

УДК 616.94-022.7-092-053.2

DOI: 10.31073/vet\_biotech36-17

ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, e-mail: ast97@ukr.net,

ТЕРЕЩЕНКО С.М., e-mail: s.teresh@ukr.net

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

САВЧЕНІЮК М.О.\*, e-mail: m.o.savcheniuk@gmail.com

*Білоцерківський аграрний університет*

## ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ПОВЕРХНЕВИХ АНТИГЕНІВ ЗБУДНИКА СТРЕПТОКОКОЗУ СВИНЕЙ (*S. Suis*) ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

*В статті досліджено зміни в складі поверхневих білків збудника стрептококозів свиней в поживних середовищах різного складу in vitro. Кожний варіант складу модельованого поживного середовища призводив до змін в пулі поверхневих білків. В результаті проведених досліджень встановлено зв'язок між біологічними властивостями (ступінь вірулентності) та антигенними властивостями у реакції ІФА (непрямий варіант). Особливості поверхневих антигенів, вивчених в цьому дослідженні, мають перспективу для подальших досліджень при створенні засобів діагностики та специфічної профілактики.*

**Ключові слова:** стрептококоз свиней, поверхневі антигени, білковий склад.

**Вступ.** *Streptococcus suis* типу 2 є важливим патогеном для свиначства майже в усіх країнах світу. Стрептококози перебігають із ознаками менінгітів, артритів, ендокардитів, септицемії, пневмонії та іноді характеризуються раптовою загибеллю свиней [1–3]. Більшість випадків припадає на вікову групу поросят від 3 до 12 тижнів, особливо небезпечна ця інфекція для тварин після відлучення [4].

Захворювання свиней на стрептококоз не тільки наносить значні прямі збитки, а й сприяє поширенню вірусних інфекцій, таких як РРСС, який реєструють у 80% випадків на фермах уражених стрептококозом [5]. В останні роки спостерігається значне зростання поширеності стрептококових інфекцій, а також їх роль як ускладнюючого фактору перебігу вірусних та бактеріальних захворювань [5–7].

Важливим фактором поширення даного захворювання є нераціональне застосування антибіотиків різних груп, що сприяє швидкому набуттю полірезистентності патогенної мікрофлори [6].

---

\* Науковий керівник – д-р вет. наук, проф. Корнієнко Л.Е.

Створення сучасних засобів специфічної профілактики із застосуванням високоефективних ад'ювантів та високоімуногенних штамів дозволить ефективно боротися із поширенням стрептококозів шляхом своєчасного щеплення поголів'я [7, 8].

Важливість вирішення проблеми стрептококозів має соціальне значення, оскільки так звані горизонтальні генетичні обміни стрептококів призводять до формування штамів збудника із новими патогенними властивостями, які можуть бути небезпечними для людини, а на фоні метицилінрезистентності – особливо небезпечними, оскільки важко піддаються антибіотикотерапії.

В світі щорічно реєструють більше 1 млн випадків первинної стрептококової інфекції у людей та, за даними ВОЗ, біля 50% ендокардитів інфекційної етіології пов'язано саме із стрептококовою інфекцією [9].

Враховуючи вищезазначене, ми вважаємо, що вивчення особливостей антигенного складу збудників стрептококозу свиней є важливим напрямком для розробки та удосконалення засобів діагностики та специфічної профілактики цього захворювання.

**Мета роботи.** Вивчити особливості антигенного складу збудника стрептококозу свиней за культивування в різних поживних середовищах.

**Матеріали і методи досліджень.** В роботі були використані штами та ізоляти мікроорганізму *Streptococcus suis*, що зберігаються та підтримуються в Інституті ветеринарної медицини НААН (табл. 1). Для проведення досліджень в якості моделі використовували патогенний штам збудника стрептококозів свиней *S.suis* 3/2 (фенотип *MRP+EF+*) та слабо патогенний штам *S.suis* 16/2 (*MRP+EF-*), а також сироватки та антигени 3 високовірулентних ізолятів збудника. Для проведення досліджень використовували патогенні ізоляти стрептококозів свиней, які відрізнялись за ступенем вірулентності (за даними наших попередніх досліджень).

