

Możliwości genetycznego różnicowania paciorkowców ze szczególnym uwzględnieniem *Streptococcus suis*

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANDRZEJ KOWALCZYK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.

Possibilities of genetic differentiation of Streptococci with particular emphasis on *Streptococcus suis*

Summary

The paper gives an insight into the genetic background of molecular diversity at the DNA level of the *Streptococcus* species. It pays particular attention to the specific molecular marker system of capsular types of *Streptococcus suis*, which have caused economically significant and widely spread outbreaks of swine disease. The paper presents a general overview of the most important sequences responsible for genetic variability, such as: genes encoding 16S rRNA, 23S rRNA, virulent factor genes, and sequence of the gene encoding the chaperon protein of 60kDa (cps) as well as RITS sequences. It compares the diversity of these sequences and their efficacy in genetic identification and describes the expediency of selected molecular techniques such as the polymerase chain reaction, enzymatic restriction analysis, hybridization methods as well as pulsed field gel electrophoresis. Finally, it discusses research which has investigated links between molecular markers system, virulence and geographic source of isolation.

Keywords: Streptococci, molecular markers, genetic differentiation of strains

W celu identyfikacji paciorkowców, podobnie jak innych bakterii, wykorzystuje się najczęściej metody ich charakterystyki fenotypowej. Bazują one na wykrywaniu obecności specyficznych polisacharydów otoczkowych (capsular polysaccharide – CPS), przy użyciu swoistych surowic hiperimmunizowanych oraz na ocenie właściwości biochemicznych drobnoustrojów, z wykorzystaniem odpowiednio dobranych substratów (1). Wymienione metody cechują się jednak dużym prawdopodobieństwem błędu, przez co nie jest możliwe zakwalifikowanie badanych drobnoustrojów do żadnego ze znanych typów.

Rozwój biologii molekularnej, opartej na technikach analizy kwasów nukleinowych, w tym reakcji łańcuchowej polimeryzacji (polymerase chain reaction – PCR), hybrydyzacji czy analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragments length polymorphism – RFLP), stworzył nowe możliwości różnicowania mikroorganizmów, nie tylko w obrębie rodzaju i gatunku, ale również w obrębie całego genomu. Różnicowanie genetyczne drobnoustrojów odbywa się także na podstawie oceny wybranych markerów genetycznych, które są łatwo rozpoznawalnymi sekwencjami, sprzężonymi z cechami fenotypowymi,

mi, charakterystycznymi dla danego gatunku (5). Do najbardziej popularnych markerów wykorzystywanych do celów identyfikacji mikroorganizmów, w tym paciorkowców, należą sekwencje 16S rDNA oraz geny kodujące czynniki wirulencji.

Spośród paciorkowcowych chorób świń największy problem stanowią infekcje wywoływane przez *Streptococcus suis* typ 2, dlatego na tym drobnoustroju skupiła się uwaga wielu zespołów badawczych, dążących do ustalenia jego patogenności oraz wektorów zakażeń, m.in. poprzez zainfekowane środowisko.

Polimorfizm sekwencji 16S rDNA

Zgodnie z danymi opublikowanymi przez Bentleya i Leigha (6), do określenia poszczególnych drobnoustrojów w obrębie rodzaju *Streptococcus* może zostać wykorzystany gatunkowo specyficzny region kodujący mniejszą podjednostkę rybosomu – 16S rRNA. Region ten jest na tyle stabilny i konserwatywny, a jednocześnie specyficzny gatunkowo, że jest najczęściej wykorzystywanym markerem genetycznym do charakterystyki genomowej tego rodzaju bakterii. Można go powielać np. techniką PCR. Wysoka liczba kopii sekwencji repetytywnych regionu 16S rDNA (heterogen-

ny obszar V2) pozostająca w komórce bakteryjnej również przyczynia się do jego wykorzystania do celów identyfikacyjnych (7).

