

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский государственный университет генетики,
биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

На правах рукописи



ТОЛСТОВА ЕЛИЗАВЕТА АНТОНОВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
СТРЕПТОКОККОЗА И СТАФИЛОКОККОЗА СВИНЕЙ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук, профессор
Агольцов Валерий Александрович

Саратов – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Стрептококкозы свиней.....	13
1.1.1. Краткая историческая справка.....	13
1.1.2. Характеристика возбудителя.....	15
1.1.3. Эпизоотологические сведения.....	17
1.1.4. Патогенез.....	18
1.1.5. Клинические признаки и патоморфологические изменения.....	19
1.1.6. Лабораторная диагностика стрептококкозов.....	20
1.2. Стафилококкозы свиней.....	25
1.2.1. Краткая историческая справка.....	25
1.2.2. Характеристика возбудителя.....	26
1.2.3. Эпизоотологические сведения.....	28
1.2.4. Патогенез.....	29
1.2.5. Клинические признаки и патоморфологические изменения.....	30
1.2.6. Лабораторная диагностика стафилококкозов свиней.....	31
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Материалы и методы исследований.....	36
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
2.2.1. Эпизоотическая обстановка по стрептококкозу и стафилококкозу свиней в Краснодарском крае.....	43
2.2.2. Клинические симптомы и патологоанатомические изменения при стрептококкозе и стафилококкозе свиней.....	49
2.2.3. Бактериологический метод лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней.....	58
2.2.4. Серологический метод лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней.....	67
2.2.5. Диагностика методом ПЦР.....	72
2.2.6. Диагностика методом LAMP.....	79

2.2.7. Аттестация коммерческого ПЦР-набора «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» для выявления ДНК <i>Streptococcus spp.</i> в условиях ветеринарной лаборатории	84
2.2.8 Лечение стрептококкоза и стафилококкоза свиней.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
ВЫВОДЫ.....	128
Практические предложения.....	129
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Инфекции, вызванные стрептококками, считаются глобальной и экономической проблемой свиноводства. Кроме того, стрептококки является возбудителем зооантропоноза, поражающего людей, находящихся в тесном контакте с инфицированными свиньями или продуктами, полученными из свинины [121]. Стрептококкоз у свиней может быть вызван различными видами стрептококков и проявляться в виде сепсиса, омфалита, артрита, пневмонии, эндокардита и миокардита, менингита, а также полисерозита [4, 5, 7, 12, 162, 8].

Стафилококки важные патогены свиней, которые могут вызывать сепсис, менингит и пневмонию. Сепсис, вызванный *Staphylococcus aureus*, представляет собой важную причину заболеваемости и смертности свиней, при этом инфицирование возбудителем этого заболевания возрастает [146]. Он также признан новым зоонозным агентом и ответственен за вспышки инфекций среди людей [77].

Диагностика инфекций, вызванных стрептококками и стафилококками, включает несколько методов. Среди них бактериоскопия, выявление антигенов в патологическом материале с использованием ИФА или латекс-агглютинации, а также бактериологическая идентификация возбудителей и серологическое определение антител к стрептококкам. В последние годы метод ПЦР стал особенно популярным, так как позволяет диагностировать заболевание по сравнению с традиционными бактериологическими исследованиями [1, 36]. Разработка быстрого и надежного метода анализа для ранней диагностики и выявления *S. aureus* имеет большое значение. По сравнению с обычной ПЦР, LAMP снизил LOD в десять раз. Результаты показывают, что LAMP является надежным тестом на *S. aureus* и может стать многообещающим инструментом для быстрой диагностики инфекций, вызванных *S. aureus* [132]. Поскольку LAMP-системы просты, быстры и чувствительны, они могут иметь хороший клинический потенциал для выявления высокопатогенного *S. suis* 2. Внедрение

новых экспресс-методов для диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней остается актуальной темой [97, 188].

LAMP — относительно новый метод амплификации ДНК, который благодаря своей простоте, надежности и низкой стоимости может дать серьезные преимущества. Обычно для идентификации шести различных участков целевого гена используются четыре разных праймера, что значительно повышает специфичность. Благодаря специфике действия этих праймеров количество ДНК, образующейся при LAMP, значительно выше, чем при ПЦР-амплификации [97, 175, 165, 163]. Анализы LAMP для диагностики *S. aureus* являются полезными и мощными инструментами для быстрого обнаружения различных штаммов стафилококков, и, несомненно, быстрота, техническая простота и экономическая эффективность анализов LAMP демонстрируют необходимость широкого применения для лабораторной диагностики [165, 153].

Степень разработанности темы. Научные труды по стрептококкозу приведены в работах, И.А. Болоцкого, 2007; Н.И. Брико и др., 2005; О. Ю. Черных и др., 2013; А.Н. Гречухин, 2002; А.М. Рахманов, 2003; А.А. Шевченко и др., 2013; А.В. Алешкина, 2003; Е.В. Диц, 2012; В.И. Балабанова, 2018, 2020; Marcelo Gottschalk et al., 2004; Laetitia Bonifait et al., 2010; Jinhai Zhang et al., 2013; S. L. Chen, 2019, L. Wang, 2017, 2018.

Исследования по стафилококкозу опубликованы в работах А.А. Кудряшова и др., 2018; А.А. Шевченко А.А. и др., 2013; I. W. Fong, 2017; A. F. Gillaspy, 2009.

Разработка и проведение лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней, важные составляющие элементы ветеринарной науки и практики А.А. Шевченко и др., 2013 А.В. Алешкина, 2003.

В публикациях указанных авторов не представлены систематизированные сведения об аттестации коммерческих ПЦР-тест-систем, предназначенных для выявления стрептококкоза свиней, в условиях ветеринарных диагностических лабораторий. В то же время внедрение

экспресс-методов молекулярно-генетической диагностики в лабораторную практику предполагает обязательную верификацию их аналитических и диагностических характеристик до начала рутинного применения.

В настоящее время при диагностике бактериальных инфекций у свиней в лабораторной практике всё большее распространение получает полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, способный с высокой точностью и чувствительностью выявлять генетический материал возбудителя. Однако в литературе недостаточно освещены вопросы практической реализации этих методов в условиях ветеринарных лабораторий.

Что касается терапии, то применение стандартных антибиотикограмм при лечении стрептококкоза и стафилококкоза свиней не всегда обеспечивает полную эрадикацию возбудителей, особенно при подострой и хронической формах заболевания. Это связано с развитием резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также формированием вторичного иммунодефицитного состояния у животных, что снижает эффективность традиционных схем лечения и увеличивает риск перехода инфекции в хроническую форму.

Таким образом, актуальным является проведение научно обоснованной аттестации коммерческих ПЦР-наборов в соответствии с требованиями нормативных документов, включая ГОСТ Р 8.794–2013, с целью их применения в ветеринарной лаборатории. Также представляется целесообразным проведение сравнительного анализа современных терапевтических схем, включая комбинированное лечение с использованием препаратов, обладающих различным механизмом антибактериального действия, таких как 5% раствор энтрикима.

Объект исследования: свиньи, больные стрептококкозом и стафилококкозом.

Предмет исследования: Традиционные и новейшие методы лабораторной диагностики и лечения стрептококкоза и стафилококкоза свиней.

Цель исследования – повысить эффективность диагностики и лечения стрептококкоза и стафилококкоза у свиней за счёт аттестации коммерческих ПЦР-наборов в соответствии с нормативными требованиями и сравнительной оценки современных терапевтических схем, включая применение нового ветеринарного препарата 5% раствора энтрикима.

Задачи исследования:

1. Изучить клинико-эпизоотологические особенности стрептококкоза и стафилококкоза у поросят с целью характеристики их инфекционного и эпизоотического процесса;
2. Провести сравнительную оценку эффективности классических и новейших методов лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней;
3. Провести сравнительный анализ терапевтической эффективности традиционной антибиотикотерапии и комбинированного подхода с включением 5% раствора энтрикима при лечении стрептококкоза и стафилококкоза у поросят на основании данных клинических наблюдений, а также гематологических, биохимических, бактериологических и молекулярно-генетических исследований.

Научная новизна. Установлено превосходство LAMP в диагностике стрептококкоза и стафилококкоза свиней по сравнению с ПЦР-РВ за счёт более быстрого получения результата с высокой специфичностью, простоты проведения без сложного оборудования, что делает метод оптимальным для полевых условий.

Доказана высокая терапевтическая эффективность 5% раствора энтрикима при стрептококкозе и стафилококкозе свиней, проявляемая за счёт синергетического антибактериального действия компонентов препарата.

Установлено, что пероральное введение 5% раствора энтрикима в дозе 4 см³/кг через питьевую воду (1 л на 3000 л) один раз в сутки в течение 7

дней обеспечивает степень выздоровления 80–87% (против 60–67% при стандартной антибиотикотерапии).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Диссертационное исследование имеет как фундаментальный, так и прикладной характер. Полученные данные дополняют сведения о лабораторной диагностике и лечении стрептококкоза и стафилококкоза свиней. Проведена аттестация коммерческого ПЦР-набора для диагностики стрептококкоза свиней и проведены LAMP исследования по выявлению стрептококкоза и стафилококкоза свиней в сравнительном аспекте с ПЦР-методами. Проведено сравнение двух схем лечения: стандартной антибиотикотерапии и применения комбинированного препарата - 5% раствора энтрикима.

По материалам диссертационной работы опубликована монография «Диагностика стрептококкозов и стафилококкозов свиней» (в соавторстве с А.Г. Кощаевым, В.А. Агольцовым, О.Ю. Черных, 2024 г.).

Результаты диссертационной работы внедрены в ГБУ Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория и в колхоз им. Чапаева Ивантеевского района, Саратовская область, что подтверждено актами о внедрении от 31.05.2024 и 29.05.2025 г. (приложение А, Б).

Результаты работы используются в учебном процессе при чтении лекций по дисциплине эпизоотология и инфекционные болезни животных обучающимся специальности Ветеринария в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» и в ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина.

Методология и методы исследований. Методология была определена на основе изучения трудов отечественных и зарубежных ученых и практиков, специализирующихся на лабораторной диагностике и лечении стрептококкоза и стафилококкоза свиней. В ходе работы были проанализированы и

использованы ключевые научные публикации и исследования, что позволило сформировать комплексный подход к решению поставленных задач.

В исследовании применялся комплексный подход, включающий эпизоотологические, клинические, патологоанатомические, бактериологические, серологические, молекулярно-генетические, гематологические и биохимические методы. Также использовались анализ, сопоставление и статистическая обработка данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Количественные показатели эпизоотического процесса (заболеваемость, смертность и летальность) при стрептококкозе и стафилококкозе свиней существенно варьируются в зависимости от течения болезни.

2. Лабораторные экспресс-методы молекулярно-генетического исследования ПЦР и LAMP на стрептококкоз и стафилококкоз свиней позволяют существенно сократить время проведения анализа, одновременно повышая надежность и легкость интерпретации полученных результатов, а также обеспечивая высокую чувствительность и специфичность.

3. Монотерапия 5% раствором энтрикима в дозе 4 см³/кг массы тела перорально через питьевую воду (1л на 3000 л) один раз в сутки в течение 7 дней является значительно более эффективной (80-87%) по сравнению со стандартной антибиотикотерапией пенициллином и окситетрациклином (60–67%), способствуя не только клиническому выздоровлению, но и полной эрадикации возбудителей, нормализации гематологических и биохимических показателей крови, а также предотвращению перехода инфекции в хроническую форму.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова» (ФГБОУ ВО Вавиловский университет).

Степень достоверности и аprobация работы. Степень достоверности подтверждается существенным объемом исследований фактического биологического и патологического материала, а также достаточным анализом эпизоотической ситуации по изучаемой болезни со статистической составляющей. Достоверность разности результатов средних значений определялась методами математической статистики.

Основные результаты диссертационной работы представлены на: Всероссийской конференции молодых исследователей «Аграрная наука-2022» РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева (Москва, 2022); Международной научно-практической конференции обучающихся, аспирантов и молодых ученых «Проблемы и пути развития ветеринарной и зоотехнической наук» посвященная памяти заслуженного деятеля науки, доктора ветеринарных наук, профессора кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» Колесова Александра Михайловича. (Саратов, 2022); Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2022 год, посвященной 110-летию Вавиловского университета (Саратов, 2023); II Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Наука будущего-наука молодых», посвященной 300-летию Российской академии наук, которая прошла в рамках Всероссийской научно-практической конференции «Наука в современном мире: актуальные вопросы, достижения и инновации в животноводстве и растениеводстве» ФГБНУ «ФНЦБСиА РАН», (Оренбург, 2023); Международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы ветеринарной медицины на крайнем Севере Российской Федерации», посвященная 115-летию организации Якутской бактериологической лаборатории и проведения научных исследований по ветеринарной медицине в Якутии (Якутск, 2023); IV Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежная наука – развитию агропромышленного комплекса» Курский ГАУ (Курск, 2023); XXVIII Международном конкурсе

научно-исследовательских работ Всероссийское общество научных разработок «ОНР ПТСАЙН» (Москва, 2023); Международной научно-практической конференции «Иновационные подходы ветеринарного благополучия при интенсивном ведении животноводства», посвященная 95-летию со дня рождения доктора ветеринарных наук, профессора Мамаева Нурутдина Хизроевича (Махачкала, 2023); XVI Национальной научно-практической конференция молодых ученых «Наука молодых – инновационному развитию АПК» (Уфа, 2023); VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, магистров, аспирантов и молодых ученых «Вклад молодых ученых в инновационное развитие АПК региона» (Махачкала, 2023); Международной научно-практической конференции «Достижения и результаты ученых в реализации научных исследований в агропромышленном комплексе» СКЗНИВИ-филиал ФГБНУ ФРАНЦ, г. (Новочеркасск, 2024); II Международной научно-практической конференции «Достижения и результаты ученых в реализации научных исследований в агропромышленном комплексе» СКЗНИВИ-филиал ФГБНУ ФРАНЦ, г. (Новочеркасск, 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 6 статей из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад соискателя. Состоит в анализе литературных источников, получении первичных данных, формулировании цели и задач исследований, обработке и анализе результатов, апробации материалов исследований на различных конференциях, подготовке научных публикаций по теме диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы, список литературы, включающий 210 источников, из которых 150 иностранных и 60 отечественных авторов, а также список сокращений и

приложения. Работа изложена на 171 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 26 рисунками и 46 таблицами.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стрептококкозы свиней

1.1.1. Краткая историческая справка

Стрептококковые и стафилококковые инфекции известны на протяжении веков, хотя их разделение на отдельные виды заболеваний началось только в XVI в. нашей эры. Оригинальные труды Гиппократа IV в. до н. э. описывают заболевание в форме рожистого воспаления (έρυσίπελας, красная кожа), а также симптомы родильной горячки. Гален отмечает не только рожистое воспаление кожи, но и воспаление поражающее оплодотворенную матку, обычно заканчивающееся смертельным исходом» [62].

Первое упоминание именно стрептококковой инфекции принадлежит австрийскому хирургу Теодору Бильроту в 1874 г., когда он выделил и описал микроорганизм, при рожистом воспалении и раневых инфекциях [87].

Понимание реального значения и официальное вхождение стрептококков в историю инфектологии произошли в 1879 г., когда Луи Пастер выделил микроорганизм из матки и крови женщин с послеродовой лихорадкой. Он также продемонстрировал, что стрептококк был этиологическим агентом, ответственным за заболевание, которое в то время вызывало самые высокие показатели смертности женщин-рожениц и новорожденных [4, 14].

Дополнительное уточнение названия *Streptococcus* дано Фридрихом Юлиусом Розенбахом в 1884 г., который исследовал бактерии, выделенные из гнойных поражений, а вид бактерии был назван *Streptococcus pyogenes* (гр.: гной и гены, формирование). Ранее Фелейзен выделил стрептококки у пациента с рожистым воспалением, а Розенбах назвал этот микроорганизм *S. erysepaltis*. Однако более поздние обзоры показали, что не существует какой-либо конкретной характеристики, связанной с микроорганизмами, выделенными при конкретных заболеваниях. Эндрюс и Кристи

рекомендовали, чтобы названия видов *pyogenes*, *eryespaltis*, *scarlatinae* и *puerperalis* были включены в одно название *Streptococcus pyogenes* [14].

В 40-х годах XX века были проведены первые крупные исследования, посвященные роли стрептококков в развитии различных заболеваний, таких как ангина, скарлатина, ревматизм и гломерулонефрит. В 1944 году Гровер Ф. Пауэрс и Пол Л. Бойсверт опубликовали исследование, в котором изучалась роль возраста человека в развитии стрептококкоза [160].

В последние десятилетия продолжаются исследования, направленные на изучение механизмов патогенеза, устойчивости к антибиотикам и разработки новых методов диагностики и лечения стрептококковых инфекций. В 2019 году было опубликовано исследование, посвященное геномным аспектам распределения и эволюции стрептококков группы В [85].

Первые случаи стрептококковой инфекции у свиней были зарегистрированы в начале XX века. В 20-х годах XX века ученые начали описывать случаи септицемии и менингита у свиней, вызванные *Streptococcus suis*. Эти ранние исследования заложили основу для дальнейшего изучения патогенеза и эпизоотологии заболевания.

В 50-х годах XX века было установлено, что *Streptococcus suis* является основным возбудителем стрептококковой инфекции у свиней. В 60-х годах XX века были разработаны методы выделения и идентификации этого патогена, что позволило более точно диагностировать заболевание.

В 70-х и 80-х годах XX века были разработаны серологические методы диагностики, такие как реакция агглютинации и иммуноферментный анализ (ИФА), которые позволили более точно определять наличие инфекции у свиней. В 90-х XX века годах появились молекулярные методы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), которые значительно улучшили точность и скорость диагностики [188, 195].

1.1.2. Характеристика возбудителя

Стрептококкоз представляет собой комплекс инфекционных заболеваний, которые преимущественно поражают молодняк различных видов животных. Эти болезни вызываются патогенными стрептококками и могут проявляться в острой форме как септицемия и омфалит. В подострой и хронической формах они характеризуются первичными поражениями легких, суставов, глаз и других органов [141, 9].

Стрептококки – это широко распространенная группа организмов, которые могут быть важными патогенами или комменсалами человека и других животных. Некоторые виды стрептококков могут быть обнаружены в качестве сапрофитов в естественной среде. Стрептококки зачастую присутствуют на слизистых оболочках ротовой полости, дыхательных путей, пищеварительного тракта и мочеполовой системы, а также на коже здоровых людей и многих животных. Стрептококки обычно являются аэробами или факультативными анаэробами, но и некоторые obligатные анаэробы включены в род *Streptococcus*.

Стрептококки – это разновидность бактерий, которые могут вызывать тяжелые заболевания у людей и животных. Многие виды стрептококков поражают различные виды животных и человека. Некоторые из них были зарегистрированы как у животных, так и у людей, и их можно считать зоонозными. *Streptococcus suis* – это, по сути, микроорганизм, обитающий только у свиней, и было установлено, что все свиньи в возрасте старше 6 недель содержат этот микроорганизм в небных миндалинах. [77].

Стрептококкозы у животных вызываются микроорганизмами рода *Streptococcus* (семейство *Streptococcaceae*), к числу патогенных видов которых относят 24 таксона. Эти бактерии представляют собой грамположительные кокки, имеющие округлую или слегка вытянутую (ланцетовидную) морфологию и достигающие в размере до 2 мкм. В микроскопических препаратах, в том числе в мазках из гнойного экссудата, они располагаются

парами или цепочками различной протяжённости. Спорообразование у них отсутствует. Большинство видов не образуют капсулы, не обладают подвижностью и не вырабатывают каталазу. По типу дыхания – аэробные или факультативно-анаэробные микроорганизмы. Оптимальные условия для их культивирования обеспечиваются на обычных питательных средах, особенно при добавлении сыворотки или цельной крови животных. [107, 158, 175, 116].

Некоторые типичные виды, такие как *S. suis*, или атипичные виды, такие как *S. porcinus* и *S. dysgalactiae*, подвид *dysgalactiae*, могут вызывать такие инфекции, как сепсис, менингит, эндокардит, артрит и септический шок. *S. suis* считается новым зоонозным патогеном [91].

В целях оценки распространённости стрептококков с разной гемолитической активностью в патологическом материале, полученном от павших, вынужденно убитых и больных коров, овец и лошадей в условиях хозяйств Кабардино-Балкарской Республики (КБР), было проанализировано 508 изолятов. Из них 212 были выделены от крупного рогатого скота, 176 – от мелкого рогатого скота и 120 – от лошадей. Среди всех исследованных штаммов 186 (36,6 %) проявили α-гемолиз, 190 (37,4 %) – β-гемолиз и 132 (25,0 %) не вызвали гемолиза (γ-тип).

В овцеводческих хозяйствах КБР из 176 стрептококковых культур, полученных от овец, α-гемолитическая активность наблюдалась в 71 случае (40,3 %), β-гемолитическая – в 62 (35,2 %), а отсутствие гемолиза – в 43 (24,4 %). Наибольшую концентрацию β-гемолитических стрептококков выявили в образцах крови (50,0 %) и селезёнки (75,0 %) у ягнят, павших от пупочного сепсиса, а также в крови (40,0 %) и лёгких (33,3 %) овец с клиническими признаками пневмонии.

Среди 120 изолятов, выделенных от лошадей, α-гемолиз проявляли 44 штамма (36,6 %), β-гемолиз – 41 (34,1 %), а 35 (29,1 %) не продуцировали гемолиз. α-гемолитические стрептококки чаще всего обнаруживались в смывах из носовой полости (40,2 %) и препуциальной области (50,0 %) больных лошадей. β-гемолитические формы преобладали в пробах от жеребят

с омфалитом: в крови – 62,5 %, в селезёнке – 72,7 %. В свою очередь, негемолитические (γ) стрептококки чаще всего выделяли из патматериала лошадей с поражениями органов дыхания – в 33,7 % случаев.[16, 21, 202, 209, 171, 89, 114, 9].

1.1.3. Эпизоотологические сведения

В ветеринарно-диагностической лаборатории университета штата Айова были проведены исследования двух случаев высокой смертности среди отбракованных свиноматок и откормочных свиней на закупочной станции в Огайо и на скотобойне в Теннесси. Животные были слабыми, вялыми, у некоторых была высокая температура. Сообщалось о высокой смертности, которая в течение 8-10 дней достигала 30-50% на пункте закупки свиней, и в течение 5-7 дней 30-40% на скотобойне. Наиболее характерными макроскопическими патологическими признаками были спленомегалия и геморрагические лимфатические узлы, а у одной свиноматки наблюдался незначительный фибринозный полисерозит. Микроскопические повреждения в виде васкулита, фибриновых тромбов, фибринозно-некротического полисерозита и внутрипузырных бактерий соответствовали острой бактериальной септицемии. Бактериальным посевом из проб внутренних органов, включая селезенку, легкие и почки и последующим культивированием был выделен *Streptococcus equi subsp.* зооэпидемический возбудитель (*S. zooepidemicus*). Причиной столь высокой смертности свиней была септицемия, вызванная *S. zooepidemicus* [177, 190, 131, 169, 185, 186].

Наиболее часто выявляемыми патогенами были pcv-2 и а-гемолитический стрептококк; плевропневмония была выявлена в двух случаях. У свиней с клиническими признаками стрептококкоза чаще обнаруживали ассоциации микроорганизмов, чем у здоровых свиней. В частности, а-гемолитический стрептококк и *M. hyorpneumoniae* были связаны с присутствием *M. hyorhinis*, вируса prrsv европейского типа, *P. multocida* и *B. bronchiseptica*, и а-гемолитический стрептококк также чаще встречался у

свиней, которые уже были инфицированы другими патогенами *P. multocida* и *B bronchiseptica* были в значительной степени связаны с *M hyopneumoniae*, агемолитическими стрептококками prrsv европейского типа и prrsv американского типа [67, 88, 153, 70, 79, 99, 124, 191, 205, 183, 27, 56].

1.1.4. Патогенез

Из первоначального места внедрения и локализации стрептококки с током крови, разносятся по всему организму, вызывая поражения кожи, сальных и потовых желез, внутренних органов, мозговых оболочек, костей и придаточных пазух носа. После латентной фазы различной продолжительности и по механизму, идентичному аллергической реактивности, иногда развиваются осложнения в виде острого геморрагического нефрита и полиартрита, сходного с ревматической лихорадкой [158, 11, 13, 84, 90, 189, 187].

Стрептококки, колонизирующие слизистые оболочки желудочно-кишечного и респираторного трактов, способны проникать в лимфатическую и кровеносную системы, где подавляют фагоцитарную активность иммунных клеток, что создаёт условия для развития септицемии. Вырабатываемые ими экзотоксины оказывают цитопатическое действие на эндотелий сосудов, провоцируя геморрагии на слизистых и серозных оболочках.

Под влиянием токсических метаболитов в жизненно важных органах – таких как миокард, печень и почки – развиваются дистрофические изменения белково-жирового характера, которые в тяжёлых случаях приводят к летальному исходу. [41, 178, 197, 127, 204, 172, 199, 201].

Streptococcus suis - зоонозный патоген, который может вызывать тяжелые заболевания, главным образом менингит, у свиней и людей, имеющих профессиональный контакт со свиньями. Первой стадией патогенного процесса, сходного у свиней и человека, является прикрепление и колонизация слизистой оболочки и/или эпителиальных тканей хозяина. Вторая стадия - проникновение в более глубокие ткани и внеклеточное

перемещение бактерий в кровоток, либо свободная циркуляция, либо прикрепление к поверхности моноцитов. Если *S. suis*, присутствующий в крови, не вызывает септицемию со смертельным исходом, тогда он способен перейти в третью стадию, включающую проникновение в органы хозяина, главным образом, через гематоэнцефалический барьер и/или барьер кровь-спинномозговая жидкость, чтобы получить доступ к центральной нервной системе (ЦНС) и вызвать менингит. Четвертая стадия - воспаление, которое играет ключевую роль в патогенезе как системных инфекций, так и инфекций ЦНС, вызванных *S. suis*. Возбудитель может вызывать избыточную выработку провоспалительных цитокинов, которые вызывают септический шок и/или привлечение и активацию различных популяций лейкоцитов, вызывая острое воспаление ЦНС [203, 188, 109, 207, 160, 190].

Streptococcus suis способен вызывать стремительную воспалительную реакцию в головном мозге, активируя клетки микроглии, астроциты и, возможно, другие типы клеток. Это приводит к серьезным внутричерепным осложнениям, таким как отек мозга, повышение внутричерепного давления, нарушения кровообращения в мозге и потеря слуха вследствие кохлеарного сепсиса [170, 200, 203, 106, 122].

На всех стадиях патогенного процесса *S. suis* взаимодействует со многими типами иммунокомпетентных клеток хозяина, такими как полиморфноядерные лейкоциты, мононуклеарные макрофаги, лимфоциты, дендритные клетки и микроглия, используя ряд универсальных факторов вирулентности для преодоления врожденной и адаптивной иммунной защиты хозяина и для преодоления экологического стресса [193, 107, 175, 116].

Источником возникновения стрептококкоза в хозяйствах являются свиноматки, больные маститом и эндометритом, а также свиньи-стрептококконосители. У свиноматок стрептококки наиболее часто выявляют в пакетах молочных желез при абсцедирующем мастите и в матке при послеродовом эндометrite, а также на слизистых оболочках верхних дыхательных путей. Инфицирование поросят происходит от больных

свиноматок алиментарным и аэрогенным путями, а также через поврежденную кожу [136, 142, 91, 119].

1.1.5. Клинические признаки и патоморфологические изменения

У инфицированных стрептококками свиней, как правило, поражаются органы дыхательной или центральной нервной системы (ЦНС). Неврологические симптомы были обратно пропорциональны глобальным поражениям дыхательных путей, с респираторными симптомами и серьезным поражением ЦНС. Гнойная бронхопневмония наиболее распространенная форма поражений легких (55,2%). Имеются сообщения о фибринозном и/или гнойном плеврите, эпикардите, перикардите, артrite, перитоните и полисерозите [162, 17, 57, 45, 76].

У свиней регистрировали гнойные менингиты с гноенным или негноенным энцефалитом, гнойную бронхопневмонию, фибринозно-гнойный эпикардит, многоочаговый миокардит и сердечный васкулит. Эти результаты свидетельствуют о том, что у свиней, инфицированных *S. suis*, преобладает гноечное или фибринозно-гноечное воспаление мозга, сердца, легких и серозных оболочек, и что для подтверждения диагноза стрептококкоза у свиней и дифференциации этого заболевания от заболеваний, вызванных другими гноеродными бактериями, необходимо бактериологическое исследование [163, 20, 11, 54].

1.1.6. Лабораторная диагностика стрептококкозов

Для диагностики стрептококкоза свиней могут быть использованы различные типы проб биоматериала, включая кровь, мозовую жидкость, легочную ткань, суставную жидкость. Пробы должны быть собраны стерильными инструментами и помещены в подходящие транспортные среды

для предотвращения контаминации и сохранения жизнеспособности бактерий [167, 21].

Мазки-отпечатки с проб окрашиваются по Грамму для предварительной идентификации бактерий. *Streptococcus suis* является грамположительной кокковой бактерией, которая располагается в виде цепочек или пар. Микроскопия позволяет быстро оценить наличие и морфологию бактерий, однако для окончательной идентификации необходимы дополнительные методы лабораторных исследований [192, 203, 79, 146, 154].

Streptococcus suis является каталаза отрицательным микробом, что отличает его от стафилококков. *Streptococcus suis* демонстрирует а-гемолиз (частичный гемолиз) на кровяном агаре. Дополнительные биохимические тесты, такие как ферментация углеводов, могут быть использованы для идентификации [133, 152, 207, 134, 69].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет быстро и точно идентифицировать *Streptococcus suis* и его гены вирулентности. Этот метод особенно полезен для выявления различных серотипов возбудителя. ПЦР применяется для быстрой диагностики клинических случаев стрептококкоза у свиней, что позволяет своевременно начать лечение и предотвратить распространение инфекции [171, 138, 95, 98].

Streptococcus suis является значимым патогеном у свиней, вызывающим различные заболевания. Быстрая и точная идентификация возбудителя имеет решающее значение для своевременного лечения и контроля инфекции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее эффективных методов идентификации *Streptococcus suis* благодаря своей высокой чувствительности и специфичности [99, 187, 149, 150].

Преимущество метода ПЦР - способность обнаруживать низкие концентрации ДНК возбудителя стрептококкоза в течение нескольких часов. Имеется возможность и количественного анализа. Реальная количественная ПЦР (qPCR) позволяет не только идентифицировать, но и количественно оценить наличие возбудителя. ПЦР позволяет идентифицировать различные

серотипы *Streptococcus pneumoniae*, что важно для эпизоотологического мониторинга и разработки вакцин [161, 113, 147, 155, 168, 176].

ПЦР применяется для быстрой диагностики клинических случаев стрептококкоза у свиней, что позволяет своевременно начать лечение и предотвратить распространение инфекции [103, 96, 97, 108, 104].

Определение чувствительности изолятов *Streptococcus suis* к различным антибиотикам проводится методом дисковидфузии или методом минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Это позволяет выбрать наиболее эффективное лечение и контролировать распространение резистентных штаммов [132, 208, 65, 54].

Для выявления стрептококков в клинических образцах материал чаще всего культивируют на чашках с кровяным агаром, что облегчает предварительный скрининг на наличие β-гемолитических колоний. Последующее подтверждение наличия подозрительных колоний *S. pyogenes* может быть достигнуто с помощью нескольких простых и быстро выполняемых лабораторных тестов или автоматизированных систем идентификации, таких как масс-спектрометрия MALDI TOF. В дополнение к классическим методам серологического типирования доступны хорошо зарекомендовавшие себя системы молекулярного типирования, которые предоставляют обширные базы данных по уже охарактеризованным штаммам [160, 115, 66, 86, 157].

Диагностика инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, является важной задачей для микробиологических исследований ввиду её распространённости, высокой смертности и резистентности к антибиотикам. Обнаружение антигена в сыворотке крови при отсутствии бактериемии затруднительно. Определение антигена в моче более эффективно, но требуется проведение концентрирования образца, что ограничивает применение этого метода в повседневной практике. Полимеразная цепная реакция на определение гена аутолизина является перспективной для диагностики стрептококкоза по образцам крови и смывам [196, 165, 172, 159].

В течение нескольких десятилетий диагностика пневмококковой инфекции основывалась на классическом бактериальном посеве и методах идентификации. Однако выделение и идентификация пневмококка осложняются контаминацией альфа-гемолитическими стрептококками. Неправильная идентификация может повлиять на правильную диагностику и адекватное лечение [197].

Молекулярные анализы ценные по своей сути благодаря их повышенной аналитической и клинической чувствительности и специфичности. Такие анализы также могут помочь в диагностике выявлением нежизнеспособных микроорганизмов у пациентов, получавших лечение антибиотиками [82].

Разработка методов ПЦР, нацеленных на гены *rly* и *lytA* (Sp-ПЦР) [112], стала важной вехой в развитии лабораторной диагностике пневмококков. Сообщалось, что метод ПЦР в реальном времени, нацеленный на ген *lytA*, является чувствительным и специфичным для выявления *S. pneumoniae* [75].

Однако оборудование для ПЦР и ПЦР в режиме реального времени является относительно дорогостоящим, а анализы сложны для проведения в лабораториях с ограниченными ресурсами.

В 2000 году Цугунори Нотоми и его коллеги впервые сообщили о новом методе обнаружения нуклеиновых кислот - петлевой изотермической амплификации (LAMP). В LAMP используется ДНК-полимераза с активностью смещения цепей, а также два внутренних праймера (прямой внутренний праймер, FIP; обратный внутренний праймер, BIP) и два внешних праймера (F3, B3), которые распознают шесть отдельных участков ДНК в целевой последовательности. Этот метод использует уникальный механизм прайминга, который позволяет получать специфические ДНК-продукты за более короткое время, чем ПЦР [129, 97, 177, 178, 110, 97, 174].

Дополнительные праймеры (т.е. так называемые петлевые праймеры: loop-primer forward, LF; loop-primer backward, LB), предназначенные для отжига петлевой структуры в LAMP, могут быть использованы для ускорения реакции, что приводит к повышению чувствительности [12, 72].

