

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU

Aleksandar B. Stanojković, dipl. vet.

**ISPITIVANJE PRISUSTVA I SEROTIPSKE
PRIPADNOSTI VRSTE *STREPTOCOCCUS SUIS* U
MATERIJALIMA POREKLOM OD SVINJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2012

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU

Aleksandar B. Stanojković, dipl. vet.

**ISPITIVANJE PRISUSTVA I SEROTIPSKE
PRIPADNOSTI VRSTE *STREPTOCOCCUS SUIS*
U MATERIJALIMA POREKLOM OD SVINJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

Aleksandar B. Stanojković, dvm

**INVESTIGATION OF PRESENCE AND
SEROTYPE AFFILIATION OF
STREPTOCOCCUS SUIS SPECIES IN SAMPLES
ORIGINATING FROM PIGS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2012

MENTOR:

dr Ružica Ašanin, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Katedra za mikrobiologiju

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Ružica Ašanin, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

dr Nenad Milić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

dr Horea Šamanc, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

dr Dušan Mišić, docent

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

dr Žutić Milenko, naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Datum odbrane : _____._____._____ . godine

ISPITIVANJE PRISUSTVA I SEROTIPSKE PRIPADNOSTI VRSTE *STREPTOCOCCUS SUIS* U MATERIJALIMA POREKLOM OD SVINJA

Kratak sadržaj

Cilj ovog ispitivanja je bio da se ustanovi prisustvo S. suis na nekim farmama i klanicama svinja u Republici Srbiji, definišu biohemijske osobine izolovanih sojeva, utvrdi njihova serotipska pripadnost i ispita njihova osetljivost na antibiotike. Poznato je da se S. suis nalazi kao normalan stanovnik respiratornog sistema svinja, najčešće tonzila i nosnih šupljina, a često se može izolovati i iz genitalnog i gastrointestinalnog sistema. Klinički zdrave svinje predstavljaju glavni rezervoar uzročnika i najznačajniju kariku u epidemiologiji infekcije kod ljudi. Iako se smatra uglavnom patogenom svinja, S. suis je do sada izolovan kao uzročnik infekcija kod različitih drugih vrsta sisara (goveda, mačaka, ovaca) i ptica. Infekcije kod ljudi izazvane S. suis smatrane su sporadičnim i bile su uglavnom vezane za ljude koji dolaze u kontakt sa svinjama i njihovim proizvodima. Međutim, 2005. godine u Kini je izbila epidemija izazvana S. suis kada je obolelo više od 200 ljudi, a kod skoro 20% obolelih bolest se završila fatalno. Ova epidemija je potpuno promenila shvatanje o opasnosti ovog patogena za zdravlje ljudi. Veterinarske dijagnostičke laboratorije obično lako identifikuju S. suis upotrebom malog broja biohemijskih testova, naročito ukoliko su ispitivani uzorci poreklom od obolelih svinja. Međutim, smatra se da neki sojevi (i/ili serotipovi) S. suis mogu biti pogrešno identifikovani komercijalnim kitovima, zbog čega serotipizacija, koja se inače koristi i u rutinskoj dijagnostičkoj proceduri predstavlja jednu od sigurnih dijagnostičkih metoda Osetljivost na antibiotike sojeva S. suis u zemljama u kojima je ispitivana uglavnom je zavisila od antibiotika koji su korišćeni u lečenju svinja. Za ovo ispitivanje korišćeni su brisevi nazofaringealnih tonzila prasadi i svinja, nosnih šupljina prasadi, ali i brisevi organa uginule prasadi, brisevi sa trupova zaklanih svinja i brisevi sa noža za evisceraciju organa na klanici. Svi uzorci su transportovani u tripton soja bujonu u roku od 2 časa od uzorkovanja. Za izolaciju su korišćene čvrste i tečne hranljive podloge (Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, moždano srčana infuzija sa dodatkom 6,5% NaCl, tripton soja bujon, eskulin bujon, andrade ugljeno hidratni bujon sa indikatorom i trehalozom ili salicinom). Za identifikaciju izolovanih bakterija korišćeni su klasični i komercijalni testovi API 20 Strep i rapid ID32 STREP (bioMérieux, Francuska), a definitivna identifikacija sojeva S. suis obavljena je serološkom tipizacijom sa serumima specifičnim za kapsularne antigene (1-35) S. suis, takozvanim Neufeld testom (Quellung reakcija). Ispitivanje osetljivosti sojeva na antimikrobne lekove S. suis izvedeno je disk-difuzionom metodom po Kirby - Bauer-u na Mueller Hinton agaru sa 5% ovčije krvi, korišćenjem diskova proizvođača BD diagnostics prema uputstvu proizvođača. Od ukupno 226 uzoraka izolovana su i serotipizirana 34 soja. Serotip 2 S. suis je ustanovljen u 67.7% slučajeva, a serotipovi 7, 9 i 1 su izolovani u daleko manjim procentima (17.6%, 8.8% i 5.9%). Kod svih sojeva Streptococcus suis izolovanih od svinja sa nekoliko farmi i klanica u Republici Srbiji ustanovljena je visoka osetljivost na cefalosporinske antibiotike, vankomicin i hloramfenikol (100%), manja na penicilin, amoksicilin, ciprofloksacin, eritromicin i azitromicin (94,1%), veoma niska na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima (5,9%), dok je kod svih sojeva utvrđena rezistencija na tetraciklin, klindamicin i linkomicin.