W badaniach prowadzonych przez Drancourt i wsp., zsekwencjonowano obszar 16S rDNA szeregu gatunków szczepów bakteryjnych, należących do 47 różnych rodzajów, w tym 4 gatunków rodzaju *Streptococcus* (12). Wymienieni badacze wykazali wysoką stabilność genetyczną i konserwatywność badanej sekwencji, zarejestrowali oni podobieństwo genetyczne na poziomie powyżej 97% w odniesieniu do 159 spośród 177 badanych izolatów. W innych badaniach Kawamura i wsp. (16) zsekwencjonowali fragment 16S rDNA 34 gatunków bakterii w obrębie rodzaju *Streptococcus* i przy pomocy programu komputerowego określili pokrewieństwo filogenetyczne badanych szczepów. W ten sposób stwierdzono obecność sześciu grup filogenetycznych oraz określono, że homologia między grupą filogenetyczną *mitis* a pozostałymi grupami (*anginosus*, *salivarius*, *bovis*, *mutant* oraz *pyogenic*) kształtowała się na poziomie 93,8%, natomiast pomiędzy gatunkami tej samej grupy filogenetycznej stopień homologii był bardzo wysoki, powyżej 99%, jak na przykład w grupie *mitis* między gatunkami *S. oralis* i *S. mitis*, gdzie stwierdzono aż 99,93% homologii. Bentley i wsp. na podstawie wykrycia obecności 4 mutacji punktowych w sekwencji 16S rDNA szczepów *S. uberis* i *S. parauberis* zakwalifikowali je do dwóch odrębnych gatunków. Kawamura i wsp. (16), bazując na wynikach wcześniejszych analiz, przeprowadzonych przez Stackerbrandta i Goelba, sugerują, że dla określenia filogenetycznych zależności wśród gatunków prokariotycznych homologia zapisu sekwencji 16S rDNA powinna być niższa niż 97%.

Grupa badaczy japońskich uznała, że mutacje nukleotydowe wykryte w obrębie genu kodującego 16S rRNA nie są wystarczającą podstawą dla typowania w obrębie gatunku (24). Rozszerzyli oni obszar 16S rDNA o sekwencję dla dużej podjednostki rybosomowej – 23S rDNA, wykorzystując ją jako matrycę dla stworzenia gatunkowo specyficznych sond oligonukleotydowych do scharakteryzowania przedstawicieli szczepów z gatunku *S. anginosus*. W przeprowadzonych badaniach 21 szczepów, spośród 28 poddanych hybrydyzacji, zostało wyodrębnionych jako dające pozytywne sygnały reakcji. Hybrydyzacja pozwoliła na określenie pokrewieństwa filogenetycznego i wyodrębnienie szczepów spoza gatunku. Umożliwiło to również usystematyzowanie dwóch nie typujących się w sposób biochemiczny grup szczepów do dwóch gatunków: *S. anginosus* i *S. parasanguis*. Dzięki wykorzystaniu sekwencji 23S rDNA w omawianych badaniach możliwe było taksonomiczne przypisanie badanych szczepów do odpowiedniej gałęzi drzewa filogenetycznego, pomimo niskiego poziomu zróżnicowania, kształtującego się na poziomie zaledwie 1,5%, w obrębie genu kodującego małą podjednostkę 16S rRNA.

Heterogenność sekwencji 16S rDNA okazuje się najczęściej zbyt niska, by na poziomie DNA określić przynależność danych szczepów do określonych serotypów w obrębie badanego gatunku. Chatellier i wsp. analizując stopień analogii sekwencji genów 16S rDNA *S. suis* (10) wykreślili dendrogram dla 34 typów serologicznych. Wyodrębnili oni trzy klastery (grupy filogenetyczne). W obrębie dwóch pierwszych grup stwierdzili identyczność między niektórymi serotypami (6, 16, 18, 23, 29 i 31 w pierwszym klasterze oraz 2, 12, 14 i 15 w klasterze drugim), a rozbieżność między wszystkimi szczepami w obydwu grupach wahała się od 0,0104 do 0,0188. Wskazuje to jednoznacznie na wysoki stopień homologii nukleotydów w obrębie badanej sekwencji, w porównaniu z pozostałymi serotypami, gdzie różnice między serotypem 22 i 26, zakwalifikowanymi do trzeciej grupy filogenetycznej, a serotypem 1, reprezentującym grupę pierwszą, zawarte były w przedziale od 0,026 do 0,033. W omawianych badaniach wyodrębniono dodatkowo trzy serotypy (32, 33, 34), które w związku z rozbieżnością w sekwencji 16S rDNA, na poziomie 0,0449 i 0,057, uniemożliwiały zakwalifikowanie ich do głównej grupy dendrogramowej.