В настоящее время петлевые праймеры широко используются в практическом применении LAMP [153].

Для выявления антител к *S. suis* был разработан метод непрямого иммуноферментного анализа (GMD-ELISA). Для оптимизации соотношения антиген – антитело использовали титрование в шахматном порядке. Результаты тестирования методом ИФА на сальмонеллы (*Salmonella enterica*), эшерихии (*Escherichia coli*), золотистый стафилококк (*SA*) и пиогенный стрептококк (*Streptococcus pyogenes*) были отрицательными, что указывает на высокую специфичность этого метода. Результаты были положительными, когда соотношение разведений сыворотки, положительной на *S. suis*, достигло 1:6400, что также указывает на высокую чувствительность метода. Результаты анализа воспроизводимости непрямого иммуноферментного анализа показали, что коэффициент вариации внутри исследований и коэффициент вариации между анализами составляли менее 10%, что указывает на хорошую повторяемость метода [100, 101, 105, 111].

Новый GMD-ELISA – это удобный, чувствительный и специфичный метод диагностики, который обеспечивает техническую поддержку для быстрой диагностики и эпидемиологического расследования.

Дифференцирование вирулентных и авивирулентных штаммов *Streptococcus suis* типа 2 позволит правильно диагностировать больных свиней и идентифицировать свиней-бактерионосителей. Чтобы отличить вирулентные штаммы от невирулентных, разработано два метода иммуноферментного анализа с двойными антителами (DAS) с использованием специфических моноклональных антител, направленных против двух маркеров вирулентности *S. suis* типа 2. Таким образом можно прийти к выводу, что два анализа DAS-ELISA являются надежными, быстрыми и простыми методами идентификации вирулентных штаммов *S. suis* 2 типа [104, 146, 172, 108, 129].

Белки, связанные с бактериальной поверхностью, часто исследуются в качестве потенциальных кандидатов антигенов для конструирования вакцин и

использования как диагностических антигенов. Сравнительный анализ для диагностики инфекции, вызванной *S. suis* с использованием обычного набора для ИФА на планшетах показал, что специфичность и чувствительность метода Dot-PPA-ELISA составили 97,5 и 96,6% соответственно. Общая серопревалентность в 305 образцах сыворотки свиней составила 73,1%, что указывает на применимость метода для выявления инфекции вызванных *S. suis*. В совокупности полученные результаты показали, что Dot-PAА-ELISA является удобным, быстрым, чувствительным и специфичным диагностическим методом, пригодным для изучения большого количества образцов, полученных в ходе клинических и эпидемиологических исследований, что помогает снизить значительные экономические потери [99, 200, 202, 99, 178].

1.2. Стафилококкозы свиней

1.2.1. Краткая историческая справка

Стафилококки впервые они были идентифицированы как бактериальные возбудители в XIX веке. В 1880 году Александр Огстон впервые обнаружил похожие на виноградную лозу скопления бактерий из хирургического абсцесса в коленном суставе и назвал их стафилококк (греч. *staphyle* – «гроздь винограда»; *kokkos* – «зерно или ягода»). В 1884 году немецкий врач Фридрих Юлиус Розенбах смог выделить чистую культуру микроорганизма и классифицировать. [138].

В 1899 году врач Павел Лащенков, исследуя вспышку острого пищевого отравления среди группы гимназисток после употребления торта, впервые описал токсические свойства *Staphylococcus aureus*. Он установил, что при температуре выше 37 °C этот микроорганизм интенсивно размножается и подавляет рост менее патогенного *Staphylococcus albus* [4].

Начиная с начала 1930-х годов, для диагностики инфекций, вызванных *S. aureus*, в клинической практике стали использовать тест на коагулазу —

специфический фермент, вырабатываемый только патогенными штаммами этого вида [4].

Александр Флеминг в 1928 году случайно обнаружил антибиотические свойства плесневого микроскопического гриба *Penicillium notatum*, который попав из окружающей среды «загрязнил» чистую культуру золотистого стафилококка [115].

До 1940-х годов инфекции, вызываемые *Staphylococcus aureus*, носили, как правило, летальный характер для подавляющего большинства пациентов.

С внедрением в клиническую практику пенициллина появилась возможность эффективного лечения таких инфекций. Однако уже к концу 1940-х годов у значительной части штаммов *S. aureus* сформировалась устойчивость к этому антибиотику, что привело к возникновению вспышек заболеваний, вызванных резистентными к пенициллину вариантами бактерий. [145].

В 1940 году был опубликован отчет о пенициллин-резистентном золотистом стафилококке [61].

В 1959 году британская фармацевтическая компания Beecham разработала первый полусинтетический пенициллин - метициллин для лечения инфекций, вызванных пенициллин-резистентным золотистым стафилококком [164].

Однако, штаммы золотистого стафилококка, устойчивые и к метициллину (MRSA), были обнаружены уже в 1961 году [133, 148].

Инфекции, вызванные *S. aureus*, стали серьезной угрозой, которая возникла в конце 1970-х годов, когда были обнаружены штаммы MRSA с множественной лекарственной резистентностью [79,80].

1.2.2. Характеристика возбудителя

Сепсис, вызываемый золотистым стафилококком, представляет собой важную причину тяжелого течения болезни и смертности, частота этого инфекционного процесса растет [144, 73, 13, 173].

Золотистый стафилококк является одним из основных колонизаторов организма человека и животных. В некоторых случаях этот микроб может стать патогеном, вызывая локальные или системные инфекции. Реже стафилококковые инфекции возникают в результате экзогенного заражения. Колонизация стафилококковыми микроорганизмами может сохраняться в течение месяцев и даже лет, пока они не вызовут инфекцию, и колонизированные животные смогут заражать других животных, поскольку они являются наиболее важным резервуаром стафилококковых микробов [92, 42, 23, 7, 18, 47].

Золотистый стафилококк является основным патогеном, вызывающим широкий спектр клинических инфекций. Он является основной причиной бактериемии и инфекционного эндокардита, а также костно-суставных инфекций, инфекций кожи и мягких тканей, плевролегочных инфекций [184, 135, 179, 180].

Стафилококки являются нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек животных и человека, и известно, что штаммы с патогенным потенциалом вызывают заболевания, которые варьируются от простых абсцессов и мастита до более тяжелого синдрома токсического шока [94, 3, 46, 137, 140, 143].

Стафилококки в основном обнаруживаются в носу. Эти бактерии, как правило, безвредны, не причиняют вреда или вызывают лишь незначительные проблемы, которые могут пройти сами по себе. Однако при определенных обстоятельствах стафилококки могут проникать в кровоток, поражать весь организм и вызывать септический шок. Золотистый стафилококк является одновременно комменсальным микроорганизмом, а также важным условно-

патогенным микробом, вызывающим различные патологии, такие как бактериемия-сепсис, эндокардит, пневмония, остеомиелит, артрит и кожные заболевания [3, 46, 137, 143].

Возрастание роли *S. aureus* как этиологического фактора инфекции в течение последнего десятилетия во многом способствовали не только механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам, но и появление новых *S. aureus* клональных типов с повышенной экспрессией факторов вирулентности и способностью нейтрализовать иммунный ответ хозяина [93, 209, 83, 204, 163, 125].

Устойчивость к антибиотикам является еще одной проблемой из-за сложности лечения инфекций, вызванных печально известным метициллин-резистентным золотистым стафилококком (MRSA), устойчивым к большинству известных в настоящее время антибиотиков [182, 52, 28, 58, 44].

Таким образом, быстрая и точная диагностика стафилококка и характеристика профилей устойчивости к антибиотикам необходимы в клинических условиях для эффективной профилактики, контроля и лечения бактерий.

1.2.3. Эпизоотологические сведения

Метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) был выделен у свиней и их владельцев в Нидерландах. Оценивая распространение MRSA среди голландской популяции свиней, был проведен скрининг 540 свиней на 9 бойнях, где в 2005 году было вынуждено убито 340 (63%) свиней. Было обнаружено, что у 209 (39%) свиней в носоглотке был обнаружен MRSA. Были поражены 44 из 54 групп, в каждой по 10 свиней (81%). Все отдельные группы животных были с разных ферм, и их убой производился на разных скотобойнях. Процент свиней, инфицированных MRSA, был разным на различных скотобойнях и в группах внутри скотобояни, что указывает на инфицированность MRSA свиней непосредственно на фермах, а также на заражение при нахождении их на «передержке» на скотобазах [127].

В разных странах было проведено несколько исследований для оценки распространенности MRSA и понимания динамики распространения микроорганизма на свинофермах [181, 37, 35, 10].

В рамках комплексного базового исследования, проведенного в 2008 году Европейским агентством по безопасности пищевых продуктов (EFSA), выявили MRSA-положительные племенные стада свиней в 12 из 26 обследованных европейских стран. Распространенность MRSA среди свиноводческих ферм в Европейском Союзе в среднем составила 14% (диапазон от 0 до 46%) в племенных стадах и 26,9% (диапазон от 0 до 51%) в производственных (товарных) стадах [138].

1.2.4. Патогенез

У *Staphylococcus aureus* секреция коагулаз, белков, которые связываются с гемостатическим фактором хозяина - протромбином активируя его, способствует появлению на поверхности бактерий агглютининов, белков, которые связывают полимеризованный фибрин и являются ключевыми в вирулентности *S. aureus*, приводя к образованию абсцессов, после проникновения бактерии в кровоток. Контролируемые патогенами процессы, включающие широкий спектр секретируемых факторов, ответственные за привлечение и разрушение иммунных клеток, превращение абсцессных поражений в гнойный экссудат, с которым стафилококки распространяются, вызывая новые поражения органов или заражая новых хозяев. Исследования характера инфекций, вызванных *S. aureus*, являются важным этапом в определении защитных вакцинных антигенов и разработке иммунотерапевтических средств, направленных на предотвращение заболеваний или улучшение результатов лечения [198, 48, 193, 91, 71].

Образование капсулых полисахаридов *S. aureus* связано с его персистенцией в молочной железе хозяина, а инкапсулированный *S. aureus* более устойчив к макрофагам, чем не инкапсулированные штаммы. Считается, что выработка эксфолиативных токсинов *S. hyicus* играет важную роль в

развитии экссудативного эпидермита, но также считается, что для развития инфекции необходимы определённые сопутствующие факторы [183].

S. aureus известен как частый комменсал и патоген человека и животных. Он может постоянно или периодически колонизировать кожу и слизистые оболочки верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и нижних мочеполовых путей. Носительство микроорганизма через нос было определено как наиболее важный фактор риска развития инфекций, возникающих в результате повреждения кожи и мягких тканей [136].

Проблемы, связанные с инфекцией *S. aureus*, включают поверхностные кожные заболевания, системные заболевания и токсикозы [120, 130].

В животноводстве *S. aureus* является основной причиной мастита у молочных коров и различных типов некрозов у домашней птицы [117].

Патогенез стафилококковой инфекции во многом зависит от характера инфицирования. При экзогенном попадании возбудителя входными воротами являются кожа, слизистые оболочки ротовой полости, дыхательных путей и ЖКТ, конъюнктива век, пупочная ранка и др. На месте внедрения развивается воспаление с некрозом и нагноением. При эндогенном – верхние дыхательные пути [62].

1.2.5. Клинические признаки и патоморфологические изменения

Стафилококковые инфекции могут протекать неблагоприятно из-за повышенной агрессивности отдельных штаммов, устойчивых к антибиотикам, снижения способности организма животного защищаться [6, 49, 3. 40, 5, 11].

Примерно у 15-40% животных, колонизированных *S. aureus*, в разное время можетиться инфекционный процесс [121, 175, 123, 142, 119].

Из-за высокой распространенности инфекций, вызываемых золотистым стафилококком, в последнее время становится серьезной проблемой, в частности связанной с образованием абсцессов у свиней. Некоторые способствующие факторы, в частности скученность животных в помещениях

технического обслуживания (весовая и т.п.) связаны с возникновением и распространением абсцессов, вызываемых золотистым стафилококком [12, 38, 2, 50, 166].

Изоляты стафилококков колонизируя желудочно-кишечный тракт животных легко распространяются в окружающей среде. Также установлено, что как при контакте кожи к коже, так и при контакте с выделениями, содержащими стафилококки, такими как слюна, SpA обладает способностью связывать выделения, которые образуются при чихании и кашле. Инфекции *S. aureus* могут быть вызваны штаммами, которые вызывают метициллин-резистентные заболевания, такие как сепсис [82].

1.2.6. Лабораторная диагностика стафилококкозов свиней

Золотистый стафилококк является одним из важнейших бактериальных патогенов, вызывающих пищевые отравления и инфекционные заболевания человека и животных. Разработка быстрого, специфичного и чувствительного метода выявления *S. aureus* имеет большое значение для диагностики, профилактики и борьбы с заболеваниями, вызываемыми этим микробом. Для решения этой задачи был разработан биогибридный наноархитектонический метод ИФА на основе наноцветков для выявления *S. aureus* с высокой специфичностью и чувствительностью. Благодаря высокой специфичности CBD из лизина PlyV12 бактериофага $\chi 1$ с *S. aureus* был сформирован стабильный комплекс антитело-бактерия-гибрид наноцветка. Затем было проведено усиление сигнала активности фермента HRP в гибридном наноцветке с использованием системы регистрации ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин)-пероксид водорода. Доказано, что этот метод позволяет специфически выявлять *S. aureus* в диапазоне от 101 до 106 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл линейно с пределом обнаружения до 6 КОЕ/мл, что, возможно, является одним из лучших среди всех известных на сегодняшний день методов обнаружения [74].

Отсутствие необходимости в очищенных антигенах делает ИФА на *S. aureus* простым, быстрым и дешевым. Поэтому ИФА на *S. aureus* неплохая альтернатива ранее применявшимся анализам с использованием очищенных антигенов клеточной стенки [63].

Для тестирования штаммов чаще всего используются методы диффузии в агарозном геле (по Оухтерлони), при которых энтеротоксин, продуцируемый любым штаммом, сравнивается с одним из идентифицированных энтеротоксинов. Чувствительность этих методов составляет от 0,1 до 0,5 мкг энтеротоксина/мл, что обычно достаточно для определения энтеротоксигенности штаммов. Радиоиммунологический анализ (RIA), с использованием J^{125} , иммуноферментный анализ (ELISA) и метод обратной пассивной латексной агглютинации (RPLA) обладают необходимой чувствительностью для определения 1 нг/г энтеротоксина без использования сложных процедур экстракции и концентрирования. Тесты показали, что методы ELISA несколько более чувствительны, чем метод RPLA.

В сочетании с энтеротоксином *S. aureus* чаще всего продуцирует белок A. Белок A может влиять на реакцию и вызывать ложноположительные реакции при ИФА-тестировании путем неспецифического связывания IgG в разных слоях, имитируя иммуноспецифическое связывание токсина. При соединении кроличьего IgG с сефарозным гелем CL-4B из растворов может быть удалено 99% белка A, что приводит к снижению уровня, препятствующего проведению ИФА [72].

ПЦР значительно более чувствительная, чем культуральные методы, для выявления *S. aureus* и *S. uberis*, но при определении чувствительности между ПЦР и культуральным методом выявления *S. agalactiae* и *S. dysgalactiae*. существенных различий не установлено. Полученные результаты позволяют предположить, что этот мультиплексный ПЦР-анализ может быть использован в качестве альтернативного метода рутинной диагностики для быстрого, чувствительного, специфичного и одновременного выявления *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* и *S. uberis* [151].

Протокол мультиплексной ПЦР для диагностики стафилококковой инфекции был разработан таким образом, чтобы выявлять любые виды стафилококков, исключая другие бактериальные патогены (на основе праймеров, соответствующих специфичным для стафилококка участкам генов 16S рРНК), отличать *S. aureus* от коагулазонегативных стафилококков (CNS) (на основе амплификации этих генов), специфичных для золотистого стафилококка ген ClfA), и давать представление о вероятности того, что присутствующие в образце стафилококки устойчивы к оксациллину (на основе амплификации гена *mecA*) [141,151].

Синтетические олигонуклеотидные праймеры из 21 и 24 оснований, были использованы в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации последовательности гена *nuc*, который кодирует термостабильную нуклеазу золотистого стафилококка. Фрагмент ДНК длиной приблизительно 270 п.н. был амплифицирован из лизированных клеток *S. aureus* или выделенной ДНК. Праймеры ПЦР распознавали 90 из 90 эталонных и клинических штаммов. Метод ПЦР обладает потенциалом для быстрой диагностики инфекций *S. aureus* путем прямого тестирования биологических образцов [78].

В современной лабораторной практике наряду с классическими микробиологическими и иммунологическими подходами всё шире применяются методы, основанные на достижениях молекулярной биологии [19, 29, 59, 122, 156].

Эти технологии позволяют непосредственно выявлять возбудителя инфекции и определять его профиль антибиотикорезистентности без этапа культивирования. Установлено, что использование ПЦР-диагностики существенно сокращает время получения результатов по сравнению с традиционными микробиологическими методами [22, 24, 55].

1.3. Лечение стрептококкоза и стафилококкоза свиней

Основным подходом к лечению стрептококкоза свиней долгое время оставалось использование антибиотических препаратов. Наиболее эффективными считаются пенициллины, цефалоспорины, макролиды и

тетрациклины. Например, ампициллин и цефтриаксон показали высокую активность против *S. suis* в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [208]. Однако широкое и бесконтрольное применение антибиотиков привело к развитию устойчивости штаммов стрептококков, что требует постоянного мониторинга чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [206].

Применение пробиотиков и пребиотиков демонстрирует высокую эффективность в профилактике и лечении стафилококковых инфекций у сельскохозяйственных животных. Эти препараты не только снижают риск заболеваний, но и улучшают общее состояние здоровья животных, что делает их перспективным инструментом для современного животноводства, но всё же по лечебной эффективности уступают антибактериальным препаратам [126, 10].

Антибиотики остаются основным методом лечения стрептококкоза свиней, однако их использование требует тщательного контроля из-за растущей устойчивости штаммов *S. suis*. Современные исследования подтверждают, что пенициллины (амициллин, амоксициллин) и цефалоспорины (цефтриаксон) остаются наиболее эффективными препаратами для лечения острой формы заболевания. Однако их применение должно быть основано на данных по чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам *S. suis* [139].

Для преодоления резистентности предложена комбинированная терапия, например, сочетание пенициллинов с аминогликозидами (гентамицин). Такой подход позволяет повысить бактерицидное действие и снизить риск формирования устойчивости [208].

Комплексный препарат энтриким демонстрирует выраженный терапевтический эффект при лечении поросят, страдающих подострой и хронической формами энзоотической пневмонии, вызванной *Mycoplasma hyopneumoniae* и осложнённой вторичной бактериальной инфекцией, ассоциированной с микроорганизмами родов *Pasteurella* и *Streptococcus*.

Повышенная эффективность энтрикима обусловлена синергизмом входящих в его состав активных компонентов – энрофлоксацина, триметопrima и тилмикозина фосфата, которые оказывают направленное воздействие на микоплазмы, являющиеся этиологическим агентом данной патологии [17, 26, 31].

Использование данного комбинированного средства расширяет арсенал доступных ветеринарных препаратов для терапии респираторных заболеваний у свиней. Препараты комплексного действия, подобные энтрикиму, не только усиливают антимикробный отклик за счёт взаимного потенцирования компонентов, но и способствуют снижению риска формирования приобретённой устойчивости у патогенных штаммов микроорганизмов [53].

Антибиотики остаются основным методом лечения и стафилококкоза, однако их использование требует осторожности из-за высокой вероятности формирования резистентности. Однако рост числа устойчивых штаммов *S. aureus* к β-лактамным антибиотикам и другим классам препаратов требует регулярного мониторинга чувствительности микроорганизмов [60, 20].

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Лабораторные исследования проводились на базе ГБУ Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории. Для контроля питательных сред и диагностикумов использовали эталонные культуры микроорганизмов, находящихся в ГБУ Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории.

Изучение патогенных свойств культур проводили в виварии ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория». Были использованы штаммы стрептококков и гетерологичных микроорганизмов из государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Материалами для лабораторных исследований служили: мазки со слизистой носовой полости, влагалищные смывы от заболевших свиноматок; цельная кровь, сыворотка крови, смывы из бронхов, а также трупы поросят в возрасте от 1 до 4 месяцев.

Взятие и доставка материала осуществлялась в соответствии с действующими правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования утвержденными Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 24 июня 1971 года [43].

Патологический материал был взят и исследован в течении 6 ч, а при условии хранения в охлажденном виде, не позднее 10–12 ч.

Для диагностики использованы «Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утвержденные ГУВ СССР 25 сентября 1990 г. и «Методические указания по лабораторной диагностике стафилококкоза животных», утвержденные Госагропромом СССР 29.07.1987 г. [32, 33]

Методами лабораторной диагностики являлись: микроскопический, культуральный, биологический, молекулярно-генетический и серологический.

Для проведения бактериологической диагностики применялись диагностические инструменты: СТРЕПТОтест 16 (Erba Lachema Чехия), который используют для определения видов и биохимической идентификации стрептококков. СТАФИтест 16 (Erba Lachema Чехия) для идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* и родственных им других грамположительных каталазо положительных кокков, изолированных из клинического материала.

Для установления серогрупповой принадлежности стрептококков использовали стрептококковые групповые преципитирующие сыворотки, которые изготавливают ФГБУ ВГНИИ. Для культивирования стрептококков и стафилококков использовали мясопептонный бульон с 1% глюкозы и 10% инактивированной нормальной сывороткой лошади и мясопептонный агар с 1% глюкозы и 5-10% дефибринированной крови барана. Посевы инкубировали в термостате при 37 °С в течении 19 ч. Определение патогенности стрептококков и стафилококков проводили на трех белых беспородных мышах 15-16 г. Для заражения использовали свежевыделенные (18 часовые) культуры стрептококков и стафилококков. Культуру в объеме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно.

Для ПЦР и LAMP диагностики были применены диагностические наборы: «ВЕТСКРИН.СТАФИПОЛ» ООО НПФ «Литех» (Россия), «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «Литех», АмплиСенс Пневмо-квант-FL ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия), «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» (Вет-Фактор, Россия), набор реагентов «NZYtech» (Германия) для выявления ДНК *Streptococcus pneumoniae*, набор реагентов ООО «ДНК-Технология» (Россия) для выявления ДНК *Streptococcus agalactiae*, «Isothermal Master Mix» (США) для обнаружения *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, штаммов *Escherichia coli O157, O26, O45, O103, O111, O121, O145* и *Streptococcus agalactiae*.

Исследование проводилось в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий,

использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности [39].

Для проведения молекулярно-генетических исследований, включая выделение ДНК и последующую постановку ПЦР, в лаборатории были задействованы следующие технические средства и расходные материалы.

В зоне выделения ДНК использовались:

- автоматические пипетки с регулируемым объёмом (20–200 мкл и 200–1000 мкл, «Ленпипет», Россия);
- одноразовые стерильные наконечники для указанных пипеток (объём до 200 мкл и 1000 мкл, Tarsons, Индия);
- полипропиленовые микропробирки объёмом 1,5 мл (Tarsons, Индия), размещённые в специализированных штативах для пробирок вместимостью 1,5–2 мл (Axygen, США);
- настольная микроцентрифуга «ТЭТА-2» (ООО «Биоком», Россия);
- твердотельный терmostат ТТ-2 «Термит» (НПО «ДНК-Технология», Россия);
- вакуумный отсасыватель «ОМ-1» («УКБП», Россия);
- ламинарный бокс «БАВп – Ламинар-С-1» (ООО «Ламинарные системы», Россия);
- коммерческий набор реагентов, предназначенный для выделения геномной ДНК;
- герметичная ёмкость с дезинфицирующим раствором для обеззараживания инструментов и поверхностей;
- холодильное оборудование с основным отделением (+2...+8 °C) и морозильной камерой (от –18 до –24 °C).

В зоне ПЦР-анализа задействованы:

- детектирующий амплификатор Rotor-Gene Q;
- ламинарный бокс «БАВп – Ламинар-С-1» (ООО «Ламинарные системы», Россия);

- автоматические пипетки (20–200 мкл и 200–1000 мкл, «Ленпипет», Россия) в комплекте со стерильными наконечниками (Tarsons, Индия);
- микропробирки из полипропилена (1,5 мл, Tarsons, Индия) и штативы для их хранения (Axygen, США);
- микроцентрифуга «ТЭТА-2» (ООО «Биоком», Россия);
- твердотельный термостат ТТ-2 «Термит» (НПО «ДНК-Технология», Россия);
- вакуумный отсасыватель «ОМ-1» («УКБП», Россия).

Разделение рабочих зон (выделение ДНК и амплификация) обеспечивало соблюдение требований по предотвращению перекрёстной контаминации и гарантировало надёжность получаемых результатов.

Для обнаружения антител к свиному стрептококку (*Streptococcus suis*) в сыворотке свиней и оценки состояния иммунитета против *S. suis* на свинофермах использовали непрямой иммуноферментный анализ. Для работы применялся диагностический набор LSY-30019 Porcine *Streptococcus suis* Antibody ELISA Test Kit – GreenSpring® (Германия). Для выполнения измерений использовали спектрофотометр (Thermo Scientific Multiskan Go Финляндия).

Для постановки ИФА, использовали:

- откалиброванные одноканальные и многоканальные пипетки с рабочими объёмами 30, 50 и 100 мкл («Ленпипет», Россия; Sartorius, Финляндия);
- совместимые одноразовые наконечники для пипеток (Axygen, США);
- автоматическая станция для промывки микропланшетов Thermo Scientific Wellwash Versa (США);
- спектрофотометр для измерения оптической плотности в 96-луночных планшетах (Thermo Scientific Multiskan FC, США);

– вода высокой степени очистки – дистиллированная и деионизированная, используемая для приготовления растворов и промывочных буферов.

Все измерительные приборы регулярно проходили поверку и калибровку в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

Проведена комплексная оценка пригодности к применению в условиях лаборатории и в соответствии с «Инструкцией по оценке, верификации и валидации методик испытаний» И-02-2023, перед допуском к использованию коммерческого набора реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК *Streptococcus spp.* методом полимеразной цепной реакции [25]. В рамках данной процедуры был разработан акт верификации и валидации инструкции и диагностического набора реагентов. Проведённые мероприятия позволили подтвердить соответствие набора установленным аналитическим требованиям и аттестовать его для использования в практической работе лаборатории.

Все методики, используемые в лаборатории, оценивались на пригодность до их первого рабочего применения. Требованиями ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 для методик испытаний (исследований, измерений) предусмотрена оценка их пригодности (верификация), как составляющего компонента технической компетентности лаборатории [15].

В соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 Тест системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции была проведена оценка специфичности, чувствительности, стабильности, сходимости и воспроизводимости результатов тест системы ««ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для обнаружения ДНК *Streptococcus spp* [16].

Для выполнения процедуры, из предварительно исследованных холостых проб были подготовлены две контрольные и две пробы с добавлением синтетического положительного контроля ДНК *Streptococcus spp* входящего в состав диагностический набора. Пробы разделялись на серии.

Для выбранного диапазона определения проводилась серия из двух параллельных исследований, которые выполнялись двумя операторами с минимальным временным интервалом, чтобы обеспечить сходимость результатов.

Уровни заболеваемости, смертности и летальности при стрептококкозе и стафилококкозе у свиней оценивались на основе методических подходов, изложенных в руководящих документах Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных (ВНИИЗЖ) по организации и проведению эпизоотологических исследований. [34].

Эффективность считали по формуле:

$$\text{Эффективность} = \left(\frac{\text{Выздоровевшие} - \text{Переход в хронику}}{\text{Общее количество животных}} \times 100\% \right) - \text{Падеж, \%}$$

Для терапии стрептококкоза и стафилококкоза у поросят применяли две схемы: стандартную, принятую в хозяйстве и экспериментальную с использованием 5% раствора энтрикима.

Стандартная схема включала комбинированное применение пенициллина G и окситетрациклина (5% раствор). Дозировка пенициллина составляла 20 000 ЕД/кг массы тела, вводимого внутримышечно дважды в сутки. Курс лечения – 7 дней. Параллельно использовали окситетрациклин (5% раствор) в дозе 20 мг/кг 1 раз в день, также в течение 7 суток.

Курс лечения в эксперименте составил 7 дней, в течение которых 5% раствор энтрикима ежедневно вводили перорально. Препарат добавляли в питьевую воду в пропорции 1 л на 3000 л, обеспечивая дозировку 4 см³ на килограмм массы тела животного.

Клиническое наблюдение осуществлялось ежедневно, с фиксацией динамики температуры, аппетита, двигательной активности и исчезновения специфических симптомов (нейрологические нарушения, экземоподобные поражения кожи, полиартриты). Учет эпизоотических показателей проводился в соответствии с методическими указаниями.

Первичный осмотр – забор крови и смывов из носовой полости для базовой оценки.

Посттерапевтический контроль – повторный анализ через 7 дней после начала лечения.

Кровь для исследований забирали из яремной вены утром до кормления, что обеспечивало стандартизацию данных за счет минимизации влияния пищеварительной активности и циркадных ритмов. Пробы хранили в пробирках с этилендиаминетрауксусной кислотой (EDTA) для предотвращения коагуляции и доставляли в лабораторию в течение 24 часов после взятия. Все исследования проводились в ГБУ Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории, с соблюдением требований ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 и инструкций производителей оборудования.

Гематологический анализ выполнялся на автоматическом анализаторе Microcc-20 Plus (High Technology, Inc., США).

Биохимические исследования выполнялись на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas c111 (Roche Diagnostics, Швейцария).

Полученные данные лабораторных исследований подвергались количественному анализу с использованием методов вариационной статистики. Для обработки показателей применяли программное обеспечение Microsoft Excel (Microsoft Office 365), включая функции для расчета средних значений (M), стандартных отклонений (m) и коэффициентов вариации. Оценку статистической значимости различий между группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента, где уровень достоверности принимали при $p < 0,05$.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1. Эпизоотическая обстановка по стрептококкозу и стафилококкозу свиней в Краснодарском крае

Эпизоотический характер стрептококкоза и стафилококкоза у поросят типичен для большинства хозяйств. При этом пик заболеваемости чаще приходится на время массовых опросов, когда создаются благоприятные условия для распространения инфекции.

Из анализа результатов полученных при проведении лабораторных диагностических исследований патологического материала, поступавшего в Кропоткинскую краевую ветеринарную лабораторию за четыре года (с 2019 по 2022гг.) эпизоотическую обстановку по стрептококкозу свиней в Краснодарском крае можно охарактеризовать как неблагополучную (таблица 1-2).

Таблица 1 –Результаты лабораторных исследований на стрептококкоз свиней в Краснодарском крае за 4 года (2019-2022гг.).

Год	Количество проб патологического материала	Получено положительных результатов
2019	33	14
2020	36	12
2021	40	15
2022	15	3

Таблица 2 – Обнаруженные виды стрептококков в Краснодарском крае за 4 года (2019- 2022гг.).

Год	Район	Количество, гол	Исследуемый материал, показатели	Вид / к-во изолятов
2019	Усть-Лабинский	3	Смывы из влагалища свиноматок	<i>S. uberis</i> / 3
	г. Краснодар	8	Смывы из влагалища свиноматок, трупы поросят,	<i>S. pneumoniae</i> / 4, <i>S. uberis</i> / 2, <i>S. faecalis</i> / 2

			носовые смывы	
	Новопокровский	3	Смывы из влагалища свиноматок, носовые смывы	<i>S. uberis</i> / 2, <i>S. pneumoniae</i> / 1
2020	Выселковский	6	Носовые смывы	<i>S. pneumoniae</i> / 6
	г. Краснодар	6	Смывы из влагалища свиноматок,	<i>S. uberis</i> / 6
2021	г. Краснодар	15	Носовые смывы, трупы поросят	<i>S. pneumoniae</i> / 13 <i>S. zooepidemicus</i> / 2
2022	г. Краснодар	3	Носовые смывы, трупы поросят	<i>S. uberis</i> / 1, <i>S. pneumoniae</i> / 2

Данные результатов полученных при проведении лабораторных диагностических исследований патологического материала, поступавшего в Кропоткинскую краевую ветеринарную лабораторию за четыре года (с 2019 по 2022 гг.) эпизоотическую обстановку по стафилококкозу свиней в Краснодарском крае также можно охарактеризовать как неблагополучную (таблица 3).

Таблица 3 – Данные по обнаружению *Staphylococcus aureus* у свиней в Краснодарском крае за 4 года (2019-2022 гг.).

Год	Количество проб патологического материала	Получено положительных результатов
2019	20	10
2020	45	17
2021	29	13
2022	10	2

Таблицы 4 и 5 отражают динамику эпизоотического процесса при стрептококковой и стафилококковой инфекциях у свиней: в них представлены значения заболеваемости, смертности и летальности, сгруппированные по клиническим формам течения болезни.

Таблица 4 – Особенности эпизоотического проявления стрептококковой инфекции у свиней при подостром и хроническом вариантах течения

Течение болезни	Животных, гол	Заболело, гол	Пало, гол	Заболеваемость на 1000 голов	Смертность на 1000 голов	Летальность, %
острое	1250	202	72	161,6	57,6	35,6
п/острое	925	261	65	70,2	70,2	24,9
острое + хрон-кое	2175	463	137	62,9	62,9	29,5

Таблица 5 – Эпизоотическая картина стафилококковой инфекции у свиней при подостром и хроническом течении

Течение болезни	Животных, гол	Заболело, гол	Пало, гол	Заболеваемость на 1000 голов	Смертность на 1000 голов	Летальность, %
острое	1250	300	54	240,1	43,2	18,0
п/острое	925	87	30	94,1	32,4	34,5
острое + хрон-кое	2175	387	84	178	38,6	21,7

Представленные в таблицах 4-5 показатели заболеваемости, смертности и летальности свидетельствуют о высокой восприимчивости к стрептококкам и стафилококкам и тяжелом течении стрептококкоза и стафилококкоза у свиней.

