результати досліджень мають таке практичне значення для свинарського господарства та ветеринарної медицини:

1. знання про розповсюдження стрептококозу серед поголів'я свиней у різних регіонах дозволить управляти епізоотичною ситуацією та здійснювати необхідні заходи для запобігання поширенню захворювання;

2. оптимізовані протоколи ПЛР з детекцією результатів досліджень у реальному часі дозволять швидко й точно визначати наявність *Str. suis*, а також ідентифікувати конкретний штам збудника, що сприятиме ранній діагностиці захворювання та прийняттю необхідних заходів для його контролю;

3. результати досліджень щодо антигенних та імуногенних властивостей *Str. suis* стануть основою для розробки ефективних вакцин проти стрептококозу у свиней. Це дозволить знизити захворюваність та загибель серед тварин і забезпечить підвищення загального здоров'я поголів'я;

4. отримані результати використані при створенні нами методичних рекомендацій щодо типізації збудника стрептококозу свиней покращать ідентифікацію *Str. suis* (додаток Б).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно виконано весь обсяг експериментальних досліджень, проведено статистичне оброблення одержаних результатів, їх аналіз та узагальнення.

Епізоотологічні, бактеріологічні, імунологічні та молекулярно-генетичні дослідження виконані в лабораторії “Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин” Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України та в науково-дослідній лабораторії новітніх методів (ІФА та ПЛР) Білоцерківського національного аграрного університету.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися і були схвалені на міжнародних, державних наукових і науково-практичних конференціях: Актуальні проблеми ветеринарної біртехнології та інфекційної патології тварин (Київ, 22 червня 2017 р.); Ветеринарне забезпечення інтенсивних технологій у тваринництві, безпека та якість харчових продуктів (Біла Церква, 23 листопада 2017 р.); Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті (Біла Церква, 18 та 23 травня 2017 р.); Актуальні

проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин (Київ, 19 липня 2018 р.); Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини (Біла Церква, 30 жовтня 2020 р.); «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 21 жовтня 2021 р.); Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти (Житомир, 12–13 жовтня 2022 р.); Біобезпека, захист та благополуччя тварин (Київ, 2022 р.).

Розроблені методичні рекомендації: “Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції”.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, зокрема 1 у виданні, включеному в міжнародну наукометричну базу даних Scopus та 6 – у виданнях, що належать до переліку наукових видань України: науковому віснику ветеринарної медицини Білоцерківського національного аграрного університету (2) та у науковому бюлетні Ветеринарна біотехнологія (4), матеріалах і тезах конференції (8), науково-методичні рекомендації: “Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції” (1).

Структура та обсяг дисертації. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і 8 додатків. Дисертацію викладено на 172 сторінках комп’ютерного тексту, ілюстровано 29 таблицями та 12 рисунками. Список використаних джерел містить 171 найменування, у тому числі 142 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Інфекційні захворювання тварин у сучасному світі є серйозною проблемою, яка призводить до значних економічних утрат у галузі тваринництва, у тому числі й в Україні. Один із поширених мікроорганізмів у свинарстві – *Str. suis*. Цей бактеріальний патоген здатний не лише передаватися від тварини до людини, а й викликає такі захворювання, як артрит, ендометрит, менінгіт, сепсис, пневмонія та системні інфекції, а також мастити та ендометрити в дорослих свиней [17, 18].

Поширення *Str. suis* можливе не тільки через контакт із хворими тваринами, але й через здорових носіїв, оскільки цей патоген може перебувати на мигдаликах без видимих симптомів захворювання. Люди також можуть заразитися через контакт із хворими тваринами або через споживання контамінованого м'яса [18, 23].

З огляду на важливість стрептококозу свиней і його наслідки як для тварин, так і для людей, проведені дослідження з епізоотичної ситуації та характеристики цього захворювання в Україні мають практичне значення, зокрема для розробки та вдосконалення протоколів його діагностики, контролю та профілактики [18, 24].

1.1. Епізоотологічні особливості поширення стрептококозу поросят

Str. suis виділяють у значній кількості господарств, проте захворювання тварин проявляється лише в деяких із них. Це пов'язано з порушенням рівноваги в середовищі, де вирощують тварин, а також з ослабленням їх загальної резистентності. В інфікованих *Str. suis* типу 2 стадах спалахам захворювання часто передують стрес, неправильне обрізання іклів, шорстка поверхня підлоги, на якій перебувають поросята, слабка молочність свиноматки і пов'язана з цим боротьба сисунів за місце біля молочної залози, скупченість тварин у станках, регулярні переміщення і змішування різних груп свиней, порушення принципу

“порожньо-зайнято”, поява у стаді вірусу репродуктивно-респіраторний синдром свиней (PPCS), замалий об’єм приміщення для свиней (у період відлучення на одного підсвинка має припадати щонайменше 0,8 м²), погана система вентиляції та висока вологість, необґрунтована або різка зміна корму, нестача вітаміну Е та такого мінералу як селен [6, 17, 29, 105].

1.2. Характеристика *Streptococcus suis*

Str. suis є грампозитивним, факультативно анаеробним коком, що викликає широкий спектр клінічних симптомів у свиней та інших домашніх тварин. Хвороби, спричинені *Str. suis*, поширені у світі, особливо в країнах з інтенсивним свинарством. У свиней симптоми захворювань, пов’язаних із *Str. suis*, включають артрит, менінгіт, пневмонію, септицемію, ендокардит, полісерозит, аборти та абсцеси. У людей, особливо при контакті зі свиньми або при споживанні забрудненого м’яса, *Str. suis* типу 2 може викликати такі серйозні захворювання, як менінгіт, септицемія, ендокардит та навіть смерть. Патогенез та механізм дії *Str. suis* ще недостатньо вивчені, хоча було ідентифіковано деякі фактори вірулентності. Контроль за інфекцією, спричиненою *Str. suis*, в основному зводиться до використання антибіотиків, оскільки ефективна імунопрофілактика досі не розроблена [1, 4, 10, 85].

Str. suis належить до роду *Streptococcus* і є грампозитивним коком. Ці мікроорганізми є нерухомими й не утворюють спор, але в мазках із патологічного матеріалу оточені капсулою. *Str. suis* погано культивуються на стандартних живильних середовищах. Класифікація *Str. suis* базується на його антигенній структурі, що дозволяє поділити його на серологічні групи [9, 19, 91].

Усі представники серологічних груп *Str. suis* мають різні полісахаридні антигени, але кожна група містить однаковий антиген. Зокрема, серед основних антигенів у стрептококах варто виділити М-субстанцію, що є типовим протеїном і відповідає за вірулентність та імуногенність збудника [8, 77, 90].

На сьогодні виявлено 35 різних капсулярних серотипів *Str. suis*. Цей мікроорганізм може колонізувати мигдалики як у хворих, так і здорових тварин,

що сприяє поширенню збудника серед поголів'я через субклінічний перебіг захворювання [5, 14, 41, 56].

Str. suis належить до нормальної бактеріальної флори свиней і стає причиною захворювання лише за певних порушень в утриманні, годівлі тварин, а також при стресах та зниженні резистентності організму. Тому він є умовно-патогенним збудником, що може спричинити захворювання в іншого “господаря”, якщо потрапить до його організму [10, 27, 39]. Частота випадків стрептококозу у свинарських господарствах зростає і робить це захворювання серйозною проблемою сучасної галузі свинарства, особливо в умовах зростаючої резистентності *Str. suis* до антибіотиків [5, 11, 16]. Термін “антимікробні препарати” (АМП) включає в себе всі речовини, які мають згубну дію на мікроорганізми і переважно призначаються системно, незалежно від їхнього природного, напівсинтетичного або синтетичного походження. Антибіотикорезистентність (АР) відображає біологічні властивості збудника, проте може бути пов'язана також з іншими факторами нераціонального використання АМП [13, 19, 31].

Спалах цієї інфекції може впливати на молодняк усіх видів тварин, починаючи з перших днів життя, але найбільш чутливими вони у віці від 15-ти днів до 3-х місяців [6, 22, 25]. *Str. suis* може виділятися в навколишнє середовище через уражені органи, зокрема статеві, або через молоко за маститу. У деяких господарствах захворюваність новонароджених поросят під час масових опоросів може сягати 50–60 %, а смертність становити 60–65 %. Захворювання починається з поодиноких випадків, зазвичай серед поросят, отриманих від свиноматок першого опоросу [29, 33, 92].

Ця інфекція спричинює народження відсталих у розвитку поросят, у яких, зокрема, слабо розвинені внутрішні органи та слабка стійкість організму до збудників хвороб. Нестача вітамінів і мінералів у раціоні свиноматок також може сприяти народженню таких поросят [70, 131]. У них погано формується колостральний імунітет, тому вони є особливо уразливими до стрептококової

інфекції, яка може потрапляти в їхній організм із зовнішнього середовища або з молоком матері. Поросята найчастіше хворіють на *Str. suis* після опоросу синоматок [6, 18, 22].

Збудник *Str. suis* може міститися на мигдаликах протягом тривалого часу. Із кровотоком він може потрапити до будь-якого органа, тому клінічні прояви захворювання залежать від ураженого органа. Інкубаційний період триває 1–3 доби. Перебіг захворювання може бути миттєвим, гострим, підгострим або хронічним і, залежно від ураженого органа, мати різні форми, такі, як септична, септико-токсична, легенева, суглобова, кишкова та змішана [22, 34, 36].

Діагноз на стрептококоз вважають підтвердженим у разі одержання одного з таких результатів: виділення типових культур із патологічного матеріалу та визначення їх патогенних властивостей; смерть однієї з трьох лабораторних тварин, що були інфіковані суспензією з відібраного патологічного матеріалу, з подальшим виділенням збудника захворювання з відповідними характеристиками. Диференційний діагноз проводять із сальмонельозом, колибактеріозом, анаеробною ентеротоксемією. Постановка точного діагнозу й визначення форми захворювання є важливими для вибору оптимального лікування та контролю над поширенням інфекції [62, 65, 82].

Стрептококовій інфекції легше запобігти, ніж лікувати, тому своєчасне лікування та дотримання санітарних і ветеринарно-санітарних умов утримання молодняку сприяє боротьбі з цією інфекцією. Найбільш небезпечними є *Str. suis*, які належать до серотипу 2 і становлять приблизно 80 % усіх ізольованих штамів, інші ж серотипи, зокрема серотипи 1, 4 і 14, складають лише 20 %. Захворюваність свиней на стрептококоз не тільки спричиняє прямі збитки, але й сприяє поширенню вірусних інфекцій, таких, як репродуктивно-респіраторний синдром свиней. На фермах, де є стрептококова інфекція, РРСС виявляють у 70 % випадків. Молекулярні дослідження вказують на наявність різних генотипів другого типу у складі кожного серотипу свинячого стрептокока [58, 99, 107, 119]. У неблагополучних господарствах можуть виділятися як патогенні, так і

непатогенні штами *Str. suis*. Під час епідемічних спалахів хвороби може спостерігатися виділення обох видів штамів від однієї тварини, що ускладнює діагностику та імунопрофілактику [29, 40, 44].

Захворювання свиней на стрептококоз має серйозні економічні наслідки, тому необхідні нові підходи для боротьби з цією хворобою. Для ефективного контролю й запобігання цього захворювання важливо володіти актуальними даними про принципи її подолання. Крім економічного аспекту, вирішення проблеми стрептококозів має й соціальне значення. Горизонтальний генетичний обмін між стрептококовими штамми може зумовлювати появу нових штамів, що мають нові патогенні властивості, які можуть бути небезпечними для людей. Ці штами також можуть бути складними для лікування антибіотиками [57, 75, 127].

Для ефективного контролю над стрептококозом у свиней доцільно дотримуватися таких заходів:

- забезпечувати гігієнічні умови утримання свиней, які включають чистоту приміщень, регулярне прибирання та дезінфекцію;
- проводити профілактичні заходи, такі, як вакцинація свиней проти стрептококозу. Вакцини можуть знизити ризик зараження та тяжкість перебігу захворювання;
- дотримуватися суворого контролю за ввезенням нових тварин на ферму, а також проводити ретельний моніторинг і тестування свиней перед введенням у стадо;
- поліпшувати харчування та забезпечувати раціон свиноматок оптимальним рівнем вітамінів і мінералів, які підтримують імунітет;
- раціонально застосовувати антибіотики [39, 97, 119, 127].

Для успішного подолання стрептококозу свиней необхідно шукати нові та покращувати існуючі заходи з боротьби й профілактики та методи його діагностики. Важливим завданням є також глибокий аналіз популяційних змін у збудника стрептококозу за допомогою молекулярно-генетичних методів. Це

дозволить обґрунтованіше підходити до відбору штамів для виготовлення вакцин та прогнозування змін їхніх біологічних та імуногенних властивостей [37, 45, 75].

1.3. Актуальність проблеми стрептококозу поросят та формування у бактерій антибіотикорезистентності

Антибіотикорезистентність є серйозною проблемою галузі охорони здоров'я та сільського господарства. Часте й неконтрольоване використання антибіотиків призводить до появи стійких до них збудників. Бактерії зі стійкими фенотипами існували задовго до відкриття антибіотиків й існують і досі. Вона виникає за відсутності в бактерій чутливості до лікування антимікробними препаратами, до яких раніше вони були чутливими. Основними причинами формування антибіотикорезистентності є нераціональне використання згаданих препаратів у тваринництві та клінічній медицині [45, 47, 65, 95].

У тваринництві надмірне використання антимікробних препаратів сприяє появі резистентних штамів бактерій. Це може статися через неконтрольоване використання антибіотиків як промоторів росту у тваринництві, а також через профілактичне застосування їх без достатніх показань. У гуманній медицині також існує проблема нераціонального використання антимікробних препаратів, що, очевидно, пов'язано з відсутністю доступу до якісної медичної допомоги або фінансовими можливостями пацієнтів та призводить до неповного курсу лікування [48, 59, 128].

Резистентні до антибіотиків штами мікроорганізмів виявляли вже на початку використання цих препаратів. У 1940-х роках, невдовзі після відкриття пеніциліну, було зареєстровано перші випадки резистентності до цього антибіотика. Резистентні штами золотистого стафілокока були виявлені в 1948 р., а резистентність пневмококів до пеніциліну була ідентифікована в 1967 р. Відносно новою проблемою є резистентність золотистого стафілокока до ванкоміцину, виявлена в 1997 р. [13, 42, 49, 59].

У тваринництві активне безконтрольне застосування антимікробних препаратів призводить до швидкого формування антибіотикорезистентності в

патогенних бактерій. Близько 80 % антимікробних препаратів, що використовують у тваринництві, ідентичні до тих, що застосовують у гуманній медицині. Антибіотики часто застосовують, здоровим тваринам для підвищення продуктивності. Таке нераціональне використання антимікробних препаратів у ветеринарній медицині є основним фактором формування антибіотикорезистентності. За даними Центру контролю та профілактики захворювань (CDC) у США близько 50 % призначень антимікробних препаратів є недоцільними [60, 71, 83, 109].

Раціональне застосування антибіотиків передбачає глибоке розуміння їхньої природи, класифікації та механізму дії, а також типів резистентності бактерій до них. Урахування цих аспектів є важливим при виборі антибіотиків для лікування конкретних інфекцій [2, 60].

Класифікація антибіотиків дозволяє лікарям вибирати найефективніші препарати для конкретних мікроорганізмів та інфекцій, оскільки розроблена з урахуванням їхньої структури, механізмів дії та спектра активності щодо різних видів бактерій. Крім того, розуміння типів стійкості бактерій до антибіотиків допомагає уникнути невиправданого призначення препаратів, що може призвести до подальшого зростання резистентності збудника. Існують різні механізми, завдяки яким бактерії можуть набувати стійкості до антибіотиків. Це, зокрема, модифікація цільових мішеней, зміна проникності клітинної мембрани, продукування бактеріями ферментів, що розкладають антибіотики, та інші. Розуміння цих механізмів допомагає лікарям вибирати ефективні препарати та розробляти схеми й заходи щодо подолання антибіотикорезистентності [42, 79].

Стійкість бактерій до антибіотиків буває двох типів:

– Природна стійкість – цей тип резистентності зумовлений властивостями конкретного виду або роду мікроорганізмів. Здійснюється через внутрішні механізми, що забезпечують опір до певного типу антибіотиків. Наприклад, деякі грамнегативні бактерії природно стійкі до бензилпеніциліну. Інші ж можуть мати природну стійкість до протигрибкових препаратів, а гриби

можуть бути резистентними до антибактеріальних препаратів. Віруси ж чутливі тільки до конкретних противірусних засобів [43, 79, 88, 136];

– Набута стійкість – цей тип стійкості може бути первинним або вторинним. Первинна стійкість виникає як результат мутацій в окремих клітинах популяції до початку лікування антибіотиками. Вторинна стійкість формується також через мутації, які можуть з'являтися під час контакту бактерій з антибіотиками. Ці мутації не є спрямованими або пов'язаними з дією антибіотиків, які виконують роль селекційних агентів, елімінуючи чутливі особини популяції та сприяючи переважанню резистентних клітин [47, 48, 86, 109];

Залежно від швидкості появи мутантів, набуту вторинну стійкість поділяють на стрептоміцинову та пеніцилінову. Стрептоміцинова стійкість розвивається швидко – через одноступеневу мутацію, коли високостійкі мутанти формуються стрімко після одного-двох контактів мікроорганізму з антибіотиком. Цей тип стійкості не залежить від концентрації антимікробних препаратів, зокрема стрептоміцину, рифампіцину або новобіоцину. Пеніцилінова стійкість, натомість, розвивається поступово – через багатоступеневі мутації. У цьому випадку селекція стійких варіантів відбувається повільно. До цього типу стійкості належать такі антибіотики, як пеніцилін, ванкоміцин, левоміцетин, поліміксин та циклосерин [31, 59, 109].

Механізми резистентності мікроорганізмів до антибіотиків зумовлюються наявністю генів, які містяться у хромосомі або в позахромосомних елементах спадковості, таких, як транспозони та плазміди. Хромосомні мутації переважно є причиною зміни рецепторів або мішеней, з якими взаємодіють антибіотики. R-плазміди можуть містити один або більше генів резистентності, що робить мікроорганізми нечутливими до багатьох антибіотиків, які використовують у клінічній практиці [69, 84, 136].

Деякі з механізмів передачі генетичної інформації, зокрема кон'югація та трансдукція, можуть передаватися від одного бактеріального штаму до іншого не

лише в межах одного виду, але часто й між різними видами та навіть родами мікроорганізмів. Кон'югація передбачає прямий контакт між бактеріями, під час якого передається генетичний матеріал, включаючи гени стійкості до антибіотиків. Трансдукція залучає фаги, які переносять генетичну інформацію від одного мікроорганізму до іншого. За таких умов може відбуватися передача механізмів резистентності. Крім того, генетичний матеріал може також передаватися за допомогою трансформації, коли мікроорганізм поглинає зовнішній генетичний матеріал та інтегрує його у свій власний геном, що може вплинути на резистентність до антибіотиків. Згадані механізми передачі генетичної інформації сприяють поширенню резистентного генетичного матеріалу в мікробних популяціях [3, 31, 76, 79, 110].

У деяких мікроорганізмів існує ще один клас генетичного матеріалу, відомого як транспозони. Ці елементи часто виявляють у стрептококів, стафілококів та ентеробактерій. Наприклад, транспозони Tn551 мають гени резистентності до еритроміцину, Tn552 – до пеніциліну, а Tn554 – до еритроміцину та спектиноміцину. Особливістю цього генетичного матеріалу є їхня здатність інтегруватися як із кон'югативними R-плазмідами, так і з трансдукуючими r-факторами. R-плазмідні містять гени, які кодують ферменти, що руйнують антибіотики. Наприклад, деякі штами стафілококів, резистентні до пеніциліну та цефалоспоринів, продукують β -лактамазу [27, 53, 76, 132].

Більшість різних видів бактерій входять до складу нормальної бактеріальної флори організму людини і тварин. Однак деякі з них є умовно-патогенними або можуть стати патогенними, якщо потрапляють в організм іншого "господаря". Усі бактерії здатні швидко адаптуватися до навколишнього середовища. Багато стрептококів виробляють фактори вірулентності, такі, як стрептолізин, ДНК-ази та гіалуронідаза, які сприяють руйнуванню тканин і поширенню інфекції. Деякі штами виробляють екзотоксини, які активують певні Т-клітини, що викликають вивільнення цитокінів [18, 76, 98].

Так, активація комплементу, системи коагуляції та фібринолітичних систем під впливом цитокінів, продукованих деякими штамми бактерій, може мати негативні наслідки для організму, зокрема спричиняти розвиток шоку, поліорганної недостатності (захворювання, при якому декілька органів нездатні виконувати свої функції), а також смерть. Цей процес є складним і включає взаємодію між бактеріями, їхніми факторами вірулентності, цитокінами та різними системами організму [18, 84, 92, 113].

Ступінь антибіотикорезистентності різних мікроорганізмів може варіювати залежно від регіону. Оцінка стійкості основних патогенних мікроорганізмів до широко використовуваних антибактеріальних препаратів є надзвичайно важливою. На жаль, в Україні наразі немає актуальних об'єктивних і систематизованих даних щодо антибіотикорезистентності мікроорганізмів [158, 159].

Людство зробило власний внесок у проблему антибіотикорезистентності, оскільки антибактеріальні препарати широко використовують у сільському господарстві, у тому числі в розведенні худоби, у ветеринарії та рибному господарстві. Тварини, наприклад, отримують регулярні дози антибіотиків на фермах, що допомагає їм швидше набирати масу. Згідно з літературними даними, антибіотики тетрациклінового ряду виявлені в 11 % зразків м'яса та м'ясних продуктів, пеніцилін – у 33 %, стрептоміцин – у 25 % зразків молока. У результаті цього бактерії звикають до низьких доз антибіотиків, які містяться в організмі тварин [104, 117, 125].

Стійкість, або ж резистентність мікроорганізмів до антибіотиків, базується на принципі природного відбору. За один день одна мікробна клітина може створити до 16-ти мільйонів подібних. Мікроорганізми мають виняткову здатність пристосовуватися до зміни умов навколишнього середовища, включаючи антибіотики. Усі бактерії, які є чутливими до антибіотиків, гинуть, тоді як деякі, що проявляють низьку чутливість до них, виживають. Саме ці бактерії починають активно розмножуватися, що призводить до появи

резистентного штаму. У такому випадку ліки втрачають ефективність щодо патогенних бактерій, серед яких можуть бути навіть такі банальні штами, як стафілококи або збудники туберкульозу. Бактерії часто стають чутливими до антибіотиків за субмінімальних інгібуючих концентрацій, що спостерігають у деяких клінічних випадках, таких, як неповне лікування інфекції, недотримання пацієнтами режиму прийому медичних препаратів, а також через обмежений доступ лікарських засобів до певних типів тканин [79, 117, 127].

Резистентність до протимікробних препаратів проявляється здатністю мікроорганізмів виживати після дії антибіотиків, які зазвичай є смертельними для них у високих концентраціях. Ця резистентність може бути як природною, так і набутою. За природної резистентності деякі види мікроорганізмів мають фізіологічні особливості, що запобігають дії антибіотиків. Найпоширенішими рухливими елементами є плазмідні – невеликі круглі дволанцюжкові фрагменти ДНК. Ці молекули можуть містити різні гени, які забезпечують резистентність до антибіотиків і легко передаються між мікроорганізмами через горизонтальний генний обмін, що спричинює поширення генів стійкості до антибіотиків у природному середовищі. Мікроорганізми мають різноманітні механізми опору. Це, зокрема, експульсія (виведення) антибіотиків із клітини, модифікація цільових білків та інактивація антибіотиків. Клітини, які експулюють антибіотики, виживають за присутності цих лікарських засобів, виводячи їх із клітини. Трансміембранні білкові комплекси забезпечують транспорт антибіотиків через клітинну мембрану. Інші клітини, стійкі до антибіотиків, виживають завдяки мутаціям у цільовому білку, на який діє антибіотик. Зміна місця зв'язування антибіотика за збереження клітинної функціональності дозволяє клітині витримати вплив цього препарату. Крім того, деякі бактерії розвиваються таким чином, що виробляють ферменти, які руйнують хімічну структуру антибіотика, що призводить до втрати ним антимікробних властивостей. Цей механізм опору є найпоширенішим для β -лактамних антибіотиків. Бактерії, які виробляють бета-лактамази (ферменти, що розщеплюють β -лактамне кільце),

роблять препарат неефективним. Такі бактерії здатні вижити за наявності багатьох β -лактамних антибіотиків [65, 79, 80, 84, 132].

У природі плазмиди часто містять гени, які забезпечують бактеріям стійкість до неблагополучних зовнішніх факторів, включаючи стійкість до антибіотиків. Плазмиди в бактеріальних клітинах виконують різноманітні захисні функції. Вони передають генетичний матеріал, відповідають за синтез білків, які можуть бути смертельними для інших бактерій, сприяють синтезу ентеротоксинів і антигенів, що дозволяють бактеріям кріпитися до клітин організму людини. Плазмиди забезпечують стійкість бактерій до важких металів, ультрафіолетового випромінювання й антибіотиків, а також беруть участь у розкладанні камфори, ксиліту, саліцилатів. Стійкість до певного антибіотика часто залежить від наявності в бактеріях R-плазмід [60, 65, 78, 99, 110].

Уперше стійкість до макролідів і лінкозамідів після використання протимікробних препаратів у тваринництві була зафіксована в Данії. За останні 15 років стійкість до протимікробних препаратів серед *Str. suis* зросла з 0 до 20 %. З іншого боку, у Швеції, використання антибіотиків як стимуляторів росту було заборонено з 1986 року [45, 78, 125].

Останні дослідження свідчать про зростання ступеня опору бактерій до тетрацикліну серед ізолятів *Str. suis* у Європі, який становить на сьогодні 52–55 % у Данії та майже 85 % – в Іспанії. У Північній Америці стійкість до тетрацикліну становить 80 %, а в окремих господарствах Канади – майже 82 %. В Азії стійкість до тетрацикліну серед *Str. suis*, що були ізольовані від хворих і здорових свиней, також була дуже високою – близько 92 %. У звіті за 1992 р. зазначено, що лише 8 % *Str. suis*, виділених від людей у Нідерландах, виявилися стійкими до тетрацикліну. Якщо супутня мікрофлора не була виділена, то *Str. suis* можна розглядати як основний інфекційний агент, що спричиняє захворювання у тварини. Проте у випадках, коли *Str. suis* був виділений із легень, захворювання, імовірно, було спричинене асоціацією мікроорганізмів, тобто роль *Str. suis* у розвитку цього захворювання була вторинною [84, 86, 104].

Багато антимікробних препаратів, що використовують у ветеринарії, належать до тих же класів, що й препарати, які застосовують у гуманній медицині. Використання їх у тваринництві призводить до формування антибіотикорезистентності, поширення стійких бактерій серед тварин і можливої передачі цих генів стійкості людям та синантропним тваринам. Відмова від стандартних процедур і протоколів лікування пов'язана зі зростанням захворюваності та смертності серед людей. Крім того, неефективне лікування може спровокувати необхідність використання нових, зазвичай дорогих антибіотиків для заміни тих, що втрачають ефективність [37, 109, 110].

У зв'язку з антигенними варіаціями на сьогодні відсутні ефективні вакцини проти *Str. suis*. Сучасні вакцини забезпечують лише частковий специфічний захист. З огляду на це, протимікробні засоби все частіше використовують для лікування та контролю інфекції. У різних країнах було досліджено чутливість штамів *Str. suis*, виділених від хворих та клінічно здорових тварин, до бета-лактамів, тетрациклінів, сульфаніламідів і макролідів, які часто застосовують для профілактики та лікування стрептококових інфекцій у цих тварин [104, 109]. При цьому в різних країнах спостерігали різний в рівень стійкості *Str. suis* до протимікробних препаратів. Ізоляти *Str. suis*, виділені від інфікованих або клінічно здорових свиней, часто проявляли стійкість до використовуваних антимікробних препаратів. Неконтрольоване використання антибіотиків спричинило розвиток резистентності *Str. suis* до цих препаратів у всьому світі. Вивчення поширеності та чутливості *Str. suis* до антимікробних препаратів у клінічно здорових та хворих тварин є важливим фактором у боротьбі зі спалахами стрептококозу свиней [99, 104, 128].

1.4. Методи визначення чутливості бактерій до АМП

Для визначення чутливості бактерій до антимікробних препаратів (АМП) використовують різні лабораторні методи, найпоширенішими з яких є такі:

– метод дифузії в агар (метод дисків), який широко застосовують у мікробіологічних лабораторіях усього світу. Він полягає в нанесенні паперових

дисків, що містять визначену концентрацію АМП, на щільне живильне середовище, на якому зростає випробовуваний мікроорганізм. Під час дифузії препарату в агар утворюється градієнт концентрації. Активність АМП оцінюють за розміром зони інгібіції росту бактерій;

– метод серійних розведень, суть якого полягає у створенні серії розведень АМП з різними концентраціями. Цим методом визначають мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК), що вказує на найнижчу концентрацію АМП, яка ефективно інгібує ріст бактерій;

– генетична ідентифікація мутацій резистентності, яка дозволяє швидко виявляти генетичні мутації, що викликають резистентність бактерій до АМП. Цей метод базується на аналізі генетичного матеріалу бактерій для виявлення специфічних мутацій, які впливають на ефективність АМП [13, 16, 83, 88, 125].

Одним із різновидів методу дифузії є Е-тест – використання вузьких смужок полімерного матеріалу із градієнтом концентрацій АМП, які наносять на живильне середовище аналогічно до дисків. Ріст мікроорганізмів пригнічується навколо смужок Е-тесту тільки в тих ділянках, де концентрація АМП найвища й утворюється краплеподібна зона інгібіції. Значення концентрації АМП наносять на зовнішню поверхню смужки Е-тесту методом друку. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) вираховують у тій ділянці, де межа зони пригнічення росту мікроорганізмів знаходиться на найнижчому рівні, тобто в місці, де спостерігається мінімальна концентрація антибіотика, достатня для стримування їхнього росту. Е-тест є зручним методом для визначення чутливості бактерій до АМП, оскільки дає кількісну оцінку МІК, що дозволяє більш точно визначати ефективність препарату щодо конкретного штаму бактерій [65, 88, 115, 122, 132].

Перевагою методу дифузії є його низька вартість і простота застосування. Однак цей метод має свої недоліки, основним з яких є значна залежність створеного концентраційного градієнта антимікробного препарату від різних умов, на який, зокрема, впливає щільність середовища, яка у свою чергу залежить від складу й температури культивування. Крім того, рН середовища та вміст

катіонів (Ca^{2+} , Mg^{2+}) також впливають на рівень чутливості за використання цього методу. При оцінці результатів дослідження слід ураховувати те, що діаметр зони відсутності росту мікроорганізмів задля точності вимірюють у міліметрах. Цей показник свідчить про чутливість або резистентність, які є різними для кожного мікроорганізму та препарату [83, 86, 144, 148].

Методика серійних розведень передбачає приготування серії розведень антимікробного препарату в рідкому або твердому живильному середовищі. Отримані середовища з АМП засівають певною кількістю культури досліджуваного мікроорганізму (інокулюму). Після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту мікроорганізмів, що дозволяє визначити мінімальну інгібітуючу концентрацію АМП у середовищі. Існує також метод серійних розведень – використання лише двох концентрацій АМП, що відповідають мініимальному і максимальному значенням МІК [81, 147, 158].

Цей метод часто використовують в автоматизованих системах діагностики для визначення чутливості мікроорганізмів. Використання цієї методики дозволяє точно визначати чутливість мікроорганізмів до антимікробних препаратів, що дає змогу швидко й ефективно оцінювати ефективність лікування та обирати оптимальні препарати для контролю інфекційних захворювань. Автоматизовані системи діагностики значно прискорюють визначення чутливості та знижують ризик помилок, пов'язаних зі зручністю та швидкістю аналізу [31, 42, 59, 147].

Існує інша модифікація методики серійних розведень, відома як мікрометод, яка відрізняється від традиційного обсягами рідкого живильного середовища та кількістю інокулюму. Цей метод дозволяє використовувати стандартні 96-лункові планшети з подальшою оцінкою наявності зони росту мікроорганізмів за допомогою автоматизованих методів діагностики. На сьогодні методика серійних розведень є золотим стандартом мікробіологічної діагностики антибіотикорезистентності. Основними ж недоліками цього методу є його висока трудомісткість і вартість [88, 144, 158, 159].

Метод генетичної ідентифікації мутацій резистентності дозволяє безпосередньо виявляти у виділених мікроорганізмах гени, відповідальні за формування стійкості до антибактеріальних препаратів. Однією з переваг є його здатність розрізняти різні ситуації згідно з генетичними механізмами, навіть якщо фенотипові прояви є схожими, а недоліком його є висока вартість, зумовлена використанням окремих тест-систем для ідентифікації кожної мутації. Метод є високоточним щодо виявлення генетичних маркерів резистентності в особливо значущих патогенах у клінічній практиці.

Швидкими методами визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків з-поміж згаданих вище є, зокрема, такі:

- вивчення ферментативної активності мікроорганізмів під впливом антибіотиків;
- визначення зміни кольору при зміні окисно-відновного потенціалу під час росту бактерій у живильному середовищі;
- цитологічна оцінка змін морфології бактеріальних клітин під впливом антибіотиків;
- автоматизований метод [144, 158, 159].