Wyniki prezentowanych powyżej badań potwierdzili także inni uczeni, którzy wykazali, że zbyt duża konserwatywność sekwencji 16S rDNA w obrębie innych rodzajów bakterii uniemożliwia wykorzystanie jej jako narzędzia różnicowania szczepów w obrębie jednego gatunku.

Badania nad sekwencją 16S rDNA prowadzili także m.in. Wenner i wsp. (27), którzy donieśli o istnieniu bloków insercyjnych między transkrybowanymi regionami rybosomalnego DNA (ribosomal internal transcribed spacer – RITS). Są to regiony repetytywne ułożone tandemowo, cechujące się wysoką heterogennością sekwencji. Ze względu na brak działania selekcji, związany z niekodującym charakterem tych miejsc genomu, stopień utrwalenia się mutacji jest porównywalnie wyższy niż w przypadku sekwencji ujawniających się fenotypowo, tak jak ma to miejsce w przypadku genu podjednostki 16S rRNA. Akumulacja mutacji nukleotydowych sprawia, że sekwencje RITS są o wiele bardziej heterogenne, a zatem mogą one być wykorzystywane jako alternatywne narzędzie przy określaniu zależności wewnątrz gatunkowych bakterii (13).

Takie insercyjne sekwencje między transkrybowanymi regionami rybosomalnego DNA, 16S-23S rDNA poddano analizie podczas identyfikacji paciorkowców w obrębie grupy filogenetycznej *mitis* (17). Baele i wsp. (3), badając różnice genetyczne między gatunkami tej grupy paciorkowców wykorzystali sekwencje RITS, powielając je metodą PCR i poddając otrzymane amplicony trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Największy polimorfizm fragmentów restrykcyjnych odnotowano po cięciu enzymem AluI. Na podstawie rozkładu elektroforetycznego fragmentów trawionych kom-

binacją pięciu enzymów restrykcyjnych (AluI, MboI, CfoI, HinfI, MaeII) wykreślono dendrogram dla dziesięciu różnych gatunków w obrębie badanej grupy bakterii. Wszystkie analizowane szczepy zostały zakwalifikowane do wyraźnie zróżnicowanych, indywidualnych klasterów. Nawet gatunki *S. oralis* i *S. mitis*, wcześniej charakteryzujące się wysoką homologią fragmentu 16S rDNA uformowały się w dwie oddzielne grupy (17). Ponadto, wysoki dystans genetyczny został przypisany jednemu ze szczepów *S. sanguis*, co potwierdzałoby wcześniejsze analizy porównawcze struktury białek tego szczepu i stanowiło podstawę wyłączenia go z grupy charakterystycznej dla tego gatunku (25).

Niektórzy badacze, pomimo wysokiego podobieństwa sekwencji 16S rDNA wśród poszczególnych gatunków rodzaju *Streptococcus*, wykorzystują ją nadal do badań molekularnych, mających na celu różnicowanie szczepów bakteryjnych. Dla przykładu: Rasmussen i wsp., prowadząc badania nad epidemiologią zakażeń wywołanych przez *S. suis*, wykorzystując odpowiednio dobrany zestaw enzymów restrykcyjnych oraz specyficzne sondy dla regionu 16S rDNA, opisywali zależności między genotypem, wirulencją, lekoopornością i rozmieszczeniem epidemiologicznym serotypu 2 *S. suis* (20). Stwierdzili oni m.in. obecność dwóch głównych rybotypów, ściśle związanych z odmiennym obrazem klinicznym oraz występowaniem streptokokoz u świń, od których wyizolowano omawiane patogeny. Gottschalk i wsp., analizując przypadki kliniczne infekcji wywołanych przez *S. suis* oraz prowadząc immunizację zwierząt, stworzyli mapę rozprzestrzeniania się paciorkowca o określonym rybotypie, zjadliwości oraz antybiotykooporności (15). Przedstawione badania pozwoliły na określenie relacji między wirulencją, geograficznym pochodzeniem szczepów oraz ich profilem genetycznym.

