

# Wykrywanie i ocena właściwości krajowych izolatów *Arcanobacterium pyogenes* wyosobnionych od świń

ZYGMUNT PEJSAK, IWONA MARKOWSKA-DANIEL,  
MACIEJ SAMOREK, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Pejsak Z., Markowska-Daniel I., Samorek M., Truszczyński M.

## Detection and evaluation of properties of Polish strains of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from pigs

### Summary

The aim of the study was the genetic identification and evaluation of properties of field isolates of *A. pyogenes*. Samples of internal organs as well as pathologically changed joints taken from dead pigs bred in Poland were used for testing. The isolation of bacteria was carried out according to standard microbiological methods. Properties of bacteria were evaluated based on their color, size and shape on the agar plates and in smears stained with the Gram method as well as on results of biochemical tests. Genetic identification of isolates based on results of the elaborated PCR test. Sensitivity to the most commonly used chemotherapeutics was evaluated by the disc diffusion test.

Monocultures of transparent, small bacteria of pinhead size, surrounded by large hemolysis zone, Gram positive, fermented with acid production of glucose, fructose, galactose, lactose, cellobrose, trecholoze, maltose, melarytoze, mannose, glikogen, xylose and starch, of proteolytic activity, were evidenced. Tested *A. pyogenes* isolates were 100% sensitive to a wide spectrum of beta-lactames, with the exception of penicillin, for which 5% of the strains were resistant. One hundred percent of isolates were sensitive to oxytetracycline, doxycyclin, enrofloxacin, tylosin and florfenicol and 95% of them were sensitive to tetracyklines, cephalosporin and Linco-Spectin. A high percentage (90%) of sensitivity was registered for tiamulin, tulatromycyn, gentamicin and norfloxacin. The highest resistance was evidenced in the case of neomycin (47% resistant strains) and sulphonamides with trimetoprimem (45% of resistant strains). In PCR the presence of genetic material of *A. pyogenes* was detected in the case of 56 tested strains (98.2%).

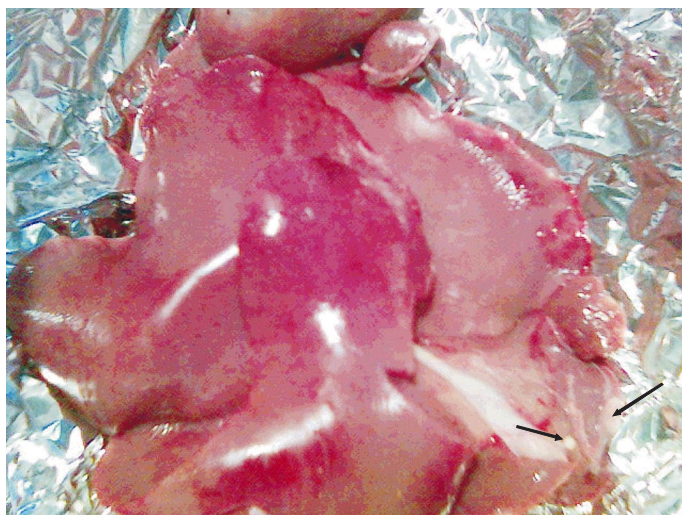
**Keywords:** *Arcanobacterium pyogenes*, pigs

W okresie ostatnich kilku lat coraz częściej w Zakładzie Chorób Świń PIWet-PIB (ZCHS) od padłych zwierząt izolowany jest w czystej kulturze warunkowo chorobotwórczy drobnoustroj, należący wg systematyki Bergeya (9) do rodzaju *Arcanobacterium*, gatunku *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*). Bytuje on zasadniczo na skórze oraz błonach śluzowych świń, niemniej jednak w sprzyjających warunkach powoduje schorzenia płuc i stawów oraz powstawanie ropni podskórnych i/lub w narządach wewnętrznych (7, 10, 15). Mechanizm przejścia ze stanu komensalizmu w stan zjadliwości nie jest dokładnie poznany, przyjmuje się, że ujawnieniu się właściwości patogennych omawianego drobnoustroju sprzyjają urazy mechaniczne (2, 14). W patogenezie zakażeń *A. pyogenes* biorą udział toksyny i czynniki adhezyjne, a w szczególności hemolityczna egzotoksyna – pyolizyna oraz neuraminidaza, ułatwiające jego adhezję do komórek nabłonkowych śluzówki przewodu pokarmowego i układu oddechowego (3-6, 8). Z obserwacji