Патологические явления стрептококкоза и стафилококкоза стали проявляться в апреле у поросят в возрасте от 1 до 4 месяцев после отъема от свиноматок. Клинические признаки стрептококкоза: кашель, диарея, рвота, tremor, хромота и обширные экземаподобные поражения кожи (пятна гиперемии на коже подгрудка и брюшной части тела, покраснение век), при пальпации – повышенная тактильная чувствительность.

У поросят, заражённых стафилококками, болезнь сопровождалась явлениями общей интоксикации: регистрировалось стойкое повышение температуры выше 40 °C, симптомы системного воспалительного ответа,

появление множественных нагноений на кожных покровах и слизистых, а также поражение нескольких суставов. В зоне груди и передней брюшной стенки отмечались кожные изменения, сходные с экзематозными – покраснение, нарушение целостности эпидермиса и мелкие дефекты поверхностного слоя. Животные становились вялыми, переставали поедать корм, у многих развивалось расстройство пищеварения.

При одновременном или последовательном инфицировании стрептококками и стафилококками исход болезни у значительной доли поросят оказался летальным.

Показатели заболеваемости и летальности поросят с января по декабрь представлены в таблицах 6-7.

Таблица 6 - Динамика заболеваемости и летальности поросят заболевших стрептококкозом

Месяц	Заболело, гол	Заболеваемость, % к году	Пало гол	Летальность, % к году
Январь	15	0,6	5	0,2
Февраль	10	0,4	3	0,1
Март	21	0,9	6	0,2
Апрель	45	2,0	20	0,9
Май	48	2,2	17	0,7
Июнь	52	2,3	23	1,0
Июль	40	1,8	15	0,6
Август	70	3,2	18	0,8
Сентябрь	61	2,8	10	0,4
Октябрь	45	2,0	8	0,3
Ноябрь	30	1,3	5	0,2
Декабрь	26	1,2	7	0,3
Итого	463	20,7	137	5,7

Таблица 7 - Динамика заболеваемости и летальности поросят заболевших стафилококкозом

Месяц	Заболело, гол	Заболеваемость, % к году	Пало гол	Летальность, % к году
Январь	8	2,1	3	3,6
Февраль	15	3,9	3	3,6
Март	27	7,0	7	8,3
Апрель	35	9,0	10	11,9
Май	57	14,7	16	19,0

Июнь	68	17,6	20	23,8
Июль	60	15,5	22	26,2
Август	52	13,4	13	15,5
Сентябрь	30	7,8	6	7,1
Октябрь	14	3,6	2	2,4
Ноябрь	11	2,8	1	1,2
Декабрь	10	2,6	1	1,2
Итого	387	100	104	100

Представленные в таблицах 4-7 и на рисунках 1-4 основные показатели эпизоотического процесса при стрептококкозе и стафилококкозе поросят свидетельствуют о том, что уровень заболеваемости и летальности взаимосвязаны и наиболее часто регистрируются в теплое время года (апрель-октябрь).

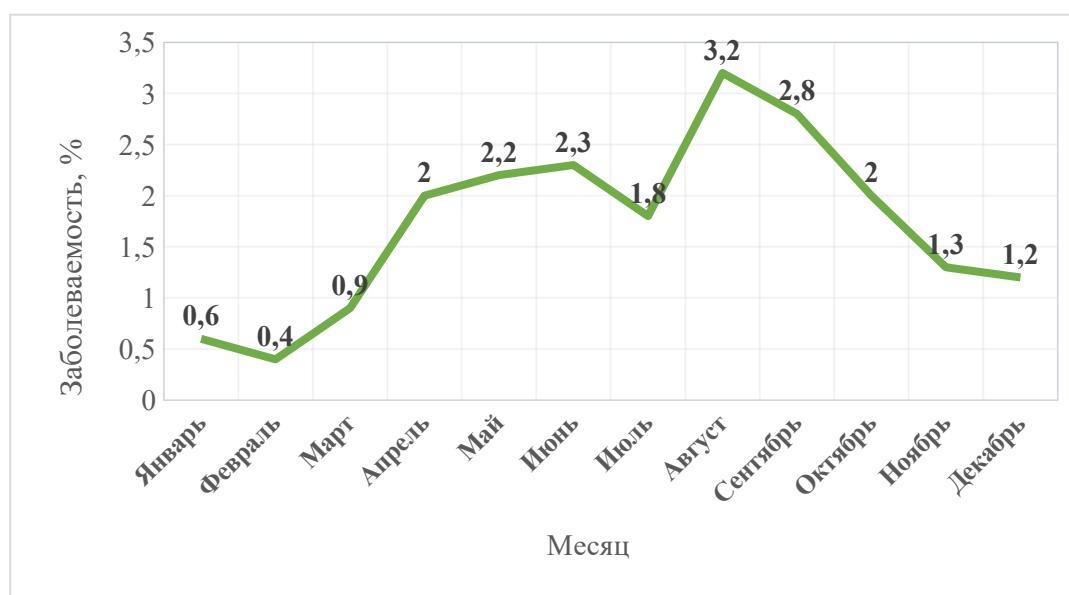


Рисунок 1 – Показатели заболеваемости поросят стрептококкозом в зависимости от сезона года

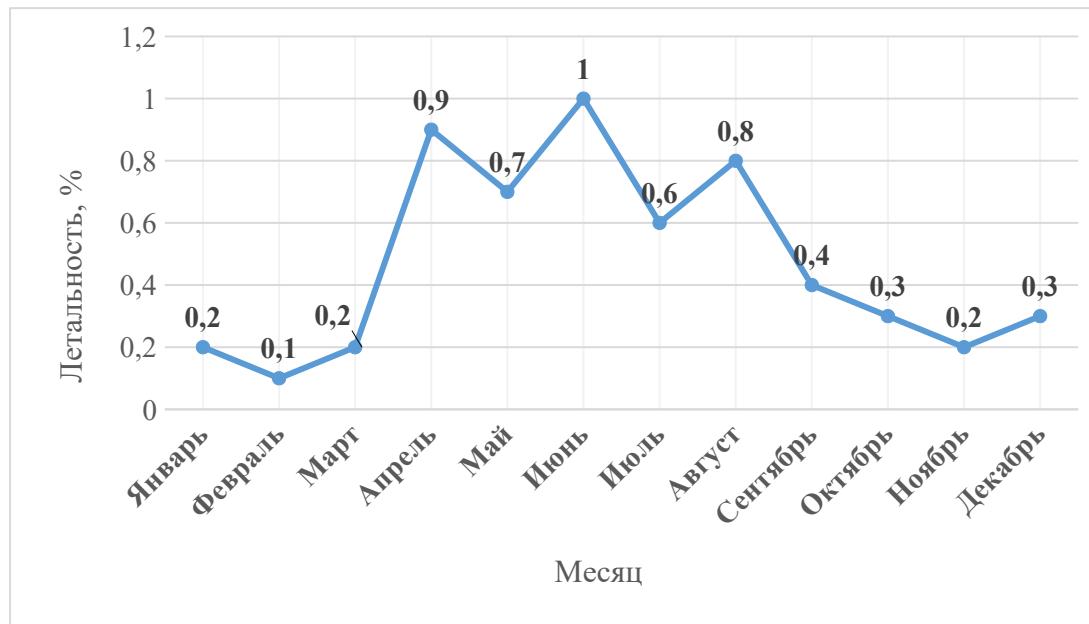


Рисунок 2 – Показатели летальности поросят при стрептококкозе в зависимости от сезона года



Рисунок 3 – Показатели заболеваемости поросят при стафилококкозе в зависимости от сезона года

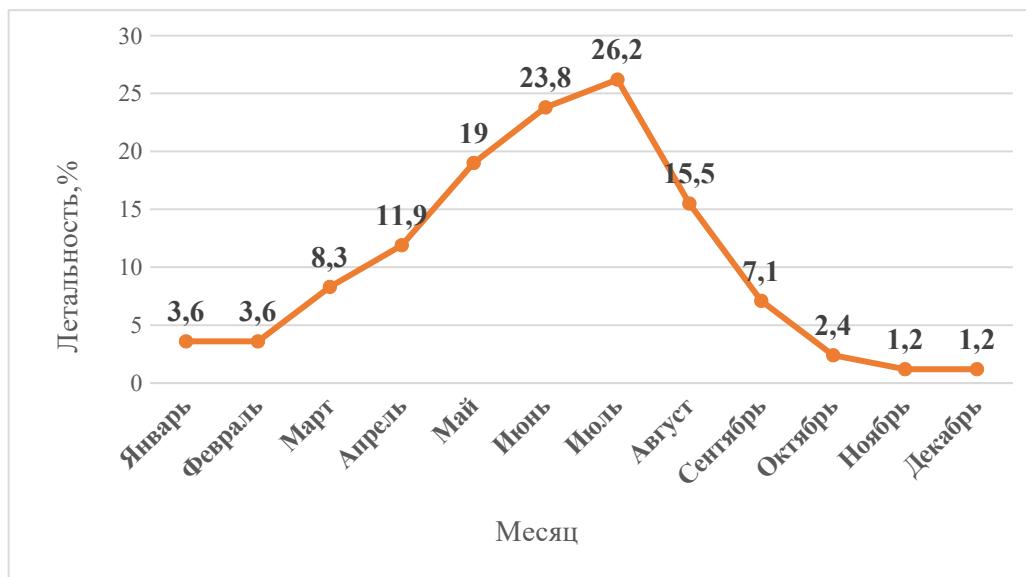


Рисунок 4 – Показатели летальности поросят при стафилококкозе в зависимости от сезона года

Эпизоотическая характеристика стафилококковой инфекции у свиней, включая заболеваемость, смертность и летальность, представлена в таблице 5. Анализ данных проведен с учетом клинических форм заболевания (острая, подострая) и возрастных особенностей животных (поросята, молодняк, взрослые свиньи).

2.2.2. Клинические симптомы и патологоанатомические изменения при стрептококкозе и стафилококкозе свиней

Стрептококковые поражения в большинстве случаев вначале выявляли на коже (Рисунок 5) и слизистых оболочках органов дыхания, затем в органах пищеварения, а также на половых органах и молочных железах свиноматок.

В области первичного очага возникает воспалительный процесс (Рисунок 6), который приводит к гнойно-некротическому поражению тканей. В данных очагах в воспалительный процесс вовлекаются лимфатические и кровеносные сосуды, в которые проникают стрептококки. Гноеродный гемолитический стрептококк вызывает у животных септикопиемию с образованием гнойных фокусов в легких, печени, молочных железах и других органах (Рисунки 7-9). Возможно развитие бронхопневмонии, менингита и поражение суставов

(Рисунки 10-11). В зависимости от серогрупповой принадлежности, степени патогенности, восприимчивости животного стрептококки могут вызывать у свиней разнообразные симптомы.

Стафилококкоз в зависимости от локализации может проявляться постоянно или периодически колонизировать кожу и слизистые оболочки верхних дыхательных путей, желудочно-кишечный тракт и нижние отделы мочеполовой системы. Так как стафилококки распространяются аэрогенным путем, они определяются как наиболее важный фактор риска развития респираторных инфекций.

Проблемы, связанные с инфекцией *S. aureus*, включают поверхностные кожные заболевания, системные заболевания и токсикозы. У свиней *S. aureus* является основной причиной развития сепсиса, пневмонии, энцефалита и артрита. Последствиями септицемии могут быть абсцессы и воспаление суставов. Абсцессы же в свою очередь могут локализоваться в селезенке, на коже, в сердце, в легких (Рисунок 12-16), на лимфатических узлах (Рисунок 17).



Рисунок 5 – Обширные экземаподобные поражения кожи туловища



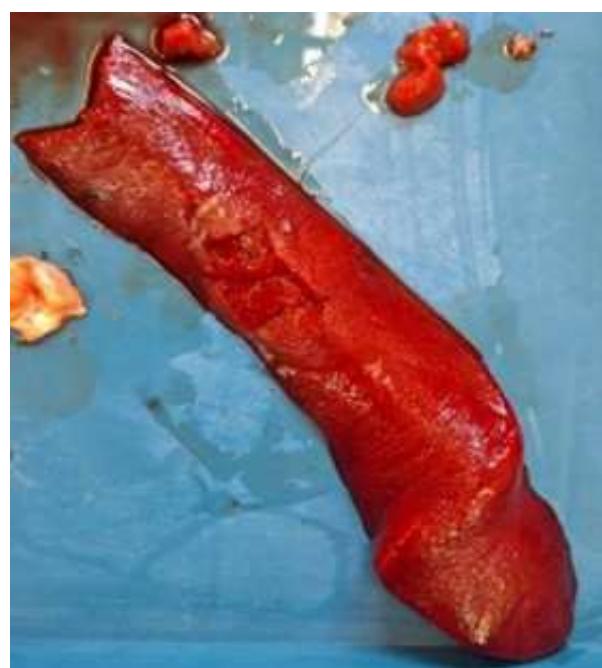
Рисунок 6 – Экземаподобные поражения кожи головы



Рисунок 7 – Септикопиемия с образованием гнойных фокусов в легких



А - печень



Б - селезенка



В - Почка



Г – легкое

Рисунок 8 – Патология внутренних органов поросенка при септической форме стрептококкоза. Кровонаполнение тканей органов



Рисунок 9 – Септикопиемия с образованием гнойных фокусов в печени



Рисунок 10 –Гнойный фокус из печени



Рисунок 11 – Поражение суставов у поросенка



Рисунок 12 – Поражение суставов у поросенка



Рисунок 13 – Сердце поросенка. Кровоизлияния на сердце и в сердечной сумке



Рисунок 14 – Легкие поросенка. Локальное геморрагическое поражение легочной ткани



Рисунок 15 – Легкие поросенка. Локализованные участки гнойного воспаления в легочной ткани

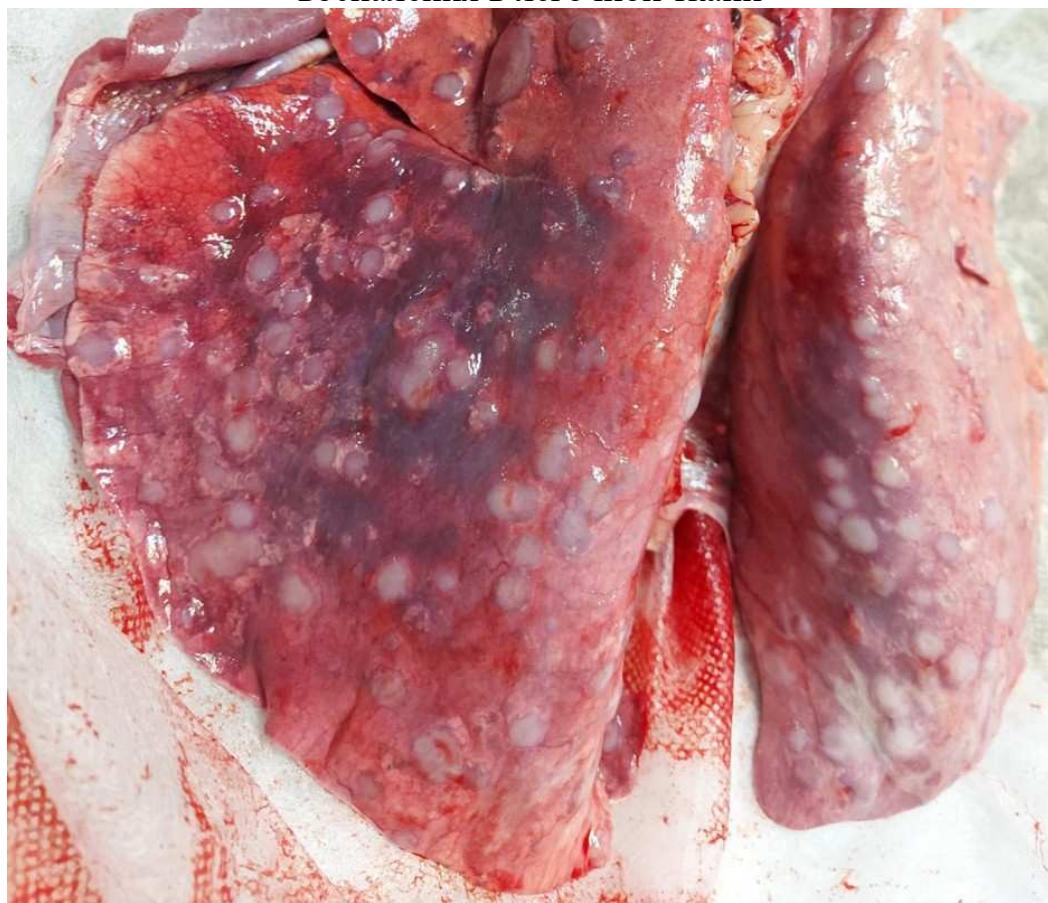


Рисунок 16 – Легкие свиноматки. Крупозная пневмония

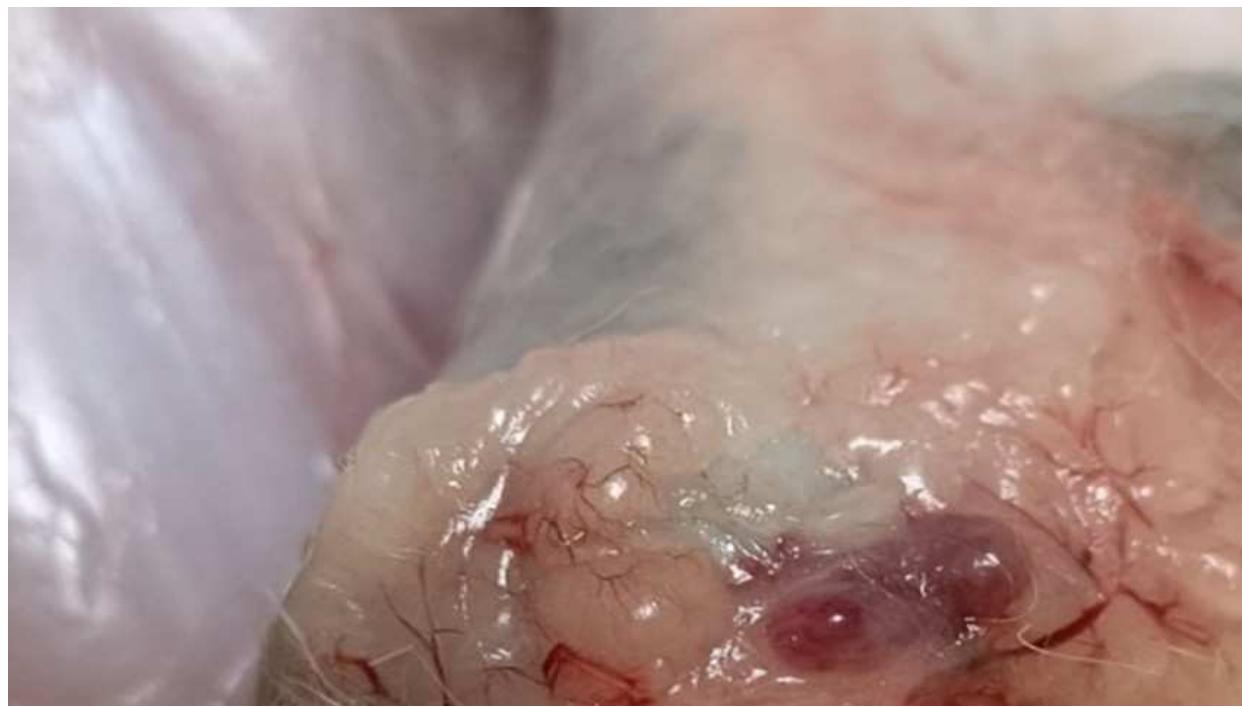


Рисунок 17 – Увеличенный с кровоизлияниями подколенный лимфатический узел

2.2.3. Бактериологический метод лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней

Лабораторное исследование с целью установления этиологии проводили при появлении у свиней острого заболевания, сопровождающегося признаками респираторного синдрома, резким снижением массы тела и гибелью животных.

Для выявления основных возбудителей стрептококкоза и стафилококкоза у свиней было проведено бактериологическое исследование различных видов биоматериала, включая трупы поросят, лёгкие свиноматок, смывы с поверхностей помещений и носовые смывы взрослых животных.

Результаты представлены в следующих таблицах 8-11.

Таблица 8 – Данные бактериологического анализа патматериала от павших поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1	<i>S. suis</i>	10	2
2	<i>S. uberis</i>	10	1
3	<i>S. pneumoniae</i>	10	1
4	<i>E. faecalis</i>	10	1
5	<i>S. zooepidemicus</i>	10	-
6	<i>S. aureus</i>	10	2

Таблица 9 – Данные бактериологического анализа образцов легочной ткани от свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1	<i>S. suis</i>	25	3
2	<i>S. uberis</i>	25	-
3	<i>S. pneumoniae</i>	25	2
4	<i>E. faecalis</i>	25	-
5	<i>S. zooepidemicus</i>	25	-
6	<i>S. aureus</i>	25	3

Таблица 10 – Результаты бактериологического исследования смывов с внутренних поверхностей стен производственных помещений

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1	<i>S. suis</i>	40	-
2	<i>S. uberis</i>	40	-
3	<i>S. pneumoniae</i>	40	-
4	<i>E. faecalis</i>	40	1
5	<i>S. zooepidemicus</i>	40	-
6	<i>S. aureus</i>	40	1

Таблица 11 – Данные бактериологического анализа смывов из носовой полости свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1	<i>S. suis</i>	100	3
2	<i>S. uberis</i>	100	-
3	<i>S. pneumoniae</i>	100	5
4	<i>E. faecalis</i>	100	1
5	<i>S. zooepidemicus</i>	100	-
6	<i>S. aureus</i>	100	1

Микробиологические исследования

Выделение культуры стрептококков

Микроорганизмы, относящиеся к роду *Streptococcus* сферические или оvoidные клетки, располагаются парами или цепочками различной длины, спор не образуют, каталазоотрицательные, по Граму окрашиваются положительно, при ферментации глюкозы никогда не выделяют газа.

Высевы из патологического материала делали пастеровской пипеткой в мясопептонный бульон с 1% глюкозы и 10% инактивированной нормальной сывороткой лошади и на мясопептонный агар с 1% глюкозы и 5-10% дефибринированной крови барана. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течении 19 часов. На глюкозо- кровяном агаре стрептококки росли в

виде мелких, прозрачных и слегка мутноватых колоний, которые были окружены зоной гемолиза.

S. suis – на глюкозо-кровяном агаре формировал колонии: мелкие, прозрачные и слегка мутноватые, округлой формы, диаметром 0,5–0,8 мм. Колонии располагались в виде цепочек или пар и окружены зоной α-гемолиза — частичным разрушением эритроцитов с образованием зеленоватого ободка вокруг колоний. В отдельных случаях наблюдались более крупные, мукоподобные (слизистые) колонии, характерные для капсулых штаммов.

На сывороточно-глюкозном бульоне *S. suis* рос равномерно, вызывая помутнение питательной среды и образование небольшого осадка, что типично для стрептококков при бульонном культивировании.

S. pneumoniae – на глюкозо-кровяном агаре росли круглые, плоские, полупрозрачные колонии, диаметром 0,5-0,8 мкм. Иногда встречались мукойдные колонии – они были более крупные, слизистой консистенции (Рисунок 18). На сывороточно-глюкозном бульоне рост был с равномерным помутнением среды с образованием осадка.

Один из механизмов, позволяющих *S. pneumoniae* уклоняться от действия фагоцитов и антител является наличие полисахаридной капсулы.

S. zooepidemicus - образовывал мелкие колонии, блестящие, вязкие, в виде капли воды, серые, диаметром 0,1-0,3 мм.

E. faecalis- колонии округлой формы, с ровными краями, диаметр 1,5-2 мм, с красноватым оттенком (Рисунок 19). При выделении стрептококков серологической группы Д определяли разновидность энтерококков. Для этого использовали среду с теллуритом калия или энтерококковую дифференциально-диагностическую среду.

Культура *E. faecalis* устойчива к теллуриту калия (0,07%) и хорошо растет на плотной среде в его присутствии, образуя колонии черного цвета. На дифференциально-диагностической среде через 15 ч роста колонии *S. faecalis* приобретали вишнево-красный цвет.

S. uberis -на кровяном агаре формировал колонии: крупные, блестящие, вязкие, с неровными краями, прозрачные, матовые, мелкие, диаметром 0,1-0,2 мм. На сывороточно-глюкозном бульоне росли с равномерным помутнением (Рисунок 20).

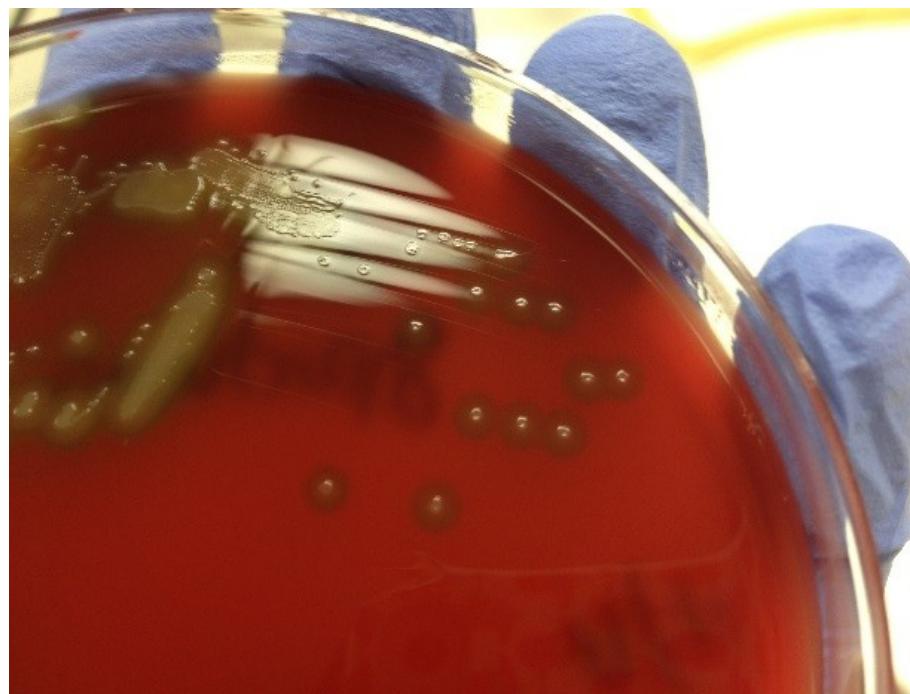


Рисунок 18 – *S. pneumoniae* на глюкозо-кровяном агаре



Рисунок 19 – *E. faecalis* на глюкозо-кровяном агаре



Рисунок 20—*S. uberis* на глюкозо-кровяном агаре

Эталонный штамм *Streptococcus uberis* 0140J является условно-патогенным микроорганизмом, который может адаптироваться к различным экологическим нишам благодаря своей питательной гибкости (Рисунок 19). Этот вездесущий микроорганизм был выделен из кожи, губ и миндалин коров, в полости рта, рубце, прямой кишке и дыхательных путях, на коже сосков и каналах, а также инфицированном вымени и фекалиях. *S. uberis* также может быть выделен из окружающей коровы среды в виде отработанного молока, воды для очистки, подстилки для пастбищ и амбаров. Все это является основным источником инфекции. Коровы выделяют *S. uberis* со своими фекалиями через слизистые оболочки пищеварительного тракта, что может объяснить широкое распространение и поддержание этого патогена в молочной среде. Участки рядом с доильным залом богаты органическими веществами (фекалиями, молоком), которые могут попадать на вымя. Когда сосковые каналы открыты, фекальное загрязнение вымени может способствовать усилению инвазии.

Более того, патоген распространяется в слизистых оболочках полости рта и губ при облизывании шерсти и эпидермиса других коров. *S. uberis* может сохраняться в результате фекально-орального цикла передачи. До сих пор роль микробиоты молочной железы крупного рогатого скота во взаимодействии хозяин–патоген была плохо изучена, и в основном во время инфекционного процесса. У здоровых лактирующих коров исследовали микробный состав и разнообразие из фекалий, молока и лейкоцитов крови

Для определения видовой принадлежности проведены биохимические исследования выделенных культур стрептококков. Продуцирование сероводорода, аммиака и индола определяли с использованием индикаторных бумажек при инкубации стрептококков в МПБ с добавлением 0,2 % глюкозы. Для определения сахаролитических свойств стрептококков, исследуемые культуры засеяли на специальные питательные среды Гисса. Использовали питательные среды с 12 углеводами и спиртами: раффиноза, ксилоза, сахароза, галактоза, мальтоза, декстроза, глюкоза, маннит, дульцит, лактоза, арабиноза, инулин. Результаты видовой принадлежности стрептококков представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты постановки реакции преципитации со стрептококками

Серологическая группа стрептококков	Пат.материал	Частота выделений, %
B	Смывы из влагалища свиноматок	17
C	-	-
E	-	-
G	Смывы из влагалища свиноматок; Носовые смывы, трупы поросят	58
D	-	-
I	Носовые смывы, трупы поросят	15
R	Носовые смывы, трупы поросят	10
S	-	-

К идентификации штаммов рода *Staphylococcus* относили микроорганизмы, демонстрирующие ферментацию глюкозы как в присутствии, так и в отсутствии кислорода (положительный ОФ-тест), производящие каталазу, не проявляющие оксидазную активность и подавляющие свой рост под действием бациллазина (Рисунок 21).

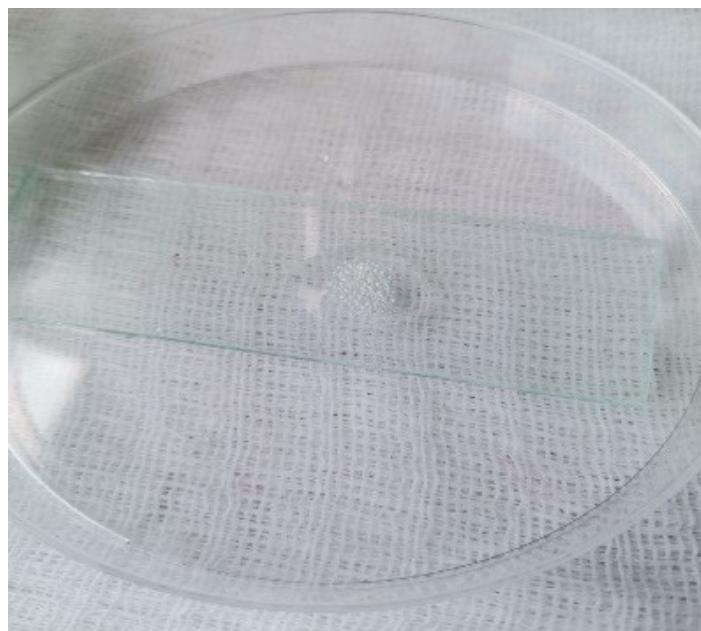


Рисунок 21 – Каталазная проба для дифференциации стрептококков от стафилококков

Наличие выраженной коагулазной активности служит основанием для отнесения стафилококковой культуры к патогенным, даже без установления её видовой идентичности, что соответствует критериям, представленным в таблице 13.

Таблица 13 – Диагностические особенности, отличающие стафилококки от прочих грамположительных кокков

Стрептококки	Микрококки			
Энтерококки	Стафилококки			
Стафилококки	Каталаза	Микрококки	Стафилококки	Микрококки
Ферментация глюкозы (ОФ-тест)		Оксидаза	Коагулаза	Чувствительность к бациллазину

Рост колоний *Staphylococcus aureus* на питательных средах характеризуется круглой формой, золотисто-желтого цвета, размер колоний 1-3

мм, гладкая и блестящая поверхность, а также бета-гемолиз на кровяном агаре (Рисунок 22).



Рисунок 22 – *S. aureus* на глюкозо-кровяном агаре

Биологический метод исследования

Определение патогенности стрептококков и стафилококков проводили на беспородных белых мышах весом 15-16 г. Для заражения использовали свежевыделенные (18 часовые) культуры стрептококков и стафилококков. В приготовленной бактериальной суспензии, проводили подсчет количества клеток, мутность суспензии визуально сравнивали стандартами McFarland.

Для эксперимента выбрана доза 5×10^7 КОЕ/мышь.

Чтобы ввести 5×10^7 КОЕ в объеме 0,5 мл, доводили суспензию до нужной концентрации физиологическим раствором.

Концентрацию рассчитывали по формуле:

$$\text{Концентрация (КОЕ/мл)} = \frac{\text{Доза (КОЕ)}}{\text{Объем (мл)}} = \frac{5 \times 10^7}{0,5} = 1 \times 10^8 \text{ КОЕ/мл}$$

Культуру в объеме 0,5 мл вводили внутрибрюшинно.

Культуру признавали патогенной при гибели не менее двух мышей из шести заражённых (Рисунок 23).



Рисунок 23 –Модель инвазивного заражения мышей и сбор биологического материала

Наблюдения проводились в течении 5 суток, при заражении патогенной культурой мыши погибали в течении 1-2 суток. Результаты постановки биопробы представлены в таблицах 14-15.

Таблица 14 – Данные патогенности стрептококковой культуры по результатам биопробы на лабораторных мышах

№ животного	Масса мыши, г	Введенная доза (КОЕ/мышь)	Объем инокулята, мл	Концентрация суспензии (КОЕ/мышь)	Признаки заболевания на 1 сутки	Признаки заболевания на 2 сутки
1	15	5×10^7	0,5	1×10^8	+	+
2	16	5×10^7	0,5	1×10^8	+	+
3	15	5×10^7	0,5	1×10^8	-	-

Условные обозначения: (-) –отсутствие признаков заболевания или выживание, (+) – наличие признаков заболевания или гибель животного

Таблица 15 – Данные патогенности стафилококковой культуры по результатам биопробы на лабораторных мышах

№ животного	Масса мыши, г	Введенная доза (КОЕ/мышь)	Объем инокулята, мл	Концентрация супензии (КОЕ/мышь)	Признаки заболевания на 1 сутки	Признаки заболевания на 2 сутки
1	15	5×10^7	0,5	1×10^8	+	-
2	16	5×10^7	0,5	1×10^8	+	-
3	15	5×10^7	0,5	1×10^8	+	-
Условные обозначения: (-) –отсутствие признаков заболевания или выживание, (+) – наличие признаков заболевания или гибель животного						

Из органов павших животных готовили мазки, окрашивали по Граму, микроскопировали под иммерсионной системой при увеличении х 100.

