



TDK DOLGOZAT

Vajda Lilla
2023.

Állatorvostudományi Egyetem
Patológia Tanszék
Haszonállat-Diagnosztikai Központ

Magyarországi sertésekből izolált *Streptococcus suis* törzsek jellemzése

Készítette: Vajda Lilla

VI. évfolyam, állatorvostan-hallgató

Témavezető:

dr. Albert Ervin

egyetemi tanársegéd

2023.

Tartalomjegyzék

ÁBRA-ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK.....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Streptococcus genus és a Streptococcus suis általános jellemzése.....	4
2.1.1. <i>A Streptococcusok mikrobiológiája és tenyésztése</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>A Streptococcus suis</i>	<i>6</i>
2.1.3. <i>A Streptococcus suis előfordulása és patogenitása sertésben</i>	<i>6</i>
2.1.4. <i>A Strep. suis okozta tünetek sertésben, hajlamosító tényezők.....</i>	<i>8</i>
2.2. A Streptococcus suis törzsek járványtana	8
2.2.1. <i>Szerotípusok és a szerotípusok szerepe a S. suis járványtanában</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Diagnosztikai lehetőségek, a szerotipizálás jelentősége.....</i>	<i>9</i>
2.2.3. <i>Földrajzi megoszlás, ennek járványtani jelentősége</i>	<i>10</i>
2.3. A Streptococcus suis elleni védekezés lehetőségei	11
2.3.1. <i>A vakcinás védekezés lehetőségei, előnyök és nehézségek</i>	<i>11</i>
2.4. A S. suis közegészségügyi jelentősége.....	13
3. CÉLKITŰZÉS	14
4. ANYAG-ÉS MÓDSZER.....	14
4.1. A streptococcus izolátumok eredete	14
4.1.1. <i>mintagyűjtés- és tárolás</i>	<i>14</i>
4.1.2. <i>A streptococcusok primer tenyésztése és fajszintű azonosítása</i>	<i>15</i>
4.1.3. <i>A szerotípus meghatározása</i>	<i>15</i>
4.1.4. <i>Az izolátumok konzerválása, a konzerválási naplók elemzése és az izolátumok kiválogatása további vizsgálatokra</i>	<i>15</i>
4.2. A konzervált izolátumok mikrobiológiai vizsgálata.....	16
4.2.1. <i>Tenyésztés</i>	<i>16</i>
4.2.2. <i>Szelektív elődúsítás</i>	<i>16</i>
4.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	17
4.3.1. <i>A bakteriális DNS izolálása.....</i>	<i>17</i>
4.3.2. <i>PCR tesztek, döntéshozatal</i>	<i>17</i>
4.3.2.1. <i>A szerotípus genetikai hátterének azonosítása PCR segítségével (Genoszerotipizáló mPCR és a MAMA PCR)</i>	<i>18</i>
4.3.2.2. <i>A S. suis és a Streptococcus genus azonosítására használt multiplex PCR teszt.....</i>	<i>20</i>

4.4. Adatrögzítés és elemzés	21
5. EREDMÉNYEK.....	21
5.1. A Magyarországon előforduló <i>S. suis</i> szerotípusok és azok aránya az egyes telepeken	21
5.1.1. Térkép + idő oszlopdiagramja; mátrixok; szerotípusok általában	22
5.1.2. A szerotípusok és a gyakoribb szerotípusok szöveti tropizmusa	23
5.1.3. Szerotípusok megoszlása az egyes nagy mintaszámot szolgáltató telepeken.....	25
5.2. A szerotípus meghatározására használt módszerek értékelése.....	26
6. MEGBESZÉLÉS.....	26
6.1. A Magyarországon előforduló <i>S. suis</i> szerotípusok és azok jellemzése	26
6.2. A szerotípusok megoszlása az egyes nagy mintaszámot szolgáltató telepeken.....	28
6.3. A szerotípus meghatározására használt módszerek értékelése	29
6.4. Következtetések.....	31
ÖSSZEFOGLALÓ	32
SUMMARY.....	33
IRODALMJEGYZÉK.....	34
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	41

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra β -haemolizáló <i>Streptococcus</i> sp. véres agaron [saját]	16
2. ábra A MAMA-PCR működési elvének sematikus ábrázolása. A: PCR1 B: PCR2 [51].....	19
3. ábra Az izolátumokat szolgáltató 45 telep térképen [saját].....	22
4. ábra <i>Streptococcus suis</i> izolátumok éves és havi bontása [saját]	22

TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat Molekuláris biológiai módszer döntéshozatala a kapott eredmények és az abból való következtetések alapján.....	18
2. táblázat MAMA-PCR eredményeinek értelmezése	20
3. táblázat A fajazonosító mPCR működési profilja	21
4. táblázat <i>Strep. suis</i> izolátumok szerotípusai, kimutatásukhoz használt módszer és a mátrixok	24
5. táblázat A három telep izolátumainak és szerotípusainak aránya, megoszlása	25

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

PCR – Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció

mPCR – Multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex polimeráz láncreakció

MAMA PCR – Mismatch Amplification Mutation Assay polymerase chain reaction

AM – Assay Mix

16S rRNS - 16 Svedberg units ribosomal-ribonucleic acid, 16 Svedberg egység riboszómális ribonukleinsav

RNS – ribonukleinsav

rRNS – riboszómális ribonukleinsav

SS – Streptococcus suis

CPS – kapszula

SLY – suilysin

MRP – muramidáz-felszabaduló fehérje

EF – extracelluláris fehérje faktor

BBB – blood-brain barrier, vér-agy gát

FHBP – H-factor binding protein, FH-kötő fehérje

cnp60 – Chaperonin fehérje 60

MLST – multilókusz.szekvencia tipizálás

ST – szekvenciatípus

CC – klonális komplex

MODS – multi organ dysfunction syndrome, többszervi sokk

NBS – Nemzeti Bakteriológiai Surveillance

BEVEZETÉS

Élővilágunkban számos mikroorganizmus található, amelyek a legtöbb esetben a környezetben és az emberi szervezetben harmóniában élnek. Azonban bizonyos mikrobiológiai ágensek kiemelkedő jelentőséggel bírnak humán és állati egészség szempontjából, mivel patogén tulajdonságaik révén komoly betegségeket okozhatnak.

A nagyüzemi sertéstartásra jellemző a szakaszos nevelés, mely esetén mindegyik fázisában nagyfokú figyelmet kell szentelni a kórokozókkal szembeni prevencióra, azok minél gyorsabb és biztosabb detektálására. Magyarországon a jelenlegi választási mód a szopós malacok esetében a 28 napos kor, majd 90 napos korban történik a további szelektálás. Ebben a 3 hónapos időszakban gyakori a bakteriális fertőződés a malacok között, és az egyik jelentős patogén a *Streptococcus suis*. Gyakori a szubklinikai megjelenése, ám más kórokozókkal történő koinfekció esetén súlyosbíthatja azok klinikai tüneteit, ezzel rontva a gazdasági mutatókat. A nagyüzemi sertéstartásban a profitábilis termelés érdekében elengedhetetlen a fertőző kórokozók jelenlétéről készülő vizsgálatok, így a *S. suis* fertőzések detektálása, monitorozása, a törzsek részletes vizsgálata, és szerotípusuknak megállapítása elősegíti a megfelelő intézkedések alkalmazását.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Streptococcus genus és a Streptococcus suis általános jellemzése

A nemzetség tagjai különböző állatfajban, így emlősben, halakban és többek között emberben kommenzális baktériumként gyakran előfordulnak a nyálkahártyákon, de akár sporadikusan átmeneti bőrmikrobiótaként is jelen tudnak lenni [83]. Több *Streptococcus* faj is magas virulenciapotenciállal rendelkezik, ám a magas patogenitás ellenére gyakran kolonizáló törzsekként vannak csak jelen [83]. Sertések felső légútjában, az emésztő csatornán belül a belekben vagy akár a nemi szervek nyálkahártyáján diagnosztikai módszerekkel kimutathatóak klinikailag egészséges, tünetmentes állatokból is [86].

2.1.1. A Streptococcusok mikrobiológiája és tenyésztése

A *Streptococcus* szó eredete és annak használata egészen 1868-ig nyúlik vissza, amikor is Theodor Billroth német sebész az általa sebből kimutatott mikroorganizmus leírására először alkalmazta ezt a kifejezést [98]. Az elmúlt évtizedekben a Gram-pozitív baktériumok között

végzett széleskörű 16S rRNS génszekvencia-elemzésnek köszönhetően részletesebb és pontosabb kép áll rendelkezésre a nemzetségekről, az organizmusok közötti evolúciós kapcsolatról [39]. Ennek eredményeképp a filogenetikai szerkezetet tanulmányozva elmondható, hogy a Streptococcusok a Firmicutes törzsbe tartozó Gram-pozitív baktériumok, a Bacilli osztályba, azon belül a Lactobacillus rendbe és a Streptococcaceae családba tartozó baktérium nemzetség [93]. A Streptococcus nemzetségbe tartozó fajok sejtjei jellegzetes gömb vagy tojásdad alakúak, de ritkán rövid pálcika alakban is feltűnhetnek bizonyos fajok, ha az ehhez szükséges tenyésztési körülmények adottak számukra [38]. A coccusok átmérője kisebb, mint 2 μm és levestenyészetben párban vagy hosszabb-rövidebb láncokba verődve figyelhetőek meg [93]. A Streptococcusok kataláz-negatívak, nem mozognak, fakultatív anaerob kórokozók, azaz az oxigén jelenlétében és hiányában is képesek növekedni [72]. De akad faj, ami az említett körülmények között a szaporodásához és növekedéséhez további CO_2 kiegészítést igényel [93]. A genusba tartozó organizmusok kemoorganotrófok, azaz képesek a fermentatív anyagcserére, így felhasználják a szerves anyagokat (szénhidrátok, zsírok, fehérjék) a metabolizmusuk során [93]. Néhány, a genusba tartozó faj képes a kapszula termelésére, de ez nem jellemző az egész nemzetségre nézve [38]. A Streptococcusok viszonylag széles hőmérsékleti tartományban képesek növekedni (20-42 °C) [38], azonban a legtöbbjük számára az optimális tenyésztési hőmérséklet 37 °C körül van [83]. Továbbá elmondható az ide tartozó törzsekről, hogy igényes baktériumok, szilárd táptalajon az összetett tenyésztési igényükhöz vérrel, szérummal vagy glükózzal lehet hozzájárulni [38]. Azonban a tápközeg kiválasztásakor fontos tudni, hogy folyékony táptalajon a glükóz vagy más szénhidrát hozzáadásával a kezdeti pozitív hatást a növekedés csökkenése vagy teljes gátlása tudja követni a csökkenő pH miatt, melynek elkerülése erősen puffertelt közeg (pl. Todd-Hewitt leves/THB) alkalmazásával lehetséges [83]. Megfelelő ideig (20-24 óra) és megfelelő hőmérsékleten történő inkubációt követően szilárd tápközegen kisméretű, maximum 1 mm átmérőjű kolóniákat tapasztalhatunk, amik nem pigmentáltak, enyhén áttetszőek [38]. Véres-agaron a Streptococcusok egyik legjellemzőbb tulajdonságát, a hemolízist figyelhetjük meg [12]. Különböző típusú lehet az érintett organizmustól függően, illetve befolyásolja a felhasznált vér típusa (pl. ló, juh, emberi), az alapközeg és a környezeti, légköri viszonyok is: teljes (β -haemolysis), részleges (α -haemolysis) vagy semmilyen (γ) [38]. Bár ez a fajta megkülönböztetés még mindig hasznos fenotípusos mutató, a nemzetség taxonómiai felosztása szempontjából nem megbízható [38]. A Streptococcus genuson belül történő megkülönböztetésére hagyományos, régi múltra visszatekintő technikák mellett a modern molekuláris biológiai módszerek is a rendelkezésünkre állnak. A hagyományos laboratóriumi eljárások közé a már tárgyalt

hemolitikus változások, a Lancefield-féle csoportosítás, továbbá biokémiai vizsgálat tartozik [72]. Az osztályozásban fontos előrelépés volt, amikor a 20. század elején Rebecca Lancefield azonosított egy bizonyos sejtfal-poliszacharid antigént, melynek köszönhetően akkoriban eredetileg 6 db, betűkkel jelölt csoportot tudtak elkülöníteni, ez pedig a tudomány fejlődésével mára már bővült [38, 93]. A Lancefield-féle csoportosítás egy szerológiai tipizálási módszer, amely a fajok közötti különböző csoport-specifikus C-antigénen alapszik, ami gyűrűs kicsapódási teszttel, vagy latex-agglutinációs teszt segítségével kimutatható [72]. Bár ez a típusú csoportosítás a mai napig él, a felismert antigének nem feltétlenül korlátozódnak egyetlen fajra, továbbá nem minden *Streptococcus* fajnál mutatható ki egyedi csoportantigén [38]. Számos biokémiai vizsgálati rendszer is a rendelkezésre áll a kórokozók rapid detektálására, de a pontos és részletes nemzetségen belüli elkülönítés céljából a molekuláris biológiai vizsgálatokat (PCR) kell előnyben részesíteni [72].

2.1.2. A Streptococcus suis

A *Streptococcus suis*-ra a nemzetség kapcsán leírtak igazak: Gram-pozitív, burokkal rendelkező, fakultatív anaerob és fakultatív patogén baktériumfaj, amelynél mikroszkópos vizsgálatnak alávetve a genusra jellemző gömb vagy ovális morfológiájú sejtei láncokat alkotva tűnnek fel [15]. Igényes, tenyésztéséhez véres-agar szükséges, amin α vagy β hemolízist figyelhetünk meg [15, 86, 89], és a legoptimálisabb a 37 °C-on, 24-48 órán át történő aerob körülmények közötti inkubáció [72]. A Lancefield szerinti D-csoportba tartozik és összesen 29 db, burokkal rendelkező szerotípusát különítették el eddig, amelyek közül a leggyakoribb, akár súlyos klinikai tüneteket is okozó szerotípus a 2-es, de gyakori tünetet eredményező szerotípus a SS1-SS9 is világszerte [15].