epidemiologicznych prowadzonych w ZCHS wynika, że czynnikiem predysponującym do ujawnienia się zakażeń na tle *A. pyogenes* może być immunosupresja będąca konsekwencją zakażenia stada wirusem zespołu rozrodczo-oddechowego (PRRS), bowiem materiał, z którego izoluje się omawiane drobnoustroje, pochodzi głównie z chlewni zainfekowanych tym patogenem.

Objawy kliniczne towarzyszące infekcji *A. pyogenes* są różnicowane, w zależności od zaatakowanego narządu (15). W przypadku posocznicy lub zapalenia wsierdza czy błon surowiczych choroba często kończy się nagłym padnięciem zwierząt. Konsekwencją zapalenia stawów kończyn są kulawizny, natomiast zapalenie rdzenia kręgowego i przestrzeni międzykręgowych uwidacznia się porażeniami zadu. W przypadku infekcji układu rozrodczego obserwuje się uporczywy ropny wypływ z dróg rodnych roniących samic lub ogniska ropne w gruczole mlekowym.

*Arcanobacterium pyogenes* jest Gram-dodatnią, hemolityczną, katalozoujemną pałeczką. Izolacja i iden-



Ryc. 1. Wątroba pobrana od padłej świni – strzałką zaznaczono obecność ropni pod torebką narządu

tyfikacja tego drobnoustroju nie jest łatwa w związku z bardzo małymi rozmiarami kolonii i częstym jednoczesnym wzrostem innych gatunków bakterii.

Celem badań była identyfikacja genetyczna oraz ocena właściwości fenotypowych, z uwzględnieniem wrażliwości na powszechnie stosowane chemioterapeutyki, izolatów terenowych *A. pyogenes* wyosobnionych z narządów wewnętrznych padłych świń.

### Materiał i metody

**Szczepy bakteryjne.** Materiał do badań diagnostycznych stanowiły wycinki narządów wewnętrznych (ryc. 1) i zmienione chorobowo stawy, pobrane w okresie od stycznia 2004 do czerwca 2005, od 490 padłych świń, odchowywanych w średnio- i wielkotowarowych fermach trzody chlewnej,

Tab. 1. Narządy świń padłych, z których izolowano w czystej kulturze *Arcanobacterium pyogenes*\*

Narząd	Liczba izolatów	
	2004	2005*
Płuca	22	11
Stawy	6	3
Serce	4	2
Wątroba	3	3
Śledziona	1	-
Nerka	1	1

Objaśnienie: \* do 30.06.2005

zlokalizowanych na obszarze całego kraju. W przypadku 57 zwierząt z omawianej stawki (11,6%) *A. pyogenes* izolowano w czystej kulturze z różnych narządów (48 próbek) lub z płynu stawowego (9 próbek) (tab. 1). Szczepy referencyjne pochodziły z Duńskiego Instytutu Weterynaryjnego w Kopenhadze. Szczepy *Pasterella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* oraz *Escherichia coli*, z których wyeks-

trahowano materiał genetyczny, wykorzystano do kontroli swoistości testu PCR.

**Badania bakteriologiczne.** Izolacji bakterii dokonywano z narządów wewnętrznych oraz ropni według uznanych i stosowanych powszechnie metod mikrobiologicznych, wykorzystując do tego celu podłoże agarowe z dodatkiem 5% krwi końskiej. Inkubację prowadzono w atmosferze 8% CO<sub>2</sub>, w temperaturze 37°C przez 24-48 godzin. Cechy ho-

dowlane i morfologiczne wyrosłych bakterii ustalano na podstawie barwy, wielkości i kształtu kolonii na podłożu stałym i w preparatach barwionych metodą Grama oraz wyników badań biochemicznych (test Api Coryne) (BioMerieux). Aktywność proteolityczną *A. pyogenes* weryfikowano inokulując drobnoustroje do podłoża z surowicą wg Loefflera podczas 24 godzinnej inkubacji.