Комплексное применение бактериологического, биологического и микробиологического методов исследования обеспечило надёжную идентификацию возбудителя, включая определение видовой принадлежности, серогруппы и патогенности изолятов.

В ходе исследований впервые в значительном количестве проб патологического материала от свиней был выявлен ранее не являющийся эпизоотически значимым вид стрептококков — *Streptococcus uberis*.

Это указывает на изменение этиологической структуры стрептококковых инфекций у свиней и требует дальнейшего изучения роли данного вида в патологии, а также его чувствительности к антибиотикам и другим препаратам.

2.2.4. Серологический метод лабораторной диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней

Серологические методы диагностики использовали как для выявления специфических антител, так и антигенов в сыворотке крови свиней, что позволяло определить наличие инфекции. Использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения антител к *Streptococcus suis* и *Staphylococcus aureus*, так как он обладает рядом

преимуществ (высокая чувствительность и специфичность; быстрота автоматизация и объективность результатов).

Для обнаружения антител к *Streptococcus suis* использовался набор LSY-30019 Porcine *Streptococcus suis* Antibody ELISA Test Kit – GreenSpring®.

Принцип работы. Набор GreenSpring® Porcine *S. suis* antibodies ELISA изготовлен из покрытого антигеном микротитрационного планшета (покрытого антигеном *S. suis*) и других реагентов. Он применяет принцип твердофазного ИФА для тестирования антител против *S. suis* в сыворотке свиней. В teste покрытый антиген объединяется с *S. suis*-Ab в сыворотке, затем добавляется коньюгат фермента для специфического связывания с комплексом покрытый антиген + *S. suis*-Ab + коньюгат фермента на микропланшете. С субстратом ТМБ он генерирует количество цвета. Глубина цвета зависит от содержания *S. suis*-Ab, когда значение цвета больше порогового значения, свиньи хорошо вакцинированы или имеют естественное заражение.

Таблица 16 – Состав набора GreenSpring® Porcine *S. suis* antibodies ELISA

Микропланшет с антигеном <i>S. suis</i>	22 мл	96T × 2
Коньюгат фермента	50 мл	желтая крышка
Образец разбавленного раствора	1,5 мл	прозрачная крышка
<i>S. suis</i> отрицательная контрольная сыворотка	1,5 мл	зеленая крышка
<i>S. suis</i> положительная контрольная сыворотка	12 мл × 2	красная крышка
Субстрат	12 мл × 2	оранжевая крышка
Стоп-раствор	12 мл	синяя крышка
20×концентрированный промывочный буфер	50 мл	белая крышка
Самоклеящаяся фольга	6 штук	-

Образцы представляют собой свиную сыворотку, которая должна быть собрана без бактерий. Требования к образцу:

1. Срок хранения должен быть менее 1 недели при температуре 2–8 °C, для длительного срока следует хранить при температуре минус 20 °C.

2. Избегать использования образцов с выраженным гемолизом, осадком, загрязненных бактериями или белковой супензией.

3. ЭДТА, гепарин натрия и другие антикоагулянты не влияют на результаты.

Подготовка образца:

1) Довести реагенты ИФА до комнатной температуры (20–25 °C) на 30 мин, чтобы получить наилучшие результаты.

2) Образец разбавляют раствором разбавителя в 40 раз, после чего необходимо равномерно перемешать, чтобы получить лучшие результаты.

3) Для подготовки промывочного раствора разбавить концентрированный промывочный буфер десорбированной водой в 20 раз.

Процедура проведения исследования:

1. Достать покрытые планшеты (можно отсоединить) и записать положение образца на рабочем листе. Установить 2 лунки для сыворотки отрицательного контроля, добавить неразбавленную сыворотку отрицательного контроля, в 2 лунки для сыворотки положительного контроля, добавить неразбавленную сыворотку положительного контроля, 100 мкл/лунку (можно не устанавливать пустой контроль). Другие лунки предназначены для образцов, добавить разбавленный образец, 100 мкл/лунку (подходит как для однолуночного, так и для двух-луночного теста) (Рисунок 17-18).

2. Аккуратно перемешать, инкубировать при температуре 37 °C в течение 30 мин.

3. Снять липкую фольгу. Вылить жидкость из лунок, добавить разбавленный промывочный буфер в каждую лунку.

полностью, оставить на 10 с, сразу вылить. Повторить 3 раза в последний раз промокнуть на впитывающей бумаге.

4. Добавить по 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.

5. Накрыть планшет новой клейкой фольгой. Инкубировать при температуре 37 °C в течение 30 мин.

6. Повторить шаг 3 (стирка).

7. Добавить субстрат в каждую лунку, по 100 мкл/лунку, тщательно перемешать, инкубировать в течение 10 мин при температуре 37 °C в темноте, с новой клейкой фольгой.

8. Добавить стоп-раствор в каждую лунку по 50 мкл на лунку, осторожно перемешать и определить результат.

9. Измерить значение OD каждой лунки с помощью фотометра при двух длинах волн 450 нм/630 нм.

Оценка ИФА. Чтобы анализ был действительным, среднее значение OD положительных контрольных лунок должно быть больше или равно 0,6, а среднее значение OD отрицательных контрольных лунок должно быть меньше 0,15. В противном случае тест недействителен, необходимо провести тест повторно.

Результат оценивается по значению S/P.

$S/P = \frac{(О образец OD450/630 - NCx)}{(PCx - NCx)}$, NCx⁻, NCx – среднее значение OD450/630 отрицательного контроля, PCx – означает Среднее значение OD450/630 положительного контроля.

Если S/P ≥ 0,2, то это положительно; менее 0,2, то это отрицательно.

Интерпретация результата

1. Тяжелый гемолиз, недостаточное разделение белка в сыворотке, содержащая эритроциты, осадок, образец с бактериями может привести к ложноположительному результату.

2. Отрицательные результаты могут наблюдаться у отдельных свиней после вакцинации из-за индивидуальных различий или продолжительности иммунитета.

3. Положительные результаты серологической диагностики и эпидемиологического исследования свиней в сочетании с другими методами и клиническими данными.

Таблица 17 – Результаты серологического исследования сывороток свиней методом ИФА (антитела к *S. suis*)

№ п/п	Группы животных	Количество проб	Положительных проб, %
1	Поросята-сосуны (14-20 дней)	30	3 (10)
2	Поросята отъемыши (1,5- 2 месяца)	25	3 (12)
3	Ремонтный молодняк (3-4 месяца)	15	2 (13,3)
4	Откормочный молодняк (с 3 до 9 месяцев)	15	1 (6,6)
5	Основные свиноматки (9-10 месяцев)	15	1 (6,6)
Итого		100	10 (10)

Результаты серологического обследования сывороток крови свиней из хозяйств Краснодарского края указывают на широкое распространение стрептококковой инфекции среди поголовья. Данные представлены в таблице 17.

Наибольший процент положительных проб зарегистрирован у ремонтного молодняка (13,3%), тогда как у откормочного молодняка и свиноматок он был одинаковым и составил 6,6%. Общий уровень серопозитивности в стаде составил 10% (10 из 100 животных). Полученные данные позволяют предположить, что заражение происходит преимущественно в раннем возрасте, а к моменту половой зрелости и откорма наблюдается снижение уровня специфического иммунного ответа, что может быть связано с формированием невосприимчивости или отсутствием повторного контакта с возбудителем.

Таким образом, анализ полученных данных демонстрирует выраженную возрастную динамику накопления антител к *Streptococcus suis*, с максимальными показателями в младших возрастных группах и последующим снижением их частоты по мере роста и развития животных.

2.2.5. Диагностика методом ПЦР

Для обнаружения специфических генетических фрагментов стрептококков и стафилококков применялся метод ПЦР-РВ.

Основой метода является процесс амплификации ДНК, который включает повторяющиеся циклы температурной денатурации, отжиг праймеров к комплементарным последовательностям и последующее удлинение полинуклеотидных цепей с использованием этих праймеров и Тақ-полимеразы.

Применялись диагностические наборы: «ВЕТСКРИН.СТАФИПОЛ» ООО НПФ «Литех» (Россия), «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «Литех», АмплиСенс Пневмо-квант-FL ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия), «Вет-Фактор» (Россия).

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.

Экстракцию ДНК проводили на наборе «ДНК/РНК-С-ФАКТОР». Лизирующий раствор прогревали при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов. Набор представлен на рисунке 24.



Рисунок 24 – Набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР

1. Отбирали необходимое количество одноразовых пробирок для проб, включая пробирку для отрицательного контроля экстракции. Маркировали пробирки, пробирку для отрицательного контроля экстракции маркировали как ВК-. Вносили в каждую пробирку по 10 мкл реагента ВКО и по 500 мкл лизирующего раствора.
2. В пробирку ВК- вносили по 100 мкл ОКО. В остальные пробирки с лизирующим раствором и ВКО. При выделении НК использовали пробу в объеме 50 мкл с добавлением 50 мкл ОКО.
3. Все пробы, включая пробирку ВК-, аккуратно (без вспенивания) перемешивали на вортексе и прогревали 5 мин при 60 °С на 12000 об/мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение 1 мин.
4. К прогретым пробам добавляли 100 мкл преципитирующего раствора, перемешивали на вортексе, после чего сбрасывали капли с крышек на микроцентрифуге.
5. Тщательно ресуспенсировали сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавляли по 50 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешивали на вортексе и оставляли на столе на 5 мин. Для успешной сорбции пробирки с сорбентом периодически встряхивали на вортексе (без вспенивания).
6. Осаживали сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 12000 об/мин. («MiniSpin», «Eppendorf») в течение 1 мин. Удаляли супернатант с помощью вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.
7. Добавляли к осадку 300 мкл раствора для отмычки № 1, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента (получения однородного раствора). Осаживали сорбент универсальный центрифугированием при 12 000 об/мин. («MiniSpin», «Eppendorf») в течение 1 мин. Удаляли супернатант с помощью вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.
8. Добавляли к осадку 500 мкл Раствора для отмычки №2, перемешивали на вортексе до получения однородной суспензии. Осаживали сорбент

универсальный центрифугированием при 12000 об/мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. Удаляли супернатант с помощью вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

9. Повторяли пункт 8. Тщательно, не захватывая сорбент, удаляли жидкость полностью.

10. Помещали пробирки в термостат при температуре 60 °C на 10–15 мин для подсушивания. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

11. Добавляли в пробирки по 100 мкл буфера для элюции ДНК/РНК, ТЕ-буфера. Встряхивали на вортексе до получения однородной суспензии. Прогревали пробы при температуре 60 °C в течение 5 мин с закрытыми крышками. Пробы встряхивали каждые 2 мин.

12. Центрифугировали пробирки при 12000 об/мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержала очищенную НК. Проба готова к постановке ПЦР.

13. Зона 2. ПЦР проводили с использованием реагентов набора, с приготовленной реакционной смесью из расчета на одну пробу: 21 мкл разбавителя, 7 мкл реакционной смеси и 0,3 мкл Таq-полимеразы со следующими условиями ПЦР: 95 °C в течение 1 мин 30 с, затем 40 циклов при 95 °C 15 с, 60°C 30 с (считывание), 72 °C 40 с, используя каналы FAM/Green и HEX/Yellow.

14. Перемешивали смесь на вортексе и сбрасывали капли кратковременным центрифугированием.

15. Отбирали необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Вносили по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

16. Используя наконечники с фильтром, в подготовленные пробирки вносили:

а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл ДНК буфера;

б) в каждую пробирку для исследуемых проб вносят по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО.

17. Интерпретация результатов анализа. Данные, представленные в виде кривых накопления флуоресцентного сигнала, были проанализированы с использованием программного обеспечения прибора для проведения ПЦР в режиме реального времени, следуя инструкциям производителя.

Интерпретация результатов анализа. Анализ полученных данных, представленных в виде кривых накопления флуоресцентного сигнала, осуществляется с использованием программного обеспечения, интегрированного в прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени, согласно рекомендациям производителя.

Таблица 18 – Интерпретация результатов к набору ДНК «ВЕТСКРИН. СТАФИПОЛ» ООО НПФ «Литех»

Параметры	Ct FAM (Green) <i>Streptococcus species</i>	Ct HEX (Yellow) ЭВК	Результат
ПКО	< КЦ	< КЦ	Реакция прошла
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО-ПЦР	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Специфическая контаминация и контаминация ЭВК отсутствует.
	< КЦ	НЗ или > КЦ	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация ЭВК. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки после принятия антиконтаминационных мер.
Анализируемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Streptococcus species</i>
	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК <i>Streptococcus species</i>
	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца с этапа выделения. В случае неудовлетворительного результата рекомендуется сделать повторный забор материала.

Ст – пороговый цикл выхода, НЗ – нет значения (значение N/A или НД);

КЦ – конечный цикл.

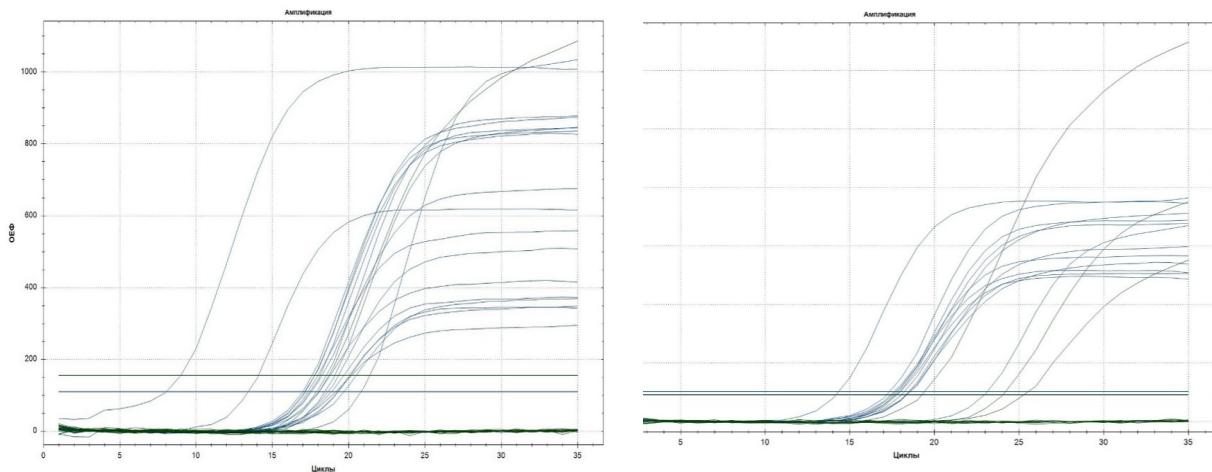


Рисунок 25 – Кинетические кривые положительных результатов анализа *Streptococcus spp.*(А) и *Staphylococcus spp.* (Б) методом ПЦР

Таблица 19 – Данные расчета ПЦР исследования с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» *Staphylococcus spp* полученные с амплификатором Bio-Rad CFX96

Лунка	Флуоресцентная детекция	Проба	Cq	Среднее Сq
A11	FAM	9	17,54	17,54
B02	FAM	2	19,68	19,68
B10	FAM	К-	Н/О	0,00
B11	FAM	10	18,43	18,43
C02	FAM	3	19,15	19,15
C10	FAM	ПК	20,81	20,81
C11	FAM	11	17,47	17,47
D02	FAM	4	17,33	17,33
D11	FAM	12	17,11	17,11
E02	FAM	5	18,63	18,63
E11	FAM	13	17,16	17,16
F02	FAM	6	19,27	19,27
F11	FAM	14	17,90	17,90
G02	FAM	7	18,87	18,87
G11	FAM	15	17,00	17,00
H02	FAM	8	18,05	18,05
H11	FAM	16	13,41	13,41
A02	HEX	1	н/о	0,00
A10	HEX	ОКО	н/о	0,00
A11	HEX	9	н/о	0,00
B02	HEX	2	н/о	0,00
B10	HEX	К-	н/о	0,00
B11	HEX	10	н/о	0,00
C02	HEX	3	н/о	0,00

Примечание: Сq – пороговый цикл амплификации, Значение Сq < 30 считается положительным результатом, Сq > 38 или «Н/О» (не определён) — отрицательный результат. ПК (положительный контроль), К- (контроль отрицательный), ОКО

(внутренний контрольный образец), FAM — флуоресцентный канал, используемый для детекции специфической ДНК *Streptococcus spp.*, HEX — второй флуоресцентный канал, используемый для детекции внутреннего контроля образца (ОКО)

Для выявления возбудителей *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus aureus* у свиней проводили ПЦР-анализ биоматериала, от разных возрастных групп свиней. Метод ПЦР в режиме реального времени позволил не только качественно определить наличие ДНК целевых микроорганизмов, но и количественно оценить уровень обсеменённости по значению порогового цикла (Ct), что имеет важное значение для прогнозирования инфекционного процесса и оценки риска передачи болезни. Результаты представлены в таблицах 20-21.

Таблица 20 - Данные ПЦР-анализа образцов лёгочной ткани от павших поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1	<i>Streptococcus spp.</i>	20	5	29,10
2	<i>S. aureus</i>	20	7	31,12

Примечание: если Ct \leq 27 соответствует высокому количеству антигена Ct \leq 30 среднему, Ct $>$ 30 низкому количеству антигена. Ct – пороговый цикл амплификации

Таблица 21 - Идентификация возбудителей методом ПЦР в смывах из носовой полости свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1	<i>Streptococcus spp.</i>	50	12	28,5
2	<i>S. aureus</i>	50	3	25,7

Примечание: если Ct \leq 27 соответствует высокому количеству антигена Ct \leq 30 среднему, Ct $>$ 30 низкому количеству антигена. Ct – пороговый цикл амплификации

Преимущество ПЦР заключается в том, что она позволяет проводить генетические исследования даже с небольшими количествами целевого биологического материала. Этот метод позволяет размножить любой фрагмент ДНК в течение двух или даже трех часов.

Полученные данные демонстрируют значимость использования ПЦР-РВ в комплексной диагностике стрептококковых и стафилококковых инфекций у свиней. Применение коммерческих тест-систем позволяет не только качественно, но и количественно оценить наличие возбудителя, что имеет важное значение для прогнозирования течения инфекционного процесса и оценки эффективности терапии.

Высокая чувствительность и специфичность метода обеспечивают надёжное выявление даже минимальных концентраций патогена в исследуемом материале. Важным условием получения достоверных результатов явилось соблюдение требований по организации лабораторного пространства, включая разделение на зоны проведения отдельных этапов исследования, что полностью соответствует действующим санитарно-эпидемиологическим нормам.

2.2.6. Диагностика методом LAMP

Для обнаружения специфических генетических фрагментов стрептококка и стафилококка применяют метод LAMP (петлевая изотермическая амплификация).

Принцип метода специфически, чувствительно и быстро амплифицирует нуклеиновые кислоты, используя фермент ДНК-полимеразу с высокой активностью замещения цепи и две пары праймеров, распознающих шесть независимых последовательностей целевого гена в изотермических условиях.

Анализ петлевой изотермической амплификации (LAMP) – это новый метод амплификации ДНК и РНК, обладающий высокой специфичностью, чувствительностью и простотой. Этот недавно разработанный инструмент просветил мир сегодняшней диагностики и изменил способы мониторинга инфекционных заболеваний. Как следует из названия реакция протекает при изотермической температуре, что является наибольшей заслугой теста. По сути, анализ состоит из инкубации смеси целевого гена вместе с шестью наборами целенаправленных праймеров (2 внутренних, 2 внешних, 2 петли), ДНК-полимеразой Bst и субстратами при оптимальной температуре (63–65 °C). Внутренние праймеры привносят самокомплементарность в продукт амплификации, вызывая образование петель, тогда как удлинение внешних праймеров вызывает смещение продления внутренних праймеров.

Благодаря экономической эффективности и чувствительности LAMP широко применяется для ветеринарных исследований и диагностики инфекционных заболеваний.

Применяются диагностические наборы: «Isothermal Master Mix» (США) для обнаружения *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, штаммов *Escherichia coli* O157, O26, O45, O103, O111, O121, O145 и *Streptococcus agalactiae*.

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569–09 «Организация работы лабораторий,

использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.

LAMP протекает непрерывно при поддержании температуры 65°C, что оптимально для Bst-полимеразы, так в реакционной смеси остаются свободные дНТФ и праймеры. При анализе кривых флуоресценции проводят определение порогового цикла реакций Ct, который не эквивалентен Ct ПЦР. Из-за лавинообразного накопления продуктов амплификации, трудно провести количественную оценку анализируемой мишени в образце.

Патологический материал отбирали следующим образом: Мазки (со слизистой носоглотки, ротоглотки) снимали с помощью стерильного зонда, зонд помещали в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора. Фрагменты тканей и органов – кусочки паренхиматозных органов размером 1 × 1 × 1 см (печень, легкие, селезенка), лимфатические узлы, фрагменты пораженных кожных покровов, мозг – отбирали в стерильные контейнеры.

Далее готовили исследуемые пробы для выделения ДНК. Пробы тканей и органов гомогенизировали с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовили 10 % суспензию на стерильном фосфатном буфере. Суспензию переносили в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали при 2 тыс. об/мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 5 мин. Супернатант использовали для экстракции НК.

Исследование состояло из следующих этапов:

1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
2. Изометрическая амплификация (LAMP) ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
3. Анализ и интерпретация результатов.

Молекулярные методы, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени, использовались для быстрой идентификации *S. aureus*.

Таблица 22 – Оценка результатов анализа LAMP с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		Результат	
FAM	HEX		
Отсутствует или определено	определенено Ct ≤ 50	Обнаружена ДНК <i>S. aureus</i>	
Определено меньше граничного, Ct ≤ 55	отсутствует	Не обнаружена <i>S. aureus</i>	
Отсутствует или определено больше граничного Ct > 55	Отсутствует или определено Ct > 50	Невалидный/Сомнительный Требуется повторное исследование	
<i>Результаты для контролей различных этапов исследований</i>			
Контроль	Контролируемый Этап LAMP-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора	
		FAM	HEX
ПК	LAMP	не учитывается	определенено Ct ≤ 35
ОК	Экстракция ДНК, LAMP	определенено Ct ≤ 50	отсутствует
К-	LAMP	отсутствует	отсутствует

В случае, если Ct на канале HEX определено Ct ≤ 50, а на канале FAM отсутствует или определено, а также когда Ct на канале HEX определено меньше граничного, Ct ≤ 55, а на канале HEX отсутствует – результаты можно считать достоверными. Если (Ct на канале HEX отсутствует или определено Ct > 50), необходимо провести повторное исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата, повторяем с этапа отбора материала.

Кинетическая кривая положительного результата LAMP -исследования с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» представлена на рисунке 26.

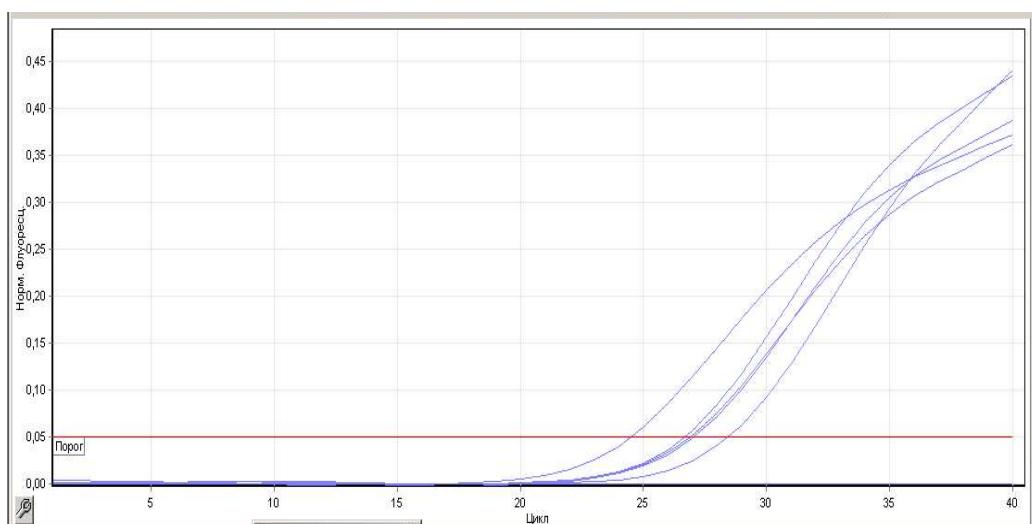


Рисунок 26 – Кинетическая кривая положительного результата анализа на *S. aureus* методом LAMP

Данные расчета результата LAMP исследований представлен в таблице 23.

Таблица 23 - Данные LAMP-анализа образцов лёгочной ткани от павших поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1	<i>S. pneumoniae</i>	20	2	30,20
2	<i>S. aureus</i>	20	7	31,10

Примечание: если Ct на канале HEX определено $Ct \leq 50$, а на канале FAM отсутствует или определено, а также когда Ct на канале HEX определено меньше граничного, $Ct \leq 55$, а на канале HEX отсутствует – результаты можно считать достоверными. Ct – пороговый цикл амплификации

Таблица 24 – Данные LAMP-анализа назальных смызов от свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1	<i>S. pneumoniae</i>	50	4	32,3
2	<i>S. aureus</i>	50	3	33,8

Примечание: если Ct на канале HEX определено $Ct \leq 50$, а на канале FAM отсутствует или определено, а также когда Ct на канале HEX определено меньше граничного, $Ct \leq 55$, а на канале HEX отсутствует – результаты можно считать достоверными. Ct – пороговый цикл амплификации

Все пробы показали положительную амплификацию в НЕХ-канале ($C_t \leq 35$), что свидетельствует о корректном проведении выделения ДНК и отсутствии ингибирования реакции.

Значения FAM-сигнала находились в диапазоне 31,10–33,8, что указывает на наличие специфической ДНК *S. aureus* в исследуемых образцах.

практику является ограниченная представленность на российском рынке реагентов и комплектующих для реакции LAMP, выпускаемых отечественными производителями. На данный момент основная часть необходимых компонентов импортируется, что делает метод более затратным и менее доступным для регулярного использования в государственных и частных лабораториях.

Таким образом, несмотря на потенциал LAMP как перспективной альтернативы ПЦР в ряде диагностических задач, для его массового внедрения требуется проведение дополнительных исследований по стандартизации протоколов, минимизации взаимодействия праймеров в мультиплексных системах, а также развитие отечественной промышленности, способной предложить качественные и экономически выгодные решения для реализации данного метода.

2.2.7. Аттестация коммерческого ПЦР-набора «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» для выявления ДНК *Streptococcus spp.* в условиях ветеринарной лаборатории

Оптимизация процесса верификации и валидации диагностического набора реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» (ООО НПФ «ЛИТЕХ») для выявления ДНК *Streptococcus spp.* включала стандартизацию процедур оценки его аналитических характеристик. В рамках работы были определены чёткие критерии оценки чувствительности, специфичности, точности и воспроизводимости теста, а также разработан план испытаний в соответствии с требованиями ГОСТ Р 70150-2022. Оценка проводилась с использованием контрольных образцов по ключевым параметрам ПЦР, предусмотренным инструкцией по применению тест-системы.

Оценка специфичности проводилась на наборах: «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК *Streptococcus spp.* методом полимеразной цепной реакции, набор реагентов «nzytech» для выявления ДНК *Streptococcus pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции и набор реагентов ООО «ДНК-Технология» для выявления ДНК *Streptococcus agalactiae* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. При обсуждении результатов работы названия тест-систем и их производителей закодировали.

Оценку специфичности *in vitro* проводили на следующих образцах ДНК стрептококков из государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК», находящихся в Кропотинской краевой ветеринарной лаборатории (таблица 25).

Таблица 25 – Штаммы стрептококков

№ п/п	Вид	Номер/Название штамма
1	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4826
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303 серотип 3	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-7397
3	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344 NCTC 8198	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4806

Отсутствие специфических реакций *in vitro* проводили на следующих образцах ДНК гетерологичных микроорганизмов из государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, находящихся в Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории (таблица 26).

Таблица 26 – Штаммы гетерологичных микроорганизмов

№ п/п	Название штамма	Номер
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P FDA 209-P	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4508
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4510
3	<i>Clostridium septicum</i>	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-7366
4	<i>Salmonella typhimurium</i> №79	ФГБУ «НЦЭСМП» 100035
5	<i>Enterobacter aerogenes</i> №10006 NCTC=№13047ATCC	ФГБУ «НЦЭСМП» 243542
6	<i>Yersinia enterocolitica</i> 287-II	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-3992
7	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4536
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-4916
9	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-6433
10	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 CCM 303	ГКПМ-ОБОЛЕНСК В-6498

Ложноотрицательные и ложноположительные результаты при анализе образцов отсутствовали.

При проверке стабильности работы наборов реагентов оценивали результат амплификации положительных и отрицательных контролей каждые 4 месяца в течении срока годности ПЦР-набора.

Для оценки устойчивости реагентов к температурным условиям транспортировки, рекомендованным производителем, а также к многократному размораживанию-оттаиванию набор делили на 3 аликовоты и согласно таблице 27 производили оценку устойчивости. По завершении

испытаний для каждого диагностического набора проводили сравнительные реакции амплификации положительных и отрицательных контролей.

Таблица 27 – Параметры оценки устойчивости ПЦР-набора

Параметры	1 аликвота (контрольная)	2 аликвота	3 аликвота
Условия и время хранения	Температура хранения, указанная в инструкции	В термоизолирующей пенопластовой коробке во льду в течение максимального срока транспортирования, указанного в инструкции	Проводят рассчитанное по формуле число циклов замораживания-оттаивания
Требования к постановке ПЦР	По три повтора отрицательного и положительного контроля.	По три повтора отрицательного и положительного контроля. Сравнивают контрольной аликвотой	По три повтора отрицательного и положительного контроля. Сравнивают с контрольной аликвотой

Каждый цикл замораживания и оттаивания включал 30 мин оттаивания при комнатной температуре и 60 мин замораживания при заявленной температуре хранения. После завершения процедур замораживания/оттаивания проводили амплификацию положительного контроля в трех повторах и отрицательного контроля.

Таблица 28 – Результаты расчета количества циклов тестируемых наборов

Наименование набора	Число исследований, заявленных в наборе	Количество циклов замораживания и оттаивания (N)
Набор №1	60	20
Набор №2	60	20
Набор №3	48	16

Стабильность реагентов для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени оценивали по значению коэффициента вариации значений Ct для

положительных образцов для контрольной и испытуемой аликвоты. Результаты испытаний представлены в таблицах 29-31.

Таблица 29 – Оценка стабильности набора №1

№ Повтора	ОКО		К-		ПКО	
	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX
1.Контрольная аликовта						
1	21,87				24,48	25,42
2	21,24				24,97	25,76
3	21,10				25,02	24,93
Ср. знач. Ct	21,40				24,82	25,37
Среднеквадратичное отклонение SD	0,41				0,30	0,42
Коэффициент вариации Cv, %	1,92				1,21	1,64
2. Вторая аликовта						
1	21,87				24,48	25,42
2	21,24				24,97	25,76
3	21,10				25,02	24,93
Контроли после транспортировки						
4	21,12				25,00	25,14
5	21,32				24,81	24,27
6	20,00				23,98	24,89
Ср. знач. Ct	21,11				24,71	25,07
Среднеквадратичное отклонение SD	0,61				0,41	0,51
Коэффициент вариации Cv, %	2,90				1,66	2,03
3.Третья аликовта						
1	21,12				25,00	25,42
2	21,32				24,81	25,76
3	20,00				23,98	24,93
Контроли после замораживания-оттаивания						
4	20,95				24,43	23,03
5	20,83				23,76	22,32
6	20,06				24,07	23,67
Ср. знач. Ct	20,71				24,34	24,19
Среднеквадратичное отклонение SD	0,55				0,49	1,39
Коэффициент вариации Cv, %	2,68				2,02	5,74

нуклеиновых кислот в пробе; К– (отрицательный контроль (без ДНК)), используется для контроля контаминации реактивов и оборудования; ПКО — положительный контрольный образец; аликвота 2 контрольные образцы после транспортировки при комнатной температуре; аликвота 3: контрольные образцы после трёх циклов замораживания–оттаивания. Ср. знач. Ct – рассчитано как среднее арифметическое из 3–6 повторностей; Среднеквадратичное отклонение (SD) отражает степень разброса значений Ct относительно среднего значения; Коэффициент вариации (Cv) вычислен как отношение SD к среднему значению Ct, выраженное в процентах, и используется для оценки воспроизводимости результата; FAM — флуоресцентный канал, предназначенный для детекции амплификации специфического генетического маркера возбудителя; HEX — второй флуоресцентный канал, используемый для регистрации сигнала внутреннего контроля.

Таблица 30 – Оценка стабильности набора №2

№ Повтора	ОКО		К-		ПКО	
	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX
1. Контрольная аликвота						
1	18,35				24,40	23,86
2	18,42				24,51	23,53
3	18,57				24,80	23,12
Ср. знач. Ct	18,45				24,57	23,50
SD	0,11				0,21	0,37
Cv, %	0,61				0,85	1,58
2. Вторая аликвота						
1	18,35				24,40	23,86
2	18,42				24,51	23,53
3	18,57				24,80	23,12
Контроли после транспортировки						
4	19,00				25,00	24,72
5	18,92				24,81	23,99
6	18,53				23,98	23,17
Ср. знач. Ct	18,63				24,58	23,73
SD	0,27				0,37	0,60
Cv, %	1,43				1,50	2,52
3. Третья аликвота						
1	18,35				24,40	23,86
2	18,42				24,51	23,53
3	18,57				24,80	23,12
Контроли после замораживания-оттаивания						
4	18,05				24,31	23,12
5	18,09				24,15	23
6	17,98				23,44	22,95
Ср. знач. Ct	18,24				24,27	23,26
SD	0,24				0,46	0,36

Cv, %	1,30				1,90	1,53
Примечание: ОКО - основная контрольная аликвота (исходный образец без дополнительных воздействий), используется как эталонный показатель стабильности нуклеиновых кислот в пробе; К- (отрицательный контроль (без ДНК)), используется для контроля контаминации реагентов и оборудования; ПКО — положительный контрольный образец; аликвота 2 контрольные образцы после транспортировки при комнатной температуре; аликвота 3: контрольные образцы после трёх циклов замораживания–оттаивания. Ср. знач. Ct – рассчитано как среднее арифметическое из 3–6 повторностей; Среднеквадратичное отклонение (SD) отражает степень разброса значений Ct относительно среднего значения; Коэффициент вариации (Cv) вычислен как отношение SD к среднему значению Ct, выраженное в процентах, и используется для оценки воспроизводимости результата; FAM — флуоресцентный канал, предназначенный для детекции амплификации специфического генетического маркера возбудителя; HEX — второй флуоресцентный канал, используемый для регистрации сигнала внутреннего контроля.						