2.1.3. A Streptococcus suis előfordulása és patogenitása sertésben

A *Streptococcus suis* (SS) egy világszerte előforduló, zoonotikus tulajdonsággal rendelkező fakultatív patogén. A nagyüzemi sertéstartásban minden korosztályt érinthet, emellett a háztáji, kisebb állományokban is előfordulhat és vaddisznó eredetű mintából is kimutatták már [15, 85]. Az SS jelenlétének predilekciós helye a felső légutak nyálkahártyája, a tonsillák, nasopharynx, a gastro-intestinális traktus, illetve a nemi utak [15]. Ezekből adódóan az állat-állat fertőzés és fertőződés könnyen megvalósulhat a bélsáron keresztül, a sertések közötti fizikai kapcsolat eredményeként vagy akár az orrfogó fertőzött állaton történő használata során [15]. Annak érdekében, hogy a *S. suis* súlyos tüneteket tudjon okozni, az epithel barrieren át kell

jutnia [19]. Ha ez megtörtént, a gazdaszervezetet kolonizálja, majd a véráramba betör. Ennek segítségével szóródik a szervezeten belül, és a célszervekben súlyos gyulladást tud generálni [19]. A 2000-es évektől kezdődően, a Kínában emberi járványok kitörését okozó *S. suis* törzsek részletesebb adatgyűjtése megkezdődött [19, 103], melynek köszönhetően nagy mennyiségű információ gyűlt össze a feltételezett virulenciafaktorokról [19]. A kutatások által kiderült, hogy a *S. suis* törzsek között nagymértékű diverzitás észlelhető a virulencia tekintetében [103]. Vannak faktorok, amik nem feltétlenül befolyásolják egy törzs virulenciáját, még más sejthez kötött vagy a sejt által kiválasztott faktor egyértelműen hatással van a patogenezisre [19]. Az egyik bizonyítottan fontos és fő virulenciafaktor a CPS. Elősegíti a baktérium túlélését a vérben, antifagocitikus hatásának köszönhetően pedig megvédi az immunrendszer sejtjeitől így elősegítve a szervezeten belüli szóródását [15, 19]. In vivo és in vitro kísérletek is alátámasztották, hogy a kapszulával nem rendelkező törzsek kevésbé ellenállóak a fagocitákkal szemben, ezáltal hamarabb kiürülnek a vérkeringésből [79]. Ennek köszönhetően a klinikai tünetek manifesztációja enyhébb, vagy el is maradhat [79]. Ám voltak olyan vizsgálatok is, mely során a kapszulával rendelkező avirulens törzs 48 óra elteltével eliminálódott a keringésből, míg a szintén CPS-el rendelkező de virulens törzs magas titerrel több napig kimutatható volt [6, 7]. Lejegyeztek olyan eseteket is, mikor a *S. suis* törzsek két fenotípusa együttesen volt jelen az izolátumban és feltételezhető, hogy a CPS sejtek segítették a kapszulával nem rendelkező populáció fennmaradását és szaporodását a gazdaszervezeten belül [92]. Mindez azt támasztja alá, hogy a *S. suis* törzs ellenállóképessége a fagocitózissal, az immunrendszerrel szemben nem csak a CPS termeléstől függ [19]. Azonban a CPS expresszióját, annak szerkezetét számos tényező befolyásolja, mint például a glükóz, egyéb szénhidrátok, a környezet, azon belül a pH vagy a hőmérséklet [80, 101]. Más *S. suis* virulenciafaktor is ismert. A suilysin (SLY) részletesen vizsgált, a pórusképző koleszterin-függő citolysin toxincsalád része [67, 102]. Részt vesz a gazdasejttel történő kölcsönhatásban, a gyulladáshoz vezető indukciójában [90]. és a trombociták károsodásával járó folyamatokban [105, 106]. Hatására citokin-felszabadulás történik [55]. Számos európai, akár humán patogénként is számon tartott szerotípusból kimutatták [18, 34, 48], azonban több Észak-Amerikában izolált virulens törzs esetén hiányzott a SLY expresszióját szabályozó gén [9, 20]. Európai tanulmányok a virulenciával bizonyítottan összefüggésbe hozták az MRP és az EF fehérjéket, de ezek esetében is vannak olyan virulens törzsek, amik az említett fehérjéktől mentesek [5, 94]. Az MRP elősegíti a mikrovaszkuláris endothel sejtekhez történő kapcsolódást, növelve ezzel a BBB permeabilitását [96]. Továbbá az FHBP szekréciójának képessége [56], az adhesinek [29], vagy az oxidatív stresszel szembeni bakteriális toleráció

kifejlesztése [87], mind a virulenciát segítik elő. A leírtak alapján elmondható, hogy a *S. suis* esetében a "virulencia" fogalma nehezen definiálható [29]. Számos gén és fehérje van, ami összefüggésben áll a törzsek okozta súlyos klinikai tünetekkel, ugyanakkor hiányuk nem feltétlenül vonja maga után a virulencia hiányát is [29]. Ráadásul lehet, hogy egy fehérje önmagában nem is lenne virulenciafaktor, csak véletlenszerűen kapcsolódik a virulenciával [81].

2.1.4. A Strep. suis okozta tünetek sertésben, hajlamosító tényezők

A malacok 12 hetes koruk előtt fertőződnek a kórokozóval, ám leggyakrabban a választás környékén manifesztálódnak a tünetek különböző stresszoroknak köszönhetően [15]. De nem ritka a baktérium szubklinikai hordozása sem a felnőtt állatok esetén [15]. A klinikai tünetek megjelenését számos tényező befolyásolja, ilyenek a környezeti tényezők (rossz szellőztetés, magas páratartalom, magas por-ammónia, stressz), a nem megfelelő menedzsment (túlzsúfoltság, különböző korú sertések keverése, all in-all out hiánya) illetve a vírusos vagy bakteriális társfertőzések jelenléte [31, 63]. Immunológiai hátterét tekintve vizsgálatok során látszódtott, hogy az alacsony maternális immunitás hajlamosította a klinikai tünetek megjelenését [14, 16], és hogy a választást követő időszakban, ahogy az antitest szint fokozatosan emelkedett, a malacok ellenállóbbá váltak [75]. A *S. suis* szinte bármely életkorban kimutatható [59], és gyakori az egynél több szerotípus együttes jelenléte [21]. Vertikális fertőződés az ellés során következhet be a nemi traktust kolonizáló törzsekkel, míg a horizontális fertőzés és fertőződés leggyakoribb módja az úgynevezett „nose to nose” kontaktus [30]. Ha az állatok a perakut formában nem hullanak el, a leggyakoribb klinikai tünetek a láz, remegés, a meningitis következtében koordinációs zavarok, görcsök, a poliarthritis miatti sántaság, míg patológiásan endocarditis és a szepszis okozta szervi tünetek figyelhetőek meg [31, 72].

2.2. A Streptococcus suis törzsek járványtana

2.2.1. Szerotípusok és a szerotípusok szerepe a S. suis járványtanában

A *Streptococcus suis* egy nagyon változatos faj, ám a fertőzések és klinikai tünetek nagy része csak néhány törzsével hozhatóak összefüggésbe [79]. A *Streptococcus* csoportosítása már az 1930-as évektől elkezdődött [53], majd évtizedekkel később sikeresen bebizonyították, hogy a diagnosztika szempontjából fontos fő antigének a CPS-ből származnak, nem a baktérium sejtfalából [17, 99]. A kapszula poliszacharidok antigenitása alapján először kilenc szerotípust

(1-8 és ½ szerotípus) jegyezték le [69], majd 1995-ig további 26 szerotípust (9-34 szerotípus) írtak le a fajhoz kapcsolódóan [24, 26, 41]. A *Streptococcus suis*-nak összesen 35 szerotípusát ismerték fel (1-34 és ½) [79], ám a DNS-alapú eszközök fejlődésével a tudomány részletesebb képet tudott kapni a *S. suis* törzsek diverzitásáról, azok filogenetikai viszonyairól [40]. Az évek során felhalmozódott adatok, a 16S rRNS és a *cpn60* gének szekvenciaanalízise megmutatták, hogy a 32-es és 34-es szerotípusok a genuson belül más fajhoz sorolhatóak be [42], továbbá újabb fajspecifikus gének (*sodA*, *recN*) elemzése alapján a 20-as, 22-es, 26-os és 33-as szerotípusok másik fajba való csoportosítását, és a *S. suis* taxonból való eltávolítását javasolták [65]. Ezeknek köszönhetően jelenleg 29 valódi *S. suis* szerotípus van [40], de klinikai szempontból a laboratóriumok legtöbbször még továbbra is a 35 szerotípust azonosítja [86]. A klinikai tüneteket mutató sertésekből izolált törzsek nagy része 1-9 szerotípusba tartozik [35], gyakoriságukat tekintve csökkenő sorrendben 2-es, 9-es, 3-as, ½-es és 7-es szerotípusok [79]. A 2-es szerotípus, földrajzilag eltérő ST törzseit mutatják ki legtöbbször mind sertésből mind pedig emberből, messze ez a leggyakoribb és legvirulensebb szerotípus Európában, Ázsiában, Afrikában és Dél-Amerikában is [33, 79]. Továbbá egészséges sertésekből és más állatokból származó izolátumok esetében gyakran találni szerológiai nem tipizálható törzseket, ami arra enged következtetni, hogy több szerotípus lehet jelen, mint amit eddig a szakirodalomban lejegyeztek [35, 57, 107].

2.2.2. Diagnosztikai lehetőségek, a szerotipizálás jelentősége

A szerotipizálás kiemelkedően fontos rutindiagnosztikai eljárás [86], segít a populáció szerkezetének vizsgálásában, a járványtani diverzitás tanulmányozásában [40]. Mindez hozzájárul a kórokozó epidemiológiájának megértéséhez, egy esetleges járványkitörés eredetének és kinetikájának a meghatározásához és elősegíti a kezelési, védekezési és ellenőrzési terv kidolgozását [40]. Továbbá segít az olyan törzsek vagy mutánsok kimutatásában, amelyek potenciálisan képesek betegséget okozni akár egészséges állatokban is, ezek az információk pedig elősegítik a vakcinagyártást, a vakcina megfelelő törzseinek a kiválasztását [40]. Számos diagnosztikai módszerről lehet olvasni a szakirodalomban, a laboratóriumi gyakorlatban is többféle technikát alkalmazhatunk. A *S. suis* egyik legfontosabb jellemzőjén alapuló és régóta ismert kimutatási mód az agglutinációs teszt [23]. A laboratóriumok körében preferált módszer, de előfordul, hogy az izolátumok keresztreakcióba lépnek más antiszérummal is, és autoagglutináció is történhet, mindez pedig megnehezíti a diagnosztikát [27]. A keresztreakció feltételezhetően a CPS hasonló szerkezeti jellemzőinek

oka, rendszeres az ½ szerotípus 1-es és 2-es szerotípussal, az 1-es szerotípus a 14-es szerotípussal, de megfigyelték már a 6-os és 16-os szerotípus között és a 2-es és 22-es szerotípus között is [25, 26]. Olyan is előfordulhat, hogy egy izolátum nem agglutinálódik egyik tipizáló antiszérummal sem, ennek következtében nem tipizálhatóként sorolják be [61]. Ahogy már korábban említettem, ennek lehet oka, hogy több *S. suis* törzs létezik, mint ami a szakirodalomban le van írva [35, 57, 107], de valószínűbb ok, hogy burokkal nem rendelkező törzsekről van ilyenkor szó, amik ráadásul ennek eredményeként hidrofóbbá is válnak [28]. Ezeknek következtében pedig a CPS antigéneken alapuló szerológiai módszerrel nem lehet detektálni őket [35]. Nehéz visszakövetni, hogy a nem agglutináló törzsek a fertőzés idején se rendelkeztek kapszulával, vagy pedig az izolálási folyamatok során vesztették el CPS-üket [35]. A *S. suis* törzsek tipizálása kapcsán a rutindiagnosztikában egyre népszerűbbé vált a multiplex PCR tesztek alkalmazása [64]. Segítségével a szerológiai vizsgálatok során kapott eredményeket és a törzsek azonosságát meg tudjuk erősíteni [35]. Ráadásul bizonyos esetekben a nem tipizálható kategóriába sorolt törzsek szerotípusait is képes beazonosítani [64]. Sajnos a PCR tesztek elterjedése ellenére is maradnak tipizálhatatlan törzsek, aminek lehet oka a mutáció vagy a CPS lókuszt elvesztése [108], emellett a szakirodalomban és a mindennapi diagnosztikában is találkozhatunk téves *S. suis* azonosítással [28]. Ez utóbbinak az oka a már korábban tárgyalt taxonómiai változások miatt lehetséges, aminek következményeképp a PCR primerek tervezési koncepciója téves eredményt tud adni [65, 66]. A molekuláris módszerek fejlődésének köszönhetően új protokollok is születtek, ami lehetővé teszi az 1-31, 33 és ½ szerotípusok azonosítását [57], ezenfelül a szerológiai vizsgálatok során egynél több antiszérummal reagáló törzsek esetén is segíthet a molekuláris módszerek alkalmazása [52].