Ključne reči: *Svinje, S. suis, serotip*

INVESTIGATION OF PRESENCE AND SEROTYPE AFFILIATION OF *STREPTOCOCCUS SUIIS* SPECIES IN SAMPLES ORIGINATING FROM PIGS

Abstract

The aim of this study was to establish the presence of S. suis on some pig farms in the Republic of Serbia, then, to define their biochemical profiles, determine their serotype affiliation and test antimicrobial susceptibility of isolated serotypes. It is known that S. suis is a normal inhabitant of the respiratory system of pigs, mostly of the tonsils and nasal cavities, and can often be isolated from the genital and gastrointestinal system. Clinically healthy pigs are a major reservoir of pathogens and the most important link in the epidemiology of infection in humans. Although generally considered a pathogen for pigs, S. suis has been isolated as the cause of infection in a variety of other mammal species (cattle, cats, sheep) and birds. Infections in humans caused by S. suis were considered sporadic and were mostly related to people who come in contact with pigs and their products. However, in year 2005 the outbreak in China caused by S. suis affected more than 200 people, with almost 20% of patients with the disease ending fatally. This epidemic has completely changed the perception of the danger of this pathogen to human health. Veterinary diagnostic laboratories usually easily identify S. suis using a small number of biochemical tests, especially if the samples originate from diseased pigs. However, it is considered that some S. suis strains (and/or serotypes) may be incorrectly identified by commercial kits, thus making serotyping (normally used in routine diagnostic procedures), one of the safest diagnostic procedures. For this test we used nasopharyngeal swabs of pigs and pig tonsils, nasal cavities of piglets, and swabs of dead pigs, swabs from the carcasses of slaughtered pigs and swabs from the evisceration knife after slaughter. All samples were transported in tryptone soy broth within 2 hours of sampling. For isolation were used solid and liquid media (Colombia agar with 5% sheep blood added, brain heart infusion with 6.5% NaCl added, tryptone soy broth, esculin broth, andrade's carbohydrate broth with indicator and trehalose or salicine). For the identification of the isolated bacteria classical and commercial tests API 20 Strep and Rapid ID32 STREP (bioMérieux, France) were used and for the definitive identification of strains of S. suis serological typing was performed with antisera specific for capsular antigens (1-35) the so-called Neufeld test (Quellung reaction). Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc-diffusion (Kirby-Bauer) method on Mueller Hinton agar with 5% sheep blood using BD diagnostics antimicrobial susceptibility test discs according to manufacturers instructions. From 226 collected samples, 34 strains of S. suis have been isolated. S. suis serotype 2 has been isolated in 67,7% of cases, while serotypes 7, 9 and 1 have been isolated much less frequently (17.6%, 8.8% and 5.9%, respectively). All S. suis strains isolated from some pig farms and slaughterhouses in Republic of Serbia showed high antimicrobial susceptibility to cephalosporins, vancomycin and chloramphenicol (100%), little less susceptibility to penicillin, amoxicillin, ciprofloxacin, erythromycin and azythromycin (94,1%), very low susceptibility was observed against sulfamethoxazole and trimethoprim, while all strains were resistant to tetracycline, clindamycin and lincomycin.

Key words: Pigs, *S. suis*, serotype

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Opšte karakteristike <i>Streptococcus</i> spp.	3
2.2. Morfološke i kulturelne osobine vrste <i>S. suis</i>	4
2.3. Biohemijske karakteristike <i>S. suis</i>	5
2.4. Serološki tipovi <i>S. suis</i>	8
2.5. Prevalencija pojedinih serotipova <i>S. suis</i>	11
2.6. Otpornost <i>S. suis</i> u uslovima spoljašnje sredine	13
2.7. Epizootologija vrste <i>S. suis</i>	16
2.8. Epidemiologija infekcije koju izaziva <i>S. suis</i>	20
2.9. Faktori virulencije <i>S. suis</i>	24
2.9.1. Kapsularni polisaharid (CPS)	27
2.9.2. Peptidoglikan	30
2.9.3. Teihoična (TA) i lipoteihoična kiselina (LTA)	31
2.9.4. Pilusi	32
2.9.5. Sortaze	33
2.9.6. Muramidaza oslobađajući protein (MRP)	34
2.9.7. Hijaluronidaza (HylA)	36
2.9.8. Površinski antigen 1 (Surface antigen one, SAO)	36
2.9.9. Serumski faktor neprozirnosti (SOF, OFS)	37
2.9.10. Cilična nukleotid fosfodiesteraza (SntA)	38
2.9.11. Fibronektin i fibrinogen vezujući protein (FBPS)	39
2.9.12. Arginin deiminaza (Arginine deiminase, ArcA)	40
2.9.13. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)	41
2.9.14. Enolaza	41
2.9.15. Hemaglutinini	42
2.9.16. Lipoproteini	43
2.9.17. Suilizin (Hemolizin)	44
2.9.18. Ostali hemolizini	47
2.9.19. Fosfolipaza C	47
2.9.20. Vančelijski proteinski faktor (EF)	48
2.9.21. Inhibitorne supstance slične bakteriocinu (BLIS)	49
2.9.22. Imunoglobulin G vezujući protein	50
2.9.23. Biofilm	50
2.10. Patogeneza	50
2.10.1. Patogeneza STSS (streptococcal toxic shock syndrome)	59
2.11. Klinički znaci bolesti svinja	61
2.12. Patološki nalaz	65
2.13. Osetljivost <i>S. suis</i> na antibakterijske lekove	72
2.14. Lečenje svinja obolelih od meningitisa koji izaziva <i>S. suis</i>	74
2.15. Prevencija bolesti koju izazivaju sojevi <i>S. suis</i>	75
2.16. Imunizacija	76
2.17. Iskorenjivanje bolesti	78
2.18. Klinička slika infekcije koju izaziva <i>S. suis</i> kod ljudi	79

2.19. Dijagnoza infekcije koju izaziva <i>S. suis</i> kod ljudi	83
2.20. Terapija infekcije izazvane vrstom <i>S. suis</i> kod ljudi	84
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	85
4. MATERIJAL I METODE	86
4.1. Uzorkovanje i transport	86
4.2. Ispitivanje uzoraka	87
4.2.1. Hranljive podloge	87
4.2.2. Identifikacija sojeva <i>Streptococcus suis</i>	91
4.2.2.1. Kulturelne osobine	91
4.2.2.2. Mikroskopski izgled	91
4.2.2.3. Katalaza i oksidaza testovi	92
4.2.2.4. Preliminarna biohemijska identifikacija	92
4.2.2.4.1. Razlaganje eskulina	92
4.2.2.4.2. Fermentacija trehaloze i salicina	93
4.2.2.4.3. Stvaranje acetoina (acetilmetilkarbinola) iz glukoze (VP test)	93
4.2.2.4.4. Rast u medijumu sa 6,5% NaCl	93
4.2.2.5. Identifikacioni sistem API 20 STREP	93
4.2.2.5.1. Izvođenje API 20 STREP testa	94
4.2.2.6. Rapid ID 32 STREP identifikacioni sistem	96
4.2.2.6.1. Izvođenje rapid ID 32 STREP testa	97
4.2.2.7. Serološka tipizacija <i>S. suis</i>	99
4.2.2.7.1. Neufeld test (Quellung reakcija)	99
4.2.2.8. Ispitivanje osetljivosti <i>S. suis</i> na antimikrobne lekove	99
4.2.2.8.1. Disk-difuziona metoda	99
5. REZULTATI	101
5.1. Preliminarna biohemijska identifikacija <i>S. suis</i>	101
5.2. Biohemijske osobine <i>S. suis</i> i upotreba identifikacionih sistema u dijagnostici	105
5.3. Prevalencija serotipova <i>S. suis</i> na ispitivanim farmama svinja	108
5.4. Osetljivost sojeva <i>S. suis</i> na antibiotike	112
6. DISKUSIJA	116
7. ZAKLJUČCI	132
8. SPISAK LITERATURE	133

1. UVOD

Proizvodnja svinjskog mesa zauzima izuzetno važno mesto u svetskom stočarstvu, kako u pogledu obima proizvodnje, tako i ekonomskih efekata koji se u ovoj grani stočarstva ostvaruju. Intenzivna proizvodnja svinja podrazumeva držanje velikog broja životinja na relativno malom prostoru, a takav način proizvodnje stavlja pred savremenu veterinarsku nauku i praksu čitav niz novih problema i zadataka. U uslovima masovne proizvodnje i sve većih zahteva u smislu povećanja proizvodnih sposobnosti životinjskog organizma postavljaju se i problemi zdravstvene zaštite. Poznati su brojni mikroorganizmi koji izazivaju različita oboljenja svinja, ali u državama koje imaju razvijeno svinjarstvo posebno u proteklih 20 godina kao jedan od značajnijih prouzrokovaca zdravstvenih problema navodi se *Streptococcus suis*.

