

# Właściwości biochemiczne krajowych izolatów *Streptococcus suis*

ANNA SZCZOTKA, IWONA MARKOWSKA-DANIEL

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

Szczotka A., Markowska-Daniel I.

## Biochemical features of Polish isolates of *Streptococcus suis*

### Summary

The aim of the study was to evaluate biochemical features of 575 Polish isolates of *S. suis* from pigs with symptoms of streptococcosis and to improve methods of identification of the pathogen. The following tests were used to evaluate biochemical features of the strains: raffinose, inulin, mannitol, arginine and esculin fermentation, and production of acetoin,  $\beta$ -glucuronidase as well as amylase (on starch agar plates). Typical reactions were observed in 538 isolates (94%). The highest number of positive results was obtained in the  $\beta$ -glucuronidase production test in which 100% of the isolates demonstrate activity of mentioned enzyme. Since positive results were evidenced in 563 isolates (98%), raffinose fermentation was also a specific feature of the tested isolates. Less specific (93% of positive strains) results were proved for the following tests: acetoin and amylase production as well as inulin fermentation. Arginine dihydrolase activity was demonstrated in 523 tested isolates (91%) and 69% had the ability to hydrolyze esculin. The least specific result was obtained in the mannitol fermentation test: 33% of the typical reactions. 14 biochemical profiles were estimated among the analyzed isolates. 60% of the strains were classified in groups B and H. In group H only the strains with typical for *S. suis* pattern, reaching 22.3% of the tested isolates, were placed. This study confirmed *S. suis* to be highly heterogenous in biochemical profiles. In our opinion the evaluation of biochemical features is not a universal method and should not be considered as a basis for bacterial identification. This method can be used as an additional test for *S. suis* identification, supplemented by other, more reliable techniques.

**Keywords:** swine, *Streptococcus suis*

W ostatnich kilku latach poważnym problemem zdrowotnym, notowanym w fermach trzody chlewnej zarówno w Polsce, jak i na świecie, stała się streptokokozą. Czynnikiem etiologicznym choroby są Gram-dodatnie paciorkowce, należące wg systematyki Bergeya do rodziny *Streptococcaceae*, rodzaju *Streptococcus*, gatunku *Streptococcus suis* (*S. suis*) (15). Należy zaznaczyć, że *S. suis* nie jest patogenem bezwzględnie chorobotwórczym.

Do chwili obecnej, na podstawie antygenów otoczkowych, opisano 35 różnych serotypów *S. suis*. Wyniki badań molekularnych dowodzą, że w obrębie każdego serotypu *S. suis* występuje szereg genotypów tego drobnoustroju (15).

Znaczenie streptokokozą rośnie wraz z intensyfikacją produkcji trzody chlewnej, niemniej jednak infekcje wywoływane przez omawiany patogen rozpoznawane są również w chlewniach tradycyjnych (19). Na streptokokozą chorują zwierzęta ze wszystkich grup wiekowych, aczkolwiek największe straty notuje się w populacji prosiąt odsadzonych oraz warchlaków (15). U zakażonych świń najczęściej obserwuje się zapalenie mózgu, wsierdzia, płuc, stawów oraz posocz-

nicę, powodującą nagle padnięcia (15, 19, 20). Ekonomiczne skutki występowania tej jednostki chorobowej wynikają nie tyle z padnięć świń, co z zahamowania rozwoju i przyrostów masy ciała oraz wysokich kosztów leczenia.

Celem badań była charakterystyka fenotypowa krajowych izolatów *S. suis*, wyizolowanych od świń chorujących z objawami streptokokozą, z uwzględnieniem oceny ich właściwości biochemicznych.

### Materiał i metody

**Szczepy bakteryjne.** Do badań wykorzystano 575 izolatów terenowych pozyskanych od świń chorujących z objawami wskazującymi na streptokokozę, zakwalifikowanych wstępnie do rodzaju *Streptococcus*.

Do ustalenia wzorca reaktywności szczepów paciorkowców świń z wybranymi substratami biochemicznymi wykorzystano szczepy referencyjne *S. suis*, reprezentujące wszystkie 35 serotypów tego drobnoustroju.

**Podłoża, testy.** Do namnażania izolatów użyto podłoża stałego – agaru Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej (Oxoid).