**Identyfikacja genetyczna.** W celu izolacji materiału genetycznego *A. pyogenes* badane szczepy namnażano przez 24 godz. w warunkach opisanych uprzednio. Z wyrosniętej hodowli pobierano kolonie bakteryjne celem ekstrakcji matrycowego DNA, z wykorzystaniem elucji przez kolumny ze złożem krzemionkowym, wg procedury opracowanej przez firmę A&A Biotechnology, Polska. Produkt ekstrakcji zawieszono w 100 µl 10 mM roztworu TE.

Sekwencję starterów ustalono na podstawie danych z Banku Genów (NCBI) oraz piśmiennictwa (1).

Mieszanina reakcyjna, o objętości 50 µl, miała następujący skład: 5 µl 10 × buforu PCR, 25 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 10 mM mieszaniny trifosforanów nukleotydów dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 pmoli na reakcję starterów A.pyog-F i A.pyog-R, 1 µl (1 U/µl) polimerazy Taq (Fermentas), 5 µl matrycowego DNA i 34,5 µl wody. Sekwencje użytych starterów przedstawiono w tab. 2.

Reakcje PCR wykonano w termocyklerze produkcji Biometra, przy użyciu programu o następujących parametrach: denaturacja wstępna 94°C – 4 min., a następnie 30 cykli składających się z: denaturacji w temp. 94°C przez 1 min., przyłączania starterów w temp. 58°C przez 1 min., procesu elongacji w temp. 72°C przez 1 min. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 10 minut. Wyniki reakcji analizowano za pomocą rozdziału elektroforetycznego uzyskanych produktów w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1 X TBE, barwionym bromkiem etydyny i wizualizowanym w świetle UV.

Tab. 2. Sekwencje starterów użytych do amplifikacji materiału genetycznego *A. pyogenes*

Nazwa startera	Sekwencja	Produkt reakcji PCR
A.pyog-F	5'GAA GCC GGG GCT TTT TGT T 3'	385 pz
A.pyog-R	5' CAC ATA CCG TCA CAA AAA TGC 3'	

**Badanie lekowrażliwości.** Do analizy lekowrażliwości *in vitro* wobec wymienionych poniżej grup antybiotyków, użyto 57 szczepów *A. pyogenes*: tetracykliny: oksytetracyklina, doksycyklina (Oxoid) oraz tetracyklina (BioMerieux); antybiotyki beta-laktamowe: amoksyacylina, amoksyacylina z kwasem klawulonowym, ampicylina i penicylina (Oxoid); antybiotyki aminoglikozydowe: neomycyna i gentamycyna (Oxoid); chinolony: enrofloksacyna i norfloksacyna (Oxoid); linkosamidy-aminocyklitole: (Linco-spectin) (Oxoid); antybiotyki makrolidowe: tylozyna (Symbios), tiamulina (Rosco) i tulatromycyna (Pfizer); sulfonamidy potencjonowane trimetoprimem (SxT) (BioMerieux); cefalosporyny: ceftiofur i cobactan (Oxoid); pochodna chloramfenikolu – Florfenicol (Beton Dickinson).

Wrażliwość izolatów *A. pyogenes* badano metodą dyfuzyjno-krażkową na podłożu Müellera-Hintona z dodatkiem

5% krwi baraniej, po 48-godzinnej inkubacji bakterii, zgodnie z procedurą zalecaną przez National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). W zależności od strefy zahamowania wzrostu bakterii badane szczepy określano jako odporne lub wrażliwe na oceniany chemioterapeutyk.

### Wyniki i omówienie

Charakterystyka wyizolowanych drobnoustrojów. Po 24-godzinnej inkubacji bakterii w temperaturze 37°C w posiewach z wymienionych w tab. 1 narządów stwierdzono jednorodny wzrost kolonii o wielkości główki szpilki, otoczonych silną hemolizą. Strefa hemolizy była kilkukrotnie większa niż średnica kolonii.

W badaniu mikroskopowym stwierdzono obecność Gram-dodatnich pałeczek, wykazujących niekiedy polimorfizm (kształt maczugi lub ziarenkowca).