Streptococcus suis se normalno može naći u gornjim delovima respiratornog sistema, najčešće u tonzilama i nosnim šupljinama, ali i u genitalnom i digestivnom sistemu svinja. Iako su svinje skoro 100% kliconoše bakterije *Streptococcus suis*, pojavljivanje bolesti varira, i obično je manje od 5% zahvaljujući kontrolisanoj upotrebi antibiotika.

U slučajevima bolesti kod svinja kada se životinje adekvatno ne leče mortalitet može dostići i do 20%. U perakutnim slučajevima bolesti, svinje mogu uginjavati bez ikakvih znakova bolesti. Bolest izazvana ovim uzročnikom može da se manifestuje kao: septikemija, artritis, endokarditis, pneumonija, rinitis, vaginitis i abortusi. Takođe i meningitis izazvan vrstom *S. suis* se često javlja kao klinička forma bolesti. Najčešće se uzročnik može izolovati u slučajevima iznenadnog uginuća kod meningitisa i endokarditisa ili kada se kod obolelih životinja registruju znaci poremećenog disanja, cijanoze i mršavljenja. Međutim, infekcije ljudi izazvane vrstom *S. suis* su dugo vremena smatrane sporadičnim pojavama koje su imale nisku prevalenciju, i smatralo se da samo ljudi koji rade sa svinjama ili proizvodima od svinja oboljevaju. Prvi slučaj meningitisa kod ljudi izazvanog vrstom *Streptococcus suis* zabeležen je 1968. godine u Danskoj i od tada je oboljenje prijavljeno u više od 20 zemalja sa preko 700 obolelih ljudi.

Međutim, epidemija bolesti izazvana ovim patogenom 2005. godine u Kini, u kojoj je preko 200 ljudi bilo inficirano, a oko 20% umrlo, promenila je percepciju pretnje koju ovaj patogen predstavlja za ljudsko zdravlje. Od tada je povećan broj prijavljenih slučajeva infekcija izazvanih *S. suis*, čime se ova bakterija počela svrstavati u veoma značajnog zoonotskog patogena. Takođe, osim slučajeva meningitisa ljudi izazvanog ovim uzročnikom, sve značajnija je pojava streptokoknog toksičnog šok sindroma (STSS) koji izaziva ova bakterija, a koji je do 2005. godine bio karakteristika stafilokokne infekcije ili infekcije streptokokama iz grupe A (*Streptococcus pyogenes*). Iako su faktori virulencije *S. suis* veoma dobro poznati, tačan mehanizam patogeneze infekcije nije još sasvim razjašnjen. Ovaj mikroorganizam se veoma dobro prilagođava organizmu domaćina i zbog toga postoje male razlike među sojevima koji izazivaju infekcije svinja i ljudi.

S obzirom da istraživanja iz ove oblasti u Republici Srbiji nisu vršena, želeli smo da u okviru ove disertacije na nekoliko farmi i klanica ispitamo prisustvo *Streptococcus suis*, njegovu serotipsku pripadnost i osetljivost izolovanih sojeva na određeni broj antimikrobnih lekova koji se koriste u kliničkoj praksi.

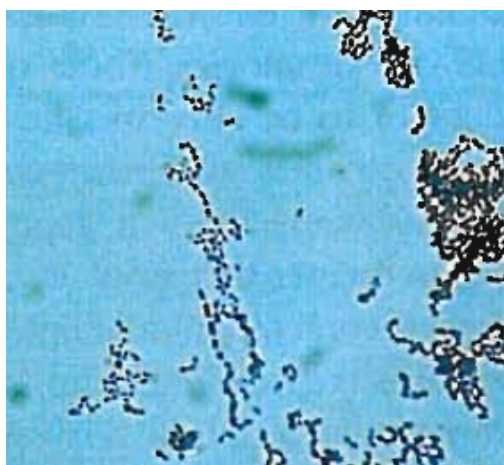
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Opšte karakteristike *Streptococcus* spp.

Klasifikacija i taksonomija streptokoka i streptokokama sličnih bakterija se radikalno promenila poslednjih godina otkrićem nekoliko novih rodova katalaza negativnih koka. Upotreba molekularnih metoda (DNK-DNK hibridizacija, DNK-ribozomalna RNK hibridizacija, sekvencioniranje male subjedinice ribozomalne RNK) doprinela je kompletnoj reorganizaciji taksonomije streptokoka.

U najnovijem izdanju **Bergey's manual of systematic bacteriology (2009)** , streptokoke su svrstane u koleno *Firmicutes*, klasu *Bacilli*, red *Lactobacillales*, familiju *Streptococcaceae* i rod *Streptococcus*. Ovom novom taksonomijom rod *Streptococcus* je podeljen na osnovu sekvencioniranja male subjedinice (16S) ribozomalne RNK na sedam grupa.

Bakterije roda *Streptococcus* su katalaza i oksidaza negativni, fakultativni anaerobi, iako neki sojevi rastu bolje pod anaerobnim uslovima. Najveći broj vrsta ovog roda raste dobro u aerobnim uslovima, međutim, rast nekih vrsta se može stimulisati kultivisanjem u uslovima povećane koncentracije ugljen dioksida. Na preparatima bojenim po Gramu, članovi roda *Streptococcus* su gram pozitivne koke koje se obično mogu uočiti u formaciji lanaca, u parovima ređe pojedinačno (**Slika 1**).



Slika 1. *Streptococcus* spp. – bojenje po Gramu

Ćelijski zid streptokoka je sličan ćelijskom zidu drugih gram pozitivnih bakterija i sastavljen je od peptidoglikana u koji su uronjeni različiti molekuli ugljenih hidrata, teihoična kiselina, lipoproteini i površinski proteinski antigeni. Neke vrste streptokoka se mogu serološki klasifikovati na osnovu površinski vezanih ugljeno hidratnih molekula. Na osnovu ovih molekula definisane su i grupe streptokoka po osnivaču i pioniru u ovoj oblasti Rebeke Lancefeld. Antigeni na površini ćelija koji se detektuju u Lancefield sistemu grupa su ili polisaharidi (npr. grupe A, B, C, F i G) ili lipoteihoična kiselina (kao što je kod D grupe streptokoka i kod enterokoka). Ovi antigeni iz ćelijskog zida se mogu dobiti ekstrakcijom pomoću razblažene hipohlorne ili azotne kiseline, formamidom ili autoklaviranjem a određivanje grupa se izvodi metodom kapilarne precipitacije. Komercijalni kitovi za određivanje grupa streptokoka zasnovani su na enzimskoj ekstrakciji i koaglutinaciji, odnosno lateks aglutinaciji prilikom detekcije antigena. Međutim, neke streptokoke, kao što su streptokoke viridans grupe ne poseduju antigene na osnovu kojih mogu biti klasifikovane u grupe po Lancefeld-ovoj, dok neke druge kao što je *S. suis* često unakrsno reaguju sa specifičnim serumima za neke iz Lancefeld grupe, iako ne poseduju antigene ovih grupa.