Варто зазначити, що всі ці методи дозволяють оцінювати стійкість збудника до антибіотика *in vitro*, тобто у штучних умовах, проте вони не враховують розподіл та обробку антибіотиків в організмі. Наприклад, відсутність клінічної ефективності в мікроорганізмі, чутливого до певного антибіотика, може бути пов'язана з недостатньою концентрацією його у вогнищі запалення через його обмежену проникність або використання недостатньої дози препарату. З іншого боку, відсутність чутливості мікроорганізму до антибіотика *in vitro* не завжди свідчить про його клінічну неефективність. Так, у ході метаболізму антибіотиків (АМП) в організмі можуть утворюватися активні метаболіти, які проявляють виражену антибактеріальну активність. Наприклад, кларитроміцин – це АМП, який в організмі може зазнавати метаболічних перетворень й утворювати

активні метаболіти із властивостями, що сприяють боротьбі з інфекційними агентами [145, 155, 160].

При використанні деяких антибіотиків можлива також акумуляція їхніх високих концентрацій у вогнищі запалення. Це може сприяти пригніченню частково резистентних збудників, які можуть бути причиною інфекцій. Наприклад, цефоперазон застосовують за інфекцій жовчовивідних шляхів, а аміноглікозиди – за інфекцій нирок. Азитроміцин також виявляє активність щодо різних видів інфекцій [101, 104, 146].

Вищезгадані фактори свідчать про те, що оцінка чутливості мікроорганізмів до антибіотиків лише *in vitro* є недостатньою для визначення їхньої клінічної ефективності, оскільки ряд додаткових чинників, зокрема метаболізм антибіотика та його розподіл в організмі, можуть впливати на їхню дію в живому організмі [79, 89, 113].

Розвиток і закріплення антибіотикорезистентності (АР) у популяції мікроорганізмів є результатом природного еволюційного процесу, який включає спадковість, мінливість і відбір. Спадковість відображає передачу генетичної інформації від одного покоління до іншого. Геном організму складається із сукупності генів, які визначають його природні властивості. У популяції мікроорганізмів генофонд представлений сукупністю генів усіх організмів цієї популяції. У бактерій наявна кільцева молекула ДНК, відома як бактеріальна хромосома, яка містить основну генетичну інформацію. Крім того, бактерії можуть мати додаткові кільцеві молекули ДНК, відомі як плазміди, які не є обов'язковими компонентами. Плазміди іноді містять гени, які кодують резистентність до антибіотиків. Таким чином, фактори вірулентності можуть бути пов'язані як із хромосомою, так і з плазмідами [51, 101, 104, 115].

Мінливість є ще однією складовою еволюційного процесу. Мікроорганізми можуть зазнавати мутацій або генетичних змін, які позначаються на їхньому генетичному складі. Це може бути причиною виникнення нових форм резистентності до антибіотиків.

Відбір відбувається в середовищі, де існує конкуренція за ресурси й виживання, в наявності антибіотиків. Мікроорганізми, що містять гени резистентності до антибіотиків, матимуть перевагу перед чутливими мікроорганізмами. При дії антибіотиків чутливі мікроорганізми можуть загинути, тоді як резистентні здатні виживати і розмножуватися, що збільшує частоту генів стійкості в популяції [128, 152].

Таким чином, поєднання спадковості, мінливості та відбору сприяє розвитку антибіотикорезистентності й закріплює її в популяції. Цей процес може пришвидшуватися невиправданим або недоцільним використанням антибіотиків, коли порушуються рекомендації щодо дозування, тривалості та доцільності призначення антибіотиків, а також використання їх у тваринництві та сільському господарстві без належної обережності [59, 128, 132].

Мінливість є властивістю організмів, що дозволяє їм набувати нових характеристик. Фактори, що спричиняють мінливість, включають мутації та рекомбінації. Мутації є випадковими процесами, які можуть відбуватися в будь-якій частині геному. Однією з особливостей бактерій, що відрізняє їх від інших організмів, є їхня здатність до кон'югації, яка дозволяє обмінюватися корисними ознаками за відсутності справжнього статевого процесу [5, 79, 86, 152].

Наявність певних ознак в індивідів, які підвищують їхню резистентність до несприятливих факторів зовнішнього середовища, дозволяє більшій кількості нащадків виживати й витіснити тих, хто таких ознак не має. Таким чином ці ознаки закріплюються в популяції. Швидкість розмноження мікроорганізмів має велике значення, оскільки визначає швидкість появи нових поколінь, а отже – швидкість витіснення менш пристосованих особин більш пристосованими “побратимами”. У популяційній генетиці час вимірюється не секундами, годинами чи роками, а швидкістю появи нових поколінь мікроорганізмів [71, 100, 104].

Залежно від того, чи пов'язана стійкість до антимікробних препаратів (АМП) із конкретними генами, використовують терміни “антибіотикорезистентність” (АР) і “антибіотикотолерантність” (АТ). АР належить до генів, які забезпечують фізіологічний механізм стійкості до АМП. Ця характеристика є видовою ознакою і притаманна всім представникам штаму мікроорганізмів, незалежно від умов середовища [104, 162].

Термін АТ відображає наявність стійкості до АМП на рівні популяції мікроорганізмів. АТ не є генетично визначеною на рівні геному окремого організму, а являє собою взаємодію між окремими клітинами мікробної популяції. Члени такої популяції, які вижили після дії АМП, можуть бути знищені цими АМП при зміні умов у самій популяції [83, 89, 113].

Бактеріальна клітинна стінка сама по собі є бар'єром для проникнення малих молекул у цитоплазму клітини. У грамнегативних бактерій ця властивість особливо виражена. Крім того, бактерії мають спеціальні насосні системи, які активно виводять антимікробні препарати з клітини. Існування таких механізмів пов'язане з розвитком резистентності до фторхінолонів і тетрациклінів. Один мікроорганізм може мати кілька систем активного виведення препаратів. Прийнято вважати, що ці системи еволюційно виникли як механізми, що забезпечують резистентність мікроорганізмів до різних хімічних речовин зовнішнього походження [109, 128, 132].

У бактерій наявні також різноманітні біохімічні механізми, здатні змінювати хімічну структуру антимікробних препаратів (АМП) внутрішньоклітинно. Один із найвідоміших із них – це β -лактамази, які розкладають β -лактамні кільця відповідних антибіотиків [132]. На початку ХХ ст. були виявлені ферменти, що розщеплювали лише пеніциліни, а не цефалоспорини, але наприкінці ХХ ст. з'явилися β -лактамази, які здатні розщеплювати обидва типи препаратів. Ці ферменти отримали назву β -лактамаз розширеного спектра (БЛРС). Науковцям вдалося зупинити резистентність, сформовану шляхом специфічної блокади відповідних ферментів. З цією метою

були розроблені інгібітори β -лактамаз, зокрема клавуланова кислота і сульбактам. Проте тривале використання антибіотиків із такими інгібіторами призвело до формування БЛРС, що стали стійкими до їхнього впливу. Подібно до β -лактамних антибіотиків, інші АМП можуть бути інактивовані за допомогою специфічних ферментів. Наприклад, хлорамфенікол може ацетилюватися, а аміноглікозиди – інактивуватися шляхом ацетилювання аміногруп або фосфорилування / аденілірування гідроксигруп. В останні роки розвивається резистентність до фторхінолонів. Одним із механізмів її проявів є ацетилювання. Цікаво, що здатність до ацетилювання фторхінолонів виникла внаслідок мутації гена, що відповідає за утворення ферменту ацетильованого аміноглікозиду. Ці біохімічні механізми, які змінюють хімічну структуру АМП, дозволяють бактеріям протистояти їм і розвивати резистентність. Це значно ускладнює лікування й контроль за інфекційними захворюваннями, оскільки бактерії постійно адаптуються та вибирають механізми, що дозволяють їм уникати впливу антибіотиків. Розуміння цих механізмів резистентності є важливим для пошуку нових шляхів та засобів боротьби з інфекційними хворобами при збереженні ефективності антимікробних препаратів [86, 88, 104, 117, 146].

Формування резистентності внаслідок зміни структури мішені, на яку впливають антимікробні препарати, є поширеним серед мікроорганізмів. Мутації в генах, що кодують пеніцилінзв'язуючі білки, і внаслідок цього зміна їхньої структури зумовлює втрату чутливості до пеніцилінів. Зміна структури ДНК-гірази спричинює резистентність до фторхінолонів. Відповідно зміна структури мішені може зумовити резистентність до рифампіцину, ванкоміцину та лінезоліду. Згадані механізми дозволяють мікроорганізмам уникати дії антибіотиків та зберігати свою життєздатність навіть за дії цих препаратів [125, 170].

Існують механізми, які сприяють антибіотикотолерантності на рівні цілої бактеріальної популяції. Ці механізми включають: персистенцію – явище, за якого в популяції бактерій, вразливих до антибіотиків, можуть зустрічатися клітини, що

повільно діляться або не діляться взагалі. Ці клітини завдяки низькій метаболічній активності проявляють стійкість до антибіотиків, однак, коли їх перенести в інші умови (наприклад, змінити середовище), ця стійкість може бути втрачена; – утворення біоплівки (бактерії можуть утворювати біоплівки, які являють собою складні структури з полімерних матриць і бактеріальних клітин) [30, 117, 122].

Біоплівки захищають бактерії від дії антибіотиків, ускладнюючи їх проникнення та ефективність; – скупчення бактерій (деякі види бактерій можуть формувати механізми, або скупчення, які забезпечують їм стійкість до антибіотиків). У таких скупченнях бактерії можуть взаємодіяти та захищати одна одну, знижуючи ефективність антибіотиків. Згадані механізми дозволяють бактеріям проявляти толерантність до антибіотиків на рівні популяції й ускладнюють боротьбу зі збудниками при їх застосуванні [64, 74, 127].

Формування біоплівки є складним процесом, за якого бактерії прикріплюються до твердого субстрату й утворюють матрикс. У складі біоплівки окремі бактеріальні клітини утворюють певну структуру, взаємодіючи хімічними сигналами. Ці біоплівки забезпечують бактеріям захист від антибіотиків, дозволяючи їм витримувати вищі концентрації препаратів, які є небезпечними для мікроорганізмів, які не утворювали їх. Однак руйнування біоплівки призводить до переходу бактерій у вільно живучу форму, яка стає чутливою до стандартних концентрацій антибіотиків [48, 127].

Формування резистентності у скупченнях бактерій подібне до утворення біоплівки, але відбувається на поверхні напіврідких середовищ, на відміну від біоплівки, які формуються на твердих поверхнях. Після поділу бактерій представники багатьох видів можуть залишатися з'єднаними, утворюючи структури, схожі на скупчення. Ці скупчення бактерій мігрують як єдине ціле. Так само, як і біоплівки, скупчення бактерій проявляють підвищену резистентність до АМП. Руйнування цих скупчень шляхом розсіювання в рідкі середовища відновлює чутливість бактерій до АМП [48, 65, 125, 133].

Боротьба з біоплівками є досить складною проблемою, яка до сьогодні залишається не вирішеною. Одним із способів підвищення ефективності протимікробної терапії є використання АМП, які впливають не лише на самі бактерії, й на утворений ними матрикс. У зв'язку з цим вивчають можливість використання бактеріофагів [86].

Відповідно до даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), антибіотикорезистентність є однією з найбільших загроз для людства. За даними цієї організації, із 115 основних існуючих антибіотиків, створених у різний час, 68 з них є вже майже не ефективними [49, 51, 59].

Ця проблема є актуальною і для України, тому для боротьби з антибіотикорезистентністю Кабінет Міністрів затвердив план дій. Першим кроком цього плану є запровадження контролю за використанням антибіотиків у гуманній медицині, а другим – у ветеринарії. Особливу увагу в цьому документі приділено використанню антибіотиків у харчовій промисловості та попередженню зростання антибіотикорезистентності в країні загалом [127, 146, 155].

Наказом Міністерства економіки України від 30 грудня 2021 року № 1177–21 “Порядок використання протимікробних ветеринарних лікарських засобів у ветеринарній медицині та звітування про обсяги їх застосування” затверджені правила використання їх у ветеринарній медицині. Цей порядок передбачає запровадження обмежень та контролю за використанням протимікробних ветеринарних засобів [157].

Термін “набута стійкість” використовують для опису випадків, коли в чутливій до певного препарату популяції мікроорганізмів з'являються резистентні варіанти. Це зазвичай відбувається через мутації в геномі клітини. Первинна стійкість, що є результатом мутацій, проявляється в окремих клітинах популяції задовго до початку лікування антибіотиками і зумовлена гетерогенністю популяції, коли деякі клітини вже є стійкими до препарату [45, 144, 148].

Вторинна стійкість також спричинюється мутаціями і може посилюватися при контакті бактерій з антибіотиками. Ці мутації не пов'язані з дією препарату й виникають випадково. Вони призводять до видалення чутливих особин з популяції, а резистентні бактерії починають домінувати [16, 43, 88].

1.5. Застосування методу ПЛР за діагностики *Str. suis* та визначення його генотипу

У літературних джерелах зазначено, що високий відсоток вірулентних штамів *Str. suis* серотипу 2 виробляє антигени MRP і EF, які вважають основними факторами вірулентності цього мікроорганізму [67, 131].

Хоча існує пряма залежність між наявністю білків MRP і EF та ступенем вірулентності, мутантні штами, які не мають цих генів, усе ж зберігають вірулентність щодо свиней. Деякі штами, ізольовані в Канаді від хворих свиней, не продукували ці протеїни, проте мали високий ступінь вірулентності. У той же час у більшості країн Європи, США та Австралії штами з фенотипом MRP+EF+ переважали серед ізольованих штамів з патологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин/ Тому цей фенотип вважають класичним вірулентним [49, 54, 67, 96, 105, 130, 131].

У сучасних умовах для розрізнення серотипів *Str. suis* застосовують складні методи, такі, як західний імуноблот та імуноферментний аналіз (ІФА). Однак ці методи мають певну похибку, що може сягати 30 % через перехресні реакції сироваток з іншими видами стрептококів [11, 12].

Використання новітніх молекулярно-біологічних методів діагностики, зокрема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дозволяє швидко й точно визначати серотип збудника в біологічному матеріалі, що має велике значення для оптимізації заходів специфічної профілактики, та отримувати достовірні результати, що покращує діагностику та контроль над захворюванням [25, 43, 81].

Молекулярно-генетичний метод діагностики резистентності суттєво відрізняється від інших методів, оскільки є високоточним і за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє виявити резистентність у

генетичному апараті певного виду або навіть штаму мікроорганізму (у кільцевій ДНК або плазмідах). Цей метод належить до експрес-методів, тому що результат можна отримати всього за кілька годин при використанні ПЛР у реальному часі. Його перевагою є те, що не потрібно виділяти чисту культуру збудника, а також, що він дозволяє одночасно виявляти конкретні мікроорганізми в біологічних зразках від хворого та гени стійкості до різних антимікробних препаратів (до декількох препаратів одночасно) [4, 16, 84, 96].

Слід зазначити, що цей метод дає “якісний” результат, а не кількісну характеристику. Він не може надати інформацію про мінімальну інгібіторну концентрацію (МІК) конкретного антимікробного препарату для певного збудника інфекції. Але найбільш суттєвим недоліком цього методу є те, що він не дозволяє визначити чутливість мікроорганізмів до антимікробних засобів і не дає кількісної характеристики у вигляді ступеня МІК [13, 16, 28, 84].

1.6. Висновки з розділу огляд літератури

Дослідження особливостей антигенного складу *Str. suis* є важливим для подальшої розробки і вдосконалення засобів діагностики та специфічної профілактики цього захворювання. Ретельне вивчення антигенного профілю дозволить швидше виявляти та ідентифікувати збудники, а також стане основою для розробки вакцин та імунопрофілактики, спрямованих на захист свиней від цього захворювання.

Окрім того, заслуговує уваги вдосконалення системи моніторингу та контролю за захворюванням, що дозволить вчасно виявляти й контролювати поширення *Str. suis* серед свиней. Урахування факторів ризику, розробка превентивних заходів та раціональне використання антибіотиків є ключовими в боротьбі із стійкістю до антибіотиків для подолання цього захворювання.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана впродовж 2016–2023 рр. на кафедрах епізоотології та інфекційних хвороб, мікробіології та вірусології Білоцерківського національного аграрного університету, наукові дослідження проводили в лабораторії “Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин” Інституту ветеринарної медицини, а також у науково-дослідній лабораторії мікробіологічних методів досліджень і науково-дослідній лабораторії новітніх методів (ІФА та ПЛР) Білоцерківського національного аграрного університету.

Дослідження складались із трьох етапів (табл. 2.1): на першому етапі було проведено епізоотологічне дослідження ситуації щодо стрептококозу в Україні та виділення чистих культур *Str. suis*, на другому етапі проводилась розробка протоколів ПЛР та молекулярно-генетичні дослідження ізолятів *Str. suis*, третій етап в себе включав характеристику антигенів *Str. suis* та встановлення їх імуногенних властивостей.

Таблиця 2.1

Етапи проведення наукових досліджень

1 етап Ідентифікація збудника та мікробіологічні дослідження	Епізоотологічне дослідження ситуації щодо стрептококозу в Україні	Виділення чистих культур та ідентифікація мікроорганізмів	Вивчення культуральних властивостей ізолятів <i>Str. suis</i>	Визначення стійкості ізолятів <i>Str. suis</i> до антибіотиків
2 етап Молекулярно-генетичні дослідження ізолятів	Ідентифікація <i>Str. suis</i> та визначення його серотипів за допомогою класичної полімеразної ланцюгової реакції	Розробка та апробація протоколу ПЛР-РЧ для ідентифікації <i>Str. suis</i>	Виявлення генів патогенності <i>Str. suis</i> методом класичної ПЛР	
3 етап Імуногенні властивості <i>Str. suis</i>	Визначення впливу середовища культивування на антигенні властивості	Розробка протоколу проведення ІФА для визначення антигенних властивостей	Визначення ступеня перехресних імунних реакцій між різними ізолятами	Характеристика афінності антитіл до різних фракцій поверхневого білка

2.1. Епізоотологічні методи досліджень

Епізоотологічний моніторинг стрептококозу свиней в Україні та світі проводили з використанням епізоотологічного та статистичного методів. У рамках дисертаційної роботи було проведено аналіз епізоотичної ситуації щодо стрептококозу свиней за останні 10 років. Для аналізу використовували офіційну звітність Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів і результати власних досліджень патологічного матеріалу з різних областей України.

2.2. Штами мікроорганізмів

У роботі був використаний музейний штам мікроорганізму *Str. suis* NCTC 10234 та польові ізоляти, виділені від хворих свиней на свинофермах (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Штами *Str. suis*, що використовувались у досліджах

№ п/п	Назва	Серотип	Фенотип	Вірулентність для тварин
1	3/2	2	MRP+EF+	Високовірулентний
2	<i>Str. suis</i> NCTC 10234	2	MRP+EF+	Музейний/високовірулентний
3	10	2	MRP+EF+	Високовірулентний
4	21	2	MRP+EF+	Високовірулентний
5	19	2	MRP+EF+	Високовірулентний
6	17	2	MRP+EF+	Високовірулентний
7	31	2	MRP+EF+	Середньовірулентний
8	14	2	MRP+EF+	Середньовірулентний
9	05	2	MRP-EF-	Авірулентний
10	16/2	2	MRP+EF-	Слабовірулентний

Тестову культуру *Str. suis* NCTC 10234 використовували як позитивний контроль. Окрім вищезазначених штамів, у дослідженнях використовували нетиповані ізоляти *Str. suis*, виділені з патологічного матеріалу, зокрема в

дослідженнях щодо серотипування збудника за допомогою ПЛР. Інші мікроорганізми, які вивчали в досліджах, зазначені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Тестові музейні культури мікроорганізмів, використані в дослідженнях

Назва мікроорганізмів	Штам	Характеристика
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC10240	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Bacillus cereus var mycoides</i>	537	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Staphylococcus aureus</i>	P209	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин
<i>Escherichia coli</i>	1257	Тестовий мікроорганізм для визначення активності антибіотичних речовин

2.3. Культивування мікроорганізмів

Культури *Str. suis* культивували в м'ясо-пептонному бульйоні Хоттінгера (МПБХ) з умістом (%): пептону – 0,5; натрію хлориду – 0,2; калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,3; натрію фосфорнокислого двохзаміщеного – 2; детергенту Tween-80 – 0,05; сироватки крові великої рогатої худоби, коней або овець – 8 – 10; глюкози – 0,4; амінного азоту – 180–200 мг %. Живильні середовища мали рН 7,4–7,6. Інші дослідження проводили на середовищах МПА, МПБ, Мюллера-Хінтона.

Для з'ясування гемолітичних властивостей *Str. suis* використовували МПА із додаванням стерильної дефібринованої крові ВРХ. Під час досліджень використовували також суху плазму крові (ТОВ “Біофарма”).

2.4. Ідентифікація чистих культур виділених мікроорганізмів

Серед критеріїв ідентифікації виділених культур ураховували морфологічні, культуральні та біохімічні властивості, які визначали за допомогою

біохімічного тест-набору для ідентифікації стрептококової та ентерококової групи мікроорганізмів *API 20 STREP* (*bioMerieux*, France). Тестування виділених культур та визначення їхніх біохімічних властивостей проводили згідно з інструкцією до тест-набору. Лецитиназну активність вивчали шляхом посіву виділених культур та контрольного *Str. suis* на жовточно-сольовий агар з подальшою інкубацією в термостаті упродовж 24–48 год.

Коагулазну активність визначали після висіву *Str. suis* у плазму кроля та інкубації посівів у термостаті упродовж 4–8 год. За негативного результату культури залишали в термостаті ще на 16–18 год. Згущення плазми у часовому проміжку від 4 до 8 год. враховували як позитивний результат, якщо ж коагуляція наставала після 8 год. – як слабопозитивний або сумнівний результат.

Використаний набір *API 20 STREP* (*bioMerieux*, France) дозволяв визначити біохімічну активність ізолятів щодо 8 ферментів та 16 субстратів, таких, як N-ацетил-глюкозамінідаза, L-лейцин-амінопептидаза, β -манозидаза, β -глюкоронідаза, β -глюкозидаза, β -галактозидаза, α -галактозидаза, фосфатаза, ескулін, інулін, манітол, сорбітол, мелібіоза, рибоза, лактоза, пуллулан, аргінін, тагатоza, мальтоза, рафіноза, триглоза, сорбоза, α -метилглюкозидаза. Тестом також визначали можливість росту виділених культур за вмісту 6,5 % NaCl, що дозволило диференціювати стрептококи та ентерококи.

Для диференціації мікроорганізмів родини *Streptococcaceae* визначали тип гемолізу на кров'яному агарі, чутливість до бацитрацину для диференціації β -гемолітичних стрептококів, здатність до росту на середовищах із 6,5 % хлориду натрію для α -гемолітичних стрептококів. Вивчали здатність бактерій до капсулоутворення.

Морфологічні та культуральні властивості досліджували загальноприйнятими бактеріологічними методами згідно з інструкціями [144. 154-156].

Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) у добових бульйонних культурах визначали шляхом висівання аліквоти культури в послідовних

розведеннях 1×10^{-6} ; 1×10^{-7} і 1×10^{-8} у кількості по $0,2 \text{ см}^3$ кожного розведення на поверхню МПАХ у трьох чашках Петрі з подальшим культивуванням за температури $36,7 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 48–72 год. та підрахунком колоній, що вирости, а також середньої кількості живих мікроорганізмів в 1 см^3 культури за формулою:

$$K = a/n \times 5 \times 10^x, \text{ де} \quad (1)$$

K – кількість живих мікроорганізмів в 1 см^3 культури цього розведення;

a – кількість колоній у чашках;

n – кількість чашок;

5 – коефіцієнт перерахунку на 1 см^3 ;

10^x – ступінь розведення.

Середню кількість живих мікроорганізмів в 1 см^3 культури загальної кількості мікробних клітин у трьох розведеннях досліджували поділом на три із урахуванням статистичної похибки.

2.5. Оцінка активності антибіотичних субстанцій

Для оцінки активності антибіотичних субстанцій (АБС) застосовували два методи – метод серійних розведень, який включає макро- і мікрометоди, та загальноприйняті методи дифузії в агар шляхом розкладання виготовлених власноруч чи готових антибіотичних дисків.

Метод серійних розведень. Приготування робочих розчинів антибактеріальних субстанцій проводили загальноприйнятими методами [144. 154-156]. У випадку, коли субстанції погано розчинялись у воді, застосовували розчинники для первинної солюбілізації та розчинники для доведення до необхідної концентрації. Із робочих розчинів готували необхідні розведення з дворазовим кроком. При цьому враховували необхідну кратність розведення розчину в кінцевому об'ємі.

МПБ або МПБХ розливали в пробірки по $0,5 \text{ см}^3$. У першу пробірку додавали $0,5 \text{ см}^3$ робочого розчину АБС й ретельно перемішували. Переносили в наступну пробірку $0,5 \text{ см}^3$ розчину і т. д. Із останньої пробірки $0,5 \text{ см}^3$ розчину

вливали. Кількість пробірок визначали діапазоном розведень АБС, урахувавши негативний контроль. Серія розведень мала включати в себе граничну концентрацію та допустимі діапазони МПК для кожного із *Str. suis*, що тестувалися.

Для інокулювання використовували завись мікроорганізмів у стерильному фізрозчині, еквівалентну 0,5 одиницям за стандартом Макфарланда, розведену у 100 разів МПБ (концентрація мікроорганізмів приблизно складала 10^6 КУО/см³). Після внесення інокулюму всі пробірки інкубували в термостаті за $36,5 \pm 0,5$ °C упродовж 24 год. Результати обліковували візуально у проникаючому світлі. Ріст культур з АБС порівнювали з негативним контролем, який містив вихідний інокулюм у МПБ. МПК визначали за найменшою концентрацією АБП, яка повністю пригнічувала видимий ріст мікроорганізмів.

Метод дифузії в агар. Метод ґрунтується на здатності АБС дифундувати із просочених паперових дисків у живильне середовище та пригнічувати ріст мікроорганізмів, посіяних у товщу або на поверхню агару. Для проведення дослідів використовували МПА або МПАХ, який готували згідно з настановою або загальноприйнятим методом за відомими рецептурами та стерилізували автоклавуванням [160, 161, 165–168]. Важливим аспектом у процесі досліджень була товщина шару та кількість агару в чашках. Вона складала $4,0 \pm 0,5$ мм, чого досягали шляхом внесення в чашку Петрі діаметром 90 мм за допомогою піпетки 20 см³ агару.

Перед заповненням чашки середовищем враховували те, що розмір та форма зони пригнічення тест-мікроорганізму залежать від товщини та рівномірності розподілу агарового шару по поверхні дна чашки. Для рівномірного розподілу агару на поверхні чашок їх перед розлиттям агару розміщали на горизонтальній поверхні, після чого чашки упродовж короткого періоду часу підсушували в термостаті. При внесенні інокуляту контролювали відсутність конденсату на внутрішній поверхні чашки. Для дослідів із відомими

антибіотичними субстанціями використовували комерційні стандартизовані диски.

Під час роботи також попередньо готували інокулюм зі щільністю 0,5 одиниці за стандартом МакФарланда, який містив близько 10^8 КУО/см³. Інокулюм наносили на поверхню чашки Петрі із живильним середовищем в об'ємі 1 см³, рівномірно розподіляли по всій поверхні агаризованого середовища, після чого надлишок культури видаляли. Чашки підсушували протягом 15 хв. Потім наносили диски з АБС із дотриманням відстані між дисками та краєм чашки не менше 20 мм, тобто в одну чашку поміщали не більше шести дисків. Після аплікації чашки ставили в термостат догори дном та інкубували за температури 36 ± 1 °С упродовж 24 год.

Результати обліковували за допомогою лінійки або штангенциркуля з точністю до 1 мм. При визначенні зон затримки росту мікроорганізмів орієнтувалися на повну відсутність видимого росту.

При вивченні чутливості мікроорганізмів до сульфаніламідів та їх комбінації з триметопримом враховували те, що при дії цих препаратів перед повним пригнічення росту можливе проведення одного-двох циклів проліферації мікроорганізмів, тому зону пригнічення росту вважали на 20 % меншою за фактичну.

Відсутність зони затримки росту мікроорганізму навколо диска вказувала на нечутливість тест-мікроорганізму до цього антибіотика. За розміром зони затримки росту визначали ступінь чутливості мікроба до антибіотиків. Якщо ця зона становила в діаметрі до 15 мм, мікроорганізм вважали слабочутливим, від 15 до 25 мм – чутливим, понад 25 мм – високочутливим.

2.6. Нуклеотидні послідовності

Нуклеотиді послідовності для проведення молекулярно-генетичних досліджень були підібрані з літературних джерел.

На основі проведеного аналізу нуклеотидної послідовності ділянок гена *gdh* (глутаматдегідрогеназа), який є висококонсервативним структурним

геномом, на відміну від інших протеїнкодуєчих генів саме він був обраний для видового визначення *Str. suis*.

Специфічні ділянки генів *mpr* та *epf* були використані для підбору праймерів, щоб підтвердити наявність основних факторів вірулентності. Специфічність усіх розрахованих праймерів становила 100 % відповідно до сиквенсів баз даних DDBJ/EMBL/GenBank/PDB.

Для визначення серотипів нами були використані специфічні фрагменти високоваріабельного кластера генів *cps*, ORF-ділянки сиквенсу якого варіюють серед усіх відомих на сьогодні серотипів. Нами було використано рекомендовані в літературі праймери та проведено оптимізацію дизайну для уніфікації температури відпалу праймерів за допомогою програми *Primer Express v.3.0* (Applied Biosystems, США) [58, 93, 107]. Аналіз і множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей виконували з використанням програми *BLAST on-line* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Послідовності олігонуклеотидів для проведення класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі наведені в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

**Праймери і флуоресцентні зонди для проведення ПЛР
(класичної та у режимі реального часу)**

Набір праймерів	Сиквенс праймера (5' – 3')	Фрагмент гена, на який розраховано праймери	Розмір продукту	Призначення
1	2	3	4	5
1	F: AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACC	<i>cps1J</i> , <i>cps14J</i>	550	Детекція серотипу 1 та 14
	F: GATTTGTCGGGAGGGTACTTG R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC	<i>cps2J</i> , <i>cps1/2J</i>	450	Детекція серотипу 2 та 1/2
	F: TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA R: ACCCCCAGAAGAGCCGAAGGA	<i>cps3J–cps3K</i>	1273	Детекція серотипу 3

Продовження таблиці 2.4

1	2	3	4	5
	F: GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC R: AGTCACAATTGCTGGTCCTGACACC	cps7H	150	Детекція серотипу 7
	F: GGGATGATTGCTCGACAGAT R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG	cps9H	300	Детекція серотипу 9
	F: TACAGTGCTTGCAGCCCTAC R: CGACTTGTCGTGCCCTGAT	cps11N	896	Детекція серотипу 11
	F: TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT R: TTTGTTTGCTGGAATCTCAGGCACC	Cps16K	202	Детекція серотипу 16
2	F: ACTTGGAGTTGTCGGAGTAGTGCT R: ACCGCGATGGATAGGCCGAC	cps4M– cps4N	783	Детекція серотипу 4
	F: TGATGGCGGAGTTTGGGTCGC R: CGTAACAACCGCCCCAGCCG	cps5N	166	Детекція серотипу 5
	F: ATGGGCGTTGGCGGGAGTTT R: TTACGGCCCCCATCACGCTG	cps8H	320	Детекція серотипу 8
	F: TGTGGCGATAGGACAACAGG R: ACCAAGAAGTTTCCGCCTGA	cps12J	209	Детекція серотипу 12
	F: CGGGGCAGTCTTACTCATGG R: ATGACAGCGAAACGGACAGA	cps18N	432	Детекція серотипу 18
	F: AGCAGGGTTGCGTATGGCGG R: ACAAGCACCAGCAAAGACCGCA	cps19L	1024	Детекція серотипу 19
	F: ACCCGGAAAAACCAGGAGTT R: ACCAATCAATGCCAAGCGAC	cps24L	500	Детекція серотипу 24
	F: GGAGGAGCTGCGGGCTCATA R: TGGCCACAACCTGGATGCGTT	cps25M	1211	Детекція серотипу 25
3	F: TACGGTCTCCCTTGCCTGTA R: AACTCAGCTAGTGCTCCACG	cps6I	325	Детекція серотипу 6
	F: TTACGAGGGGATTCTGGGGT R: CGGGACAACAGATGGAACCT	cps10M	153	Детекція серотипу 10
	F: CTGGTGCTGCAATTTTCGCTT R: GCAGACTAGCTGCAGTTCCA	cps13L	1135	Детекція серотипу 13
	F: GCAAGAAAGCTTCCGGATGGA R: CAAGAGAGTGTGCAACCCCA	cps15K	274	Детекція серотипу 15
	F: ACTTGGGTTGGAATGGCGAA R: ACCACCGAAAGTCAGGTCAC	cps17O	906	Детекція серотипу 17
4 (gdh– F/ gdh– R)	F: CTTCACTTGACGTCCCTGCT R: CGTCAATTTTGGGGGCGTTT	<i>gdh</i>	916	Ідентифікація <i>Str. suis</i> до виду

Продовження таблиці 2.4

1	2	3	4	5
5 (mrp–F/ mrp–R)	F: GACAGATGGTGAGGAAAATGG, R: TGAGCTTTACCTGAAGCGGT	<i>mrp</i> (X64450)	1148	Ідентифікація <i>Mrp</i> гена <i>Str. suis</i>
6 (epf–F2/ epf–R2)	F: GCTACGACGGCCTCAGAAATC R: GGATCAACCACTGGTGTAC	<i>epf</i> (X71881)	626	Ідентифікація <i>Epf</i> гена <i>Str. suis</i>
7 (fbpS–F/ fbpS–R)	F: TCC RAT RCT GCT CTG CCA TT R: ATGA TAG TAG AAG TCC AGC ARA CT Probe: FAM–AA TAG CCC “T”GA AAA MCA GCC ACWYTT TGA RA– 6SpC; “T” = RTQ1	fbpS (CP003993)	114	Ідентифікація <i>Str. suis</i> до виду

У таблиці представлено чотири набори праймерів, які передбачають постановку 4-х реакцій і дозволяють виявити найбільш поширені в Україні серотипи *Str. suis* (1–4), сиквенс яких запропоновано Kerdsin A. et al. (2012), два набори праймерів для виявлення *mrp* та *epf* генів *Str. suis*, які зумовлюють вірулентні властивості (5–7), а також по одному набору праймерів для виявлення збудника стрептококозу свиней у реакції звичайного ПЛР та ПЛР у реальному часі.

