

**О. А. ТАРАСОВ**, кандидат ветеринарних наук  
**В. П. САПЕЙКО**, кандидат ветеринарних наук  
**І. В. ГАЛКА**, кандидат ветеринарних наук  
**І. А. ЗОЦЕНКО, М. М. БАБКІНА**

*Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ*

**О. С. ГАЙДЕЙ**, кандидат ветеринарних наук

*Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ*

## ВПЛИВ МОЛЕКУЛЯРНО – ГЕНЕТИЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ *STREPTOCOCCUS SUIIS* НА ЙОГО ВІРУЛЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ

*У статті викладені результати досліджень впливу молекулярно-генетичних особливостей на вірулентність збудника стрептококозу свиней.*

*Було розраховано пари праймерів для вивчення молекулярно-генетичних особливостей ізолятів збудника щодо генів, які за даними літератури мають прямий зв'язок із ступенем вірулентності (*mpr* та *epf*):*

*$epf-2407$  5'-GCTACGACGGCCCT-CAGAAATC- 3' та  $epf-3012$  5'-GGATCAACCACTGGGTGTAC-3';  $epf-F$  5'- TGATGCTAAGACTA-ATGGTGAGAT-3' та  $epf-R$  5'-GGAATG-CCTTGATACGAGC- 3';  $mpr-R3$*

*5'-TGGTAGGATCAATAGTAAATGGAG-3' та  $mpr-F3$*

*5'-TGCCTACATTCGTTACTCTTTGG-3';*

*$mpr-F25$ -GAAGCGGTTGC-AGAAGAAGC-3' та  $mpr-R2$  5'-GAAGGCGT-TGCTGTTGTAGTGC-3' на консервативну ділянку гена *mpr* та варіабельну ділянку гена *epf* для встановлення можливих відмінностей ізолятів щодо даного гена та/або його фрагменту.*

*Отримані результати засвідчують про наявність розбіжностей в цьому районі геному (фрагмент довжиною в 626 п.н.) для 14 ізолятів збудника стрептококозу свиней, які відрізнялись за ступенем вірулентності.*

*Отримані результати засвідчують про відсутність розбіжностей в цьому районі геному (фрагмент довжиною в 626 п.н.) для 5 високпатогенних ізолятів збудника стрептококозу свиней. Для ізолятів 8,20,14,14,17 характерні певні відмінності у гені *epf*. ПЛР продукти різних розмірів (1278, 1505, 2313, 2537, 2993 bp) були отримані у випадку середньо вірулентних ізолятів *MRP+EF\* S. suis* типу 2, що відповідає даним літератури про можливість варіювання цієї ділянки гену.*

*Ключові слова: стрептококоз свиней, молекулярно- генетичні властивості, вірулентні властивості*

**Streptococcus suis* типу 2 є важливим патогеном для свиначства майже в усіх країнах світу (Vecht et al., 1991; Reams et al., 1994) [11, 7]. Найбільша кількість випадків припадає на вікову групу на поросят від 3 до 12 тижнів (Lamont et al., 1980) [6].*

*В більшості європейських країн, *S. suis* серотипу 2 (типу 2) є найбільш поширеним, серед ідентифікованих ізолятів від хворих свиней. Згідно даних зарубіжних дослідників, штами та ізоляти типів 1 та 2 часто відрізняються за ознакою вірулентності. Вірулентні варіанти мають в своєму складі 136 кДа мурамідазо-вивільняючий протеїн (*MRP+*) та 110кДа позаклітинний білковий антиген (*EF+*), слабо вірулентні штами продукують *MRP* та *EF-* протеїн (*MRP+EF\**), невірулентні штами не продукують цих протеїнів (*MRP-EF-*) (Vecht et al., 1991, 1996) [11-12].*

*На основі цього ділення на фенотипи, штами та ізоляти *S. suis* типу 1 були віднесені до *MRPsEF+* та *MRP-EF-* фенотипів. Ізоляти фенотипу *MRPsEF+* продукували *MRP-* протеїн зменшеної маси (біля 120 кДа) та 110-кДа *EF* протеїн, та були високо вірулентними для поросят [1- 4].*