Polimorfizm długości regionu 16S rDNA jest kolejnym narzędziem badawczym umożliwiającym wykrycie i identyfikację gatunków paciorkowców. Trawiąc amplikon matrycy 16S RNA jednym tylko enzymem restrykcyjnym BpiI, odróżniono gatunek *S. porcinius* od innych gatunków bakterii, wykorzystanych w badaniach jako kontrola, a mianowicie: *S. suis*, *S. dysgalactiade* i *S. uberis* (1). Obecność charakterystycznych prążków, odpowiadających długości strawionego amplikonu, wykazano we wszystkich ośmiu przebadanych serotypach *S. porcinius*, podczas gdy w przypadku szczepów kontrolnych nie stwierdzono obecności prążków świadczących o reakcji trawienia enzymatycznego. Wysoko heterogenny obszar V2 regionu 16S rDNA wykazał zatem gatunkową specyficzność. Podobne wyniki uzyskano po trawieniu produktów amplifikacji regionu 16S rDNA szczepów paciorkowców grupy B wg Lancefielda, powodujących zapalenie wymion u krów. Obecność charakterystycznych produktów trawienia wykryto w odniesieniu do 14 serotypów streptokoków grupy B, natomiast nie wykry-

to ich w przypadku szczepów kontrolnych (paciorkowców grup A i C) (2).

Białka chaperonowe

Alternatywnym markerem genetycznym, na którego podstawie sekwencji określono zróżnicowanie filogenetyczne serotypów *S. suis*, był region kodujący jedno z białek chaperonowych, o masie 60 kDa, znane również pod nazwami Cpn60, HSP60 lub Grobel (9). Peptyd ten, kodowany przez gen *cpn*, uczestniczący w fałdowaniu pozostałego łańcucha polipeptydowego, cechuje się wysoką konserwatywnością (22). Dendrogram sporządzony na podstawie porównania nukleotydowego zapisu tego genu uwidoczniał wyraźnie większą odrębność między badanymi serotypami niż dendrogram sporządzony na podstawie sekwencji 16S rDNA.

Na podstawie porównania 595 par nukleotydów w obrębie genu kodującego białko chaperonowe i tej samej liczby par nukleotydów w obrębie genu kodującego podjednostkę 16S rRNA określono maksymalną liczbę zasad DNA o wysokim stopniu identyczności między tymi samymi serotypami *S. suis*. Dla genu *cpn* wynosiła ona 355, zaś dla genu 16 rDNA – 532 pary zasad. Potwierdzałyby to większą przydatność genu *cpn* niż genu podjednostki 16S rRNA w różnicowaniu szczepów w obrębie gatunku *S. suis* oraz jego większą przydatność jako markera genetycznego (9).

Elektroforeza w zmiennym pulsacyjnym polu elektrycznym (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE)

Coraz więcej uwagi w badaniach z zakresu epidemiologii molekularnej poświęca się rozkładowi fragmentów restrykcyjnych w zmiennym pulsacyjnym polu elektrycznym. Metoda ta uzależnia średnią ruchliwość fragmentu DNA w polu elektrycznym, wzdłuż przekątnej żelu, od jego ciężaru cząsteczkowego. Pozwala to na uzyskanie rozkładu o bardzo wysokiej rozdzielczości (19). Zmienne napięcie wpływa na czas reorientacji cząstek DNA, nawet powyżej 50 kb i decyduje o jego dokładnym rozdzieleniu. Właściwość ta, niemożliwa do uzyskania przy zastosowaniu klasycznej elektroforezy, dostarcza nowych informacji na temat organizacji całych genomów wielu gatunków drobnoustrojów.

Genetyczna homologia między wybranymi serotypami *S. suis*, zdefiniowana przy pomocy metody PFGE, została opisana na poziomie 44% (8). Daje to odmienny obraz filogenetycznej integracji poszczególnych szczepów *S. suis*, w porównaniu z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi przy użyciu metod rybotypowania (18).