За розробленим дизайном нами було замовлено синтез зазначених пар олігонуклеотидних праймерів і флуоресцентно помічених гібридизаційних зондів у компанії *Амплісенс/Синтол* (РФ) та *Thermo Fisher Scientific* (США). Для виділення нуклеїнових кислот (РНК, ДНК) використовували комерційний набір *IndiSpin Pathogen kit* (*Indical Bioscience*, Німеччина).

2.7. Проведення класичного варіанта ПЛР з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації

Варіант ПЛР з електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації проводили з об'ємом 50 мкл. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриці та їх ампліфікації нами був використаний метод приготування реакційної суміші, за яким компоненти ПЛР фізично розділяли. Для

приготування “нижньої” реакційної суміші змішували праймери та нуклеотидтрифосфати (2мМ) в одній пробірці з розрахунку по 5 мкл кожного компонента (по 2,5 мкл обох праймерів із кінцевою концентрацією кожного 20–25 пМоль/зразок). Після змішування на вортексі суміш розподіляли в підготовлені для ПЛР мікропробірки по 10 мкл і нашаровували зверху по 15 мкл розплавленого воску. Після застигання воску в пробірку вносили по 20 мкл “верхньої” суміші та по 2 краплі мінерального масла. До складу “верхньої” ПЛР-суміші в розрахунку на один зразок входило: 10 мкл 5-х ПЛР-буферу; 2,5 мкл 50 мМ MgSO₄; 6,5 мкл H₂O та 1 мкл Taq-полімерази (5 од/мкл). Під масло відповідно до маркування пробірок вносили по 20 мкл ДНК досліджуваного зразка або, якщо це передбачено планом проведення досліду, розведення в lowTE-буфері для елюції ДНК.

Режими ампліфікації. Пробірки переносили в термоциклер (TC1000-G) і проводили ампліфікацію за програмами, наведеними в таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Програма температурного режиму ампліфікатора для проведення ПЛР з метою серотипізації *Str. suis* з використанням наборів праймерів 1–4

Етап	Режим	Кількість циклів
Активация полімерази	95 °C – 60хв	1
Денатурація Відпал Елонгація	62 °C – 90с	35
	95 °C – 20 с	
	62 °C – 90 с	
Фінальна елонгація	72 °C – 300 с	1
Зберігання	10 °C	Зберігання

Температурний режим проведення полімеразної ланцюгової реакції з метою виявлення специфічних ділянок Mgr та Erf генів наведено в таблиці 2.6.

Таблиця 2.6

Програма температурного режиму для проведення ПЛР з праймерами з метою виявлення специфічних ділянок Mgp та Erf генів *Str. suis*

Ідентифікація Mgp гена <i>Str. suis</i>			Ідентифікація Erf гена <i>Str. suis</i>		
Етап	Режим	Кількість циклів	Етап	Режим	Кількість циклів
Активація полімерази	94 °С – 240 с	1	Активація полімерази	94 °С – 240 с	1
Денатурація	94 °С – 30 с	35	Денатурація	94 °С – 60 с	5
Відпал	54 °С – 20 с		Відпал	52 °С – 60 с	
Елонгація	72 °С – 35 с		Елонгація	72 °С – 60 с	
Фінальна елонгація	72 °С – 240 с	1	Денатурація	94 °С – 30 с	30
			Відпал	55 °С – 20 с	
			Елонгація	72 °С – 35 с	
Зберігання	10 °С	Зберігання	Фінальна елонгація	72 °С – 420 с	1
	–	–	Зберігання	10 °С	Зберігання

2.8. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР

Аналіз продуктів ампліфікації виконували шляхом розділення синтезованих фрагментів ДНК в 1,5 %-ному гелі агарози. Після охолодження розплавленої до 55–60 °С агарози, до неї додавали 0,003 см³ розчину броміду етидію й перемішували. Агарозний гель заливали у форму (товщиною 5–6 мм) і формували за допомогою гребінок лунки для внесення зразків. Оскільки реакційна суміш ПЛР уже містила гліцерин та маркерний барвник ксиленціанол, зразки додавали безпосередньо в лунки та проводили електрофорез. Смути готового гелю поміщали в електрофоретичну камеру так, щоб лунки були повернуті в бік негативного електрода.

У середні лунки вносили по 12 мкл кожного зразка для ампліфікації, а в крайні – по 7 мкл маркера *100bp Ladder (BioRad, USA)*. Електрофорез проводили з градієнтом напруги 10 В/см до того моменту, поки барвник проходив приблизно половину довжини гелю. Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі переглядали на транслюмінаторі під ультрафіолетовим випромінюванням. Електрофореграму фотографували за допомогою цифрової фотокамери *Canon A540 (Canon, Японія)*.

2.9. Проведення ПЛР у реальному часі

Для постановки ПЛР у реальному часі використовували ПЛР-суміш, яка включала такі компоненти: ПЛР-буфер, суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (дНТФ), Трис-НСl, розчин MgCl₂, Таq ДНК-полімераза (*Thermo Fisher Scientific*) і стерильну деіонізовану воду для молекулярно-генетичних досліджень (*NEB, США*), а також комерційні реакційні суміші для постановки ПЛР виробництва *NEB, США* та *BioRad, США*, які використовували згідно з протоколами виробника.

Ампліфікацію проводили в реакційному об'ємі 22 мкл з таким складом: стерильна деіонізована вода для молекулярно-генетичних досліджень (7,5 мкл); 2× ТаqMan ПЛР мастер мікс (12,5 мкл); праймер 1,5 pmol (1 мкл); праймер 2,5 pmol (1 мкл); ТаqMan зонд, 5 pmol (1 мкл). По 3 мкл виділеної ДНК вносили на зразок. Ампліфікацію проводили за допомогою ампліфікаторів *Rotor-Gene Q (QIAGEN Hilden, Німеччина)*, *CFX96 (Bio-Rad, США)* у режимі реального часу. Флуоресценцію вимірювали за 55 °С на каналі FAM та JOE.

Облік та інтерпретація результатів. Для виявлення продуктів ампліфікації використовували пороговий метод – вираховували значення порогового циклу реакції Ct (*Threshold cycle*), а саме точки перетину графіка накопичення ДНК і порогової лінії (*Threshold line*). Результати аналізу вважали достовірними, якщо значення Ct по каналах FAM було меншим або дорівнювало 35 ($Ct \leq 35$); значення Ct НКЗ було відсутнім. При цьому досліджуваний зразок вважався позитивним, якщо значення Ct по каналу FAM було меншим або дорівнювало 35 ($Ct \leq 35$), і негативним – якщо значення Ct по FAM було більшим 35 ($Ct \geq 35$).

2.10. Валідація методу ПЛР

Валідацію виконували за показниками чутливості, специфічності, збіжності та відтворюваності.

Аналітичну чутливість методу ПЛР визначали послідовним дослідженням серії 10-кратних розведень ДНК *Str. suis*. За межу виявлення (limit of detection,

LOD) брали граничне розведення ДНК, за якого виявляли продукт ампліфікації очікуваного розміру (класична ПЛР) або зростання кривої флуоресценції (ПЛР-РЧ).

Аналітичну специфічність методу ПЛР визначали як здатність ідентифікувати цільовий фрагмент ДНК збудника.

Збіжність результатів та їх відтворюваність визначали за багаторазового використання одного й того ж зразка та порівняння одержаних результатів.

Кількісно збіжність і відтворюваність результатів оцінювали за такими показниками, як стандартне відхилення та коефіцієнт варіації, що обраховували за формулою 2:

$$CV = \frac{SD}{Ct\ mean} \times 100 \%, \text{ де} \quad (2)$$

CV – коефіцієнт варіації;

SD – стандартне відхилення;

Ct mean – середнє значення Ct для 3-х повторів.

Аналізуючи збіжність результатів, брали до уваги те, що обраховане значення SD і CV для кожного досліджуваного зразка має бути нижчим від прийнятого для методу значення SD ($SD \leq 0,5$) та CV.

Діагностичну чутливість визначали як відношення позитивних зразків та загальної кількості досліджених зразків у відсотках.

Розрахунки проводили за формулою 3:

$$\text{Чутливість} = \frac{Ni^+}{Ni^+ + Nx^-} \times 100 \%, \text{ де} \quad (3)$$

Ni^+ – кількість істинно-позитивних результатів;

Nx^- – кількість хибно-негативних результатів.

Діагностичну специфічність визначали як відношення кількості негативних зразків панелі, узятих для аналізу, до загальної кількості досліджених зразків, що виражається у відсотках. Розрахунки здійснювали за формулою 4:

$$\text{Специфічність} = \frac{Ni^-}{Ni^- + Nx^+} \times 100 \%, \text{ де} \quad (4)$$

Ni^- – кількість істинно-негативних результатів;

Nx^+ – кількість хибно-позитивних результатів.

2.11. Приготування цільноклітинного антигена

Поверхневі антигени були отримані нами із дослідної добової культури шляхом центрифугування за 3,000x g протягом 5 хв для осадження клітин. Супернатант декантували, стерильно фільтрували через фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Клітини дворазово промивали стерильним 20 mM Tris буфером (pH 7,6), який містив 0,5 % детергента Triton X-100 (Sigma, США), та інкубували за постійного струшування протягом 60 хв за 37 °C.

Потім зразки центрифугували за 5000x g протягом 5 хв. Супернатант містив поверхневі антигени, які ми використовували в подальших дослідженнях.

Лізати бактерій готували в 1x PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄). Готували їх у буфері для лізису в нативних умовах (10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 % NP-40; 10 mM імідазол, pH 7,5). Лізис бактеріальних клітин проводили, обробляючи їх ультразвуком 20 кГц – 3 рази по 30 с з такими ж інтервалами на приладі SS-GEN-LAB. Після цього лізати центрифугували за температури 40 °C та 15000 обертів протягом 20 хв.

2.12. Електрофорез білків у денатуруючих умовах

Аналіз білків проводили стандартним методом електрофорезу за Лемлі в 12,5 %-му поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах [56]. Концентрацію білка визначали за $\lambda=280$ нм на спектрофотометрі “NanoDrop” (США).

Для приготування роздільного гелю змішували 30 %-ий розчин акриламід у (акриламід:N,N’метилен біс-акриламід 37,5:1), 1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10 %-ий розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 mM та персульфат амонію (0,1 %). Полімерізацію акриламід у ініціювали додаванням до нього TEMED (0,1 %).

Зразки для нанесення готували таким чином: 3 частини клітинного лізату чи розчину білка змішували з 1 частиною 4x буферу для зразків (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % glycerol; 4 %-ий ДСН; 0,2 M ДТТ; 0,1 %-ий бромфеноловий синій), прогрівали упродовж 5 хв за 95 °C.

Електрофорез проводили в електрофорезному буфері за фіксованої сили струму – 20–30 mA (25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 195 mM гліцин та 0,1 %-ий ДСН).

Після електрофорезу гель поміщали в розчин барвника (0,1 %-ий Кумасі діамантовий синій R250; 40 %-ий метанол, 10 %-ва оцтова кислота) на 20 хв. Після цього відмивали гель від фонового забарвлення шляхом кип'ятіння в дистильованій воді до отримання чіткого контрастного зображення.

2.13. Імуноферментний аналіз (ІФА)

Титрування антигенів та сироваток проводили за допомогою ІФА в непрямому варіанті проведення реакції. Тест виконували на 96-лункових плашках (*Sarstedt, Germany*). У кожен лунку вносили по 100 мкл розчину поверхневого антигена в розведеннях: 5 мкг/см³; 7,5 мкг/см³; 10 мкг/см³ та 15 мкг/см³ в 0,05 М карбонатно-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Інкубували упродовж 1 години за температури 37 °С, після чого три рази промивали 300 мкл ЗФР–0,05 % Tween 20 (ЗФР, рН 7,2). Кожну лунку блокували 100 мкл 5 %-ого розчину сухого молока в PBS протягом однієї години за температури 37 °С. Потім усі лунки промивали 5 %-вим розчином сухого молока на ЗФР. Після цього усі плашки інкубували протягом 60 хв за температури 37 °С, промивали тричі фосфатним буфером (рН 7,2) та вносили 100 мкл розведення 1:5,000 антимишиного кон'югату у 5 %-ому розчині сухого молока у фосфатному буфері. Після інкубування упродовж 60 хв та промивання в кожен лунку вносили 100 мкл ТМВ субстрату та зупиняли реакцію через 10 хв у темному місці додаванням 100 мкл стоп-реактиву в кожен лунку. Зчитування реакції проводили на рідері *BioRad Plate Reader (BioRAD, США)* за довжини хвилі 450 нм.

2.14. Отримання гіперімунної сироватки

Усі сироватки були титровані для визначення активності із застосуванням лізату цільноклітинного антигена, отриманого з музейного штаму та польових ізолятів *Str. suis*. Протеїнові фракції були розділені в білковому ПААГ електрофорезі за стандартним протоколом. Розділені на фракції білки були використані для вивчення антигенної активності. Для отримання гіперімунної сироватки крові мишей імунізували суспензією живих бактерій *Str. suis*. Підшкірно в ділянці спини тваринам вводили суспензію, що містила $2,5 \times 10^6$

мікробних клітин із додаванням неповного ад'юванта Фрейнда (*Sigma, USA*) – до 20 % від об'єму в дозі 0,2 см³. Повторну імунізацію проводили через 14 днів такою ж дозою. Через 21 добу після останнього щеплення тваринам вводили суспензію живих бактерій у кількості 5×10^6 КУО в дозі 1 см³. Сироватку отримували з крові, яку відбирали на 20-у добу після останнього введення антигена із серця від кожної миші в групі в кількості близько 1 см³. Її пулірували, аліквотували та зберігали в замороженому стані за температури -70°C в низькотемпературному холодильнику (*ThermoFisher Scientific, США*).

2.15. Статистичні методи

Статистичну обробку одержаних результатів виконували, використовуючи рекомендовані для вірусологічних досліджень методи з визначенням критерію Стьюдента та комп'ютерну програму “Microsoft Excel 10.0” із статистичним модулем StatPlus (analystsoft.com/ru/products/statplus/). Отримані результати досліджень статистично обробляли згідно з правилами рядової й альтернативної варіаційної статистики. Одержані значення кількісних ознак було представлено у вигляді $M \pm m$ з обов'язковою оцінкою достовірності розбіжностей за критерієм Стьюдента з урахуванням ступеня значущості розбіжностей (p). Якісні показники статистичної обробки результатів досліджень представлено у вигляді абсолютної кількості та/або відсотків.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вивчення епізоотичних особливостей та біологічних властивостей *Streptococcus suis*

Бактеріологічний моніторинг інфекційних захворювань тварин на території України нами проведено за 2016–2021 рр. з використанням даних офіційної звітності Держпродспоживслужби та власних досліджень. Одержані нами дані свідчать про значну поширеність бактеріальних захворювань серед сільськогосподарських тварин у різних регіонах.

У свинарських господарствах України бактеріози свиней реєструють щорічно, що пов'язано зі стресовими чинниками внутрішнього і зовнішнього характеру. Бактеріологічний моніторинг інфекційних захворювань свиней, зумовлених патогенними бактеріями, показав, що у 2016–2021 рр. основна інфекційна патологія була сталою, оскільки серед свиней здебільшого діагностували захворювання на колібактеріоз – у середньому в 41,9 % та набрякову хворобу – у 23,1 % випадків (рис. 3.1).

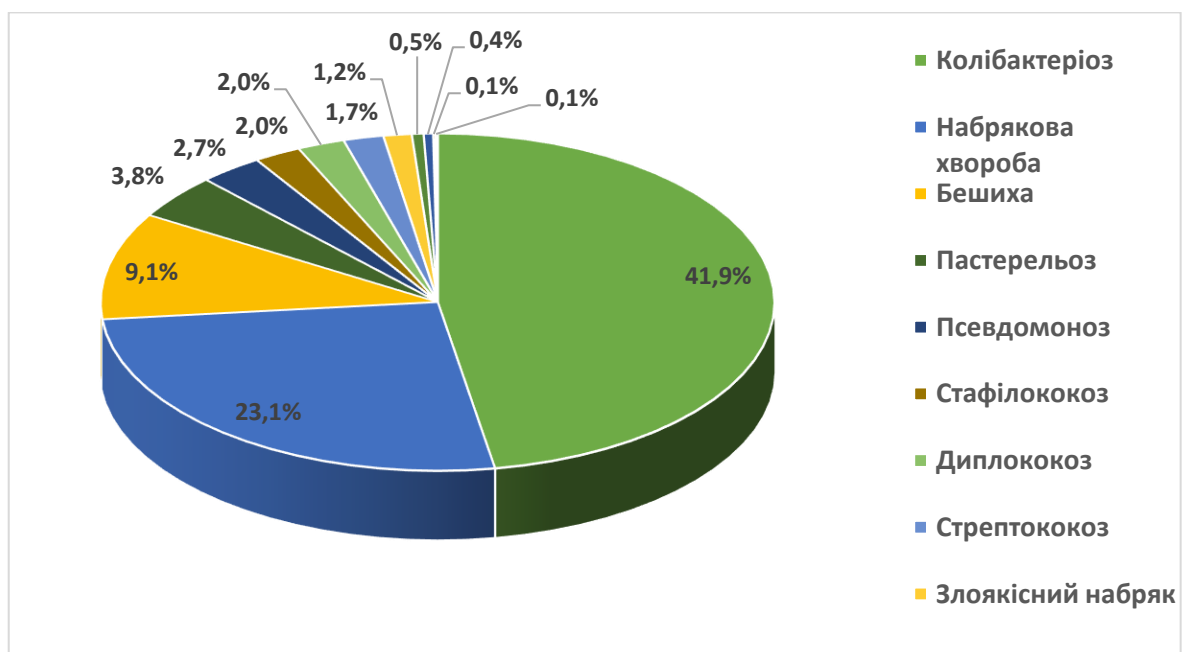


Рис. 3.1. Ступінь ураженості свиней бактеріальними інфекціями в господарствах України у 2016–2021 рр.

Високу ураженість поголів'я свиней спричиняють збудники сальмонельозу (5,8 %), інфекційної ентеротоксемії (5,6 %), пастерельозу (3,8 %), псевдомонозу (2,7 %), інфекцій стрептококової групи (1,7–2,0 % серед усіх бактеріозів) та інших патогенів, ступінь ураження якими був нижчим 1,7 % (злякисний набряк – 1,2 %; лістеріоз – 0,5 %; патогенний протей – 0,4 % від усіх виділених збудників бактеріального походження).

Кокова група збудників (стафілококи, диплококи і стрептококи) відігравали особливу роль в інфекційній патології свиней. Результати моніторингу показали зростання їхньої ролі в інфекційних процесах, яка в середньому серед підтверджених бактеріозів свиней складала за стрептококозу 1,7 %, за стафіло- та диплококозів – 2,0 %.

Усі інші інфекційні захворювання свиней разом становили 2,3 %. Із них: злякисний набряк – 1,2 %, лістеріоз – 0,5 %, патогенний протей – 0,4 % від одержаних позитивних результатів. За результатами епізоотологічного обстеження господарств встановлено, що збудники бактеріозів, які зумовлюють значну ураженість поголів'я тварин, мають високий ступінь антибіотикорезистентності.

Слід зауважити, що офіційні статистичні дані не завжди відображають повну картину циркуляції патогенних збудників у тваринницьких господарствах України. Це пов'язано з тим, що за доставки біологічного матеріалу в державні діагностичні лабораторії ветеринарної медицини надається супровідний документ, у якому зазначені конкретні захворювання, на які необхідно провести бактеріологічні дослідження та підтвердити чи відхилити діагноз. Тому бактеріологи працюють в обмеженому колі діагностичних досліджень. Інші ж мікроорганізми, у тому числі асоційовані патогени, не обліковують у звітності, оскільки діагностику щодо їх не проводять.

Асоційовані інфекції особливо ускладнюють проблему антибіотикорезистентності збудників бактеріозів тварин. Це пов'язано з одержанням *Str. suis* і визначенням ступеня їхньої чутливості до антибіотичних

препаратів кожного з асоціантів зокрема. Метаболічні процеси бактеріальних клітин збудників за перебігу асоційованих інфекцій в умовах *in vivo* дуже відрізняються від таких *in vitro* за посіву на живильні середовища, оскільки мають різну швидкість росту й розвитку та наявний між мікроорганізмами антагонізм, що призводить до помилкових результатів у дослідженнях та провокує ризик появи нових антибіотикорезистентних штамів патогенів (рис. 3.2).

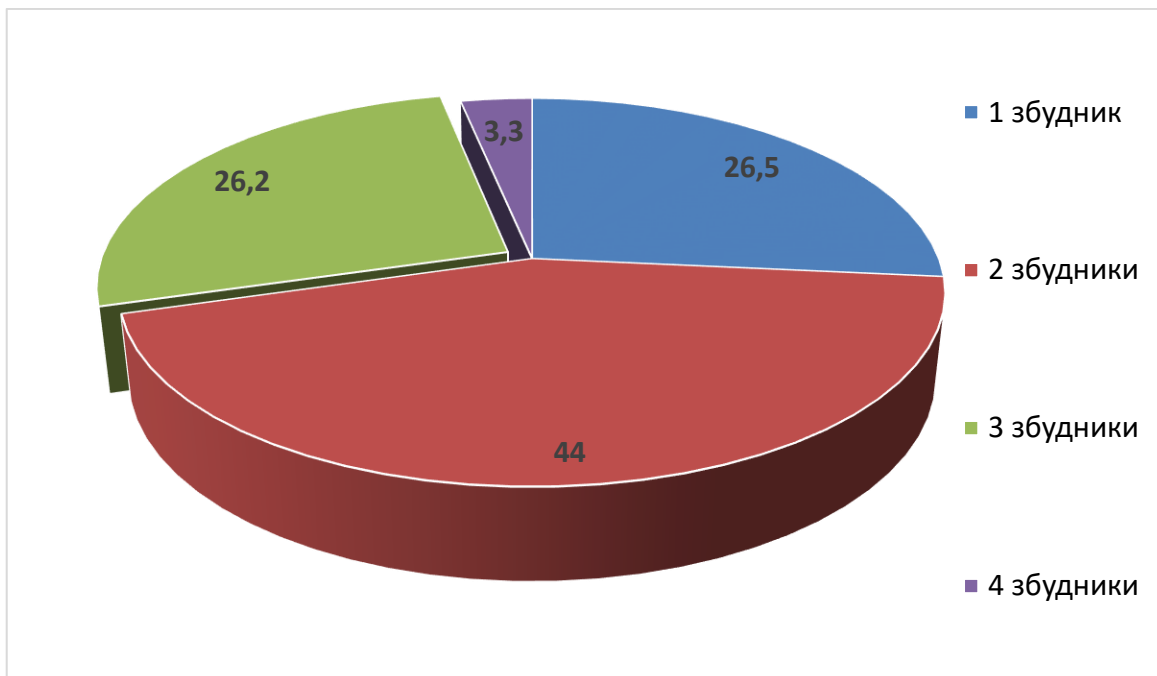


Рис. 3.2. Співвідношення (%) кількості збудників інфекційних захворювань свиней, виділених із тестових зразків одночасно за період 2017–2021 рр.

Результати мікробіологічних досліджень біологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин, проведених у рамках цього дослідження, підтверджують асоційований перебіг бактеріальних інфекцій. Основний видовий склад асоційованих збудників представлений *E. coli*, *P. multocida*, *S. aureus*, *Str. suis*, *K. pneumoniae*.

Переважаюча кількість виділених нами культур *Str. suis* віднесена нами до серотипу 2. Літературні дані свідчать про те, що більшість авторів вважають цей

серотип основним інфекційним фактором при захворюванні свиней на стрептококоз.

Обстеження свиноферм, на яких було виявлено стрептококоз, показало їхнє стаціонарне неблагополуччя, спричинене такими факторами, як надмірне перевантаження сектора опоросу і підвищений у цих приміщеннях мікробний фон, неякісна підлога, яка є причиною пошкодження кінцівок свиней, порушення принципу “пусто-зайнято” у тваринницьких приміщеннях, неякісна дезінфекція родильного відділення.

Аналіз результатів досліджень патологічного матеріалу, відібраного у свиней 30–45-денного віку із підозрою на стрептококоз, показав, що у 26,5 % випадків *Str. suis* викликав гостру моноінфекцію, у 14,7 % випадків разом із *Str. suis* виділяли *E. Coli*; у 11,8 % випадків – з *Pasteurella multocida*, у 8,8 % випадків – із *Haemophilus parasuis*. Такі мікроорганізми, як *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Bordetella spp* разом виділяли у 2,9 % випадків. Змішана інфекція спостерігалась у 29,4 % випадків (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Асоціації збудників інфекційних захворювань, виділених із патологічного матеріалу від свиней із підозрою на стрептококоз

Вид асоціативних збудників	Зразки (%)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2,9
<i>Actinobacillus suis</i>	2,9
<i>Haemophilus parasuis</i>	8,8
<i>E. coli</i>	14,7
<i>Pasteurella multocida</i>	11,8
<i>Bordetella spp</i>	2,9
<i>S.suis</i> у вигляді моноінфекції	26,5
Змішана інфекція за участі трьох і більше збудників	29,4
Всього	100 %

Для визначення ступеня патогенності музейного штаму та ізолятів збудника *Str. suis* за LD₅₀ нами була проведена серія дослідів на мишах, у результаті чого було встановлено, що найвищу патогенність мали 5 ізолятів та музейний штаб *Str. suis* (LD₅₀ для білих мишей становила менше 100 бактерійних клітин на голову). Дослідження показали, що ці штами проявляють різний ступінь вірулентності щодо лабораторних тварин – нелінійних білих мишей.

Для визначення ступеня вірулентності штаму та ізолятів *Str. suis* проводили дослідження з визначення LD₅₀, результати яких наведені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Визначення ступеня вірулентності музейного штаму та ізолятів *Str. suis* на нелінійних білих мишах, M±m, n=10

Назва збудника	Серо-тип	Загибель мишей (%) при введенні бактерій різних ізолятів, КУО						LD ₅₀ , КУО/см ³
		1×10 ⁶	1×10 ⁵	1×10 ⁴	1×10 ³	1×10 ²	10	
<i>Str. suis</i> NCTC 10234	2	100	100	100	100	80	-	275±20
<i>Str. suis</i> 16/2	2	90	70	10	-	-	-	55000±1290
<i>Str. suis</i> 14	2	100	90	10	-	-	-	37674±1175
<i>Str. suis</i> 31	2	100	90	30	-	-	-	25111±1321
<i>Str. suis</i> 17	2	100	100	100	50	30	-	748±87
<i>Str. suis</i> 05	2	-	-	-	-	-	-	авірулентний
<i>Str. suis</i> 3/2	2	100	100	100	80	80	10	187±28
<i>Str. suis</i> 10	2	100	100	100	80	70	-	380±48
<i>Str. suis</i> 21	2	100	100	100	100	70	10	225±40
<i>Str. suis</i> 19	2	100	100	100	50	40	10	891±63

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що найвищий ступінь вірулентності був притаманний *Str. suis* штаму *Str. suis* NCTC 10234 (275 ± 20 КУО/см³) та ізолятам *Str. suis* 3/2 (187 ± 28 КУО/см³); *Str. suis* 21 (225 ± 40 КУО/см³); *Str. suis* 10 (380 ± 48 КУО/см³); *Str. suis* 17 (735 ± 34 КУО/см³) та *Str. suis* 19 (891 ± 63 КУО/см³) за середнього розрахунку на 1 дослідну тварину. Ці ізоляти *Str. suis* рекомендовані для проведення паспортизації та депонування з метою використання їх при виробництві профілактичних засобів проти збудника *Str. suis* і для контролю їхньої імуногенності та протективних властивостей. При проведенні дослідів було встановлено, що загибель інфікованих тварин наставала з третьої до п'ятої доби після введення відповідних інокулянтів. Також було вивчено локалізацію ізолятів збудника *Str. suis* (таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Вивчення особливостей локалізації високовірулентних ізолятів збудника *Str. suis* у тканинах органів заражених лабораторних білих мишей, n=10

Група та ізолят <i>Str. suis</i>	КУО/см ³ в 0,2 см ³ суспензії	Виділення культури збудника з патологічного матеріалу				
		легенів	печінки	селезінки	головного мозку	зразків крові
Гр. № 1; ізолят 3/2	1×10^6	1/10	8/10	5/10	5/10	8/10
Гр. № 2; ізолят 10	1×10^6	2/10	7/10	6/10	6/10	10/10
Гр. № 3; ізолят 21	1×10^6	1/10	9/10	5/10	7/10	7/10
Гр. № 4; ізолят 19	1×10^6	3/10	8/10	8/10	6/10	8/10
Гр. № 5; контрольна група тварин	—	—	—	—	—	—
% виділених до усіх	—	17,5	80	60	60	82,5

Аналіз результатів досліджень з визначення локалізації збудника *Str. suis* у тканинах організму показав, що його здебільшого виділяли зі зразків крові – до 82,5 % випадків в усіх групах дослідних білих мишей, що, імовірно, було зумовлено розвитком септичних процесів у тварин, викликаних збудником. Високий ступінь локалізації збудника був виявлений у зразках печінки – як органу, що фільтрує і нейтралізує токсини, оскільки *Str. suis* був виділений у 80 % заражених тварин. Із селезінки та головного мозку виділяли *Str. suis* у 60 % випадків після інокуляції його білим мишам. Найменшу частоту виділення *Str. suis* спостерігали при дослідженні зразків легень – до 17,5 % серед усіх заражених тварин.

При дослідженні ступеня патогенності виділених нами ізолятів на мишах було встановлено, що не всі з них мали високу патогенність і здатність викликати захворювання в лабораторних тварин.

Збудник *Str. suis* має властивість персистувати у здорових тварин без прояву клінічних ознак захворювання. Однак зразки патологічного матеріалу, отримані з мозку загинувших поросят, свідчать про безпосередню участь збудника стрептококозу в розвитку інфекційного процесу, а саме – в розвитку енцефаломієліту (табл. 3.4 та 3.5).

Таблиця 3.4

Результати мікробіологічних досліджень патологічного та біологічного матеріалу, відібраного із трупів свиней, на виявлення *Str. suis*

Вид патологічного матеріалу	Кількість виділених ізолятів (%)
Головний мозок	33,3
Зразки легень	14,7
Зразки тканин органів від свиней з ознаками септицемії	4,1
Синовіальна рідина уражених суглобів	37,5
Середостінні лімфатичні вузли	10,4
Всього досліджених пат- та біоматеріалів	100 %

Як свідчать дані табл. 3.4, більшість усіх патогенних ізолятів *Str. suis* була виділена нами з головного мозку (33,3 %) та із суглобів з ознаками артрити (37,5 %), легенів (14,7 %) та з патологічного матеріалу від тварин з ознаками генералізованої септичної інфекції (4,1 %). Із лімфатичних вузлів *Str. suis* вдалося виділити лише в 10,4 % випадків.

Таблиця 3.5

**Етіологічна роль ізолятів збудника стрептококозів свиней
за асоційованих інфекцій**

Клінічні ознаки захворювання у свиней	Виділено ізолятів (шт.)	
	патогенні	непатогенні
Менінгіт, енцефаліт, хоріоїдит	1	3
Артрит, поліартрит, періепікардит, плеврит	2	5
Септицемія	1	-
Катаральна бронхопневмонія, фібриозна пневмонія, інтерстиціальна пневмонія	-	4
Змішані захворювання	1	8
Всього	5	20

Дані таблиці 3.5 вказують на те, що за генералізації патологічного процесу стрептококи можуть відігравати роль опортуністичної мікрофлори, беручи участь у патологічних процесах, не проявляючи при цьому патогенних властивостей. За гострих уражень головного мозку ми виявляли переважно патогенні ізоляти, при менш тяжких ураженнях таких, як артрит, бронхопневмонія та ентерит, реєстрували значну кількість непатогенних ізолятів. Це зумовлено змішаним перебігом хвороби та більш агресивними основними патогенами.

При дослідженні патологічного матеріалу водночас із *Str. suis* часто виявляли й інші збудники бактеріальних захворювань (*E. coli*, *P. multocida*., *H.*

parasuis та інших), що свідчить про змішаний перебіг стрептококових захворювань свиней. Ці дані збігаються з результатами зарубіжних авторів, згідно з якими *Str. suis* є основним інфекційним агентом у розвитку енцефалітів та енцефаломієлітів, незважаючи на інші бактеріальні агенти, що виділяються одночасно із патогенним стрептококом (табл.3.6).

Таблиця 3.6

**Етіологічна роль ізолятів збудника стрептококозів
свиней за моноінфекцій**

Клінічні ознаки захворювання у свиней	Виділено ізолятів (шт.)	
	патогенні	непатогенні
Менінгіт, енцефаліт, хоріоїдит	5	-
Артрит, поліартрит, пери- та епікардит, плеврит	-	1
Септицемія	1	-
Катаральна бронхопневмонія, фібриозна пневмонія, інтерстиціальна пневмонія	-	-
Змішані захворювання	2	-
Всього	8	1

Результати проведених нами досліджень співпадають із даними інших науковців щодо найбільшої кількості випадків захворювання свиней на стрептококоз у 30–45-денному віці.