2.2. Morfološke i kulturelne osobine vrste *S. suis*

Streptococcus suis je gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija, kokoidnog ili ovalnog oblika, koja se na preparatima može uočiti u vidu pojedinačnih ćelija, u parovima i kraćim lancima.

Streptococcus suis dobro raste na većini podloga na kojima rastu i ostale vrste iz roda *Streptococcus*. Obično se za izolaciju ove bakterije koriste podloge sa dodatkom seruma ili krvi. Podloge koja se najčešće koriste za izolaciju su: Kolumbija agar sa dodatkom krvi (Columbia blood agar, CBA), sa ili bez dodatka kolistina i nalidiksinske kiseline; triptoza soja agar (TSI agar) sa dodatkom 5% goveđeg seruma ili 5% ovčije defibrinisane krvi; srčano moždani infuzioni agar (BHI agar) sa dodatkom 5% ovčije defibrinisane krvi; Todd-Hewitt bujon.

Kolonije *S. suis* su male, obično 0,5-1 mm u prečniku, prozirne ili blede sive boje i obično blago sluzave. Na agaru sa dodatkom ovčije krvi svi sojevi *Streptococcus*

suis stvaraju usku zonu α hemolize, dok na agaru sa dodatkom konjske krvi stvaraju zonu β hemolize (Staats i sar., 1997).

2.3. Biohemijske karakteristike *S. suis*

Značajne biohemijske varijacije mogu se uočiti među serotipovima *S. suis*, ali značajne razlike postoje i u okviru istih serotipova ove bakterije (Hardie, 1984; Higgins i Gottschalk, 1990; Devries i sar., 1991).

Kilper-Balz i Schleifer (1987), pri prvom zvaničnom predstavljanju *S. suis* kao nove vrste streptokoka, iznose kako kulturelne, tako i biohemijske osobine ove bakterije. Prema ovim autorima *S. suis* stvara kiselinu nakon fermentacije D-glukoze, sukroze, laktoze, maltoze, salicina, trehaloze i inulina. Varijabilni rezultati fermentacije mogu se očekivati sa rafinozom, melobiozom i u produkciji hijaluronidaze. Takođe, *S. suis* razlagaže L-arginin, eskulin, skrob i glikogen, a ne hidrolizuje hipurat i ne stvara acetoin. Ova bakterija proizvodi L-ornitin dekarboksilazu, N-acetilglukozaminidazu, α -galaktozidazu, β -glukuronidazu i leucin arilamidazu, varijabilna je u produkciji β -galaktozidaze, a ne proizvodi kiselu niti alkalnu fosfatazu. *Streptococcus suis* je otporna na optohin, ne raste pri temperaturama od 10°C i 45°C, ne raste u podlogama sa 6,5% NaCl i sa 0,04% teluritom, dok samo neki sojevi rastu u podlogama sa 40% žuči.

Veliki broj šema je do sada predlagan za biohemijsku identifikaciju *S. suis*. Prema Perch i sar. (1981) fermentacija inulina i glikogena, otpornost na optohin i arginin dihidrolaza test su dovoljni testovi za identifikaciju *S. suis*. Prema istim autorima, fermentacija rafinoze je dobar test za razlikovanje S grupe (serotip 1) od R grupe (serotip 2) *S. suis*. Od tada, više autora je izučavalo biohemijske karakteristike različitih kapsularnih tipova *S. suis*. Određeni broj autora smatra da je arginin dihidrolaza test i stvaranje kiseline iz inulina karakteristika na osnovu koje se *S. suis* razlikuje od ostalih članova roda *Streptococcus* (Hoffman i sar., 1985; Hommezi i sar., 1986; Silvonen i sar., 1988). Međutim, kasnijim istraživanjima je dokazano da ni test fermentacije rafinoze, a ni bilo koji drugi fermentacioni test, nisu dovoljni za

diferenciranje kapsularnih serotipova. Prema **Devriese i sar. (1991)**, svaka α hemolitična streptokoka, koja proizvodi amilazu, ali ne i acetoin, može se okarakterisati kao *S. suis*. Biohemijske karakteristike *S. suis* su toliko varijabilne da je identifikacija često teška i zahteva kombinaciju biohemijskih reakcija, a sama biohemijska identifikacija se na kraju mora potvrditi serotipizacijom (**Higgins i Gottschalk, 1990**). Isti autori predlažu četiri testa za približnu identifikaciju *S. suis*, i to: rast na agaru sa 6,5% NaCl (negativan za *S. suis*), negativan Voges-Proskauer (VP) test, stvaranje kiseline iz trehaloze i stvaranje kiseline iz salicina. Prema pomenutim autorima neki sojevi mogu biti trehaloza ili salicin negativni, ali veoma mali broj izolata je negativan u oba testa. Veoma pouzdanim za razlikovanje *S. suis* od *S. bovis* smatra se VP test. Takođe, ukoliko je potrebno, moguće je uključiti i dodatne biohemijske testove, koji uključuju arginin dihidrolaza test, stvaranje kiseline iz laktoze, sukroze i inulina u bujonu sa fenol crvenim, kao i negativne reakcije za manitol i sorbitol. Međutim, ipak se naglašava da je serotipizacija jedina metoda za sigurnu identifikaciju.

Gottschalk i sar. (1991) predlažu iste biohemijske parametre kao i **Higgins i sar (1990)**, odnosno, negativan VP test, negativan porast u bujonu sa 6,5% NaCl, i pozitivni trehaloza i salicin testovi, s tim što autori primećuju da, prema njihovim istraživanjima, oko 12,5% sojeva nije razlagalo trehalozu, dok oko 5% sojeva nije razlagalo salicin. Međutim, **Tarradas i sar. (1994)** dobijaju rezultate koji ukazuju na to da oko 20% sojeva ne razlaže salicin, pa smatraju da fermentacija salicina ne treba da bude indikator u identifikaciji *S. suis*. Isti autori predlažu nove biohemijske parametre u približnoj identifikaciji *S. suis*, i to: VP negativna reakcija, eskulin pozitivna reakcija, pozitivna fermentacija trehaloze i odsustvo rasta u bujonu sa 6,5% NaCl. Ovim biohemijskim testovima treba dodati i odsustvo β hemolize na krvnom agaru sa ovčijom krvi.