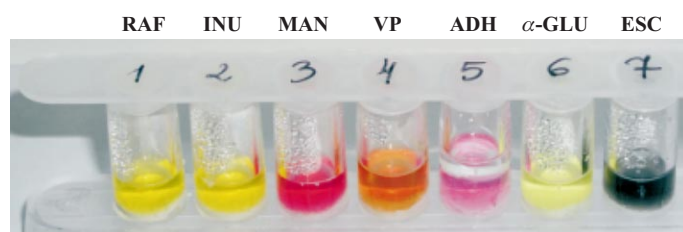
Na podstawie danych piśmiennictwa (2-4, 8, 9, 12-14, 21, 24) oraz wyników badania szczepów referencyjnych

Tab. 1. Wyniki biotypowania 35 szczepów referencyjnych *Streptococcus suis*

Test	Wynik	Odsetek reakcji typowych
Acetoina	-	100
Amylaza	+	92
$\beta$ -glukuronidaza	+	90
Dihydrolaza argininy	+	98
Eskulina	+	76
Inulina	+	98
Mannitol	-	94
Rafinoza	+	94

*S. suis* (tab. 1) do oceny właściwości biochemicznych izolatów terenowych wybrano następujące testy: na rozkład rafinozy, inuliny, mannitolu, argininy i eskuliny oraz testy na produkcję: acetoiny (test Voges-Proskauera) (VP),  $\beta$ -glukuronidazy i amylazy. Do wykonania badań wykorzystywano substraty biochemiczne w formie tabletek, produkcji Rosco Inc. W celu identyfikacji szczepów wytwarzających amylazę bakterie wysiewano na agar Columbia z dodatkiem skrobi, w ilości 0,5 g na 475 ml agaru. W przypadku testu na rozkład argininy, w celu zapewnienia beztlenowych warunków inkubacji, powierzchnię roztworu pokrywano olejem mineralnym (bioMerieux).

**Postępowanie.** Przygotowywano 18-godzinną hodowlę poszczególnych izolatów na płytkach Petriego zawierających agar Columbia z krwią barania. Pobierano 4-5 kolonii



Ryc. 1. Wynik analizy biochemicznej *S. suis* przy użyciu substratów Rosco



Ryc. 2. Wynik testu na produkcję amylazy przez *S. suis* – widoczne odbarwienie podłoża wokół kolonii *S. suis*

i wprowadzano je do bulionu cieleńcego (Difco) z dodatkiem 5% surowicy końskiej (Sigma), po czym inkubowano je w termostacie (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) przez 18 godzin. Następnie hodowlę mieszano na wytrząsarce i poddawano ją wirowaniu (3000 obrotów/minutę, 15 minut, temperatura pokojowa). Do osadu dodawano 2 ml 0,9% roztworu NaCl i mieszano do uzyskania homogennej zawiesiny. Zawiesinę badanego szczepu paciorkowca w płynie fizjologicznym wprowadzano do stelaża z szeregiem probówek, zawierających poszczególne substraty biochemiczne. Stelaże zamykano i inkubowano w termostacie, w warunkach analogicznych do przedstawionych powyżej. Po 4 godzinach inkubacji do studzienki z tabletką VP dodawano po kropli odczynników VP1 oraz VP2 (bioMerieux) i pozostawiano je na 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie dokonywano odczytu testu. Pozostałe reakcje analizowano po 24-godzinnej inkubacji w warunkach jw.

Do testu na wytwarzanie amylazy bakterie wysiewano na agar Columbia z dodatkiem skrobi. Płytki inkubowano przez 18 godzin w warunkach jw. Następnego dnia wyrosniętą hodowlę zalewano kilkoma ml płynu Lugola, pozostawiano na ok. 30 sekund i odczytywano wynik reakcji.

Interpretacji wyników testów z substratami Rosco dokonywano na podstawie oceny wizualnej, opartej na określeniu zabarwienia roztworu (ryc. 1), natomiast w przypadku testu na produkcję amylazy na podstawie odbarwienia płynu Lugola (ryc. 2).

Każdorazowo przygotowywano kontrolę badań, którą stanowił szczep referencyjny serotypu 2 *S. suis*.

## Wyniki i omówienie

W badaniach dokonano analizy 575 izolatów terenowych, wyosobnionych od świń odchowywanych w fermach wielkotowarowych trzody chlewnej oraz chlewniach przyzagrodowych, zlokalizowanych na obszarze całego kraju, chorujących z objawami wskazującymi na streptokokozę. Na podstawie morfologii kolonii na podłożu stałym, z uwzględnieniem wytwarzania hemolizy typu  $\alpha$ , pozytywnego wyniku badania bakterioskopowego w preparatach barwionych metodą Grama, ujemnego wyniku testu na produkcję katalazy oraz pozytywnego wyniku identyfikacji genetycznej w teście mPCR izolaty zostały wstępnie zakwalifikowane do rodzaju *Streptococcus*.