При проведенні патологоанатомічних досліджень загиблих тварин суттєвих патологічних уражень тканин і відмінностей між інокульованими ізолятами нами не було виявлено.

Таким чином, при дослідженні патологічного і біологічного матеріалу від свиней збудник *Str. suis* здебільшого виділяли із синовіальної рідини уражених артритом суглобів (37,5 % від усіх досліджених зразків),

головного мозку (33,3 %), зразків легень (14,7 %) і середостінних лімфатичних вузлів (10,4 % відповідно). Із патологічного і біологічного матеріалу цих тварин нами було виділено 34 ізоляти стрептококів. Вивчення культуральних та ферментативних властивостей цих ізолятів підтвердило їхню належність до роду *Streptococcus*.

Найвищий ступінь вірулентності (LD_{50}) був властивий штаму *Str. suis* NCTC 10234 (275 ± 20 КУО/см³) до білих мишей та ізолятам 3/2 (187 ± 28 КУО/см³); 21 (225 ± 40 КУО/см³); 10 (380 ± 48 КУО/см³) та 19 (891 ± 63 КУО/см³) за середнього розрахунку на одну дослідну тварину. Ці ізоляти *Str. suis* рекомендовані для проведення паспортизації та депонування з метою їхнього застосування при виробництві профілактичних засобів проти збудника *Str. suis* та для контролю їхньої імуногенності та протективних властивостей.

Результати досліджень із визначення локалізації збудника в організмі лабораторних тварин *Str. suis* у тканинах організму вказують на те, що найвищим рівень був у печінці (80 %), селезінці та головному мозку (60 %). У зразках крові збудник виділено у 82,5 % від усіх зразків. Найменшу частоту виділення *Str. suis* спостерігали при дослідженні зразків легень – близько 17,5 % серед усіх заражених білих мишей.

3.2. Виділення чистих культур та дослідження морфологічних, культуральних та ферментативних властивостей ізолятів *Streptococcus suis*

Для попередньої ідентифікації стрептококів нами були досліджені морфологічні ознаки грампозитивних коків, характер росту на кров'яному агарі (здатність до альфа-гемолізу), наявність пігменту, каталазна та коагулазна активність. Усі виділені ізоляти мали характерну морфологію та ферментативні властивості.

Культури стрептококів усіх досліджених ізолятів під час культивування в термостаті протягом 24 год. за температури $35 \pm 0,5$ °C добре росли в МПБХ із характерним через 20–24 год. рівномірним помутнінням без плівки та пристінного

кільця, згодом – з утворенням осаду. При культивуванні на МПАХ через 24–48 год. утворювалися дрібні гладенькі, прозорі, росинчасті колонії з рівними краями (S-форми), які через 72–96 год. набували білого кольору. Майже всі ізоляти, що досліджувались (95 %), через 24 год. культивування на кров'яному агарі утворювали зону гемолізу.

У мазках крові та мікроскопічних препаратах із культур збудника, пофарбованих за Грамом, спостерігали лише типові грампозитивні коки, розташовані поодинокі, попарно або короткими ланцюжками, що вказувало на чистоту культури. При вивченні рухливості *Str. suis* у препаратах “роздавлена крапля” збудник був нерухомий, що відповідає видовим та родовим характеристикам.

Після 24-годинного культивування на кров'яному агарі розмір колоній *Str. suis* становив приблизно 1–2 мм і мав добре видиму зону гемолізу навколо них. У бульйонних культурах спостерігався ріст, характерний для стрептококової мікрофлори.

Ферментативні властивості всіх досліджених штамів та ізолятів були майже ідентичними. Результати досліджених нами ферментативних властивостей відповідали даним літератури. Так, усі ізоляти ферментували рафінозу з утворенням кислоти без газу, що характерно для *Str. suis* серотипу 2 та не характерно для серотипу 1.

Усі досліджувані ізоляти також добре ферментували аргінін, саліцин, глікоген, D-глюкозу, сахарозу, галактозу, мальтозу, лактозу, трегалозу, інουλін. Позитивними були реакції на α -галактозидазу, β -глюкуронідазу та лейцин-ариламідазу, що підтверджувало ознаки виду *Str. suis* та вірогідну диференціацію культур збудника.

Результати досліджень біохімічних властивостей дослідного штаму та ізолятів *Str. suis* представлено в таблиці 3.7 та 3.8.

Таблиця 3.7

Ферментативні властивості музейного штаму та ізолятів *Str. suis*

Показник	Штами <i>Str. suis</i>								
	NCTC 10234	3/2	16/2	10	21	17	14	31	05
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Інулін	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-арабіноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-маніт	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-сорбіт	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гліцерин	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-рибоза	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Саліцин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ескулін	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гіппурат	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Продукування індолу	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Лужна фосфатаза	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α -галактозидаза	–	–	–	–	–	–	+	+	+
β -глюкуронідаза	+	+	+	+	+	+	+	–	–
β -галактозидаза	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Гіалуронідаза	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Рафіноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка. “+” – позитивна реакція, “–” – негативна реакція

Таблиця 3.8

Ферментативні властивості патогенних ізолятів *Str. suis*, виділених із патологічного матеріалу від свиней

Показник	Ізоляти <i>Str. suis</i>				
	з мозку	з легень	із суглобів	із крові	із лімфатичних вузлів
1	2	3	4	5	6
D-глюкоза	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+

Продовження таблиці 3.8

1	2	3	4	5	6
Мальтоза	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+
Інулін	+	+	+	+	+
L-арабіноза	–	–	–	–	–
D-маніт	–	–	–	–	–
D-сорбіт	–	–	–	–	–
Гліцерин	–	–	–	–	–
D-рибоза	–	–	–	–	–
Саліцин	+	+	+	+	+
Ескулін	+	+	+	+	+
Гішпурат	–	–	–	–	–
Продуктування індолу	–	–	–	–	–
Лужна фосфатаза	–	–	–	–	–
α -галактозидаза	–	–	–	–	–
β -глюкуронідаза	+	+	+	+	+
β -галактозидаза	+	+	+	–	+
Гіалуронідаза	+	+	+	+	+
Рафіноза	–	+	+	+	+

Примітка. “+” – позитивна реакція, “–” – негативна реакція

Характерною особливістю ізолятів *Str. suis*, виділених від свиней, було те, що вони не ферментували маніт, що відповідає ідентифікації збудника за Берджі (Bergey) та співпадає з даними літератури (понад 70 % ізолятів не ферментують маніт) [9].

Найголовнішими біохімічними ознаками ізолятів *Str. suis* були позитивні реакції на ферментацію глюкози, сахарози, галактози, мальтози, трегалози. Негативні результати були отримані щодо розщеплення арабіози, маніту, сорбіту, рибози та гліцерину. Слабопозитивний результат щодо ферментації рафінози був виявлений у 40 % досліджених ізолятів.

Грампозитивні коки родини *Streptococcaceae* нецільових видів у процесі дослідження патологічного матеріалу попередньо диференціювали від інших

грампозитивних коків на підставі морфологічних та культуральних властивостей, негативного тесту на каталазу, відсутності пігментоутворення та здатності утворювати зони альфа-гемолізу на кров'яному агарі. Стрептококи визначали за типовою морфологією, утворенням слизових колоній, оточених зоною α -гемолізу, ентерококи – за типовою морфологією, оскільки це видовжені овальні клітини, розташовані у вигляді коротких ланцюжків.

Результати біохімічної ідентифікації підтвердили видову належність попередньо ідентифікованих *Str. suis* (n=15).

Таким чином, нами встановлено, що ферментативні властивості дослідних ізолятів *Str. suis* відповідають профілю, характерному для *Str. suis* 1-го та 2-го серотипів. Певні відмінності спостерігали при ферментуванні β -галактозидази, гіалуронідази та рафінози.

Біохімічні властивості різних за патогенністю ізолятів 2-го типу суттєво не відрізнялися.

Отже, проведені нами дослідження показали, що всі патогенні ізоляти *Str. suis* мають типові для серотипів 1 та 2 культурально-морфологічні та ферментативні ознаки. Значних відмінностей щодо біохімічних властивостей між окремими ізолятами *Str. suis* одного серотипу нами не було виявлено.

3.3. Вивчення чутливості отриманих ізолятів збудника стрептококозу до антимікробних речовин

Нами вивчено чутливість 34-х культур ізолятів *Str. suis* до 11-ти антимікробних речовин. Ізоляти з усіх господарств відбирали у 2017 р. – 25 ізолятів та 2021 – 9 ізолятів. Це дозволило порівняти стійкість до антибактеріальних речовин з динамікою в часі. Усі культури виявилися чутливими до пеніциліну та амоксициліну, які проявляли бактеріостатичну та бактерицидну дію щодо ізолятів *Str. suis* у концентрації 0,012–0,030 мкг/см³. У 2017 р. більшість ізолятів виявилися чутливими до фтористих хінолонів – у 2021 р. енрофлоксацину та ципрофлоксацину (за концентрації 0,025–0,1 мкг/см³), проте нами було виявлено суттєвий ріст кількості стійких мікроорганізмів. Майже

всі досліджувані ізоляти були резистентними до еритроміцину (88,2 %), кліндаміцину (76,5 %), а майже половина не проявляли чутливість до цефалексину (55,9 %). 44,1 % ізолятів були не чутливими до гентаміцину, а 20,6 % – до енрофлоксацину. Кількість нечутливих ізолятів до інших антибіотиків не перевищувала 16 % (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Чутливість 34-х ізолятів *Str. suis*, виділених у 2017 та 2021 роках
до антибіотиків**

Назва антибіотика	МІК (мкг/см ³)	Ізолятів	Висока чутливість	Помірна чутливість	Резистентність
1	2	3	4	5	6
Пеніцилін	0,016 – 0,028	Кількість	18	15	1
		%	52,9	44,1	2,9
Амоксицилін	0,012 – 0,030	Кількість	29	5	0
		%	85,3	14,7	0,0
Цефтріаксон	0,015 – 0,021	Кількість	26	3	5
		%	76,5	8,8	14,7
Цефалексин	0,032 – 0,046	Кількість	15	0	19
		%	44,1	0,0	55,9
Еритроміцин	0,35 – 0,62	Кількість	1	3	30
		%	2,9	8,8	88,2
Кліндаміцин	0,425 – 0,91	Кількість	3	5	26
		%	8,8	14,7	76,5
Енрофлоксацин	0,040 – 0,1	Кількість	19	8	7
		%	55,9	23,5	20,6

Продовження таблиці 3.9

1	2	3	4	5	6
Ципрофлоксацин	0,025 – 0,09	Кількість	17	14	3
		%	50,0	41,2	8,8
Тетрациклін	0,25 – 0,60	Кількість	22	7	5
		%	64,7	20,6	14,7
Доксициклін	0,20 – 0,78	Кількість	17	12	5
		%	50,0	35,3	14,7
Гентаміцин	0,04 – 0,1	Кількість	14	5	15
		%	41,2	14,7	44,1

На рисунку 3.3 показано проведення оцінки мінімальної інгібуючої концентрації АБС, яку візуально визначали за комірками, у яких відсутній ріст, та відповідно концентрацію, за якої не відбувалося помутніння розчину, що свідчить про експоненціальний ріст культури *Str. suis*.

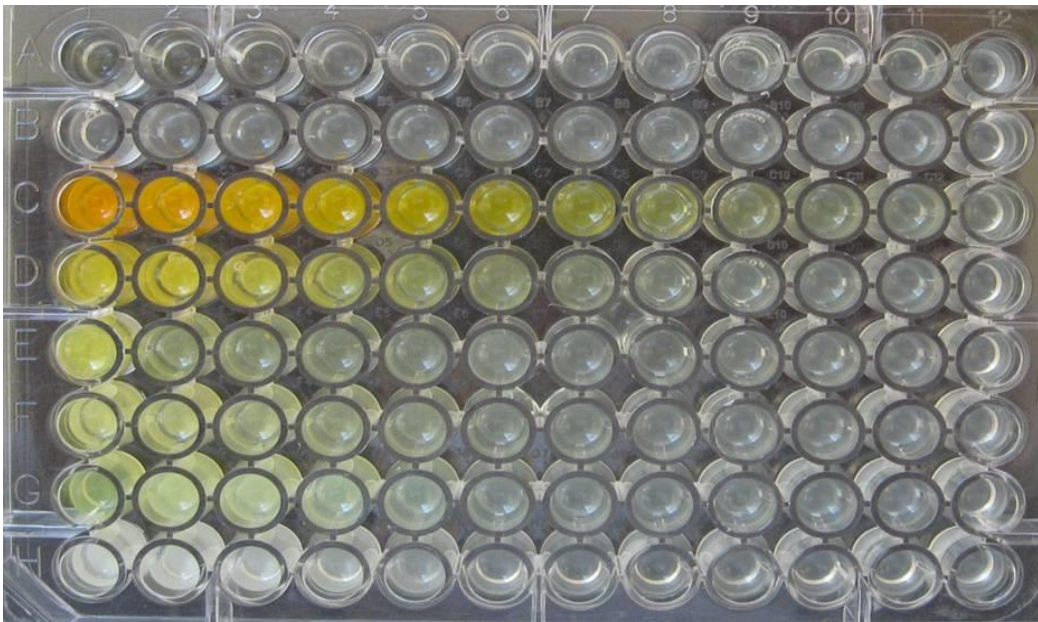


Рис. 3.3. Визначення МІК (мкг/см³) антибіотиків відносно *Str. suis* методом послідовних розведень на 96-лунковій плашці

У таблицях 3.10 та 3.11 показано динаміку змін чутливості мікроорганізмів до найбільш застосовуваних антибіотичних препаратів у 2017 та 2021 роках.

Таблиця 3.10

**Ефективність антимікробних препаратів щодо ізолятів *Str. suis*,
виділених у 2017 р.**

Назва антибіотика	Висока чутливість %	Помірна чутливість %	Резистентність %
Пеніцилін	56,0	44,0	0,0
Амоксицилін	84,0	16,0	0,0
Цефтріаксон	80,0	12,0	8,0
Цефалексин	44,0	0,0	56,0
Еритроміцин	4,0	8,0	88,0
Кліндаміцин	8,0	12,0	80,0
Енрофлоксацин	68,0	24,0	8,0
Ципрофлоксацин	52,0	44,0	4,0
Тетрациклін	68,0	16,0	16,0
Доксициклін	52,0	32,0	16,0
Гентаміцин	48,0	12,0	40,0

Таблиця 3.11

**Ефективність антимікробних препаратів щодо *Str. suis*,
виділених у 2021 році**

Назва антибіотика	Висока чутливість, %	Помірна чутливість, %	Резистентність, %
1	2	3	4
Пеніцилін	44,4	44,4	11,1

Продовження таблиці 3.11

1	2	3	4
Амоксицилін	88,9	11,1	0,0
Цефтріаксон	77,8	0,0	22,2
Цефалексин	33,3	0,0	66,7
Еритроміцин	0,0	11,1	88,9
Кліндаміцин	8,3	22,2	66,7
Енрофлоксацин	22,2	22,2	55,6
Ципрофлоксацин	44,4	33,3	22,2
Тетрациклін	88,9	0,0	11,1
Доксициклін	55,6	33,3	11,1
Гентаміцин	22,2	22,2	55,6

Згідно з отриманими даними, високою була стійкість бактерій до еритроміцину. За весь період досліджень нами були виявлені 34 чутливі ізоляти. Кількість стійких *Str. suis* до кліндоміцину зменшилася з 80 % до 66,7 %, проте показники чутливості залишилися незмінними. Чутливість до гентаміцину знизилася із 63 % до 24 %. Антибіотики тетрациклінової групи (доксициклін та тетрациклін), навпаки, дещо збільшили перспективи використання для терапії кокових мікроорганізмів із 68–52 % до 88,9–52,6 %.

Антибіотики тетрациклінової групи (доксициклін та тетрациклін), навпаки, дещо збільшили перспективи використання для терапії кокових мікроорганізмів із 68–52 % до 88,9–52,6 %.

Кількість стійких ізолятів *Str. suis* до антибіотиків фторхінолонової групи (енрофлоксацину та ципрофлоксацину) зросла з 8 % та 4 % до 55,6 % та 22,2 %. Подібну тенденцію спостерігали щодо цефалоспоринових антибіотиків: кількість резистентних ізолятів зросла із 8 % та 56 % у 2017 р. до 22,2 % та 66,7 % – у

2021 р. Слід зазначити, що виявлена нами стійкість до двох і більше антибіотиків в ізолятах 2021 р. зростає, порівняно з ізолятами 2017 р.

Специфічні до кокової мікрофлори антибіотики в господарствах майже не застосовують, оскільки ці препарати, які мають вузький спектр дії, в умовах інтенсивного свинарства через комплексну патологію, зумовлену кількома збудниками, які можуть мати різну резистентність, у тому числі зумовлену видовою, є неперспективними. За таких умов лікарі господарств використовують антибіотики широкого спектра дії, які часто мають низьку ефективність саме щодо кокової інфекції. Останнє на фоні зниження кількості чутливих мікроорганізмів інших груп провокує генералізацію стрептокової інфекції, спричиненої резистентними штамми. Тому комплексний підхід до оцінки загальної антибіотикорезистентності мікробіоти з патологічного матеріалу необхідно доповнювати виділенням окремих збудників та визначенням їхньої чутливості задля максимально дієвої антибіотикотерапії та зниження подальшого поширення резистентних штамів.

При виконанні завдань дисертаційної роботи нами було досліджено синергічну дію антибіотичних сполук на музейні культури *Str. suis*, щоб оцінити можливість їх одночасного застосування. Після вивчення протимікробної активності окремих сполук та визначення зон затримки росту нами було досліджено їх на суміші антибіотиків в об'ємному співвідношенні 1 до 1 на дисках, які кладуть на попередньо засіяне тест-мікроорганізмом агаризоване середовище. Були також проведені дослідження щодо можливості підсилення антибіотичної дії визначених нами найбільш активних антибіотичних субстанцій іншими протимікробними препаратами. Перед початком дослідів урахували дані літератури щодо сумісності цих субстанцій з іншими речовинами та сполуками.

При вивченні окремих протимікробних субстанцій щодо тест-мікроорганізму *Str. suis* NCTC 10234 нами було виявлено синергічну дію між комплексами таких препаратів: окситетрациклін – тилозин, окситетрациклін –

ципрофлоксацин, окситетрациклін – канаміцин та окситетрациклін – поліміксин (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Результати вивчення синергічної дії окремих протимікробних субстанцій щодо *Str. suis* NCTC 10234

№ з/п	Субстанції, що застосовувалися для вивчення комплексної дії окремо та в суміші в об'ємному співвідношенні 1:1	Зміна зони затримки росту <i>Str. suis</i> P 209 (\pm мм)
1	Гентаміцин – окситетрациклін	0 \pm 1
2	Окситетрациклін – сульфадиметоксин*	-3 \pm 1
3	Окситетрациклін – тилозин	+5 \pm 2
4	Енрофлоксацин – сульфадиметоксин*	0 \pm 1
5	Окситетрациклін – канаміцин	+2 \pm 1
6	Цефалексин – окситетрациклін	0 \pm 2
7	Окситетрациклін – поліміксин	+4 \pm 1
8	Енрофлоксацин – ципрофлоксацин	0 \pm 1
9	Тилозин – гентаміцин	1 \pm 1
10	Енрофлоксацин – триметоприм	+2 \pm 1
11	Окситетрациклін – ципрофлоксацин	+3 \pm 1

Примітка. * – Сульфадиметоксин давав зону затримки росту меншу, ніж препарат, що вивчався в комплексі.

Такі комбінації АБС, як енрофлоксацин – ципрофлоксацин, тилозин – гентаміцин, окситетрациклін – сульфадиметоксин, енрофлоксацин – сульфадиметоксин не проявляли підвищеної антимікробної активності, а зони затримки росту були навіть нижчими, ніж при застосуванні монопрепаратів.

3.4. Вивчення молекулярно-генетичних властивостей *Streptococcus suis*

Визначення належності штаму та ізолятів до родини *Str. suis* проводили на основі аналізу нуклеотидної послідовності ділянок гена *gdh*

(глутаматдегідрогеназа) (AF229683.1), який є висококонсервативним структурним геном, на відміну від інших протеїнокодуючих генів. Нами розраховано набір праймерів для видового визначення *Str. suis* методом класичної плр.

Для підтвердження протоколу реакції було досліджено 12 музейних штамів коків. Негативний контроль та інші види мікроорганізмів не утворювали продукту ампліфікації. Після успішної апробації протоколу реакції вона була застосована для підтвердження родової належності отриманих нами польових ізолятів, результати чого показано на рисунку 3.4.

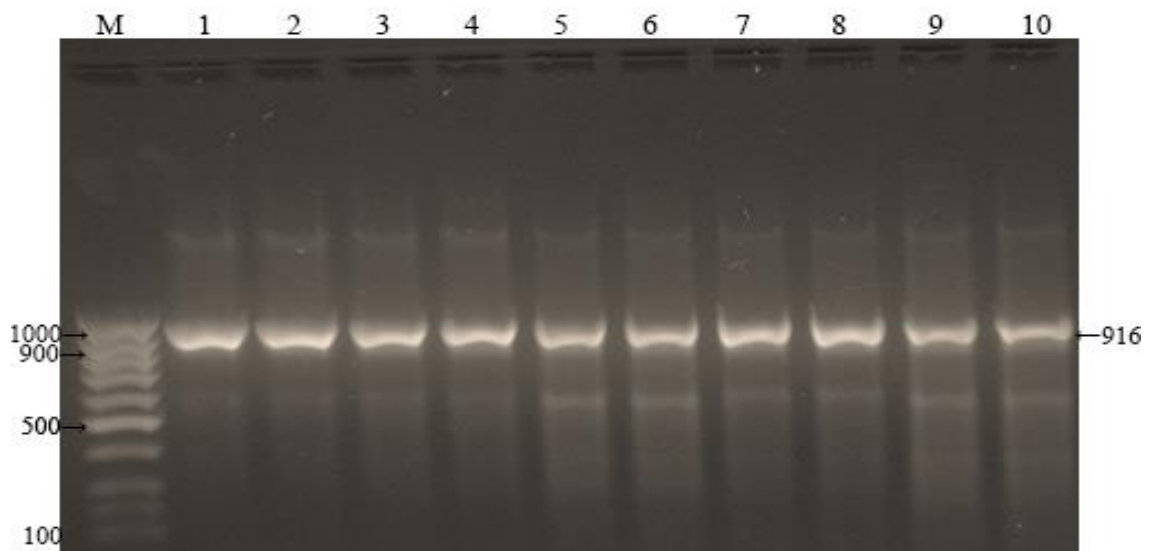


Рис. 3.4. Виявлення специфічної ділянки консервативного гена *gdh* для видового визначення *Str. suis*. Доріжки: М – 100 bp маркер; 1 – *Str. suis* NCTC 10234; 2-10 – ізоляти *Str. suis* (наявність специфічного фрагмента 916 п.н.); 11-12 – негативний контроль.

Усі 34 досліджені ізоляти, видова належність яких була попередньо визначена за біохімічними, морфологічними та культуральними властивостями, були ідентифіковані як *Str. suis* із наявністю продукту ПЛР розміром 916 п.н, що відповідає очікуваному розміру. У подальшому нами була використана мультиплексна ПЛР, що дозволила виявити *Str. suis* з одночасною ідентифікацією 8-ми його серотипів. На електрофореграмі (рис. 3.5 та 3.6) показані характерні смужки ампліконів, отриманих у результаті проведених досліджень.

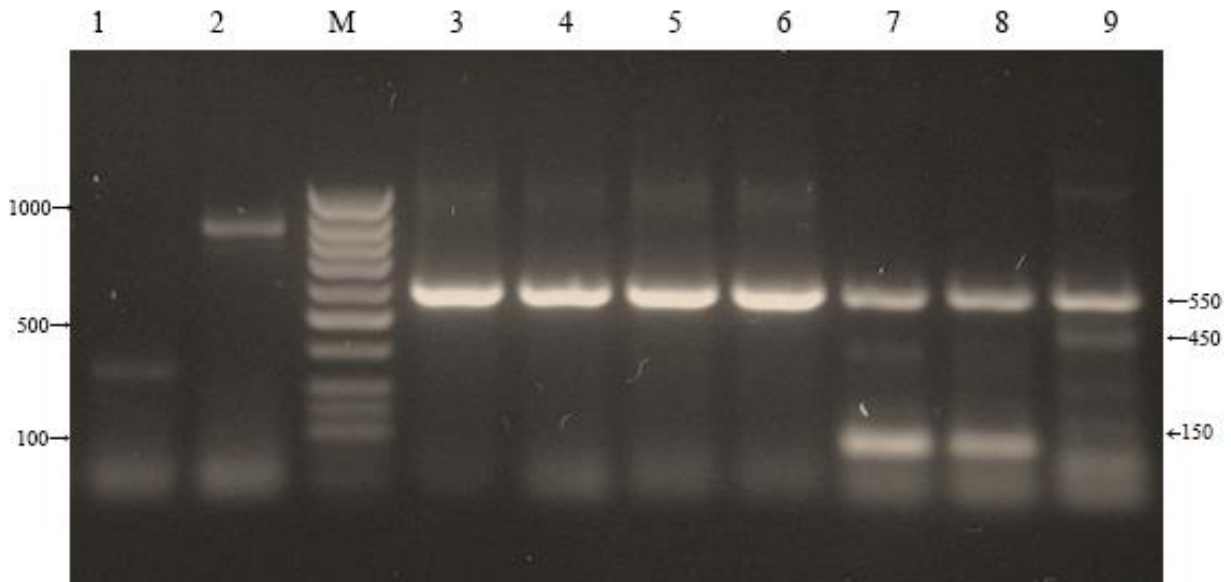


Рис. 3.5. Електрофореграма результатів серотипування ізолятів збудника стрептококозу свиней: 1 – *Micrococcus luteus* (негативний контроль); 2 – *S. faecalis* (негативний контроль); 3–9 (550 п.н.) – *Str. suis* серотип 1 та 14; 7, 8 (150 п.н.) – *Str. suis* серотип 7; 9 (450 п.н.) – серотип 2 та 1/2; М – маркер молекулярної маси

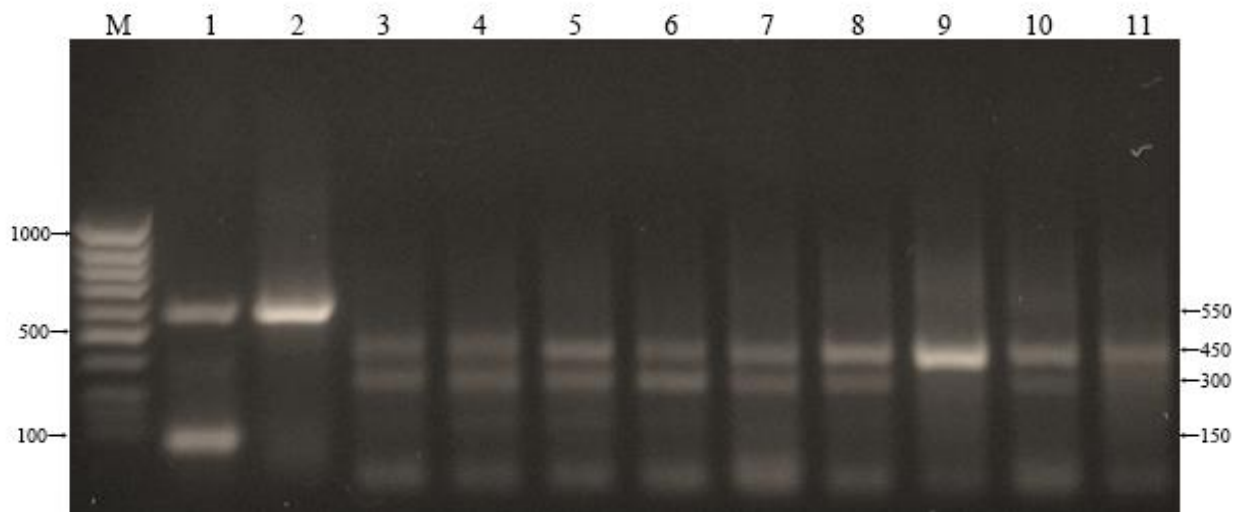


Рис. 3.6. Електрофореграма результатів серотипування ізолятів збудника стрептококозу свиней: 1, 2 (550 п.н.) – *Str. suis* серотип 1 та 14; 3–8 (300 п.н.) – *Str. suis* серотип 9; 1 (150 п.н.) – *Str. suis* серотип 7; 3–11 (450 п.н.) – *Str. suis* серотип 2 та 1/2; М – маркер молекулярної маси

Результати серотипування ізолятів, отриманих із різного патологічного матеріалу, представлені в табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Результати серотипування *Str. suis*, виділеного зі зразків патологічного та біологічного матеріалу, відібраного із трупів свиней

Вид патологічного матеріалу	Кількість виділених ізолятів <i>Str. suis</i>	Серотип
Головний мозок	4	2, 1/2
Легені	7	2, 7, 10
Селезінка	4	2, 1/2
Синовіальна рідина уражених суглобів	7	1, 2, 1/2, 14, 5, 7
Середостінні лімфатичні вузли	2	2
Печінка	2	2,1/2
Кров	8	1, 2, 1/2, 7, 14
Усього	34	–

Як видно з матеріалів таблиці 3.13, найчастіше *Str. suis* ізолювали із синовіальної рідини суглобів за артритів – виявлено серотипи 1, 2, 1/2, 14, 5, 7 та крові – 1, 2, 1/2, 7, 14. Із легень виділяли серотипи 2,7 та 10, а з головного мозку та селезінки – 2 та 1/2. Отже, серед серотипів, які викликали тяжкі ураження у свиней, переважали такі: 1, 2, 1/2, 5, 7, 10 та 14.

Згідно з даними, наведеними в таблиці 3.14, найбільша кількість ізолятів *Str. suis* припадає на вікові групи поросят-сисунів (28,2 %) та відлученців (53,1 %), тобто у віці від народження до 4-х місяців. У цих вікових групах виявлено циркулювання серотипів 2, 1/2, 1, 14, 5, 7.

Таблиця 3.14

Результати серотипування *Str. suis* з біологічного матеріалу, отриманого від свиней різних вікових груп

Група тварин	Кількість виділених ізолятів	% від усіх досліджених ізолятів	Серотип
Поросята новонароджені	2	3,1	2, 1/2
Поросята сисуни (до двох місяців)	9	28,2	2, 1/2
Відлучені поросята (3–4 місяці)	17	53,1	2, 1/2, 1, 14, 5, 7
Тварини на відгодівлі (3–9 місяців)	5	12,5	7, 10
Дорослі тварини (старші 9-ти місяців)	1	3,1	7
Усього	34	100	

У зразках від новонароджених поросят реєстрували серотип 2 та 1/2, а для тварин на відгодівлі характерним було циркулювання серотипів 7 та 10, які згідно з літературними даними та нашими спостереженнями можуть ускладнювати перебіг інших інфекційних захворювань. Хоча особливості таргетного гену не дозволяють відрізнити серотипи 2 та 1/2, а також 14 та 1, реакція ПЛР не потребує якісно отриманої сироватки крові, тому застосований підхід може бути альтернативою ІФА.

Також нами були використані інші набори праймерів, направлені на ділянки геному, що пов'язані з вірулентністю збудника, а саме: гени *epf* та *mpr*, зміни в яких можуть супроводжуватися варіюванням ступеня вірулентності.

Під час нашого дослідження ми вживали різні стратегії та інструменти для вивчення вірулентності збудника. Особливу увагу ми звернули на гени *epf* та *mpr*, які вважаються ключовими у цьому контексті.

Зміни в генах *epf* та *mpr* можуть суттєво впливати на ступінь вірулентності збудника. Таким чином, наша робота з використанням праймерів, спрямованих на

гени *epf* та *mpr*, допомогла нам отримати глибше розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі вірулентності цього мікроорганізму.

Одержані праймери були застосовані до музейного штаму та 9 ізолятів для визначення їх фенотипової належності. Маса одержаного специфічного продукту реакції становила 626 п.н. для ізолятів та музейного штаму 3/2, 21, 19, 17, 14, NCTC 10234, 10, 31. Штами 16/2 та 05 специфічного фрагмента не мали. Досліджуючи ділянку гена *mpr*, спостерігали утворення специфічного продукту реакції масою 1148 п.н. для ізолятів та штамів 3/2, 21, 19, 17, 14, 10, NCTC 10234, 31, 16/2, а також відсутність специфічного фрагмента для авірулентного ізоляту 05.

Результатами дослідження встановлено, що високо- та середньовірулентні ізоляти 3/2, 21, 19, 17, 14, 10, NCTC 10234, 31 мають фенотип MRP+EF+, тоді як ізолят 16/2 – фенотип MRP+EF-. Авірулентний ізолят мав фенотип 05 MRP-EF-.

Отже, отримані дані щодо молекулярно-генетичних особливостей будуть ураховані в подальших дослідженнях при створенні засобів специфічної профілактики та контролю циркуляції різних типів збудника в господарствах України. Незважаючи на пряму кореляцію між продукуванням протеїнів MRP, EF та вірулентністю, мутантні штами, лізогенні за цими генами, зберігали вірулентність щодо свиней.

Отже, проведені дослідження показали, що застосування методу мультиплексної ПЛР дозволяє виявити не лише видову приналежність *Str. suis*, але й визначати серотип та наявність генів патогенності. Результати досліджень уражених *Str. suis* свиней різних вікових груп указують на те, що більшість виявлених випадків припадає на поросят-сисунів (28,2 %) та групу на відлученні (53,1 %), серед яких циркулюють переважно серотипи 1, 2, 1/2, 5, 7, 10, 14. У тварин на дорощуванні циркулювали серотипи 7 та 10.

