

Występowanie genów kodujących czynniki zjadliwości szczepów *Streptococcus suis* izolowanych od świń z objawami streptokokozы i od bezobjawowych nosicieli*)

MICHAŁ FABISIAK, JERZY KITA, ROMAN JĘDRYCZKO*, MARIAN BINEK

Katedra Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*Weterynaryjna Diagnostyka Laboratoryjna, ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Fabisiak M., Kita J., Jędryczko R., Binek M.

Occurrence of gene encoding virulence factors in *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs

Summary

The paper presents a study of the prevalence of suilysin, MRP and EF protein encoding genes - considered to be important virulence factors in *Streptococcus suis*. Of the 63 strains included in the study, 44 were isolated from the tissues of streptococcosis affected pigs and 19 from the tonsils of healthy carrier animals. The suilysin gene was detected in 79% of the strains; *mrp* and *ef* genes were detected in 54% and 51% respectively; and the *ef** gene was present in 4 strains. Genotypes of the isolated strains were also analyzed. The majority of the strains (35%), isolated from both diseased as well as healthy pigs represented genotype *sly+* *mrp+* *ef+* but in 6 strains (10%), (five of which were isolated from diseased pigs) none of the genes were detected.

The study concluded that the capacity of *Streptococcus suis* to produce suilysin and other virulent proteins may have a direct impact on the pathological potential of *Streptococcus suis* strains.

Keywords: *Streptococcus suis*, suilysin, MRP, EF, swine

Streptococcus suis jest uznawany za przyczynę ostrych i przewlekłych zakażeń u świń przynoszących poważne straty we współczesnym, intensywnym chowie tego gatunku zwierząt (7). W ostrym przebiegu streptokokozы może dochodzić do zapalenia opon mózgowych i mózgu, zapalenia płuc, zapalenia stawów oraz zapalenia błon surowiczych. Drobnoustrój ten jest również chorobotwórczy dla ludzi i może u nich powodować zapalenia opon mózgowych o bardzo ciężkim przebiegu (14).

Streptokokozę rozpoznaje się na podstawie obserwacji objawów chorobowych, oceny zmian anatomopatologicznych, a głównie wyników badania bakteriologicznego. Objawy kliniczne są podobne jak przy chorobie obrzękowej czy też chorobie Glässera, a zmiany anatomopatologiczne niemal identyczne jak przy chorobie Glässera. Badanie bakteriologiczne jednak nie zawsze pozwala na rozpoznanie choroby, ponieważ od jednego zwierzęcia czasami izoluje się więcej niż jeden szczep tych bakterii o nieznannej zjadliwości. Szczepy o podobnych cechach obecne są także w środowisku bytowania zwierząt (4). Nie stwierdzono, jak dotychczas, zależności pomiędzy ich właściwościami fenotypowymi a zjadliwością.

Patogeneza różnych postaci streptokokozы nie jest do końca wyjaśniona. Istotnymi dla rozwoju choroby są takie czynniki zjadliwości *Str. suis*, jak: polisacharyd otoczkowy, cała grupa adhezyń, białka MRP i EF oraz suilizyna (8). Szczególnie dużo uwagi poświęca się suilizynie, która jest cytotoksyczną toksyną wykrywaną u większości euro-

pejskich szczepów *Str. suis* uznawanych za patogenne (10). Innymi ważnymi czynnikami wytwarzanymi przez *Str. suis*, które prawdopodobnie wpływają na patogenezę choroby, są: białko uwalniane przez muramidazę (MRP) oraz czynnik pozakomórkowy (EF). Białka te ulegają również ekspresji u większości szczepów *Str. suis* typu 2 izolowanych od świń w Europie oraz, zdaniem niektórych autorów, istotnie wpływają na wyższą zjadliwość tych bakterii (15, 16).

Celem podjętych badań było określenie częstości występowania genów kodujących suilizynę oraz białka MRP i EF u szczepów *Str. suis* różnych serotypów, wyizolowanych od świń z klinicznymi objawami streptokokozы oraz u szczepów wyizolowanych od bezobjawowych nosicieli.