2.2.3. Földrajzi megoszlás, ennek járványtani jelentősége

A *S. suis* szerotípusainak vizsgálatának segítségével megállapított szekvenciák kiértékelésekor egyértelmű földrajzi megoszlást lehet észrevenni. Világviszonylatban nézve a *Streptococcus suis*hoz kapcsolódó sertésbetegségek jelentése, az ehhez kapcsolódó publikációk és vizsgálatok eltérő mértéket mutatnak az országok vagy akár a kontinensek között. Globálisan a klinikailag beteg sertések izolátumaival összefüggő vizsgálatok majdnem 70%-a Észak-Amerikából, azon belül is főleg Kanadából származik [35]. Kanadában a 2-es szerotípus a legelterjedtebb, ezt követi az 3-as szerotípus, míg az Egyesült Államokban a 3-as szerotípus dominál és második a 2-es szerotípus [35]. Ezek által pedig elmondható, hogy a két ország közötti állatszállítás befolyásolja a hasonló szerotípus eloszlást [35]. Délkelet-és Kelet Ázsia, ahol 1998-ban és

2005-ben sertés eredetű humán járványkitörések és halálesetek voltak [11, 104], a *S. suis* fertőzésekhez kapcsolódó legkevesebb információt szolgáltatják, bár a mikrobiológusok a sertésesetekkel és a már endémiásnak tekintett zoonotikus fertőzésekkel tisztában vannak [35, 44]. A kontinensről származó szakirodalmi cikkek alapján elmondható, hogy Kelet-Ázsiában a fertőzött sertések esetén a 2-es szerotípus domináns, ezt követi a 3-as, 4-es és 8-as szerotípus, de itt is az országok között szerotípus-dominanciabeli különbség előfordulhat [35]. Az európai kontinensen számos fontos sertéstermelő ország található, azonban nagy különbségek figyelhetők meg a *S. suis* okozta sertésbetegségek jelentése kapcsán. Spanyolország és Hollandia rendelkezik a legfrissebb adatokkal, aminek alapján elmondható, hogy a két ország hasonló szerotípus-eloszlással bír, előfordulási sorrendben a 9-es, 2-es, 7-es, 8-as és 3-as szerotípusokkal [35, 76]. Más kiemelkedően fontos sertésstartó és sertéshús előállító ország (például Dánia, Franciaország, Németország, Olaszország, az Egyesült Királyság) a 2000-es évek eleje óta nem számolt be friss adatokkal és publikációkkal a sertések *S. suis* okozta fertőzések epidemiológiájáról [60, 100]. A 2000-es évek előtt izolált törzsek és vizsgálatok alapján az említett országokban a 2-es szerotípus volt a domináns, majd ezt követte a 9-es szerotípus epidemiológiájáról [60, 100]. A fent leírtak alapján kijelenthető, hogy sürgősen szükség van az európai, de világviszonylatban is a szerotípusok globális eloszlásának elemzésére, ehhez pedig új adatokra és publikációkra van szükség az érintett országokból [35]. A beteg sertésekből származó izolátumok prevalenciájára vonatkozó friss adatok fontosak a szerotípus-specifikus vakcinák szempontjából, továbbá állat-és humánegészségügyi szempontból is [35].

2.3. A *Streptococcus suis* elleni védekezés lehetőségei

2.3.1. A vakcinás védekezés lehetőségei, előnyök és nehézségek

A *Streptococcus suis* elleni védekezés és megelőzés egyik módja a vakcinázás. Mind a sertés-telepek mind pedig közegészségügyi szempontból kiemelkedően fontos kérdés, hogy hogyan lehet sikeresen megelőzni a klinikai tünetekben megnyilvánuló fertőzések számát. Mint ahogyan azt már korábban részleteztem, a *Streptococcus suis*-ra rendkívül nagy szerológiai és genetikai diverzitás jellemző, ez pedig komplexé teszi az ellene történő vakcinák fejlesztését és azok alkalmazását is. Napjainkban a kórokozó ellen autogén vagy bakterin vakcinák érhetőek el a piacon, melyeket néhány országban a problémás telepeken malacok vagy kocák esetében alkalmaznak is [77]. A úgynevezett telep-specifikus vakcinák bakterin típusúak, amit a fertőzéssel küzdő telepen izolált ottani törzsekből készítenek, és ugyan abban a gazdaságban is használják fel [77]. Ezen vakcinatípussal számos laboratóriumi és terepi

vizsgálatot elvégeztek, melyek ellentmondásos eredményeket mutatnak a védelemmel és az immunválasszal kapcsolatban [37, 77]. Kísérleti vizsgálatok során megfigyelték, hogy alkalmazásukkor a szervezet részéről tapasztalt csökkent válaszreakciónak több oka lehet: a bakteriális antigének nem váltanak ki erős immunválaszt, esetleg a nem specifikus válaszantigének hiányoznak, vagy éppen a vakcina előállításakor a fontosabb antigének eltűnnek [4, 10, 13, 43, 54]. Továbbá a nem megfelelő védelem a telepen történő hibás mintavételi eljárás következménye is lehet, aminek eredményeképp egy fals törzs vagy szerotípus kerül megállapításra [73]. Számos kérdés övezi az ellés előtt álló kocák bakterinell történő vakcinázását is, amellyel passzív maternális immunitást lehetne elérni a születendő malacoknál, ezzel átsegítve őket a kritikus időszakban [3, 77]. Azzal azonban több szakirodalom is egyet ért, hogy a malacok maternális immunitásának megszűnését követően a későbbi aktív vakcinázásra szükség lehet a sikeres védekezés elérése céljából, azonban nagyon fontos a megfelelő időpont kiválasztása az anyai antitestek és a vakcina interferenciájának elkerülése végett [4]. Az élő vakcinák alkalmazása kérdéses. Szükséges egy teljesen legyengített törzs alkalmazása, ami biztonságos, de kellő immunválaszt eredményez, azonban még így is kialakulhatnak változatos súlyosságú mellékhatások, mint például hipertermia vagy görcsök, nem beszélve a törzsek zoonotikus potenciáljáról [77]. A *S. suis* elleni védekezésben a baktérium univerzális védőantigénjeinek azonosítása és ezek vakcinába való beültetése előrelépést jelenthet a megelőzésben és a törzsek közötti keresztimmunitás biztosításában [78]. A *S. suis* virulencia faktorait már régóta kutatják, jónéhány fehérjével kapcsolatba hozták a kórokozó fertőzőképességét, ennek köszönhetően pedig az alegységvakcinák fejlesztése is folyamatosan zajlik [77, 78]. A klinikai törzsek kapszulázottságának gyakoriságából adódóan az egyik gyakori vakcinacélpont a CPS, azonban ez is szerotípus-specifitást mutat a CPS lókuszt gyakori rekombinációjából kifolyólag [78]. A vakcinák alkalmazása a *S. suis* esetén szorosan kapcsolódik a "One Health" elvéhez, hiszen a sertésipar nagy mennyiségű antibiotikumot használ fel, ezzel hozzájárulva a rezisztenciák kialakulásához. Ennek vizsgálata már az 1980-90-es években elkezdődött, mely során már akkor számos antibiotikumról derült ki a kórokozóval szembeni rezisztencia, mint például a tetraciklin, klindamicin, szteptomycin vagy a benzilpenicillinek [97]. Azóta több publikáció rámutatott és levezette a *S. suis* rezisztenciájának időbeli alakulását [2, 49], amihez a felelőtlenül alkalmazott antibiotikumok baktériumra gyakorolt szelekciós nyomása, ezzel pedig a rezisztens törzsek túlélése és az ezt elősegítő gének cseréje megtörtént [36]. Multirezisztens törzsekről is tudunk, amelyek főként vágóhídi mintákból mutattak ki és egészséges állatok mandulájában detektálták őket [36, 82].

2.4. A *S. suis* közegészségügyi jelentősége

A *Streptococcus suis* egy zoonotikus kórokozó, amelyet egészen a közelmúltig nem tekintettek potenciális veszélynek. Az első *S. suis* törzshöz kapcsolódó humán esetet 1968-ban jegyezték le Dániában [68], azóta pedig a szakirodalomban olvasható *S. suis* törzsekhez köthető humán fertőzések száma lassú emelkedő tendenciát mutat [51]. A kórokozóhoz köthető eddigi legnagyobb járványtörés Kínában volt 1998-ban és 2005-ben, ami több mint 200 embert érintett és több mint 50 ember halálát okozta [11, 104]. Ezen járványok során az emberről emberre történő közvetlen átvitel nem volt tapasztalható [88]. Kelet és Délkelet-Ázsiában a *S. suis* törzsek okozta zoonotikus fertőzéseket endémiásnak tekintik [44]. Sőt, Hongkongban a szerzett bakteriális agyhártyagyulladás harmadik leggyakoribb kórokozója [45], míg Vietnámban vezető oka a felnőttkorban kialakult agyhártyagyulladásoknak [91]. A második kontinens Európa ahonnan a legtöbb emberi fertőzést jelentették az évek során, ezen belül is megfigyelhető, hogy a fejlett sertéságazattal rendelkező országokban fordulnak elő inkább humán esetek, mint például Hollandia, az Egyesült Királyság, Olaszország vagy Németország [35]. Kanadából és az Amerikai Egyesült Államokból számos sertésből kimutatott *S. suis* fertőzést jelentenek, azonban humán esetek csak szórványosan fordulnak elő, aminek valószínűsíthető oka a már korábban tárgyalt virulenciabeli különbségnek tudható be [35]. A tárgyalt országokban és kontinenseken a humán megbetegedések legnagyobb számát a SS2 szerotípusa okozza, amely nem melleleg a sertésekből legnagyobb számban izolált szerotípus és komoly klinikai tüneteket tud okozni [32]. De kimutatták már a 4-es, 14-es és 16 szerotípusokat is humán izolátumokból [32]. Összességében elmondható, hogy a mikrobiológiai vizsgálatoknak és az állat-és humánegészségügyi adatoknak köszönhetően az emberekből izolált törzsek hasonlóak az ugyanazon földrajzi területen sertésekből izolált törzsekkel [8]. A humán esetek kapcsán a *S. suis* fertőzések sok esetben foglalkozási betegségnek tekinthetőek, a fertőzött minták gyakran köthetőek a sertéságazatban dolgozók, vágóhídi munkások, hentesek, húsvizsgálók és gyakorló állatorvosokhoz [32]. A tünetek a sertések klinikai tüneteivel hasonlóak, a lappangási idő néhány naptól akár 2 hétig is terjedhet [44]: szepszis, endocarditis, arthritis, a már említett gennyes meningitis, pneumonia vagy peritonitis, uveitis vagy a kifejezetten embereknél megfigyelhető vesztibuláris diszfunkció okozta halláskárosodás [32, 95]. Súlyos esetben sokk, úgynevezett MODS alakulhat ki, aminek eredménye akár halál is lehet [58, 84]. A fertőződés lehetséges fertőzött sertéssel vagy sertéshússal történő kitettség és érintkezés során, továbbá a kulturális és étkezési szokások is nagyban hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához, hiszen Ázsiában előszeretettel

fogyasztanak nyers vagy nem kellően hőkezelt húst és belsőségeket [46]. Magyarországon szórványosan, de előfordulnak humán esetek. Egy 2020-ban publikált közlemény a 2002-2019 közötti időszakot összefoglalta az NBS jelentései és adatbázisa alapján [22]. A vizsgált 18 éves periódus során összesen 74 db *S. suis* törzset izoláltak invazív (liquor, hemokultúra) fertőzésekből magyar kórházakban, ami 34 beteget jelent, ám szerotipizálás csak az utolsó 11 esetben történt, aminek eredménye 10 esetben SS2 és 1 esetben SS14 szerotípus lett [22].

3. CÉLKITŰZÉS

A nemzetközi adatok bővülésével, a *S. suis* törzsek izolálásával, tipizálásával egyre részletesebb képet kapunk a kórokozó járványtanáról és evolúciójáról. Mivel az ország sertésállományában is jelen van a kórokozó, így indokoltta vált a Magyarországon megtalálható törzsek részletesebb vizsgálata és átfogóbb jellemzése.

Célunk volt, hogy a 2020-2022 közötti időszakban a Haszonállat Diagnosztikai Központban izolált streptococcus törzsek retrospektív vizsgálatával átfogó képet kapjunk a *Streptococcus suis*, valamint az egyes szerotípusainak hazai előfordulásáról és a magyarországi sertésállomány kórokozó terheltségéről. A dolgozatban szereplő adatok támpontot tudnak nyújtani a későbbiekben lefolytatandó virulencia faktorok vizsgálatához, antibiotikum-rezisztencia értékeléséhez, illetve zoonotikus potenciállal rendelkező *S. suis* törzsek humánegészségügyi kockázatbecsléséhez.

4. ANYAG-ÉS MÓDSZER

4.1. A streptococcus izolátumok eredete

4.1.1. mintagyűjtés- és tárolás

Vizsgálataink során szerettünk volna átfogó képet kapni a streptococcus törzsekről, amelyeket a 2020, 2021 és 2022-es naptári év során a Haszonállat Diagnosztikai Központban izoláltak és konzerváltak. A sertés eredetű mintákat az ország egész területéről, rutin diagnosztikai célból küldték be. A célzott diagnosztikai mintaküldést a legtöbb esetben az Irodalmi áttekintés c. fejezetben már részletesen tárgyalt klinikai tünetek és/vagy kórbonctani elváltozások megfigyelése indokolta, azonban némely esetben a mintaküldés pontos oka nem volt kikövetkeztethető. A tamponminták, szerv és egyéb biológiai minták a laboratórium

munkatársaihoz hűtött formában érkeztek, melyeket ezt követően is hűtve (4-8 °C-on) tároltak a feldolgozás megkezdéséig, de legfeljebb két napig.

4.1.2. A streptococcusok primer tenyésztése és fajszintű azonosítása

A mintákból a streptococcus izolátumokat rutin mikrobiológiai eljárással tenyésztették, ld. az Irodalmi összefoglaló vonatkozó részét. Röviden összefoglalva, a biológiai mintákból véres juhvért tartalmazó Columbia agarra szélesztettek (primer leoltás), majd a 37 °C-on inkubálták és 24 óra múlva elbíralták a tenyészetet. Gyenge növekedés vagy negatív tenyésztés esetében további 24 órán keresztül inkubálták a táptalajt. A streptococcusok további vizsgálatához szintenyészetet készítettek. A faji meghatározást egy biokémiai tesztsíkot, az API® Strep tesztsíkot használták. Ennek lényege, hogy a tesztsíkon található, különböző szubsztrátokat és indikátorokat tartalmazó mintacellákat a baktérium táplevessel készített szuszpenziójával töltik fel. A tesztsíkot 37±1 °C-on inkubálják, mialatt a cellákban a lezajló biokémiai reakciók színváltozást okoznak az egyes mintacellákban. A színváltozásokat leolvasva, és egy webes felületen keresztül kiértékelve eredményként megkapják a baktérium fajtát, esetleg alfaját.