Застосування ПЛР для серотипування *Str. suis* в Україні є важливим для визначення домінантних серотипів з метою підбору оптимального складу вакцини для специфічної профілактики стрептококозу свиней.

3.5. Виявлення *Str. suis* за допомогою оптимізованого протоколу ПЛР у реальному часі

При оптимізації методики проведення ПЛР у реальному часі звертали увагу на те, щоб температура відпалу праймерів була однаковою, а також досліджували праймери на відсутність димерів за використання їх у реакційній суміші.

Для детекції ДНК *Str. suis* у результаті проведеного пошуку нуклеотидної послідовності *Str. suis* у базі даних GenBank (CP003993) було обрано фрагмент, що містив цільову висококонсервативну ділянку 5' UTR (нетрансльована ділянка). За допомогою програми Primer Express була підібрана пара праймерів (прямий – *fbpS-F* і зворотний – *fbpS-R*) до обраного фрагмента гена розміром 114 п.н. Послідовність праймерів на специфічність перевіряли за допомогою програми BLAST, яка підтвердила їх 100 %-ву гомологію до обраної ділянки.

Оптимізація співвідношення праймерів. Важливим етапом оптимізації є визначення оптимального співвідношення праймерів для детекції патогена. Для визначення оптимального співвідношення праймерів оцінювали показники граничного циклу *Ct* за різного співвідношення їх концентрацій (табл. 3.15).

Таблиця 3.15

Показники ПЛР у режимі реального часу за різного співвідношення праймерів

Концентрація зонда	Концентрація праймерів для детекції <i>Str. suis</i> , пкмоль					
	5,0		10,0		15,0	
	Значення <i>Ct</i>		Значення <i>Ct</i>		Значення <i>Ct</i>	
	FAM	JOE	FAM	JOE	FAM	JOE
2,0	14,43	21,06	13,53	23,27	12,7	22,08
2,5	14,61	20,53	13,91	22,87	13,52	21,51
5,0	15,08	22,07	14,22	23,46	14,03	21,16

Обрана оптимальна концентрація праймерів у розрахунку на одну реакцію становила по 10 пМ праймерів для детекції *Str. suis*. Флуоресцентні зонди використовували об'ємом по 2,5 пМ. Обране співвідношення праймерів і зондів забезпечує високу ефективність усіх систем детекції і в той же час обмежує надмірне використання праймерів, що може знижувати специфічність реакції. Результат реакції за використання обраної концентрації праймера при оптимальній температурі відпалу показаний на рисунку 3.7.

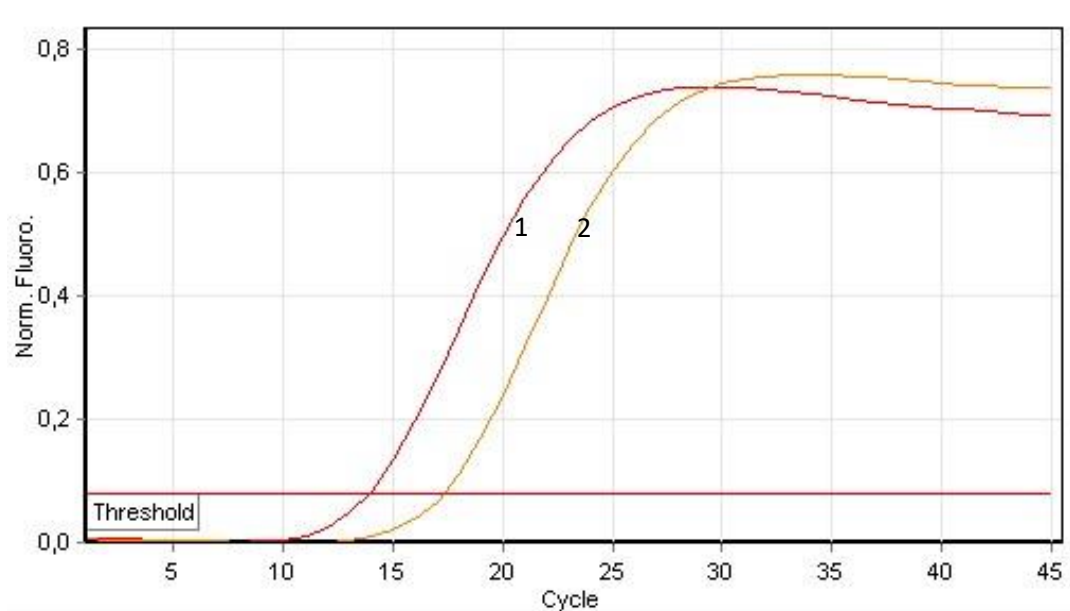


Рис. 3.7. Результати ампліфікації цільової послідовності ДНК збудника стрептококозу свиней за температури відпалу 55 °С, концентрації праймера 10 пМ та концентрації зонда 2,5 пМ: 1 – К+; 2 – патологічний матеріал, що містить ДНК *Str. suis*

Підбір температури відпалу праймерів. Важливим етапом оптимізації умов проведення ПЛР був підбір температури відпалу. Цей важливий фактор проведення реакції залежить від складу та розміру праймерів. Загальноприйнятим є вибір оптимальної температури відпалу праймерів. Неправильний вибір знижує чутливість детекції результатів (за підвищення температури) або зумовлює появу неспецифічних продуктів (за низької температури).

Нами була проведена серія ампліфікацій із різною градацією температури відпалу (50, 53, 55, 58, 60 °C). При цьому використовували панель зразків нуклеїнових кислот, що включала ДНК штаму та ізолятів *Str. suis*. Результати підбору температури відпалу праймерів наведені в таблиці 3.16.

Таблиця 3.16

Ефективність відпалу праймерів за різних температур

Зразок		Градiєнт температури відпалу (T_a)				
		50 °C	53 °C	55 °C	57 °C	60 °C
Показник C_t у 10 повторах	<i>Str. suis</i> NCTC 10234	17,61	20,79	21,03	21,79	23,17
	<i>Str. suis</i> 1	17,63	20,83	21,19	21,65	23,36
	<i>Str. suis</i> 2	18,32	20,36	20,47	20,86	21,56
	<i>Str. suis</i> 2	18,85	20,23	20,71	21,45	22,36
	<i>Str. suis</i> 2 та 1/2	21,23	20,35	20,74	21,39	22,44
	<i>Str. suis</i> 2 та 1/2	21,59	20,69	20,84	21,96	22,69
	<i>Str. suis</i> 5	25,17	21,36	20,37	21,16	21,39
	<i>Str. suis</i> 7	25,23	21,14	20,42	21,75	22,14
	<i>Str. suis</i> 10	28,36	21,63	20,65	21,15	22,73
	<i>Str. suis</i> 14	29,51	21,48	20,63	21,63	22,15
Медіана C_t		21,40	20,80	20,70	21,50	22,40
SD		4,46	0,499	0,262	0,342	0,630
Прийнятний SD_v		Не більше 0,5				
CV		19,90	2,39	1,265	1,5907	2,8125
Прийнятний % CV_v		Не більше 2,41				
Позитивний/негативний результат		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Аналітична чутливість, %		100	100	100	100	100

Результати серії ампліфикацій, проведених за чотирма режимами відпалу (53, 55, 58, 60 °C), показують, що праймери специфічно реагують із ДНК *Str. suis* за температури 53, 55, 58 °C. Амплікони *Str. suis* було виявлено в позитивному зразку патматеріалу свині та позитивному контролі. За температури 53, 55 °C та 58 °C середнє значення C_t для позитивних до *Str. suis* зразків становило $20,8 \pm 0,499$; $20,7 \pm 0,262$ та $21,4 \pm 0,342$. Підвищення температури на 2 та 5 °C спричинило зниження чутливості методики, що проявлялося збільшенням значень C_t та рівня флуоресценції, порівняно з режимами відпалу 53 °C та 55 °C. Зокрема, за 60 °C середній показник C_t становить 22,4 з показником SD 0,630, що виходить за межі вірогідного інтервалу. При зниженні температури відпалу до 50 °C середній показник C_t становив $21,4 \pm 4,46$, що значно виходить за межі вірогідних значень.

Результатами проведеного дослідження встановлено, що оптимальну роботу всіх пар праймерів забезпечує температура відпалу 55 °C, тому подальші дослідження з оптимізації ПЛР-РЧ проводили за температури відпалу 55 °C. На основі проведеної оптимізації методики було обрано режим проведення ПЛР-РЧ згідно з таблицею 3.17.

Таблиця 3.17

**Програма ампліфикації для детектування *Str. suis* методом
ПЛР у реальному часі**

Етап	Режим	Кількість циклів
1	95°C – 6 хв	1
2	95°C – 20 с	35
	55°C – 20 с	
	75°C – 20 с	
3	72°C – 5 хв	1

Для визначення межі виявлення *Str. suis* було взято зразок добової культури із відомим умістом КУО в см³. Зразок було розведено до концентрації

5×10^4 КУО/см³, який використовували у 5-ти послідовних 10-кратних розведеннях. На кожну концентрацію проводили аналіз не менше 10 незалежних повторів. Результати визначення межі виявлення *Str. suis* наведені в таблиці 3.18.

Таблиця 3.18

Визначення ліміту виявлення *Str. suis* методом ПЛР у реальному часі

Кількість КУО/см ³		1x10 ⁵	1x10 ⁴	1x10 ³	1x10 ²	1x10 ¹
Показник <i>Ct</i> у 10 повторах	<i>Str. suis</i> NCTC 1023	24,75	28,49	35,73	36,18	37,21
	<i>Str. suis</i> 1	24,63	29,66	34,68	0	0
	<i>Str. suis</i> 2	25,13	28,54	34,78	37,22	0
	<i>Str. suis</i> 2	24,75	29,03	0	0	0
	<i>Str. suis</i> 1/2	24,47	29,22	0	0	0
	<i>Str. suis</i> 1/2	25,38	28,76	35,27	36,15	0
	<i>Str. suis</i> 5	25,84	28,67	0	0	0
	<i>Str. suis</i> 7	24,70	29,68	0	0	0
	<i>Str. suis</i> 10	25,24	28,62	0	0	0
	<i>Str. suis</i> 14	24,85	28,64	0	0	0
Медіана <i>Ct</i>		24,97	28,93	35,11	36,51	37,21
<i>SD</i>		0,42	0,45	0,48	0,61	–
<i>CV</i>		1,674	1,5509	1,3792	1,6685	–
Кількість повторів		10	10	10	10	10
Позитивний/негативний результат		10/0	10/0	4/6	3/7	1/9
Аналітична чутливість, %		100	100	40	30	10

Показники таблиці 3.18 свідчить про те, що вірогідний інтервал аналітичної чутливості методу за концентрації 1×10^5 КУО/см³ та 1×10^4 КУО/см³ становив 100 %. Однак за концентрації 1×10^3 КУО/см³ та 1×10^2 КУО/см³ він становив лише 40 % та 30 % відповідно, а за концентрації 5×10^0 КУО/см³ чутливість не виявляли. Тобто, межа виявлення (LOD) досліджуваного методу становить 1×10^3 КУО/см³. Збіжність результатів досліджень вираховували повторною кількаразовою постановкою якісної ПЛР-РЧ за однакових умов із визначенням коефіцієнта варіації (% CV), який оцінювали за показниками C_t .

Нами було порівняно розрахований коефіцієнт варіації (% CV) значень C_t для серії досліджень зразка в один і той же час із прийнятним значенням коефіцієнта варіації (% CV_v), яке отримували на основі валідованого показника стандартного для цього методу відхилення (% SD_v не більше 0,5).

Для визначення збіжності було використано біологічний матеріал (суспензія головного мозку свині, що містила *Str. suis*), який досліджували в 10-ти повторях (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

**Оцінка збіжності результатів виявлення ДНК *Str. suis* методом ПЛР
у режимі реального часу**

Кількість повторів досліджуваного матеріалу	C_t , канал FAM	$C_{t_{сер}}$	% SD	% CV	Прийнятне значення стандартного відхилення для методу (SD _v)	Прийнятне значення коефіцієнта варіації (% CV _v)
1	2	3	4	5	6	7
1	21,03	20,705	0,26	1,26	Не більше 0,5	2,41
2	21,19					
3	20,47					
4	20,71					
5	20,74					

Продовження таблиці 3.19

1	2	3	4	5	6	7
6	20,84					
7	20,37					
8	20,42					
9	20,65					
10	20,63					

За даними, наведеними в таблиці 3.19, мінімальний показник C_t становив 20,37, максимальний – 21,19, а середній – 20,70. Подальші розрахунки показали, що валідоване значення стандартного відхилення (SD) у наших дослідах складало 0,26 %, що удвічі нижче від максимально допустимого рівня прийнятного коефіцієнта стандартного для методу відхилення ($SD \leq 0,5$). Коефіцієнт варіації (% CV) під час постановки досліду становив 1,26 %, що також удвічі нижче від прийнятного для методу коефіцієнта варіації ($CV_v \leq 2,41$).

Дані таблиці 3.20 вказують на відсутність неспецифічних реакцій зі штамми гетерологічних коків, що свідчить про специфічність методу.

Таблиця 3.20

Визначення меж чутливості ПЛР та специфічності методики

Зразки	Межі чутливості ПЛР у реальному часі, КУО/см ³	Різниця в межах чутливості методів, Log ₁₀
1	2	3
<i>Str. suis</i> NCTC 1023	1x10 ¹	4
<i>Str. suis</i> 1	1x10 ³	3
<i>Str. suis</i> 2	1x10 ²	3
<i>Str. suis</i> 2	1x10 ⁴	2
<i>Str. suis</i> 1/2	1x10 ⁴	3

Продовження таблиці 3.20

1	2	3
<i>Str. suis</i> 1/2	1x10 ²	3
<i>Str. suis</i> 5	1x10 ⁴	2
<i>Str. suis</i> 7	1x10 ⁴	2
<i>Str. suis</i> 10	1x10 ⁴	3
<i>Str. suis</i> 14	1x10 ⁴	2
Негативний контроль		
<i>S. aureus</i>	Негативний	Негативний
<i>M. luteus</i>	Негативний	Негативний
<i>E. faecalis</i>	Негативний	Негативний
<i>S. agalactiae</i>	Негативний	Негативний

Проведеними дослідженнями доведено, що використання методу ПЛР у реальному часі дозволяє виявляти *Str. suis* у концентрації 1x10⁴ копій геному в зразку.

Нашими дослідженнями встановлено, що всі використані параметри валідації якісного методу визначення ДНК *Str. suis* методом ПЛР у реальному часі відповідають міжнародним вимогам (ISO 17025), що гарантує отримання точних і достовірних результатів [142].

Запропонована методика виявлення ДНК *Str. suis* методом ПЛР у реальному часі рекомендована свинарським господарствам для можливості проведення моніторингу та контролю за поширенням стрептококозу свиней.

3.6. Дослідження особливостей поверхневих антигенів збудника стрептококозу поросят під час культивування *in vitro*

Для проведення досліджень з вивчення особливостей поверхневого антигена *Str. suis* нами було отримано електрофоретичні профілі загального бактеріального антигена, культуральної рідини та поверхневого антигена, отриманого за допомогою детергента, що описано в розділі “Матеріали та методи досліджень”. На рис. 3.8 та 3.9 показано загальний вигляд отриманих білкових профілів ізолятів 3/2 (високовірулентний) та 16/2 (слабовірулентний) на середовищі без та з додаванням плазми крові кроля.

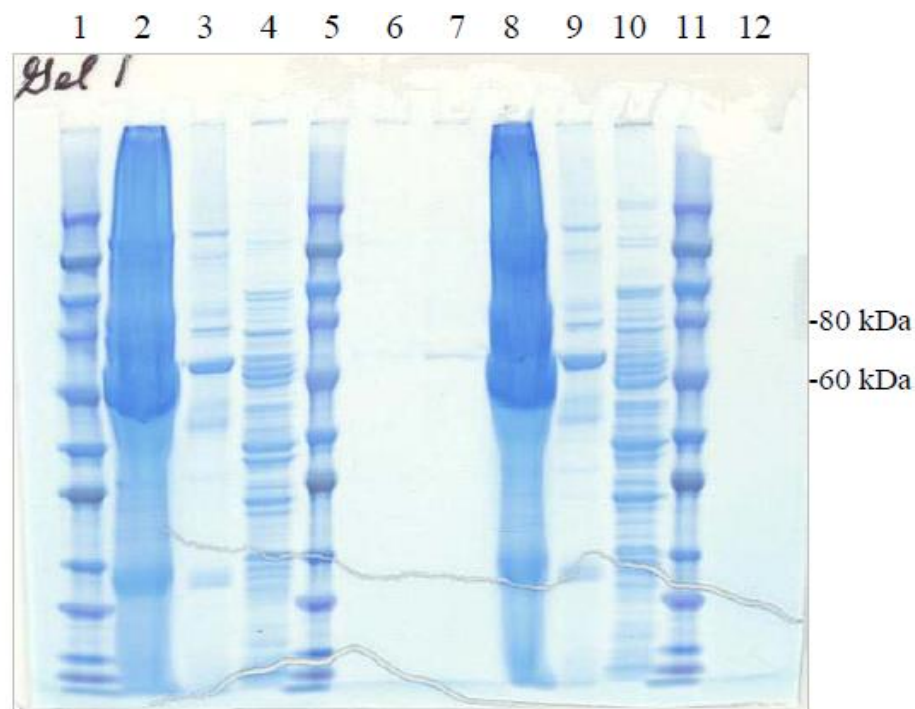


Рис. 3.8. Електрофореграма результатів ПААГ цільноклітинного білка ізолята *Str. suis* 3/2: 1, 5, 11 – маркер маси, 2 – загальноклітинний антиген, 3 – культуральна рідина, 4 – поверхневий антиген, 6–7, 12 – негативний контроль, 8 – загальноклітинний антиген на середовищі, 3 – культуральна рідина, 4 – поверхневий антиген на середовищі з додаванням плазми крові

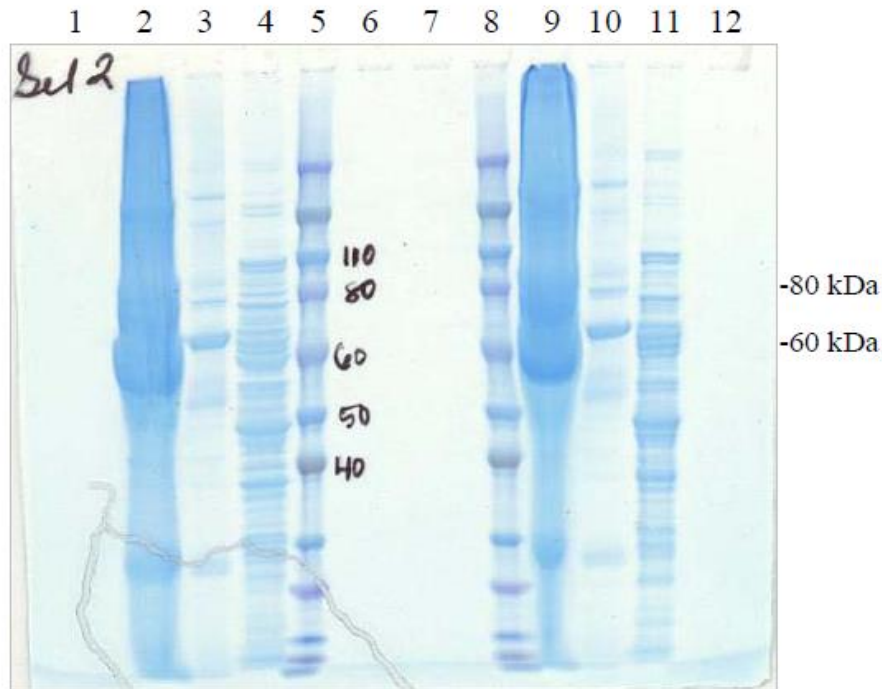


Рис. 3.9. Електрофореграма результатів ПААГ цільноклітинного білка ізолята *Str. suis* 16/2: 5,11 – маркер маси, 2 – загальноклітинний антиген, 3 – культуральна рідина, 4 – поверхневий антиген, 6–7, 12 – негативний контроль, 8 – загальноклітинний антиген на середовищі без додавання плазми крові, 3 – культуральна рідина, 4 – поверхневий антиген на середовищі без додавання плазми крові

На електрофореграмах показано, що основні пули білків припадають на 20–40 кДа, 60–80кДа та 100–120кДа. Слід зазначити, що при додаванні плазми крові в середовище культивування збудників кількість білків усіх зазначених груп була більш виражена, ніж у середовищах без додавання.

На рис. 3.10 наведені результати більш детального дослідження поверхневих білків, які виконують провідну роль у формуванні антигенної активності збудника. Ці білки мають велике значення в регуляції експресії факторів вірулентності, що впливає на патогенність у лабораторних тварин і свиней. Детальне вивчення цих поверхневих білків дозволило нам з'ясувати механізм взаємодії бактерії з “господарем” та її здатність спричинювати захворювання.

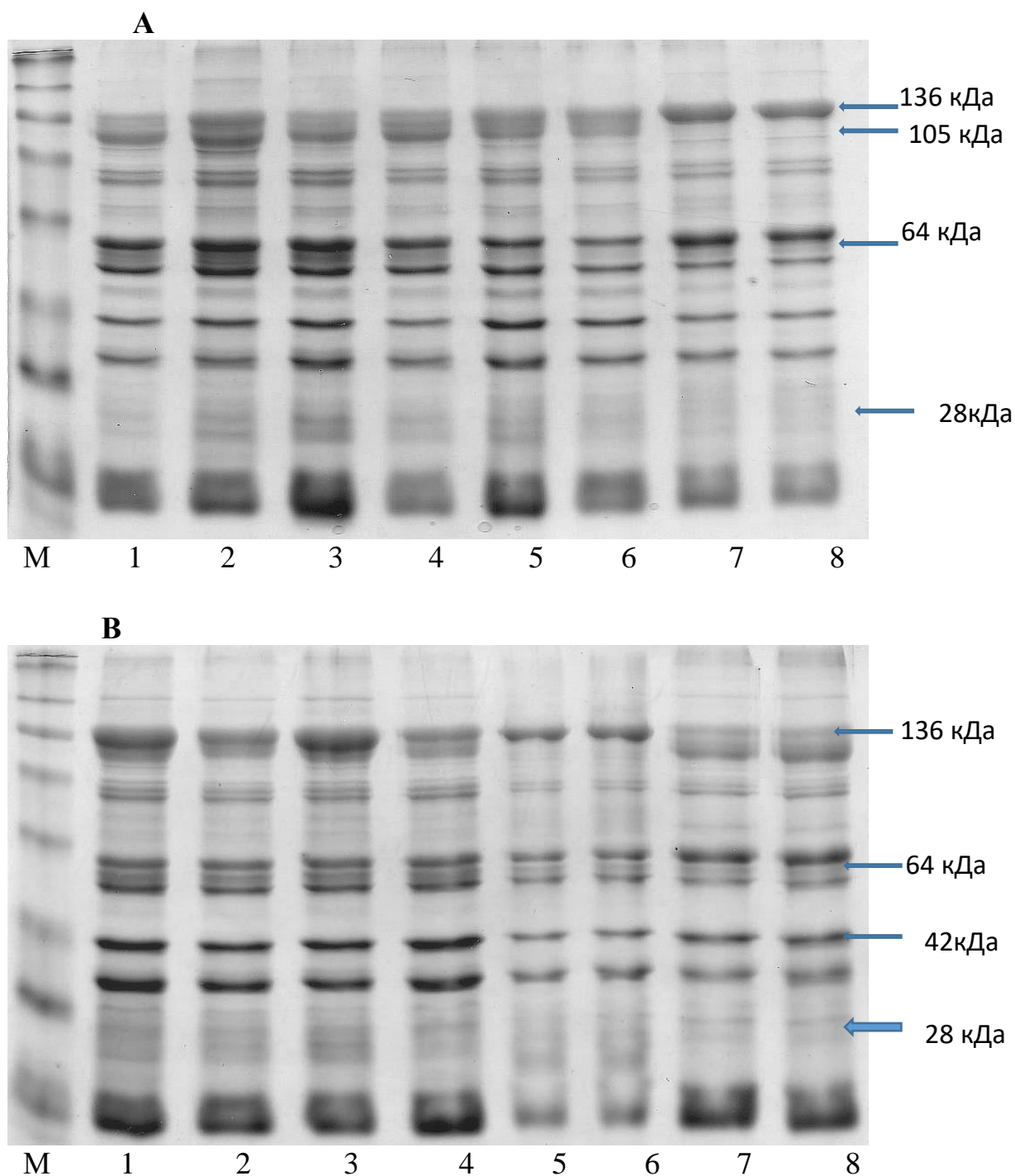


Рис 3.10. Електрофореграма поверхневого білка штамів *Str. suis* 3/2 (А) та 16/2(В), вирощених на МПА, МПА з додаванням сироватки крові та на кров'яному агарі: М – білковий маркер SeeBlue® (Invitrogen); доріжки 1–2 – білкові фракції з ізолятів, вирощених на МПАХ із додаванням дефібринованої крові; доріжки 3–4 – білкові фракції з ізолятів, вирощених на МПАХ із додаванням сухої плазми крові; доріжки 5–6 – білкові фракції від штамів, вирощених на МПАХ із додаванням сироватки крові ВРХ; доріжки 7–8 – білкові фракції з ізолятів, вирощених на МПАХ без крові. Стрілки вказують на потенційні відмінності в експресії білка

У досліджених ізолятах були виявлені чотири диференційно експресовані поверхневі білки розміром 136, 105, 64 та 28 кДа (ізолят *Str. suis* 3/2) та 136, 64, 42 та 28 кДа (ізолят *Str. suis* 16/2) (рис. 3.10). Поверхневих білків масою 136 та 64 кДа утворювалося більше за наявності в середовищі дефібринованої крові або плазми крові. Також встановлено, що в середовищі без додавання крові або її сироватки, білок масою 105 кДа майже не утворювався, що може знижувати вірулентність ізолятів та дещо змінювати антигенні властивості патогенних ізолятів. При дослідженні авірулентного ізоляту *Str. suis* 16/2 спостерігали значно менше продукування поверхневих білків масою 136,42 та 26 кДа в середовищі без додавання крові. Результатами досліджень встановлено, що кілька поверхневих білків *Str. suis* зазнають диференційної експресії при зміні складу живильного середовища *in vitro*. Поверхневий протеїновий профіль, отриманий для кожного з досліджених штамів *Str. suis*, був унікальним. Кожний варіант складу модельованого середовища дозволяв виявити декілька диференційно експресованих поверхневих білків.

Електрофореграми показали подібність складу пулу поверхневих білків *Str. suis* високо- та слабовірулентних ізолятів, що досліджувалися. Моделювання *in vitro* змін антигенного складу збудника під час культивування в різних живильних середовищах є корисним інструментом для ідентифікації потенційно важливих факторів вірулентності. Однак дані, отримані нами під час дослідження *in vitro*, вказують лише на потенційні зміни антигенного складу збудника *in vivo*.

Особливості поверхневих білків, які визначені в цьому дослідженні, можуть бути включені в патогенез та є важливими для подальших досліджень при створенні засобів діагностики та специфічної профілактики стрептококозу свиней.

3.7. Вивчення антигенної спорідненості ізолятів *Streptococcus suis*

Серія дослідів була приділена також вивченню антигенних властивостей штамів та ізолятів, антигенних властивостей музейного штаму та 2-х ізолятів збудника стрептококозу свиней. Крім того, досліджено їх молекулярно-біологічні властивості щодо основних протективних антигенів та виявлено кореляцію між

антигенною активністю та варіюванням ділянок геному, що відповідають за продукування антигенів, важливих для створення засобів специфічної профілактики стрептококозу.

Дані таблиці 3.21 вказують на те, що білковий антиген з м.м. 120–140кДа, розведений у співвідношенні 1:1024 (до вмісту білка в пробі 1,28 мкг/см³), реагує з референт-сироваткою.

Таблиця 3.21

Вивчення серологічної активності в ІФА білків із м.м. 120–140 та 64–68 кДа залежно від сенсibilізуючої дози (n=5)

Розведення антигена	Концентрація білка на твердій фазі (мкг/см ³)	Імунна сироватка			
		120–140кДа	64–68 кДа	40–45 кДа	20-30 кДа
		оптична густина за $\lambda=495$ нм.			
1:128	8,1	1,436*	1,684	0,960	1,222
1:256	4,3	1,200	1,440	0,784	1,114
1:512	2,21	0,987	1,170	0,522	0,862
1:1024	1,28	0,832	0,984	0,418	0,635
1:2048	0,63	0,691	0,817	0,376	0,422
1:4096	0,31	0,563	0,686	0,250	0,283
Контроль негативний	–	0,259	0,232	0,218	0,246

Примітка: *Цифрові дані відображають середньоарифметичну величину для $n=5$ з похибкою (T) у межах $\pm 3-8\%$.

Для білкового антигена з м.м. 64–68 кДа позитивний показник виявлено за ще вищого розведення – 1:2048, у якому вміст білка становив усього 0,63 мкг/ см³. Білки з молекулярною масою 40–45 кДа та 20–30 кДа реагували лише в розведенні 1:256 та 1:512. Одержані в дослідях дані дозволяють стверджувати, що з підвищенням ступеня чистоти сорбованого антигена в певних межах підвищується й ефективність аналізу.

Отже, підбір оптимальної сенсibiliзуючої дози на лунку планшет показав, що інтенсивність ІФА була максимальною при застосуванні антигена з концентрацією 4,3–8,1 мкг/см³, яка формувала високий рівень оптичної густини (0,960 – 1,436) та вірогідну різницю результатів між контрольними позитивними та негативними сироватками.

Показники загальної антигенної активності сироваток мишей на поверхневі антигени високовірулентного ізоляту 3/2, слабовірулентного 16/2 та референсного NCTC 10234 наведено у таблиці 3.22.

Таблиця 3.22

**Загальна антигенна активність сироваток мишей до
поверхневого антигена (M±m, n=3)**

Сироватки	Титр антитіл у сироватках (log ₂) відносно антигенів			
	120–140 кДа	64–68 кДа	40–45 кДа	20–30кДа
Імунна щодо поверхневого антигена ізоляту 3/2 M–2 ВК	9,6±0,3	8,3±0,3	10,9±0,5	4,7±0,2
Імунна щодо поверхневого антигена ізоляту 16/2	5,3±0,4	5,1±0,2	7,6±0,3	3,2±0,3
Імунна щодо поверхневого антигена штаму NCTC 10234	8,9±0,4	7,4±0,4	9,2±0,2	5,6±0,3
Негативна сироватка	0	0	0	0

Примітка: * — робоча концентрація антигенів 8 мкг/ см³.

Нами встановлено, що максимальну активність сироватки в ІФА проявили щодо білка з м.м. 120–140 кДа – у титрах до 9,6±0,3 log₂, 64–68 кДа – у титрах до 8,3±0,3 log₂. З білками м.м. 40–45 кДа, 25–30 кДа всі досліджені сироватки реагували зі слабкою активністю з титрами не вище 5,6±0,5 log₂. Найменшу активність сироватка проявляла щодо слабовірулентного ізоляту 16/2 до білка м.м. 64–68 кДа – у титрах 5,1±0,2 log₂ та до білка 20–30 кДа – у титрах 3,2±0,3 log₂.

Ми припустили що високовірулентні штами 3/2 та 10234 призводять до утворення високого титру антитіл слабовірулентного штаму 16/2. Для статистичного підтвердження різниці між порівнюваними групами використали T-Test. Високовірулентні штами 3/2 та NCTC 10234 в порівнянні з слабовірулентним штамом 16/2 призводить до утворення вищого титру антитіл $p=0,007$ та $p=0,005$. При цьому відсутня статистично значима різниця між високовірулентними $p=0,351$. Найбільш активно з усіма пулами білків реагували імунна сироватка до поверхневого антигена ізоляту 3/2 та імунна сироватка проти референс-штаму NCTC 10234 – у титрах до $10,9 \pm 0,5 \log_2$ та $9,2 \pm 0,2 \log_2$ відповідно. Щодо антигена з м.м. 20–30кДа білки цього пулу виявились антигенно інертними в ІФА, оскільки, імовірно, є продуктами розпаду білків із більшою молекулярною масою.

Нами встановлено, що максимальну активність мала сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген (табл. 3.23).

Таблиця 3.23

Результати визначення активності сироваток мишей, отриманих на білкові антигени збудника стрептококозу свиней в ІФА ($M \pm m$, $n=3$)

Білковий антиген, м.м. (кДа)	Сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген (зворотні титри \log_2)	Сироватка, отримана на білок із м.м., кДа (титри \log_2)				
		Понад 140	120–140	64–68	40–45	20–30
Понад 140	$7,1 \pm 0,3$	$8,4 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,2$	0	0	0
120–140	$8,9 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$	0	0	0
64–68	$8,2 \pm 0,2$	0	0	$10,9 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	0
40–45	$7,9 \pm 0,1$	0	0	0	$9,6 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$
20–30	$7,7 \pm 0,3$	0	0	0	0	$8,3 \pm 0,3$

Активність сироватки до білків із м.м. 120–140 кДа становила – $8,9 \pm 0,3 \log_2$; із 64–68 кДа – $8,2 \pm 0,2 \log_2$; 40–45 кДа – $7,9 \pm 0,1 \log_2$. Найменшу активність сироватка мишей проявляла в реакції з білком з м.м. 20–30 кДа – $7,7 \pm 0,3 \log_2$, за 140 кДа вона становила $7,1 \pm 0,3 \log_2$.