Materiał i metody

Szczepy. Materiały do badań bakteriologicznych stanowiły migdałki pobrane od 198 świń zdrowych, ubitych w rzeźniach oraz wycinki narządów od 127 świń chorych z objawami streptokokozы i padłych lub poddanych ubojowi diagnostycznemu. Materiał posiewano na agar z krwią i podłoże MacConkeya, podłoże selektywne przeznaczone do izolacji paciorkowców (z dodatkiem kwasu oksolinowego i kolistyny), a także agar czekoladowy z dodatkiem czynnika V w celu izolacji *Haemophilus parasuis*. Posiewy inkubowano w warunkach tlenowych i mikroaerofilnych przez 24-48 godzin. We wstępnej ocenie zwracano uwagę na cechy wzrostu, hemolizę, wykonywano badanie mikroskopowe oraz test na wytwarzanie katalazy. Czyste kultury szczepów identyfikowano przy pomocy testu biochemicznego rapid ID 32 STREP.

Wyizolowane szczepy poddano typowaniu serologicznemu, metodą aglutynacji szkiełkowej z surowicami pozwalającymi na rozpoznanie serotypów od 1 do 11 oraz 13 i 14.

*) Badania sfinansowano z grantu promotorskiego KBN nr P06K 033 27.

Wykrywanie genów suilizyny, mrp, ef i ef* metodą PCR. Jako matrycy użyto DNA pochodzącego z komórek badanych *Str. suis*. DNA izolowano przy użyciu zestawu Genomic DNA Prep Plus. W celu wykrycia genu suilizyny startery do reakcji PCR (sly 1 o sekwencji nukleotydów TCAAAGCTTGACT-TACGGGCC oraz sly 2 o sekwencji CCACCATTCCCAAGC-TAATCC) dobrano na podstawie danych opublikowanych w pracy Okwumabua i wsp. (9). Odpowiednie startery dla genów mrp, ef i ef* (sekwencje nukleotydów poszczególnych starterów przedstawiały się następująco: mrp 1 – AGTGAACAGAACGAGCA-AGGTAG, mrp 2 – TTCCTTGATAACTGTGCCATCTT; ef 1 – ATGCTAACACAGTGACAGAAGCA, ef 2 – GCTTGACCA-ATTTGCATTATAGC; ef* 1 – CAGCTATTGATGCTAATCCA-AACTT; ef* 2 – GCGTATCTTCTGCAAGTTTCTCTAC) skonstruowano na podstawie sekwencji nukleotydów zapisanych w bibliotece genów NCBI (kody dostępu: X64450 dla mrp, A24023 dla ef, A24024 dla ef*).

Mieszanina reakcyjna, o końcowej objętości 50 µl składała się z: 10 × PCR-bufor, 1,5 mM MgCl₂ dla reakcji amplifikacji genu suilizyny i 2 mM MgCl₂ dla reakcji amplifikacji pozostałych genów, po 200 µM każdego z dNTP, 100 ng matrycy DNA, po 1 µM każdego ze starterów, 1 U polimerazy Taq dla reakcji amplifikacji genu suilizyny i 0,5 U polimerazy Taq dla reakcji amplifikacji pozostałych genów. Wstępną denaturację przeprowadzano w temp. 94°C przez 5 min. Program amplifikacji złożony z 35 cykli w przypadku genu suilizyny oraz 25 cykli w przypadku pozostałych genów obejmował denaturację DNA przez 1 min. w temp. 94°C, wiązanie starterów przez 1 min. w temp. 55°C, wydłużanie DNA przez 1 min. w temp. 72°C i końcowe wydłużanie w temp. 72°C przez 7 min.

Rozdział DNA przeprowadzano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 80 V przez 75 minut. Do określenia wielkości produktu amplifikacji używano markera MassRuler™ DNA Ladder Mix. Za wynik pozytywny uznawano pojawienie się prążka o wielkości odpowiadającej 1282 pz dla genu suilizyny, 1563 pz dla genu mrp, 1054 pz dla genu ef oraz 987 pz dla genu ef*.

Wyniki i omówienie

Ogółem przebadano 63 szczepy *Strep. suis*. Od zwierząt chorych na streptokokozę wyizolowano 44 szczepy. Pozostałe 19 szczepów pochodziło od świń zdrowych, będących nosicielami tego zarazka.