Таблиця 1

### Штами та ізоляти *S. suis*, що використовувались в дослідях

№ п/п	Назва збудника	Тип	Фенотип	Вірулентність
1	<i>S. suis</i> штам 3/2	2	MRP+EF+	високо вірулентний
2	<i>S. suis</i> ізолят 10	2	MRP+EF+	високо вірулентний
3	<i>S. suis</i> ізолят 21	2	MRP+EF+	високо вірулентний
4	<i>S. suis</i> ізолят 19	2	MRP+EF+	високо вірулентний
5	<i>S. suis</i> штам 16/2	2	MRP+EF-	слабо вірулентний

Штами та ізоляти *S.suis* культивували у м'ясопептонному бульйоні Хоттінгера (МПБХ) з вмістом (%): пептону – 0,5; натрію хлориду – 0,2; калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,3; натрію фосфорнокислого двошзаміщеного – 2; детергенту Tween-80 – 0,05; глюкози – 0,4; амінного азоту 180–200 мг %. Концентрація водневих йонів (pH) складала 7,4–7,6. В якості твердого поживного середовища використовували ВНІ агар (BioRad), який готували згідно інструкції виробника та в який додавали стерильну дефібриновану кров овець в кількості 10%, суху плазму крові – 10% (БіоФарма), а також стерильну сироватку крові овець – 10%.

Для моделювання середовищ готували також окремі варіанти рідкого МПБХ із додаванням стерильної дефібринованої крові овець в кількості 10%, сухої плазми крові – 10% (БіоФарма), а також стерильної сироватки крові овець – 10%.

Культивування в рідких середовищах проводили за температури  $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  протягом 24–36 годин і на твердих – протягом 48–72 годин.

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

Поверхневі антигени були отримані із добової культури шляхом центрифугування при  $3,000 \times g$  протягом 5 хвилин для осадження клітин. Супернатант декантували, стерильно фільтрували через фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Мікробні клітини дворазово промивали стерильним 20 mM Tris буфером (pH 7,6), який містив 0,5% детергента Triton X-100 (BioRad) та інкубували при струшуванні протягом 60 хвилин при  $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Після цього зразки центрифугували при  $3000 \times g$  протягом 5 хвилин. Супернатант містив поверхневі антигени, які ми використовували в подальших дослідженнях.

Білковий склад отриманих антигенів визначали шляхом проведення електрофорезу в поліакриламідному гелі за класичним методом U.K. Laemmli (1970) [10]. Аліквоти кожного зразка змішували з 1X NuPAGE® LDS буфером для доведення концентрації білка до  $3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Потім зразки нагрівали до  $70^\circ\text{C}$  та  $10 \mu\text{L}$  зразка переносили в гель та проводили електрофорез в денатуруючих умовах. Гелі візуалізували фарбуванням SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) згідно інструкції виробника.

Антигенну активність вивчали за допомогою непрямого варіанту ІФА за стандартним протоколом із застосуванням специфічних сироваток, отриманих від білих мишей шляхом імунізації відповідними антигенами із застосуванням повного та неповного адюванта Фрейнда.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Культури стрептококів досліджених штамів при культивуванні у термостаті протягом 24 годин за

температури  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  добре росли на твердих живильних середовищах з утворенням через 20–24 годин рівномірного помутніння без плівки та пристінного кільця, в подальшому із утворенням осаду. При культивуванні на МПАХ через 24–48 години – утворювали дрібні гладенькі, прозорі, росинчасті колонії з рівними краями (S-форми), які через 72–96 годин набували білого кольору (рис. 1 А).

У мазках крові та мікроскопічних препаратах із культур збудника пофарбованих за Грамом спостерігалися тільки типові грампозитивні коки, розташовані по 1–2, що вказувало на чистоту культури.

Штами, що досліджувались, утворювали зону гемолізу на кров'яному агарі через 24 години культивування (рис. 1 Б).