Vela i wsp. (26) oszacowali statystycznie rozbieżność między wzorami elektroforetycznymi uzyskanymi przy rozdziale DNA wyizolowanego od świń chorych na streptokokozę oraz zdrowych, na podstawie analizy produktów trawienia DNA przy użyciu dwóch

enzymów restrykcyjnych (Apali SmaI). Okazało się, że zastosowanie kombinacji tych 2 enzymów umożliwiło lepsze zróżnicowanie genomów badanych szczepów paciorkowców świń. Wymienieni autorzy wyodrębnili dwie podgrupy PFGE, charakterystyczne dla zjadliwej i awirulentnej populacji paciorkowców. Zależność między wzorami prążków a serotypami stwierdzili oni w odniesieniu do większości przebadanych szczepów *S. suis*. W dalszych badaniach nad analizą genotypu, opartą o PFGE, potwierdzili oni użyteczność wymienionej metody w badaniach epidemiologicznych szczepów *S. suis* izolowanych z różnych regionów Hiszpanii. Uznali ją za cenne narzędzie dochodzenia epidemiologicznego na poziomie genetycznym, w badaniach nad rozprzestrzenieniem się streptokokozy u świń.

W doświadczeniu identyfikującym szczepy *Streptococcus pneumoniae* serotypu 6B, izolowane z różnych regionów Stanów Zjednoczonych, wykorzystano ten sam zestaw enzymów, co w przedstawionej powyżej analizie *S. suis* (21). Otrzymane pulsotypy PFGE szczepów nie pozwoliły jednak na jednoznaczne zdefiniowanie powiązań między wirulencją, opornością antybiotykową, pochodzeniem geograficznym a mapą restrykcyjną genomu. W wielu przypadkach stwierdzono konieczność wykorzystania kombinacji większej liczby enzymów (minimum trzech), co, jak potwierdzono w badaniach nad innymi patogenami, pozwoliło na wyraźne zwiększenie możliwości różnicowania molekularnego szczepów.

Odmiana multiplex reakcji łańcuchowej polimeryzacji DNA (multiplex polymerase chain reaction – mPCR)

Identyfikacja patogenów poprzez łańcuchową polimeryzację DNA jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod diagnostyki molekularnej. Cechuje ją duża szybkość i specyficzność wykrywania fragmentu DNA, wykorzystywanego jako gatunkowo-specyficzny marker wirulencji, lub jak w przypadku reakcji RAPD – specyficzność dla wielu miejsc rozpoznawalnych w genomie. Obok klasycznej reakcji PCR coraz częściej znajdują zastosowanie testy określane jako multiplex PCR, w których wykorzystuje się dwie lub więcej par starterów, umożliwiających równoczesną amplifikację kilku markerów genotypowych dla danych szczepów bakterii.

W Holandii opracowano test multiplex PCR do wykrywania genu kodującego czynnik pozakomórkowy (extracellular protein factor) (epf) gatunku *S. suis* (28). Metoda ta umożliwiała również wykrywanie fragmentu odpowiadającego sekwencji genu spokrewnionego z epf, zwanego genem epf*. Jest to gen zawierający kilka kodujących motywów repetytywnych, przez co niesie informację o syntezie białka o zwiększonej masie cząsteczkowej od dzikiej formy białka EF. Z uwagi na występowanie odmiany wysokocząsteczkowej białka EF, głównie w populacji słabo wirulent-

nego serotypu 2 *S. suis*, sugerowano początkowo wykorzystanie go jako cechy odróżniającej ten serotyp od wirulentnych serotypów 1 i 2.

Staats i wsp. próbowali znaleźć związek między wirulencją szczepów *S. suis*, ich serotypem a polimorfizmem odcinka genu *sly* kodującego suilizynę (24). Jest to sekrecyjna toksyna bakteryjna, o zdolnościach hemolitycznych. We wcześniejszych eksperymentach wymienieni badacze odnotowali brak obecności genu *sly* w niektórych szczepach *S. suis*, stąd początkowo wiązano występowanie tego genu z wirulencją paciorkowców. Jednak poprzez zastosowanie testu mPCR, z użyciem 15 par starterów swoistych dla różnych miejsc sekwencji *sly* (głównie miejsc okalających sekwencje) oraz metody RFLP wymienieni badacze scharakteryzowali region kodujący suilizynę. Okazało się, że w obrębie badanego genu występuje niewielka heterogenność genetyczna, na poziomie zaledwie 1,79%, w porównaniu z 80% zróżnicowaniem nukleotydowym innych bakteryjnych czynników wirulencji. Nie udało się jednak jednoznacznie określić korelacji między obecnością lub brakiem genu *sly* a danym serotypem *S. suis* lub zjadliwością szczepu.