Największa liczba, bo aż 21 szczepów na 63 badane, aglutynowała z surowicą zawierającą przeciwciała przeciwko *Strep. suis* serotypu 2. Siedem szczepów zakwalifikowano do serotypu 7, a kolejnych sześć do serotypu 8. Po pięć szczepów reagowało z surowicami skierowanymi przeciwko *Strep. suis* serotypu 4 oraz 3. Serotyp 5 reprezentowały trzy szczepy. Do serotypu 1 i 1/2 zakwalifikowano po jednym szczepie. Nie stwierdzono szczepów, które aglutynowały z surowicami przeciwko serotypowi 9-11, 13 i 14. Serotypu 14 szczepów nie udało się oznaczyć przy pomocy dostępnego zestawu surowic pozwalającego na zidentyfikowanie *Strep. suis* należących do serotypów od 1 do 11 oraz 13 i 14. Dwa spośród szczepów nieoznaczonego serotypu izolowano od świń chorych, podejrzanych o streptokokozę, natomiast pozostałe 12 szczepów pochodziło z migdałków od świń bezobjawowych nosicieli zarazka.

Wyniki wykrywania u badanych izolatów genów kodujących czynniki chorobotwórczości przedstawiono w tab. 1.

Sekwencje specyficzne dla genu suilizyny wykryto u 50 spośród 63 (79%) badanych szczepów. Wśród izolatów pochodzących od świń z objawami streptokokozy gen ten stwierdzono u 38 na 44 przypadki (86%), natomiast u szcze-

Tab. 1. Występowanie genów kodujących suilizynę, białka MRP i EF u szczepów *Streptococcus suis* izolowanych od zwierząt chorych i bezobjawowych nosicieli

Szczepy izolowane od:	Liczba	Występowanie genu			
		sly (%)	mrp (%)	ef (%)	ef* (%)
Zwierząt chorych	44	38 (86%)	24 (55%)	22 (52%)	1 (1,5%)
Bezobjawowych nosicieli	19	12 (63%)	10 (53%)	10 (53%)	3 (4,5%)
Razem	63	50 (79%)	34 (54%)	32 (51%)	4 (6,0%)

pów *Str. suis* izolowanych od świń zdrowych gen suilizyny wykryto u 12 na 19 izolatów (63%).

Sekwencje specyficzne dla genu mrp wykryto u 34 spośród 63 (54%) badanych szczepów. Wśród izolatów pochodzących od świń z objawami streptokokozy gen ten stwierdzono u 24 na 44 przypadki (55%), natomiast u szczepów *Str. suis* izolowanych od świń zdrowych gen mrp wykryto u 10 na 19 izolatów (53%).

Bardzo podobnie przedstawiały się wyniki badań, w których wykrywano obecność genu ef. Ogółem stwierdzono go u 32 na 63 (51%) badane szczepy, w tym u 22 na 44 izolaty (52%) pochodzące od zwierząt chorych i u 10 na 19 izolatów (53%) pochodzących z migdałków zwierząt zdrowych.

Gen ef* wykryto u 4 badanych szczepów. Trzy z wymienionych pochodziły z migdałków od świń zdrowych, a jeden z osłonki pochłowej wspólnej jądra od świni chorej, pochodzącej z chlewni gdzie izolowano również trzy inne szczepy mające gen ef zamiast ef*. Szczepy te izolowano z mózgu lub narządów mięsnych. Wszystkie szczepy, u których wykryto obecność genu ef* należały do serotypu 2.

W tab. 2 przedstawiono łączne występowanie genów kodujących wspomniane czynniki zjadliwości u badanych szczepów.

W sumie u 22 izolatów (35%) stwierdzono występowanie wszystkich genów. Osiemnaście spośród tych szczepów pochodziło od zwierząt chorych, a cztery od bezobjawo-

Tab. 2. Łączne występowanie genów kodujących czynniki zjadliwości (suilizyna, białka MRP i EF) u szczepów *Streptococcus suis* izolowanych od zwierząt chorych i bezobjawowych nosicieli