Približnu identifikaciju *S. suis* moguće je izvršiti i pomoću komercijalnih biohemijskih sistema. **Tarradas i sar. (1994)** su šemu preliminarne identifikacije predložili nakon intenzivnog ispitivanja biohemijskih osobina *S. suis* pomoću API 20 STREP identifikacionog sistema. Biohemijske osobine, koje su u ispitivanju ovih autora pokazali različiti sojevi *S. suis*, su prikazane u **tabeli 1**. Isti autori nalaze da su, sem pet

parametara, koje su predložili u identifikaciji *S. suis* (VP negativna reakcija, eskulin pozitivna reakcija, pozitivna fermentacija trehaloze, odsustvo rasta u bujonu sa 6,5% NaCl i α hemoliza), sve ostale biohemijske reakcije u velikoj meri varijabilne, kako među različitim serotipovima, tako i među istim serotipovima *S. suis*, i da značajno zavise od toga da li su sojevi ove bakterije poreklom od bolesnih ili zdravih životinja.

Tabela 1. Biohemijske osobine različitih sojeva *S. suis* urađene API 20 STREP identifikacionim sistemom (Tarradas i sar., 1994)

Test	% sojeva pozitivnih u testu		
	<i>S. suis</i> serotip		
	Ukupno	Bolesne	Zdrave
VP	3,4	9,1	2,1
HIP	13,6	18,2	12,5
ESC	100	100	100
PYRA	6,8	18,2	4,2
α GAL	32,2	81,8	20,8
β GUR	78	72,7	79,2
β GAL	11,9	-	14,6
PAL	27,1	-	33,3
LAP	88,1	81,8	89,6
ADH	33,9	27,3	35,4
RIB	25,4	-	31,3
ARA	6,8	-	8,3
MAN	15,3	18,2	14,6
SOR	16,9	-	20,8
LAC	91,5	81,8	93,8
TRE	100	100	100
INU	32,2	45,5	29,2
RAF	69,5	81,8	66,7
AMD	94,9	81,8	97,9
GLYG	89,8	72,7	93,8
β -HEM	-	-	-

Neke laboratorije predlažu upotrebu multi-testova, kao što su API Strep System test (bioMerieux), BBL Crystal Grampositive ID kit (Becton-Dickinson), Vitek GPI Card (bioMerieux) i Phoenix System PID (Becton-Dickinson) u dijagnostici *S. suis*. Međutim, smatra se da neki sojevi (i/ili serotipovi) mogu biti pogrešno identifikovani ovim komercijalnim kitovima (**Gottschalk et al., 1991; Michaud et al., 1996; Heidt et al., 2005; Tsai et al., 2005; Ip et al., 2007**).

U svom viđenju taksonomije streptokoka, **Facklam (2002)** smatra da su biohemijske osobine viridans streptokoka ponekada toliko slične onima koje daje *S. suis*, te je serotipizacija često jedina metoda kojom se *S. suis* može dijagnostikovati. Prema pomenutom autoru, fenotipske osobine *S. suis* su veoma slične osobinama *S. gordonii*, *S. sanguinis* i *S. parasanguinis*, pa svako izolovanje viridans streptokoka iz cerebrospinalne tečnosti ljudi može navesti na sumnju da je infekcija izazvana *S. suis*.

2.4. Serološki tipovi *S. suis*

Streptococcus suis je kapsulirana gram pozitivna koka koja poseduje antigene determinante ćelijskog zida slične onima koje poseduju streptokoke D grupe. Postoji konfuzija povodom terminologije Lancefield grupa R, S i T i povezanošću ovih grupa sa grupom D streptokoka i različitih *S. suis* serotipova, često označavanih kao kapsularni tipovi ili serovari (**Gottschalk i sar., 2007**). Prema **de Moor (1963)**, ova α hemolitična streptokoka je svrstana u grupe R, S, RS i T po Lancefield-ovoj. Međutim, **Elliot i sar. (1977)**, koji su izučavali kapsulirane streptokoke koje je opisao de Moor, shvataju da je on opisao ove streptokoke na osnovu antigena dobijenog ekstrakcijom iz kapsularnog polisaharida (CPS), a ne iz ćelijskog zida, i na osnovu toga sasvim pogrešno zaključio da lipoteihoična kiselina ovih sojeva reaguje sa D streptokoknim antiserumom. Konvencionalnom metodom ekstrakcije grupnih antigena streptokoka (zagrevanjem na temperaturi do 100°C u hlorovodoničnoj kiselini pri pH 2) može se izdvojiti dovoljna količina slobodne teihoične kiseline iz najvećeg broja streptokoka D grupe koja će precipitirati sa D antiserumom. Međutim, ovo nije slučaj *S. suis*, čime se mogu dobiti slabo pozitivni ili sumnjivi rezultati (**Gottschalk i sar., 1991**). **Gottschalk i sar. (2010)**

smatraju da terminologiju Lancefield grupa R, S, RS i T, koja se koristi u otkrivanju infekcija izazvanih *S. suis*, treba potpuno izbaciti pri opisivanju *S. suis*, kako bi se izbegla konfuzija.

Kao što je već rečeno, *S. suis* poseduje slične epitope ćelijskog zida kao streptokoke D. grupe. Međutim, *S. suis* nije genetski povezan sa D grupom streptokoka (Kilper-Balz i Schleifer 1987). Chatellier i sar. (1999) su ispitivanjem 16S rRNK kod referentnih sojeva *S. suis* ustanovili povezanost ali i jasnu genetsku razliku sa ostalim streptokokama i enterokokama, sa izuzetkom serotipova 32, 33 i 34, koji pokazuju jasnu različitost od ostalih serotipova *S. suis*. Komparativnom analizom genoma dokazano je da se *S. suis* filogenetski razlikuje od ostalih *Streptococcus* vrsta čiji su genomi do sada analizirani. Oko 40% od genoma *S. suis* čine jedinstvene sekvence u poređenju sa ostalim vrstama streptokoka (Holden i sar., 2009). Treba naglasiti da je do sada sekvencioniran genom samo *S. suis* serotipa 2 (Chen i sar., 2007; Holden i sar., 2009).