Wiele laboratoriów na świecie prowadziło badania w zakresie identyfikacji biochemicznej drobnoustrojów należących do rodzaju *Streptococcus*, w związku z tym podczas doboru zestawu reakcji biochemicznych służących do określenia profilu fenotypowego paciorkowców świń sugerowano się danymi z piśmiennictwa (2, 8, 13, 14, 20). Na ich podstawie wybrano 8 reakcji biochemicznych do identyfikacji *S. suis*. Za typowe dla omawianych patogenów przyjęto następujące wyniki: zdolność do rozkładu rafinozy, inuliny i skrobi, hydrolizy argininy i eskuliny oraz wytwarzania  $\beta$ -glukuronidazy, a także brak rozkładu mannitolu i produkcji acetoiny (13-15, 18).

W badaniach własnych reakcje typowe dla *S. suis* wykazywało 538 izolatów (94%). Pozostałe izolaty,

Tab. 2. Wyniki biotypowania izolatów terenowych *Streptococcus suis*

TEST		Liczba/% szczepów reagujących typowo
Acetoina		535/93
Amylaza		535/93
$\beta$ -glukuronidaza		100/100
Dihydrolaza argininy		523/91
Eskulina		397/69
Inulina		535/93
Mannitol		190/33
Rafinoza		563/98
Ogółem (575 szczepów)	szcypy dające reakcje typowe	538/94
	szcypy dające reakcje atypowe	37/6

w liczbie 37 (6%), wykazywały różnego stopnia odchylenia od przyjętego wzorca. Porównywalne wyniki uzyskali w swoich badaniach Jayarao i wsp. dla metod Vitek GPI oraz API Rapid Strep (16).

Rezultaty uzyskane dla poszczególnych reakcji biochemicznych przedstawiono w tab. 2. Z zaprezentowanych danych wynika, że najwyższy odsetek wyników typowych dla *S. suis* uzyskano w reakcji identyfikującej aktywność  $\beta$ -glukuronidazy, z uwagi na to, że 100% badanych szczepów wykazywało aktywność tego enzymu.

Fermentacja rafinozy także okazała się swoistą cechą analizowanych szczepów. W tym przypadku pozytywny wynik badania uzyskano w odniesieniu do 563 izolatów, co stanowiło 98%. Należy podkreślić, że mimo iż test ten włączało do zestawu do identyfikacji *S. suis* wielu badaczy, rezultaty opisywanych eksperymentów były zróżnicowane. Dodatnie reakcje wykazywało 65% (24) lub 78% szczepów (8), co sugeruje występowanie szczepów o nietypowych właściwościach, których jednak nie zidentyfikowano wśród polskich izolatów.

Nieco mniej specyficzne wyniki otrzymano w teście Voges-Proskauera, który przez wielu autorów uważany jest za typowy dla identyfikacji *S. suis* (2, 21, 22, 24). Generalnie uważa się, że szcypy bakteryjne reprezentujące ten gatunek drobnoustrojów, nie produkują acetoiny. W badaniach własnych uzyskano wynik nieco odmienny. Wśród ocenianych izolatów zidentyfikowano 93% szczepów o właściwościach typowych dla gatunku oraz dodatkowo 40 izolatów (7% analizowanych szczepów), które wytwa-

rzały acetoinę. Należy przypuszczać, że zidentyfikowano izolaty o nietypowych właściwościach lub, co bardziej prawdopodobne, izolaty te błędnie zakwalifikowano do gatunku *S. suis* w badaniach wstępnych. Ostateczne rozstrzygnięcie klasyfikacji wspomnianych szczepów wymaga zastosowania bardziej precyzyjnych metod badawczych, np. sekwencjonowania.

Produkcja amylazy i rozkład skrobi również uważane są za typowe cechy identyfikacyjne *S. suis* (2, 3, 21). Podobnie jak poprzednio uzyskane wyniki wskazują na obecność 93% izolatów rozkładających skrobię oraz występowanie 7% szczepów o nietypowych właściwościach w omawianym zakresie. Wyniki analogiczne uzyskali w swoich badaniach Gottschalk i wsp. (13), którzy wśród szczepów *S. suis* zidentyfikowali izolaty nie wykazujące aktywności wymienionego enzymu.

Odsetek izolatów zdolnych do rozkładu inuliny kształtował się na tym samym poziomie, co w przypadku dwóch opisanych powyżej testów. Z kolei spośród 575 badanych szczepów 523 (91%) cechowały się aktywnością dihydrolazy argininy.