Łączne występowanie genów	Szczepy izolowane od:		
	ogółem	zwierząt chorych	bezobjawowych nosicieli
sly+ mrp+ ef+	22	18	4
sly+ mrp+ ef-	3	3	0
sly+ mrp- ef+	3	2	1
sly+ mrp- ef-	18	13	5
sly- mrp+ ef+	6	2	4
sly- mrp+ ef-	0	0	0
sly- mrp- ef+	1	0	1
sly- mrp- ef-	6	5	1
Razem	59	43	16

wych nosicieli. Drugim pod względem częstości występowania był genotyp sly⁺ mrp⁻ ef⁻ reprezentowany przez 18 szczepów (29%), z których 13 pochodziło od zwierząt chorych, a 5 od bezobjawowych nosicieli. Genotyp sly⁺ mrp⁺ ef⁻ stwierdzono u 3 szczepów i wszystkie izolowano od zwierząt z objawami streptokokozy. Genotyp sly⁺ mrp⁻ ef⁺ stwierdzono również u 3 szczepów. Dwa z nich pochodziły od świń chorych, a jeden z migdałków bezobjawowego nosiciela. U 6 szczepów (10%) wykryto łączne występowanie genów mrp i ef przy jednoczesnym braku genu suilizyny. Dwa spośród nich pochodziły od zwierząt chorych, a cztery od bezobjawowych nosicieli. U 6 (10%) szczepów nie wykryto żadnego z poszukiwanych genów. Pięć z tych szczepów pochodziło od świń chorych, a tylko jeden z migdałków bezobjawowego nosiciela. Genotyp sly⁻ mrp⁻ ef⁺ wystąpił tylko u 1 szczepu izolowanego z migdałków, natomiast genotypu sly⁻ mrp⁺ ef⁻ nie stwierdzono u żadnego z badanych szczepów.

Z danych nie przedstawionych w tabelach wynika, że 4 izolaty, u których wykrywano gen ef^{*}, reprezentują następujące genotypy: 2 izolaty (jeden pochodzący od świni zdrowej, a drugi od chorej) sly⁺ mrp⁺ ef^{*} oraz po jednym izolacie pochodzącym z migdałków sly⁺ mrp⁻ ef^{*} i sly⁻ mrp⁺ ef^{*}.

Wraz z odkryciem białek MRP i EF wytwarzanych przez *Str. suis* wiązano nadzieję na wyjaśnienie mechanizmów zjadliwości tych bakterii oraz patogenezę streptokokozy. W początkowych badaniach (12, 16) udało się zaobserwować zależność między zjadliwością *Str. suis* należących do serotypu 2 a ich zdolnością do syntezy białek MRP i EF. Jednakże wyniki innych autorów (1, 3, 6, 17) nie były już tak jednoznaczne i sugerowały, że białka MRP i EF zwiększają zjadliwość jedynie niektórych izolatów *Str. suis*, jak np. zaliczanych do serotypu 1, 2, 1/2 i 14. U innych zjadliwych szczepów białka te częstokroć nie są syntetyzowane. Smith i wsp. (11) wykazali, że u mutantów *Str. suis* pozbawionych genów mrp i ef nie dochodziło do obniżenia ich zjadliwości.

Dotychczasowe wyniki badań własnych, jak i dane innych autorów zdają się wskazywać, że istotnym czynnikiem warunkującym chorobotwórczość *Str. suis* jest suilizyna. Występowanie kodującego ją genu określa się na poziomie 69,4% (5) lub 75% (9). W badaniach nad ekspresją tego genu Tarradas i wsp. (13) stwierdzili syntezę suilizyny przez 47% szczepów izolowanych od zwierząt chorych i przez 22,9% szczepów wyisobnionych od bezobjawowych nosicieli. Wyniki, jakie uzyskano w niniejszej pracy są bardzo zbliżone do wyników przedstawionych w pracach King i wsp. oraz Segers i wsp. (5, 10). Obecność genu suilizyny wykazano bowiem u 79% badanych izolatów, w tym u 86% pochodzących od zwierząt chorych i 63% od świń zdrowych bezobjawowych nosicieli.

Doto i wsp. (2) na podstawie obecności lub braku genów sly, mrp, ef, ef^{*} wykazali duże zróżnicowanie genetyczne szczepów *Str. suis* serotypu 2 izolowanych od świń w Brazylii. Na tej podstawie wyróżnili 8 genotypów. W badaniach własnych wyodrębniono 9 genotypów, w tym dwa: sly⁺ mrp⁻ ef^{*} i sly⁻ mrp⁺ ef^{*} wcześniej nie opisywane. Nie stwierdzano natomiast genotypu sly⁻ mrp⁺ ef⁻, niezwykle rzadko występującego i opisanego w jednym na 133 izolaty analizowane przez wspomnianych badaczy.