4.1.3. A szerotípus meghatározása

A szerotípus meghatározását a baktérium szintenyészetéből, tárgylemezagglutinációs próbával végezték el. Ehhez a S. suis 1-12., valamint 14. és 21. szerotípusára specifikus monoklonális savókat használtak (Ceva Biovac Ltd, Franciaország).

4.1.4. Az izolátumok konzerválása, a konzerválási naplók elemzése és az izolátumok kiválogatása további vizsgálatokra

Az izolátumok szintenyészetének konzerválását -80 °C-on az adott esetet kezelő laboratóriumi állatorvos rendelte el. A konzerválás tényét, valamint az izolátum legfontosabb adatait a fagyasztási naplóban rögzítették a laboratórium munkatársai.

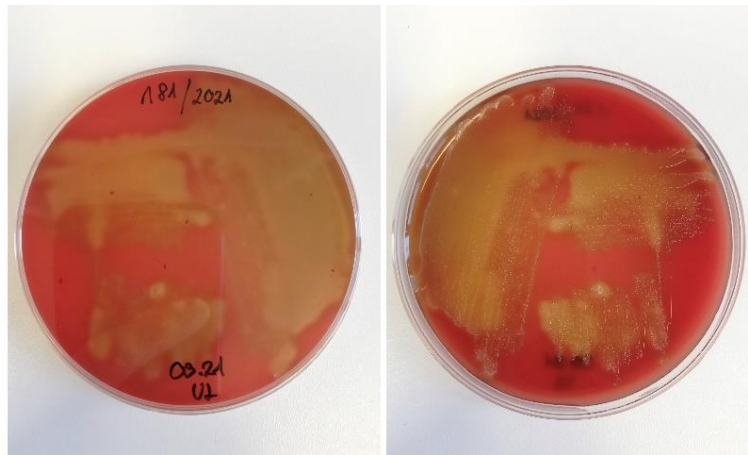
A munkám során, a labor munkafolyamataiba történő bekapcsolódásomat követően első lépésként a 2020. január 1. és 2022. december 31. közötti időszak konzerválási naplóinak adatait összegeztem az MS Excel program segítségével. Leválogattam minden sertésből származó streptococcus izolátumot és a kapott adatsorokhoz társítottam a korábbi vizsgálatok eredményeit: az API Strep tesztsíkkal elvégzett fajszintű meghatározás, illetve a szerotipizálás eredményét. Azon törzseket jelöltem ki további vizsgálatra, amelyekből (a) a szerotipizálás nem vezetett eredményre vagy (b) amelyeknél egyáltalán nem végeztek korábban szerotípus

meghatározást és esetleg a baktérium faja sem került meghatározásra. Összesen 253 streptococcus izolátumból mintegy 90 izolátum esetében volt szükséges a fagyasztásból történő kioltásra.

4.2. A konzervált izolátumok mikrobiológiai vizsgálata

4.2.1. Tenyésztés

A véres agaron történő tenyésztés a *Streptococcus* sp. törzsek fenotípusos azonosítására alkalmazható bakteriológiai vizsgálat. Az általános célra készült, dúsított táptalajon a kórokozó hemolitikus sajátosságai alapján nagy biztonsággal beazonosítható [74]. A fagyasztásból felvett törzseket közvetlenül 5% juhvért tartalmazó Columbia véres agarra szélesztettük. A tenyészeteket 37 ± 1 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk, majd 24 óra elteltével, az irodalmi áttekintésben leírtak szerint a tenyészeteket telepmorfológiájuk, a színük és a haemolízis alapján értékeltük. A streptococcus-nak tűnő tenyészetekkel dolgoztunk tovább a genotipizáló vizsgálatok során.



1. ábra β -haemolizáló *Streptococcus* sp. véres agaron [saját]

4.2.2. Szelektív elődúsítás

A fagyasztásból felvett minták között a kioltást és inkubációs időt követően voltak, amik egyáltalán nem, vagy kétes haemolízist mutattak az agaron. Az ilyen eredmények esetében a fagyasztási szám alapján a problémás mintákat újból felvettük, azonban az újabb bizonytalan eredmény elkerülésének érdekében, és hogy megfelelő mennyiségű baktériumot tudjunk a táptalajra ismételtelen leoltani, szelektív elődúsító táplevest (Todd-Hewitt leves, Biolab Zrt., Budapest) alkalmaztunk. A beoltott táplevest 37 ± 1 °C-on inkubáltuk 24 órán keresztül, majd ebből Columbia véres agarra szélesztettünk. Ismét 24 órán keresztül inkubáltuk a táptalajokat,

értékeljük az tenyészeteket és az alkalmasnak bizonyult tenyészetekkel folytattuk a molekuláris biológiai vizsgálatokat.

4.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok

4.3.1. A bakteriális DNS izolálása

A baktériumtörzseink további genetikai vizsgálatához a bakteriális DNS izolálására volt szükségünk. A Molekuláris Diagnosztikai Laboratórium protokollját követve a nukleinsavat a baktériumsejtek direkt lízisével nyertük ki. Ehhez a friss színtenyészetből 3-5 telepet steril pipettaheggyel felvettünk. Az előre mikrocsővekbe előkészített 75 µl lízispufferben (PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent, ThermoFisher, Biocenter Kft., Szeged) a felvett mintát szuszpendáltuk, és a keletkezett szuszpenziót 10 percig 100 °C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után centrifugálással (10.000 rpm, 1 perc) a szilárd sejtörmelékeket leülepítettük, majd a felülúszóból óvatosan 50 µl-t átmértünk 200 µl elúciós puffert (tris-EDTA puffer) tartalmazó mikrocsővekbe. A további felhasználásig rövid ideig hűtőben (4-8 °C), egy hét elteltét követően fagyasztóban (-20 °C) tároltuk. A sikeres izolálást a folyamat eredményeképpen kinyert nukleinsav első PCR vizsgálata alapján ítéltük meg.

4.3.2. PCR tesztek, döntésfa

A PCR-alapú genoszerotipizálásra tovább vitt streptococcus tenyészetek kezelésére a Molekuláris Diagnosztika Laboratóriuma által létrehozott döntésfát vettük alapul a szerintünk szükséges apróbb módosításokkal. Ennek értelmében a vizsgálatokat közvetlenül a *Strep. suis* genoszerotipizáló mPCR futtatásával kezdtünk. A mPCR a szerotípusok meghatározásán túl alkalmas a *Strep. suis* törzsek faji szintű azonosítására is a faj glutamát dehidrogenáz (*gdh*) enzim génjére specifikus primerekkel. A teszt módszer részleteit ld. lejjebb. A kiértékelés során az alábbi eredményeket kaphattuk és ha szükségesnek láttuk, ezeknek megfelelő vizsgálati irányba haladhattunk tovább.

1. táblázat Molekuláris biológiai módszer döntéshozatala a kapott eredmények és az abból való következtetések alapján

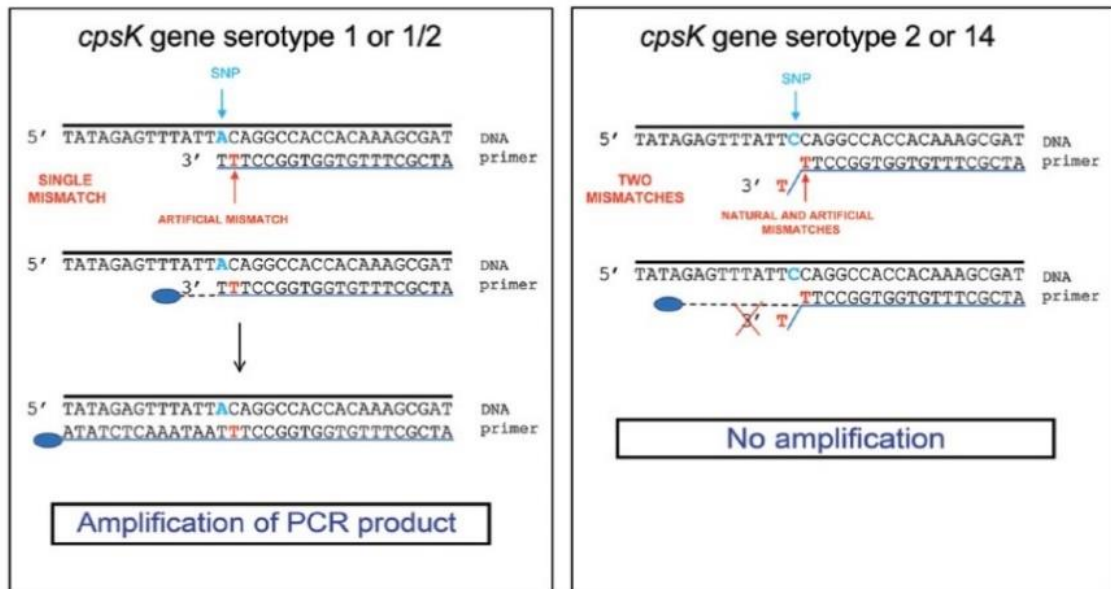
Eredmény	Következtetés	További vizsgálatok
A minta <i>gdh</i> -pozitív, és van szerotípus-specifikus termék	A minta adott szerotípusú <i>Strep. suis</i> törzs	Nincs, az eredményt rögzíteni kell
A minta <i>gdh</i> -pozitív, és a genoszerotípus 1/2, vagy 2., illetve 1. vagy 14.	A minta genoszerotípusa a PCR-rel nem elkülöníthető típusok egyikébe tartozik	MAMA PCR vizsgálat a genoszerotípusok elkülönítésére
A minta <i>gdh</i> -pozitív, de nincs szerotípus-specifikus termék	A minta valószínűleg <i>Strep. suis</i> törzs, de nincs azonosítható genoszerotípus	Faj- és genus-specifikus mPCR vizsgálat, és a 13. és 24. szerotípus tesztelése egy másik mPCR rendszerrel
A minta <i>gdh</i> -negatív, és nincs szerotípus-specifikus termék	A minta valószínűleg nem <i>Strep. suis</i> törzs, vagy sikertelen nukleinsav izolálás	Faj- és genus-specifikus mPCR vizsgálat

4.3.2.1. A szerotípus genetikai hátterének azonosítása PCR segítségével (Genoszerotipizáló mPCR és a MAMA PCR)

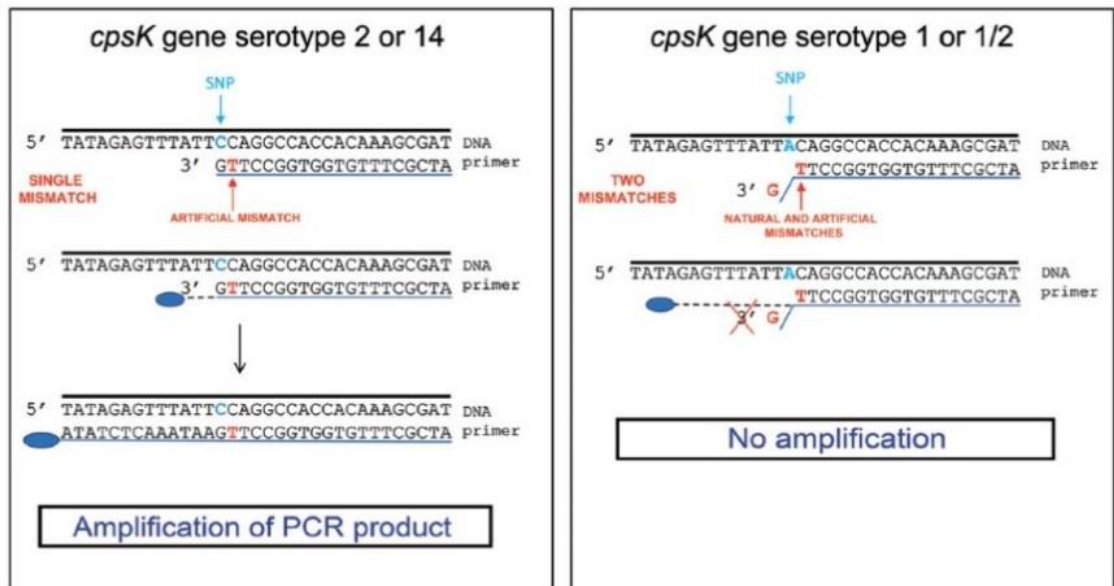
A genoszerotipizáló mPCR képes olyan izolátumok szerotípusának megállapítására is, amelyeket a szerológiai vizsgálatok során nem tudtak tipizálni [50]. A szerotípusok meghatározásához négy különálló mPCR-t futtattunk le. Az első PCR reakciómix az 1+14., 2+1/2., 3., 7., 9., 11., 14. és 16. szerotípusok primereit, a második reakciómix a 4., 5., 8., 12., 18., 19., 24. és 25. szerotípusok primereit, a harmadik a 6., 10., 13., 15., 17., 23. és 31. szerotípusok primereit és a negyedik reakció a 21., 27., 28., 29. és 30. szerotípusok primereit tartalmazta. A primerek a következő géneket célozták meg: *cps1J*, *cps14J*, *cps1/2J*, *cps2J*, *cps3J*, *cps7H*, *cps9H*, *cps16K*, *cps21N*, *cps23I* és *cps24L*, *cps3K*, *cps4M* és *cps5N* *cps4N*, *cps6I*, *cps10M*, *cps11N*, *cps12J*, *cps13L*, *cps15K*, *cps17O*, *cps18N*, *cps19L*, *cps25M*, *cps27K*, *cps28L*, *cps29L*, *cps31L* és *cps31L*, *cps8H*, és *cps25N* glicerofoszfotranszferáz gén [62]. Ezen felül mind a négy reakciómixben megtalálható volt a fajspecifikus *gdh* génre tervezett primerpár, ami egyben belső kontrollként is szolgált.