Таблица 31 – Оценка стабильности набора №31

№ Повтора	ОКО		К-		ПКО	
	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX
1. Контрольная аликвота						
1	19,17				25,81	24,17
2	19,34				25,75	24,21
3	19,63				25,49	24,00
Ср. знач. Ct	19,38				25,68	24,13
SD	0,23				0,17	0,11
Cv, %	1,20				0,66	0,46
2. Вторая аликвота						
1	19,17				25,81	24,17
2	19,34				25,75	24,21
3	19,63				25,49	24,00
Контроли после транспортировки						
4	19,22				25,25	24,13
5	19,14				25,32	24,09
6	19,06				24,67	23,86
Ср. знач. Ct	19,26				25,38	24,08
SD	0,20				0,41	0,13
Cv, %	1,06				1,63	0,53
3. Третья аликвота						
1	19,17				25,81	24,17
2	19,34				25,75	24,21
3	19,63				25,49	24,00
Контроли после замораживания–оттаивания						
4	19,12				24,84	23,68
5	18,75				24,73	23,42
6	18,41				24,29	23,19

Ср. знач. Ст	19,07				25,15	23,78
SD	0,43				0,62	0,42
Cv, %	2,27				2,47	1,76

Примечание: ОКО - основная контрольная аликвота (исходный образец без дополнительных воздействий), используется как эталонный показатель стабильности нуклеиновых кислот в пробе; К- (отрицательный контроль (без ДНК)), используется для контроля контаминации реагентов и оборудования; ПКО — положительный контрольный образец; аликвота 2 контрольные образцы после транспортировки при комнатной температуре; аликвота 3: контрольные образцы после трёх циклов замораживания–оттаивания. Ср. знач. Ст – рассчитано как среднее арифметическое из 3–6 повторностей; Среднеквадратичное отклонение (SD) отражает степень разброса значений Ст относительно среднего значения; Коэффициент вариации (Cv) вычислен как отношение SD к среднему значению Ст, выраженное в процентах, и используется для оценки воспроизводимости результата; FAM — флуоресцентный канал, предназначенный для детекции амплификации специфического генетического маркера возбудителя; HEX — второй флуоресцентный канал, используемый для регистрации сигнала внутреннего контроля.

Оценка аналитической специфичности и чувствительности

Были сформированы контрольные образцы в виде панели, которая состояла из 3 положительных образцов, а также 10 отрицательных образцов, содержащих ДНК близкородственных целевому микроорганизму и других патогенов, которые могут вызвать у животного схожие клинические симптомы.

В качестве образцов панели использовались штаммы из государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России находящихся в ГБУ «ККВЛ» согласно таблице 23-24.

Панель для проверки специфичности тестировалась с помощью референсного ПЦР- набора. Из каждого образца контрольной панели проводили экстракцию ДНК и ПЦР в двух повторностях. Испытания проводились двукратно, в разные дни, разными операторами, на разных приборах.

Для определения чувствительности контрольная панель содержала 3 пробы 10-кратных разведений целевой последовательности ДНК в разном биологическом материале, указанном в инструкции по применению тест системы. Концентрация целевой ДНК в последнем разведении в панели была в

10 раз меньше заявленной чувствительности тест-системы. В качестве контрольных образцов использовались штаммы микроорганизмов, содержащие целевую ДНК с известной концентрацией. Испытания проводились двукратно, в разные дни, разными операторами, на разных приборах. Оценка результатов представлена в таблица 32-33.

Таблица 32 – Результаты аналитической специфичности Оператор №1

Компоненты и материалы	Набор №1		Набор №2		Набор №3	
	Канал детекции (значения Ct)		Канал детекции (значения Ct)		Канал детекции (значения Ct)	
	FAM/ Green	HEX/ Yellow	FAM/ Green	HEX/ Yellow	FAM/ Green	HEX/ Yellow
	ДНК	ЭВК	ДНК	ВКО	ДНК	ВКО
Кровь	-	-	-	-	-	-
Мазок	-	-	-	-	-	-
Пат.мат	-	-	-	-	-	-
Кровь с нагр.	27,32	27,89	24,14	20,91	24,32	20,25
Мазок с нагр.	27,69	28,75	29,43	22,75	26,27	20,51
Пат.мат. С нагр.	25,51	26,70	25,51	23,70	28,51	23,54
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	24,22	-	22,22	26,22	19,18
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303	-	25,40	-	21,40	27,29	20,21
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344 NCTC 8198	23,08	-	25,35	-	28,59	19,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P FDA 209-P	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> №79	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> №10006	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 287-II	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	-	-	-	-	-	-

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 CCM 303	-	-	-	-	-	-
OK	-	-	-	-	-	21,21
K-	-	-	-	-	-	-
K+	27,98	29,96	28,78	24,96	26,25	23,25

Примечание: FAM/Green — флуоресцентный канал, предназначенный для детекции специфического генетического маркера целевого микроорганизма; HEX/Yellow — второй флуоресцентный канал, используемый для регистрации сигнала внутреннего контроля (ВК); ДНК — значение Ct, полученное при детекции специфической ДНК исследуемого микроорганизма; ВКО/ЭВК — экзогенный внутренний контроль, добавленный в реакционную смесь для контроля возможного торможения ПЦР за счет ингибиторов, содержащихся в образце; Кровь, мазок, (патологический материал) — типы исследуемых биоматериалов; Кровь с нагр., мазок с нагр., патмат с нагр. — образцы, прошедшие термообработку (нагревание), применяемую как ускоренный метод выделения ДНК без использования набора для экстракции; OK — положительный контроль, используемый для проверки работоспособности реагентов и оборудования; K— отрицательный контроль, без добавления матричной ДНК, применяется для исключения контаминации; K+ — положительный контроль, включающий стандартную ДНК-матрицу, используется для контроля эффективности амплификации. Ct — цикл пороговой флуоресценции.

Таблица 33 – Результаты аналитической специфичности Оператор №2

№ п/п	Набор №1		Набор №2		Набор №3	
	Канал детекции (значения Ct)		Канал детекции (значения Ct)		Канал детекции (значения Ct)	
	FAM/ Green	HEX/ Yellow	FAM/ Green	HEX/ Yellow	FAM/ Green	HEX/ Yellow
	ДНК	ЭВК	ДНК	ВКО	ДНК	ВКО
Кровь	-	-	-	-	-	-
Мазок	-	-	-	-	-	-
Пат.мат	-	-	-	-	-	-
Кровь с нагр.	27,21	27,13	24,39	22,13	25,03	24,13
Мазок с нагр.	27,35	26,67	28,75	27,11	25,12	24,01
Пат.мат. С нагр.	24,74	24,24	26,42	24,09	24,53	23,89
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	23,12	-	25,14	25,71	22,33
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303	-	25,80	-	22,17	-	21,08
<i>Streptococcus</i>	24,25	-	26,42	-	27,76	20,53

<i>pyogenes</i> ATCC 12344 NCTC 8198						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P FDA 209-P	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> №79	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> №10006	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 287-II	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 CCM 303	-	-	-	-	-	-
OK	-	-	-	-	-	24,68
K-	-	-	-	-	-	-
K+	27,46	28,74	28,02	25,13	26,01	25,17

Примечание: FAM/Green — флуоресцентный канал, предназначенный для детекции специфического генетического маркера целевого микроорганизма; HEX/Yellow — второй флуоресцентный канал, используемый для регистрации сигнала внутреннего контроля (ВК); ДНК — значение Ct, полученное при детекции специфической ДНК исследуемого микроорганизма; ВКО/ЭВК — экзогенный внутренний контроль, добавленный в реакционную смесь для контроля возможного торможения ПЦР за счет ингибиторов, содержащихся в образце; Кровь, мазок, (патологический материал) — типы исследуемых биоматериалов; Кровь с нагр., мазок с нагр., патмат с нагр. — образцы, прошедшие термообработку (нагревание), применяемую как ускоренный метод выделения ДНК без использования набора для экстракции; OK — положительный контроль, используемый для проверки работоспособности реагентов и оборудования; K— — отрицательный контроль, без добавления матричной ДНК, применяется для исключения контаминации; K+ — положительный контроль, включающий стандартную ДНК-матрицу, используется для контроля эффективности амплификации. Ct — цикл пороговой флуоресценции.

Оценка результатов. У тест-систем с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени отсутствовали значения Ct (по каналам, определяющим амплификацию целевой ДНК) для образцов контрольной панели, не содержащих целевые фрагменты ДНК, и присутствовали соответствующие значения Ct для образцов, содержащих целевые фрагменты ДНК.

Чувствительность тест-систем считали соответствующей заявленным характеристикам так как получили положительные результаты ПЦР для всех повторов контрольных образцов с концентрацией, соответствующей заявленной.

В ходе валидации набора реагентов в различных сочетаниях форм выпуска, двух видов амплификаторов, мест и времени анализа, а также различными операторами, была проведена оценка прецизионности в условиях повторяемости и воспроизводимости. Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК стрептококков были установлены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Повторяемость и воспроизводимость были определены путем тестирования крови, мазка и патологического материала в которых предварительно не было выявлено ДНК стрептококков, а затем были добавлены синтетические положительные контроли из наборов реагентов, содержащих ДНК стрептококков, до конечных концентраций 1×10^4 и 1×10^6 ГЭ/мл – при этом каждый образец содержал одинаковую концентрацию ДНК возбудителя

Под повторяемостью подразумевалась степень схожести независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях: тестирование проводилось одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием идентичного оборудования в течение короткого временного интервала. Воспроизводимость же определялась как степень близости независимых результатов, полученных в стандартизованных условиях, но с участием разных операторов, в разные дни, с использованием различных комплектов оборудования и серий

реагентов. Исследования проводили согласно таблице 34. Результаты исследований представлены в таблицах 35-36.

Таблица 34 – Параметры оценки сходимости и воспроизводимости результатов

Параметры	Сходимость/повторяемость	Воспроизводимость
Условия проведения	Одним оператором на одном приборе в один день	Двумя операторами на разных приборах в разные дни
Состав постановки	2 постановки 10 повторов ПКО 10 повторов К-	2 постановки 10 повторов ПКО 10 повторов К-
Критерии анализа результатов	Cv не более 5% для 10 повторов (n=10)	Cv не более 5% для 10 повторов (n=10)

Примечание: Cv ≤ 5% для n=10 — установленный порог коэффициента вариации, характеризующий допустимую степень разброса значений Ct между повторностями. При соблюдении этого условия метод считается воспроизводимым и надёжным.

Таблица 35 – Оценка сходимости и воспроизводимости набор №1

№ Повтора	ПКО		ПКО 10 ⁻²		ДНК буфер	
	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX	Ct FAM	Ct HEX
Оператор 1, серия 1-1, постановка 1						
1	18,86	19,34	24,48	25,42	-	-
2	18,05	19,74	24,97	25,76	-	-
3	18,73	18,79	25,02	24,93	-	-
4	18,28	19,48	25,17	25,45	-	-
5	18,36	19,82	25,20	25,21	-	-
6	18,42	19,22	25,18	24,76	-	-
7	18,57	18,63	25,23	24,31	-	-
8	18,63	19,77	24,93	25,27	-	-
9	18,45	18,95	24,94	24,33	-	-
10	18,66	18,21	24,03	24,32	-	-
Cр. знач. Ct	18,50	19,20	24,91	24,98	-	-
SD	0,24	0,54	0,38	0,53	-	-
Cv, %	1,28	2,82	1,52	2,12	-	-
Оператор 2, серия 1-1, постановка 2						
1	18,95	19,45	24,61	25,30	0,33	-
2	18,56	20,00	24,03	25,42	0,35	-
3	18,28	18,32	24,40	25,84	0,38	-
4	18,10	19,07	24,51	25,14	0,35	-
5	18,68	18,08	24,80	24,27	0,36	-

6	18,60	19,18	25,02	24,89	0,34	-
7	18,55	19,45	25,19	24,84	0,36	-
8	19,00	18,12	24,71	24,55	0,36	-
9	18,05	18,48	25,07	24,84	0,39	-
10	18,05	18,01	24,33	24,66	0,35	-
Ср. знач. Ct	18,48	18,82	24,67	24,98	0,36	-
SD	0,35	0,70	0,36	0,46	0,02	-
Cv, %	1,90	3,73	1,47	1,84	4,95	-
Расчет Cv для 2x постановок						
Ср. знач. Ct	18,49	19,01	24,79	24,98	-	-
SD	0,29	0,64	0,38	0,48	-	-
Cv, %	1,58	3,37	1,55	1,93	-	-

Таблица 36 – Оценка сходимости и воспроизводимости набор №2

1	19,23	18,52	24,39	24,10	-	-
2	18,65	19,64	24,56	24,35	-	-
3	18,42	18,31	24,67	23,86	-	-
4	19,17	19,01	25,72	24,73	-	-
5	18,96	18,11	25,01	24,69	-	-
6	18,75	18,54	24,13	23,96	-	-
7	19,01	19,45	24,99	24,77	-	-
8	18,99	18,02	24,65	24,49	-	-
9	19,12	19,10	25,01	24,62	-	-
10	18,88	18,04	24,43	24,07	-	-
Cр. знач. Ст	18,92	18,67	24,76	24,36	-	-
SD	0,25	0,59	0,45	0,34	-	-
Cv, %	1,33	3,17	1,81	1,41	-	-

Расчет Cv для 2х постановок

Ср. знач. Ст	19,12	18,86	24,86	24,46	-	-
SD	0,33	0,60	0,50	0,42	-	-
Cv, %	1,72	3,16	2,00	1,72	-	-

Примечание: ПКО (положительный контроль), ПКО 10^{-2} разведённый положительный контроль (разведение 1:100), применяемый для проверки чувствительности и стабильности результатов при низкой концентрации матрица; ДНК буфер — образец, содержащий только ДНК в буферном растворе без биологического материала, используемый для оценки стабильности внутреннего контроля и качества реагентов, Ct — цикл пороговой флуоресценции; FAM — канал детекции специфического генетического маркера возбудителя; HEX — канал регистрации сигнала внутреннего контроля; Ср. знач. Ct — среднее значение цикла пороговой флуоресценции, рассчитанное из 10 повторностей; SD (среднеквадратичное отклонение) — показатель разброса значений Ct относительно среднего; Cv (%) — коэффициент вариации, выраженный в процентах; Cv $\leq 5\%$ — высокая воспроизводимость; Cv $> 5\%$ — возможные нарушения в подготовке пробы, снижение качества реагентов или технические погрешности.

Оценку сходимости результатов ПЦР наборов рассчитывали по коэффициенту вариации значений Ct(V). Полученные результаты являются сходимыми, так как коэффициент вариации (Cv) не превышает 5%.

Оценку воспроизводимости ПЦР наборов, также рассчитывали по коэффициенту вариации значений Ct(V). Полученные результаты являются воспроизводимыми, так как коэффициент вариации (Cv) не превышает 10%.

В заключение следует отметить, что чувствительность и групповой эффект оцениваемых наборов немного различались для разных целей. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что случаи с подозрением на стрептококковую инфекцию с низкой концентрацией ДНК или на начальных

стадиях заражения должны быть исследованы с использованием различных наборов для выявления стрептококков. Кроме того, с увеличением количества коммерческих наборов для диагностики стрептококка свиней исследователям необходимо обмениваться такой информацией, как методы сравнения многоцентровых наборов и возможности обнаружения различных коммерческих диагностических наборов ПЦР-РВ среди разных образцов.

После проведения аттестации коммерческого набора был сформирован акт верификации для допуска к работе в ветеринарной лаборатории диагностического набора реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК *Streptococcus spp*, который представлен в Приложении.

2.2.8 Лечение стрептококкоза и стафилококкоза свиней

В рамках исследования оценивалась эффективность традиционных схем лечения и нового ветеринарного препарата 5% раствор энтрикима при стрептококковой и стафилококковой инфекции у свиней. Особое внимание уделялось клиническому течению заболевания, показателям эпизоотического процесса и результатам лабораторных исследований.

В эксперимент были включены поросыта в возрасте от 1 до 4 месяцев с острым и подострым течением стрептококкоза. За животными велось постоянное клиническое наблюдение для оценки динамики заболевания.

В ходе исследования ключевое внимание уделялось динамике эпизоотологических показателей – в частности, уровню заболеваемости, частоте летальных исходов и общей смертности.

Для объективной оценки состояния животных до и после терапевтического курса были выполнены комплексные лабораторные анализы, включая молекулярно-генетические, бактериологические, гематологические и биохимические исследования.

Исследования проводили при первичном осмотре и через 7 дней после окончания лечения.

У животных, отобранных для экспериментального лечения, были выявлены выраженные признаки системного воспалительного процесса. Все особи демонстрировали снижение активности, отсутствие интереса к корму, поверхностное и ускоренное дыхание. Температура тела превышала физиологические нормы (до 41–42°C), пульс учащен (до 120–140 ударов/мин). Характерным симптомом стало наличие серозно-геморрагического отделяемого бурого оттенка из носовых путей, наблюдавшегося с обеих сторон.

Аускультация органов дыхания выявила патологические изменения в легких: усиление везикулярного дыхания с элементами крепитации, а также влажные хрипы крупнопузырчатого типа, свидетельствующие о воспалении альвеол и бронхов. При перкуссии грудной клетки отмечались участки

притупленного звука, указывающие на инфильтрацию легочной ткани или наличие экссудата.

Для объективной оценки микробной обсеменённости и выбора эффективной терапии проведено бактериологическое исследование проб, взятых у поросят до начала лечения. Исследование включало выявление основных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов *S. suis*, *S. pneumoniae*, *S. zooepidemicus* и *S. aureus*.

Положительным результатом считали выделение чистой культуры в концентрации не менее 10^3 КОЕ/мл, что указывает на клиническую значимость микроорганизма.

В таблице 37 представлены данные по частоте выявления указанных микроорганизмов в пределах одного свиноводческого хозяйства, неблагополучного по бактериальным инфекциям.

Таблица 37 – Результаты бактериологического исследования проб у поросят до начала лечения

Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов ($\geq 10^3$ КОЕ/мл)*	Процент положительных результатов (%)
<i>S. suis</i>	50	13	26%
<i>S. pneumoniae</i>		17	34%
<i>S. zooepidemicus</i>		1	4%
<i>S. aureus</i>	50	30	60%
Общий итог животных по стрептококкозу	50	31	62%
Общий итог животных по стафилококкозу	50	30	60%
Примечание: Положительным результатом считалось выделение чистой культуры микроорганизма в концентрации не менее 10^3 КОЕ/мл			

Для верификации этиологического фактора у поросят с клинически подозрением на бактериальную инфекцию проводили лабораторное обследование с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Исследование направлено на выявление специфических ДНК-маркеров возбудителей — *Streptococcus spp.* (при подозрении на стрептококкоз) и *Staphylococcus spp.* (при подозрении на стафилококкоз).

Результаты ПЦР-диагностики подтвердили высокую степень специфичности и чувствительности метода в условиях хозяйства, неблагополучного по данным заболеваниям. Данные о результатах ПЦР-обнаружения патогенов у обследованных животных представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Результаты выявления ДНК *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* методом ПЦР у поросят с клиническими признаками бактериальной инфекции до лечения

Группа поросят	Количество животных (n)	Положительный результат ПЦР	Процент положительных результатов (%)	Ct Green (FAM)*	Ct Yellow (HEX)*
<i>Streptococcus spp.</i>					
Подострая форма	25	20	80%	$33,5 \pm 2,1$ <КЦ	> КЦ
Хроническая форма	25	11	44%	$32,8 \pm 3,2$ <КЦ	> КЦ
Итого	50	31	62%	-	
<i>Staphylococcus spp.</i>					
Подострая форма	25	17	68%	$32,6 \pm 2,1$ <КЦ	> КЦ
Хроническая форма	25	13	52%	$31,2 \pm 3,0$ <КЦ	> КЦ
Итого	50	30	60%	-	-

Примечание: N/A – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано, КЦ – конечный цикл. Положительный результат: Ct Green (FAM) <КЦ и Ct Yellow (HEX) > КЦ или N/A; Отрицательный результат :Ct Green (FAM) > КЦ или N/A Ct Yellow (HEX) > КЦ или N/A.

У поросят с верифицированным стрептококкозом и стафилококкозом (подтверждено бактериологическим методом и ПЦР) брали кровь из вены для многофакторного анализа системного ответа организма.

Исследования включали оценку гематологического профиля форменных элементов (эритроциты и лейкоциты) и биохимические показатели.

Лабораторный анализ крови поросят с подтвержденным диагнозом стрептококкоз и стафилококкоз продемонстрировал выраженные различия в гематологических параметрах, коррелирующие со стадией заболевания.

У животных с подострой формой стрептококкоза уровень лейкоцитов составил $18,0 \pm 2,1 \times 10^9/\text{л}$ (превышение нормы в 1,2 раза), тогда как у особей с хронической формой зафиксировано снижение до $12,5 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$, что находилось в пределах верхней границы нормы. Ускорение СОЭ в подострой форме ($30 \pm 4 \text{ мм}/\text{ч}$) указывало на активное воспаление, однако в хронической форме этот показатель достиг $45 \pm 6 \text{ мм}/\text{ч}$, превышая норму в 3 раза и подчеркивая устойчивый характер воспалительного процесса.

При анализе данных у поросят с стафилококкозом выявлены схожие, но более выраженные изменения. У животных с острой формой стафилококкоза отмечено значительное повышение лейкоцитоза — $20,3 \pm 2,5 \times 10^9/\text{л}$, то есть превышение верхней границы нормы на 35,3%. Это свидетельствует о мощном системном воспалительном ответе на воздействие стафилококковых токсинов. Уровень СОЭ также был повышен ($40 \pm 5 \text{ мм}/\text{ч}$), что говорит о ранней активации острофазных белков и интенсивном воспалении.

При хронической форме стафилококкоза наблюдалось некоторое снижение лейкоцитов по сравнению с острой фазой, однако их уровень оставался выше средних значений — $14,7 \pm 2,1 \times 10^9/\text{л}$, что указывает на сохраняющийся патологический процесс. СОЭ возрастала до $55 \pm 6 \text{ мм}/\text{ч}$, что демонстрировало развитие устойчивого воспаления с вовлечением соединительной ткани и формирование иммунопатологических реакций.

Таким образом, оба заболевания — стрептококкоз и стафилококкоз — имеют сходные патофизиологические механизмы, проявляющиеся в активации воспалительного ответа и изменении клеточных элементов крови. Однако при стафилококковой инфекции отмечаются более выраженные отклонения, особенно на ранних этапах болезни.

Результаты анализа крови поросят с подострой и хронической формами стрептококкоза и стафилококкоза до лечения представлены в таблицах 39-40.

Таблица 39 – Гематологические показатели крови поросят с подострой и хронической формами стрептококкоза и стафилококкоза до лечения (n=100)

Гематологические показатели крови поросят больных стрептококкозом			
Параметр	Подострая форма Ср.*($M\pm m$)	Хроническая форма Ср.*($M\pm m$)	Нормативное значение для свиней**
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	18,0 \pm 2,1	12,5 \pm 1,5	10–15
Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$)	5,0 \pm 0,6	4,2 \pm 0,5	5,5–8,0
Гемоглобин (г/л)	110 \pm 8	90 \pm 7	120–140
СОЭ (мм/ч)	30 \pm 4	45 \pm 6	5–15
Нейтрофилы (%)	65 \pm 4	50 \pm 3	30–50
Лимфоциты (%)	22 \pm 3	38 \pm 4	35–55
Гематологические показатели крови поросят больных стафилококкозом			
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	20,3 \pm 2,5	14,7 \pm 2,1	10–15
Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$)	4,2 \pm 0,3	3,6 \pm 0,4	5,5–8,0
Гемоглобин (г/л)	90 \pm 7	72 \pm 6	120–140
СОЭ (мм/ч)	40 \pm 5	55 \pm 6	5–15
Нейтрофилы (%)	70 \pm 5	54 \pm 4	30–50
Лимфоциты (%)	18 \pm 3	34 \pm 3	35–55

Примечание: Ср.*($M\pm m$) — среднее значение \pm стандартное отклонение.
 **Нормативные значения для свиней взяты из общепринятых референсных интервалов, указанных в методических указаниях, которые используются в Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории.

Подострая форма стрептококкоза характеризовалась активацией острофазного ответа, что проявлялось лейкоцитозом ($18,0\pm2,1\times 10^9/\text{л}$), превышающим верхнюю границу нормы на 20%. Увеличение количества нейтрофилов до $65\pm4\%$ (норма 30–50%) указывает на доминирование фагоцитарной активности и мобилизацию гранулоцитов для нейтрализации бактериальных токсинов. В этой фазе отмечалась лимфопения ($22\pm3\%$, норма 35–55%), обусловленная угнетением Т-клеточного звена иммунитета под действием кортизола и провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α). Уровень эритроцитов снижался до $5,0\pm0,6\times 10^{12}/\text{л}$ (на 9,1% ниже нормы), что связано с гемодилюцией и ранними признаками анемии воспаления. Гемоглобин (110 ± 8 г/л) также был снижен, но не достигал критических значений, что отражало обратимость процесса при своевременной терапии.

В хронической форме стрептококкоза наблюдалось снижение лейкоцитов до $12,5 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$, что находилось в пределах верхней границы нормы ($10\text{--}15 \times 10^9/\text{л}$), однако ниже уровня подострой формы. Это указывало на переход от острого воспаления к более длительному течению с относительной нормализацией клеточного ответа при сохранении патогенного фактора. Эритроциты были значительно снижены — $4,2 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л}$, что на 23,6% ниже нижней границы нормального диапазона ($5,5\text{--}8,0 \times 10^{12}/\text{л}$). Снижение количества эритроцитов связано с развитием анемии воспаления, вызванной угнетением эритропоэза и нарушением метаболизма железа. Гемоглобин также был снижен — $90 \pm 7 \text{ г/л}$ (норма: $120\text{--}140 \text{ г/л}$), что соответствовало умеренной гипохромной анемии. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) была значительно повышена — $45 \pm 6 \text{ мм/ч}$ (норма: $5\text{--}15 \text{ мм/ч}$). Нейтрофилы находились на уровне $50 \pm 3\%$ (норма: 30—50%), что ниже показателя подострой формы, но оставались на верхней границе нормы. Это говорило о частичном восстановлении баланса лейкоцитарного звена, хотя нейтрофильная реакция продолжала играть роль в контроле инфекции. Лимфоциты были повышенны до $38 \pm 4\%$ (норма: 35—55%), что указывало на вовлечение адаптивного иммунитета в ответ на длительно текущую инфекцию. Однако уровень лимфоцитов не достигал значений, достаточных для эффективной антибактериальной защиты, что говорило о частичном иммунодефиците или дисрегуляции Т-клеточного ответа.

Подострая форма стафилококкоза сопровождалась выраженной активацией системного воспалительного ответа, что подтверждалось значительным лейкоцитозом — $20,3 \pm 2,5 \times 10^9/\text{л}$, превышающим верхнюю границу нормы на 35,3%. Увеличение доли нейтрофилов до $70 \pm 5\%$ (норма 30—50%) указывает на интенсивную мобилизацию гранулоцитов для борьбы с патогеном и его токсинами. Одновременно наблюдалась выраженная лимфопения — $18 \pm 3\%$ (ниже нижней границы нормы на 48%), обусловленная выбросом глюкокортикоидов и провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α), подавляющих Т-клеточное звено иммунитета.

Уровень эритроцитов снижался до $4,2 \pm 0,3 \times 10^{12}/\text{л}$, что на 23,6% ниже средних физиологических значений, а гемоглобин составлял $90 \pm 7 \text{ г/л}$, что также находилось за пределами нормального диапазона. Эти изменения отражают развитие ранней стадии анемии воспаления, связанной с нарушением утилизации железа и угнетением эритропоэза.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) была значительно повышена — $40 \pm 5 \text{ мм/ч}$ (норма 5–15 мм/ч), что служит маркером активации острофазных белков и выраженного воспалительного процесса.

При хронической форме стафилококкоза выявлены более глубокие изменения: уровень лейкоцитов снижался до $14,7 \pm 2,1 \times 10^9/\text{л}$, однако оставался выше нормы на 22%, что указывает на сохраняющийся воспалительный процесс. Продолжалось снижение эритроцитов до $3,6 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л}$ (на 34,5% ниже нормы) и гемоглобина до $72 \pm 6 \text{ г/л}$ (на 40% ниже нормальных показателей), что соответствует развитию выраженной гипохромной анемии.

СОЭ достигала $55 \pm 6 \text{ мм/ч}$, что свидетельствует о длительно текущем воспалении и повышенной концентрации острофазных белков. Отмечено увеличение доли лимфоцитов до 34±3%, что может быть связано с переходом на адаптивный иммунный ответ при затяжном течении болезни. Количество нейтрофилов снижалось до 54±4%, что говорит о частичной нормализации клеточного иммунитета, хотя воспаление продолжало сохраняться.

Таблица 40 – Биохимические показатели крови поросят с подострой и хронической формами стрептококкоза и стафилококкоза свиней до лечения ($n=100$)

Биохимические показатели крови поросят больных стрептококкозом			
Параметр	Подострая форма Результат анализа Ср.*($M \pm m$)	Хроническая форма Результат анализа Ср.*($M \pm m$)	Нормативное значение для свиней**
АСТ (Ед/л)	92 ± 14	60 ± 10	15–45
АЛТ (Ед/л)	85 ± 12	50 ± 8	10–40
Креатинин (мкмоль/л)	120 ± 15	160 ± 20	80–110
Мочевина (ммоль/л)	$6,2 \pm 1,1$	$5,0 \pm 0,8$	2,5–5,0
Общий белок (г/л)	72 ± 5	65 ± 4	60–80
Глобулины (г/л)	40 ± 5	40 ± 4	25–35

Фибриноген (г/л)	$5,8 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,5$	2,0–4,0
Альбумин (г/л)	32 ± 3	25 ± 2	35–45
Биохимические показатели крови поросят больных стафилококкозом			
АСТ (Ед/л)	95 ± 15	62 ± 10	15–45
АЛТ (Ед/л)	88 ± 13	52 ± 9	10–40
Креатинин (мкмоль/л)	125 ± 16	165 ± 22	80–110
Мочевина (ммоль/л)	$6,5 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,9$	2,5–5,0
Общий белок (г/л)	74 ± 6	66 ± 5	60–80
Глобулины (г/л)	42 ± 6	41 ± 5	25–35
Фибриноген (г/л)	$6,0 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,6$	2,0–4,0
Альбумин (г/л)	32 ± 3	24 ± 2	35–45

Примечание: Ср.*($M \pm m$) — среднее значение \pm стандартное отклонение.
**Нормативные значения для свиней взяты из общепринятых референсных интервалов, указанных в методических указаниях, которые используются в Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории.

Уровень фибриногена в подострой форме составлял $5,8 \pm 0,7$ г/л (норма 2,0–4,0), превышая верхнюю границу нормы в 1,45 раза. Это указывало на интенсивную продукцию острофазных белков печенью в ответ на провоспалительные цитокины (IL-6, TNF- α) и повышенный риск гиперкоагуляции. В хронической форме уровень фибриногена снижался до $4,0 \pm 0,5$ г/л, находясь на верхней границе нормы, что свидетельствует о переходе к компенсированному воспалению с сохранением минимальной активации коагуляционного каскада.

Содержание альбуминов в подострой форме было 32 ± 3 г/л (норма 35–45), что на 26% ниже средней нормы. Снижение обусловлено угнетением гепатоцитов под действием цитокинов и начальными признаками почечной потери. В хронической форме альбумины достигали 25 ± 2 г/л, снижение на 44%, что указывает на прогрессирование гепатоцеллюлярной дисфункции и усиление протеинурии.

Уровень глобулинов в обеих формах оставался стабильно повышенным: 40 ± 5 г/л (подостроя) и 40 ± 4 г/л (хроническая), превышая среднюю норму (25–35 г/л) на 54%. Это связано с активацией продукции специфических антител (IgG) и секрецией провоспалительных цитокинов.

Общий белок в подострой форме находился в пределах нормы (72 ± 5 г/л, норма 60–80), что обусловлено компенсацией за счет повышения глобулинов.

В хронической фазе уровень снижался до 65 ± 4 г/л, что на 18,7% ниже верхней границы нормы, связано с истощением альбуминов и ограничением ресурсов печени.

АСТ в подострой форме – 92 ± 14 Ед/л превышал верхнюю границу в 2,1 раза, в хронической форме — 60 ± 10 Ед/л, превышал норму в 1,3 раза, что могло указывать на умеренное повреждение печени.

АЛТ в подострой форме — 85 ± 12 Ед/л (норма 10–40), был превышен в 2,1 раза, в хронической форме — 50 ± 8 Ед/л, был превышен в 1,2 раза, что отражало сохраняющийся, но менее выраженный гепатоцеллюлярный стресс.

Креатинин в подострой форме превышал норму на 9,1% 120 ± 15 мкмоль/л (норма 80–110), в хронической форме 160 ± 20 мкмоль/л, превышение на 45,5%, что могло коррелироваться с прогрессированием почечной недостаточности.

Мочевина в подострой форме превышала норму на 24% $6,2\pm1,1$ ммоль/л (норма 2,5–5,0), легкая азотемия была обусловлена дегидратацией, катаболизмом тканей и снижением клубочковой фильтрации, в хронической форме $5,0\pm0,8$ ммоль/л, это указывало на нормализацию на верхней границе и было связано с восстановлением водно-электролитного баланса.