*Хоча спостерігається пряма кореляція між продукуванням протеїнів *MRP* та *EF* та вірулентністю, мутантні штами, лізогенні за цими генами зберігали вірулентність у відношенні до свиней не продукуючи даних антигенів. У той же час, в більшості Європейських країн, США та Австралії штами та ізоляти фенотипу *MRP+EF+* найбільш превалювали при типуванні ізолятів, виділених із патологічного матеріалу від загинув свиней (Mwaniki et al., 1994, Salasia et al., 1995, Galina et al., 1996) [2, 6, 8]. Таким чином, цей фенотип вважається класичним вірулентним фенотипом.*

*У наших дослідженнях ми приділяли увагу *EF*-протеїну як маркеру вірулентності та гену *epf* як інструменту для визначення вірулентності ізолятів [5, 7, 9, 10].*

*В сучасних умовах для диференціювання фенотипів збудника стрептококозу свиней використовують молекулярно-генетичні методи для швидкої детекції вірулентних ізолятів *Streptococcus suis* [4, 7, 8, 11, 12].*

**Мета** Вивчити вплив молекулярно-генетичних особливостей на вірулентність збудника стрептококозу свиней.

### **Матеріали та методи**

*У роботі були використані штами та ізоляти *Streptococcus suis*, що виділені фахівцями лабораторії бактеріальних хвороб свиней та лабораторії вивчення сибірки, зберігаються та підтримуються в Інституті ветеринарної медицини. Для проведення досліджень використовували патогенні ізоляти стрептококозів свиней (14), які відрізнялись за ступенем вірулентності (за даними наших попередніх досліджень).*

*Культивування проводили: в м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) з рН – 7,4 – 7,6 із додаванням інактивованої сироватки крові ВРХ в кількості 8-10 % за температури 36,7± 0,3° С протягом 24 годин та в м'ясо-пептонному агарі (МПА) 24 – 48 години.*

*Дослідження морфологічних та культуральних властивостей проводили з використанням загальноприйнятих бактеріологічних методів.*

*Для досліджень було застосовано розраховані пари праймерів на консервативну ділянку гена *mpr* та варіабельну ділянку гена *epf* для встановлення можливих відмінностей ізолятів щодо даного гена та/або його фрагменту.*

### **Результати досліджень**

*Праймери, які використовувались у дослідках, були розраховані на ділянку геному (ген *epf*), зміни в якій можуть супроводжуватись змінами вірулентності.*

*Специфічність всіх розрахованих праймерів складала 100 % згідно сиквенсів баз даних DDBJ/EMBL/GenBank/PDB, а саме: AY296730, X71881, DQ410873, DQ410876 та GQ352521.*

Праймери розраховані із використанням послідовностей генів *epf* та *epf\**, які згідно сіквенсів міжнародного банку генів були госмологічними. за виключенням тандемних повторів групи амінокислот в гені *epf\**

Дизайн праймерів проведений для фланкування регіонів, де присутні інсерційні послідовності та за різницею в розмірах можливо проаналізувати молекулярно- генетичні особливості щодо даного гену.