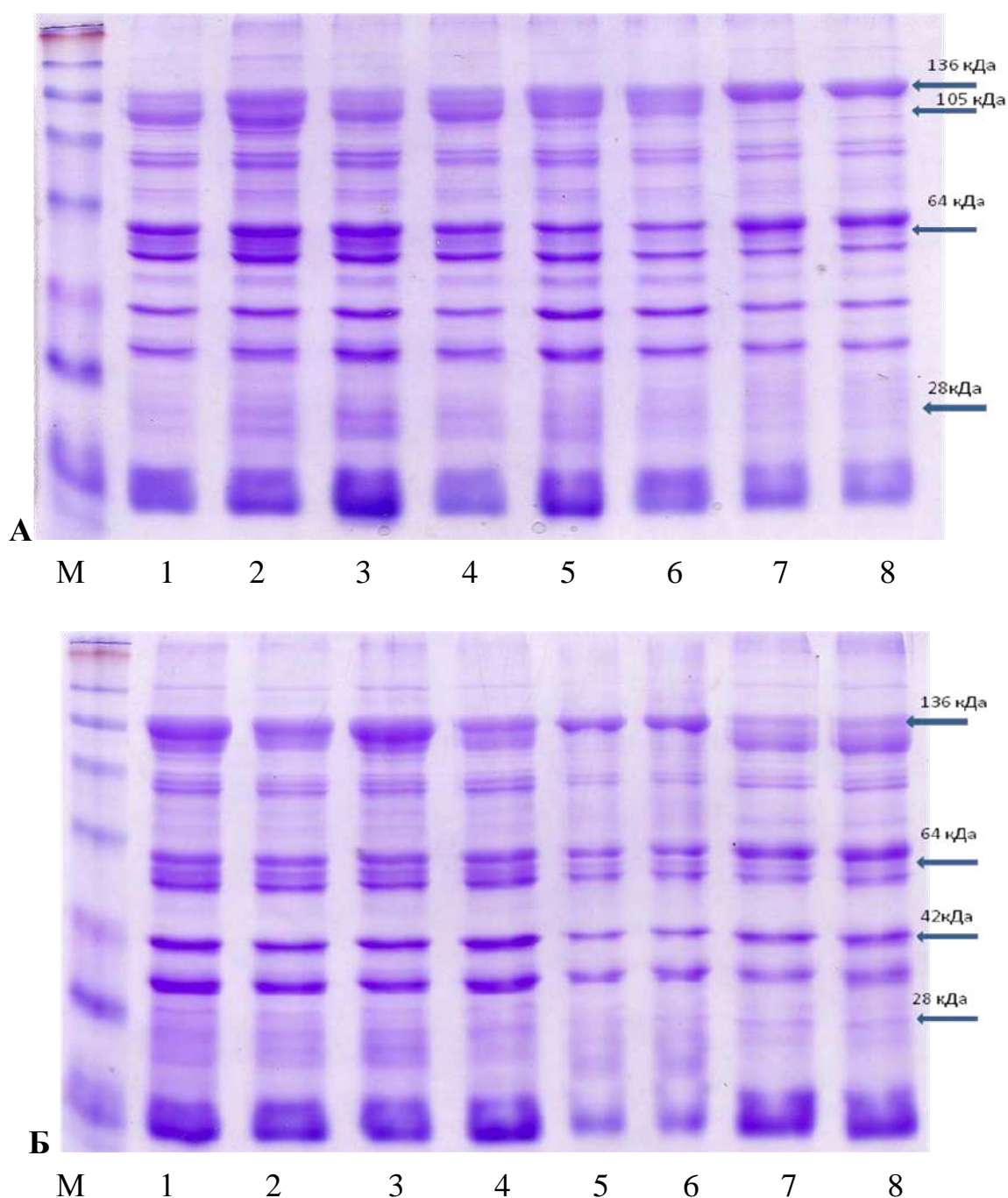
А



Б

**Рис. 1. Добові колонії збудника стрептококозу свиней вирощені на МПАХ (А) та кров'яному ВНІ агарі (Б).**

Досліджені штамми демонстрували наявність чотирьох диференційно експресованих поверхневих білків розміром 136 кДа, 105, 64 та 28 кДа (штам *S.suis* 3/2) та 136 кДа, 64, 42 та 28 кДа (штам *S.suis* 16/2) (рис. 2). При цьому поверхневі білки вагою 136 та 64 кДа експресувалися в більшій кількості за присутності в середовищі дефібринованої крові або плазми крові. Також встановлено, що білок вагою 105 кДа майже не вироблявся в середовищі без додавання крові або її сироватки, що знижує вірулентність штамів та може призвести до змін антигенних властивостей патогенних штамів та ізолятів. За дослідження слабо вірулентного штаму *S.suis* 16/2 встановлено значне зменшення продукування поверхневих білків вагою 136 кДа, 42 та 26 кДа в середовищі без додавання крові (рис. 2А). В результаті досліджень встановлено, що кілька поверхневих білків *S.suis* піддаються диференційній експресії під впливом змін в складі поживного середовища *in vitro*.