W badaniach biochemicznych wykazano, że wymienione bakterie fermentowały, z wytworzeniem kwasu, następujące substraty: glukozę, fruktozę, galaktozę, laktozę, cellobrozę, trehalozę, maltozę, melarytozę, mannozę, glikogen, ksylozę i skrobię.

W próbie na podłożu z surowicą wg Loefflera badane izolaty ujawniły aktywność proteolityczną.

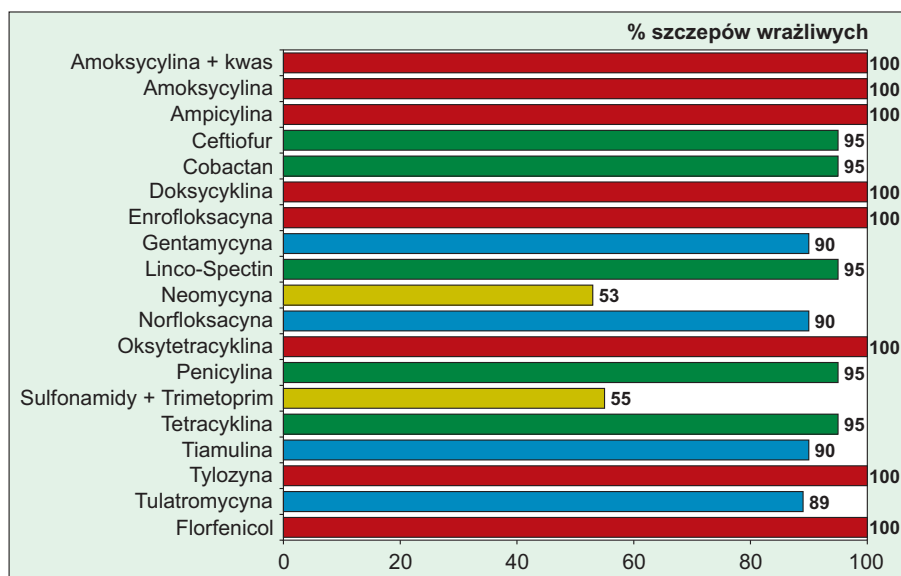
Wrażliwość *in vitro* szczepów bakteryjnych na powszechnie stosowane chemioterapeutyki przedstawiono na ryc. 2.

Jak wskazują otrzymane wyniki izolaty *A. pyogenes* były wrażliwe na działanie wszystkich badanych antybiotyków. Najwyższą – 100% wrażliwość wykazywały one na antybiotyki beta-laktamowe o szerokim zakresie działania (amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulonowym, ampicylinę), z wyjątkiem penicyliny, w odniesieniu do której stwierdzono obecność 5% szczepów opornych. Podobną sytuację stwierdzono w odniesieniu do tetracyklin. W tym przypadku stuprocentową wrażliwość zarejestrowano wobec oksytetracykliny i doksycykliny oraz 95% wrażliwość na tetracyklinę. Bardzo wysoką (100%) wrażliwość obserwowano ponadto na enrofloksacynę, tylozynę oraz florfenikol. Dziewięćdziesiąt pięć procent badanych szczepów wykazywało *in vitro* wrażliwość na działanie cefalosporyn (ceftiofuru i cobactanu) oraz Linco-Spectinu. Znaczną (90% wrażliwość zarejestrowano w odniesieniu do pozostałych ocenianych makrolidów (tiamulina i tulatromycyna), jak również na gentamycy-

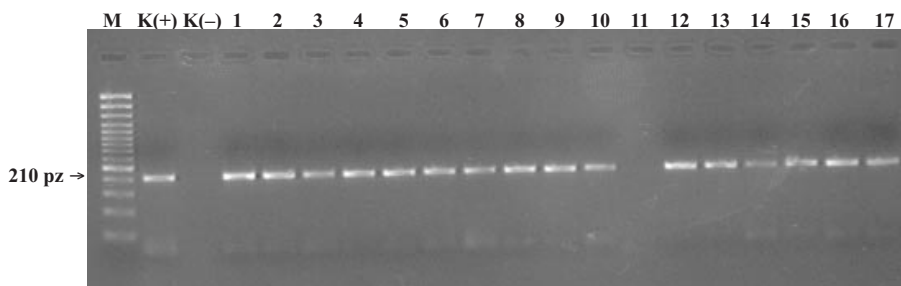
nę i norfloksacynę. Najwyższą opornością badane izolaty charakteryzowały się w stosunku do neomycyny (47% szczepów opornych) oraz sulfonamidów potencjonowanych trimetoprimem (45% szczepów opornych).