Obecność genu suilizyny u przeważającej większości izolatów pochodzących od świń chorych oraz dodatkowo

występowanie genów mrp i ef u tych szczepów i u większości szczepów należących do serotypu 2 pozwala przypuszczać, że produkty tych genów wspólnie mogą wpływać na patogenezę powodowaną przez nie choroby. Z drugiej strony, obecność szczepów pozbawionych jednego, dwóch lub wszystkich z tych genów może wyjaśniać zróżnicowaną ich zjadliwość i różny przebieg powodowanej przez nie choroby.

Wydaje się, że *Str. suis* mogą nabierać cech chorobotwórczości w wyniku włączenia do swojego genomu, na drodze horyzontalnego transferu, genów kodujących różne białka zjadliwości. Rezerwuarem takich szczepów pozostają również świny zdrowe, u których w niewielkim odsetku, ale stwierdza się *Str. suis* mające geny wszystkich ważniejszych czynników zjadliwości.

Piśmiennictwo

1. Baums C. G., Da Silva L. M., Goethe R., Valentin-Weigand P.: Occurrence and diagnostic relevance of virulence-associated factors in *Streptococcus suis*. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 2003, 110, 378-381.
2. Doto D. S., Calderano F. F., Baccaro M. R., Gomes C. R., Shymia L. T., Pestana de Castro A. F., Moreno A. M.: Detection of virulence-related protein genes in Brazilian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2 by PCR. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc. 2004, 18, 617.
3. Galina L., Vecht U., Wisselink H. J., Pijoan C.: Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the USA based on the presence of muramidase released protein and extracellular factor. Can. J. Vet. Res. 1996, 60, 72-74.
4. Higgins R., Gottschalk M.: Streptococcal diseases, [w:] Straw W. B. E., Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. (wyd.): Diseases of Swine. Iowa University Press, Ames, Iowa 1999, 563-578.
5. King S. J., Heath P. J., Luque I., Tarradas C., Dowson C. G., Whatmore A. M.: Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. Infect. Immun. 2001, 69, 7572-7582.
6. Luque I., Tarradas C., Astorga R., Perea A., Wisselink H. J., Vecht U.: The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. Res. Vet. Sci. 1998, 66, 69-72.
7. MacInnes J. I., Desrosiers R.: Agents of a „Suis – ide Diseases” of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*. Can. J. Vet. Res. 1999, 63, 83-89.
8. Markowska-Daniel L., Kowalczyk A.: Możliwości genetycznego różnicowania paciorkowców ze szczególnym uwzględnieniem *Streptococcus suis*. Med. Wet. 2005, 61, 851-856.
9. Okwumabua O., Abdelmagid O., Chengappa M. M.: Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 181, 113-121.
10. Segers R. P., Kenter T., de Haan L. A., Jacobs A. A.: Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. FEMS Microbiol. Lett. 1998, 167, 255-261.
11. Smith H. E., Vecht U., Wisselink H. J., Stockhofe-Zurwieden N., Biermann Y., Smits M. A.: Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase – released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. Infect. Immun. 1996, 64, 4409-4412.
12. Staats J. J., Plattner B. L., Stewart G. C., Changappa 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.
13. Tarradas C., Borge C., Arenas A., Maldonado A., Astorga R., Miranda A., Luque I.: Suilysin production by *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy carrier pigs in Spain. Vet. Rec. 2001, 148, 183-184.
14. Tarradas C., Luque I., de Andres D., Abdel-Aziz Shahen Y. E., Pons P., Gonzalez F., Borge C., Perea A.: Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. J. Vet. Med. B 2001, 48, 347-355.
15. Vecht U., Wisselink H. J., Jellema M. L., Smith H. E.: Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. Infect. Immun. 1991, 59, 3156-3162.
16. Vecht U., Wisselink H. J., van Dijk J. E., Smith H. E.: Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 1992, 60, 550-556.
17. Wisselink H. J., Smith H. E., Stockhofe-Zurwieden N., Peperkamp K., Vecht U.: Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. Vet. Microbiol. 2000, 74, 237-248.

Adres autora: lek. wet. Michał Fabisiak, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: michalfabisiak@wp.pl