**Рис. 2. Електрофореграма поверхневого білка штамів *S.suis* 3/2 (А) та 16/2 (Б), вирощених на МПА, МПА з додаванням сироватки крові та на кровяному агарі:**

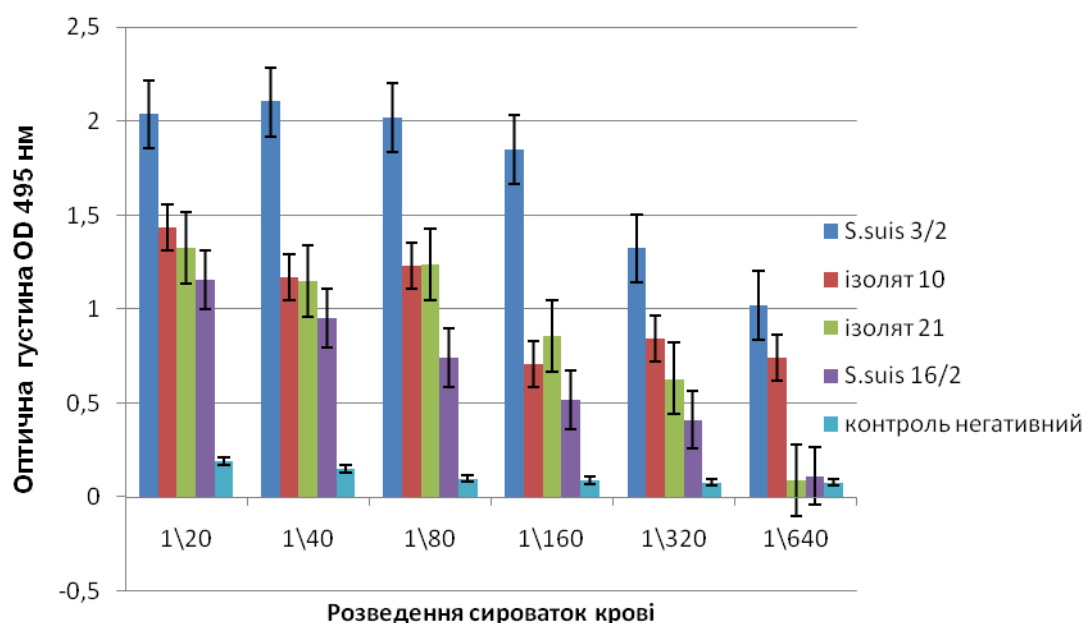
М – білковий маркер SeeBlue® (Invitrogen); доріжки 1 та 2 – білкові фракції зі штамів, вирощених на МПАХ із додаванням дефібринованої крові; доріжки 3 та 4 – білкові фракції зі штамів, вирощених на МПАХ із додаванням сухої плазми крові; доріжки 5 та 6 – білкові фракції від штамів вирощених на МПАХ із додаванням сироватки крові ВРХ; доріжки 7 та 8 – білкові фракції зі штамів, вирощених на МПАХ без додавання крові. Стрілки вказують на потенційні відмінності в експресії білка.

Поверхневий протеїновий профіль, отриманий для кожного із випробуваних штамів *S.suis*, був унікальним. Кожний варіант складу модельованого середовища призводив до виявлення декількох диференційно експресованих поверхневих білків.

Електрофореграми показали подібність складу пулу поверхневих білків *S.suis* досліджуваних штамів. Моделювання *in vitro* змін антигенного складу збудника за культивування в різних варіантах складу середовищ дозволило виявити потенційно важливі фактори вірулентності.