Сироватки, отримані на білки з м.м. 120–140 кДа, 64–68 кДа, 40–45 кДа та 20–30 кДа, активно реагували з гомологічними білками, а також мали слабку реакцію з білками меншої молекулярної маси, що, очевидно, зумовлено певними неспецифічними реакціями та можливим недостатнім очищенням одержаних білків. Так, сироватка мишей, отримана на білок з м.м. 20–30 кДа, реагувала лише з білком м.м. 20–30 кДа у титрах $9,3 \pm 0,3 \log_2$, сироватка мишей до білка з м.м. 40–45 кДа реагувала з білком м.м. 40–45 кДа у титрах $9,6 \pm 0,1 \log_2$, а сироватка мишей до білка з м.м. 64–68 кДа – із білком з м.м. 64–68 кДа у титрах $10,9 \pm 0,2 \log_2$. Незначні перехресні реакції спостерігали під час дослідження сироваток, отриманих на білки з молекулярною масою 120–140; 64–68 та 40–45 кДа.

Одержані нами результати дозволяють стверджувати, що сироватки, отримані на вірулентні та авірулентні ізоляти, реагували в ІФА з одними й тими ж антигенами, з високою активністю та специфічністю, що свідчить про подібність антигенних властивостей.

Імуноферментний аналіз із використанням антигенів патогенних польових ізолятів та контрольних ізолятів виявив найвищу активність щодо антигенів з молекулярною масою 120–140 кДа, 64–68 та 40–45 кДа, а також дещо нижчу – активність щодо антигенів масою понад 140 кДа та 20–30 кДа.

У результаті проведених нами досліджень було встановлено, що антигени високовірулентного ізоляту *Str. suis* 3/2, слабовірулентного *Str. suis* 16/2 та референсного ізоляту *Str. suis* NCTC 10234 мають виражену антигенну активність як щодо гомологічних сироваток, так і сироваток, отриманих на музейний штам та ізоляти. Дослідження, проведені нами, були спрямовані на вивчення антигенної активності та спорідненості штаму й ізолятів різного походження з декількох регіонів України.

Вивчення антигенних властивостей музейного штаму та двох ізолятів *Str. suis* із застосуванням гомологічних та гетерологічних сироваток показало, що високовірулентний штам проявив найвищу антигенну активність як щодо гомологічних, так і гетерологічних сироваток крові лабораторних тварин, у той час як поверхневий антиген слабовірулентного штаму *Str. suis* 16/2 продемонстрував дещо нижчу антигенну спорідненість із сироватками, отриманими на поверхневі антигени патогенного штаму та двох патогенних ізолятів у реакції з гомологічною сироваткою, що підтверджує високу афінність антигена до власних антитіл. Сироватки, одержані на ізоляти 10 та 21, проявили однаково високу активність щодо всіх досліджуваних антигенів (рис.3.11 та 3.12).

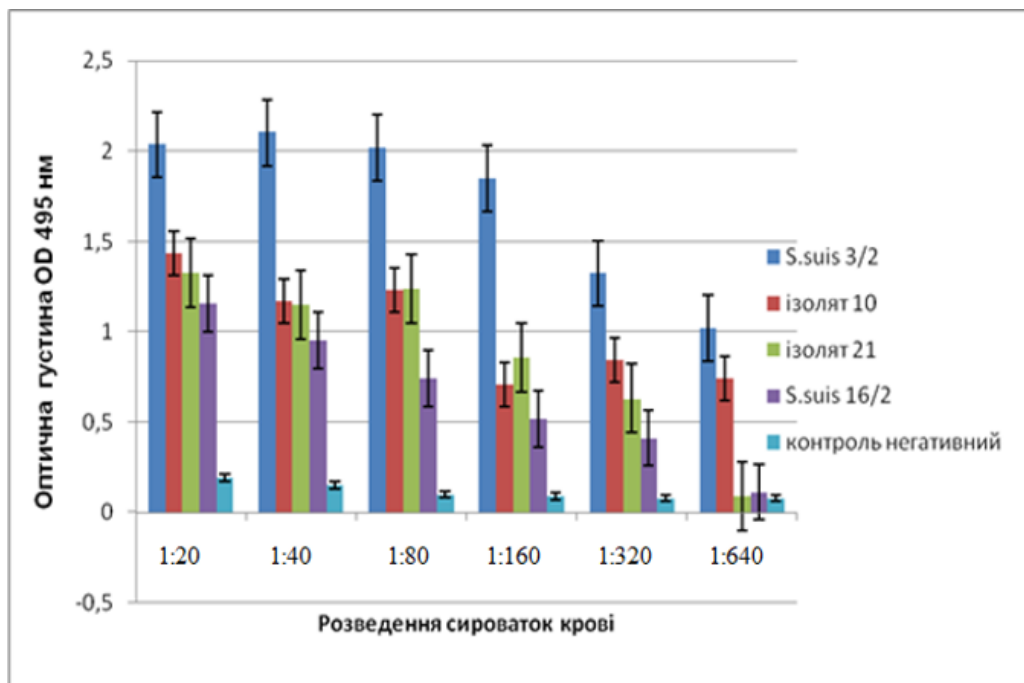


Рис. 3.11. Ступінь антигенної спорідненості поверхневого антигена *Str. suis* 3/2 штамів та антитіл з ізолятами *Str. suis* у сироватках крові ($M \pm m$, $n=5$, $P < 0,05$)

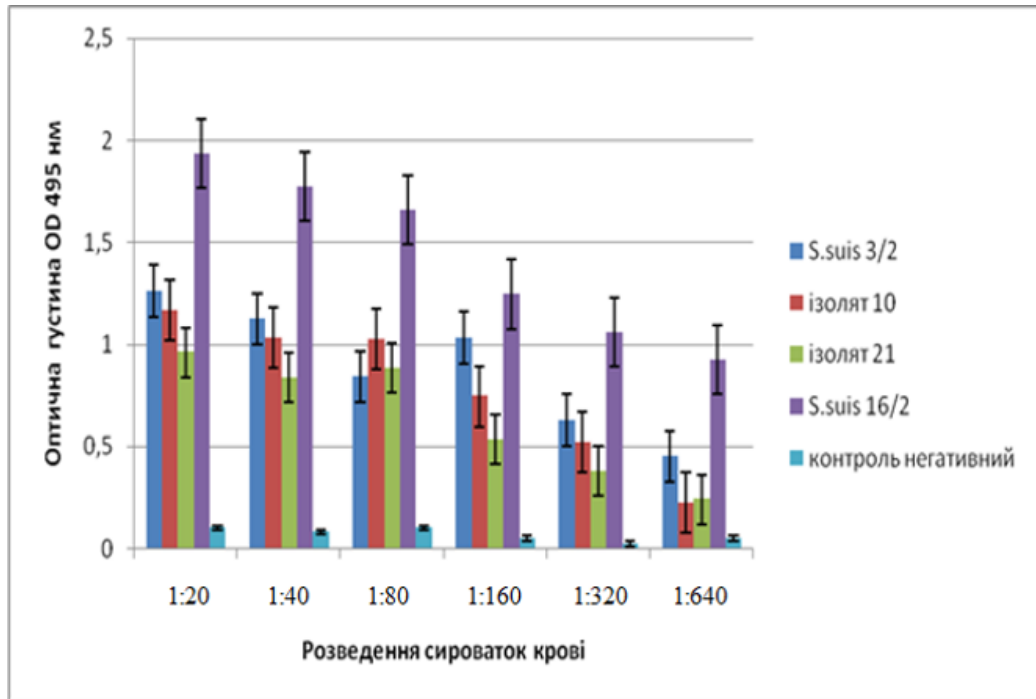


Рис. 3.12. Ступінь антигенної спорідненості поверхневого антигена *Str. suis* 16/2 штамів та антитіл з ізолятами *Str. suis* у сироватках крові ($M \pm m$, $n=5$, $P<0,05$)

Відносно низька антигенна активність щодо поверхневого антигена слабовірулентного штаму, на нашу думку, свідчить про те, що мікроорганізми слабовірулентних штамів та ізолятів несуть на своїй поверхні приблизно таку ж кількість антигенних детермінант, але, імовірно, значно менше презентовані (антигени занурені углиб капсули, не вигідне просторове розташування білкових антигенів).

У результаті проведених досліджень нами виявлено пряму кореляцію (кофіцієнт кореляції $r=0,79$) між біологічними властивостями (ступінь вірулентності) та антигенними властивостями в ІФА (непрямий варіант). Поверхневий антиген високовірулентного штаму *Str. suis* 3/2 проявляв виражену антигенну активність як щодо гомологічних сироваток, так і сироваток, отриманих на досліджувані ізоляти, які відрізнялися ознаками патогенності.

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

3.8. Висновки з розділу результати власних досліджень

У свиней стрептококи виявлені як важливі патогени, що грають значну роль у захворюваннях та епідеміології. Під час нашого дослідження ми відзначили зростання кількості інфекцій, спричинених цими збудниками, і в більшості випадків вони виявлені в асоційованих формах інфекцій, уражаючи різні органи та системи організму. Широка поширеність стрептококів серед свиней на досліджуваних фермах свідчить про важливість їх контролю. Досліджені ізоляти стрептококів виявили велику стійкість до багатьох антибіотиків, що важливо враховувати при розробці стратегій антимікробної терапії. Протягом наших досліджень ми також зафіксували зростання кількості мультирезистентних штамів стрептококів, що свідчить про необхідність посилення контролю над використанням антибіотиків у тваринництві.

Серотипи 2 та 1/2 *Str. suis* мають великий зоонозний потенціал і потребують особливої уваги та контролю. Використання комбінації мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів діагностики дозволяє більш точно ідентифікувати та класифікувати ізоляти стрептококів. Розроблений набір праймерів для ПЛР в реальному часі є важливим інструментом для моніторингу наявності стрептококів у свиней та має високу чутливість та специфічність. Різні штами *Str. suis* проявляють різний ступінь вірулентності, і це важливо враховувати при розробці стратегій контролю за захворюваннями у свиней.

Дослідження поверхневих антигенів високовірулентних штамів стрептококів показали, що вони мають високу імуногенність та здатні викликати сильну імунну відповідь. Відзначалася перехресна імунна відповідь між поверхневими антигенами отриманими з різних ізолятів. Це може бути важливим аспектом для подальших досліджень щодо розробки вакцин проти цих патогенів.

Проведені дослідження схвалені Етичним комітетом Білоцерківського НАУ (висновок №3/15 від 06.03.23 р., протокол № 15) (додаток В).

Матеріали наших досліджень опубліковано [93, 152, 160, 161, 165, 166, 168].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Особливо небезпечним для свинарства майже в усіх країнах світу є серотип *Str. suis* типу 2. Стрептококову інфекцію пов'язують із менінгітами, артритами, ендокардитами, септицемією, пневмонією та раптовою загибеллю свиней. Більшість випадків цієї інфекції припадає на поросят у віці від 3 до 12 тижнів та особливо – на тварин після відлучення.

На сьогодні зареєстровано 35 різних капсулярних серотипів *Str. suis*. У більшості європейських країн *Str. suis* серотипу 2 є найпоширенішим серед ідентифікованих ізолятів від хворих свиней [28, 46, 89, 102, 114].

Str. suis серотипу 2 може спричиняти тяжкі захворювання та смертність у тварин і призводити до значних втрат поголів'я худоби. Тому розробка ефективних профілактичних заходів, зокрема вакцин та заходів із контролю, є надзвичайно важливою для зменшення впливу цієї інфекції, забезпечення здоров'я та продуктивності свиней. Крім того, необхідно проводити комплексні епідеміологічні дослідження, щоб з'ясувати шляхи передачі, фактори ризику та резервуари *Str. suis* серотипу 2 [61, 71, 74].

Подальше дослідження антигенного складу *Str. suis* серотипу 2 може сприяти розробці більш ефективних методів діагностики. Вивчення антигенних властивостей дозволить точніше ідентифікувати цей серотип і вдосконалити діагностичні тести для його виявлення. Ці дані також можуть бути використані при розробці нових вакцин та заходів із профілактики, спрямованих на конкретні антигенні варіанти *Str. suis* серотипу 2 [16, 88, 170].

Значний вплив *Str. suis* серотипу 2 на свинарство та загрозу для громадського здоров'я потребує глибшого вивчення, моніторингу і контролю цієї інфекції. Комплексний підхід, що включає профілактику, діагностику та заходи з контролю, спрямовані на конкретні серотипи й антигенні властивості *Str. suis*,

можуть сприяти зниженню поширеності цієї інфекції та запобігати її негативним наслідкам для свинарства [10, 171].

Str. suis може колонізувати мигдалики як хворих, так і здорових тварин, тому субклінічний перебіг захворювання спричинює поширення його серед чутливого поголів'я. Однак на сьогодні не виявлено кореляції між ступенем носійства та захворюваністю. Згідно з даними зарубіжних дослідників, штами та ізоляти типів 1 та 2 часто відрізняються своєю вірулентністю. Вірулентні варіанти мають у своєму складі 136 кДа мурамідазовивільняючий протеїн (MRP+) та 110 кДа позаклітинний білковий антиген (EF+). Слабовірулентні штами продукують MRP та EF- протеїн (MRP+EF+), а невірулентні штами не виробляють цих протеїнів (MRP-EF-). Дослідження нами протеїнів MRP, EF та EF+ показало, що N-термінальні їх ділянки є однаковими, у той час як С-термінальний фрагмент EF+ протеїну містив кілька тандемних повторів амінокислот, які були відсутні в менших за масою EF-протеїнах [45, 19, 55, 98].

Ураховуючи зазначене вище, можна стверджувати, що дослідження вірулентності різних штамів і типів *Str. suis* є актуальним для розуміння механізмів захворюваності та розробки заходів щодо його контролю. Вивчення біологічних властивостей цих протеїнів дозволить краще розуміти їхню роль у патогенезі інфекції.

Крім того, ідентифікація й характеристика різних капсулярних серотипів *Str. suis* є важливою складовою в боротьбі з інфекціями, викликаними різними серотипами *Str. suis*, серед яких серотип 2 є найпоширенішим з ізольованих штамів у хворих свиней у більшості європейських країн [33, 73, 169].

Розуміння механізмів розподілу й частоти поширення різних серотипів є важливим для ефективного контролю й запобігання захворюванню. Вивчення взаємозв'язку між серотипами і вірулентністю, а також розробка специфічних методів діагностики та профілактики для кожного серотипу можуть сприяти покращенню заходів з контролю стрептококозу свиней. Крім того, важливим аспектом дослідження є виявлення та дослідження генетичної різноманітності й

еволюційних змін у стрептококових штаммах, що можуть впливати на їхні властивості та вірулентність. Розуміння генетичних механізмів, які лежать в основі адаптації та поширення *Str. suis*, може сприяти пошуку нових шляхів для контролю та зниження поширеності цієї інфекції серед свиней [59, 91, 92, 167].

Отже, дослідження властивостей серотипів, генетичних механізмів та взаємодії *Str. suis* з організмом свиней є ключовими для ефективної боротьби зі стрептококозом свиней і розробки заходів із профілактики та контролю цього захворювання.

На основі поділу на фенотипи, штами та ізоляти *Str. suis* типу 1 були віднесені до MRP+EF+ та MRP-EF- фенотипів. Ізоляти фенотипу MRP+EF+ продукували MRP- протеїн меншої маси (близько 120 кДа) та 110 кДа EF-протеїн і були високовірулентними для поросят [150–153].

Хоча існує пряма кореляція між продукуванням протеїнів MRP та EF і вірулентністю, мутантні штами, лізогенні за цими генами, зберігали вірулентність щодо свиней, не продукуючи цих антигенів. Деякі штами та ізоляти від хворих на стрептококоз свиней, виділені в Канаді, не продукували цих протеїнів і відзначалися високою вірулентністю. У той же час у більшості європейських країн, США та Австралії штами та ізоляти фенотипу MRP+EF+ переважали серед ізолятів, виділених із патологічного матеріалу від загиблих свиней. Отже, цей фенотип є класичним вірулентним фенотипом [152, 155, 158].

Незважаючи на те, що пряма кореляція між продукуванням протеїнів MRP та EF та вірулентністю існує, деякі мутантні штами, що втратили здатність продукувати ці антигени через лізогенний процес, вони все ще зберігали високу вірулентність щодо свиней. Навіть ізоляти, які не продукували MRP та EF-протеїни, виділені в Канаді, проявляли дуже високу вірулентність. Це свідчить про те, що вірулентність *Str. suis* залежить не тільки від наявності в ньому цих конкретних протеїнів, але й від інших факторів, які можуть впливати на патогенність інфекції. Вивчення різних фенотипів *Str. suis* та їх взаємозв'язку з

вірулентністю є важливим для подальшого дослідження та розробки методів контролю і профілактики стрептококозу свиней [150, 159, 165].

Детальне дослідження механізмів продукування протеїнів MRP та EF, а також їхньої взаємодії з організмом “господаря”, дозволяють знайти нові підходи до контролю захворювання та розробки вакцин, які сприятимуть зниженню вірулентності й запобігатимуть колонізації мигдаликів у свиней. Пошук нових антибактеріальних засобів, спрямованих на інгібування продукції цих протеїнів, також має значення для боротьби зі стрептококовою інфекцією [153, 160].

Крім того, дослідження різних серотипів *Str. suis*, зокрема їх генетичного складу та варіацій, поглиблює розуміння еволюційних процесів та походження цього патогена. Такі відомості є важливими для з'ясування походження й поширення конкретних серотипів, а також для вдосконалення методів діагностики та епідеміологічного контролю [162, 163].

Грунтовні дослідження фенотипів, генетичних властивостей та механізмів взаємодії *Str. suis* з “господарем” є важливими для прогнозування захворюваності свиней та можуть сприяти розробці ефективних заходів з профілактики, контролю та лікування стрептококозу свиней, а також поліпшенню здоров'я та благополуччя свинарських господарств [164, 166].

У наших дослідженнях було вивчено EF-протеїн, який є маркером вірулентності, та ген *epf* – як інструмент з визначення вірулентності ізолятів. Також була вивчена наявність генів *mpr*-протеїну. У сучасних умовах для диференціації фенотипів збудника стрептококозу свиней використовують трудомісткі методи – вестерн блот та ІФА. Ці методи також мають досить високу похибку [152, 160, 165, 168].

У наших дослідженнях були використані молекулярно-генетичні методи для швидкого виявлення вірулентних ізолятів *Str. suis*. Нами, зокрема, було досліджено наявність генів *mpr*-протеїну, які можуть впливати на його вірулентні властивості. Ці методи дозволяють швидко й точно оцінювати вірулентність

збудника, що є важливим для ефективного контролю й лікування захворювань, спричинених стрептококовою інфекцією у свиней [147, 151, 153].

Крім того, результати наших досліджень можуть мати перспективне застосування в гуманній медицині. Оскільки *Str. suis* є зооозною інфекцією, яка може передаватися від тварин людині, вони можуть сприяти посиленню контролю захворювань у тваринництві, що у свою чергу зменшуватиме ризик зараження людей. Одержані при виконанні нами дисертаційної роботи результати є важливими для подальшого дослідження й розуміння взаємодії між *Str. suis* і його “господарями” [58, 125, 154, 156, 168].

У ході наших досліджень докладно проаналізовано штами та місцеві ізоляти *Str. suis*, що дозволило нам отримати значну кількість інформації про їхні антигенні та молекулярно-генетичні властивості, морфологію мікроорганізмів, культуральні характеристики, біохімічні властивості, ферментативну активність та біологічну поведінку.

Досліджені нами 5 ізолятів *Str. suis* мали схожі морфологічні ознаки, такі, як форма та розмір колоній, морфологія бактерій тощо. Крім того, культуральні властивості, зокрема забарвлення, агарні штампи, додаткові ростові фактори та вимоги до середовища, у досліджуваних ізолятів виявилися схожими [161].

Додатково, нами було проаналізована ферментативна активність цих ізолятів, що дозволило виявити їхню здатність виробляти певні ферменти, які можуть впливати на їхню вірулентність та інфекційний потенціал [165, 166].

Проведені нами дослідження дозволили з’ясувати відмінність та подібність в ізолятів *Str. suis*, що дасть можливість у подальшому провести класифікацію та типування цих мікроорганізмів.

Розуміння морфологічних, культуральних, біохімічних та ферментативних властивостей ізолятів дає можливість розпізнавати та ідентифікувати їх, що є важливим у процесі діагностики та контролю за захворюванням. Наприклад, ці дані можуть бути корисними для пошуку ефективних методів виявлення та

відстеження поширеності інфекційних штамів у популяціях свиней, а також для розробки заходів із контролю за хворобою [157].

Молекулярно-генетичні дослідження, які включали аналіз генетичних маркерів та виявлення вірулентних генів, поглибили розуміння основних механізмів вірулентності *Str. suis*. Це може сприяти розробці нових методів діагностики, профілактики та лікування захворювань, пов'язаних із досліджуваним мікроорганізмом.

Одержані при виконанні завдань дисертаційної роботи результати уточнюють характеристику *Str. suis*, зв'язки між його морфологічними, культуральними та генетичними властивостями, що розширює загальне розуміння патогенезу зумовлених ним інфекційних захворювань [152].

Розуміння антигенних властивостей ізолятів *Str. suis* та їхніх молекулярно-генетичних особливостей має значення не лише в дослідженні цього конкретного мікроорганізму, але й у широкому контексті боротьби з інфекційними хворобами у тваринництві. Це допомагає розробляти нові заходи й способи контролю та профілактики, спрямовані на зниження ризику зараження та поширення хвороби [100, 118].

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на глибше вивчення ролі окремих генів і протеїнів, їхньої взаємодії та впливу на вірулентність і патогенез, що дозволить з'ясувати складні механізми, які лежать в основі інфекційних процесів.

Дослідження нами ферментативних властивостей ізолятів *Str. suis* також поглибило розуміння характеристики цього мікроорганізму. Подібні ферментативні властивості усіх ізолятів вказують на однорідність цього виду бактерій. Одержані нами результати узгоджуються з даними інших авторів і підтверджують вірогідність наших вимірювань. Нами, зокрема, було виявлено, що чотири ізоляти ферментують рафінозу з утворенням кислоти, не утворюючи при цьому газу, що є характерним для серотипу 2 *Str. suis*. З іншого боку, один з ізолятів не ферментував рафінозу, що вказує на його належність до серотипу 1.

Усі ізоляти проявляли активність ферментів, таких, як аргініназа, глікогеназа, D-глюкозидаза, цукрозидаза, галактозидаза, мальтозидаза, саліциназа, трегалозидаза та інуліназа. При проведенні дослідів також спостерігали позитивні реакції мікроорганізмів на α -галактозидазу, β -глюкуронідазу і лейцин-ариламідазу, що свідчить про їх належність до виду *Str. suis* та правильно проведену диференціацію культур збудника [156, 157].

Результати наших досліджень вказують на подібність ферментативних властивостей усіх досліджених ізолятів та штамів *Str. suis* другого типу. Усі відповідні цукри були ферментовані однаковою мірою однак, певні відмінності проявлялися при ферментуванні β -галактозидази, гіалуронідази та рафінози.

Слід зазначити, що ізоляти *Str. suis*, отримані від свиней, не ферментували маніт, що відповідає результатам ідентифікації за Берджі (Bergey) та збігається з даними доступної літератури (понад 70 % ізолятів не ферментують маніт). Використання системи API 20 STREP (виробництва "bioMerieux", Франція) при вивченні біохімічних властивостей ізолятів *Str. suis* дозволило виявити та ідентифікувати серотипи 1, 2 та 1/2, проте ця система не є придатною для ідентифікації інших серотипів *Str. suis* [9, 16, 34, 107, 142].

Отже, необхідно використовувати різні методи і тест-систем для повної ідентифікації та класифікації ізолятів *Str. suis*. Результати наших досліджень показали, що більшість виділених нами ізолятів *Str. suis* належать до серотипу 2, який вважають основним інфекційним фактором при захворюванні свиней на стрептококоз.

Аналіз результатів досліджень патологічного матеріалу показав, що 26,5 % випадків захворювань, спричинених *Str. suis*, були гострою моноінфекцією. У 14,7 % випадків разом із *Str. suis* було виділено *E. coli*, у 11,8 % випадків – *Pasteurella multocida*, а у 8,8 % випадків – *Haemophilus parasuis*. Змішану інфекцію становили 29,4 % випадків. Ці дані підкреслюють важливість вивчення взаємодії *Str. suis* з іншими патогенними мікроорганізмами, оскільки змішані інфекції можуть поглибити й ускладнити захворювання у свиней. Дослідження

змішаних інфекцій має важливе значення для розуміння патогенезу та розробки ефективних заходів із контролю і профілактики стрептококозу у свиней [150, 153].

Дослідження чутливості ізолятів *Str. suis* до антибіотиків, проведені у 2017 та 2021 роках, показало, що всі ізоляти були чутливими до пеніциліну та амоксициліну. При цьому спостерігалась зростаюча стійкість до фторхінолонів, цефалоспоринів та гентаміцину, що свідчить про підвищення стійкості до антибіотиків у зазначений період. У цей же час тенденція зниження стійкості досліджуваного збудника до тетраціклінів була незначною. Кількість помірно чутливих ізолятів у період з 2017 по 2021 рік залишилася практично незмінною. Варто зазначити, що у цей період спостерігалось часткове зростання мультирезистентності до антибіотиків. Це свідчить про те, що деякі ізоляти можуть проявляти опір одночасно до декількох різних класів антимікробних препаратів [153, 155].

Крім того, при вивченні взаємодії протимікробних речовин із мікроорганізмом *Str. suis* NCTC 10234 було виявлено синергічну дію лише між окситетрацикліном і такими препаратами, як тилозин, ципрофлоксацин, канаміцин та поліміксин. Це означає, що комбінація цих антибіотиків забезпечує більш виражений ефект проти збудника, ніж окситетрациклін, та за умов, коли ці препарати застосовуються окремо [150, 151].

Вищесказане дозволяє стверджувати, що виявлені нами зміни чутливості ізолятів *Str. suis* до антибіотиків вказують на необхідність постійного моніторингу резистентності мікроорганізмів. Одержані нами результати свідчать про зростання опору бактерій до деяких класів антибіотиків, що може ускладнити лікування інфекційних захворювань, спричинених *Str. suis*.

Мультирезистентність *Str. suis* до антибіотиків є серйозною проблемою галузі свинарства, оскільки ускладнює вибір ефективної терапії та сприяє розповсюдженню інфекцій. Додаткові дослідження й моніторинг резистентності

до антибіотиків допоможуть удосконалити схему лікування та контролю інфекцій *Str. suis* [156].

Крім того, виявлену нами синергічну дію певних комбінацій антибіотиків децільно враховувати при розробці нових терапевтичних протоколів для боротьби зі стрептококовими інфекціями, зокрема із *Str. suis*. Подальше дослідження взаємодії антибіотиків та виявлення нових комбінацій із потенційно високою активністю може мати важливе значення для подолання антибіотикорезистентності.

Отримані нами результати досліджень підтверджують необхідність подальшого детального вивчення *Str. suis*, що дозволить розробити ефективніші методи контролю та лікування інфекційних захворювань, спричинених цим збудником [150, 154].

Одержані дані відображають певні тенденції в розвитку резистентності досліджуваних мікроорганізмів до певних компонентів препарату, що може бути зумовлено тривалим терміном застосування препаратів групи цефалоспоринів, гентаміцинів та фторхінолонових антибіотиків у господарствах, де було виділено вказані мікроорганізми.

Підвищення стійкості досліджуваного збудника до певних антибіотиків може бути наслідком нераціонального та надмірного використання цих препаратів у тваринництві, що сприяє розвитку антибіотикорезистентності. Це може мати негативний вплив на лікування інфекційних захворювань, спричинених *Str. suis*, й ускладнювати контроль за поширенням цих мікроорганізмів. Такі тенденції в резистентності досліджуваної мікрофлори зумовлюють необхідність обережного та раціонального використання антибіотиків у тваринництві та гуманній медицині. Контроль за використанням антибіотиків є важливою складовою в боротьбі з антибіотикорезистентністю, що сприяє збереженню їхньої ефективності та обмежує поширення резистентних мікроорганізмів [152, 153].

Однією з умов ефективного лікування тварин є раціональне призначення антибіотиків, тобто врахування принципів правильного добору препарату з урахуванням спектра дії, мінімальної інгібіторної концентрації та специфічних особливостей мікроорганізму, який викликає інфекцію [154].

Крім того, при призначенні протимікробних препаратів необхідно дотримуватись рекомендацій щодо дозування та тривалості їх прийому. Передчасне припинення курсу антибіотикотерапії або недотримання рекомендованої дози можуть сприяти розвитку резистентності, оскільки це створює умови для виживання та розмноження резистентних штамів.

Додатково важливо вживати заходів щодо запобігання інфекціям та здійснювати контроль за поширенням мікроорганізмів. Це включає гігієнічні заходи, вакцинацію, правильну утилізацію антибіотиків та раціональне використання їх у тваринництві [148, 151].

Застосування антибіотиків вимагає комплексного підходу, що включає доцільність призначення та використання, контроль за їх застосуванням, а також заходи щодо запобігання інфекціям та поширення резистентних мікроорганізмів.

Дослідження поверхневого антигена високовірулентної та слабовірулентної культури *Str. suis* показало, що вони проявляють антигенну активність як щодо гомологічних сироваток, так і сироваток, отриманих із досліджуваних ізолятів, які мають різну патогенність. Однак поверхневі антигени високовірулентного *Str. suis* проявляли більш виражену антигенну активність щодо обох сироваток. Це свідчить про те, що високовірулентний *Str. suis* більше споріднений із гомологічними та гетерологічними специфічними сироватками. Висока антигенна активність може вказувати на його вищу імуногенність, порівняно зі слабовірулентним штамом [155, 156].

Одержані результати вказують на роль поверхневих антигенів у патогенезі *Str. suis* і можуть впливати на взаємодію з імунною системою “господаря”.

Для проведення мікробіологічних, культурально-біохімічних, серологічних і молекулярно-генетичних досліджень нами було відібрано й охарактеризовано

ізоляти *Str. suis*, а також проведено оптимізацію термінів культивування з метою отримання максимальної біомаси цього збудника.

Мікробіологічні дослідження включали вивчення морфологічних ознак ізолятів, їхню здатність до росту на різних агарах та утворення колоній, а також оцінку морфологічних змін з використанням мікроскопа. Культурально-біохімічні тести були спрямовані на визначення ферментативних властивостей, зокрема здатності до ферментування різних цукрів і сполук. Серологічні дослідження включали використання специфічних сироваток та антисироваток для ідентифікації та типування ізолятів. Молекулярно-генетичні методи використовували для аналізу генетичних властивостей ізолятів та їх порівняння з відомими штамами *Str. suis* [130, 154].

Проведені нами дослідження дозволили визначити оптимальні умови культивування *Str. suis* з метою отримання максимальної біомаси збудника, що є важливим для подальших досліджень, з вивчення патогенезу, впливу факторів навколишнього середовища та вироблення антигенів для діагностики та вакцинації проти *Str. suis*.

Результати наших досліджень свідчать про високу частоту і значну кількість спалахів стрептококозу серед поросят на території України. Вивчення проб, відібраних із неблагополучних щодо стрептококозу господарств, дозволило виділити чисту культуру стрептококів. Слід зазначити, що стрептококи були виділені як у підсисних, так і відлучених поросят. Це свідчить про значну поширеність цього збудника інфекційних хвороб серед свиней, які утримувалися в різних умовах. Виділення чистих культур стрептококів дозволяє проводити детальні дослідження, спрямовані на вивчення цих штамів, їхньої патогенності й можливих способів контролю та профілактики захворювання [102, 117, 150].

У зв'язку з відсутністю специфічних клінічних ознак за стрептококозу свиней, остаточна діагностика цього захворювання стає загрозливим викликом для галузі свинарства. За таких умов зростає роль молекулярно-генетичних методів діагностики, зокрема класичної полімеразної ланцюгової реакції та

полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, які є найбільш чутливими й ефективними для виявлення збудника.

На жаль, в Україні на сьогодні відсутні зареєстровані комерційні ПЛР-діагностикуми, які б дозволяли швидко виявляти збудника стрептококозу свиней. Розвиток та впровадження таких діагностикумів може значно полегшити й прискорити процес діагностики цього захворювання та контролювати його поширення в господарствах.

У зв'язку з вищевказаним, одним із наших завдань була розробка чутливого й специфічного методу диференційної діагностики *Str. suis* із використанням полімеразної ланцюгової реакції. Цей метод дослідження дозволяє одночасно виявляти присутність збудників та визначати їхню належність до серотипу у пробі, і таким чином заощаджувати час та знижувати витрати на проведення реакції. Вирішення цього завдання мало забезпечити швидку й ефективну ідентифікацію *Str. suis*, що сприяло б вчасному вжиттю заходів щодо контролю захворювання [140].

Ключовим етапом у розробці набору праймерів для полімеразної ланцюгової реакції був підбір праймерів з урахуванням їхньої температури відпалу. Для цього необхідно було забезпечити однакову температуру відпалу для усіх праймерів у наборі, оскільки оптимальна температура відпалу дозволяє ефективно ампліфікувати цільові послідовності ДНК [93. 152].

Крім того, при розробці набору праймерів, проводили оцінку їхніх можливих небажаних ефектів, таких, як димери та неспецифічні реакції. Димери є неконтрольованими ампліфікаційними продуктами, які можуть утворюватися при використанні неправильно підібраних праймерів. Важливо було переконатися, що праймери не утворюють димерів між собою, що може призвести до неконтрольованого збільшення фонового сигналу. Крім того, неспецифічні реакції можуть виникати, коли праймери ампліфікують послідовності, які не є цільовими.

Таким чином, при підборі праймерів для ПЛР проводили дослідження, спрямовані на забезпечення оптимальної температури відпалу. Це

дозволяло забезпечити високу специфічність та ефективність ПЛР-реакції при діагностиці *Str. suis*.