Ha az mPCR futtatását követően, a kapott eredmények értékelésekor 1. vagy 14., illetve 1/2. vagy 2. szerotípust kaptunk, ezeken elkülönítő MAMA PCR-t alkalmaztunk. Ezen szerotípusok CPS génje nagymértékben hasonló, amely megnehezíti az elkülönítésüket a klasszikus PCR teszttel. Ismert, hogy az említett szerotípus-párok törzseinek *cpsK* génjében, a 161-es kodonban

egy egyponos nukleotid polimorfizmus (SNP) fedezhető fel [52]. A MAMA-PCR az SNP megkülönböztetésén alapszik az adott pontmutációra specifikus primereket alkalmazva [52]. Az egyik forward primer az 1. és 1/2. szerotípusú *cpsK* gén megfelelő SNP alléljával komplementer, míg a másik forward primer a 2. és 14. szerotípusok *cpsK* gén alléljával (ld. 2. ábra). A reverz primer mindkét teszt esetében ugyanaz [52].



A



B

2. ábra A MAMA-PCR működési elvének sematikus ábrázolása. A: PCR1 B: PCR2 [51]

A reakciókhoz PCRBIO HS Red Taq PCR kitet használtunk, a gyártó által ajánlott végtérfogaton, illetve a MAMA-1 vagy MAMA-2 assay mixet, amely a megfelelő primerek 1:1 arányú keveréke. A kapott eredmények a következőképpen voltak értelmezhetőek a gélelektroforézist követően:

2. táblázat MAMA-PCR eredményeinek értelmezése [52]

Geno-szerotipizáló mPCR eredménye	MAMA-PCR1	MAMA-PCR2	Szerotípus
1, 14	Pozitív (367 bp)	Negatív	1
	Negatív	Pozitív (367 bp)	14
½, 2	Pozitív (367 bp)	Negatív	½
	Negatív	Pozitív (367 bp)	2

Egy harmadik genoszerotipizáló tesztre akkor volt szükségünk, ha az mPCR során Strep. suis törzset kaptunk, de nem volt azonosítható genoszerotípusunk. Ebben az esetben feltételezhettük, hogy a tesztfutások során bizonytalanul működő 13. és 24. szerotípusokat azonosító primerpárok miatt nem kaptunk genoszerotípus eredményt. Megoldásként egy alternatív genoszerotipizáló rendszer vonatkozó primereivel is teszteltük a mintákat [57]. Ha ekkor sem kaptunk genoszerotípus eredményt, akkor a törzset nem tipizálhatóként könyveltük el. Hogy ellenőrizzük, hogy a törzs valóban a *S. suis* fajhoz tartozik, ezen minták esetében is lefuttatuk a fajazonosító mPCR-t.

4.3.2.2. *A S. suis és a Streptococcus* genus azonosítására használt multiplex PCR teszt

A *S. suis* valamint a *Streptococcus* genus kimutatására multiplex (m)PCR vizsgálatot végeztünk a rekombinááz és javító fehérje génjére *recN*, illetve az Tu elongációs faktor génjére (*tuf*) tervezett primerekkel [47, 70]. A reakciókhoz PCRBIO HS Red Taq PCR kitet használtunk, a gyártó által ajánlott végtérfogaton a mintaszámhoz igazítva, továbbá a szükséges primereket tartalmazó assay mixeket (AM).

3. táblázat A fajazonosító mPCR működési profilja

Ciklus neve	Ciklusszám	Hőmérséklet	Időtartam
Primer denaturáció	1	95 °C	5 perc
Amplifikáció	35	95 °C	30 másodperc
		55-64 °C	30 másodperc-1 perc
		72 °C	1 perc
Végső lánchosszabbítás	1	72 °C	10 perc
Hűtés	1	10 °C	gélelektroforézisig

A keletkezett mPCR termékek elkülönítésére agaróz-gélelektroforézist használtunk, amely folyamat végén a DNS fragmentekhez kötött fluoreszcens festéknek köszönhetően azok, megfelelően alkalmazott UV fény mellett, detektálhatóvá váltak.

4.4. Adatrögzítés és elemzés

Eredményeimet az MS Excel programban rögzítettem és értékeltem.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A Magyarországon előforduló *S. suis* szerotípusok és azok aránya az egyes telepeken

Retrospektív kutatásunk során a 2020, 2021 és 2022-es évben a Haszonállat Diagnosztikai Központban izolált streptococcus-ként azonosított és konzervált törzseket használtuk. A 3 év alatt 253 *Streptococcus* sp. izolátum került rögzítésre. Ebből n=96 izolátum volt fagyasztásban, melyből 66 esetében előzetesen nem történt szerológiai és vagy fajazonosító vizsgálat, 30 izolátumnál pedig a fenotípusos azonosítás nem járt sikerrel, ezért "be nem sorolt"-ként (BNS) kerültek rögzítésre. A gyakorlatban 90 izolátumot sikerült molekuláris biológiai módszerekkel megvizsgálni, 3 izolátumot nem tudtunk felvenni a fagyasztásból, mert elvesztek, másik 3 esetén pedig nem jártunk sikerrel a véres-agaron történő tenyésztés során. A vizsgálataink során alkalmazott fenotípusos és molekuláris módszerek segítségével (ld. Anyag és módszer fejezet) a 253 *Streptococcus* sp. izolátumból 210 *Streptococcus suis* izolátumot azonosítottunk.

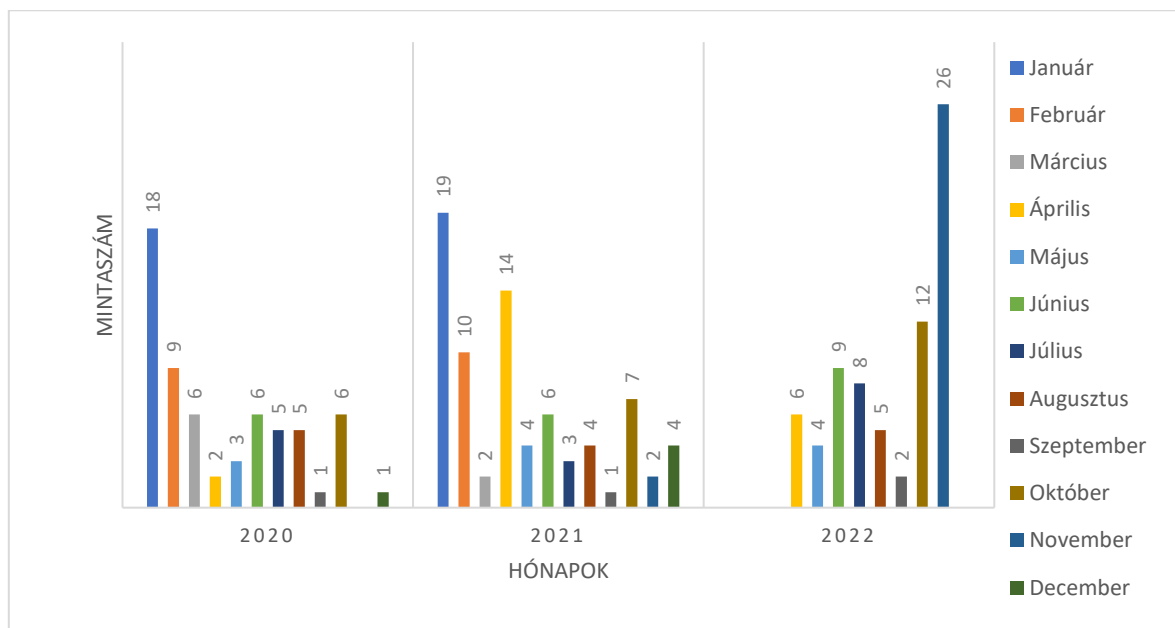
5.1.1. Térkép + idő oszlopdiagramja; mátrixok; szerotípusok általában

A minták az egész ország területéről érkeztek, összesen 42 gazdaság 45 telepén mutattunk ki *Streptococcus suis*-t a beküldött mátrixokból.



3. ábra Az izolátumokat szolgáltató 45 telep térképen [saját]

A 3 év alatt a *S. suis* izolátumok száma hasonló éves, illetve havi megoszlást mutatott. 2020-ban 62, 2021-ben 76, és 2022-ben 72 *S. suis* izolátumot azonosítottunk.



4. ábra *Streptococcus suis* izolátumok éves és havi bontása [saját]

A 210 *Streptococcus suis* izolátum esetében 19 féle szerotípust sikerült kimutatnunk. Ezek az 1., 2., ½., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11., 14., 16., 21. és 24. szerotípusok voltak. A leggyakoribb szerotípus a 2. volt, ezt 68 esetben mutattuk ki. Ezt követi a 9. szerotípus (n = 32), a 7. szerotípus (n = 30), és végül az 1/2. szerotípus (n = 24). A többi szerotípus esetében 1-10 izolátumot azonosítottunk.

Összesen 9 féle mátrixok különítettünk el amelyekből a *Streptococcus suis* izolátumok származtak: agy, lép, szívbillentyű thrombus, szívburok, ízület, tüdő, hüvelyváladék, tonsilla, hulla.

5.1.2. A szerotípusok és a gyakoribb szerotípusok szöveti tropizmusa

A négy gyakoribb szerotípus esetén predilekciós szöveti megoszlást lehetett tapasztalni. A 2. szerotípus esetében az izolátumok leginkább az agyból és agyburkokról kerültek elő (21/68; 30,9%). A 9. szerotípus esetében szintén az agy volt a leginkább érintett szövet (12/32; 37,5%). A 7. szerotípus n=10 esetben lép eredetű volt, és az ½ szerotípus esetén is a lép n=9 dominált.

4. táblázat Strep. suis izolátumok szerotípusai, kimutatásukhoz használt módszer és a mátrixok

Szerotípusok	Összesen	Szerológia	Molekuláris		Mátrix
			a) Sikertelen szerológia (bns)	b) Nem volt szerológia	
1 szerotípus	10	10	0	0	szisztémás fertőzés 8/10 (80%) bronchopneumonia 2/10 (20%)
½ szerotípus	24	12	4	8	szisztémás fertőzés 22/24 (91,6%) bronchopneumonia 1/24 (4,1%) egyéb 1/24 (4,1%)
2 szerotípus	68	60	4	4	szisztémás fertőzés 62/68 (91,1%) bronchopneumonia 5/68 (7,3%) egyéb 1/68 (1,4%)
3 szerotípus	7	5	1	1	szisztémás fertőzés 6/7 (85,7%) bronchopneumonia 1/7 (14,3%)
4 szerotípus	9	7	2	0	szisztémás fertőzés 6/9 (66,6%) bronchopneumonia 1/9 (11,1%) egyéb 2/9 (22,2%)
5 szerotípus	4	4	0	0	szisztémás fertőzés 1/4 (25%) bronchopneumonia 3/4 (75%)
6 szerotípus	2	2	0	0	szisztémás fertőzés 2/2 (100%)
7 szerotípus	30	22	4	4	szisztémás fertőzés 27/30 (90%) bronchopneumonia 3/30 (10%)
8 szerotípus	4	3	0	1	szisztémás fertőzés 4/4 (100%)
9 szerotípus	32	23	6	3	szisztémás fertőzés 27/32 (84,3%) bronchopneumonia 4/32 (12,5%) egyéb 1/32 (3,1%)
10 szerotípus	5	3	1	1	szisztémás fertőzés 3/5 (60%) bronchopneumonia 1/5 (20%) egyéb 1/5 (20%)
11 szerotípus	1	1	0	0	szisztémás fertőzés 1/1 (100%)
14 szerotípus	5	2	3	0	szisztémás fertőzés 5/5 (100%)
16 szerotípus	3 db	0	2	1	szisztémás fertőzés 3/3 (100%)
21 szerotípus	3 db	3	0	0	szisztémás fertőzés 2/3 (66,6%) bronchopneumonia 1/3 (33,3%)
24 szerotípus	2 db	0	2	0	szisztémás fertőzés 2/2 (100%)
ismeretlen szerotípus	1 db	0	0	1	szisztémás fertőzés 1/1 (100%)

5.1.3. Szerotípusok megoszlása az egyes nagy mintaszámot szolgáltató telepeken

A 45 telep közül 3 telep (A, B, C) szolgáltatta a 210 Streptococcus suis izolátum 41,4 %-át, ami 87 izolátumnak felel meg. Az A telepről 45, a B telepről 24, míg a C telepről 18 Streptococcus suis izolátum származott. Az A telep esetében a szerotípusok előfordulásában időbeli tendencia is megfigyelhető volt: míg 2020 és 2021-ben az ½. és 2. szerotípusok domináltak az izolálás tekintetében, addig ezek a szerotípusok a 2022-es évben kiszorultak a telepről, más szerotípusok kerültek előtérbe (ld. 5. táblázat). A telepeken előforduló szerotípusokat, azok mennyiségi és százalékos megoszlását a lentebb található táblázatokban részleteztem.