Testem PCR obecność materiału genetycznego *A. pyogenes* stwierdzono w odniesieniu do 56 badanych izolatów, co stanowiło 98,2% (ryc. 3). Tylko 1 izolat okazał się negatywny w badaniu genetycznym z zastosowaniem użytych starterów. Opracowany test do genetycznej identyfikacji izolatów *A. pyogenes* okazał się swoistym narzędziem diagnostycznym, bowiem nie wykrywał on obecności bakteryjnego DNA w próbkach wyekstrahowanych ze szczepów porównawczych, tj. *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* oraz *Escherichia coli*. Nie odnotowano również niespecyficznego prążków świadczących o kontaminacji bądź niestabilności starterów.

Doświadczenia własne wskazują, że identyfikacja *A. pyogenes* nie jest łatwa ani tania. Być może z tego powodu laboratoria weterynaryjne identyfikują te bak-



Ryc. 2. Wrażliwość szczepów *Arcanobacterium pyogenes*, izolowanych w czystej kulturze z narządów padłych świń, na najczęściej stosowane antybiotyki



Ryc. 3. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji metodą PCR, uzyskanych ze starterami flankującymi gen 16S rRNA (210 pz) wybranych szczepów terenowych *A. pyogenes*. Poszczególne ścieżki: M – 100 pz, standard masy molekularnej; K(+) szczep referencyjny *A. pyogenes*; K(-) kontrola reakcji PCR (H<sub>2</sub>O); 1-17 badane izolaty terenowe *A. pyogenes*

terie niezwykle rzadko. To z kolei minimalizuje rolę tych bakterii w etiologii mieszanych zakażeń świń. Dowodem powyższego jest brak jakichkolwiek danych na ten temat w piśmiennictwie krajowym.

Zdecydowanie więcej danych odnośnie do udziału *A. pyogenes* w etiologii zachorowań znaleźć można w piśmiennictwie dotyczącym chorób bydła i owiec (11-13). Na udział *A. pyogenes* w etiologii zapaleń wymienia u krów zwracali uwagę m.in. Malinowski i wsp. (12). Autorzy ci wykazali, że wymienione drobnoustroje były przyczyną zapaleń wymienia w niektórych gospodarstwach aż w 6,4% przypadków. Malinowski (11) zwrócił również uwagę na znaczenie much w szerzeniu się zakażeń *A. pyogenes*. Badania bakteriologiczne much z okolic wymienia i strzyków pozwoliły na izolację tych bakterii w czystej kulturze.

Przedstawione dane wskazują, że *A. pyogenes* mógł być bezpośrednią przyczyną padnięcia ponad 11% świń odchowywanych w chlewniach średnio- i wielkotowarowych, gdzie istnieją warunki sprzyjające zakażeniu zwierząt (częste przypadki przerwania ciągłości błony śluzowej oraz skóry, nadmierne zagęszczenie zwierząt, bezściółowy system chowu itp.).

Uzyskane wyniki wskazują na stosunkowo dużą wrażliwość szczepów *A. pyogenes* na różne grupy antybiotyków. Biorąc to pod uwagę, można wyrazić pogląd, że problem miejscowych stanów chorobowych wikłanych przez ten drobnoustrój jest stosunkowo łatwy do opanowania, pod warunkiem, że są to zakażenia świeże.

Badania własne podważają w stopniu istotnym pogląd, że zakażenia *A. pyogenes* mają przede wszystkim charakter miejscowy. Fakt, że aż u 11,6% zwierząt bakterie te wyizolowano w czystej kulturze, w tym w 48 na 57 badanych przypadków, drobnoustroje izolowano z narządów wewnętrznych wskazuje, że w określonych sytuacjach *A. pyogenes* staje się przyczyną infekcji ogólnych prowadzących bezpośrednio do padnięcia świń.