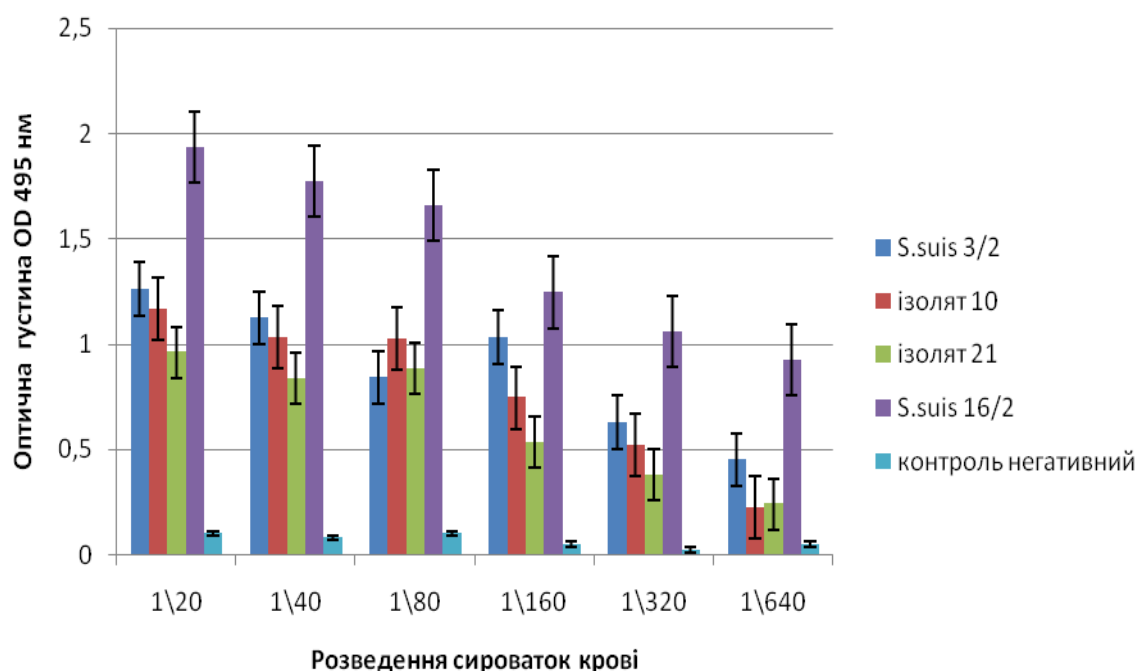
В результаті вивчення антигенних властивостей двох штамів збудника стрептококозів свиней із застосуванням гомологічних та гетерологічних сироваток встановлено, що високо вірулентний штам *S.suis* 3/2 проявив найвищу антигенну активність у відношенні як гомологічних, так і гетерологічних сироваток крові лабораторних тварин, в той час як поверхневий антиген слабо вірулентного штаму *S.suis* 16/2 показав нижчу антигенну спорідненість до сироваток, отриманих на поверхневі антигени патогенного штаму та двох патогенних ізолятів в реакції ІФА (рис. 3, 4). Це підтверджує високу афінність антигену до власних антитіл. Сироватки, отримані на ізоляти 10 та 21 проявили однаково високу активність на всі досліджувані антигени.

Відносно низька антигенна активність по відношенню до поверхневого антигену слабо вірулентного штаму, на нашу думку, свідчить про те, що мікроорганізми слабо вірулентних штамів та ізолятів несуть на своїй поверхні приблизно таку ж кількість антигенних детермінант, але вони, ймовірно, значно гірше презентовані (антигени занурені вглиб капсули, не вигідне просторове розташування білкових антигенів).



**Рис. 3. Антигенна спорідненість поверхневого антигену *S.suis* штам 3/2 у відношенні до сироваток на антигени штамів та ізолятів *S.suis*,  $M \pm m$ ,  $n=3$ ,  $z < 0.05$ .**





**Рис. 4. Антигенна спорідненість поверхневого антигену *S.suis* штам 16/2 у відношенні до сироваток на антигени штамів та ізолятів *S.suis*,  $M \pm m$ ,  $n=3$ ,  $p<0,05$ .**

В результаті проведених досліджень нами було встановлено, що поверхневий антиген високо вірулентного штаму *S. suis* 3/2 характеризувався вираженою антигенною активністю як по відношенню до гомологічних сироваток, так і по відношенню до сироваток, отриманих на досліджувані ізоляти, які відрізнялися за ознаками патогенності.