5. táblázat A három telep izolátumainak és szerotípusainak aránya, megoszlása

A telep				
Szerotípusok	Izolátumok száma (n)	(%)	2021. májusa előtt (n)	2021. májusa után (n)
2	14	31,1%	11	3
7	8	17,8%	1	7
½	7	15,6%	6	1
9	4	8,9%	0	4
3	3	6,7%	1	2
24	2	4,4%	1	1
10	2	4,4%	1	1
8	1	2,2%	1	0
5	1	2,2%	0	1
16	1	2,2%	0	1
14	1	2,2%	0	1
½ vagy 2	1	2,2%	1	0
B telep				
9	15	62,5%	-	-
2	6	25,0%	-	-
14	1	4,2%	-	-
21	1	4,2%	-	-
7	1	4,2%	-	-
C telep				
7	7	38,9%	-	-
½	4	22,2%	-	-
2	4	22,2%	-	-
1	3	16,7%	-	-

5.2. A szerotípus meghatározására használt módszerek értékelése

Az összes elvégzett szerológiai vizsgálat (n=186) esetében 157 zárult sikeresen, azaz lehetséges volt a szerotípus meghatározása. A maradék 29 esetben a vizsgálat során nem sikerült meghatározni a szerotípust, így az izolátumot be nem soroltként rögzítették a nyilvántartásban. Ebből a 29 izolátumból mind a 29 esetben meg tudtuk állapítani a szerotípusukat az utólag elvégzett PCR vizsgálattal, ám 4 esetben olyan szerotípust azonosítottunk (16. és 24.), amelyekhez nem állt rendelkezésre típus-specifikus savó a laborban, így ezek tárgylemez agglutinációs módszerrel történő detektálása lehetetlen lett volna. Ezen izolátumokat figyelmen kívül hagyva, a laboratóriumban használt szerotipizáló módszer sikeraránya a módszerrel tipizálható törzsek esetében 157/182 (86,2%). Ebből következően az esetek 13,7%-ban a szerotípus nem volt meghatározható annak ellenére sem, hogy a specifikus savó rendelkezésre állt.

A szerotípus meghatározásához PCR vizsgálatot 53 izolátum esetében végeztünk. A vizsgálataink során az 53-ból 3 izolátum esetében nem tudtuk elkülöníteni MAMA PCR-rel az 1/2. és 2. szerotípust, egy esetben pedig nem tudtuk meghatározni a szerotípust. Előbbieket figyelembe véve, a szigorúbb számítás szerint a PCR vizsgálati módszer sikeraránya 49/53, azaz 92,5%. Amennyiben az 1/2. és 2. szerotípusok együttes eredményét is elfogadjuk, akkor az alkalmazott PCR sikeraránya 52/53-ra növekszik (98,1%) a *Streptococcus suis* törzsek szerotípusának azonosítása terén.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A Magyarországon előforduló *S. suis* szerotípusok és azok jellemzése

Vizsgálatainkat 45 telepről származó adattal végeztük el, ami a jelenleg Magyarországon működő nagyüzemi sertéstelepek körülbelül 24%-a. A felmérésünk során felhasznált mintaszám viszonylag kicsi, a megbízhatóságot az elemszám növelésével lehetne fokozni. Ám már az általunk kapott szerotípus prevalencia adatok is figyelemfelkeltőek, hiszen Magyarországon hasonló felmérő vizsgálat a *Streptococcus suis* szerotípusait illetően még nem történt.

Egyre több tudományos cikk készül a kórokozóval kapcsolatban, többségük 100-400 közötti izolátum számmal dolgozik. Számos országgal kapcsolatban elérhetőek nemzeti vagy regionális szerotípus prevalencia adatok. Kanadában és az Egyesült Államokban a 2. és a 3. szerotípus dominál [35]. Az európai kontinensen számos jelentős sertéstartó és sertéshús

előállító ország megtalálható. Spanyolország és Hollandia esetében, a gyakoriságot csökkenő sorrendben feltüntetve a 9., 2., 7., 8. és 3. szerotípusokat izolálják a sertésekből leggyakrabban [35, 76]. Szintén fontos sertéstartó ország például Dánia, Franciaország, Németország, Olaszország, vagy az Egyesült Királyság, ahol a 2., majd a 9. szerotípust mutatják ki az esetek túlnyomó részében sertésekből [60, 100].

Jelenleg 29 valódi *S. suis* szerotípust ismerünk [40]. Ezek közül vizsgálataink során 19 hazai jelenlétét igazoltuk. Nemzetközi adatokban a törzsek nagy része 1-9 szerotípusba tartozik, leggyakrabban a 2. szerotípus, majd 9., 3., ½. és 7. szerotípus izolálható a tüneteket mutató sertések mintáiból [35, 79]. A magyarországi előfordulási gyakoriság a nemzetközi szakirodalmi adatokkal is egybevág. Hazai adatok alapján a leggyakoribb a 2. szerotípus volt, majd a 9., a 7. és az 1/2. szerotípus. Egy vagy néhány domináns, virulensebb szerotípus mellett kimutathatóak egyéb, eltérő virulenciával rendelkező törzsek is. Ám ahogy azt már korábban is leírtam (lsd. Irodalmi áttekintés), sokféle gén és fehérje van, ami összefüggésben áll a törzsek okozta súlyos klinikai tünetekkel [29]. Ugyanakkor hiányuk nem feltétlenül vonja maga után a virulencia hiányát is [29]. Így a kimutatott, ám kevésbé domináns törzsek jelentősége nem tisztázott. A különböző szerotípusok jelenléte egy telepen belül a vakcinázás kérdése szempontjából is fontos. Nem elég egy gyári, adott szerotípust tartalmazó oltóanyag használata. Fontos a telepen előforduló törzsek felmérése, a domináns szerotípusok detektálása. Ezek ismeretében érdemes az adott telepre szabott készítménnyel dolgozni a sikeres vakcinázás elérésének céljából.

A Diagnosztikai Központba küldött minták havi eloszlását megfigyelve (lsd. 4. ábra) elmondható, hogy a téli hónapokban (november, december, január, február) gyakrabban érkezett be olyan minta, amelyből *S. suis*-t sikerült izolálni. Ez is alátámasztja, hogy a baktérium szubklinikai hordozása gyakori [15], a hidegebb téli időszakban amikor a vírusos és bakteriális fertőzések gyakoribbak, a *S. suis* a hajlamosító tényezők hatására klinikai tüneteket tud okozni. [31, 63].

Streptococcus suis izolátumok 9 különböző mátrixból származtak. A szakirodalomban olvasható, a *S. suis*-ra jellemző szervi előfordulás a vizsgálataink során megegyezett [15]. Az általunk detektált szerotípusok legtöbbször kimutatható volt légúti mintából, légúti tüneteket is okozott. Szakirodalmi adatokkal összevetve, világviszonylatban a legtöbb bronchopneumonia esetből kimutatható törzs a 2. szerotípus [1, 30]. Ám egy 2019-ben publikált, 1996-2016 közötti időszakot vizsgáló tanulmány esetén már más szerotípusok dominálnak [71]. A németországi sertéstelepekről bronchopneumonia esetén izolált szerotípusok közül a 4. volt a leggyakoribb,

majd ezt követte a 2., 1/2., 3. és 7. szerotípus [71]. Magyarországon a tüdőből izolált domináns törzsek a 2. (22,7%), a 9. (18,1%), 7. és 5. azonos arányban (13,2% és 13,2%), és az 1. (9%) szerotípusok voltak. A maradék 23,8%-ba a maradék, kisebb előfordulási számú tüdőből kimutatott szerotípus tartozott. A szisztémás fertőzésből származó mintákból (lép, agy, szív stb.) az általunk detektált 19 szerotípus mindegyike kimutatható volt, változó szervi megnyilvánulással. A korábban említett négy leggyakoribb szerotípus dominált a szeptikémia esetén. A 2. szerotípus 34,06%-ban, a 9. szerotípus 14,83%-ban, a 7. szerotípus szintén 14,83%-ban és az 1/2. szerotípus 12,08%-ban volt okozója a szisztémás fertőzéseknek. A többi kimutatott, szeptikémiát okozó szerotípus a maradék 24,2%-ba tartozott. Az ehhez kapcsolódó, általunk kapott eredmények megegyeznek a szakirodalomban leírtakkal, ahol szintén ezen szerotípusok (főleg a 2. és 1/2.) felelnek a szisztémás fertőzések döntő hányadáért [30, 33, 72, 79].

6.2. A szerotípusok megoszlása az egyes nagy mintaszámot szolgáltató telepeken

A passzív surveillance során az izolátumok mennyisége az egyes telepek között néhány esetben jelentős eltérést mutatott. A 45 telep közül 42 telepről 1-9 közötti izolátum származott, míg 3 telep (A, B, C) a 210 S. suis izolátum 41,4%-át (n = 87) szolgáltatta. Ez egyfelől torzítja a szerotípusok telepi szintű megoszlásának vizsgálatát, így a vonatkozó eredményeinket is eszerint kell értékelni. Másfelől viszont, a nagy mintaszámot adó telepek esetében tendenciák vizsgálatára ad lehetőséget.

A három nagy mintaszámot adó telep közül az "A" telepről 45, a "B" telepről 24, és a "C" telep 18 izolátumot származott. Mind a három telep esetén elmondható, hogy a 4 domináns szerotípus (2., 9., 7., 1/2.) előfordult, bár változó gyakorisággal, és mellettük más, kevésbé virulens törzsek is jelen voltak. A "B" telep esetén a 9. szerotípus a leggyakoribb (62,5%), majd ezt követi a 2. szerotípus (25%). A "C" telep esetén a 7. szerotípus dominál (38,9%), majd az 1/2 és 2. szerotípust azonos arányban mutattuk ki (22,2%).

Az "A" telepen, ahonnan a legtöbb S. suis izolátum származott, a szerotípusok előfordulásában időbeli tendencia fedezhető fel. A 2021 májusa előtti időszakban a legtöbb beküldött minta 2. illetve 1/2. szerotípusú izolátum volt. A 2021. májusa utáni időszakban azonban változást észleltünk a szerotípusok előfordulásának arányában: a szakirodalom alapján szintén virulensebb 7. és 9. szerotípusok kerültek előtérbe, míg az addig domináló 2 és 1/2 szerotípusok aránya lecsökkent. A teleppel konzultálva kiderült, hogy a telepen 2021. májusa óta vakcinázás folyik, amely során a leggyakrabban kimutatott szerotípusú törzseket tartalmazó telep-

specifikus vakcinát alkalmaznak. Ez egy már alkalmazott módszer sertéstelepeken. Ezen vakcinák bakterin típusúak, és a fertőzéssel küzdő telepen izolált ottani törzsekből készítik, majd abban a gazdaságban is használják fel [77]. A szerotípus-specifikus vakcina a 2 és ½ szerotípusokat tartalmazza. A kocákat oltják, mellyel céljuk, hogy a kolosztrális immunitásnak köszönhetően az újszülött malacok védettek legyenek a kórokozóval szemben a legkritikusabb életperiódusukban. Az ellés előtt álló kocák vakcinázásával elért passzív immunitás a születendő malacok esetében egy működő módszer [3, 77], ám arra több vizsgálat is rámutatott, hogy a maternális immunitás megszűnését követően a malacokban szükség lehet a későbbi aktív immunizálásra (vakcinázásra) a megfelelő védőhatás eléréséhez [4]. A "B" telep szolgáltatja a tenyészszülő utánpótlást az "A" telep számára. Más telep is kap szüldőket a "B" teleptől, azonban sem a „B” telepen, sem a többi telep esetében nem okoz ekkora állategészségügyi gondot a *Streptococcus suis* jelenléte. Ezen információk, valamint az „A” telep vakcinázással elért eredményei (a domináns szerotípusok változása) arra utalnak, hogy a vakcinázás mint megelőzési forma működik, ám a telepen előforduló környezet- és állathigiéniai hiányosságok jelentős mértékben befolyásolhatják a vakcinázás sikerességét. Ezen immunszuppresszív és hajlamosító tényezők hatására a maternális immunitás megszűnte után a sertések sokkal fogékonyabbak a *S.suis* fertőzéssel szemben, és egy esetleges későbbi vakcinázás sikertelenségét is okozhatják [15].

6.3. A szerotípus meghatározására használt módszerek értékelése

A 210 *S. suis* izolátumból 186 esetébenben végeztünk szerológiai vizsgálatot, amelyek közül 157 esetben tudtuk azonosítani a szerotípust, azaz az esetek 13,7%-ban a szerotípus nem volt meghatározható annak ellenére sem, hogy a specifikus savó rendelkezésre állt. A maradék 29 esetben a későbbiekben PCR tesztek alkalmazva sikeresen kimutattuk a hiányzó szerotípusokat. A sikertelen szerológiai vizsgálatok több oka lehet. Ezek közül a legnyilvánvalóbb a típus-specifikus savó hiányából adódó nehézség. Vizsgálatunk során 4 izolátum PCR teszttel történő azonosítása olyan szerotípusokat igazolt (16. és 24.), amelyekhez nem rendelkezett a labor specifikus savóval. Így ezen szerotípusok tárgylemez agglutinációs módszerrel történő kimutatása lehetetlen lett volna. A maradék 25 esetben ugyanakkor rendelkezésre állt a típus-specifikus savó az azonosításhoz. Ezen esetekben technikai nehézséget jelenthettek a tárgylemez-agglutinációs módszer technikai hibaforrásai. Az agglutináció lejátszódásához elengedhetetlen feltétel a savó és a baktérium megfelelő arányú jelenléte a kikevert szuszpenzióban, valamint, hogy a reakció megfelelő hőmérsékleten játszódjon le [72].

Ezek a nehezen standardizálható tényezők mind hozzájárulhattak a szerológiai azonosítás sikertelenségéhez.

A szerológiai kimutatást nehezítő körülmények másik nagy csoportja a *Streptococcus suis* biológiai felépítéséből adódik. A kórokozó burokantigénje, ha nem is jelentős mértékben, de változékony, és buroktermelő képessége számos feltételhez kötött. A szerológiai módszerrel nem tipizálható (esetünkben "be nem sorolt") kategóriájú törzsek olyan burokkal nem rendelkező törzsek, amelyek tipizálása emiatt a tulajdonságuk miatt a CPS antigéneken alapuló szerológiai módszerrel nem lehetséges [35]. Kutatások során leírták, hogy a nem tipizálható törzsek nagy százaléka felületi hidrofóbságot mutat, ami abból adódik, hogy nem vagy rosszul burkoltak [35]. Azt azonban a szakirodalmi vizsgálatok során és esetünkben sem lehet megállapítani, hogy az említett törzsek nem rendelkeztek burokkal a fertőzés pillanatában sem, vagy pedig a laboratóriumi munkafolyamatok (izolálás, tenyésztés) vesztik el a burkukat [35].