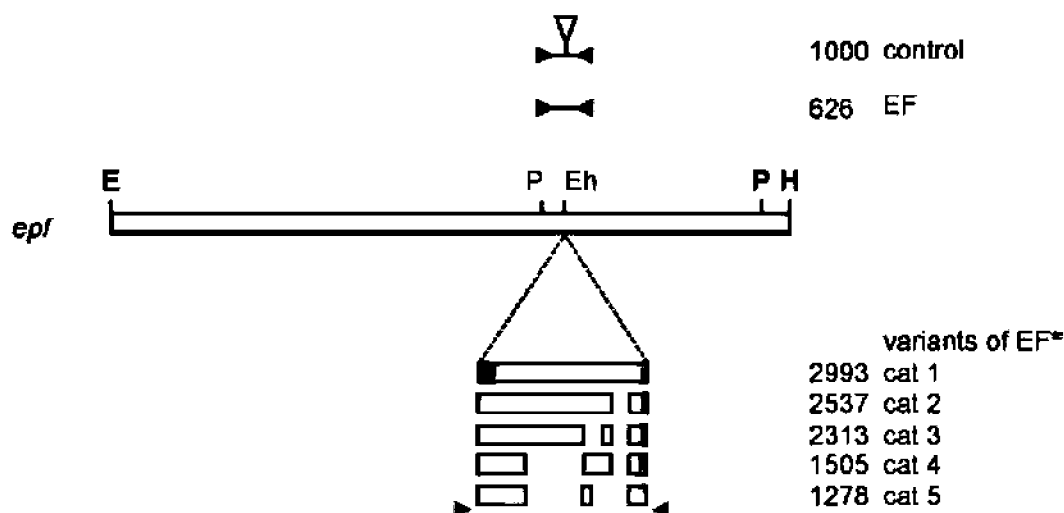


Рис. 1 Схеми гену *epf*, що кодує *EF*- протеїн та варіанти *EF\**-протеїнів із позицією праймерів. На схемі показані сайти для ферментів *EcoRI* (*E*), *PstI* (*P*), *EhoI* (*Eh*) та *HindIII* (*H*). Очікуваний розмір ампліфікованих фрагментів позначено у нп.

Таким чином були застосовані наступні праймери (Vecht et al., 1996):

*epf*-1 5'-gCTACgACggCCTCAgAAATC- 3' 21

*epf*-2 5'- ggATCAACCACtggTgTTAC-3' 20

ці праймери відповідають позиціям 2407 – 2427 та 3032 – 3012 в гені *epf* та позиціям 2407-2427 та 5400-5380 в гені *epf\**.

Розмір ампліфікованих фрагментів складає 626 нп для *EF+* штамінів та 1278, 1505, 2313, 2537 і 2993 нп для різних варіантів *EF\** штамінів

Також співробітниками розраховано додаткові пари праймерів для аналізу можливих відмінностей у генах *epf* та *mpr* серед ізолятів збудників стрептококозів свиней із різних регіонів України.

*epf*-3 5'-TgATgCTAAgACTAAATggTgAgAT-3' 24

*epf*-4 5'-ggAAAgCCTTgATACgAgC- 3' 19

*mpr*-R3 5'-TggTAaggATCAATAgTAAATggAg-3' 24

*mpr*-F3 5'-TgCCTACATTCgTTACTCTTgg-3' 23

У результаті відпрацювання умов проведення реакції ПЛР були встановлені оптимальні показники (Таблиця 1)

Таблиця 1

Програма температурного режиму для проведення ПЛР з праймерами на консервативну ділянку гена *mpr* та варіабельну ділянку гена *epf*

Праймери – <i>epf</i> -3/ <i>epf</i> -4			Праймери – <i>mpr</i> -R3/ <i>mpr</i> -F3			Праймери <i>epf</i> -1/ <i>epf</i> _2		
етап	режим	кількість циклів	етап	режим	кількість циклів	етап	режим	кількість циклів
1	94° C - 4 хв	1	1	94° C - 4 хв	1	1	95° C - 10 хв	1
2	94° C - 1 хв 60° C - 1 хв 72° C - 2 хв	35	2	94° C - 1 хв 58° C – 30с 72° C - 2 хв	40	2	94,8° C - 1 хв 60° C - 1 хв 72° C - 2 хв	40
3	72° C - 5 хв	1	3	72° C - 5 хв	1	3	72° C - 10 хв	1
4	10° C	зберігання	4	10° C	Зберігання	4	10° C	зберігання

Умови проведення ПЛР, відображені в таблиці забезпечують отримання достовірних результатів та стабільність реакції за