Czarno-brunatne zabarwienie podłoża, uznawane za wynik dodatni testu na hydrolizę eskuliny, jest skutkiem reakcji jednego z jej produktów – eskuletyny z jonami żelaza (6, 7). W badaniach własnych wynik taki uzyskano w odniesieniu do 379 izolatów (69% badanych szczepów). Zdolność do hydrolizy eskuliny jest cechą charakterystyczną dla paciorkowców z grupy D (10, 11), do której należą głównie paciorkowce kałowe. Może to częściowo wyjaśniać niższy odsetek zarejestrowanych reakcji dodatnich w badaniach własnych. W pracach innych badaczy, uwzględniających zastosowanie tego testu do charakterystyki właściwości biochemicznych *S. suis*, uzyskiwano bardzo zróżnicowane rezultaty – od 100% wyników dodatnich (22), do niewielu ponad 50% (8).

Najmniej swoistych reakcji zaobserwowano w teście na fermentację mannitolu. W tym przypadku wynik typowy uzyskano jedynie w odniesieniu do 190 izolatów, co stanowiło 33%. Uważa się, że *S. suis* nie fermentuje mannitolu, niemniej jednak niektóre bada-

Tab. 3. Profile biochemiczne izolatów terenowych *Streptococcus suis*

TEST	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Ł	M
Acetoina	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Amylaza	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
$\beta$ -glukuronidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dihydrolaza argininy	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Eskulina	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Inulina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Mannitol	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Rafinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ogółem	Liczba	11	210	5	5	13	103	7	128	3	6	3	47	17
	%	2,0	37,0	0,9	0,9	2,3	18,0	1,2	22,3	0,5	1,0	0,5	8,2	3,0

nia wskazują na istnienie szczepów paciorkowców świń wykazujących tę cechę (9). Dla przykładu: Devriese i wsp. (2) zidentyfikowali szczepy *S. suis* o wspomnianych właściwościach wśród drobnoustrojów wyizolowanych od owiec, bydła i koni. Z kolei w badaniach Gottschalka i wsp. (14) 45% badanych patogenów fermentowało mannitol. Dane te wskazują, że reakcji rozkładu omawianego cukru nie można uważać za cechę typową dla *S. suis*.

Uzyskane wyniki badań własnych pozwoliły na wyodrębnienie wśród poddanych analizie szczepów 14 profili biochemicznych, oznaczonych literami od A do M (tab. 3), przy czym niemal 60% szczepów zakwalifikowano do grup B i H. W grupie H znalazły się szczepy, które wykazały wyłącznie typowe reakcje, stanowiły one 22,3% badanych izolatów.

Testy oparte na fermentacji cukrów, zmianie pH i w konsekwencji zmianie barwy podłoża są powszechnie stosowane do identyfikacji różnych gatunków bakterii (1, 4, 5, 10), w tym również należących do rodzaju *Streptococcus* (4, 10, 11, 16).

Do identyfikacji bakterii z rodzaju *Streptococcus* można stosować tradycyjne testy mikrobiologiczne, jak również zestawy do szybkiej identyfikacji drobnoustrojów na podstawie reakcji biochemicznych, jak API 20 STREP (bioMerieux), rapid ID 32 STREP (bioMerieux), API RAPID Strep system (16), system GPI (16) lub Minitek (23). Niezaprzeczalną zaletą tych systemów jest łatwość przeprowadzenia reakcji i stosunkowo krótki czas potrzebny do uzyskania wyników (4-8 godzin). Należy mieć jednak na uwadze, że zostały one opracowane przede wszystkim do identyfikacji drobnoustrojów izolowanych od ludzi, co ogranicza ich przydatność w odniesieniu do szczepów wyosobnionych od zwierząt.

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły, że *S. suis* reprezentuje znaczne zróżnicowanie właściwości biochemicznych. Określanie profilu biochemicznego ma zatem ograniczoną przydatność. Występowanie rozbieżności w uzyskiwanych profilach biochemicznych, co może być konsekwencją identyfikacji szczepów o nietypowych właściwościach, sprawia, że do rutynowej diagnostyki bakteriologicznej drobnoustrojów, a w szczególności do rozpoznawania chorób zwierząt o etiologii bakteryjnej, powinny być stosowane bardziej wiarygodne metody identyfikacji patogenów, uwzględniające, na przykład, identyfikację molekularną (2, 8, 10, 14, 17, 21). Badanie właściwości biochemicznych może stanowić metodę uzupełniającą charakterystykę fenotypową szczepów, uzyskaną przy zastosowaniu innych technik badawczych (24).