Przyczyny ujawniania się właściwości chorobotwórczych w odniesieniu do bakterii względnie patogennych są wielorakie i trudne do precyzyjnego ustalenia. Bezwzględnie do głównych zaliczyć należy: koncentrację i intensyfikację produkcji, dążenie do wyselekcjonowania linii świń charakteryzujących się szybkim wzrostem i wysoką mięsnością, duży obrót zwierzętami (w tym obrót międzynarodowy) oraz rozprzestrzenianie się patogenów charakteryzujących się właściwościami immunosupresyjnymi (PRRSV, Mhp itp.). Zmiany w przedstawionych zakresach wydają się przyczyną zjawisk, które decydują o tym, że coraz rzadziej spotykamy się z chorobami kiedyś powszechnymi (pomór klasyczny świń, choroba pęcherzykowa, pryszczycą, brucelloza, różycą), a jednocześnie coraz częściej przyczyną zachorowań i padnięć świń stają się drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze (*Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter coli*, *Clostridium perfringens* czy cirkowirus świń PCV-2),

których wykrycie, identyfikacja i zwalczanie następcza wielu problemów. Otrzymane wyniki badań dowodzą, że drobnoustrojem takim może być również *A. pyogenes*.

## Piśmiennictwo

1. Bartlett J. M. S., Stirling D.: PCR Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 2003, 33-35, 53-55, 81-101.
2. Biberstein E., Hirsh D. C.: Corynebacteria; Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes; Rhodococcus equi. Veterinary Microbiology, Hirsh D. C., Zee Y. E. Blackwell Science Inc. 1999, 127-134.
3. Billington S. J., Jost B. H., Cuevas W. A., Bright K. R., Songer J. G.: The Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. J. Bact. 1997, 19, 6100-6106.
4. Billington S. J., Songer J. G., Jost B. H.: Molecular characterisation of the pore-forming toxin, pyolysin, a major virulence determinant of Arcanobacterium pyogenes. Vet. Microbiol. 2001, 82, 261-274.
5. Ding H., Lämmler C.: Purification and further characterization of a haemolysin of Actinomyces pyogenes. J. Vet. Med. B 1996, 43, 179-188.
6. Funk P. G., Staats J. J., Howe M., Nagaraja T. G., Chengappa M. M.: Identification and partial characterization of Actinomyces pyogenes hemolysin. Vet. Microbiol. 1996, 50, 129-142.
7. Hoie S., Falk K., Lium B. M.: An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. Acta Vet. Scand. 1991, 32, 395-402.
8. Imaizumi K., Serizawa A., Hashimoto N., Kaidoh T., Takeuchi S.: Analysis of the functional domains of Arcanobacterium pyogenes pyolysin using monoclonal antibodies. Vet. Microbiol. 2001, 81, 235-242.
9. Jones D., Collins M. D.: Irregular, nonsporing, gram-positive rods, genus Arcanobacterium. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, Section 15. Williams and Wilkins, A Waverley Company, Baltimore, USA 1986, 1287-1288.
10. Jost B. H., Post K. W., Songer J. G., Billington S. J.: Isolation of Arcanobacterium pyogenes from the porcine gastric mucosa. Vet. Res. 2002, 26, 419-425.
11. Malinowski E.: Letnie zapalenie wymienia. Medycyna Wet. 1996, 52, 343-346.
12. Malinowski E., Kłossowska A., Lassa H.: Variability among etiological agent of clinical mastitis in cows. P. J. Vet. Sci. 2001, 4, 41-44.
13. Scanlan C. M., Hathcock T. L.: Bovine rumenitis – liver abscess complex: a bacteriological review. Cornell Vet. 1983, 73, 288-297.
14. Taylor D. J.: Arcanobacterium (Actinomyces – Corynebacterium) pyogenes, [w:] Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J.: Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA 1999, 640-642.
15. Truszczyński M., Pejsak Z.: Arcanobacterium pyogenes. Medycyna Wet. 2005, 61, 373-376.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: zpejsak@piwet.pulawy.pl