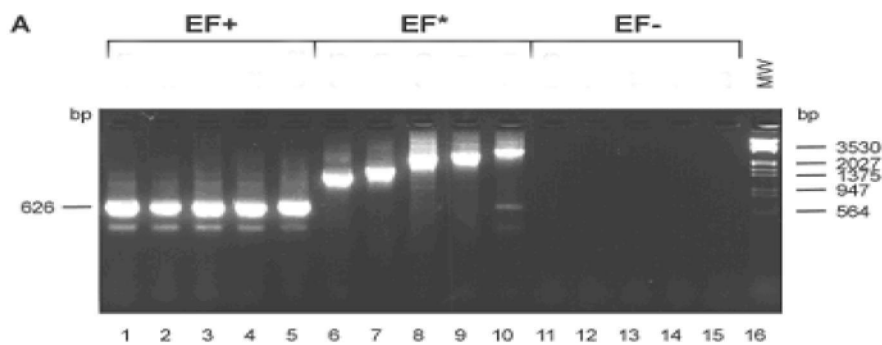


Рис. 2 Електрофореграма ампліфікованих фрагментів ізолятів *S. suis* типу 2. Полоски 1-5 *S. suis* (*MRP+EF+*) ізоляти 3, 10, 31, 19, 11; полоски 6-10 *S. suis* (*MRP+EF+*) ізолят 8, 20, 14, 14, 17; полоски 11-15 *S. suis* типу 1 (*MRP-EF-*) ізоляти 31, 16, 25, 15, 18. Ряд MW містить маркер молекулярної ваги

Отримані результати засвідчують про відсутність розбіжностей в цьому районі геному (фрагмент довжиною в 626 п.н.) для 5 високопатогенних ізолятів збудника стрептококозу свиней. Для ізолятів 8, 20, 14, 14, 17 характерні певні відмінності у гені *epf*. ПЛІР продукти різних розмірів (1278, 1505, 2313, 2537, 2993 bp) були отримані у випадку середньо вірулентних ізолятів *MRP+EF\** *S. suis* типу 2, що відповідає даним літератури про можливість варіювання цієї ділянки гену (Рис. 2.).

У результаті досліджень встановлено фрагмент довжиною 626 нук-леотидних пар у штамів *MRP+EF+* *S. suis* типу 2 (Рис. 1, лінії 1-5) та відсутність ПЛІР продукту у випадку дослідження фенотипу *MRP-EF-* штамів (ізоляти 31, 16, 25, 15, 18) (Рис. 2, лінії 11-15).

Отримані результати засвідчують про наявність розбіжностей в цьому районі геному (фрагмент довжиною в 626 п.н.) для 14 ізолятів збудника стрептококозу свиней, які відрізнялись за ступенем вірулентності (Рис. 2.).

#### Висновки

1. Розраховано чотири пари специфічних праймерів на ділянку генів *epf* та *mvp* для дослідження молекулярно-біологічних властивостей збудників стрептококозів свиней та визначено оптимальні умови проведення ПЛІР.

2. За допомогою реакції ПЛІР встановлено, що ізоляти збудника стрептококозів свиней мали певні відмінності за геном *epf*. Продукт ампліфікації утворювався при наявності матеріалу від високо патогенних та середньо патогенних штамів. У випадку слабо патогенних та авірулентних штамів, ампліфікат був відсутній, що підтверджує відсутність продукування цими ізолятами позаклітинного протеїнового антигену. Комплексні дослідження стануть підґрунтям для подальших фундаментальних та прикладних досліджень щодо даного збудника.

Результати досліджень, які були отримані при проведених дослідженнях, дозволили охарактеризувати штами та місцеві ізоляти *S. suis* за антигенними та молекулярно-генетичними властивостями. Таким чином, отримані дані щодо молекулярно-генетичних особливостей будуть ураховані в подальших дослідженнях при створенні засобів специфічної профілактики та контролюванні циркуляції різних типів збудника в господарствах України.

Наступними етапами планується розробка специфічних біопрепаратів для активної профілактики стрептококозів свиней.