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

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** В результаті досліджень встановлено, що кілька поверхневих білків *S.suis* диференційно експресуються під впливом змін в складі поживного середовища *in vitro*. Кожний варіант складу модельованого середовища призводив до змін в пулі поверхневих білків.

В результаті проведених досліджень нами було встановлено зв'язок між біологічними властивостями (ступінь вірулентності) та антигенними властивостями у реакції ІФА (непрямого варіанту).

Особливості поверхневих антигенів, вивчених в цьому дослідженні, мають перспективу для подальших досліджень при створенні засобів діагностики та специфічної профілактики.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Айшпур О.Е. Стрептококкоз – проблема сучасного свинарства / О.Е. Айшпур, С.А. Ничик, О.А. Тарасов // Тваринництво України. – 2014. – № 7. – С. 87–89.
2. Galina L. 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 / L. Galina, U. Vecht, H.J. Wisselink, C. Pijoan // Can. J. Vet. Res. – 1996. – №60. – P. 72–74.
3. Perch B. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis* / B. Perch, K.B. Pedersen, J. Henrichson // J. Clin. Microbiol. – 1983. – № 17. – P. 993–996.
4. *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms / R.Y. Reams, L.T. Glickman, D.D. Harrington [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 1994 – №6. – P. 326–334.
5. Salasia S.I. Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs / S.I. Salasia, C. Lammler // Zentralbl. Veterinarmed. – 1995. – № 42. – P. 78–83.
6. Aarestrup F.M. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996 / F.M. Aarestrup, S.E. Jorsal, N.E. Jensen // Vet. Microbiol. – 1997. – Vol. 60. – P. 59–66.
7. Тарасов О.А. Вивчення імуногенних властивостей штамів *Streptococcus suis*, придатних для виготовлення вакцин та відпрацювання методів контролю імуногенності / О.А. Тарасов, І.А. Зоценко // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – №24. – С. 248–253.
8. Тарасов О.А. Дослідження протективної активності експериментальних зразків емульсин-вакцин проти стрептококової свиней / О.А. Тарасов, В.П. Сапейко // Ветеринарна біотехнологія – 2014. – №24. – С. 254–261.
9. Gottshalk M. The pathogenesis of meningitis caused by *streptococcus suis*: the unresolved questions / M. Gottshalk, M. Segura // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol.76. – P. 259–272.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol.227 (5259). – P. 680–685.

### ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СТРЕПТОКОККОЗА СВИНЕЙ (*S. SUIS*) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO / Тарасов А.А., Терещенко С.М., Савченко М.О.

*В статье описаны изменения в составе поверхностных белков возбудителя стрептококкоза свиней в питательных средах различного состава in vitro. Каждый вариант состава моделируемой питательной среды приводил к изменениям в пуле поверхностных белков. В результате проведенных исследований установлена связь между биологическими свойствами (степень вирулентности) и антигенными свойствами в реакции ИФА (непрямой вариант). Особенности поверхностных антигенов, изученных в этом исследовании, имеют перспективу для дальнейших исследований при создании средств диагностики и специфической профилактики.*

**Ключевые слова:** стрептококкоз свиней, поверхностные антигены, белковый состав.



**THE STUDY OF PECULIARITIES OF SWINE STREPTOCOCCOSIS CAUSATIVE AGENT (*S. SUI*S) SURFACE ANTIGENES WHEN CULTIVATING IN VITRO / Tarasov O.A., Tereschenko S.M., Savcheniuk M.O.**

**Introduction.** *Streptococcus suis* type 2 is an important pathogen for pig production in almost every country in the world. *S. suis* causes a range of serious diseases in pigs – arthritis, meningitis, septicemia, pneumonia, leading to significant economic losses in industrial pig breeding. In recent years, there has been a significant increase of streptococcal infections prevalence and its role as an opportunistic factor in the course of viral diseases.

**The goal of the work** was to study the peculiarities of the antigenic composition of the streptococcus suis pathogen during cultivation in nutrient media of different composition.