A maradék, korábban szerológiával nem vizsgált 53 izolátum esetében a szerotípus meghatározásához csak a PCR vizsgálati protokollt alkalmaztuk. Az 53 izolátumból 3 esetben a MAMA-PCR vizsgálattal nem tudtuk elkülöníteni egymástól a 2. illetve 1/2 szerotípusokat. ezen szerotípusok esetén a génekészlet és a genomikus hasonlóság szoros lehet, ami megnehezítheti a két szerotípus elkülönítését. Ezenkívül a MAMA-PCR érzékenysége is esetenként korlátozott. Továbbá egy izolátum esetében nem tudtunk meghatározni szerotípust, amelynek a korábban tárgyalt burokhoz köthető oka lehet.

A számokat elemezve elmondható, hogy a szerotipizáló módszer sikeraránya 86,2% volt. Ezzel szemben (ha az 1/2. és 2. szerotípusokat is figyelembe vesszük), akkor az alkalmazott PCR módszerek sikeraránya 98,1% a törzsek szerotípusának azonosítása terén. Továbbá a vizsgálataink során is bebizonyosodott, hogy a molekuláris módszerekkel az antiszérummal nem tipizálható törzseket is képesek beazonosítani [64], és segítségükkel a szerológiai vizsgálatok során kapott eredményeket és a szerotípusok azonosságát meg tudjuk erősíteni [35].

A napi rutin szempontjából is érdemes összehasonlítani a szerológiát a molekuláris biológiai módszerekkel. A szerológia számos előnnyel rendelkezik: olcsó, gyors (15-20 perc), nem igényel speciális felszerelést és szaktudást. Ezeknek a tulajdonságoknak köszönhetően kisebb laborok számára is elérhető alternatíva a kórokozók kimutatására. Az előnyök mellett azonban van hátránya. Nagy a módszer analitikai bizonytalansága a technikai és biológiai tényezők miatt, emiatt pedig magas a hibaforrás. Ezen hibákra lehet, hogy a szerológiai vizsgálat során nem is derül fény, csak egy másodlagos, molekuláris módszerrel történő vizsgálat során. A PCR

nukleinsav alapú módszer, nem befolyásolja az izolátum buroktermelő képessége (ellenben a szerológiával). Megfelelő felszereltség esetén gyorsan kivitelezhető (pár óra), melynek végén megbízható eredményt kapunk. Hátránya azonban, hogy drágább, speciális felszerelést és szaktudást igénylő módszerről van szó (nagyobb és jobban felszerelt laborok). Továbbá a primerkötő helyeken bekövetkező esetleges mutációk zavarhatják a kórokozó biztos kimutatását.

6.4. Következtetések

A *Streptococcus suis* jelen van a hazai nagyüzemi sertésállományokban és a szerotípusok előfordulását tekintve elmondható, hogy az európai adatokkal egybevágnak a magyar eredmények. A nemzetközi szakirodalomban leírtakhoz hasonló szerotípusokkal és hasonló diagnosztikai problémákkal találkoztunk a vizsgálataink során. Az eredmények egy mind állat- mind humánegészségügyi szempontból fontos kórokozó hazai járványtani ismereteihez hozzájárulnak.

A kórokozó törzseinek állományon belüli visszaszorításához a célzott antimikrobiális védekezés, valamint a higiénia megfelelő betartása mellett a jövőben jelentős szerephez juthatnak a kórokozó elleni telepsepcifikus vakcinázási programok. Ugyanakkor ezen vakcinák sem képesek teljes mértékben felszámolni a kórokozó jelentette kártételt, ám jelentős mértékben csökkenthetik a fertőzött állatok kórokozó ürítését, ezzel csökkentve a klinikai tünetek súlyosságát és az állományon belüli fertőzöttség mértékét. De ahhoz, hogy a vakcinázás sikeres legyen, szükséges a telepeken jelenlévő szerotípusok pontos feltérképezése, és a domináns, virulens szerotípusok kiválasztása a vakcinához. Ehhez pedig a biztos diagnosztikai módszerek alkalmazása elengedhetetlen. A vizsgálatunk tapasztalatai pedig megerősítik, hogy a szerotípus meghatározása terén a molekuláris módszerek a tárgylemez agglutinációval szemben jobban teljesítenek.

ÖSSZEFOGLALÓ

Napjainkra az Egy Egészség (One Health) elvet szem előtt tartva jelentősen szigorodott a nagyüzemi sertéstartásban az antibiotikumok felhasználása. A megelőzés, így a fertőző betegségek elleni vakcinázás egyre jobban előtérbe kerül. Ám ahhoz, hogy a preventív intézkedések hatásosak legyenek, a megfelelő és részletes adatgyűjtés és azok hatékony vizsgálati módszerrel történő elemzése elengedhetetlen. A *Streptococcus suis* (*S. suis*) a sertéstenyésztés jelentős kórokozója, valamint növekvő jelentőségű zoonosis. Világszerte számos szerotípusa előfordul, de egyes szerotípusok földrajzi területenként eltérő jelentőséggel bírnak. A szerotípus ismerete fontos a járványtani adatok értékeléséhez és a megfelelő vakcinatörzsek kiválasztásához is. Több európai országban ismert az egyes szerotípusok előfordulási aránya, jelentősége, ugyanakkor vonatkozó hazai adatokkal nem rendelkezünk.

Vizsgálataim célja volt, hogy a magyarországi sertéstelepeken előforduló *S. suis* szerotípusok diverzitásáról és prevalenciájáról részletesebb képet kapjunk, valamint, hogy összehasonlítsuk a szerotípus azonosítására elterjedt szerológiai módszert egy alternatív, molekuláris teszttel. Retrospektív vizsgálataink során a 2020, 2021 és 2022-es évben a Haszonállat-diagnosztikai Központban sertésekből izolált és streptococcus-ként azonosított 253 konzervált törzset használtuk. Az izolátumok faját és *S. suis* esetében a szerotípust klasszikus mikrobiológiai, illetve szerológiai vagy különböző molekuláris módszerekkel határoztuk meg.

A vizsgált 3 év alatt 210 *S. suis* izolátumot azonosítottunk, amelyek az egész ország területéről érkeztek, összesen 42 gazdaság 45 telepéről. A 210 *S. suis* izolátum esetében 19 féle szerotípust sikerült kimutatnunk, a leggyakoribb a 2. (31,1%), 9. (17,8%), 7. (15,6%) és 1/2. (8,9%) szerotípusok voltak. Szakirodalmi adatok alapján a Magyarországon gyakoribb szerotípusok a virulensebb törzsek közé tartoznak, és foglalkozás-egészségügyi kockázatot is jelenthetnek a sertéstartásban tevékenykedőkre nézve. Adataink segítséget nyújthatnak a szerotípusokkal kapcsolatos kockázatbecsléshez, ezen keresztül pedig az ún. telep-specifikus vakcinák törzseinek célzottabb kiválasztáshoz, elősegítve a kórokozó elleni védekezés hatékonyságának növelését.

A 186 elvégzett szerológiai vizsgálatból 157 esetben sikerült meghatározni a szerotípust, így a szerológiai módszer sikeraránya a módszerrel tipizálható törzsek esetében 157/182 (86,2%). A szerológiával be nem sorolt vagy nem tipizált 53 *S. suis* törzs esetében alkalmazott PCR sikeraránya 52/53 (98,1%). Eredményeink egybevágnak más szerzők tapasztalataival és – a kis mintaszám ellenére is – a molekuláris módszer előnyére hívják fel a figyelmet.

SUMMARY

Today, the use of antibiotics in large-scale pig farming has become significantly restricted, in line with the One Health principle. Thus, the prevention, like vaccination against infectious diseases, is becoming more and more important. However, for preventive measures to be effective, adequate, and detailed data collection and analysis using an appropriate testing method are essential. *Streptococcus suis* (*S. suis*) is a major pathogen in pig production and a zoonosis of growing importance. Several serotypes occur worldwide, but some serotypes have different significance in different geographical areas. Knowledge of the serotype is important for the evaluation of epidemiological data and for the selection of appropriate vaccine strains. The prevalence and significance of each serotype is known in several European countries, but no relevant national data are available.

The aim of my studies was to obtain a more detailed picture of the diversity and prevalence of *S. suis* serotypes in Hungarian pig farms and to compare the serological method commonly used for serotype identification with an alternative molecular test. In our retrospective studies, 253 preserved strains isolated from pigs and identified as streptococci at the Production Animal Diagnostic Centre in 2020, 2021 and 2022 were used. The species of the isolates and the serotype of *S. suis* were determined by classical microbiological, serological or different molecular methods.

Over the 3 years studied, 210 *S. suis* isolates were identified from 45 farms of 42 holdings throughout the country. Among the 210 *S. suis* isolates, 19 serotypes were detected, the most frequent being serotypes 2 (31.1%), 9 (17.8%), 7 (15.6%) and 1/2 (8.9%). Based on literature data, the serotypes more prevalent in Hungary are among the most virulent strains and may pose an occupational health risk to pig farmers and veterinarians. Our data may help to estimate the risk associated with serotypes and thus to better target the strains of colony-specific vaccines, consequently helping to improve the effectiveness of disease control.

Of the 186 serological tests performed, 157 cases were serotyped, giving a serological success rate of 157/182 (86.2%) for strains typable by the method, and a PCR success rate of 52/53 (98.1%) for 53 *S. suis* strains not serotyped or not typed, respectively. Our results are in line with those of other authors and – despite the small sample size – highlight the advantages of the molecular method.

IRODALMJEGYZÉK

1. Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE (1998) Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Veterinary Microbiology* 60:59–66. doi: 10.1016/S0378-1135(98)00147-3
2. Aarestrup FM, Rasmussen SR, Artursson K, Jensen NE (1998) Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Veterinary microbiology* 63:71–80
3. Amass SF, Stevenson GW, Vyverberg BD, Huxford TW, Knox KE, Grote LA (2000) Administration of a homologous bacterin to sows preparturient provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Journal of Swine Health and Production* 8:217–219
4. Baums CG, Brüggemann C, Kock C, Beineke A, Waldmann K-H, Valentin-Weigand P (2010) Immunogenicity of an autogenous *Streptococcus suis* bacterin in preparturient sows and their piglets in relation to protection after weaning. *Clinical and vaccine immunology* 17:1589–1597
5. Baums CG, Valentin-Weigand P (2009) Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim Health Res Rev* 10:65–83. doi: 10.1017/S146625230999003X
6. Berthelot-Hérault F, Cariolet R, Labbe A, Gottschalk M, Cardinal J-Y, Kobisch M (2001) Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Canadian journal of veterinary research* 65:196
7. Berthelot-Hérault F, Gottschalk M, Morvan H, Kobisch M (2005) Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69:236
8. Berthelot-Hérault F, Marois C, Gottschalk M, Kobisch M (2002) Genetic diversity of *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and humans as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 40:615–619
9. Berthelot-Hérault F, Morvan H, Kéribin A-M, Gottschalk M, Kobisch M (2000) Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Veterinary research* 31:473–479
10. Blouin C, Higgins R, Gottschalk M, Simard J (1994) Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58:49
11. Bonifait L, Veillette M, Létourneau V, Grenier D, Duchaine C (2014) Detection of *Streptococcus suis* in Bioaerosols of Swine Confinement Buildings. *Appl Environ Microbiol* 80:3296–3304. doi: 10.1128/AEM.04167-13
12. Brown JH (1919) The use of blood agar for the study of streptococci. Rockefeller Institute for medical research
13. Büttner N, Beineke A, de Buhr N, Lilienthal S, Merkel J, Waldmann K-H, Valentin-Weigand P, Baums CG (2012) *Streptococcus suis* serotype 9 bacterin immunogenicity and protective efficacy. *Veterinary immunology and immunopathology* 146:191–200
14. Cloutier G, D'allaire S, Martinez G, Surprenant C, Lacouture S, Gottschalk M (2003) Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary microbiology* 97:135–151
15. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W (2016) *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences

16. Corsaut L, Misener M, Canning P, Beauchamp G, Gottschalk M, Segura M (2020) Field study on the immunological response and protective effect of a licensed autogenous vaccine to control *Streptococcus suis* infections in post-weaned piglets. *Vaccines* 8:384
17. Elliott SD (1966) Streptococcal infection in young pigs I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus). *J Hyg* 64:205–212. doi: 10.1017/S0022172400040468
18. Fittipaldi N, Fuller TE, Teel JF, Wilson TL, Wolfram TJ, Lowery DE, Gottschalk M (2009) Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of *Streptococcus suis* isolated in the United States. *Veterinary microbiology* 139:310–317
19. Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, Gottschalk M (2012) Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiology* 7:259–279. doi: 10.2217/fmb.11.149
20. Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, Sekizaki T, Takamatsu D, Gottschalk M (2011) Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerging infectious diseases* 17:2239
21. Flores JLM, Higgins R, D’Allaire S, Charette R, Boudreau M, Gottschalk M (1993) Distribution of the different capsular types of *Streptococcus suis* in nineteen swine nurseries. *The Canadian veterinary journal* 34:170
22. Gajdács M, Németh A, Knausz M, Barrak I, Stájer A, Mestyán G, Melegh S, Nyul A, Tóth Á, Ágoston Z, Urbán E (2020) *Streptococcus suis*: An Underestimated Emerging Pathogen in Hungary? *Microorganisms* 8:1292. doi: 10.3390/microorganisms8091292
23. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M (1993) Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2192–2194
24. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J (1991) Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 29:2590–2594. doi: 10.1128/jcm.29.11.2590-2594.1991
25. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J (1991) Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9–22. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 3:60–65
26. Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J (1989) Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 27:2633–2636. doi: 10.1128/jcm.27.12.2633-2636.1989
27. Gottschalk M, Lacouture S (2015) Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. *The Canadian Veterinary Journal* 56:1093
28. Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D (2013) Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. *Veterinary microbiology* 162:819–825
29. Gottschalk M, Segura M (2000) The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology* 76:259–272. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00250-9
30. Gottschalk M, Segura M (2012) *Streptococcus suis*: in *Diseases of swine*. Blackwell Ames
31. Gottschalk M, Segura M (2019) *Streptococcus suis*. *Diseases of swine* 934–950
32. Gottschalk M, Segura M, Xu J (2007) *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Animal health research reviews* 8:29–45
33. Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M (2010) *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future microbiology* 5:371–391