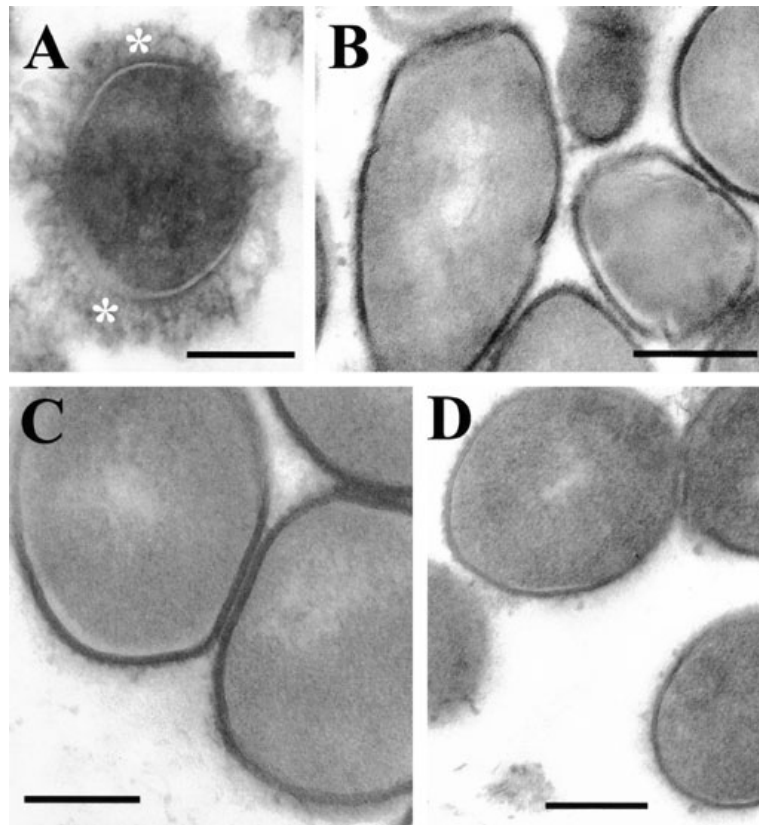
Do sada je opisano 35 serotipova (1-34 i ½) *S. suis* na osnovu sastava kapsularnog polisaharida (CPS) (Higgins i sar., 2006). Analizom šaperonin 60 genske sekvence utvrđeno je da serotipovi 32 i 34 pokazuju razliku u odnosu na ostale serotipove *S. suis* i moguće je da pripadaju nekoj drugoj vrsti streptokoka (Brousseau i sar., 2001). Sekvencioniranjem DNK i ispitivanjem bihemijskih profila, Hill i sar. (2005) su utvrdili da se ova dva serotipa podudaraju sa *Streptococcus orisratti*, streptokokom koja se često može izolovati sa zuba pacova. Broj izolata, koji se ne može tipizirati, je relativno mali (Higgins i Gottschalk, 2000). Prema navedenim autorima, ovakvi izolati se javljaju u sporadičnim slučajevima bolesti, te verovatno u budućnosti neće biti opisivanja još nekog serotipa *S. suis*.

Pošto najveći broj izolata, koji se može tipizirati, pripada kapsularnim tipovima od 1 do 8, preporučuje se da dijagnostičke laboratorije koriste samo antiserume koji odgovaraju ovim serotipovima, a da one sojeve, koji se ovim antiserumima ne mogu tipizirati, šalju u referentne laboratorije (Higgins i Gottschalk, 2005).

Isolacija i identifikacija *S. suis* iz kliconoša je mnogo komplikovanija (Gottschalk i sar., 2007). Razlog ovome je što najveći broj životinja nosi *S. suis* u

tonzilama, a veći broj serotipova i netipizirajućih sojeva ove bakterije može biti prisutan u jednoj populaciji svinja, pa čak i u istoj životinji (Marois i sar., 2007). U slučajevima nemogućnosti serološke tipizacije sojeva *S. suis*, identifikaciju je moguće obaviti upotrebom *S. suis* specifičnih PCR testova (Okwumabua et al., 2003).

Do sada nije opisan serološki test, pomoću koga bi se izvršila dijagnoza infekcije koju izaziva *S. suis* (Higgins i Gottschalk, 2005). Stoga, serotipizacija, na osnovu ekspresije kapsule (Slika 2), ostaje standardna metoda u dijagnostici oboljenja izazvanih *S. suis* (Higgins i Gottschalk, 1990; Gottschalk i sar., 2010).



Slika 2. Neufeld metoda (Quellung reakcija, ekspresija kapsule) u serotipizaciji

2.5. Prevalencija pojedinih serotipova *S. suis*

Nakon inicijalnih izveštaja, koje su objavili **Jansen i Van Dorssen (1951)** u Holandiji i **Field i sar. (1954)** u Engleskoj, *S. suis* je identifikovan u svim zemljama gde je industrija svinjskog mesa važan deo ekonomije, i od tada ovaj mikroorganizam se vezuje za različite infekcije i oboljenja životinja i ljudi.

Najveći broj izolata *S. suis* iz obolelih svinja pripada ograničenom broju serotipova, i to serotipovima od 1 do 8 (**Higgins i Gottschalk, 2001**). Iako je serotip 2 *S. suis* dominantan u većini zemalja, prisustvo serotipova zavisi od geografske lokacije. U Kanadi je prisustvo serotipa 2 *S. suis* relativno nisko i manje je od 25% (**Higgins i Gottschalk, 2001**). Ovakav nalaz se prilično razlikuje od nalaza dobijenih u Evropskim zemljama (Francuska, Italija, Španija), gde je serotip 2 najčešći izolovani serotip (**Berthelot-Herault i sar. 2000; Wisselink i sar. 2000**). Zbog toga se može pretpostaviti da se Evropski i Severeno Američki sojevi serotipa 2 *S. suis* razlikuju u virulentnosti (**Gottschalk i Segura 2000**). **Kataoka i sar. (1993)** takođe navode da je serotip 2 *S. suis* u Japanu prisutan u oko 28% slučajeva.

Neki drugi serotipovi *S. suis*, koji se ređe izoluju, takođe mogu da dovedu do ozbiljnih infekcija. U Belgiji, Holandiji i Nemačkoj serotip 9 *S. suis* se često može izolovati kod svinja (**Wisselink i sar. 2000**), a često se povezuje sa pojavama meningitisa, septikemije i pneumonije tovljenika (**Orr i sar., 1989; Gogolewski i sar., 1990**). U Velikoj Britaniji serotip 14 se često može izolovati kod prasadi sa kliničko-patološkim nalazima sličnim onima koje izaziva serotip 2 *S. suis* (**Heath i Hunt, 2001**).

Broj izolata koji se ne mogu tipizirati je relativno mali (**Higgins i Gottschalk, 2001**). Najčešće se ovakvi izolati mogu naći kod sporadičnih slučajeva oboljenja. Serotip 2 se može naći i kod klinički zdravih svinja, ali je njegovo prisustvo znatno manje nego kod obolelih. Prema nekim podacima, oko 40% klinički zdravih krmača u Kini je inficirano sojevima *S. suis*, a od tog procenta 3% krmača je inficirano serotipom 2 *S. suis*. **Clifton-Hadley i sar. (1984)** nalaze nisku prevalenciju *S. suis* kod svinja u Velikoj Britaniji. Slične rezultate o niskoj prevalenciji *S. suis* u populaciji svinja dobijaju i **Brisebois i sar (1990)** i **Monter Flores i sar. (1993)**. Međutim, prevalencija

specifičnog serotipa se obično smatrala niskom zbog nedostatka osetljivih metoda izolacije koje su postojale u to vreme.