Podobnie fingerprinting oparty o RAPD, przeprowadzony dla izolatów *S. suis* pochodzących od zdrowych i chorych świń nie odzwierciedlał rozbieżności nukleotydowych genomu między wirulentnymi i niezjadliwymi szczepami (11). Bliską korelację stwierdzono natomiast między wzorami prążków RAPD a wirulencją innego gatunku paciorkowców, *S. gallolyticus* (4). Można zatem przypuszczać, że *S. suis* jest gatunkiem, którego zjadliwość nie koresponduje z genotypem.

Podsumowanie

W przedstawionym skrótowym przeglądzie metod różnicowania genetycznego uwzględniono najczęściej wykorzystywane kierunki badania genotypu paciorkowców. Przede wszystkim można tu zaliczyć rybotypowanie, jednakże takie metody jak PFGE, mPCR czy RAPD są coraz powszechniej uznawane za równie lub nawet bardziej różnicujące i miarodajne. Ostatnia dekada ubiegłego stulecia przyczyniła się do epidemiologicznego oraz wewnątrzgatunkowego zróżnicowania rodzaju *Streptococcus*, szczególnie rozbieżności genomowej między 35 serotypami *S. suis*. Określono pochodzenie filogenetyczne znacznej liczby szczepów chorobotwórczych paciorkowców oraz zidentyfikowano niektóre zależności między genotypem danego gatunku *Streptococcus* a wirulencją czy występowaniem geograficznym. Wytypowano sześć grup rybotypowych, takich jak: *mitis*, *anginosus*, *salivarius*, *bovis*, *mutant* oraz *pyogenic*. Określono przynależność gatunkową m.in. szczepu *S. iniae* (14) oraz wykazano stosunkowo dużą rozbieżność poza gatunkową serotypów 33, 34 i 35 *S. suis*. Wykryto alternatywne regiony DNA genomu rodzaju *Streptococcus* pozwalające na osiągnięcie większego stopnia zróżnicowania ge-

netycznego, takie jak: sekwencja genu cps oraz regiony RITS. Dobierając odpowiednie narzędzia biologii molekularnej, takie jak startery reakcji PCR, enzymy restrykcyjne czy sondy diagnostyczne przy rybotypowaniu, oszacowano ich czułość i siłę identyfikacji.