Уровень фибриногена при подострой форме стафилококкоза составлял $6,0\pm0,8$ г/л (норма 2,0–4,0), превышая верхнюю границу нормы в 1,5 раза. При хронической форме уровень фибриногена снижался до $4,2\pm0,6$ г/л, оставаясь на верхней границе нормального диапазона. Это говорило о переходе к относительно стабильному состоянию воспаления с сохранением минимальной активации коагуляционного каскада, что может быть связано с адаптацией организма к длительному патологическому процессу.

Содержание альбуминов в подострой форме составляло 32 ± 3 г/л (норма 35–45), то есть было ниже средней нормы на 28,9%. Снижение уровня альбуминов обусловлено угнетением синтетической функции печени под действием воспалительных медиаторов, а также начальными проявлениями протеинурии. В хронической форме альбумины достигли значения 24 ± 2 г/л —

снижение на 47% по сравнению со средними нормативными данными. Это указывает на прогрессирование гепатоцеллюлярной дисфункции, истощение резервов печени и значительные потери белка через почки, что могло быть связано с развитием нефропатии на фоне длительного воспаления.

Уровень глобулинов оставался стабильно повышенным в обеих формах: 42 ± 6 г/л при подострой форме и 41 ± 5 г/л при хронической, что превышало верхнюю границу нормы ($25\text{--}35$ г/л) на 57,1% и 55,7% соответственно. Такое изменение отражало активную секрецию специфических иммуноглобулинов (IgG), а также накопление острофазных белков, индуцированных цитокинами (IL-1, IL-6, TNF- α).

Общий белок при подострой форме находился в пределах верхней границы нормы – 74 ± 6 г/л (норма 60–80). Это было связано с компенсаторным повышением доли глобулинов, которое нивелировало снижением альбуминов. При хронической форме уровень общего белка снижался до 66 ± 5 г/л, что на 17,5% ниже верхней границы нормы. Такое снижение свидетельствовало об истощении белково-синтезирующей способности печени и недостаточности компенсаторных механизмов, что могло отрицательно влиять на онкотическое давление плазмы и иммунный ответ.

Активность АСТ при подострой форме составляла 95 ± 15 Ед/л (норма 15–45), превышая верхнюю границу нормы в 2,1 раза. При хронической форме уровень фермента снижался до 62 ± 10 Ед/л, превышая норму в 1,4 раза. Эти изменения указывали на выраженный гепатоцеллюлярный стресс и повреждение миокарда или скелетных мышц на ранних этапах болезни, с последующей частичной нормализацией при переходе к хронической фазе.

АЛТ при подострой форме был равен 88 ± 13 Ед/л, превышая норму (10–40) в 2,2 раза, что являлось маркером гепатоцеллюлярного повреждения. При хронической форме активность АЛТ составила 52 ± 9 Ед/л, превышая норму в 1,3 раза, что указывало на сохраняющийся, но менее выраженный стресс печени, связанный с длительным воспалением и нарушением регенераторных процессов.

Креатинин при подострой форме был повышен до 125 ± 16 мкмоль/л (норма 80–110), что превышало верхнюю границу нормы на 13,6%. Это могло говорить о начальных признаках почечной дисфункции, связанной с дегидратацией, эндотоксинемией или системным воспалением. При хронической форме уровень креатинина возрастал до 165 ± 22 мкмоль/л — превышение на 50%, что свидетельствовало о прогрессировании почечной недостаточности, возможном развитии тубулярной дисфункции и необходимости коррекции водно-электролитного баланса.

Мочевина при подострой форме составляла $6,5\pm1,2$ ммоль/л (норма 2,5–5,0), превышая верхнюю границу на 30%. Это указывало на развитие легкой степени азотемии, которая могла быть обусловлена катаболизмом тканей, дегидратацией и снижением клубочковой фильтрации. При хронической форме уровень мочевины снижался до $5,2\pm0,9$ ммоль/л, оставаясь на верхней границе нормы, что могло свидетельствовать о восстановлении функции почек или компенсации за счёт усиленного канальцевого реабсорбирования.

После выявления у поросят клинических признаков системного воспаления и подтверждения диагноза стрептококкоз и стафилококкоз, мы приступили к разработке и сравнению двух терапевтических подходов: стандартной схемы лечения и нового ветеринарного препарата 5% раствор энтрикима.

Стандартная схема лечения включала комбинированную антибиотикотерапию с использованием пенициллина G (натриевая соль) и окситетрациклина (5% раствор). Препараты применялись внутримышечно в следующих дозировках:

Пенициллин G: 20 000 ЕД/кг массы тела, 2 раза в день, курс 7 дней.

Окситетрациклин (5% раствор): 20 мг/кг массы тела, 1 раз в день, курс 7 дней.

Целью данного сравнения служило обоснованность выбора наиболее эффективного метода лечения с учетом клинической динамики, лабораторных показателей и экономической целесообразности.

Согласно нормативно-технической документации (СТО 9364-001-072501001-2016), разработанной ООО НПФ «АЛИСА», ветеринарный препарат 5% раствор энтрикима в форме раствора для перорального применения推薦ован к использованию при широком спектре бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных. Препарат применяю для сельскохозяйственной птицы при колибактериозе, сальмонеллёзе, пастереллёзе, инфекционном синовите, респираторном микоплазмозе, бордепеллиозе, инфекционном рините, стафилококкозе. У свиней показаниями к применению являются атрофическом ринит, дизентерия, энзоотическая пневмония свиней, синдром мастит-метрит-агалактия, некротическом энтерите, гемофилезе, кампилобактерийном гепатите, микоплазмозе, а также ассоциированные бактериальные инфекции.

Для определения оптимальной дозы препарата 5% раствор энтрикима, обеспечивающей максимальную терапевтическую эффективность при минимальных побочных эффектах, было проведено исследование на группе из 18 поросят.

Исследуемые животные были распределены следующим образом:

- 9 поросят с клинически и лабораторно подтверждённым стрептококкозом;
- 9 поросят с диагнозом с клинически и лабораторно подтверждённым стафилококкозом.

Каждая группа была разделена на 3 подгруппы по 3 головы, получавших препарат в разных дозах и режимах применения. Это позволило оценить лечебное действие препарата при различных концентрациях и длительности курса. Данные по подбору оптимальной дозы представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Подбор оптимальной дозы препарата 5% раствор энтрикима для лечения стрептококкоза и стафилококкоза у поросят

Группа животных (n=3 в каждой группе)	Режим применения и способы введения	Курс лечения	Доза препарата на 1 кг массы тела	Терапевтическая эффективность %
Лечение стрептококкоза				
1	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и давали с кормом один раз в день.	3 дня	2 см ³ /1 кг массы тела	10%
2	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	5 дней	2 см ³ /1 кг массы тела	25%
3	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	7 дней	4 см ³ /1 кг массы тела	85%
Лечение стафилококкоза				
4	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и скармливали с кормом один раз в день.	3 дня	2 см ³ /1 кг массы тела	0%
5	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	5 дней	2 см ³ /1 кг массы тела	30%
6	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	7 дней	4 см ³ /1 кг массы тела	80%

В ходе проведённого исследования выявлено, что доза 2 см³/1 кг массы тела, применяемая в течение 3–5 дней, обеспечивает минимальный клинический эффект — от 0 до 30%. Это связано с тем, что при данной дозе не достигается терапевтическая концентрация в крови и тканях. Курс лечения менее 7 дней не позволяет достичь накопительного эффекта, особенно при системных формах инфекции.

Оптимальным режимом применения стало увеличение дозы до 4 см³/1 кг массы тела в сочетании с курсом лечения не менее 7 дней, что позволило добиться высокой терапевтической эффективности (80–85%).

Данный результат можно объяснить следующими фармакокинетическими и фармакодинамическими механизмами:

- Увеличенная доза способствует достижению и поддержанию эффективной плазменной концентрации препарата;
- Пролонгированный курс лечения (7 дней) обеспечивает достаточное время действия на бактериальную популяцию;
- Комбинация энрофлоксацина и тилмикозина фосфата усиливает антибактериальный эффект за счёт воздействия на разные этапы жизнедеятельности микроорганизма: энрофлоксацин ингибирует ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, тогда как тилмикозин фосфат угнетает синтез белка на уровне 50S-субъединицы рибосом.

Препарат лучше усваивался при введении через питьевую воду, что позволяет рекомендовать этот способ как предпочтительный.

Препарат хорошо переносился животными, клинических признаков интоксикации или аллергических реакций выявлено не было.

Для объективной оценки терапевтической эффективности нового ветеринарного препарата 5% раствор энтрикима и стандартной схемы антибактериальной терапии исследование проведено на 60 поросятах, находящихся в хозяйстве, неблагополучном по бактериальным инфекциям.

Животные были рандомизированы и разделены на четыре равные группы по 15 голов в каждой. Группы формировались с учётом возраста, массы

тела и клинической выраженности заболевания. Все животные находились в аналогичных условиях содержания и кормления.

Группа 1 (опытная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом стрептококковая инфекция. Для лечения использовали новый ветеринарный препарат 5% раствор энтрикима, в дозе 4 см³/1 кг массы тела, курс лечения — 7 дней;

Группа 2 (контрольная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом стрептококковая инфекция. Для лечения использовали общепринятую схему, принятую в хозяйстве, которая включала в себя применение антибиотиков широкого спектра действия в рекомендованных производителем дозах в течение 5–7 дней;

Группа 3 (опытная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом стафилококковая инфекция. Для лечения использовали новый ветеринарный препарат 5% раствор энтрикима, в дозе 4 см³/1 кг массы тела, курс лечения — 7 дней;

Группа 4 (контрольная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом стафилококковая инфекция. Для лечения использовали общепринятую схему, принятую в хозяйстве, которая включала в себя применение антибиотиков широкого спектра действия в рекомендованных производителем дозах в течение 5–7 дней.

Эффективность проведенного лечения представлена в таблице 42.

Таблица 42 – Эффективность лечения стрептококкоза и стафилококкоза

Показатель	Группа	
	Опытная	Контрольная
Препараторы	5% раствор энтрикима	Стандартная схема лечения
Лечение стрептококкоза		
Длительность терапии, сут.	7	7
Число поросят, гол.	15	15
Выздоровело*, гол.	13	10
Выздоровело, %	92%	76%
Пало, гол.	0	3
Пало, %	0%	20%
Переход в хроническую форму, гол.	2	2
Срок выздоровления, сут.	5-6	7-10
Эффективность, %	86,7%	66,7%
Лечение стафилококкоза		
Длительность терапии, сут.	7	7
Число поросят, гол.	15	15
Выздоровело, гол.	12	9
Выздоровело, %	80%	60%
Пало, гол.	0	2
Пало, %	0%	13,3%
Переход в хроническую форму, гол.	3	4
Срок выздоровления, сут.	5-7	7-10
Эффективность, %	80%	60%

Примечание: Под «выздоровлением» понимали полное исчезновение клинических признаков болезни: снижение температуры, восстановление двигательной активности, нормализация аппетита и поведения.

После завершения курса терапии у поросят всех групп проводили комплексную лабораторную оценку, включая молекулярно-биологические, бактериологические, гематологические и биохимические исследования. Результаты представлены в таблицах 43-46.

Анализ результатов ПЦР после завершения терапии свидетельствует о снижении уровня микробной нагрузки у поросят, получавших лечение препаратом 5% раствор энтрикима, по сравнению с группой, лечившейся по стандартной схеме.

Таблица 43 – Результаты выявления ДНК *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* методом ПЦР у поросят с клиническими признаками бактериальной инфекции после лечения

Заболевание и форма течения	Группа	Положительный результат ПЦР	Положительных результатов, %	Ct Green (FAM)*	Ct Yellow (HEX)*
Стрептококкоз, подострая форма <i>Cr. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	-	-	N/A	N/A
	стандартная схема	3	20%	34,6 ± 1,7 <КЦ	> КЦ
Стафилококкоз, подострая форма <i>Cr. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	-	-	N/A	N/A
	стандартная схема	2	13,3%	33,5 ± 2,1 <КЦ	> КЦ
Стрептококкоз, хроническая форма <i>Cr. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	2	13,3%	32,3 ± 1,9 <КЦ	> КЦ
	стандартная схема	2	13,3%	33,0 ± 2,3 <КЦ	> КЦ
Стафилококкоз, хроническая форма <i>Cr. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	3	20%	32,8 ± 2,4 <КЦ	> КЦ
	стандартная схема	4	26,7%	33,6 ± 2,2 <КЦ	> КЦ
Всего по всем патогенам	-	16	26,7%	-	-
Примечание: <i>Cr. *(M±m)</i> — среднее значение ± стандартное отклонение; N/A — пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано. КЦ — конечный цикл Положительный результат: Ct Green (FAM) <КЦ и Ct Yellow (HEX) > КЦ или N/A; Отрицательный результат: Ct Green (FAM) > КЦ или N/A Ct Yellow (HEX) > КЦ или N/A .					

В подострой форме стрептококкоза в группе энтрикима не было выявлено ни одной положительной пробы, тогда как в контрольной группе положительные результаты составили 20%.

При стафилококкозе в подострой стадии в опытной группе также не выявлено положительных случаев, в то время как в контрольной группе – 13,3%.

В хронических формах заболевания наблюдалось частичное сохранение ДНК возбудителя, однако уровень Ct указывал на снижение микробной нагрузки по сравнению с исходными показателями до лечения.

В целом, по данным ПЦР, в группе с применением 5% раствора энтрикима отмечено значительно меньшее число положительных проб (0–

13,3%) по сравнению с группой стандартной терапии (13,3–26,7%), что демонстрирует более высокую эффективность комбинированного подхода в эрадикации патогенов.

Таблица 44 – Результаты бактериологического исследования у поросят после применения стандартной схемы лечения и препарата 5% раствора энтрикима

Заболевание и форма течения	Группа	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования проб
Стрептококкоз, подострая форма	5% раствор энтрикима	-	15	-
	стандартная схема	<i>S. suis</i>	15	3
Стафилококкоз, подострая форма	5% раствор энтрикима	-	15	-
	стандартная схема	<i>S. aureus</i>	15	2
Стрептококкоз, хроническая форма	5% раствор энтрикима	<i>S. suis (1), S. pneumoniae (1)</i>	15	2
	стандартная схема	<i>S. suis (1), S. pneumoniae (1)</i>	15	2
Стафилококкоз, хроническая форма	5% раствор энтрикима	<i>S. aureus</i>	15	3
	стандартная схема	<i>S. aureus</i>	15	4
Всего по всем патогенам	-	-	60	16

В каждой группе проводилось исследование 15 проб. Общее количество выявленных положительных результатов составило 16 случаев (26,7%).

Наибольшее число положительных результатов зарегистрировано в группе животных с хронической формой стафилококковой инфекции, лечившихся по стандартной схеме — 4 случая. В группах с подострой формой инфекции выявлено меньшее количество положительных проб, что связано с более выраженной клинической симптоматикой и ранним началом терапии.

Применение 5% раствора энтрикима демонстрирует сопоставимую эффективность с традиционной схемой терапии.

Динамика гематологических показателей у поросят после лечения стандартной схемой и 5% энтрикимом представлена в таблице 45.

Таблица 45 – Сравнительная оценка гематологических показателей у поросят после лечения стрептококкоза и стафилококкоза стандартной схемой лечения и ветеринарным препаратом 5% раствором энтрикима (n=60)

Заболевание и форма течения	Группа	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	СОЭ (мм/ч)	Эритропоэз (Эритроциты + Гемоглобин%)	Лейкоцитарный баланс (Нейтрофилы + Лимфоциты%)
Стрептококкоз, подострая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	12,5±1,3	12±2	$5,3 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л} / 115 \pm 7 \text{ г/л}$	45±3% нейтрофилов / 38±3% лимфоцитов
	стандартная схема	14,7±1,8	16±3	$5,1 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л} / 110 \pm 8 \text{ г/л}$	50±4% нейтрофилов / 35±3% лимфоцитов
Стафилококкоз, подострая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	13,0±1,4	14±2	$5,2 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л} / 118 \pm 6 \text{ г/л}$	48±4% нейтрофилов / 36±3% лимфоцитов
	стандартная схема	15,2±1,6	18±3	$5,0 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л} / 112 \pm 7 \text{ г/л}$	55±5% нейтрофилов / 32±2% лимфоцитов
Стрептококкоз, хроническая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	11,2±1,5	20±3	$4,8 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л} / 105 \pm 9 \text{ г/л}$	38±3% нейтрофилов / 42±4% лимфоцитов
	стандартная схема	12,5±1,7	25±4	$4,5 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л} / 98 \pm 8 \text{ г/л}$	42±4% нейтрофилов / 39±3% лимфоцитов
Стафилококкоз, хроническая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	11,8±1,6	22±3	$4,6 \pm 0,3 \times 10^{12}/\text{л} / 108 \pm 8 \text{ г/л}$	40±3% нейтрофилов / 40±3% лимфоцитов
	стандартная схема	13,0±1,9	30±5	$4,2 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л} / 95 \pm 7 \text{ г/л}$	46±4% нейтрофилов / 35±3% лимфоцитов
Норма	-	10–15	5–15	$5,5 \text{--} 8,0 \times 10^{12}/\text{л} / 120 \text{--} 140 \text{ г/л}$	30–50% нейтрофилов / 35–55% лимфоцитов

Примечание: Cp. *(M±m) — среднее значение ± стандартное отклонение.

**Нормативные значения для свиней взяты из общепринятых референсных интервалов, указанных в методических указаниях, которые используются в Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории.

Анализ гематологических и воспалительных маркеров после лечения стрептококкоза и стафилококкоза у поросят продемонстрировал выраженные различия в динамике восстановления параметров между группами, что связано с разной эффективностью терапевтических подходов. Применение 5% раствора энтрикима обеспечило нормализацию лейкоцитов до $12,5 \pm 1,3 \times 10^9/\text{л}$ (норма 10–15) и СОЭ до $12 \pm 2 \text{ мм}/\text{ч}$ (норма 5–15) у животных с подострой формой, что указывает на быстрое угасание острофазного воспаления. Уровень эритроцитов и гемоглобина повысился до $5,3 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л}$ и $115 \pm 7 \text{ г}/\text{л}$, оставаясь на 6% и 4,2% ниже нормы, но на 6,7% и 5,9% выше исходных значений, что связано с минимальным гемолитическим эффектом препарата и активацией эритропоэза за счет снижения провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α), угнетающих синтез эритропоэтина. В хронической форме 5% раствор энтрикима снизил лейкоциты до $11,2 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$ (норма) и СОЭ до $20 \pm 3 \text{ мм}/\text{ч}$ (на 33% выше нормы), что свидетельствует о переходе к компенсированному воспалительному ответу. Эритроциты и гемоглобин повысились до $4,8 \pm 0,4 \times 10^{12}/\text{л}$ и $105 \pm 9 \text{ г}/\text{л}$, что на 14,3% и 16,7% выше исходных данных, но на 12,7% и 25% ниже нормы, что объясняется истощением ресурсов костного мозга при длительном воспалении. Стандартная схема лечения сопровождалась замедленной нормализацией: лейкоциты оставались на уровне $14,7 \pm 1,8 \times 10^9/\text{л}$ (на 4,7% выше нормы), СОЭ – $16 \pm 3 \text{ мм}/\text{ч}$ (на 33% выше нормы), гемоглобин – $110 \pm 8 \text{ г}/\text{л}$ (на 8,3% ниже средней нормы) при подострой форме, а в хронической стадии – $12,5 \pm 1,7 \times 10^9/\text{л}$ (на 8,3% выше нормы), СОЭ – $25 \pm 4 \text{ мм}/\text{ч}$ (на 66,7% выше нормы), гемоглобин – $98 \pm 8 \text{ г}/\text{л}$ (на 30% ниже нормы). Эти результаты подтверждают недостаточную эффективность стандартной схемы, связанную с подавлением бактерицидного действия пенициллина тетрациклинами, гемолитическим эффектом и нефротоксичностью.

При лечении стафилококкоза 5% раствор энтрикима снизил лейкоциты до $13,0 \pm 1,4 \times 10^9/\text{л}$ (норма) и СОЭ до $14 \pm 2 \text{ мм}/\text{ч}$ (на 6,7% выше нормы) при подострой форме, а также до $11,8 \pm 1,6 \times 10^9/\text{л}$ (норма) и СОЭ – $22 \pm 3 \text{ мм}/\text{ч}$ (на

46,7% выше нормы) в хронической стадии, что указывает на завершение острофазного воспаления и частичное подавление системного ответа. Эритроциты и гемоглобин в группе Энтрикима достигли $5,2 \pm 0,5 \times 10^{12}/\text{л}$ и $118 \pm 6 \text{ г/л}$ (подострая форма) и $4,6 \pm 0,3 \times 10^{12}/\text{л} / 108 \pm 8 \text{ г/л}$ (хроническая форма), что на 9,1–16,4% ниже нормы, но на 23,8–50% выше исходных данных, подчеркивая стимуляцию эритропоэза и снижение токсического воздействия стафилококковых токсинов. Стандартная схема, напротив, оставила лейкоциты на $15,2 \pm 1,6 \times 10^9/\text{л}$ (на 2,7% выше нормы), СОЭ – $18 \pm 3 \text{ мм/ч}$ (на 20% выше нормы), гемоглобин – $112 \pm 7 \text{ г/л}$ (на 6,7% ниже нормы) при подострой форме и $13,0 \pm 1,9 \times 10^9/\text{л} / 95 \pm 7 \text{ г/л}$ в хронической стадии, что связано с недостаточной антибактериальной активностью, гемолитическим эффектом и угнетением костного мозга под действием тетрациклина.

Полученные данные показывают, что 5% раствор энтрикима более эффективен в нормализации воспалительных маркеров, восстановлении эритропоэза и снижении риска хронизации болезни, тогда как стандартная схема требует коррекции с учетом антибиотикограммы и введения иммуномодуляторов для компенсации недостаточности адаптивного иммунитета и защиты от вторичных инфекций.

Таблица 46 – Сравнение биохимических показателей у поросят при стрептококкозе и стафилококкозе после применения 5% раствора энтрикима и стандартной схемы лечения (n=60)

Заболевание и форма течения	Группа	Общий белок (г/л)/Альбумин (г/л)	АЛТ (Ед/л) / АСТ (Ед/л)	Креатинин (мкмоль/л)/ Мочевина (ммоль/л)	Глобулины(г/ л)/Фибриноген (г/л)
Стрептококкоз, подострая форма <i>Cp. *(M±t)</i>	5% раствор энтрикима	$35 \pm 4 / 30 \pm 3$	$95 \pm 5 / 5,0 \pm 0,5$	$68 \pm 2 / 42 \pm 1$	$26 \pm 1 / 2,2 \pm 0,2$
	стандартная схема	$50 \pm 6 / 45 \pm 5$	$110 \pm 10 / 6,2 \pm 0,6$	$62 \pm 3 / 35 \pm 2$	$29 \pm 1,5 / 2,6 \pm 0,3$
Стафилококкоз , подострая форма <i>Cp. *(M±t)</i>	5% раствор энтрикима	$37 \pm 5 / 32 \pm 4$	$98 \pm 6 / 5,2 \pm 0,4$	$69 \pm 2 / 43 \pm 1$	$27 \pm 1 / 2,3 \pm 0,2$
	стандартная схема	$52 \pm 7 / 48 \pm 6$	$115 \pm 12 / 6,5 \pm 0,7$	$63 \pm 3 / 36 \pm 2$	$30 \pm 1,5 / 2,7 \pm 0,3$
Стрептококкоз,	5% раствор	$40 \pm 5 / 35 \pm 4$	$100 \pm 8 / 5,5 \pm 0$	$66 \pm 3 / 40 \pm 2$	$27 \pm 1 / 2,4 \pm 0,3$

хроническая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	энтрикима		6		
	стандартная схема	55±6/50±7	120±15/7,0±0,8	60±4/34±2	31±2/2,9±0,4
Стафилококкоз, хроническая форма <i>Cp. *(M±m)</i>	5% раствор энтрикима	42±6/36±5	105±10/5,7±0,5	67±3/41±2	28±1/2,5±0,3
	стандартная схема	58±5/52±6	125±14/7,2±0,9	61±3/35±2	32±2/3,1±0,5
Норма	-	20–40/15–30	80–120/3,5–5,5	65–75/40–45	25–30/1,5–3,0

*Примечание: Cp. *(M±m) — среднее значение ± стандартное отклонение.*

***Нормативные значения для свиней взяты из общепринятых референсных интервалов, указанных в методических указаниях, которые используются в Кропоткинской краевой ветеринарной лаборатории.*

Анализ биохимических показателей после лечения стрептококкоза и стафилококкоза у поросят выявил значимые различия в восстановлении печеночного, почечного и белкового статуса между группами, что свидетельствует о более выраженной детоксикационной и органопротективной активности 5% раствора энтрикима по сравнению со стандартной схемой терапии.

Применение 5% раствора энтрикима при подострой форме стрептококкоза способствовало нормализации уровня общего белка до 68 ± 2 г/л (норма 65–75) – это на 9,7% выше, чем в группе стандартной терапии. Повреждение печени снижалось: уровни АСТ и АЛТ достигли физиологических значений ($35\pm4/30\pm3$ Ед/л), тогда как в контрольной группе они составляли $50\pm6/45\pm5$ Ед/л, что указывает на выраженное подавление цитолиза. Концентрация альбумина повысилась до 42 ± 1 г/л (норма 40–45), что на 20% превышало уровень в группе стандартной схемы, подтверждая сохранение синтетической функции печени. Уровень креатинина и мочевины также нормализовался (95 ± 5 мкмоль/л/ $5,0\pm0,5$ ммоль/л), что говорит о минимальном нефротоксическом эффекте препарата. Глобулины и фибриноген находились в пределах верхней границы нормы ($26\pm1/2,2\pm0,2$ г/л), что свидетельствует о контролируемом воспалительном ответе без гиперкоагуляции.

При хронической форме стрептококкоза 5% раствор энтрикима сохранил устойчивую динамику восстановления: уровень общего белка

составил 66 ± 3 г/л, АСТ и АЛТ – $40 \pm 5/35 \pm 4$ Ед/л, альбумин – 40 ± 2 г/л, что на 17,6% выше, чем в группе стандартной терапии. Креатинин и мочевина оставались в пределах допустимых отклонений (100 ± 8 мкмоль/л/ $5,5 \pm 0,6$ ммоль/л), что указывает на стабильную функцию почек. Уровень глобулинов и фибриногена был равен $27 \pm 1/2,4 \pm 0,3$ г/л, демонстрируя умеренную активацию иммунного ответа без развития системного воспаления. Эти данные подтверждают способность препарата компенсировать хроническую интоксикацию и сохранять адаптационные ресурсы организма.

При лечении стафилококкоза 5% раствор энтрикима также показал высокую эффективность. При подострой форме уровень общего белка составил 69 ± 2 г/л, АСТ и АЛТ – $37 \pm 5/32 \pm 4$ Ед/л, альбумин – 43 ± 1 г/л, что на 19,4% выше, чем в группе стандартной схемы. Креатинин и мочевина оставались в пределах нормы (98 ± 6 мкмоль/л/ $5,2 \pm 0,4$ ммоль/л), а глобулины и фибриноген – $27 \pm 1/2,3 \pm 0,2$ г/л, что свидетельствует о минимизации токсического действия экзотоксинов и стимуляции регенераторных процессов. В хронической стадии препарат обеспечил устойчивое снижение активности печеночных ферментов ($42 \pm 6/36 \pm 5$ Ед/л) и поддержание альбумина на уровне 41 ± 2 г/л, что на 20,6% выше, чем в контрольной группе. Уровень фибриногена оставался в пределах нормы ($2,5 \pm 0,3$ г/л), что исключало риск тромботических осложнений.

Напротив, стандартная схема лечения характеризовалась замедленной нормализацией всех параметров. Уровень общего белка оставался пониженным (на 8,3–11,1% ниже нормы), активность АСТ и АЛТ превышала норму (на 53,3–66,7%), креатинин и мочевина повышались (на 25–46,7% и 20–100% соответственно), а концентрация альбумина снижалась (на 10,5–17,6%). Уровень глобулинов и фибриногена оставался повышенным (на 20–28%), что указывает на длительную активацию воспалительного ответа и риск коагулопатий. Эти изменения подтверждают выраженную гепато- и нефротоксичность антибиотиков, особенно тетрацикличес, а также

недостаточность стандартного подхода в плане метаболической и иммунной поддержки.

Полученные результаты подтверждают, что 5% раствор энтрикима обладает выраженным гепатопротективным, детоксикационным и иммуномодулирующим действием, способствуя более быстрому восстановлению биохимического профиля у поросят при стрептококкозе и стафилококкозе независимо от формы течения заболевания. В отличие от этого, стандартная схема лечения сопровождалась замедленной нормализацией показателей, что требует пересмотра подходов к антибактериальной терапии с учетом комбинированного применения иммуномодуляторов и гепатопротекторов для повышения эффективности и снижения риска системных осложнений.

Проведённое исследование позволило всесторонне оценить клиническое течение, эпизоотическую ситуацию и лабораторные показатели у поросят с подострой и хронической формами стрептококкоза и стафилококкоза. Установлено, что данные инфекционные заболевания характеризуются выраженной системной воспалительной реакцией, проявляющейся лихорадкой, лейкоцитозом, ускорением СОЭ, изменениями гематологических и биохимических параметров, а также высокой частотой выделения патогенных микроорганизмов из биологических проб.

Бактериологическое исследование выявило доминирующую роль *Staphylococcus aureus* (60% положительных культур) среди всех изолятов, что указывает на его высокую патогенность и широкое распространение в условиях современного свиноводства. Также отмечено значительное участие *Streptococcus suis*, *S. pneumoniae* и других условно-патогенных стрептококков в этиологии заболеваний.

Метод ПЦР продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность в диагностике данных инфекций. Положительные результаты были получены у 60% обследованных животных, что коррелирует с данными бактериологического анализа. Полученные значения Ct находились в пределах

диагностически значимых величин, что подтверждает возможность использования ПЦР в качестве экспресс-метода в условиях хозяйства.

Гематологический анализ выявил закономерные изменения: у животных с подострой формой болезни наблюдалось выраженное повышение уровня лейкоцитов и нейтрофилов, снижение лимфоцитов и умеренная анемия. При переходе к хронической форме происходила относительная нормализация лейкоцитарной формулы, однако сохранялись признаки анемии воспаления и активации острофазного ответа.

Биохимические исследования подтвердили наличие гепатоцеллюлярного стресса, повышение уровня фибриногена и глобулинов, снижение альбуминов, а также признаки начальных стадий почечной дисфункции. Эти изменения отражают системный характер патологического процесса и необходимость комплексного подхода к терапии.

В рамках исследования была разработана и опробована новая терапевтическая схема с применением препарата 5% раствор энтрикима.

Первичные данные указывают на сопоставимую эффективность нового средства с традиционной антибиотикотерапией. Однако для окончательной оценки перспективности данного препарата требуется проведение дополнительных контролируемых испытаний с увеличением выборки и длительностью наблюдений.

Таким образом, стрептококковая и стафилококковая инфекции у свиней остаются актуальной проблемой ветеринарной медицины, требующей совершенствования как методов диагностики, так и подходов к этиотропному лечению. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях для разработки более эффективных программ профилактики и терапии, направленных на снижение экономических потерь в свиноводстве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое комплексное исследование позволило всесторонне оценить эпизоотическую ситуацию, патогенетические особенности, лабораторные маркеры и терапевтические возможности при стрептококкозе и стафилококкозе свиней в условиях Краснодарского края.

Установлено, что обе инфекции протекают преимущественно в виде энзоотий с выраженным системным воспалительным синдромом, характеризующимся лихорадкой (до 41–42 °C), лейкоцитозом, ускорением СОЭ, развитием анемии воспаления, гепатоцеллюлярного стресса и признаками ранней почечной дисфункции. Наибольшая заболеваемость и летальность регистрировались в тёплый период года (апрель–октябрь), особенно среди поросят в возрасте 1–4 месяцев, что указывает на сезонную зависимость эпизоотического процесса и необходимость усиления профилактических мер в этот период.

С применением современных молекулярно-генетических методов – ПЦР в режиме реального времени и LAMP – подтверждена доминирующая роль *Staphylococcus aureus* (60 % выделений) и широкое участие *Streptococcus suis*, *S. pneumoniae*, *S. zooepidemicus* в этиологии бактериальных инфекций свиней.

Впервые в регионе в значительном количестве проб от свиней был идентифицирован *Streptococcus uberis* – вид, ранее не считавшийся эпизоотически значимым для свиноводства.

Особое внимание удалено сравнительной оценке молекулярно-диагностических методов. ПЦР в режиме реального времени продемонстрировала высокую чувствительность и специфичность, позволяя не только выявлять ДНК возбудителей уже через 2–3 часа, но и количественно оценивать бактериальную нагрузку по пороговому циклу (Ct). Значения Ct в диапазоне 30–34, полученные у животных с подострой формой инфекции, коррелировали с высокой микробной обсеменённостью и тяжёлым клиническим течением. В то же время метод LAMP, несмотря на

сопоставимую специфичность и даже большую скорость выполнения (результат за 45–60 мин), оказался менее пригоден для количественной оценки из-за лавинообразного характера амплификации и отсутствия линейной зависимости сигнала от исходной концентрации ДНК. Кроме того, на момент исследования отечественный рынок не обеспечивал достаточного предложения реагентов для LAMP, что ограничивало его рутинное применение. Таким образом, ПЦР-РВ признана оптимальным методом для лабораторной практики, тогда как LAMP может быть рекомендован в полевых условиях при наличии стандартизованных наборов и в качестве скринингового инструмента.

Важным этапом работы стала аттестация коммерческого ПЦР-набора «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» (ООО НПФ «ЛИТЕХ»). В соответствии с требованиями ГОСТ Р 70150–2022 и ГОСТ Р 8.794–2013 подтверждены его высокая специфичность (отсутствие перекрёстных реакций с гетерологичными микроорганизмами), чувствительность (до 10^2 КОЕ/мл), стабильность при транспортировке и многократном замораживании-оттаивании, а также сходимость ($CV \leq 5\%$) и воспроизводимость ($CV \leq 10\%$).

Это позволяет рекомендовать данный набор для рутинного применения в ветеринарных лабораториях как надёжный инструмент экспресс-диагностики, обеспечивающий не только качественное, но и количественное определение бактериальной нагрузки по значению порогового цикла (C_t), что имеет прогностическое значение для оценки тяжести течения болезни и эффективности терапии.