Hogg i sar. (1996) otkrivaju da je prevalencija serotipova od 9 do 34 veća u nazalnim i vaginalnim brisevima nego u tkivima uginulih životinja. U Italiji, prema **Principalli i sar. (2009)**, najveći broj *S. suis* pripada serotipu 2, a zatim slede serotip 9 i serotip 1. Pomenuti autori smatraju da se *S. suis* serotipovi 2 i 9 najčešće mogu naći kod obolelih svinja i pripadaju tzv. invazivnim sojevima. Prema **Martel i sar. (2001)** serotip 2 je najdominantniji u Belgiji, a zatim slede serotip 9 i serotip 7 *S. suis*. U Španiji kapsularni tip 9 je najučestaliji (67,4%), a zatim slede serotip 2 (14,8%), serotip 7 (6,0%) i serotip 8 (4,4%), dok svi ostali serotipovi čine manje od 3% izolata *S. suis* (**Vela i sar., 2003**). Najveći broj od serotipova 9, 7 i 2 je izolovano kod svinja uginulih od meningitisa, dok je iz pluća najčešće izolovan serotip 3. Ovi rezultati se poklapaju sa rezultatima brojnih autora (**Prieto i sar., 1993; Aarestrup i sar., 1998; Luque i sar., 1998; Berthelot-Herault i sar., 2000; Wisselink i sar., 2000; Allgaier i sar., 2001; Tarradas i sar., 2001**), prema kojima su kapsularni tipovi 2 i 9 najzastupljeniji u Evropskim zemljama. Međutim, u Španiji je zastupljenost serotipa 2 za 50% manja u odnosu na druge zemlje, dok je zastupljenost serotipa 9 u daleko većoj proporciji. **Blume i sar. (2009)** smatraju da je povećanje broja svinja, koje su inficirane *S. suis* serotipom 9 posledica veće rasprostranjenosti klona od koga su serotipovi nastali (ST61 kompleks), i da uključivanje drugih serotipova, sem serotipa 2, u izazivanju bolesti svinja može imati značajnog uticaja na svinjarstvo, pogotovo u zemljama u kojima je svinjarstvo najrazvijenija grana stočarstva. U Brazilu je dominantan serotip 2 *S. suis* (oko 58%), dok se često mogu izolovati i neki drugi serotipovi, pre svega serotipovi 3 i 7 (**Martinez i sar., 2003**). Treba pomenuti da jedna životinja može biti nosilac više serotipova *S. suis*. U jednoj studiji, 31% svinja je nosilo samo jedan serotip, 38% svinja dva ili tri serotipa, dok je oko 6% svinja bilo inficirano sa četiri ili više serotipova *S. suis* (**Monter Flores i sar., 1993**). Izolacija većeg broja serotipova je takođe moguća i kod uginulih životinja.

2.6. Otpornost *S. suis* u uslovima spoljašnje sredine

Otpornost *S. suis* na uslove sredine i mogućnost preživljavanja na različitim površinama, u različitim medijumima i pri raznim temperaturnim uslovima, ispitivana je samo u slučaju serotipa 2 *S. suis*.

Streptococcus suis je važan kontaminant fecesa, prašine, hrane i vode. U vodi, bakterija može da preživi 10 minuta na temperaturi od 60°C i oko dva časa na temperaturi od 50°C, dok u vodi na temperaturi od 4°C može da preživi od 7-14 dana. **Robertson i sar. (1991)** navode da se *S. suis* serotipovi 1 i 2 lako mogu izolovati iz posuda za hranjenje krmača i prasadi. U eksperimentalno inokulisanom fecesu, na temperaturi od 0°C bakterija može da preživi 104 dana, a na temperaturi od 9°C oko 10 dana, dok na temperaturi od 22-25°C *Streptococcus suis* živi do 8 dana. Dakle, u letnjim uslovima ili u uslovima u kojima se drže prasadi u tovu (22-25°C), patogen može da živi do 8 dana u fecesu, ali ako se nađe u prašini, mogućnost preživljavanja je samo 24 časa (**Clifton-Hadley i Enright, 1984**). U trupovima zaklanih životinja na temperaturi od 4°C *S. suis* može da preživi oko 6 nedelja (**Clifton-Hadley, 1986**).

U trulim leševima uginulih svinja *S. suis* može da preživi 6 nedelja na temperaturi od 4°C i 12 dana na temperaturi od 22-25°C, što čini leševe svinja izvorom infekcije, koja se može širiti putem ptica, pacova, miševa, mačaka ili pasa (**Clifton-Hadley i sar., 1986**).

Dezinfekciona sredstva i sredstva za čišćenje, koja se koriste na farmama svinja, vrlo lako ubijaju serotip 2 *S. suis* za manje od jednog minuta, čak i u manjim koncentracijama nego što preporučuju proizvođači (**Clifton-Hadley i Enright, 1984**). Prisustvo organskog materijala štiti bakteriju od uticaja hemijskih sredstava i zbog toga, prema pomenutim autorima, uklanjanje površinskog otpada spada u veoma važan deo dezinfekcione procedure. Ovi autori smatraju da serotip 2 *S. suis* može da preživi i do 2 časa na temperaturi od 50°C, ali samo 10 minuta na temperaturi od 60°C. Stoga se topla voda može koristiti za pranje obora, ali se ona veoma brzo ohladi na površinama do ispod 50°C, te je značaj tople vode više u smanjenju brojnosti mikroorganizama i ispiranju zagađenih površina.

Dee i Corey (1993) su izvršili detaljna istraživanja o mogućnosti preživljavanja *S. suis* na različitim površinama na farmama, opremi, mehaničkim vektorima (**Tabela 2**) i sredinama sa organskim materijama (**Tabela 3**). Osim ovoga, ovi autori su ocenili uticaj temperature na *S. suis*, kao i moguću upotrebu dezinficijensa. *Streptococcus suis* se najduže može detektovati na gumenim i plastičnim površinama, naročito ako su zaprljane fecesom i drugim organskim materijama, kao i na sobnoj temperaturi. Vreme preživljavanja na prljavim čizmama je preko 48 časova, na prljavom plastičnom podu preko 24 časa, dok na čistom plastičnom podu vreme preživljavanja iznosi oko 20 časova. *Streptococcus suis* može da preživi do 4 časa na čistom betonu i oko 2 časa na čistim ili ofarbanim daskama. Prisustvo bilo kakvog spoljašnjeg izvora toplote, kao što su lampe za grejanje prasadi, smanjuje vijabilnost bakterije, bez obzira da li se ona nalazi na prljavoj ili čistoj površini. Ispitivanje vijabilnosti u medijumima pokazalo je da na temperaturi od 20°C *S. suis* živi preko 10 dana u krvi svinja, urinu, spermi ili moždanom tkivu, a do 7 dana u Amies transportnom medijumu. U vakcinama, koje sadrže aluminijum hidroksid, ova streptokoka može da živi i do 4 dana na temperaturi od 4°C, dok na istoj temperaturi u uljanim vakcinama preživljava samo do 24 časa. *Streptococcus suis* veoma lako ubija voda temperature veće od 55°C, kao i dvostruko zamrzavanje i otapanje. Međutim, bakterija veoma dobro preživljava zamrzavanje i preko 10 dana. Takođe, prevozna sredstva mogu prenositi bakteriju na relativno kratkim udaljenostima, a smatra se i da igle za vađenje krvi lako mogu da prenose *S. suis*. Od pet tuba za vađenje krvi, u četiri je nađen patogen kada je krv vađena istom iglom, iako je igla pre svake nove upotrebe tri puta isprana fiziološkim rastvorom.