Piśmiennictwo

1. *Abdulmawjood A., Weiss R., Lammler C.*: Species identification of *Streptococcus porcinus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *Res. Vet. Sci.* 1998, 65, 85-86.
2. *Abdulmawjood A., Lammler C.*: Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of streptococci of Lancefield group B. *Res. Vet. Sci.* 1999, 67, 159-162.
3. *Baele M., Vanrobaeys M., Vaneechoutte M., De Herdt P., Devriese L. A., Haesebrouck F.*: Genomic fingerprinting of pigeon *Streptococcus gallolyticus* strains of different virulence by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 103-111.
4. *Barsotti O., Decoret D., Renaud F. N.*: Identification of *Streptococcus mitis* group species by RFLP of the PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Res. Microbiol.* 2002, 153, 687-691.
5. *Bednarek P. T., Chwedorzewska K.*: Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia* 2001, 52, 9-34.
6. *Bentley R. W., Leigh J. A.*: Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* and *S. paruberis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995, 12, 1-7.
7. *Bentley R. W., Leigh J. A., Collins M. D.*: Intra-genetic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41, 487-494.
8. *Berthelot-Herauld F., Marois C., Gottschalk M., Kobisch M.*: Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 615-619.
9. *Brousseau R., Hill J. E., Prefontaine G., Goh S. H., Harel J., Hemmingsen S. M.*: *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 4828-4833.
10. *Chatellier S., Harel J., Zhang Y., Gottschalk M., Higgins R., Devriese L. A., Brousseau R.*: Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, 48, 581-589.
11. *Chatellier S., Gottschalk M., Higgins R., Brousseau R., Harel J.*: Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 362-366.
12. *Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J. P., Raoult D.*: 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Clin. Microbiol.* 2000, 38, 3623-3630.
13. *Garcia-Martinez J., Bescos I., Rodriguez-Sala J. J., Rodriguez-Valera F.*: RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 178-180.
14. *Goh S. H., Facklam R. R., Chang M., Hill J. E., Tyrrell G. J., Burns E. C., Chan D., He C., Rahim T., Shaw C., Hemmingsen S. M.*: Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 3953-3959.
15. *Gottschalk M., Higgins R., Quessy S.*: Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 4202-4203.
16. *Kawamura Y., Hou X. G., Sultana F., Miura H., Ezaki T.*: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, 45, 406-408.
17. *Kawamura Y., Whitley R. A., Shu S. E., Ezaki T., Hardie J. M.*: Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus *Streptococcus*. *Microbiology* 1999, 145, 2605-2613.
18. *Okwumabua O., Staats J., Chengappa M. M.*: Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 968-972.
19. *Primose S. B.*: Zasady analizy genomu. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa 1998.
20. *Rasmussen S. R., Andresen L. O.*: 16S rDNA sequence variations of some *Streptococcus suis* serotypes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, 48, 1063-1065.
21. *Rudolph K. M., Parkinson A. J., Roberts M. C.*: Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B isolates from selected areas within the United States. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2703-2707.
22. *Shinde U., Li Y., Chatterjee S., Inouye M.*: Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 6924-6928.
23. *Staats J. J., Plattner B. L., Stewart G. C., Chengappa M. M.*: Presence of the *Streptococcus suis* suilysin gene and expression of MRP and EF correlates with high virulence in *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Vet. Microbiol.* 1999, 70, 201-211.
24. *Sultana F., Kawamura Y., Hou X. G., Shu S. E., Ezaki T.*: Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 158, 223-230.
25. *Vandamme P., Torck U., Falsen E., Pot B., Goossens H., Kersters K.*: Whole-cell protein electrophoretic analysis of viridans streptococci: evidence for heterogeneity among *Streptococcus mitis* biovars. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, 48, 117-125.
26. *Vela A. I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M. A., Borge C., Perea J. A., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J. F.*: Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 2498-2502.
27. *Wenner T., Roth V., Decaris B., Leblond P.*: Intra-genomic and intra-specific polymorphism of the 16S-23S rDNA internally transcribed sequences of *Streptomyces ambifaciens*. *Microbiology* 2002, 148, 633-642.
28. *Wisselink H. J., Joosten J. J., Smith H. E.*: Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 2922-2929.

Adres autora: doc. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: iwonaamd@piwet.pulawy.pl

TOUSSAINT J.-F., RZIHA H.-J., BAUER B., LETELLIER C., KERKHOF P.: Wpływ hiperwaksynacji przy użyciu 1gE delecyjnych szczepionek markerowych przeciwko herpeswirusowi bydła typ 1 na odpowiedź serologiczną i stan wirusologiczny cieląt poddanych sztucznemu zakażeniu dzikim typem wirusa. (Effect of hypervaccination with bovine herpesvirus type 1gE-deleted marker vaccines on the serological response and virological status of calves challenged with wild-type virus). *Vet. Rec.* 155, 553-558, 2004 (18)

W krajach, gdzie występują często zakażenia herpeswirusem bydła typ 1 (BHP-1), zwalczanie zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy bydła polega w pierwszej fazie na stosowaniu szczepień przy użyciu szczepionek markerowych w celu uzyskania zwierząt hiperimmunizowanych IgE seronegatywnych. Na 24 cielętach w wieku 1-2 miesięcy zbadano wpływ małej dawki zakaźnej zjadliwego szczepu BHP-1 na odpowiedź serologiczną cieląt z solidną odpornością indukowaną 4-krotnym podaniem markerowej szczepionki delecyjnej IgE. Cielęta z grup A i B otrzymały jednorazowo żywą atenuowaną szczepionkę donosowo, następnie trzykrotnie podskórnie szczepionkę inaktywowaną. Cielęta z grup C i D otrzymały czterokrotnie podskórnie szczepionkę inaktywowaną. Po 4 tyg. po ostatnim szczepieniu cielęta zakażono donosowo terenowym szczepem BHP-1 w ilości 7×10^3 TCID₅₀ (grupy A, C, E) lub 9×10^2 TCID₅₀ (grupy B, D, F). Cielęta z grup E i F nie szczepione stanowiły kontrolę. Czterokrotne szczepienie indukowało odpowiedź immunologiczną hamującą replikację wirusa w organizmie i serokonwersję gE u większości zakażonych cieląt.