34. Gottschalk MG, Lacouture S (1995) Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology* 141:189–195
35. Goyette-Desjardins G, Auger J-P, Xu J, Segura M, Gottschalk M (2014) *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging microbes & infections* 3:1–20
36. Haas B, Grenier D (2018) Understanding the virulence of *Streptococcus suis* : A veterinary, medical, and economic challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses* 48:159–166. doi: 10.1016/j.medmal.2017.10.001
37. Halbur P, Thanawongnuwech R, Brown G, Kinyon J, Roth J, Thacker E, Thacker B (2000) Efficacy of antimicrobial treatments and vaccination regimens for control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Streptococcus suis* coinfection of nursery pigs. *Journal of clinical microbiology* 38:1156–1160
38. Hardie JM, Whiley RA (1995) The genus *Streptococcus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH (eds) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US, Boston, MA, pp 55–124
39. Hardie JM, Whiley RA (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 83:1S-11S. doi: 10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x
40. Hatrongjit R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Kerdsin A (2020) Tools for Molecular Epidemiology of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 9:81. doi: 10.3390/pathogens9020081
41. Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J (1995) Description of Six New Capsular Types (29–34) of *Streptococcus Suis*. *J VET Diagn Invest* 7:405–406. doi: 10.1177/104063879500700322
42. Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH (2005) Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary microbiology* 107:63–69
43. Holt ME, Enright MR, Alexander TJL (1990) Immunisation of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Research in Veterinary Science* 48:23–27
44. Hughes JM, Wilson ME, Wertheim HF, Nghia HDT, Taylor W, Schultz C (2009) *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clinical infectious diseases* 48:617–625
45. Hui ACF, Ng KC, Tong PY, Mok V, Chow KM, Wu A, Wong LKS (2005) Bacterial meningitis in Hong Kong: 10-years' experience. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 107:366–370
46. Huong VTL, Ha N, Huy NT, Horby P, Nghia HDT, Thiem VD, Zhu X, Hoa NT, Hien TT, Zamora J (2014) Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of *Streptococcus suis* infection in humans. *Emerging infectious diseases* 20:1105
47. Ishida S, Tien LHT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T (2014) Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*. *Journal of Microbiological Methods* 107:66–70. doi: 10.1016/j.mimet.2014.09.003
48. Jacobs AA, Loeffen PL, Van Den Berg AJ, Storm PK (1994) Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and immunity* 62:1742–1748
49. KATAOKA Y, YOSHIDA T, SAWADA T (2000) A 10-year survey of antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from swine in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 62:1053–1057
50. Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, Detchawna U, Sekizaki T, Hamada S, Gottschalk M, Oishi K (2014) *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR. *Journal of Medical Microbiology* 63:824–830. doi: 10.1099/jmm.0.069757-0

51. Kjems E, Perch B (1975) Serious infections in man caused by group R streptococci. *Ugeskrift for laeger* 137:682–683
52. Lacouture S, Okura M, Takamatsu D, Corsaut L, Gottschalk M (2020) Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, 1/2, and 14. *J VET Diagn Invest* 32:490–494. doi: 10.1177/1040638720915869
53. Lancefield RC (1933) A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *Journal of Experimental Medicine* 57:571–595. doi: 10.1084/jem.57.4.571
54. Lapointe L, D’Allaire S, Lebrun A, Lacouture S, Gottschalk M (2002) Antibody response to an autogenous vaccine and serologic profile for *Streptococcus suis* capsular type 1/2. *Canadian journal of veterinary research* 66:8
55. Lecours M-P, Gottschalk M, Houde M, Lemire P, Fittipaldi N, Segura M (2011) Critical role for *Streptococcus suis* cell wall modifications and suilysin in resistance to complement-dependent killing by dendritic cells. *Journal of Infectious Diseases* 204:919–929
56. Li X, Liu P, Gan S, Zhang C, Zheng Y, Jiang Y, Yuan Y (2016) Mechanisms of host-pathogen protein complex formation and bacterial immune evasion of *Streptococcus suis* protein Fhb. *Journal of Biological Chemistry* 291:17122–17132
57. Liu Z, Zheng H, Gottschalk M, Bai X, Lan R, Ji S, Liu H, Xu J (2013) Development of Multiplex PCR Assays for the Identification of the 33 Serotypes of *Streptococcus suis*. *PLoS ONE* 8:e72070. doi: 10.1371/journal.pone.0072070
58. Lun Z-R, Wang Q-P, Chen X-G, Li A-X, Zhu X-Q (2007) *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* 7:201–209. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70001-4
59. MacInnes JI, Gottschalk M, Lone AG, Metcalf DS, Ojha S, Rosendal T, Watson SB, Friendship RM (2008) Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* 72:242
60. Marie J, Morvan H, Berthelot-Hérault F, Sanders P, Kempf I, Gautier-Bouchardon AV, Jouy E, Kobisch M (2002) Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:201–209
61. Messier S, Lacouture S, Gottschalk M (2008) Distribution of *Streptococcus suis* capsular types from 2001 to 2007. *The Canadian Veterinary Journal* 49:461
62. Nedbalcova K, Kucharovicova I, Zouharova M, Matiaskova K, Kralova N, Brychta M, Simek B, Pecha T, Plodkova H, Matiasovic J (2022) Resistance of *Streptococcus suis* Isolates from the Czech Republic during 2018–2022. *Antibiotics* 11:1214. doi: 10.3390/antibiotics11091214
63. Obradovic MR, Segura M, Segalés J, Gottschalk M (2021) Review of the speculative role of co-infections in *Streptococcus suis*-associated diseases in pigs. *Vet Res* 52:49. doi: 10.1186/s13567-021-00918-w
64. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M (2014) Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology* 52:1714–1719
65. Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D (2016) Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. *Pathogens* 5:45. doi: 10.3390/pathogens5030045
66. Okwumabua O, O’Connor M, Shull E (2003) A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS microbiology letters* 218:79–84

67. Palmer M (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39:1681–1689. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00155-6
68. Perch B, Kristjansen P, Skadhauge KN (1968) Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 74:69–76
69. Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J (1983) Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology* 17:993–996
70. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG (2004) Use of *tuf* Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species. *J Clin Microbiol* 42:3686–3695. doi: 10.1128/JCM.42.8.3686-3695.2004
71. Prüfer TL, Rohde J, Verspohl J, Rohde M, De Greeff A, Willenborg J, Valentin-Weigand P (2019) Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. *PLoS ONE* 14:e0210801. doi: 10.1371/journal.pone.0210801
72. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick Es (2011) *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons
73. Reams RY, Harrington DD, Glickman LT, Thacker HL, Bowersock TL (1996) Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 8:119–121
74. Rebecca Buxton (2005) *Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols*. American Society for Microbiology © 2016
75. Rieckmann K, Pendzialek S-M, Vahlenkamp T, Baums CG (2020) A critical review speculating on the protective efficacies of autogenous *Streptococcus suis* bacterins as used in Europe. *Porcine Health Management* 6:1–11
76. Schultsz C, Jansen E, Keijzers W, Rothkamp A, Duim B, Wagenaar JA, van der Ende A (2012) Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. *PloS one* 7:e33854
77. Segura M (2015) *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress. *Expert Review of Vaccines* 14:1587–1608. doi: 10.1586/14760584.2015.1101349
78. Segura M, Aragon V, Brockmeier S, Gebhart C, Greeff A, Kerdsin A, O’Dea M, Okura M, Saléry M, Schultsz C, Valentin-Weigand P, Weinert L, Wells J, Gottschalk M (2020) Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*. *Pathogens* 9:374. doi: 10.3390/pathogens9050374
79. Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M (2017) Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in Microbiology* 25:585–599. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.005
80. Smith HE, Buijs H, de Vries R, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA (2001) Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron-restricted conditions in vitro and by experimental infection of piglets. *Microbiology* 147:271–280
81. Smith HE, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Vecht U, Smits MM (1997) Virulence markers of *Streptococcus suis* type 1 and 2. *Streptococci and the Host* 651–655
82. Soares TCS, Gottschalk M, Lacouture S, Megid J, Ribolla PEM, de Figueiredo Pantoja JC, Paes AC (2015) *Streptococcus suis* in employees and the environment of swine slaughterhouses in São Paulo, Brazil: Occurrence, risk factors, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility. *Canadian Journal of Veterinary Research* 79:279–284
83. Spellerberg B, Brandt C (2015) *Streptococcus*. *Manual of clinical microbiology* 383–402

84. Sriskandan S, Slater JD (2006) Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the East? *PLoS Medicine* 3:e187
85. Stewart JR, Gast RJ, Fujioka RS, Solo-Gabriele HM, Meschke JS, Amaral-Zettler LA, Del Castillo E, Polz MF, Collier TK, Strom MS (2008) The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental health* 7:1–14
86. Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ (2013) *Diseases of swine*. John Wiley & Sons
87. Tan C, Zhang A, Chen H, Zhou R (2019) Recent Proceedings on Prevalence and Pathogenesis of *Streptococcus suis*. *Current Issues in Molecular Biology* 473–520. doi: 10.21775/cimb.032.473
88. Tang J, Wang C, Feng Y, Yang W, Song H, Chen Z, Yu H, Pan X, Zhou X, Wang H (2006) Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS medicine* 3:e151
89. Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, Luque I, Miranda A, Perea A (1994) Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine: proposal for biochemical parameters. *Journal of clinical microbiology* 32:578–580
90. Tenenbaum T, Asmat TM, Seitz M, Schrotten H, Schwerk C (2016) Biological activities of suilysin: role in *Streptococcus suis* pathogenesis. *Future microbiology* 11:941–954
91. Thi Hoang Mai N, Thi Hoa N, Vu Thieu Nga T, Dieu Linh L, Thi Hong Chau T, Xuan Sinh D, Hoan Phu N, Van Chuong L, Song Diep T, Campbell J (2008) *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam. *Clinical Infectious Diseases* 46:659–667
92. Tohya M, Watanabe T, Maruyama F, Arai S, Ota A, Athey TB, Fittipaldi N, Nakagawa I, Sekizaki T (2016) Comparative genome analyses of *Streptococcus suis* isolates from endocarditis demonstrate persistence of dual phenotypic clones. *PLoS One* 11:e0159558
93. Toit MD, Huch M, Cho G-S, Franz CMAP (2014) The genus *Streptococcus*. In: Holzapfel WH, Wood BJB (eds) *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 457–505
94. Vecht URI, Wisselink HJ, Jellema ML, Smith HE (1991) Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and immunity* 59:3156–3162
95. Walsh B, Williams AE, Satsangi J (1992) *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Rev Med Microbiol* 3:65–71
96. Wang J, Kong D, Zhang S, Jiang H, Zheng Y, Zang Y, Hao H, Jiang Y (2015) Interaction of fibrinogen and muramidase-released protein promotes the development of *Streptococcus suis* meningitis. *Frontiers in microbiology* 6:1001
97. Wasteson Y, Høie S, Roberts MC (1994) Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology* 41:41–49
98. Wilson LG (1987) The early recognition of streptococci as causes of disease. *Medical history* 31:403–414
99. Windsor RS, Elliott SD (1975) Streptococcal infection in young pigs: IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *J Hyg* 75:69–78. doi: 10.1017/S0022172400047070
100. Wisselink HJ, Smith HE, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkamp K, Vecht U (2000) 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. *Veterinary microbiology* 74:237–248
101. Wu T, Zhao Z, Zhang L, Ma H, Lu K, Ren W, Liu Z, Chang H, Bei W, Qiu Y (2011) Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence. *Microbial pathogenesis* 51:69–76
102. Xu L, Huang B, Du H, Zhang XC, Xu J, Li X, Rao Z (2010) Crystal structure of cytotoxin protein suilysin from *Streptococcus suis*. *Protein Cell* 1:96–105. doi: 10.1007/s13238-010-0012-3

103. Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang L, Bai X, Zhou Y (2006) Streptococcus suis sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging infectious diseases* 12:1203
104. Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, Wang S, Liu L, Zu R, Luo L (2006) Human streptococcus suis outbreak, Sichuan, China. *Emerging infectious diseases* 12:914
105. Zhang S, Wang J, Chen S, Yin J, Pan Z, Liu K, Li L, Zheng Y, Yuan Y, Jiang Y (2016) Effects of sulysin on Streptococcus suis-induced platelet aggregation. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6:128
106. Zhang S, Zheng Y, Chen S, Huang S, Liu K, Lv Q, Jiang Y, Yuan Y (2016) Sulysin-induced platelet-neutrophil complexes formation is triggered by pore formation-dependent calcium influx. *Scientific Reports* 6:36787
107. Zheng H, Ji S, Liu Z, Lan R, Huang Y, Bai X, Gottschalk M, Xu J (2015) Eight Novel Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Loci Identified in Nontypeable Streptococcus suis Isolates. *Appl Environ Microbiol* 81:4111–4119. doi: 10.1128/AEM.00315-15
108. Zheng H, Qiu X, Roy D, Segura M, Du P, Xu J, Gottschalk M (2017) Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable Streptococcus suis isolated from diseased pigs in Canada. *Veterinary research* 48:1–10

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Albert Ervinnek, hogy szakmai odaadásával segítette a tudományos diákköri munkám elkészülését. Nagyon köszönöm a közös munkát és a tudást, amivel segített és gazdagított.

Szeretném továbbá megköszönni Zahorecz Mónikának és Rádi Dórának a segítségüket, a közös munkát, és a vizsgálataim elvégzése során nyújtott támogatást. Köszönöm minden állatorvosnak a támogató segítségét a Diagnosztikai Központban.

Köszönöm dr. Biksi Imrének, a Haszonállat Diagnosztikai Központ vezetőjének, hogy lehetőséget és eszközöket biztosított a vizsgálataimhoz.

Továbbá szeretném megköszönni a támogatást, a türelmet és a biztató szavakat a családomnak és a barátaimnak.