Згідно з ISO 17025, впровадження у практику діагностичної лабораторії будь-якого аналітичного методу необхідно супроводжувати його внутрішньолабораторною валідацією, тобто оцінкою придатності методу, яка б гарантувала вірогідні й точні результати аналізу (ISO 17025). Валідація у процесі розробки нових методик особливо важлива, оскільки дозволяє своєчасно виявляти й усувати недоліки існуючих методик [93, 152, 166].

Внутрішньолабораторну валідацію розроблених методик для діагностики стрептококозу свиней проводили згідно з OIE Validation Guidelines 2014 – 3.6.3 “Development and optimisation of Nucleic acid detection assays” за показниками аналітичної чутливості, специфічності та збіжності результатів. При цьому нами були враховані рекомендації щодо розробки та оптимізації методів виявлення нуклеїнових кислот.

Одним із важливих етапів розробки методики діагностики був підбір праймерів за температурою відпалу. Відбирали праймери з однаковою температурою відпалу. Задля забезпечення ефективного ампліфікування цільового фрагмента ДНК. Крім того, щоб уникнути небажаних результатів при використанні праймерів у реакції, було проведено їх аналіз на наявність димерів і неспецифічних реакцій [152, 160].

У ході внутрішньолабораторної валідації було оцінено кілька показників. Аналітичну чутливість методики визначали шляхом виявлення низьких концентрацій цільового геному. Специфічність методики перевіряли за відсутністю позитивних реакцій зі зразками, що не містять цільової ДНК. Збіжність результатів оцінювали порівнянням результатів однієї й тієї ж реакції, проведеної в різних умовах [93, 165].

Одержані нами дані вказують на відсутність у розробленій методиці хибних результатів та неспецифічних реакцій. Виявлена висока збіжність результатів підтверджується коефіцієнтом варіації, який становив 1,30 %. Цей

показник є нижчим за прийнятий для цього методу ($CV_v \leq 2,28$), що свідчить про стабільність і повторюваність результатів. Низький рівень його варіації свідчить про високу точність і надійність розробленої методики для діагностики *Str. suis*.

Однією із переваг вищезазначеної методики є її здатність одночасно виявляти присутність у зразках збудників і визначати їх серотип, що дозволяє економити час та зменшити затрати. Розроблена методика забезпечує швидке й ефективне виявлення *Str. suis*, що є важливим для контролю та моніторингу стрептококозу у тваринництві.

На сьогодні в Україні відсутні зареєстровані комерційні ПЛР-діагностикуми для швидкого виявлення збудника стрептококозу свиней. Розроблена нами методика може бути основою для створення таких комерційних продуктів, що дозволить поліпшити діагностику та контроль захворювання у тваринництві [134, 149].

Щоб запобігати формуванню епізоотичного варіанта збудника й обмежити або припинити циркуляцію вірулентних штамів, необхідно створити “популяційний імунітет” високого рівня, тобто досягти високого рівня імунності серед тварин. “Колективний (популяційний) імунітет” відображає стан імунної системи цілої популяції.

Організація і проведення заходів з контролю та попередження інфекцій з аерозольним механізмом передачі та контактного типу вимагає урахування цього аспекту. Для таких інфекцій розроблені засоби й методи специфічної профілактики. Системний підхід до організації імунологічного моніторингу може поліпшити якість контролю епізоотичного процесу й ефективність ветеринарного нагляду за інфекціями, які контролюються засобами імунопрофілактики [156].

Для підвищення точності прогнозування інфекційних захворювань, керуючись результатами імунологічного моніторингу, необхідно коригувати організацію планового й екстреного контролю за інфекціями, які регулюються засобами специфічної профілактики. Такий підхід допоможе покращити ефективність виявлення, контроль та прогнозування інфекційних захворювань

серед тварин, а також сприятиме ранньому виявленню потенційних проблемних ділянок та ризикових груп, що дозволить вжити необхідних заходів з профілактики та контролю. Крім того, системний імунологічний моніторинг дозволить здійснювати постійний контроль за епізоотичною ситуацією й оцінювати ефективність проведених заходів [155].

Збір та аналіз даних про імунологічний стан популяції тварин дозволить вчасно реагувати на зміни в імунній відповіді та приймати обґрунтовані рішення щодо вакцинації та імунопрофілактики. Це знижуватиме ризик поширення інфекційних хвороб та сприятиме збереженню здоров'я поголів'я тварин.

Системний підхід до імунологічного моніторингу ветеринарної сфери важливий не лише для підтримання здоров'я тварин, а й забезпечення продуктивності галузі в цілому. Задля об'єктивності діагнозу, спрощення його постановки і прогнозування епізоотичного процесу у тваринницькій галузі науковці застосовують математичне моделювання з використанням інформаційних технологій [106, 109, 144].

Мультиагентне моделювання інфекційного процесу в умовах, коли інформація про елементи та чинники його та їхню взаємодію обмежена, дозволяє зрозуміти формування епізоотичної ситуації в конкретних умовах. Це дає змогу прогнозувати епізоотичний процес й ефективно використовувати ресурси для поліпшення ситуації.

Математичні моделі, включаючи мультиагентні, дозволяють досліджувати взаємодію між інфекційним агентом, “господарем” і довкіллям, а також ураховують вплив соціальних і поведінкових факторів на поширення захворювання. Використання інформаційних технологій та математичного моделювання дозволяє наочно відтворювати й досліджувати особливості розповсюдження захворювання й оцінювати ефективність запроваджених заходів контролю. Такий підхід дозволяє аналізувати взаємодію між різними факторами, такими, як “господар”, вектори передачі та середовище, які впливають на поширення інфекції, та моделювати різні сценарії й оцінювати ефективність

заходів із контролю та профілактики. Математичні моделі також можуть бути використані для прогнозування майбутнього розвитку епізоотичного процесу та визначення його можливих наслідків. Це допомагає ветеринарним службам та організаціям, які проводять моніторинг поширення інфекційних захворювань, здійснювати належний ветеринарний нагляд і планувати необхідні заходи з контролю захворювання [89, 97, 108, 154].

Застосування інформаційних технологій і математичного моделювання сприяє удосконаленню схем вакцинації та імунопрофілактики, а також дозволяє визначати оптимальні параметри вакцинаційних кампаній, зокрема дозу вакцини, розподіл ресурсів та вплив вакцинації на рівень популяційного імунітету.

Такий підхід підвищує ефективність протиепізоотичних заходів та зменшує ризик виникнення та поширення інфекційних захворювань у тваринництві. Використання математичного моделювання та інформаційних технологій у ветеринарній медицині є цінним інструментом для підвищення рівня контролю і прогнозування епізоотичних процесів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі висвітлено результати епізоотологічного моніторингу стрептококозу свиней в Україні, досліджено культуральні та ферментативні властивості ізолятів стрептококів, що спричинюють захворювання у свиней, вивчено чутливість *Str. suis* до антибіотиків, особливості його поверхневих антигенів, удосконалено методику визначення його виду і належності до серотипу на основі методу мультиплексної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу.

Одержані ід час виконання завдань дисертаційної роботи результати дають підстави зробити такі висновки:

1. Епізоотична ситуація щодо стрептококової інфекції в Україні вказує на формування стійкого нозоареалу із загрозою подальшого територіального поширення. Епізоотична ситуація щодо стрептококозу у країні є відносно стабільною, але з кожним роком кількість випадків постійно зростає (за останні 10 років виявлено близько 300 випадків цього захворювання). Встановлено що упродовж 2017–2021 рр. на фермах України зменшилася частота виявлення *Str. suis*, проте серед виділених ізолятів збільшилась кількість патогенних, що зумовлює необхідність запровадження сучасних науково-обґрунтованих заходів боротьби й ерадикації.

2. *Str. suis* становить 1,7 % від усіх патогенів, які спричинюють різні захворювання у свиней. Причому, 73,4 % захворювань спричинені асоціаціями збудників, а *Str. suis* як моноінфекція проявляється у 26,5 % випадків від усіх захворювань. Найбільшу кількість ізолятів *Str. suis* було виділено із синовіальної рідини хворих та головного мозку трупів тварин. Усі ізоляти, виділені з головного мозку, були патогенними, а ізоляти, виділені від тварин, хворих на катаральну бронхопневмонію, септицемію та інші симптомокомплекси, були переважно не патогенними.

Дослідження ступеня вірулентності 10 музейних штамів *Str. suis* показали, що 6 із них є високовірулентними, 2 – середньовірулентними, 1 –

слабовірулентний та 1 – авірулентний, що корелює з їхніми антигенними властивостями.

3. Культуральні, ферментативні та морфологічні особливості виділених ізолятів дозволяють ідентифікувати їх на рівні роду. Вивчення ферментативних властивостей збудників із застосуванням діагностичної системи *API 20 STREP* (“*bioMerieux*”, *France*) забезпечує виявлення та ідентифікацію 1, 2 та 1/2 серотипів, однак вони не можуть бути використані для ідентифікації інших серотипів *Str. suis*.

4. Усі ізоляти *Str. suis* є чутливими до пеніциліну та амоксициліну. Стійкість до еритроміцину серед ізолятів становила 88,2 %, кліндаміцину – 76,5 %, цефалексину – 55,9 %. Нами виявлено зростання стійкості до гентаміцину (з 40 % до 55,6 %) та антибіотиків фторхінолонового ряду – із 8 % та 4 % відповідно до 55,6 % та 52,2 % в ізолятів, виділених у 2021 році, порівняно з ізолятами, виділеними у 2017 році. В цьому разі дещо зменшилася кількість ізолятів стійких, до антибіотиків тетрациклінового ряду. За дослідний період кількість мультирезистентних штамів *Str. suis* збільшилася.

У результаті вивчення одночасної дії окремих протимікробних субстанцій щодо тест-мікроорганізму *Str. suis* NCTC 10234 виявлено синергічну дію між такими комплексами препаратів: окситетрациклін – тилозин, окситетрациклін – ципрофлоксацин, окситетрациклін – канаміцин та окситетрациклін – поліміксин. Такі комбінації АБС, як енрофлоксацин – ципрофлоксацин, тилозин – гентаміцин, окситетрациклін – сульфадиметоксин, енрофлоксацин – сульфадиметоксин не проявили підвищеної антимікробної активності, а зони затримки росту були порівняно меншими, ніж під час застосування монопрепаратів, які входили до складу комплексних препаратів.

5. Використання праймерів, орієнтованих на ділянку гена *gdh*, під час проведення звичайної ПЛР дозволяє ідентифікувати *Str. suis* на рівні виду. Метод мультиплексної ПЛР, націленої на ділянку гена *cps*, може бути використаний для ідентифікації *Str. suis* на рівні виду та для визначення його серотипу.

6. Доведена ефективність застосування протоколів ПЛР із електрофоретичною детекцією результатів для визначення генотипів штамів *Str. suis*, які відповідають окремим їх фенотипам. Протоколи визначених ділянок генів *mpr* і *epf*, пов'язаних із факторами патогенності, корелюють зі ступенем вірулентності досліджуваних штамів і можуть бути використані для встановлення фенотипового профілю, що може бути важливим для подальших досліджень зі створення вакцин.

7. Проведення досліджень з використанням ПЛР-методу з детекцією результатів у реальному часі дає можливість виявляти *Str. suis* у кількості 1×10^4 КУО/см³ у зразку. Серед інших апробованих методів (мікробіологічних і класичної ПЛР) метод ПЛР у реальному часі є значно чутливішим за інші та перспективним для виявлення ДНК *Str. suis* у зразку. Нами запропоновано протокол з оптимізованою температурою 55 °С (*SD* 0,26 %, *CV* 1,26 %), концентрацією праймерів 10 пМ та концентрацією зонда 2,5 пМ. Лабораторіям із моніторингу та контролю за поширенням стрептококозу свиней доцільно використовувати ПЛР у режимі реального часу.

8. Антигенні властивості штамів *Str. suis* з різною вірулентністю споріднені з гетерогенними сироватками до слабовірулентних та високовірулентних штамів. Фракції визначеного розміру близько споріднені з гетерологічними сироватками білків такого ж розміру, отриманих від інших штамів. У частині досліджень спостерігається незначна перехресна реакція із фракцією білків меншого розміру. Білковий антиген 120–140 кДа і більше високо споріднений із гетерологічними сироватками, отриманими до білків такого ж розміру загального поверхневого і цільноклітинного антигена.

9. Розроблені протоколи діагностики стрептококозу свиней із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів досліджень, та запропоновано схеми діагностики в умовах лабораторії та на виробництві.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для використання у практиці ветеринарної медицини пропонуємо:

1. під час застосування оптимізованого нами методу діагностики стрептококозу свиней з одночасним визначенням серотипу збудника методом ПЛР рекомендуємо користуватися розробленими нами методичними рекомендаціями (Тарасов О. А., Захарова О. М., Савченко М. О., Корнієнко Л. Є. Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції – К., ІВМ НААН, 2021. – 22 с.);

2. з метою збереження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків та запобігання стійкості до них необхідно дотримуватися раціонального використання цих препаратів та попередньо проводити дослідження на антибіотикорезистентність. За результатами проведених досліджень при захворюванні спричиненого *Str. suis*, ми рекомендуємо в ветеринарній практиці застосовувати такі препарати, як: ципрофлоксацин, енрофлоксацин, цефтріаксон.

3. важливою складовою подальших досліджень зі створення вакцин мають бути протоколи визначених ділянок генів *mpr* і *epf*, які пов'язані із факторами патогенності. Вони корелюють зі ступенем вірулентності досліджуваних штамів і можуть бути використані для визначення фенотипового профілю;

4. результати досліджень використовуються під час проведення наукових досліджень в лабораторіях “Лабораторія зоонозних інфекцій та оцінки ризиків” та “Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин”, також в освітньому процесі вищих навчальних закладів за спеціальністю “Ветеринарна медицина” під час вивчення дисциплін: “Епізоотологія, інфекційні хвороби та профілактична медицина”, “Ветеринарна мікробіологія”, “Лабораторна діагностика заразних хвороб”, “Ветеринарна мікробіологія та імунологія”, “Диференційна патологоанатомічна діагностика хвороб тварин”, “Методи наукових досліджень”, “Крайова епізоотологія та профілактика хвороб” (додаток А1–А5).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aarestrup, F. M., Jorsal, S. E., & Jensen, N. E. (1998). Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Veterinary microbiology*, 60(1), 59–66. URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00147-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00147-3)
2. Aarestrup, F. M., Rasmussen, S. R., Artursson, K., & Jensen, N. E. (1998). Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Veterinary Microbiology*, 63(1), 71–80. URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00228-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00228-4)
3. Almuzara, M., Barberis, C., Velázquez, V. R., Ramirez, M. S., Famiglietti, A., & Vay, C. (2016). Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–Time-of–Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) as a Reliable Tool to Identify Species of Catalase–negative Gram–positive Cocci not Belonging to the *Streptococcus* Genus. *The open microbiology journal*, 10, 202–208. URL: <https://doi.org/10.2174/1874285801610010202>
4. Arenas, J., Zomer, A., Harders-Westerveen, J., Bootsma, H. J., De Jonge, M. I., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H. E., De Greeff, A. (2020). Identification of conditionally essential genes for *Streptococcus suis* infection in pigs, *Virulence*, 11(1), 446–464. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1764173>
5. Arndt E. R. (2017). An investigation into distribution of serotypes and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus suis* isolates from clinical cases and healthy carrier pigs. *University of Guelph*. 2–15. URL: <http://hdl.handle.net/10214/10309>
6. Bagcigil, A. F., İkiş, S., Metiner, K., Özgür, N. Y., Ak, S., & Ilgaz, A. A. (2013). Isolation of *Streptococcus* species from the tonsils of slaughtered pigs. *Turkish journal of veterinary & animal sciences*, 37(1), 17. URL: <https://doi.org/10.3906/vet-0911-237>
7. Beineke, A., Bennecke, K., Neis, C., Schröder, C., Waldmann, K., Baumgärtner, W., Weigand, P., & Baums, C. (2007). Comparative evaluation of

virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Veterinary microbiology*, 128(3-4), 423–430.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.028>

8. Benkirane, R., Gottschalk, M. G., & Dubreuil, J. D. (1997). Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting, *FEMS Microbiology Letters*, 153(2), 379–385. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12599.x>

9. Bergey, D.H., Breed, R.S. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology* 7th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co. – 1130.

URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848>

10. Bolibruh, M., & Rublenko, I. (2023). Influence of factors on the gastrointestinal microbiota of pigs. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 6(1), 68–71. URL: <https://doi.org/10.32718/ujvas6-1.11>

11. Callens, B. F., Haesebrouck, F., Maes, D., Butaye, P., Dewulf, J., & Boyen, F. (2013). Clinical resistance and decreased susceptibility in *Streptococcus suis* isolates from clinically healthy fattening pigs. *Microb Drug Resist*, 19(2), 146–151.

URL: <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0131>

12. Calzas, C., Taillardet, M., Fourati, I. S., Roy, D., Gottschalk, M., Soudeyns, H., Defrance, T., & Segura, M. (2017). Evaluation of the Immunomodulatory Properties of *Streptococcus suis* and Group B Streptococcus Capsular Polysaccharides on the Humoral Response. *Pathogens*, 6(2), 16.

URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens6020016>

13. Capriolia, A., Busani, L., Martel, J. L., & Helmuth, R. (2000). Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 4(14), 295–301.

URL: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00140-0)

14. Charland, N., Jacques, M., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (1997). Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular

epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology*, 143 (Pt 11), 3607–3614. URL: <https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3607>

15. Chen, B., Zhang, A., Li, R., Mu, X., He, H., Chen, H., & Jin, M. (2010). Evaluation of the protective efficacy of a newly identified immunogenic protein, HP0272, of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol Lett*, 307(1), 12–18. . URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01944.x>

16. Chen, L., Song, Y., Wei, Z., He, H., Zhang, A., & Jin, M. (2013). Antimicrobial susceptibility, tetracycline and erythromycin resistance genes, and multilocus sequence typing of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs in China. *The Journal of veterinary medical science*, 75(5), 583-587. URL: <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0279>

17. Clifton–Hadley, F. A., Alexander, T. J., Upton, I., & Duffus, W. P. (1984). Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *The Veterinary record*, 114(21), 513–518. URL: <https://doi.org/10.1136/vr.114.21.513>

18. Clifton–Hadley, F. A., Alexander, T. J., Upton, I., & Duffus, W. P. (1984). Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs. *The Veterinary record*, 114(21), 513–518. URL: <https://doi.org/10.1136/vr.114.21.513>

19. Cucco, L., Panicià, M., Massacci, F., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I. ...Magistrali, C. (2022). New Sequence Types and Antimicrobial Drug–Resistant Strains of *Streptococcus suis* in Diseased Pigs, Italy, 2017–2019. *Emerging infectious diseases*, 28(1), 139–147. URL: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2801.210816>

20. Dall Agnol, A. M., Melo, F. D., & Zuffo, J. P. (2014). Perfil de resistência a antimicrobianos de *Streptococcus suis* tipo 2 isolados a partir de tonsilas de suínos de abate. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42(1), 1–6.

21. Davies, P. R., & Ossowicz, C. J. (1991). Evaluation of methods used for detecting *Streptococcus suis* type 2 in tonsils, and investigation of the carrier state in pigs. *Research in veterinary science*, 50(2), 190–194. URL: [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90104-v](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90104-v)

22. Dechêne-Tempier, M., Marois-Créhan, C., Libante, V., Jouy, E., Leblond-Bourget, N., & Payot, S. (2021). Update on the mechanisms of antibiotic resistance and the mobile resistome in the emerging zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Microorganisms*, 9(8), 1765. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081765>
23. Dee, S. A., Carlson, A. R., Winkelman, N. L., & Corey, M. M. (1993). Effect of management practices on the *Streptococcus suis* carrier rate in nursery swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203(2), 295–299.
24. Dekker, C., Bouma, A., Daemen, A., van Leengoed, L., Jonker, F. H., Wagenaar, J. A., & Stegeman, J. A. (2012). Homologous whole bacterin vaccination is not able to reduce *Streptococcus suis* serotype 9 strain 7997 transmission among pigs or colonization. *Vaccine*, 30, 1379–1387. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.035>
25. Dekker, N., Daemen, I., Verstappen, K., de Greeff, A., Smith, H., & Duim, B. (2016). Simultaneous quantification and differentiation of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 by quantitative real-time PCR evaluated in tonsillar and nasalsamples of pigs. *Pathogens*, 5(3), 46. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens5030046>
26. Devriese, A. L., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., & Haesebrouck, F. (1995). Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 187–197. URL: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00119-q](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00119-q)
27. 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 microbiology*, 26(1–2), 141–150. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90050-p](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90050-p)
28. Dong, W. Y., Zhu, Y., Ma, J., Ma, Y., Zhang, L., Yuan, Z., ... Yao, H. (2017) Multilocus sequence typing and virulence genotyping of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates revealed high genetic and virulence diversity. *FEMS Microbiol Lett*, 364(22), 1–8. URL: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx192>

29. Dutkiewicz, J., Zając, V., Sroka, J., Wasiński, B., Cisak, E., Sawczyn, A., Kloc, A., & Wójcik–Fatla, A. (2018) *Streptococcus suis*: a re–emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II – Pathogenesis. *Ann Agric Environ Med*, 25(1), 186–203. URL: <https://doi.org/10.26444/aaem/85651>
30. El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., ... Siegart, E. (2016). Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. *Veterinary microbiology*, 194, 11–22. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.009>
31. Farooq, M., Smoglica, C., Ruffini, F., Soldati, L., Marsilio, F., & Di Francesco, C. E. (2022). Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Conventional and Antibiotic-Free Poultry Farming, Italy. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(18), 2310. URL: <https://doi.org/10.3390/ani12182310>
32. Feng, L., Zhu, J., Chang, H., Gao, X., Gao, C., Wei, X. & Bei, W. (2016). The CodY regulator is essential for virulence in *Streptococcus suis* serotype 2. *Sci Rep*, 6(21241), 1–15. URL: <https://doi.org/10.1038/srep21241>.
33. Ferrando, M. L., De Greeff, A., Van Rooijen, W. J., Stockhofe–Zurwieden, N., Nielsen, J., Wichgers Schreur, P. J., & Schultsz, C. (2015). Host–pathogen interaction at the intestinal 3 mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*. *The Journal of infectious diseases*, 212(1), 95–105. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu813>
34. Ferrando, M. L., Willemse, N., Zaccaria, E., Pannekoek, Y., Van Der Ende, A. & Schultsz, C. (2017). Streptococcal Adhesin P (SadP) contributes to *Streptococcus suis* adhesion to the human intestinal epithelium. *PLoS One*, 12(4), 1–19. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175639>
35. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H. J., & Pijoan, C. (1996). 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. *Canadian journal of veterinary research*, 60(1), 72–74.

36. Galina, L., Vecht, U., Wisselink, H. J., & Pijoan, C. (1996). 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. *Canadian journal of veterinary research*, 60(1), 72–74.

37. Glass-Kaastra, S. K., Pearl, D. L., Reid-Smith, R. J., McEwen, B., Slavic, D., McEwen, S. A. & Fairles, J. (2014). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* F4, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* isolates from a diagnostic veterinary laboratory and recommendations for a surveillance system. *Canadian Veterinary journal*, 55(4), 341–348.

38. Glass-Kaastra, S. K., Pearl, D. L., Reid-Smith, R. J., McEwen, B., Slavic, D., & Fairles, J. (2014). Surveillance of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* from Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(4), 241–249.

39. Gottschalk, M., Higgins, R., Jacques, M., Beaudoin, M. & Henrichsen, J. (1991). Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology*, 29(11), 2590-2594. URL: <https://doi.org/10.1128/jcm.29.11.2590-2594.1991>

40. Gottshalk, M. & Segura. M. (2000). The pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet. Microbiol*, 76(3), 259–272. URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00250-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00250-9)

41. Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging microbes & infections*, 3(6), 45. URL: <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>

42. Gurung, M., Tamang, M. D., Moon, D. C., Kim, S. R., Jeong, J. H., Jang, G. C., Jung, S. C., & Lim, S. K. (2015). Molecular Basis of Resistance to Selected Antimicrobial Agents in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2332–2336. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.00123-15>

43. Gurung, M., Tamang, M. D., Moon, D. C., Kim, S. R., Jeong, J. H., Jang, G. C., Jung, S. C., & Lim, S. K. (2015). Molecular Basis of Resistance to Selected Antimicrobial Agents in the Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2332–2336. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.00123-15>
44. Haas, B., & Grenier, D. (2018) Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: A veterinary, medical, and economic challenge. *Med Mal Infect.*;48(3):159–166. URL: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.10.001>
45. Habrun, B., Kompes, G., Cvetnić, Ž., Špičić, S., Benić, M., & Mitak, M. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 80, 571–583.
46. Hernandez-Garcia, J., Wang, J., Restif, O., Holmes, M. A., Mather, A. E., Weinert, L. A., Wileman, T. M., Thomson, J. R., Langford, P. R., Wren, B. W., Rycroft, A., Maskell, D. J., Tucker, A. W., & BRADP1T Consortium (2017). Patterns of antimicrobial resistance in *Streptococcus suis* isolates from pigs with or without streptococcal disease in England between 2009 and 2014. *Veterinary microbiology*, 207, 117–124. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.002>
47. Hosain, M. Z., Kabir, S. M. L., & Kamal, M. M. (2021). Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Veterinary world*, 14(1), 210–221. URL: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.210-221>
48. Huang, K., Zhang, Q., Song, Y., Zhang, Z., Zhang, A., Xiao, J., & Jin, M. (2016). Characterization of Spectinomycin Resistance in *Streptococcus suis* Leads to Two Novel Insights into Drug Resistance Formation and Dissemination Mechanism. *Antimicrob agents chemother*, 60(10), 6390-6392. URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.01157-16>
49. Javed, M. U., Hayat, M. T., Mukhtar, H., & Imre, K. (2023). CRISPR-Cas9 System: A Prospective Pathway toward Combatting Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1075. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061075>

50. Ji, X., Sun, Y., Liu, J., Zhu, L., Guo, X., Lang, X., & Feng, S. (2016). A novel virulence-associated protein, vapE, in *Streptococcus suis* serotype 2. *Mol Med*, 16(13), 2871–2877. URL: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4818>
51. Karp, B. E., Tate, H., Plumblee, J. R., Dessai, U., Whichard, J. M., Thacker, E. L., Hale, K. R., Wilson, W., Friedman, C. R., Griffin, P. M., & McDermott, P. F. (2017). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Two Decades of Advancing Public Health Through Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Foodborne pathogens and disease*, 14(10), 545–557. URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.228>
52. Kataoka, Y., Sugimoto, C., Nakazawa, M., & Kashiwazaki, M. (1991). Detection of *Streptococcus suis* type 2 in tonsils of slaughtered pigs using improved selective and differential media. *Veterinary Microbiology*, 28(4), 335–342. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90068-q](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90068-q)
53. Kerdsin, A., Akeda, Y., Takeuchi, D. *et al.* (2018). Genotypic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from humans in Thailand. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37, 917–925. URL: <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3208-8>
54. Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Akeda, Y., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M. & Oishi, K. (2012). Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR. *Journal of medical microbiology*, 61(Pt 12), 1669–1672. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.048587-0>
55. Kerdsin, A., Takeuchi, D., Nuangmek, A., Akeda, Y., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2020). Genotypic Comparison between *Streptococcus suis* Isolated from Pigs and Humans in Thailand. *Pathogens*, 9(1), 50. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens9010050>
56. Kerdsin, A., Akeda, Y., Hatrongjit, R., Detchawna, U., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2014). *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *Journal of medical microbiology*, 63(Pt 6), 824–830. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069757-0>

57. Kerdsin, A., Dejsirilert, S., Puangpatra, P., Sripakdee, S., Chumla, K., Boonkerd, N., Polwichai, P., Tanimura, S., Takeuchi, D., Nakayama, T., Nakamura, S., Akeda, Y., Gottschalk, M., Sawanpanyalert, P., & Oishi, K. (2011). Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerging infectious diseases*, *17*(5), 835–842. URL: <https://doi.org/10.3201/eid1705.100754>

58. King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *Journal of clinical microbiology*, *40*(10), 3671–3680. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3671-3680.2002>

59. Koike, S., Mackie, R., & Aminov, R. (2017). Agricultural Use of Antibiotics and Antibiotic Resistance. School of Medicine and Dentistry, University of Aberdeen, 3–33.

60. Köck, R., & Cuny, C. (2020). Multiresistente Erreger bei Tier und Mensch [Multidrug-resistant bacteria in animals and humans]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*, *115*(3), 189–197. URL: <https://doi.org/10.1007/s00063-018-0487-x>

61. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. URL: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

62. Lamont, M. H., Edwards, P. T., & Windsor, R. S. (1980). Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey. *The Veterinary record*, *107*(20), 467–469. URL: <https://doi.org/10.1136/vr.107.20.467>

63. Lequeux, G., & Le Drean, E. (2015). Susceptibility of 45 recent French field isolates of *Streptococcus suis* to florfenicol. *Journal of Swine Health and Production*, *23*(3), 140–142.

64. Li, J., Fan, Q., Jin, M., Mao, C., Zhang, H., Zhang, X., Sun, L., Grenier, D., Yi, L., Hou, X., & Wang, Y. (2021) Paeoniflorin reduce luxS/AI-2 system-controlled

biofilm formation and virulence in *Streptococcus suis* . *Virulence* 12(1), 3062–3073.

URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2010398>

65. Li, L. L., Liao, X. P., Sun, J., Yang, Y. R., Liu, B. T., Yang, S. S., Zhao, D. H., & Liu, Y. H. (2012). Antimicrobial resistance, serotypes, and virulence factors of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 9(7), 583–588. URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1106>

66. Li, Q., Fei, X., Zhang, Y., Guo, G., Shi, H., & Zhang, W. (2021) The biological role of MutT in the pathogenesis of the zoonotic pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence* 12(1), 1538–1549.

URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1936770>

67. Li, Q., Fu, Y., Ma, C., He, Y., Yu, Y., Du, D., ... Zhang, W. (2017) The non-conserved region of MRP is involved in the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence* 8(7), 1274–1289.

URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313373>

68. Li, Q., Zhou, G., Fei, X., Tian, Y., Wang, S., & Shi, H. (2023). Engineered Bacterial Outer Membrane Vesicles with Lipidated Heterologous Antigen as an Adjuvant-Free Vaccine Platform for *Streptococcus suis*. *Applied and environmental microbiology*, 89(3), e0204722. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.02047-22>

69. Li, Y. A., Chen, Y., Du, Y. Z., Guo, W., Chu, D., Fan, J., Wang, X., Bellefleur, M., Wang, S., & Shi, H. (2020). Live-attenuated *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis vaccine with regulated delayed fur mutation confer protection against *Streptococcus suis* in mice. *BMC veterinary research*, 16(1), 129.

URL: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02340-4>

70. Lothar, S. A., Demczuk, W., Martin, I., Mulvey, M., Dufault, B., Lagacé-Wiens, P., & Keynan, Y. (2017). Clonal Clusters and Virulence Factors of Group C and G *Streptococcus* Causing Severe Infections, Manitoba, Canada, 2012–2014. *Emerg. Infect. Dis*, 23(7), 1079–1088. URL: <https://doi.org/10.3201/eid2307.161259>

71. Lugagne, J. B., & Dunlop, M. J. (2022). Anticipating antibiotic resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6583), 818–819. URL: <https://doi.org/10.1126/science.abn9969>
72. Lun, S., Perez-Casal, J., Connor, W., Willson, P. J. (2003). Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial pathogenesis*, 34(1), 27–37. URL: [https://doi.org/10.1016/s0882-4010\(02\)00192-4](https://doi.org/10.1016/s0882-4010(02)00192-4)
73. Lun, Z. R., Wang, Q. P., Chen, X. G., Li, A. X., & Zhu, X. Q. (2007). *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(3), 201–209. URL: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70001-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70001-4)
74. Ma, F., Yi, L., Yu, N. W., Wang, G. Y., Ma, Z., Lin, H. X., & Fan, H. J. (2017). *Streptococcus suis* Serotype 2 Biofilms Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 86. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00086>
75. Madsen, L. W., Svensmark, B., Elvestad, K., Aalbaek, B., & Jensen, H. E. (2002). *Streptococcus suis* Serotype 2 Infection in Pigs: New Diagnostic and Pathogenetic Aspects. *Journal of Comparative Pathology*, 126(1), 57–65. URL: <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0522>
76. Maneerat, K., Yongkiettrakul, S., Kramomtong, I., Tongtawe, P., Tapchaisri, P., Luangsuk, P., Chaicumpa, W., Gottschalk, M., & Srimanote, P. (2013). Virulence genes and genetic diversity of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from Thailand. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 2, 69–79. URL: <https://doi.org/10.1111/tbed.12157>
77. Martin del Campo Sepúlveda, E., Altman, E., Kobisch, M., D’Allaire, S., & Gottschalk, M. (1996). Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen–based indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, 52(1–2), 113–125. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(96\)00056-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(96)00056-9)
78. McDermott, P. F., Walker, R. D., & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International journal of toxicology*, 22(2), 135–143. URL: <https://doi.org/10.1080/10915810305089>

79. McInnes, R. S., McCallum, G. E., Lamberte, L. E., & van Schaik, W. (2020). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current opinion in microbiology*, *53*, 35–43. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>

80. Mola, I., Onibokun, A., & Oranusi, S. (2021). Prevalence of multi-drug resistant bacteria associated with foods and drinks in Nigeria (2015-2020): A systematic review. *Italian journal of food safety*, *10*(4), 9417. URL: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2021.9417>

81. Moreno, L. Z., Matajira, C. E. C., Gomes, V. T. M., Silva, A. P. S., Mesquita, R. E., Christ, A. P. G., Sato, M. I. Z., & Moreno, A. M. (2016). Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of atypical *Streptococcus* species from porcine clinical specimens. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *44*, 376–381. URL: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.045>

82. Mwaniki, C. G., Robertson, I. D., & Hampson, D. (1994). The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries. *Australian veterinary journal*, *71*(11), 385–386. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00938.x>

83. Oh, S. I., Jeon, A. B., Jung, B. Y., Byun, J. W., Gottschalk, M., Kim, A., Kim, J. W., & Kim, H. Y. (2017). Capsular serotypes, virulence-associated genes and 9 antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from pigs in Korea. *J Vet Med Sci* *79*, 780–787. URL: <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0514>

84. Pei, X., Liu, M., Zhou, H., & Fan, H. (2020). Screening for phagocytosis resistance-related genes via a transposon mutant library of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence*, *11*(1), 825–838. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1782088>

85. Perch, B., Pedersen, K. B., & Henrichsen, J. (1983). Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology*, *17*(6), 993–996. URL: <https://doi.org/10.1128/jcm.17.6.993-996.1983>

86. Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., & Stoltman, G. (2013). Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasterella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. *Journal of Swine Health and Production*, 21(1), 30–41.