#### Список використаної літератури

- Clifton-Hadley F. A. Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs / Clifton-Hadley F. A., Alexander T. J. L., Upton I., Duffus W. P. H. // *Vet Rec.* – 1984. – № 114, – P. 513-518.
- Galina L. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muramidase-released protein and extracellular factor / Galina L., Vecht U., Wisselink H. J., Pijoan C. // *Can. J. Vet. Res.* – 1996. – № 60. – P. 72-74
- Gottschalk M. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis* / Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Beaudoin M., Henrichson J. // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – № 29, – P. 2590-2594.
- Higgins R. An update on *Streptococcus suis* identification / R. Higgins, M. Gottschalk. // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1990. – № 2, – P. 249-252.
- Lamont M. H. Streptococcal meningitis in pigs: Results of a five-year survey / M. H. Lamont, P. T. Edwards, R. S. Windsor // *Vet. Rec.* – 1980. – № 107. – P. 467-469.
- Mwaniki C. G. The prevalence of *Streptococcus suis* type 2 in Western Australian piggeries / C. G. Mwaniki, I. D. Robertson, D. J. Hampson // *Australian Vet. J.* – 1994. – № 71, – P. 385-386.
- 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 [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1994 – № 6, – P. 326-334.
- Salasia S. I. Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs / S. I. Salasia, C. Lam-mler. // *Zentralbl. Veterinarmed.* 1995. – № 42, – P. 78-83.
- Stockhofe-Zurwieden N. Comparative studies on the pathogenicity of different *Streptococcus suis* type 1 strains / N. Stockhofe-Zurwieden, [et al.] // *Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna.* – 1996. – P. 299.
- Smith H. E. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* are absent in pathogenic strains / H. E. Smith, A. L. J. Gielkens, M. A. Smits // *Infect. Immun.* – 1993. – № 61, – P. 3318-3326.
- Vecht, U. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2 / Vecht U. [et al.] // *Infect. Immun.* 1991. – № 59. – P. 3156-3162.
- Vecht U. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs / Vecht U., Wisselink H.J., Reek F.H., Stockhofe-Zurwieden N., Smith H.E. // *Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna.* -1996. – P. 298.

**INFLUENCE OF THE MOLECULAR-GENETIC PECULIARITIES OF STREPTOCOCCUS SUIS ONTO ITS VIRULENT PROPERTIES** / Tarasov O.A., Sapeyko V.P., Galka I.V., Zotsenko I.A., Babkina M.M., Gaidei O.S.

*The paper presents the results of studies of the impact of molecular genetic features on the virulence of the swine streptococcosis causative agent.*

*Pairs of primers were designed to study the molecular genetic features of the isolates for genes that a direct correlation with the degree of virulence (mrp and epf): epf-2407 5'-GCTACGACGGCCT-CAGAAATC-3' and epf\_3012*

*5'-GGATCAACCACTGGTGTTAC-3' ;*

*epf-F 5'-TGATGCTAAGACTA-ATGGTGAGAT-3' and*

*epf-R 5'-GGAATG-CCTTGATACGAGC-3' ; mrp-R3*

*5'-TGGTAGGATCAATAGTAAATGGAG-3' and mrp-F3 5'-TGCCTACATTCGTTACTCTTTGG-3' ; mrp-F2 5'-GAAGCGGTTGC-AGAAGAAGC-3' and mrp-R2 5'-GAAGGCGT-TGCTGTTGTAGTGC-3' at a conservative area and mrp gene variable region gene epf to establish possible differences isolates for the gene and / or a fragment thereof.*

*The results confirm the presence of differences in the region of the genome (fragment length 626 bp) for 14 isolates of the swine streptococcosis pathogen which differ in the degree of virulence.*

*The results confirm the absence of differences in the region of the genome (fragment length 626 bp) for 5 Highly pathogen isolates streptococcosis pigs. For isolates 8,20,14,14,17 are several differences in gene epf. PCR products of different sizes (1278, 1505, 2313, 2537, 2993 bp) were obtained in the case of medium virulent isolates MRP + EF \* S. suis type 2, which corresponds to the literature about the possibility of variation of this part of the gene.*

*Keywords: swine streptococcosis, molecular-genetic properties, virulence properties*

**Рецензент** – кандидат ветеринарних наук **В. В. Уховський**.

Рукопис надійшов 22.09.2014 року.