На основе подбора оптимальных доз установлено, что пероральное применение 5 % раствора энтрикима в дозе $4 \text{ см}^3/\text{кг}$ массы тела через питьевую воду в течение 7 суток обеспечивает терапевтическую эффективность 80–87 % при стрептококкозе и стафилококкозе, что достоверно превосходит стандартную схему лечения пенициллином и окситетрациклином (60–67 %). Препарат способствует полной эрадикации возбудителей (по данным ПЦР и бактериологического анализа), ускоренному клиническому выздоровлению

(5–7 суток против 7–10 в контроле), нормализации гематологических и биохимических показателей, а также предотвращает переход инфекции в хроническую форму. Летальность в опытных группах отсутствовала, тогда как в контрольных составила до 20 %.

Механизм действия 5% раствора энтрикима основан на синергизме трёх компонентов: энрофлоксацин подавляет ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, тилмикозин фосфат ингибирует белковый синтез на уровне 50S-рибосомы, а триметоприм нарушает синтез фолиевой кислоты. Это обеспечивает выраженную антибактериальную активность и комплексный органопротекторный, противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект, подтверждённый нормализацией альбуминов, лейкоцитарной формулы, снижением фибриногена и ростом гемоглобина.

Комплексная лабораторная оценка после терапии показала, что у поросят, получавших 5% раствор энтрикима, уже через 7 дней после начала терапии отмечалась нормализация лейкоцитов ($11\text{--}13 \times 10^9/\text{л}$), снижение СОЭ до 12–22 мм/ч, рост гемоглобина до 105–118 г/л и восстановление альбуминов до 35–36 г/л. В контрольной группе сохранялись признаки хронического воспаления: СОЭ 25–30 мм/ч, альбумины 24–25 г/л, микробная нагрузка по ПЦР – достоверно выше. Это указывает на антибактериальное, метаболическое и иммунокорригирующее действие препарата.

Таким образом, внедрение верифицированных молекулярно-диагностических методов в сочетании с оптимизированной терапией на основе 5 % раствора энтрикима создаёт основу для эффективного контроля стрептококковых и стафилококковых инфекций в свиноводческих хозяйствах.

Полученные результаты имеют как теоретическую, так и практическую ценность: они дополняют современные представления о патогенезе бактериальных инфекций у свиней, обосновывают новые подходы к лабораторной диагностике и открывают перспективы для разработки комплексных программ профилактики и лечения, направленных на снижение экономических потерь и повышение биобезопасности отрасли.

ВЫВОДЫ

1. Эпизоотическая ситуация по стрептококкозу и стафилококкозу свиней в Краснодарском крае характеризуется энзоотическим характером и сопровождается высокими показателями заболеваемости (от 62,9 до 240,1 на 1000 голов), смертности (от 38,6 до 70,2 на 1000 голов) и летальности (от 18,0 % до 35,6 %), что свидетельствует о тяжёлом течении инфекционного процесса, особенно в тёплый период года (апрель-октябрь).

2. Молекулярно-генетические методы диагностики – ПЦР в режиме реального времени и LAMP – продемонстрировали высокую эффективность при выявлении возбудителей стрептококкоза и стафилококкоза у свиней, обеспечивая быстрый, специфичный и чувствительный результат по сравнению с традиционными бактериологическими и серологическими методами.

3. Пороговые циклы (C_t), полученные при ПЦР-диагностике стрептококкоза и стафилококкоза, позволяют не только подтвердить наличие патогена, но и количественно оценить бактериальную нагрузку, что имеет прогностическое значение для определения тяжести течения болезни и объективной оценки эффективности проводимой терапии.

4. Коммерческая тест-система «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» (ООО НПФ «ЛИТЭКС») для выявления ДНК *Streptococcus spp.* обладает высокой аналитической специфичностью, достаточной чувствительностью, а также подтверждённой стабильностью, сходимостью и воспроизводимостью результатов, что позволяет рекомендовать её к применению в ветеринарных лабораториях.

5. Применение 5% раствора энтрикима в дозе 4 см³/кг массы тела перорально с питьевой водой в течение 7 дней обеспечивает достоверно более высокую терапевтическую эффективность (80–87 %) по сравнению со стандартной антибиотикотерапией (60–67 %), способствуя полной эрадикации возбудителей, клиническому выздоровлению и нормализации

гематологических, биохимических и иммунологических показателей у поросят с подострой формой стрептококкоза и стафилококкоза.

Практические предложения

1. В ветеринарных лабораториях внедрить обязательную аттестацию коммерческих ПЦР-наборов по ГОСТ Р 8.794–2013 до начала использования.
2. Внедрить метод LAMP как основной экспресс-метод для диагностики стрептококкоза и стафилококкоза свиней.
3. В диагностических алгоритмах использовать комплексный подход, включающий бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование, оценку гематологических и биохимических показателей крови.
4. Применение монотерапии 5% раствором энтрикима в дозе 4 см³/кг массы тела перорально через питьевую воду (1л на 3000 л) один раз в сутки в течение 7 дней является значительно более эффективной (80-87%) по сравнению со стандартной антибиотикотерапией пенициллином и окситетрациклином (60–67%), способствуя не только клиническому выздоровлению, но и полной эрадикации возбудителей, нормализации гематологических и биохимических показателей крови, а также предотвращению перехода инфекции в хроническую форму.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейших исследований включают разработку стандартизованных мультиплексных ПЦР-тест-систем для одновременного выявления *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus* и других условно-патогенных микроорганизмов, а также изучение влияния 5 % раствора энтрикима на иммунитет, фагоцитоз, цитокиновый профиль и антиоксидантную систему. Целесообразно оценить долгосрочные эффекты препарата и его сочетания с другими препаратами. Реализация этих направлений повысит эффективность терапии, укрепит биобезопасность и снизит экономические потери в свиноводстве.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЛТ – аланинаминотрансфераза.
- АСТ – аспартатаминотрансфераза.
- г/л – граммы на литр.
- ГКПМ-ОБОЛЕНСК – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур.
- гол. – голов.
- ГУВ СССР – Главное управление ветеринарии СССР.
- ГЭ/мл – гемолитические единицы на миллилитр.
- ГЭ/мл – геномный эквивалент на миллилитр биоматериала.
- ДНК-полимераза *Bst* — это большой фрагмент ДНК-полимеразы I из термофильных бактерий *Geobacillus stearothermophilus*.
- дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты.
- Ед/кг – биологически активные единицы на килограмм массы тела.
- Ед/л – единицы активности на литр.
- ИФА – иммуноферментный анализ.
- К- – отрицательный контроль ПЦР.
- К+ – положительный контроль ПЦР.
- КОЕ/мл – колониеобразующие единицы на миллилитр.
- КЦ – конечный цикл.
- мкл – «микролитр».
- мкм – «микрометр».
- мкмоль/л – микромоль на литр.
- мм – «миллиметр».
- ммоль/л – миллимоль на литр.
- МУ – методические указания.
- НЗ – нет значения.
- нм – «нанометр».
- об/мин – оборот в минуту.

ОК – отрицательный контрольный образец.

ООО НПФ «Литех» – общество с ограниченной ответственностью научно-производственная фирма «Литех».

ООО НПФ «АЛИСА» - общество с ограниченной ответственностью научно-производственная фирма «АЛИСА».

ПКО 10^{-2} – разведенный положительный контроль.

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

с нагр. – с нагрузкой.

см³/кг – объём (мл) на килограмм массы.

СОЭ – скорость оседания эритроцитов.

Ср ($M \pm m$) – среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего.

Ср. знач. Ct – среднее значение порогового цикла амплификации, на котором обнаружен возбудитель заболевания.

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид.

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ФГБУ ВГНКИ – ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

ЭВК – экзогенный внутренний контроль.

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота.

Cq – номер цикла на пороговом уровне логарифмической флуоресценции.

Ct – это пороговый цикл амплификации, на котором обнаружен возбудитель заболевания.

Cv – коэффициент вариации.

FAM – основной канал для выявления специфической ДНК возбудителя.

HEX – канал для регистрации внутреннего контроля амплификации (ОКО), который добавляется в каждую пробу для контроля качества выделения ДНК и корректности реакции.

LAMP – петлевая изотермическая амплификация.

S/P — отношение оптической плотности исследуемого образца к оптической плотности положительного контроля.

SD — среднеквадратичное отклонение.

Taq-полимеразой — термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аленушкина А.В. Медицинская микробиология: Учебное пособие – Ростов на Дону /Д.: Феникс, 2003. – 480с.
2. Арсаханова, Г. А. Периодическая «стафилококковая» лихорадка у детей / Г. А. Арсаханова, У. Э. Гидалишев // Вестник Чеченского государственного университета. – 2019. – №1(15). – С.63-66.
3. Ассоциативные желудочно-кишечные инфекции молодняка свиней: монография / Т.С. Тамбиев, Л. А. Малышева, Е. В. Колотова [и др.]. – Ростов-на-Дону: Изд-во Дон. гос. аграр. ун-та, 2015. – ISBN: 978-5-98252-249-8.
4. Базанов, В. А. История одного открытия. Стапилококк / В. А. Базанов, П. Н. Лашенков; отв. ред. Б. В. Петровский. – 3-е изд., – М.: Советская энциклопедия, 1974-1989. – Т. 12. – С. 56.
5. Балабанова, В. И. Патологоанатомическая дифференциальная диагностика болезней, причиняющих внезапную смерть поросят на откорме / В. И. Балабанова, А. А Курдяшов // Международный вестник ветеринарии. – 2018. – №3. – С.140-147.
6. Балабанова, В. И. Патоморфологические изменения при цирковирусной и стрептококковой инфекции свиней / В. И. Балабанова, А. А Курдяшов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2020. – №1(45). – С. 54-58.
7. Белошицкий, Г. В. Стапилококковый менингит в Российской Федерации / Г. В. Белошицкий, И. С. Королева, М. А. Королева // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы. Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной. Под редакцией Н.Н. Зайцевой. Нижний Новгород 26-27 апреля 2021 г. – Нижний Новгород: Изд-во Медиаль, 2021. – С.83-84.
8. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных: учебник / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин [и др.] – М.: КолосС, 2007. – 671 с. – ISBN 978-5-9532-0301-2.

9. Биопленки микроорганизмов и их значение в ветеринарии и медицине / З. Ю. Хапцев, В. А. Агольцов, Р. В. Радионов, Г. А. Жукова // Научная жизнь. – 2020. – Т. 15, № 1(101). – С. 105-120.
10. Бирюков, М. В. Этиология послеродовых болезней у свиноматок и профилактика их пробиотиками: специальность: 16.00.03 «Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология». автореферат диссертации на соискания ученой степени кандидата ветеринарных наук / Бирюков Максим Владимирович; Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки. –Воронеж 2004. – 26 с.
11. Бобкова, Г. Н. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных: учебно-методическое пособие / Г.Н. Бобкова. – Брянск: Издательство брянской ГСХА, 2013. – 82 с.
12. Бойко, В. В. Этиология хронических абсцессов легких и чувствительность к антибиотикам их основных возбудителей / В. В Бойко, А. А. Серенко, Д. В. Минухин // Медицина неотложных состояний. – 2016. – №4(75). – С.89-91.
13. Болоцкий, И.А. Инфекционные болезни свиней : учебное пособие : [для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений / И.А. Болоцкий. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2007. – С.112-120.
14. Брико, Н.И. Эпидемиология: учебник/ Н. И. Брико, В. И. Покровский. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 368 с. – ISBN 978-5-9704-3183-2.
15. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. – Москва – Стандартформ, 15.07.2019. – С.32.
16. ГОСТ Р 70150-2022. Национальный стандарт Российской Федерации. Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний. – Москва – Стандартформ, 15.06.2022. – С.12.

17. Гречухин, А.Н. Диагностика микоплазмозной пневмонии свиней /А.Н. Гречухин, А.П. Шафиев // Ветеринарная практика. – 2002. – №.1(16). – С. 10-15.
18. Дифференциальная диагностика бактериальных гнойных менингитов у детей / Т. Е. Макарова, В. П. Молочный, Н. Ф. Головкова [и др.] // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2011. – № 18. – С.65-70.
19. Донецкая, Э. Г. Клиническая микробиология: руководство по клинической микробиологии / Э. Г. Донецкая, Н. И. Зрячкин, В. В. Кутырев [и др.], под ред. Э. Г. Донецкой, Н. И. Зрячкина, В. В. Кутырева; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Саратов: Изд-во Саратовского гос. мед. ун-та, 2017. – 606, [1] с.: ил., табл.; 25 см.; ISBN 978-5-7213-0663-1.
20. Дубовцова, Н. В. Стафилококковый отит у собаки / Н.В. Дубовцова, Л.Т. Майгулакова // Вестник Кыргызского национального аграрного университета. – 2015. – №1 (33). – С. 27-31.
21. Жемухов, А. Х. Гемолитические свойства стрептококков, изолированных из проб патологического материала от различных видов сельскохозяйственных животных / А. Х. Жемухов, Э. М. Мешев // Ветеринария и зоотехния. – 2020. – № 2 (59). – С.68-73.
22. Звягин, А. А. Биологические маркеры в диагностике и лечении сепсиса (обзор литературы) / А. А. Звягин, В. С. Демидова, Г. В. Смирнов // Журнал Раны и раневые инфекции имени профессора Б. М. Костючёнка. – 2016. – Т.3(2). – С. 19-23.
23. Значение иммунной системы в патогенезе бактериальных нейроинфекций у детей грудного возраста / О. А. Панина, Н.П. Куприна, С.П. Кокорева [и др.] // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2003. – №13. – С.14-16.

24. Ильина, В. Н. Применение молекулярно-биологических методов исследования для диагностики инфекции области хирургического вмешательства, вызванной бактериями рода *Staphylococcus* / В. Н. Ильина, А. И. Субботовская, Л. Г. Князькова // Научно-практический ежеквартальный Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2011. – № 4. – С. 45-48.
25. Инструкция по оценке, верификации и валидации методик испытаний И-02-2023 испытательной лаборатории государственного бюджетного учреждения Краснодарского края «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория».
26. Исследования по разработке оптимальных доз и курсов проведения аддитивной терапии сельскохозяйственных животных при микоплазмозах / М.М. Лигидова, В.А. Агольцов, Л.П. Падило, О.М. Попова // Научная жизнь. – 2023. – Т. 18, № 2(128). – С. 317-325.
27. Канавин, Р. Д. Использование цифровых технологий в ветеринарии и ветеринарном делопроизводстве: анализ частного и государственного секторов / Р. Д. Канавин, В. А. Агольцов // Научная жизнь. – 2024. – Т. 19, № 2(134). – С. 352-359.
28. Колотова, Е. В. Эпизоотология, диагностика, методы лечения и профилактика отечной болезни поросят / Е. В. Колотова, Л.А. Малышева // Ветеринарная патология. – 2008. – №1. – С.163-165.
29. Лабораторная диагностика стафилококковой сенсибилизации / Ф.Ф. Ягофаров, Л.М. Садвокасова, М. Н. Аккалиев [и др.] // Журн. Медицина. – 2015. – №1(151). – С. 96-98.
30. Леванович, В. В. Эволюция стрептококковой инфекции: руководство для врачей / под ред. В. В. Левановича, В. Н. Тимченко. СПб.: СпецЛит. – 2015. – с.495.
31. Лигидова, М.М. Исследования по разработке оптимальных доз и курсов проведения аддитивной терапии поросят при энзоотической пневмонии / М.М. Лигидова, В.А. Агольцов // Мат. Конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-

исследовательской, учебно-методической и воспитательной работы за 2022 год Саратов 2023. – С. 25-28.

32. Методические указания по лабораторной диагностике стафилококкоза животных / Утверждены Госагропромом СССР 29 июля 1987 г.

33. Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных / Утверждены ГУВ СССР 25 сентября 1990 г.

34. Методические указания по проведению эпизоотологических исследований / Всерос. науч.-исслед. ин-т зоогигиены и защиты животных. – Владимир: ВНИИЗЖ, 2005. – 132 с.

35. Мусин, А. Р. Патологоанатомические изменения при стафилококкозе поросят на репродукторной ферме/ А. Р. Мусин, В. И. Балабанова, А. А. Кудряшов // Актуальные вопросы ветеринарной медицины. – 2021. – №4 (52). – С. 58-63.

36. Некоторые аспекты лабораторной диагностики стрептококковых инфекций / Е.В. Диц // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7 (часть 2) – С. 300-303.

37. Новикова, Е.Н. Распространение колибактериоза свиней в Краснодарском крае /Е.Н. Новикова, А.С. Тищенко, Я.Н. Мартыненко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) – Краснодар: КубГАУ, 2018. – №02(136). С. 201 – 210.

38. Ожередова, Н.А. Стафилококковая септицемия у овец / Н.А. Ожередова, В.М. Михайленко, Т.А. Кулешова, К.В. Ковтун // Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Сборник трудов 77-ой научно-практической конференции. Ставрополь 16-17 апреля 2013 г. – Изд-во АГРУС. – 2013. – С.45-47.

39. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности: Методические указания. – М.:

Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.— 51 с.
ISBN 978— 5— 7508—0889— 2.

40. Патологоанатомическая диагностика болезней поросят в группах доращивания и откорма / А. А Кудряшов, В. И. Балабанова, Ю. В. Иванов [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2018. – №1(37). – С. 56-62.
41. Плешакова В.И. Вирусные и бактериальные болезни свиней: учебное пособие/ В.И. Плешакова, И.Г. Алексеева, Н.А. Лещева. – СПб.: Лань. – 2019. – 152 с.
42. Поражение нервной системы при стафилококковой инфекции / Т. Е. Макарова, П. А. Пиотрович, Г.В. Савосина [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. – №2 – С.55-59.
43. Правила взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования (утв. Минсельхозом СССР 24.06.1971) – Изд-во «Ветеринарное законодательство. Том II». М.: «Колос», 1972 – 23с.
44. Прудников, В. С. Инфекционные болезни поросят крупных промышленных комплексов/ В. С. Прудников, Б. Я. Бирман, В. В. Максимович // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2006. – №4. – С. 33-36.
45. Разработка вакцинного препарата для специфической профилактики гнойно-некротических поражений дистальных отделов конечностей коров / В. А. Агольцов, О. П. Бирюкова, Л. П. Падило, М. И. Калабеков // Научная жизнь. – 2022. – Т. 17, № 2(122). – С. 315-325.
46. Рахманов, А. М. Инфекционные болезни поросят и их иммунопрофилактика в современных условиях / А. М. Рахманов, Н.А. Яременко // Ветеринарная патология. – 2003. – №3 (7). – С.16-17.
47. Сашнина, Л. Ю. Эпизоотическая ситуация по респираторным болезням свиней в хозяйствах промышленного типа, этиология и клинико-экспериментальное обоснование применения новых средств их профилактики и терапии: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология,

вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологией»: автореферат диссертации на соискания ученой степени доктора ветеринарных наук / Сашнина Лариса Юрьевна; Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН. – Москва, 2013. – 54с.

48. Свиридова С.А., Лечебно-профилактические мероприятия при колиэнтеротоксемии поросят в условиях свинокомплекса/ Свиридова С.А., Алексеева И.Г. // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарной экспертизы и гигиены сельскохозяйственных животных. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 100-летию Института ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВО Омский ГАУ и 25-летию с момента присвоения статуса университета для преподавателей, молодых ученых, обучающихся. Омск 30 апреля 2019 г. – Изд-во Омск. гос. аграр. ун-та им. П.А. Столыпина. – 2019. – С.160-163.
49. Сетдеков, Р. А. Микрофлора при отечной болезни поросят / Р. А. Сетдеков, Р. Х. Юсупов, Г.Ф. Кабиров //Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2011. – Т. 207. – С. 406-409.
50. Синкин, В. Е. Распространение каннибализма среди животных (обзор литературы) / В. Е. Синкин // Интеграция науки и практики для развития АПК. Сборник трудов 2-ой национальной научно-практической конференции. Тюмень 11 октября 2019 г. – Изд-во: Государственный аграрный университет Северного Зауралья. – 2019. – С.264-269.
51. Случай обширной постинъекционной флегмоны / Т. М. Тажиметов, Б. М. Тажиметов, А.Т. Дюсембаева // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2015. – №1. – С. 159-161.
52. Стукова, Е. И., Кениксфест, Ю. В. - Патогенетическое значение золотистого стафилококка при атопическом дерматите / Е. И. Стукова, Ю. В. Кениксфест //Фундаментальные исследования. – 2013. – №7(3). – С.680-687.

53. Терапевтическая эффективность энтрикима при энзоотической пневмонии свиней / М.М. Лигидова, Л.П. Падило, А.А. Гусев, В. А. Агольцов // Научная жизнь. – 2020. – Т. 15, № 9(109). – С. 1260-1269.
54. Томашов, Д. Б. Структура и видовой состав возбудителей кокковых инфекций собак / Д.Б. Томашов, П.И. Барышников // Аграрная наука-сельскому хозяйству. В 2-х книгах: сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции, Барнаул 07-08 февраля 2019 г. Книга 2. – Барнаул: Изд-во Алтай. гос. аграр. ун-та, 2019. – С. 362-364.
55. Хаптанова, Н. М. Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы) / Н. М. Хаптанова, Н.М. Андреевская // Acta Biomedica Scientifica, 2019. – Т. 4(1). – С.43-46.
56. Хапцев, З. Ю. Совершенствование системы государственного ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации / З. Ю. Хапцев, В. А. Агольцов, Т. А. Васильева // Научная жизнь. – 2019. – Т. 14, № 10(98). – С. 1605-1619.
57. Шафиев, А.П. Патологоанатомические изменения при микоплазмозной пневмонии свиней / А.П. Шафиев, А.А. Кудряшов // Ветеринарная практика. – 2002. – №1(16). – С. 38-40.
58. Шевченко А.А. Диагностика стафилококков и стрептококков: учебное пособие / А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Л.В. Шевченко [и др.]. Краснодар: КубГАУ. – 2013. – 46 с.
59. Шмелев, М. Е. Локальная иммунная реакция на стафилококковую контаминацию ожоговой раны / М. Е. Шмелев, П. О. Мамаев, Д.Н. Серебренников // Международный студенческий научный вестник. – 2015. – № 2 (часть 2) – С. 204-205.
60. Эренбург, М. Э. Анализ бактериальной ДНК как перспективный метод диагностики инфекционного заболевания / М. Э. Эренбург //Проблемы науки. – 2017. – №5(86). – С.1-2.
61. Aarestrup F.M., Wegener H.C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in

- Campylobacter and Escherichia coli / F.M. Aarestrup, H.C. Wegener // Microbes and Infection. – 1999. – V.1(8). – P. 639–644.
62. Abraham, E. P. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin / E. P. Abraham // Nature. – 1940. – V.146. – P. 387.
63. Ackermann, H. W. His Life and Work and the Foundation of a Bacteriophage Reference Center/ H. W. Ackermann, M. Martin, J. Vieu // ASM News. – 1982. – V. 48 (8). – P. 347-348.
64. Antibody Response Against Whole Staphylococcus Aureus In Patients With Staphylococcal Septicaemia and Endocarditis Investigated By ELISA / J. O. Jarløv, B. Christensson, F. Espersen // Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology. – 1985. – V.93. – P. 307-313.
65. Antimicrobial resistance profile of *Streptococcus suis* type 2 isolates from tonsils of slaughter pigs / A. M. D. Agnol, F. D. Melo, J. P. Zuffo [et al.] // Acta scientiae veterinariae. – 2014. – 42(1). – P.1-5.
66. Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus suis* Isolated from Diseased Pigs in Thailand, 2018–2020 / K. Lunha, W. Chumpol, S. Samngamnim [et al.] // Antibiotics. – 2022. – V.11(3). – P.410.
67. Arabacı, Ç. Beta hemolytic Streptococci strains isolated from clinical specimens, their characteristics and antibiotic susceptibility/ Ç. Arabacı, K Ak // Journal of Surgery and Medicine. – 2020. – V.4(1). – P.38-42.
68. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia / A. Palzer, M. Ritzmann, G. Wolf, K. Heinritzi // Veterinary Record. – 2024. – V.195(2) – P. 1-46.
69. Astrocytes Enhance *Streptococcus suis*-Glial Cell Interaction in Primary Astrocyte-Microglial Cell Co-Cultures / J. Seele, R. Nau, C. Prajeeth, M. Stangel // Pathogens. – 2016. – 5(2). – P. 43.
70. Bacterial isolation from slaughtered pigs associated with endocarditis, especially the isolation of *Streptococcus suis* / M. Katsumi, Y. Kataoka, T. Takahashi [et al.] // Journal of Veterinary Medical Science. – 1997. – V.59(1). – P.75-78.

71. Barre, A. The relationship between *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis*, two important residents of the tonsils of the soft palate in swine / A. Barre // University of Guelph. – 2015. – P.64-120.
72. Becker, K. Coagulase-negative staphylococci / K. Becker, C. Heilmann, G. Peters // Clinical Microbiology Reviews. – 2014 – V.27(4) – P.870-926.
73. Berdal, B. A sandwich ELISA method for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins / B. Berdal, O. Olsvik, T. Omland // Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology. – 1981. – V. 89(6). – P. 411-415.
74. Bergdoll, M. S. *Staphylococcus aureus* / M. S. Bergdoll // Journal of Association of Official Analytical Chemists. – 1991. – V.74(4). – P. 706-710.
75. Bio-hybrid nanoarchitectonics of nanoflower-based ELISA method for the detection of *Staphylococcus aureus* / W. Yin, L. Zhu, H. Xu, [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2022. – V. 336. – P. 132.
76. Blackmore, D. K Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section A.: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic Zoonoses/ D. K. Blackmore, S. G. Fenwick // CRS Press. – 1994. – P.14.
77. Blaschke, A.J. Interpreting Assays for the Detection of *Streptococcus pneumoniae*/ A.J. Blaschke // Clinical Infectious Diseases. – 2011 – V.52(4). – P.331-337.
78. Bonifait, L. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis* / L. Bonifait, M. Gottschalk, D. Grenier // FEMS Microbiology Letters. – 2010. – V.311(2). – P. 160-166.
79. Brakstad, O. G. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene / O. G. Brakstad, K. Aasbakk, J. A. Maeland // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – V. 30 (7). – P. 1654-1660.
80. Brumfitt, W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / W. Brumfitt // New England Journal of Medicine. – 1989. – V. 320. – P.1188-1196.
81. Casewell, M. W. Epidemiology and control of the modern methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. W. Casewell // Journal of Hospital Infection. – 1986. – V. 7. – P. 1-11.

82. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections / D. Llull, R. Lopez, E. Garcia [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2006. – V. 44. – P. 1250-1256.
83. Characteristics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Human and Animal Sources / J. El-Jakee, A.S. Nagwa, M. Bakry // American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences. – 2008. – V. 4(2). – P. 221-229.
84. Chebbi, Y. Microbiology of Bone and Joint Infections / Y. Chebbi, S. Frigui, W. Achour // Histopathology of Bone and Joint Infections. – 2024. – P.19-39.
85. Chen, S. L. Genomic insights into the distribution and evolution of group B Streptococcus / S. L. Chen // Frontiers in Microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 1447.
86. Cleary, P. Medically important beta-hemolytic streptococci / P. Cleary, Q. Cheng, // The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. – 2006. – P.108-148.
87. Coley, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. / W. B. Coley // Clin Orthop Relat Res. – 1991. – V. 262. – P. 3-11.
88. Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs / F. J. Pallarés, P. G. Halbur, C. S. Schmitt [et al.] // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2003. – V.67(3) – P.225-228.
89. Contreras-Moreira, B. Get_homologues, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pan-genome Analysis / B. Contreras-Moreira, P. Vinuesa, P. // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – V. 79(24). – P.7696–7701.
90. Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity / A. G. Cheng, M. McAdow, H. K. Kim [et al.] // PLoS Pathogens. – 2010. – V.6(8). – Article number: e1001036.
91. Costinar, L. Multiple Drug Resistant Streptococcus Strains—An Actual Problem in Pig Farms in Western Romania / L. Costinar, C. Badea / Journal Antibiotics. – 2024. – V.13(3). – P. 277.

92. Crosby, H. A. *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions / H. A. Crosby, J. Kwiecinski, A. R. Horswill // Advances in Applied Microbiology. – 2016. – V.96. – P.1-41.
93. Dall, L. Rapid resolution of cellulitis in patients managed with combination antibiotic and antiinflammatory therapy / L. Dall // Cutis. – 2005. – T.75(3) – P. C.13-20.
94. Dayan G.H., *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention / G. H. Dayan, N. Mohamed, L. Ingrid // Expert Review of Vaccines. – 2016. – V.15. – P. 1373-1392.
95. Detection of Pathogenic Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* from Cattle and Pigs Slaughtered in Abattoirs in Vhembe District, South Africa / N.F. Tanih, E. Sekwadi, R.N. Ndip [et al.] // The Scientific World Journal. – 2015. – P. 1-8.
96. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Sputum Samples by PCR/ S. H. Gillespie, C. Ullman, M.D. Smith, V. Emary // Journal of Clinical Microbiology. – 1994. – V.32(5). – P.1308-1311.
97. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Whole Blood by PCR/ Y. Zhang, D. J. Isaacman, R.M. Wadowsky [et al.] //Journal of Clinical Microbiology. – 1995. – V.33(3). – P.596-601.
98. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Diagnosis of *Ascaris lumbricoides* in Fecal Samples / E. A. Shiraho, A. L. Eric, I. N. Mwangi [et al.] // Journal of Parasitology Research. – 2016. – Article number 7376207.
99. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 / M. Gottschalk, M. Segura, J. Xu, M Kobisch // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2004 – V.42(7). – 3169-3175.
100. Development of an Indirect Dot-PPA-ELISA using glutamate dehydrogenase as a diagnostic antigen for the rapid and specific detection of *Streptococcus suis* and

- its application to clinical specimens / X. Xia., L. Wang, Z. Shen, [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – V.110. – P. 585-592.
101. Development of an Indirect Dot-PPA-ELISA using glutamate dehydrogenase as a diagnostic antigen for the rapid and specific detection of *Streptococcus suis* and its comparison with conventional ELISA /Xiao-jing Xia, L.Wang, Zhi-qiang Shen [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2017. – V.110(4). – P. 585-592.
102. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to differentiate antibodies against wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome from the vaccine strain TJM-F92 based on a recombinant Nsp2 protein/X. Wang, F. Wang, Z. G. Li [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2018. – V.251. – P. 151-154.
103. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Infections in Adults with Bacteremia and Community-Acquired Pneumonia: Clinical Comparison of Pneumococcal PCR and Culture Methods / M. D. Smith, C. L. Sheppard, A. Hogan [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – V.47(4). – P.1046-1049.
104. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Lower Respiratory Infection in Hospitalized Children by Culture, Polymerase Chain Reaction, Serological Testing, and Urinary Antigen Detection / I. C. Michelow, J. Lozano, K. Olsen [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2002. – V.34(1). – P.1-11.
105. Differential role of MyD88 signaling in *Streptococcus suis* serotype 2-induced systemic and central nervous system disease / J. P. Auger, M. O. Benoit-Biancamano, C. Bedard [et al.] // International Immunology. – 2019. – V.31(11). – P.697-714.
106. Discrimination between virulent and nonvirulent *Streptococcus suis* type 2 strains by enzyme-linked immunosorbent assay / U. Vecht, H. J. Wisselink, J. Anakotta, H. E. Smith // Veterinary Microbiology. – 1993. – V. 34 (1). – P.71-82.
107. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A *Streptococcus* / M. J. Walker, T. C., Barnett, J. D. McArthur, [et al.] / Clinical Microbiology Reviews. – 2014. – V.27(2). – P. 264–301.

108. Dominguez, J. PCR Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in Serum Samples for Pneumococcal Pneumonia Diagnosis / J. Dominguez, N. Gali, L. Matas // Clinical Microbiology and Infection. – 2001. – 7(3). – P.164-166.
109. Domínguez-Punaro, M. C. Studies on the exaggerated inflammatory response caused by *Streptococcus suis* at systemic and central nervous system levels / M. C. Domínguez-Punaro // Dissertation for the degree Université de Montréal. – 2010 – P.423.
110. Emerging infectious diseases in water buffalo: An economic and public health concern / M. A. Villanueva, C. N. Mingala, G. A. S. Tubalinal [et al.] // IntechOpen. – 2018. – Article number: 73395.
111. Enhancement of loop mediated isothermal amplification's sensitivity and speed by multiple inner primers for more efficient identification of Vibrio / A. Lamalee, C. Changsen, W. Jaroenram, S. Buates // MethodsX. – 2023. – V.11. – Article number 102328.
112. Establishment and Application of an Indirect ELISA for the Detection of Antibodies to Porcine *Streptococcus suis* Based on a Recombinant GMD Protein /N. Dong, Z. Wang, Q. Sun [et al.] // Journal Animals. – 2023. – V. 13(4). – P. 719.
113. Evaluation of a PCR Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Respiratory and Nonrespiratory Samples from Adults with Community-Acquired Pneumonia / D. R. Murdoch, T.P. Anderson, K.A. Beynon [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – V.41(1). – P.63-66.
114. Evans, A. C. The Effect of Hemolytic Streptococci and Their Products on Leucocytes / A.C. Evans // Public Health Reports (1896-1970). – 1931. – 46(43). – P.2539.
115. Facklam, R. R. A review of the microbiological techniques for the isolation and identification of streptococci / R. R. Facklam // CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 1976. – V. 6(4). – P. 287-317.
116. Facklam, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes /R. Facklam // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – V.15(4). – P.613-630.

117. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza* / A. Fleming // British Journal of Experimental Pathology. – 1929. – V. 10 (3). – P.226-236.
118. Fluit, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* / A. C. Fluit // Clinical Microbiology and Infection. – 2012. – V.18. – P. 735-744.
119. Fong, I. W. Zoonotic Streptococci: A Focus on *Streptococcus suis* / I.W. Fong // Emerging Zoonoses: A Worldwide Perspective. – 2017. – P.189-210.
120. Gardam, M. A. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* an Emerging Community Pathogen A Review of the Literature / M. A. Gardam // Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. – 2000. – V.11(4). – P. 202-211.
121. Gillaspy, A. F. *Staphylococcus* / A. F. Gillaspy, J. J. Iandolo // Encyclopedia of Microbiology. – 2009. – P.293-303.
122. Golban, R. Microbiological researches of the virulent species of *Staphylococcus aureus* in pathological abscesses at swines / R. Golban, N. Berzoi // Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. – 2022. – V. LXVIII (1). – P.82-86.
123. Gottschalk, M. Streptococcosis /M. Gottschalk, M. Segura // Diseases of Swine. – 2019. – V.64. – P.934–950.
124. Gould, D. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature / D. Gould, A. Chamberlaine // Journal of Clinical Nursing, 1995. – V.4 (1). – P.5-12.
125. Gray, B. M. Streptococcal infections - Bacterial infections of humans: epidemiology and control/ B. M Gray, D.L. Stevens // 2009. – P.743-782.
126. Haag, A. F. *Staphylococcus aureus* in Animals// A. F Haag, J. R. Fitzgerald, J. R. Penadés // Microbiology spectrum. – 2019. – V.7(3). – P. 10.
127. Hamza A., Dorgham S., El-Shibiny A. Probiotics and prebiotics in the prevention of staphylococcal diseases in livestock / Hamza A., Dorgham S., El-Shibiny A. // Journal of Applied Microbiology . – 2020. – V. 129(4). – P. 741–752.
128. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs / de Neeling, A. J., van den Broek, M. J. M., Spalburg [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2007. – V. 122(3-4). – P. 366-372.

129. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA / R. J. Meagher, A. Priye, Y. K. Light [et al.] // Analyst. – 2018. – V.143(8). – P.1924-1933.
130. Investigation of the location and secretion features of *Candida albicans* enolase with monoclonal antibodies / Z. He, J. Piao, Ya. Qiu [et al.] // Annals of Microbiology. – 2022. – V.72. – Article number: 25.
131. Isolation and antibiogram of *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Escherichia coli* isolates from clinical and subclinical cases of bovine mastitis / N. N Mohanty, P. D. Priyaranjan, S. S. Pany [et al.] // Veterinary World. – 2013. – V.6. – P. 739-743.
132. Isolation and identification of *Streptococcus suis* from sick pigs in Bali, Indonesia /N.K. Besung, I.G.K. Suarjana, K.K. Agustina [et al.] // BMC Research Notes. – 2019 – V.12(1). – P.795.
133. Isolation of *Streptococcus suis* using a selective medium / S. Rosendal, J. Breton, J. Henrichsen, L. [et al.] // Canadian Journal of Veterinary Research. – 1986. – V.50(4). – P.537-539.
134. Jevons, M. Celbenin-resistant staphylococci / M. Jevons // British Medical Journal. – 1961. – V.1(5219). – P.124-125.
135. Johnson, L. P. Transfer of group A streptococcal pyrogenic exotoxin production to nontoxigenic strains of lysogenic conversion / L. P. Johnson, P. M. Schlievert, D. W. Watson // Infection and Immunity. – 1980. – V. 28(1). – P. 254-257.
136. Kluytmans, J. A. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections / J. A. Kluytmans, J. W. Wertheim // Infection. – 2005. – V. 33. – P.3-8.
137. Laishevcev, A.I. Etiological structure of Streptococcosis of pigs in various regions of the Russian Federation / A. I. Laishevcev, A. V. Kapustin // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2018. – V. 2(74). – P. 257-260.

138. Lassok, B. From Pig to Pork: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Pork Production Chain / B. Lassok, B. A. Tenhagen // Journal of Food Protection. – 2013. – V. 76 (6). – P. 1095-1108.
139. Licitra, G. Etymologia: *Staphylococcus* / G. Licitra // Emerging Infections Diseases. – 2013. – V. 19 (9). – P. 1553.
140. Martinez-Lopez B., Smith T., Segura M. Combined antibiotic therapy for the treatment of streptococcal infections in swine / B. Martinez-Lopez, T. Smith, M. Segura // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2019. – V.63(5). – P. e02345-18.
141. Monteiro, M. S. The sow microbiome: Current and future perspectives to maximize the productivity in swine herds / M. S. Monteiro, A. P. Poor, B. B. D. Muro // Journal of Swine Health and Production. – 2022. – V.30(4). – P.238-250.
142. Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection // W. J. Mason, J. S. Blevins, K. Beenken / Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – V. 39 (9). – P. 3332-3333.
143. Musher, D. M. Infections due to *Staphylococcus aureus* / D. M. Musher, S. O. McKenzie // Medicine. – 1977. – V.56(5). – P.383-410.
144. Nielsen, O. L. A pig model of acute *Staphylococcus aureus* induced pyemia/ O. L. Nielsen // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2009. – V. 51(14). – P.1-8.
145. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells / L. Benga, R. Goethe, M. Rohde [et al.] // Cellular Microbiology. – 2004. – V.6(9). – P.867-881.
146. Ogston, A. On Abscesses / A. Ogston // Rev Infect Dis. – 1984. – V.6(1). – P. 122-128.
147. Okwumabua, O. E. Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (Ribotyping) / O. E Okwumabua, M. Chengappa, J Staats // Journal of Clinical Microbiology 1995. – V.33(4). – P.968-972.

148. Park, H. K. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae* / H. K. Park, H. J. Lee, W. Kim // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – V.310(1). – P. 48-53.
149. Parker, M. T. A survey of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* / M. T. Parker // Postgraduate Medical Journal. – 1964. V. 40. – P.170-178.
150. Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-induced Increase in Susceptibility to *Streptococcus suis* Infection / R. Thanawongnuwech, G. Brown, P.G. Halbur [et al.] // Veterinary Pathology. – 2000. – V.37(2). – P.143-152.
151. Pathology and diagnosis of *Streptococcus suis* infections in pre-weaned piglets /M. Dinesh, J. Thakor, K.V. Vishwa [et al.] // Indian Journal of Veterinary Pathology. – 2020. – V.44(3). – P.144-153.
152. Phuektes, P. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* Causes of Bovine Mastitis / P. Phuektes, P. D. Mansell, G. F. Browning // Journal of Dairy Science. – 2001. – V. 84(5). – P.1140-1148.
153. Powers G.F. Age as a factor in streptococcosis / G.F. Powers, P.L. Boisvert // The Journal of Pediatrics. – 1944. – V.25(6). – P.481-504.
154. Preliminary identification of beta-hemolytic streptococci in throat swab cultures with a commercial blood agar slide (Streptocult) / P. Christensen, D. Danielsson, B. Hovelius, J. Kjellander // Journal of Clinical Microbiology. – 1982. – V. 15(6). – P.981-983.
155. Proinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a whole-blood culture system / M. Segura, G. Vanier, D. Al-Numani [et al.] // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2006. – V.47(1). – P. 92-106.
156. Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia among HIV-infected adults with urine antigen detection /D. R. Boulware, C. L. Daley, C. Merrifield [et al.] // Journal of Infection. – 2007. – V.55(4). – P.300-309.
157. Rapid identification of pneumococci, enterococci, beta-haemolytic streptococci and *S. aureus* from positive blood cultures enabling early reports/ M.

- C. Larsson, E. Karlsson, H. Woksepp [et al.] // BMC Infectious Diseases. – 2014. – V. 14. – Article number: 146.
158. Rapid PCR-Based Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in Cerebrospinal Fluid / A. M. Kearns, R. Freeman, O. M. Murphy [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – V.37(10). – P.3434.
159. Reams, R. Y. *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 // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1994. – V. 6. – P.217-227.
160. Reams, R. Y. *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, // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1994. – V. 6. (3) – P.326-334.
161. Recent Records on Bacterial Opportunistic Infections via the Dietary Route / F. Rossi, S. Santonicola, C. Amadoro // Microorganisms. – 2023. – V.12(1). – P. 69.
162. Review and meta-analysis of a urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumonia* / A. Sinclair , X. Xie, M. Teltscher, N.Dendukuri // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – V. 51(7). – P. 2303-2310.
163. Reynolds, L. A. Superbugs and Superdrugs: a history of MRSA / L. A. Reynolds, E. M. Tansey // Wellcome Witnesses to Twentieth Century Medicine. London: Wellcome Trust Centre for History of Medicine at UCL. – 2008. – V. 32. – P.172.
164. Risk factors for *Streptococcus suis* infection: A systematic review and meta-analysis / Rayanakorn A., Goh B.H., Lee L.H. [et al.] //Scientific Reports. – 2018. – Article number: 13358.
165. Rivera-Benítez, J. F., Swine health: history, challenges and prospects / J. F. Rivera-Benítez, J. D. Luz-Armendáriz, J. Hernández-García // Revista mexicana de ciencias pecuarias. – 2021. – V.12(5) – P.1234-1245.

166. Rosebury, T. The Aerobic Non-hemolytic Streptococci: a Critical Review of their Characteristics and Pathogenicity with Special Reference to the Human Mouth and to Subacute Bacterial Endocarditis/T. Rosebury // Medicine. – 1944. – V.23(3). – P.249-280.
167. Safdar, A. *Staphylococcus, Streptococcus, and Enterococcus* / A. Safdar, D. Armstrong // Principles and practice of transplant infectious diseases. – 2019. – P.419-445.
168. Sensitive and Specific Method for Rapid Identification of *Streptococcus pneumoniae* Using Real-Time Fluorescence PCR / J.C. McAvin, P.A. Reilly, R.M. Roudabush [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2001 – V.39(10). – P.3446-3451.
169. Sensitivity and specificity of the *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: A meta-analysis/ N. Horita, N. Miyazawa, R. Kojima, N. Kimura [et al.] // Respiratory Medicine. – 2013. – V.18(8). – P.1177-1183.
170. Shabayek, S. Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology / S. Shabayek, B. Spellerberg / Frontiers in Microbiology. – 2018. – V.9. – Article 437.
171. Simultaneous detection of multiple pathogens by multiplex PCR coupled with DNA biochip hybridization / H.-Y Tung, W.-C. Chen, Ou, B.-R. [et al.] // Laboratory Animals, 2017. – V. 52(2). – P. 186–195.
172. Sitthicharoenchai, P. Cases of high mortality in cull sows and feeder pigs associated with *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* septicemia / P. Sitthicharoenchai, R. Derscheid // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2017. –V. 32 (4). – P.501-627.
173. Sivapathasundharam, B. Bacterial infections of oral cavity /B. Sivapathasundharam, N. Gururaj // Shafer's textbook of Oral Pathology. – 2024. – P. 297-300.
174. Skinner, D. A study of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with

- experimental infection in animals / D. Skinner, C. S. Keefer // Archives of Internal Medicine. – 1941. – V.68 (5). – P.851.
175. Soliman, H. Detection of fish pathogens by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique / H. Soliman, M. Saleh, M. El-Matbouli // Veterinary Infection Biology. – 2015. – V.1274 – P.163-173.
176. Soroka, M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR / M. Soroka, B. Wasowicz, A. Rymaszewska // Cells. – 2021. – V. 10(8). – P.1931.
177. Specific quantitative detection of *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in co-infection and mixed biofilms / H.Wang, Q. Fan, D. Grenier [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2022. – V. 12. – Article number: 898412.
178. Spoja, B. Temperature Influences Phenotypic and Biofilm Changes in Mono- and Co-cultures of *Streptococcus suis* and *Glaesserella parasuis* / B. Spoja // Dissertation for the degree University of Guelph – 2022. – P.164.
179. Spread of LA-MRSA CC398 in Danish mink (Neovison vison) and mink farm workers / J. E. Hansena, M. Steggerb, K. Pedersen [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2020. – V.245. – Article number: 108705.
180. Staphylococcal Infections - Recent Advances and Perspectives / X.-D. Zhang, B. Gu, M. Usman // Book Staphylococcal Infections - Recent Advances and Perspectives. – 2013. – P. 11-23.
181. *Staphylococcus* / A.C. Pickering, A.F. Haag, J.R. Penades, J.R. Fitzgerald // Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fifth Edition. – 2022. V.25. – P. 543-564.
182. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management / S.Y.C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger E [et al.] // ASM Journals Clinical Microbiology Reviews. – 2015. – V.28(3). – P. 31.
183. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model

- of infection / M. C. Domínguez-Punaro, M. Segura, M. M. Plante [et al.] // The Journal of Immunology. – 2007. – V. 179 (3). – P. 1842-1854.
184. *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR / A. Kerdsin, Y. Akeda, R. Hatrongjit [et al.] // Journal of Medical Microbiology. – 2014. – V. 63(6). – P.824-830.
185. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent— an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing / G. Goyette-Desjardins, J.-P Auger, J. Xu [et al.] // Emerging Microbes & Infections. – 2014. – V.3(6). – P.e45-e45.
186. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? / M. Gottschalk, J. Xu, C. Calzas M.Segura // Future Microbiol. – 2010. – V.5(3). – P.371-391.
187. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products Part I / J.Dutkiewicz, J. Sroka, V. Zajac, [et al.] // Epidemiology. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2017. – V. 24(4). – P. 683-695.
188. *Streptococcus suis*: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II – Pathogenesis /J. Dutkiewicz, V. Zajac, J. Sroka, [et al.] // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2018. – V. 25(1). – P.186-203.
189. *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen / F. L. Heiman, H. D. Trung Nghia, W. Taylor [et al.] // Clinical infectious disease. – 2009. – V. 48(5). – P.617-625.
190. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen / Z. R. Lun, Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li // The Lancet Infectious Diseases. 2007. – V.7(3). – P.201-209.
191. Tam, K. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes / K. Tam, V. J. Torres // Microbiology Spectrum. – 2019. – V.7(2). – P. 1-34.

192. The Antiphagocytic Activity of SeM of *Streptococcus equi* Requires Capsule / J. F. Timoney, P. Suther, S. Velineni, S. C. Artiushin // J. Equine Sci. – 2014 – V.25(2). – P.53-56.
193. The diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections / S. H. Gillespie, M D Smith, A. Dickens, J. G. Raynes [et.al] // Reviews in Medical Microbiology. – 1994. – V.5(4). – P.224-232.
194. The Enhanced Pneumococcal LAMP Assay: A Clinical Tool for the Diagnosis of Meningitis Due to *Streptococcus pneumoniae* / D. W. Kim , P. E. Kilgore, E. J. Kim [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V.7(8). – Article number: e42954.
195. The inflammatory response and neuronal injury in *Streptococcus suis* meningitis / J. Seele, S.C. Tauber, S. Bunkowski [et al.] // BMC Infectious Diseases. – 2018. – V.18(1). – P. 297.
196. Thomer L. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections / L. Thomer, O. Schneewind, D. Missiakas // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2016. – V.11. – P. 343-364.
197. Tillett, W. S. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci- Bacteriological Reviews/ W. S. Tillett // Journal of Experimental Medicine. – 1933. – V.58(4). – P.485-502.
198. Toll-like receptor 2 is partially involved in the activation of murine astrocytes by *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent of meningitis / H. Zheng, H., M.C. Domínguez-Punaro, M. Segura, M. [et al.] // Journal of Neuroimmunology. – 2011. – V.234(1-2). – P.71-83.
199. Tsutsumi, Y. - Pathology of Streptococcal Infections - /Y. Tsutsumi // IntechOpen. – 2022. – intechopen.105814.
200. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis* / M. Jacques, M. Gottschalk, B. Foiry // Journal of Bacteriology. – 1990. – V. 172(6). – P. 2833-2838.
201. Vadeboncoeur, N. Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis*

- serotype 2 /N. Vadeboncoeur // FEMS Immunology & Medical Microbiology.* – 2003. – V.35(1). – P.49-58.
202. Variable Capacity for Persistent Infection and Complications of Gram-Positive Cocci: Streptococci and Staphylococci / B. Ferguson, C. Woods // In book: *Sequelae and Long-Term Consequences of Infectious Diseases*. – 2014. – P. 87-106.
203. Vecht, U. *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (Part I) / U. Vecht, L. Van Leengoed, E. R. M. Verheijen // *Veterinary Quarterly*. – 1985. – V.7(4). – P.315-321.
204. Wadsworth, A. The toxigenic properties of hemolytic streptococci from human infections / A. Wadsworth, J. M. Coffey // *The Journal of Immunology*. – 1938. – V.35(2). – P.121-130.
205. Weese, J. S. Staphylococcal infections / J. S. Weese, J.F. Prescott // *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*. – 2021. – P.611-626.
206. Wegener, H. C. Diagnostic Value of Phage Typing, Antibiogram Typing, and Plasmid Profiling of *Staphylococcus hyicus* from Piglets with Exudative Epidermitis / H. C. Wegener // *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. – 1993. – V.40(1). – P.13-20.
207. Wisselink H.J., Joosten J.J., Smith H.E. Antibiotic resistance in *Streptococcus suis*: A growing concern for veterinary and public health // *Veterinary Research*. – 2015. – V.46(1). – P. 1–10.
208. Xia, X., Wang, X., Wei, X., Jiang, J., Hu, J. - Methods for the detection and characterization of *Streptococcus suis*: from conventional bacterial culture methods to immunosensors/ X. Xia., L. Wang, Z. Shen, [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2018. – V.111(12). – P.2233-2247.
209. Zhang W., Chen Z., Li H. Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in China // *Journal of Veterinary Science* . – 2017. – V.18(2). – P. 123–130.

210. Zhu, Y., A CRISPR-Cas12a-based platform facilitates the detection and serotyping of *Streptococcus suis* serotype 2 / L. Wang, J. Sun, J. Zhao [et al.] // Talanta. – 2024. – V.267. – Article number: 125202.

ПРИЛОЖЕНИЯ



УТВЕРЖДАЮ

Директор ГБУ «Кропоткинская краевая
ветеринарная лаборатория»
Черных О.Ю.
"31" *Ольга Черных* 2024 г.

АКТ № 1

Об испытаниях и внедрении оптимизированного акта верификации и валидации
инструкции и диагностического набора реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО
НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК *Streptococcus spp*

Мы, нижеподписавшиеся, заместитель директора ГБУ ККВЛ Ткаченко В.П.,
руководитель испытательной лаборатории (ИЛ) Стрекаловская М.В., ветеринарный врач
Толстова Е.А. составили настоящий Акт в том, что с 31.03.2024 по
31.05.2024 года провели испытание инструкции и диагностического набора
реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК
Streptococcus spp по оптимизированному акту верификации и валидации, для
последующего внедрения в практику лаборатории.

Испытания проводились на диагностических наборах
«ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ», набор реагентов «pzytech» для
выявления ДНК *Streptococcus pneumoniae* и набор реагентов ООО «ДНК-Технология» для
выявления ДНК *Streptococcus agalactiae* методом полимеразной цепной реакции с
детекцией в режиме реального времени. Оценку специфичности *in vitro* проводили на
образцах ДНК стрептококков из государственной коллекции патогенных
микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» и ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России.

Исследование проводилось в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах),
согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы
амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим
микроорганизмы I–IV групп патогенности.

В соответствии с ГОСТ Р 70150-2022 Тест системы для диагностики болезней
животных методом полимеразной цепной реакции была проведена оценка специфичности,
чувствительности, стабильности, сходимости и воспроизводимости результатов тест
системы ««ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для обнаружения ДНК
Streptococcus spp.

Для реализации процедуры, из заранее проицессированных холостых проб
готовились две холостые и две с добавлением синтетического положительного контроля
ДНК *Streptococcus spp* входящего в состав диагностический набора. Пробы готовились
путем деления их на серии.

Для выбранного значения диапазона определения проводилась серия по два
параллельных исследования (параллельные исследования проводились двумя
операторами с минимальной разницей во времени для обеспечения сходимости
результатов).

Верификационные испытания подтвердили высокую точность и
воспроизводимость разработанного алгоритма. Данный алгоритм обеспечивает
комплексный подход к оценке качества диагностических тест-систем, включая

Продолжение приложения А

специфичность, чувствительность, стабильность, сходимость и воспроизводимость. Применение оптимизированного акта позволяет гарантировать высокое качество и надежность диагностических тестов, что является ключевым фактором для эффективного выявления и контроля инфекционных заболеваний у свиней.

Заключение. Считаем, что оптимизированный акт верификации и валидации инструкции и диагностического набора реагентов «ВЕТСКРИН.СТРЕПТОПОЛ» ООО НПФ «ЛИТЕХ» для выявления ДНК *Streptococcus spp* можно использовать для работы в ветеринарной лаборатории.

Заместитель директора



Б.П. Ткаченко

Руководитель ИЛ



М.В. Стрекаловская

Ветеринарный врач



Е.А. Толстова



АКТ № 2
Об испытаниях (внедрении) препарата «ЭНТРИКИМ»

Мы, нижеподписавшиеся, ведущий ветеринарный врач ОГУ «Ивантеевская рай СББЖ» Руденко Я.В., гл. ветврач к-за им «Чапаева» Основин О.М., аспирант Вавиловского университета Толстова Е.А. составили настоящий Акт в том, что с 28.04.2025 по 29.05.2025 года провели испытание ветеринарного препарата «5% раствора энтрикима», изготовленных ООО «АЛИСА».

Испытания проводились на поросятах от 2-х недельного до 4-х месячного возраста с подострым и хроническим течением стрептококкоза и стафилококкоза, в количестве 78 голов

Для определения оптимальной дозы препарата «5% раствор энтрикима» в соответствии с диагнозом стрептококкоз или стафилококкоз, животные были разбиты на 2 групп(ы) по 9 поросят, каждая группа была разделена на 3 подгруппы по 3 головы, получавших препарат в разных дозах и режимах применения.

Животные в группах подбирались по признаку «аналогов» (живая масса, кормление, содержание).

Препарат «5% раствор энтрикима» применялся в дозах: в дозе 2 см³ и 4 см³ /1 кг массы пороссят, один раз в сутки. Курс лечения: 3-5-7 дней.

Побочные явления в физиологии и поведении животных после применения препарата не выявлены. Результаты лечебной эффективности 5% раствора энтрикима представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1 – Подбор оптимальной дозы препарата «5% раствор энтрикима» для лечения стрептококкоза и стафилококкоза у поросят

Группа животных (n=3 в каждой группе)	Режим применения и способы введения	Курс лечения	Доза препарата на 1 кг массы тела*	Терапевтическая эффективность %
Лечение стрептококкоза				
1	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и давали с кормом один раз в день.	3 дня	2 см ³ /1 кг массы тела	10%
2	Перед применением препарат разводили	5 дней	2 см ³ /1 кг массы тела	25%

Продолжение приложения Б

	водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.			
3	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	7 дней	4 см ³ /1 кг массы тела	85%
Лечение стафилококкоза				
4	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и скармливали с кормом один раз в день.	3 дня	2 см ³ /1 кг массы тела	0%
5	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	5 дней	2 см ³ /1 кг массы тела	30%
6	Перед применением препарат разводили водой 1:1 и добавляли в питьевую воду.	7 дней	4 см ³ /1 кг массы тела	80%

Для оценки терапевтической эффективности нового ветеринарного препарата «5% раствор энтрикима» и стандартной схемы антибактериальной терапии исследования проводились на 60 поросятах. Животные были разделены на 4 равные группы по 15 голов в каждой. Группы формировались с учётом возраста, массы тела и клинической выраженности заболевания. Все животные находились в аналогичных условиях содержания и кормления. Группа 1 (опытная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом стрептококковая инфекция. Для лечения использовали новый ветеринарный препарат «5% раствор энтрикима», в дозе 4 см³/1 кг массы тела, курс лечения — 7 дней; Группа 2 (контрольная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом стрептококковая инфекция. Для лечения использовали общепринятую схему, принятую в хозяйстве, которая включала в себя применение антибиотиков широкого спектра действия в рекомендованных производителем дозах в течение 5–7 дней;

Группа 3 (опытная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом стафилококковая инфекция. Для лечения использовали новый ветеринарный препарат «5% раствор энтрикима», в дозе 4 см³/1 кг массы тела, курс лечения — 7 дней; Группа 4 (контрольная) состояла из 15 поросят с клинически и лабораторно подтверждённым диагнозом стафилококковая инфекция. Для лечения использовали общепринятую схему, принятую в хозяйстве, которая включала в себя применение антибиотиков широкого спектра действия в рекомендованных производителем дозах в течение 5–7 дней.

Продолжение приложения Б

Таблица 2 – Эффективность лечения стрептококкоза и стафилококкоза

Показатель	Группа	
	Опытная	Контрольная
Препараты	5% раствор энтрикима	Стандартная схема лечения
Лечение стрептококкоза		
Длительность терапии, сут.	7	7
Число поросят, гол.	15	15
Выздоровело*, гол.	13	10
Выздоровело, %	92%	76%
Пало, гол.	0	3
Пало, %	0%	20%
Переход в хроническую форму, гол.	2	2
Срок выздоровления, сут.	5-6	7-10
Эффективность, %	86,7%	66,7%
Лечение стафилококкоза		
Длительность терапии, сут.	7	7
Число поросят, гол.	15	15
Выздоровело, гол.	12	9
Выздоровело, %	80%	60%
Пало, гол.	0	2
Пало, %	0%	13,3%
Переход в хроническую форму, гол.	3	4
Срок выздоровления, сут.	5-7	7-10
Эффективность, %	80%	60%

Примечание: Под «выздоровлением» понимали полное исчезновение клинических признаков болезни: снижение температуры, восстановление двигательной активности, нормализация аппетита и поведения.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высокой лечебной эффективности 5% раствора энтрикима в дозе 4,0 см³/1 кг массы при 7-ми дневном курсе применения.

Считаем, что ветеринарный препарат «5% раствор энтрикима» в дозе 4,0 см³/1 кг массы при 7-ми дневном курсе применения, является эффективным препаратом для лечения стрептококкоза и стафилококкоза у поросят.

Ведущий ветеринарный врач



(подпись)

Руденко Я.В.
ФИО

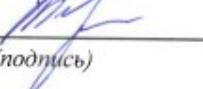
Главный ветврач хозяйства



(подпись)

Основин О.М.
ФИО

Аспирант Вавиловского университета



(подпись)

Е.А. Толстова
ФИО



ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
"КРОПОТКИНСКАЯ КРАЕВАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ"
Красноармейская ул., д 303, г. Кропоткин,
Краснодарский край, 352391
Тел.: (861-38) 6-23-14, факс: (861-38) 6-54-85,
E-mail: gukkv150@kubanvet.ru
ИНН 2313019081 ОГРН 1042307966491

3105.дд42, № 331
На № _____ от _____

СПРАВКА

Настоящим подтверждаем проведение молекулярно-генетических (LAMP петлевая изотермическая амплификация) исследований на выявление ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

Объекты исследования:

- 1) 20 проб легких от трупов поросят;
- 2) 50 проб мазков из носовых ходов свиноматок.

Результаты исследований на 1 л.

Заместитель директора
ГБУ «Кропотkinsкая краевая
ветеринарная лаборатория»

В.П. Ткаченко



Результаты лабораторных испытаний

Таблица 1 - Результаты молекулярно-генетического исследования проб легких от трупов поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1.	<i>Streptococcus pneumonia</i>	20	2	30,20
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	7	31,1

Примечание: Результаты LAMP: Если Ct на канале HEX определено $Ct \leq 50$, а на канале FAM отсутствует или определено, а также когда Ct на канале HEX определено меньше граничного, $Ct \leq 55$, а на канале HEX отсутствует – результаты можно считать достоверными. Ct – это пороговый цикл амплификации, на котором обнаружен возбудитель болезни.

Таблица 2 - Результаты молекулярно-генетического исследования проб смызов из носовых ходов свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1.	<i>Streptococcus pneumonia</i>	50	4	32,3
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	3	33,8

Примечание: Примечание: Результаты LAMP: если Ct на канале HEX определено $Ct \leq 50$, а на канале FAM отсутствует или определено, а также когда Ct на канале HEX определено меньше граничного, $Ct \leq 55$, а на канале HEX отсутствует – результаты можно считать достоверными. Ct – это пороговый цикл амплификации, на котором обнаружен возбудитель болезни.

И. о. заведующего отдела диагностики
вирусных заболеваний, молекулярной
диагностики инфекционных заболеваний и
генетических исследований, гистологии и
диагностики прионных исследований

О.В. Доценко



ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
"КРОПОТКИНСКАЯ КРАЕВАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ"
Красноармейская ул., д 303, г. Кропоткин,
Краснодарский край, 352391
Тел.: (861-38) 6-23-14, факс: (861-38) 6-54-85,
E-mail: gukkvl50@kubanvet.ru
ИНН 2313019081 ОГРН 1042307966491

3405 даты № 332
На № _____ от _____

СПРАВКА

Настоящим подтверждаем проведение бактериологических исследований патологического материала от свиней для обнаружения микроорганизмов: *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*, *S. zooepidemicus* и *Staphylococcus aureus*

Объекты исследования:

1. 10 трупов поросят;
2. 25 легких от свиноматок;
3. 40 смызов с поверхностей стен помещений для содержания животных;
4. 100 смызов из носовой полости свиноматок.

Результаты исследований на 1 л.

Заместитель директора
ГБУ «Кропотkinsкая краевая
ветеринарная лаборатория»

В.П. Ткаченко



Продолжение приложения Г

Результаты лабораторных испытаний

Таблица 1- Результаты бактериологического исследования трупов поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1.	<i>S. suis</i>	10	2
2.	<i>S. uberis</i>	10	1
3.	<i>S. pneumonia</i>	10	1
4.	<i>E. faecalis</i>	10	1
5.	<i>S. zooepidemicus</i>	10	-
6.	<i>S. aureus</i>	10	2

Таблица 2 - Результаты бактериологического исследования легких от свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1.	<i>S. suis</i>	25	3
2.	<i>S. uberis</i>	25	-
3.	<i>S. pneumonia</i>	25	2
4.	<i>E. faecalis</i>	25	-
5.	<i>S. zooepidemicus</i>	25	-
6.	<i>S. aureus</i>	25	3

Таблица 3 - Результаты бактериологического исследования смыков с поверхности стен помещений, где содержатся животные

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1.	<i>S. suis</i>	40	-
2.	<i>S. uberis</i>	40	-
3.	<i>S. Pneumonia</i>	40	-
4.	<i>E. faecalis</i>	40	1
5.	<i>S. zooepidemicus</i>	40	-
6.	<i>S. aureus</i>	40	1

Таблица 4 - Результаты бактериологического исследования смыков из носовой полости свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1.	<i>S. suis</i>	100	3
2.	<i>S. uberis</i>	100	-
3.	<i>S. Pneumonia</i>	100	5
4.	<i>E. faecalis</i>	100	1
5.	<i>S. zooepidemicus</i>	100	-
6.	<i>S. aureus</i>	100	1

Заведующий отделом диагностики
бактериальных инфекций, пищевой
микробиологии и ветеринарно-
санитарной экспертизы


 Манакова А.Ю.



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
"КРОПОТКИНСКАЯ КРАЕВАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ"**
 Красноармейская ул., д 303, г. Кропоткин,
 Краснодарский край, 352391
 Тел.: (861-38) 6-23-14, факс: (861-38) 6-54-85,
 E-mail: gukkv150@kubanvet.ru
 ИНН 2313019081 ОГРН 1042307966491

31.05.2014, № 333
 На № _____ от _____

СПРАВКА

Настоящим подтверждаем проведение иммуноферментных исследований сывороток крови свиней для обнаружения антител к *Streptococcus suis* и оценки состояния иммунитета против стрептококкоза.

Объекты исследования:

100 проб сыворотки крови от свиноматок

Результаты исследований на 1 л.

Заместитель директора
 ГБУ «Кропоткинская краевая
 ветеринарная лаборатория»

В.П. Ткаченко



Результаты лабораторных испытаний**Таблица 1- Результаты ИФА сыворотки крови свиней на антитела к *Streptococcus suis***

№ п/п	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования
1.	100	10

И. о. заведующего отдела
диагностики вирусных заболеваний,
молекулярной диагностики
инфекционных заболеваний и
генетических исследований,
гистологии и диагностики прионных
исследований

О.В. Доценко



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
"КРОПОТКИНСКАЯ КРАЕВАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ"**
Красноармейская ул., д 303, г. Кропоткин,
Краснодарский край, 352391
Тел.: (861-38) 6-23-14, факс: (861-38) 6-54-85,
E-mail: gukklv150@kubanvet.ru
ИНН 2313019081 ОГРН 1042307966491

31.05.2014 № 334
На № _____ от _____

СПРАВКА

Настоящим подтверждаем проведение молекулярно-генетических (ПЦР real time) исследований на выявление ДНК *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus aureus*.

Объекты исследования:

- 1) 20 проб легких от трупов поросят;
- 2) 50 проб мазков из носовых ходов свиноматок.

Результаты исследований на 1 л.

Заместитель директора
ГБУ «Кропоткинская краевая
ветеринарная лаборатория»

В.П. Ткаченко



Продолжение приложения Е

Результаты лабораторных испытаний

Таблица 1- Результаты молекулярно-генетического исследования проб легких от трупов поросят

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1.	<i>Streptococcus spp.</i>	20	5	29,10
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	7	31,12

Примечание: Результаты ПЦР при указании значений Ct: значение Ct < 27 соответствует высокому количеству антигена Ct <= 30 среднему, Ct > 30 низкому количеству антигена. Число Ct - условный показатель определения микробной нагрузки. Ct – это пороговый цикл амплификации, на котором обнаружен возбудитель болезни.

Таблица 2 - Результаты молекулярно-генетического исследования проб смызов из носовых ходов свиноматок

№ п/п	Микроорганизм	Количество исследованных проб	Количество положительных результатов исследования	Значение Ct
1.	<i>Streptococcus spp</i>	50	12	28,5
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	50	3	25,7

Примечание: Результаты ПЦР при указании значений Ct: значение Ct < 27 соответствует высокому количеству антигена Ct <= 30 среднему, Ct > 30 низкому количеству антигена. Число Ct - условный показатель определения микробной нагрузки. Ct – это пороговый цикл амплификации, на котором обнаружен возбудитель болезни.

И. о. заведующего отдела диагностики
вирусных заболеваний, молекулярной
диагностики инфекционных заболеваний и
генетических исследований, гистологии и
диагностики прионных исследований

О.В. Доценко