**Materials and methods.** It was used strains and isolates of *Streptococcus suis*, stored and maintained at the Institute of Veterinary Medicine. The bacterial culture was obtained in a BHI medium with pH 7.4-7.6. Different nutrient media variants were obtained by adding defibrinated blood (10%), dry blood plasma (10%) or inactivated bovine serum (10%). Microbial cultures were incubated at  $35.5 \pm 0.5^\circ \text{C}$  in liquid media for 24-36 hours and in solid media – for 48-72 hours. The protein composition of the obtained antigens was determined by polyacrylamide gel electrophoresis using the classic U.K. Laemmli method (1970). Antigenic activity was studied using the indirect ELISA variant according to the standard protocol using specific sera obtained from white mice.

**Results of research and discussion.** All tested strains formed a hemolysis zone on blood agar after 24 hours of cultivation. The strains demonstrated the presence of four differentially expressed surface proteins of size 136, 105, 64 and 28 kDa (*S. suis* strain 3/2) and 136, 64, 42 and 28 kDa (*S. suis* strain 16/2). The surface proteins of 136 and 64 kDa were expressed in larger amount in the presence of defibrinated blood or blood plasma in the medium. It was found that 105 kDa protein did not produce in significant amount in the medium without blood or serum, which may reduce the virulence of the strains and slightly alter the antigenic properties of pathogenic strains and isolates. The study of weakly virulent *S. suis* 16/2 strain revealed a significant decrease in the production of surface proteins of 136, 42 and 26 kDa in the blood-free medium variant. As a result of studying the antigenic properties of two strains of swine *Streptococcus* pathogen showed that highly virulent *S. suis* strain 3/2 had the highest antigenic activity against both homologous and heterologous sera in ELISA. The antigen of the weakly virulent strain *S. suis* 16/2 showed a lower antigen affinity for sera obtained for the surface antigens of the pathogenic strain and two pathogenic isolates in ELISA.

**Conclusions and prospects for further research.** Studies have shown that several *S. suis* surface proteins were differentially expressed under the influence of the composition of the nutrient medium in vitro. Each variant of the composition of the simulated environment led to changes in the pool of surface proteins.

As a result of our studies, we established a relationship between biological properties (virulence level) and antigenic properties in the indirect variant ELISA.

The peculiarities of surface antigens composition have the potential to be further investigated for the sensitivity and specificity increasing of diagnostic tests and vaccines.

**Keywords:** swine streptococcosis, surface antigens, protein composition.

# REFERENCES

1. Aishpur, O.E., Nychyk, S.A., & Tarasov, O.A. (2014). Streptokokoz-problema suchasnogo svinarstva [Streptococcosis – the problem of modern pig husbandry]. *Tvarinnictvo Ukraini – Ukrainian husbandry*, 7, 87-89 [in Ukrainian].
2. Galina, L., et al. (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. *Can. J. Vet. Res*, 60, 72-74.
3. Perch, B., Pedersen, K.B., & Henrichson, J. (1983). Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J. Clin. Microbiol*, 17, 993-996.
4. Reams, R.Y., et al. (1994). *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. Part II. Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *J Vet. Diagn. Invest*, 6, 326-334.
5. Salasia, S.I., & Lammler, C. (1995). Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs. *Zentralbl. Veterinarmed*, 42, 78-83.
6. Aarestrup, F.M. (1997). Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet. Microbiol*, 60, 59-66.
7. Tarasov, O.A., & Zotsenko, I.A. (2014). Vivchennia imunogennih vlastivostey shtamiv *Streptococcus suis* pridatnyh dlia vigotovlennia vaccine ta vidpraciuvanna metodiv kontroliia imunogennosti [Investigation of immunogenic properties of *Streptococcus suis* strains for vaccine production and applying immunogenicity control methods]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology*, 24, 248-253 [in Ukrainian].
8. Tarasov, O.A., & Sapeiko, V.P (2014). Doslidjennia protektivnoi aktivnosti eksperymentalnyh zrazkiv emulsyn-vaksin proty streptokokozu sviney [Studying of the protective properties of experimental samples of emulsion vaccine against swine streptococcosis]. *Veterynarna biotekhnolohiia – Veterinary biotechnology*, 24, 254-261 [in Ukrainian].
9. Gottshalk, M., & Segura, M. (2000). The pathogenesis of meningitis caused by *streptococcus suis*: the unresolved questions, *Vet. Microbiol*, 76, 259-272.
10. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.