87. 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. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 6(3), 326–334.

88. Reller, L., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*, Vol. 49. 1749–1755. URL: <https://doi.org/10.1086/647952>

89. Romaniuk, L. B., Kravets, N. Y., Klymniuk, S. I., Копча, V. S., & Dronova, O. Y. (2020). Антибіотикорезистентність умовно-патогенних мікроорганізмів: актуальність, умови виникнення, шляхи подолання. *Інфекційні хвороби*, 4, 63–71. URL: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2019.4.10965>

90. Roy, D., Fittipaldi, N., Dumesnil, A., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2014). The protective protein Sao (surface antigen one) is not a critical virulence factor for *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbial pathogenesis*, 67-68, 31–35. URL: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.02.002>

91. Salasia, S. I., & Lämmler, C. (1995). Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs. *Journal of veterinary medicine, Series B*, 42(2), 78–83. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1995.tb00685.x>

92. Salles, M. W., Perez–Casal, J., Willson, P., & Middleton, D. M. (2002). Changes in the leucocyte subpopulations of the palatine tonsillar crypt epithelium of pigs in response to *Streptococcus suis* type 2 infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87(1–2), 51–63. URL: [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00040-5](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00040-5)

93. Savcheniuk, M. O., Tarasov, O. A., Zakharova, O. M., Korniienko, L. Y., Zotsenko, V. M., & Tsarenko, T. M. (2022). Detection of *Streptococcus suis* using the optimized real-time polymerase chain reaction protocol. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(2), 168–173. URL: <https://doi.org/10.15421/022221>
94. Schwerk, C. (2017) Muramidase-released protein of *Streptococcus suis* : New insight into its impact on virulence. *Virulence*, 8(7), 1078–1080. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1325985>
95. Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends microbiology*, 25(7), 585-599. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005>
96. Silva, L. M., Baums, C. G., Rehm, T., Wisselink, H. J., Goethe, R., & Valentin-Weigand, P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 117–127. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.013>
97. Smith, H. E., Damman, M., Van Der Velde, J., Wagenaar, F., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smits, M. A. (1999). Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun*, 67(4), 1750–1756. URL: <https://doi.org/10.1128/iai.67.4.1750-1756.1999>
98. Smith, H. E., Reek, F. H., Vecht, U., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1993). Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infection and immunity*, 61(8), 3318–3326. URL: <https://doi.org/10.1128/iai.61.8.3318-3326.1993>
99. Soares, T. C., Gottschalk, M., Lacouture, S., Megid, J., Ribolla, P. E., Pantoja, J. C., & Paes, A. C. (2015). *Streptococcus suis* in employees and the environment of swine slaughterhouses in São Paulo, Brazil: Occurrence, risk factors, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 79(4), 279–284.

100. Soares, T. C., Paes, A. C., Megid, J., Ribolla, P. E., Paduan, K. S., & Gottschalk, M. (2014). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from clinically healthy swine in Brazil. *Canadian journal of veterinary research*, 78(2), 145–149.

101. Sorum, H., & Sunde, M. (2001). Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Norwegian School of Veterinary Science*, 32(3-4), 227–241. URL: <https://doi.org/10.1051/vetres:2001121>

102. Strangmann, E., Fröleke, H., & Kohse, K. P. (2002). Septic shock caused by *Streptococcus suis* : Case report and investigation of a risk group. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205(5), 385–392. URL: <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00165>

103. Staats, J. J., Feder, I., Okwumabua, O., & Chengappa, M. M. (1997). *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary research communications*, 21(6), 381–407. URL: <https://doi.org/10.1023/a:1005870317757>

104. Sweeney, M. T., Lindeman, C., Johansen, L., Mullins, L., Murray, R., Senn, M. K., ... Watts, J. L. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs in the United States and Canada, 2011 to 2015. *Journal of Swine Health and Production*, 25, 106–120. URL: <https://doi.org/10.54846/jshap/1002>

105. Swildens, B., Wisselink, H. J., Engel, B., Smith, H. E., Nielen, M., Verheijden, J. H., & Stegeman, J. A. (2005). Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR. *Veterinary microbiology*, 109(3–4), 223–228. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.024>

106. Tenenbaum, T., Asmat, T. M., Seitz, M., Schrotten, H., & Schwerk, C. (2016). Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis. *Future microbiology*, 11, 941–954. URL: <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0028>

107. Thu, I. S. L., Tragoolpua, K., Intorasoot, S., Anukool, U., Khamnoi, P., Kerdsin, A., & Tharinjaroen, C. S. (2021). Direct Detection of *Streptococcus suis* from

Cerebrospinal Fluid, Positive Hemoculture, and Simultaneous Differentiation of Serotypes 1, 1/2, 2, and 14 within Single Reaction. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(8), 996. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens10080996>

108. Tien, L. H., Nishibori, T., Nishitani, Y., Nomoto, R., & Osawa, R. (2013). Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA–DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies. *Vet Microbiol*, 162(2–4), 842–849. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.001>

109. Tumburrano, A., Barbara, A., Gentili, A., & Laurenti, P. (2018). Contrasto all'antibiotico-resistenza nella catena alimentare: una revisione narrativa [Control of antimicrobial resistance in the food chain: a narrative review]. *Igiene e sanita pubblica*, 74(6), 565–587.

110. Tyrnenopoulou, P., & Fthenakis, G. C. (2023). Clinical Aspects of Bacterial Distribution and Antibiotic Resistance in the Reproductive System of Equids. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12(4), 664. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040664>

111. Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, 14(12), 1750–1766. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>

112. Uecker H. (2018). Effectively Evolution-proof Antibiotics?. *Trends in microbiology*, 26(12), 969–970. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.002>

113. Udaondo, Z., & Matilla, M. A. (2020). Mining for novel antibiotics in the age of antimicrobial resistance. *Microbial biotechnology*, 13(6), 1702–1704. URL: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13662>

114. Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wiczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(8), 1079. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

115. Van Hout, J., Heuvelink, A., & Gonggrijp, M. (2016). Monitoring of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* in the Netherlands, 2013–2015. *Veterinary Microbiology*, *194*, 5–10. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.014>
116. Van Samkar, A., Brouwer, M. C., Schultsz, C., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2015). *Streptococcus suis* meningitis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(10). URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004191>
117. Varela, N. P., Gadbois, P., Thibault, C., Gottschalk, M., Dick, P., & Wilson, J. (2013). Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*. *Animal health research reviews*, *14*(1), 68–77. URL: <https://doi.org/10.1017/S1466252313000029>
118. Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Tetenburg, B. J., Wisselink, H. J., & Smith, H. E. (1997). Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific, *Veterinary Microbiology*, *58*(1), 53–60. URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(97\)00131-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(97)00131-4)
119. Vecht, U., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smith, H. E. (1996). Characterization of virulence of the *Streptococcus suis* serotype 2 reference strain Henrichsen S 735 in newborn gnotobiotic pigs. *Veterinary microbiology*, *51*(1-2), 125-36. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(96\)00028-4](https://doi.org/10.1016/0378-1135(96)00028-4)
120. Vecht, U., Wisselink, H. J., Anakotta, J., & Smith, H. E. (1993). Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology*, *34*(1), 71–82. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90008-u](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90008-u)
121. Vecht, U., Wisselink, H. J., Jellema, M. L., & Smith, H. E. (1991). Identification of Two Proteins Associated with Virulence of *Streptococcus suis* Type 2, *Infection and immunity*, *59* (9), 3156–3162.
122. Vela, A. I., Moreno, M. A., Cebolla, J. A., González, S., Latre, M. V., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2005). Antimicrobial susceptibility of

clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Veterinary microbiology*, 105(2), 143-147. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.10.009>

123. Walther, B., Tedin, K., & Lübke-Becker, A. (2017). Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Veterinary microbiology*, 200, 71–78. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.017>

124. Vrancianu, C. O., Popa, L. I., Bleotu, C., & Chifiriuc, M. C. (2020). Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 11, 761. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00761>

125. Wang, X., Sun, J., Bian, C., Wang, J., Liang, Z., Shen, Y., Yao, H., Huang, J., Wang, L., Zheng, H., & Wu, Z. (2021). The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Streptococcus suis* cps31. *Veterinary microbiology*, 259, 109149. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109149>

126. Wang, Y., & Salazar, J. K. (2016). Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(1), 183–205. URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12175>

127. Wang, Y., Wang, Y., Sun, L., Grenier, D., & Yi, L. (2018). *Streptococcus suis* biofilm: regulation, drug-resistance mechanisms, and disinfection strategies. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(21), 9121–9129. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9356-z>

128. Wasteson, Y., Heie, S., Roberts, M. C. (1994). Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, 41(1–2), 41–49. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90134-1)

129. Wileman, T. M., Weinert, L. A., Howell, K. J., Wang, J., Peters, S. E., Williamson, S. M., ... Tucker, A. W. (2019). Pathotyping the Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis*: Novel Genetic Markers To Differentiate Invasive Disease-Associated Isolates from Non-Disease-Associated Isolates from England and Wales. *J Clin Microbiol*, 57(7), 1712–1718. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.01712-18>

130. Wisselink, H. J., Reek, F. H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M. A., & E. Smith, H. (1999). Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR, *Veterinary Microbiology*, 67(2), 143–157. URL: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00036-X)

131. Wisselink, H. J., Smith, H. E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., & Vecht, U. (2000). Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary microbiology*, 74(3), 237–248. URL: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00188-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00188-7)

132. Wollmuth, E. M. (2017). A Survey of β -lactam Antibiotic Resistance Genes and Culturable Ampicillin Resistant Bacteria in Minnesota Soils. Departmental Honors Projects, 53, 6–28. URL: <https://digitalcommons.hamline.edu/dhp/53>

133. Xia, X., Qin, W., Zhu, H., Wang, X., Jiang, J., & Hu, J. (2019). How *Streptococcus suis* serotype 2 attempts to avoid attack by host immune defenses. *J Microbiol Immunol Infect*, 52(4), 516–525. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.03.003>

134. Xia, X., Wang, X., Wei, X., Jiang, J., Hu, J. (2018). Methods for the detection and characterization of *Streptococcus suis*: from conventional bacterial culture methods to immunosensors. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111(12), 2233–2247. URL: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1116-7>

135. Xu, Q., Chen, H., Sun, W., Zhang, Y., Zhu, D., Rai, K. R., Chen, J. L., & Chen, Y. (2021). sRNA23, a novel small RNA, regulates to the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence* 12(1), 3045–3061. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2008177>

136. Yao, J., Shang, K., Huang, J., Ran, W., Kashif, J., & Wang, L. (2014). Overexpression of an ABC transporter and mutations of GyrA, GyrB, and ParC in contributing to high-level ciprofloxacin resistance in *Streptococcus suis* type 2. *BioScience Trends*, 8(2), 84–92. URL: <https://doi.org/10.5582/bst.8.84>

137. Zhang, A., Yang, M., Hu, P., Wu, J., Chen, B., Hua, Y., & Jin, M. (2011). Comparative genomic analysis of *Streptococcus suis* reveals significant genomic diversity among different serotypes. *BMC Genomics*, 12, 523. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-523>

138. Zhang, J., Zhu, J., Ren, H., Zhu, S., Zhao, P., Zhang, F., ... Qi, Z. (2013). Rapid visual detection of highly pathogenic *Streptococcus suis* serotype 2 isolates by use of loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*, 51(10), 3250–3256. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.01183-13>

139. Zheng, C., Ren, S., Xu, J., Zhao, X., Shi, G., Wu, J., & Bei, W. (2017). Contribution of NADH oxidase to oxidative stress tolerance and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence*, 8(1), 53–65. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1201256>

140. Zheng, C., Xu, J., Shi, G., Zhao, X., Ren, S., Li, J., Chen, H., & Bei, W. (2016). Formate-tetrahydrofolate ligase is involved in the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbial pathogenesis*, 98, 149–154. URL: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.009>

141. Zhou, Y., Dong, X., Li, Z., Zou, G., Lin, L., Wang, X., Chen, H., Gasser, R. B., & Li, J. (2017). Predominance of *Streptococcus suis* ST1 and ST7 in human cases in China, and detection of a novel sequence type, ST658. *Virulence*, 8(6), 1031–1035. URL: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1243193>

142. Zou, G., Zhou, J., Xiao, R., Zhang, L., Cheng, Y., Jin, H., ... Zhou, R. (2018). Effects of Environmental and Management-Associated Factors on Prevalence and Diversity of *Streptococcus suis* in Clinically Healthy Pig Herds in China and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*, 84(8), 2590–2617. URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-17>

143. Айшпур, О. Е., Ничик, С. А., & Тарасов, О. А. (2014). Стрептококкоз – проблема сучасного свинарства. *Тваринництво України*, 7, 87–89.

144. Андрєєва, І. А., Македонський, І. О., Степанський, Д. О., & Чемерис, О. Л. (2015). Аспекти дослідження антибіотикорезистентності мікроорганізмів на сучасному етапі. *Annals of Mechnikov Institute*, 2, 160–162.

145. Бондар, В. М., Пилипенко, М. М., & Свінтуковський, М. Ю. (2016). Антибіотикорезистентність мікроорганізмів: механізми розвитку й шляхи запобігання. *Медицина неотложних состояний*, 3, 11–17.

146. Боровик, І. В. (2016). Аналіз антибіотикорезистентності збудників бактеріальних захворювань тварин у Дніпропетровській області. *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*, 3, 49–53.

147. Рухляда, В. В., Зоценко, В. М., Андрійчук, А. В., Рубленко, І. О. Білан, А. В, Тарануха, С., І. (2013). *Ветеринарна мікробіологія: Методичні вказівки із спеціальної мікробіології для студентів факультету ветеринарної медицини*. Біла Церква. С. – 180.

148. Гаркавенко, Т. О., Азарикіна, І. М., Ординська, Д. О., & Гаркавенко, В. М. (2016). Актуальні питання контролю антибіотикорезистентності збудників інфекційних захворювань тварин в Україні. *Ветеринарна біотехнологія*, 29, 67–75.

149. ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (EN ISO/IEC 17025:2017, IDT; ISO/IEC 17025:2017, IDT)

150. Кісера, Я. В., Божик, Л. Я., Гриневич, Н. Є., & Сторчак, Ю. Г. (2020). Видовий склад циркулюючої мікрофлори та її стійкість до антибактеріальних препаратів в умовах ТОВ “Квант Систем”. *Наук. вісник вет. медицини: зб. наук. праць*, 1, 12–20. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2020-154-1-12-20>

151. Кісера, Я. В., Божик, Л. Я., Мартинів, Ю. В., & Гриневич, Н. Є. (2021). Видовий склад циркулюючої мікрофлори та її стійкість до антибактеріальних препаратів в умовах ветеринарної клініки “Імпульс” міста Львів. *Науковий вісник*

ветеринарної медицини, 2, 65-71. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2021-168-2-65-71>

152. Корнієнко, Л. Є., Царенко, Т. М., Білик, С. А., & Савченко, М. О. (2018). Антибіотикорезистентність збудників стрептококозу поросят і телят. *Вет. біотехнологія*, 32, 377–386. URL: [https://doi.org/10.31073/vet_biotech32\(1\)-50](https://doi.org/10.31073/vet_biotech32(1)-50)

153. Коцюмбас, І. Я., Музика, В. П., & Стецько, Т. І. (2014). Стан антибіотикорезистентності мікроорганізмів – збудників бактеріальних захворювань молодняку великої рогатої худоби і свиней. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 13, 117–120.

154. Кривенко, Н. М., Рубленко, І. О., Рубленко, С. В., Козій, В. І., & Шаганенко, Р. В. (2023). Антибіотикорезистентність мікрофлори до препаратів за кон'юнктивітів котів бактеріального походження. *Науковий вісник ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій*, 25(110), 20–25. URL: <https://doi.org/10.32718/nvlvet11004>

155. Левківський, Д. М., Маслянюк, Р. П., Флюнт, Р. Б., & Романович, М. С. (2011). Сучасні погляди на стійкість бактерій до антибіотиків. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*, 13(2–1(48)), 166–171.

156. Кот, С. П., Кириченко, В. А., Лумедзе, І. Х., Бондар, А. О., Мельник, В. О. (2020). Методичні рекомендації до лабораторно-практичних занять та самостійної роботи для здобувачів вищої освіти СВО «Магістр» спеціальності 212 – «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» денної форми навчання. С. – 145.

157. Наказ Міністерства економіки України від 30 грудня 2021 року № 1177–21 “Порядок використання протимікробних ветеринарних лікарських засобів у ветеринарній медицині та звітування про обсяги їх застосування”. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0032-22#Text>

158. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05 квітня 2007 року № 167 Про затвердження методичних вказівок “Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів”. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07/ed20211103#Text>

159. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 15.04.2005 року № 170 методичні вказівки з мікробіологічної діагностики менінгококової інфекції та гнійних бактеріальних менінгітів.

URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0170282-05#n27>

160. Савченко, М. О., Корнієнко, Л. Є., & Царенко, Т. М. (2017). Стрептококова інфекція свиней, актуальні проблеми утворення антибіотикорезистентності. Наук. вісник вет. медицини: зб. наук. праць, 1, 5–15.

161. Савченко, М. О., Корнієнко, Л. Є., Тарасов, О. А., Довгаль, О. В., Білик, С. А., Довгенко, В. В., & Царенко, Т. М. (2022). Мікробіологічна характеристика та антибіотикорезистентність польових ізолятів *Streptococcus*. Наук. вісник вет. медицини: зб. наук. праць, 1, 72–80.

URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-72-80>

162. Свіжак, В. К., & Дейнека, С. Є. (2014). Антибіотикорезистентність: багатогранність проблеми. Клінічна та експериментальна патологія, 2, 222–224.

URL: <http://dspace.bsmu.edu.ua:8080/xmlui/handle/123456789/9369>

163. Тарасов, О. А., & Зоценко, І. А. (2014). Вивчення імуногенних властивостей штамів *Streptococcus suis*, придатних для виготовлення вакцин та відпрацювання методів контролю імуногенності. Вет. біотехнологія, 24, 248–253.

164. Тарасов, О. А., & Сапейко, В. П. (2014). Дослідження протективної активності експериментальних зразків емульсин–вакцин проти стрептококову свиней. Ветеринарна біотехнологія, 24, 254–261.

165. Тарасов, О. А., Гудзь, Н. В., & Савченко, М. О. (2021). Вивчення біологічних властивостей збудника стрептококозів свиней в Україні. Вет. біотехнологія, 38, 155–165. URL: https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-13

166. Тарасов, О. А., Захарова, О. М., Гудзь, Н. В., & Савченко, М. О. (2021). Поширення серотипів *Streptococcus suis* на території України. Вет. біотехнологія, 39, 117–127. URL: https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-11

167. Тарасов, О. А., Сайпенко, В. П., Гудзь, Н. В., & Бабкіна, М. М. (2015). Вивчення особливостей збудника стрептококову свиней (*Str. suis*) в Україні. Ветеринарна біотехнологія, 27, 286–292.

168. Тарасов, О. А., Терещенко, С. М., & Савченко, М. О. (2020). Вивчення особливостей поверхневих антигенів збудника стрептококозу свиней (*Str. suis*) за культивування *in vitro*. Ветеринарна біотехнологія, 36, 166–175. URL: https://doi.org/10.31073/vet_biotech36-17

169. Ушкалов, В. О., Салманов, А. Г., Виговська, Л. М., Мачуський, О. В., Кассіч, В. Ю., Романько, М. Є., ... Січкач, Б. В. (2023). Стимування антибіотикорезистентності та перспективи використання аутогенних вакцин у ветеринарній медицині. One Health Journal, 1(I), 16–23. URL: <https://doi.org/10.31073/onehealthjournal2023-I-02>

170. Чемеровська, І. О., & Рубленко, І. О. (2022). Проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів в Україні та світі. Наук. вісник вет. медицини: зб. наук. праць, 2, 33–41. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-176-2-33-41>

171. Шевченко, М. В., Тишківська, Н. М., Андрійчук, А. В., Мартиненко, О. А., & Царенко, Т. М. (2022). Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.* Наук. вісник вет. медицини: зб. наук. праць, 1, 81–91. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91>

ДОДАТКИ

Додаток А

Акти та картки зворотного зв'язку про впровадження матеріалів дисертаційної роботи у навчальний процес та наукові дослідження України

Додаток А1

<p style="text-align: center;">Погоджено</p> <p>Проректор з освітньої, виховної та міжнародної діяльності  Димань Т.М. д-р с.-г. наук, професор «30» <u>березня</u> 2023 р.</p>	<p style="text-align: center;">Затверджую</p> <p>Проректор з наукової та інноваційної діяльності  Варченко О.М. д-р екон. наук, професор «20» <u>березня</u> 2023 р.</p>
---	---

АКТ
про впровадження/використання результатів кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом ПЛР, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Савченкоком Михайлом Олександровичем впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Епізоотологія, інфекційні хвороби та профілактична медицина».

Результати дисертаційної роботи Савченюка Михайла Олександровича щодо мікробіологічної характеристики *Streptococcus suis*, його ідентифікації методом ПЛР, антибіотикорезистентності та поширеності у господарствах України використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб у підготовці фахівців ОС «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Білоцерківському Національному Аграрному Університеті.

<p>Декан факультету ветеринарної медицини, доктор ветеринарних наук</p> <p>Завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб, кандидат ветеринарних наук, доцент</p>	<p style="text-align: right;"> Власенко С. А.</p> <p style="text-align: right;"> Царенко Т.М.</p>
--	---



Затверджено
Проректор з наукової роботи
та інноваційного розвитку
Л. Д. Романчук Романчук Л. Д.

« 21 » *квітня* 2023р.

АКТ

Про провадження результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом ПЛР, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана **Савченко Михайлом Олександровичем** впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Крайова епізоотологія та профілактика хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології, Поліського національного університету. Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології, протокол №16 від *21.04.2023* року.

Завідувач кафедри мікробіології, фармакології
та ветеринарної епідеміології,
д-р, вет. наук, професор

О. С. Галатюк



Затверджено

Проректор з наукової роботи
 та інноваційної діяльності
 НУБіП України
 Кондратюк В. М.

Кондратюк 2023р.

АКТ

**Про провадження результатів
 дисертаційної роботи у навчальний процес**

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом ПЛР, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана **Савченюком Михайлом Олександровичем** впроваджені у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Лабораторна діагностика заразних хвороб» у підготовці фахівців ОС «Магістр» за спеціальностями 211 «Ветеринарна медицина» та 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології факультету ветеринарної медицини, Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ. Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології, протокол № 5 від 1.05.2023 року.

Декан факультету ветеринарної медицини
 д-р біол. наук, професор,
 академік НААН України

М. І. Цвіліховський

Професор кафедри епізоотології,
 мікробіології і вірусології
 д-р. вет. наук, доцент

М. Л. Радзіховський

Завідувач кафедри епізоотології,
 мікробіології і вірусології
 канд. вет. наук., доцент

В. В. Мельник

Погоджено
Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи
 д-р біол. наук, професор
 І.М.Коваленко

Затверджую
Проректор з наукової роботи
 д-р екон. наук, професор
 І.М.Дітко

_____ 2023 р. _____ 2023 р.



про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом ПЛР, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 – ветеринарна медицина, виконана Савченком Михайлом Олександровичем впроваджено у навчальні програми при викладанні дисциплін «Диференційна патологоанатомічна діагностика хвороб тварин», «Патологічна анатомія» та «Методи наукових досліджень».

Результати дисертаційної роботи Савченюка Михайла Олександровича щодо мікробіологічної характеристики *Streptococcus suis*, його ідентифікації методом ПЛР, антибіотикорезистентності, патологоанатомічного прояву та поширеності у господарствах України, використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також проведення наукових досліджень на кафедрі вірусології, патанатомії та хвороб птиці при підготовці фахівців ОС «Магістр» за напрямом ветеринарна медицина зі спеціальності 211-«Ветеринарна медицина» у Сумському національному аграрному університеті.

Завідувач кафедри,

доктор ветеринарних наук, професор _____ Роман Петров

Затверджую
 Директор Інституту ветеринарної
 медицини НААН
 д-р вет. наук, професор, член-кореспондент НААН
 Нічкіч С.А.
 « 17 »



АКТ

про впровадження/використання результатів кандидатської дисертаційної роботи у наукові дослідження

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом ПЛР, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія, 211 – ветеринарна медицина, виконана Савченкоком Михайлом Олександровичем впроваджено у науково-дослідну роботу Інституту ветеринарної медицини НААН для проведення досліджень, що стосуються ідентифікації, детекції та оцінки поліморфізму збудника стрептококозів свиней.

Результати дисертаційної роботи Савченкока Михайла Олександровича щодо мікробіологічної характеристики *Streptococcus suis*, його ідентифікації методом ПЛР, антибіотикорезистентності та поширеності у господарствах України використовуються під час проведення діагностичних мікробіологічних досліджень, а також під час проведення наукових в Лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків та Лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» (діюча акредитація за стандартом ДСТУ/ІЕС 17025:2019) в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України (м. Київ).

Завідувач лабораторії зоонозних інфекцій
 та оцінки ризиків, канд. вет. наук, ст. наук. співр

С.А.Тарасов

Завідувач лабораторії
 «Науково-дослідний навчальний центр
 діагностики хвороб тварин», канд.вет.наук, доцент

Я.П. Криця

Методичні рекомендації

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
щодо титрації збудника стрептококозу свиней методом
полімеразної ланцюгової реакції

КИЇВ-2021

УДК 616.94-022.7-092-053.2

Методичні рекомендації розглянуті і схвалені Вченою радою
Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 9 від 16.09.2021р.).

Розробники: Тарасов О.А., Захарова О.М., Савченко М.О.,
Корнієнко Л.С.

Рецензенти:

Ситюк М.П. – доктор ветеринарних наук, заступник директора з
наукової роботи Інституту ветеринарної медицини НААН.

Айштур О.С. – доктор ветеринарних наук, завідувач лабораторії
бактеріальних хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини НААН.

Методичні рекомендації щодо титрації збудника стрептококозу
свиней методом полімеразної ланцюгової реакції [Тарасов О.А.,
Захарова О.М., Савченко М.О., Корнієнко Л.С.] – К., ІВМ НААН,
2021. – 22 с.

Методичні рекомендації, призначені для спеціалістів науково-
дослідних установ, регіональних державних лабораторій ветеринарної
медицини, науковців, викладачів вищих навчальних закладів зі
спеціальності 211 – «Ветеринарна медицина».

Методичні рекомендації, призначені для спеціалістів ветеринарної
медицини та містять інформацію щодо титрації збудника стрептококозу
свиней із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції та інтерпретації
аналітичної варіабельності отриманих результатів.

©ІВМ НААН, 2021

**Висновок етичного комітету з питань поводження з тваринами
у наукових дослідженнях та освітньому процесі**

Висновок № 3/15

Етичного комітету у БНАУ з питань поводження з тваринами
у наукових дослідженнях та освітньому процесі

Заявка № 3/15 від 2 березня 2023 р. щодо експертизи завершеної науково-дослідної роботи на тему: «Мікробіологічна характеристика *Streptococcus suis*, його ідентифікація методом полімеразної ланцюгової реакції, антибіотикорезистентність та поширеність у господарствах України», яка була виконана в рамках виконання дисертаційної роботи.

Заявка, подана на розгляд аспірантом кафедри мікробіології та вірусології Савченкоком М.О. (наукові керівники д-р вет. наук, професор Корнієнко Л.Є., канд. вет. наук, доцент В.М. Зоценко В.М.), розглянута Етичним комітетом на засіданні 6 березня 2023 р., Протокол № 15.

Рішення Етичного комітету:

Схвалити проведені дослідження.

Голова:
доктор економічних наук,
професор



Варченко О.М.

Секретар



Пахомова А.О.

6 березня 2023 р.

Наукові праці, опубліковані за темою дисертації:**Статті у наукових фахових виданнях України:**

1. **Савченко М.О.**, Корнієнко Л.Є., Тарасов О.А., Довгаль О.В., Білик С.А., Довгенко В.В., Царенко Т.М. Мікробіологічна характеристика та антибіотикорезистентність польових ізолятів *Streptococcus suis*. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2022. Вип. 1. С. 72–80. Doi: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2022-173-1-72-80>
2. Тарасов О. А., Гудзь Н. В., **Савченко М. О.** Вивчення біологічних властивостей збудника стрептококозів свиней в Україні. Ветеринарна біотехнологія. 2021. Вип. 38. С. 155–165. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-13
3. Тарасов О. А., Терещенко С. М., **Савченко М. О.** Вивчення особливостей поверхневих антигенів збудника стрептококозу свиней (*Str. suis*) за культивування *in vitro*. Ветеринарна біотехнологія. 2020. Вип. 36. С. 166–175. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech36-17
4. Тарасов О. А., Захарова О. М., Гудзь Н. В., **Савченко М. О.** Поширення серотипів *Streptococcus suis* на території України. Ветеринарна біотехнологія. 2021. Вип. 39. С. 117–127. Doi: https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-11
5. Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М., Білик С. А., **Савченко М. О.** Антибіотикорезистентність збудників стрептококозу поросят і телят. Ветеринарна біотехнологія. 2018. Вип. 32. С. 377–386. Doi: [https://doi.org/10.31073/vet_biotech32\(1\)-50](https://doi.org/10.31073/vet_biotech32(1)-50)
6. **Савченко М. О.**, Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М. Стрептококова інфекція свиней, актуальні проблеми утворення антибіотикорезистентності (Оглядова стаття). Науковий вісник ветеринарної медицини. 2017. Вип. 1. С. 5–15

**Статті у виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних
Scopus та Web of Science Core Collection:**

7. **Savcheniuk, M. O.**, Tarasov, O. A., Zakharova, O. M., Korniienko, L. Y., Zotsenko, V. M., & Tsarenko, T. M. Detection of *Streptococcus suis* using the optimized real-time polymerase chain reaction protocol. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(2). 2022. P. 168–173. Doi: <https://doi.org/10.15421/022221> (Scopus)

Тези доповідей на конференціях:

8. **Савченко М. О.**, Корнієнко Л. Є., Зоценко В. М., Тарасов О. А. Моніторинг поширення *Streptococcus suis* у свинарських господарствах. *Біобезпека, захист та благополуччя тварин: матеріали міжнародної науково-практичної конференції*. Київ, 2022. С. 127–130

9. **Савченко М.О.**, Білик С.А., Довгаль О.В., Царенко Т.М. Дослідження польових ізолятів *Streptococcus suis*. *Сучасний стан розвитку ветеринарної медицини, науки і освіти: матеріали міжнародної науково-практичної конференції присвяченої 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини*. (Житомир, 12–13 жовтня 2022 р.). Житомир, 2022. С. 273–274

10. **Савченко М. О.**, Довгаль О. В., Довгенко В. В. Вивчення біологічних властивостей місцевих ізолятів *Streptococcus suis*. *Аграрна освіта і наука: досягнення, роль, фактори росту: матеріали міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 21 жовтня 2021 р.). Біла Церква, 2021. С. 33–35

11. **Савченко М. О.**, Білик С. А., Новік О. В. Особливості поверхневих антигенів *Streptococcus suis* за культивування *in vitro*. *Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Сучасний розвиток ветеринарної медицини: матеріали міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 30 жовтня 2020 р.). Біла Церква, 2020. С. 53–55

12. **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є. Бактеріологічні дослідження за стрептококозу у поросят. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених (Київ, 19 липня 2018 р.). Київ, 2018. С. 82–83

13. **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є. Антибіотикорезистентність *Streptococcus suis*: сучасні проблеми та епізоотична ситуація. *Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів (Біла Церква, 18 та 23 травня 2017 р.). Біла Церква, 2017. С. 59–60

14. **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є., Царенко Т. М. Основні фактори вірулентності *Streptococcus suis*. *Ветеринарне забезпечення інтенсивних технологій у тваринництві, безпека та якість харчових продуктів*: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 23 листопада 2017 р.). Біла Церква, 2017

15. **Савченко М. О.** Стрептококова інфекція свиней, актуальні проблеми антибіотикорезистентності. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин*: матеріали щорічної науково-практичної конференції молодих вчених (Київ, 22 червня 2017 р.). Київ, 2017. С. 77–79

Методичні рекомендації:

16. Тарасов О. А., Захарова О. М., **Савченко М. О.,** Корнієнко Л. Є. Методичні рекомендації щодо типізації збудника стрептококозу свиней методом полімеразної ланцюгової реакції. Київ, ІВМ НААН, 2021. 22 с.