## Piśmiennictwo

1. Dacko J, Osek J.: Analiza wybranych cech fenotypowych szczepów *Escherichia coli* izolowanych od prosiąt. Medycyna Wet. 2004, 60, 861-866.
2. Devriese L. A., Ceysens K., Hommez J., Kilpper-Balz R., Schleifer K. H.: Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. Vet. Microbiol. 1991, 26, 141-150.

3. Devriese L. A., Ceysens K., Hommez J., Kilpper-Balz R., Schleifer K. H.: Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. J. Appl. Bacteriol. 1994, 77, 31-36.
4. Devriese L. A., Vandamme P., Pot B., Vanrobaeys M., Kersters K., Haesebrouck F.: Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 3520-3523.
5. Dibb W. L., Bottolfsen K. L.: Evaluation of Rosco diagnostic beta-glucuronidase tablets in the identification of urinary isolates of *Escherichia coli*. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1984, 92, 261-264.
6. Edberg S. C., Pittman S., Singer J. M.: Esculin hydrolysis by Enterobacteriaceae. J. Clin. Microbiol. 1977, 6, 111-116.
7. Edberg S. C., Trepeta R. W., Kontnick C. M., Torres A. R.: Measurement of active constitutive beta-D-glucosidase (esculinase) in the presence of sodium desoxycholate. J. Clin. Microbiol. 1985, 21, 363-365.
8. Erickson E. D., Doster A. R., Pokorny T. S.: Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. J. Am. vet. med. Ass. 1984, 185, 666-668.
9. Estoepangestie S., Lammler C.: Distribution of capsular types 1 to 28 and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from various European countries. Zentbl. Bakt. 1993, 279, 394-403.
10. Faclam R. R.: Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. Appl. Microbiol. 1972, 23, 1131-1139.
11. Facklam R. R., Moody M. D.: Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. Appl. Microbiol. 1970, 20, 245-250.
12. Gabelle D., Raibaud P., Sacquet E.: Beta-Glucuronidase activities of intestinal bacteria determined both in vitro and in vivo in gnotobiotic rats. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49, 682-685.
13. Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Beaudoin M., Henrichsen J.: Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol. 1991, 29, 2590-2594.
14. Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Beaudoin M., Henrichsen J.: Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. J. Vet. Diagn. Invest. 1991, 3, 60-65.
15. Higgins R., Gottschalk M.: Streptococcal diseases, [w:] Straw B. E., D'Alaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. (wyd.): Disease of swine. The Iowa State University Press, USA 1999, 277-290.
16. Jayarao B. M., Oliver S. P., Matthews K. R., King S. H.: Comparative evaluation of Vitek Gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of *Streptococcus* species of bovine origin. Vet. Microbiol. 1991, 26, 301-308.
17. Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.: Identyfikacja drobnoustrojów z gatunku *Streptococcus suis* testem multiplex PCR. Medycyna Wet. 2005, 61, 522-525.
18. Markowska-Daniel I., Szczotka A.: Diagnostyka zakażeń *Streptococcus suis* u świń, [w:] Diagnostyka laboratoryjna wybranych bakteryjnych i wirusowych chorób świń. Wyd. PIWet, Puławy 2003, 39-50.
19. Pejsak Z.: Zakażenia *Streptococcus suis* u świń. Weterynaria po dyplomie 2003, 4, 3-8.
20. Pejsak Z.: Zakażenia *Streptococcus suis* u świń. Problemy w zakresie rozpoznawania i zwalczania. Mag. Wet. 2002, Suplement – Świnie, 77-79.
21. Prieto C., Garcia F. J., Suarez P., Imaz M., Castro J. M.: Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. Zentralbl. Veterinarmed. B. 1994, 41, 608-617.
22. Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K., Carter G. R.: The Streptococci and related cocci, [w:] Clinical Veterinary Microbiology, Mosby, Londyn 2000, 127-136.
23. Setterstrom J. A., Gross A., Stanko R. S.: Comparison of Minitek and conventional methods for the biochemical characterization of oral streptococci. J. Clin. Microbiol. 1979, 10, 409-414.
24. Tarradas C., Arenas A., Maldonado A., Luque I., Miranda A., Perea A.: Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. J. Clin. Microbiol. 1994, 32, 578-580.

Adres autora: doc. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, ul. Sienkiewicza 35A, 24-100 Puławy; e-mail: iwonaamd@piwet.pulawy.pl