Dee i Corey (1993) su u eksperimentu ispitivali uticaj dezinfekcionih sredstava na *S. suis* i to: fenola, kvaternarnih amonijumovih jedinjenja, hlorheksidina, formaldehida, 3% joda, 70% alkohola i 5% hipohlorita. Eksperiment je izveden u Miler-Hinton agaru slično disk-difuzionoj (Kirby Bauer) metodi osetljivosti na antibiotike. Jedino je u agaru sa alkoholom zabeležen rast što ukazuje da ovaj dezinficijens i nije tako dobro sredstvo za zaštitu od *S. suis*. Stoga, autori smatraju da feces i organske materije produžuju vijabilnost *S. suis*, verovatno jer ga štite od isušivanja i toplote. Oni ukazuju na to da farmeri treba temeljno da očiste sve površine od organskog otpada, a

zatim da izvrše detaljnu dezinfekciju, jer najčešće korišćeni dezinficijensi kao što su jod, hipohlorit i kvaternarna amonijumova jedinjenja nisu baš efikasna u prisustvu urina i organskog otpada. Takođe, navedeni autori smatraju da farmeri treba da koriste mašine za pranje pod pritiskom koje mogu da zagrevaju vodu, čime će se ujedno ubijati *S. suis*, a u isto vreme i skratiti vreme čišćenja obora.

Zbog toga što *S. suis* veoma dobro preživljava u urinu, krvi, spermi i mozgu svinja, neophodno je uginule životinje što pre eliminisati sa farme. Veterinari takođe moraju biti svesni mogućnosti transmisije *S. suis* preko igala ili špriceva. Naročito je važna promena igala pri vakcinaciji zbog relativno dugog preživljavanja *S. suis* u vakcinama.

Na kraju, **Dee i Corey (1993)** zaključuju da uzorci materijala koji su uzeti sa svinja, za koje se sumnja da su obolele, treba da se transportuju do mikrobiološke laboratorije u Amies transportnom medijumu zbog relativno dugog vremena preživljavanja.

Tabela 2. Preživljavanje *S. suis* na različitim površinama na farmama (+ detektovan rast; - nije detektovan rast, NT - nije testirano)

Površina	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h	48 h	72 h
Drvo (ofarbano)	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
Drvo + đubre	+	+	+	-	-	-	-	NT
Plastičan pod	+	+	+	+	+	-	-	-
Plastičan pod + đubre	+	+	+	+	+	+	-	-
Beton	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Beton + đubre	+	+	+	+	+	+	-	-
Metal	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Metal + đubre	+	+	-	-	-	-	-	NT
Guma + đubre	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 3. Preživljavanje *S. suis* u različitim materijalima (+ detektovan rast; - nije detektovan rast, NT - nije testirano)

Medijum (°C)	1 dan	2 dana	3 dana	4 dana	5 dana	6 dana	7 dana	8 dana	9 dana	10 dana
Uljana vakcina (4°C)	+	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Aluminijum hidroksid vakcina (4°C)	+	+	+	+	-	-	-	NT	NT	NT
Amies kultureta (20°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NT
Urin (20°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sperma (20°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Krv (20°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mozak (20°C)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ispitivanjem sirovog mesa svinja u super marketima radi utvrđivanja prisustva *S. suis*, **Cheung i sar. (2007)** su utvrdili da se meso lako može kontaminirati ovom bakterijom u procesu klanja, kao i pri njegovoj kasnijoj obradi. Samo prisustvo *S. suis* u sirovom mesu u marketima pokazuje da ovaj patogen relativno dugo može opstati na temperaturama na kojima se čuva meso.

2.7. Epizootiologija vrste *S. suis*

Streptococcus suis se često može izolovati iz tonzila zdravih životinja i zbog toga se smatra normalnim stanovnikom gornjeg respiratornog sistema svinja (**Devriese i sar., 1994**).

Serotip 2 *S. suis* se obično prenosi nazalno ili oralno i kolonizuje nepčane tonzile, kako kod klinički bolesnih, tako i kod klinički zdravih svinja (**Mwaniki i sar., 1994**). **Robertson i Blackmore (1989)** ukazuju da se serotip 2 *S. suis* može naći u nosnoj šupljini i reproduktivnim organima supkliničkih kliconoša. Nosioci serotip 2 *S. suis* mogu da inficiraju ostale svinje i najznačajniji su u širenju infekcije (**Higgins i sar., 1989**).

Transmisija infekcije među zapatima se obično dešava premeštanjem kliconoša u zdrave zapate. Uvođenje svinja (krmače, nazimice, nerastovi, prasad), koje nose virulentne sojeve *S. suis*, u zdrave zapate dovodi do pojave bolesti u njima. Krmače inficiraju svoju prasad tokom prašenja i verovatno putem respiratornih aerosola (**Cloutier i sar., 2003**). Nazimice i krmače nose *S. suis* u materici i vagini, dok se *S. suis* iz polnih organa nerastova nije mogao izolovati (**Robertson i Blackmore, 1989**). Navedeni autori su dokazali da se prasad inficiranih krmača mogu inficirati prilikom prašenja, pre prašenja ili neposredno posle prašenja. Takođe, konstatuju da se kod populacija, koje imaju visok stepen kliconoštva, mogu dobiti prasad koja nisu inficirana *S. suis* ako se u terminu prašenja obavi carski rez, i na taj način sprečava prolazak prasadi kroz porođajni kanal. **Amass i sar. (1996)** ne nalaze *S. suis* u orofaringealnim brisevima i pupčanoj krvi prasadi koja su oprášena carskim rezom. Autori smatraju da bi se ovaj metod, iako nepraktičan, mogao koristiti u dobijanju nukleus zapata koja su oslobođena od *S. suis*. Međutim, pomenuti autori istovremeno smatraju da bi se ovakvi zapati teško mogli održati duže vreme slobodnim od *S. suis*, zbog raznovrsnih načina prenošenja bakterije, i da će metoda dobijanja prasadi slobodne od *S. suis* naći verovatno samo eksperimentalnu primenu.

Mogollon i sar. (1991) smatraju da je prevalencija *S. suis* na farmama svinja veoma visoka i da se prasad inficiraju već u prvim danima života. Veliki broj autora ukazuje na činjenicu da se *S. suis* može izolovati od prasadi starih 1 dan i da do dana odbijanja sva prasad već nose neki od sojeva *S. suis* u svojim tonzilama.

Do sada nije uspeo ni jedan pokušaj da se eliminiše *S. suis* ranom medikacijom svinja (**Wiseman i sar., 1992**). **Amass i sar. (1997)** definitivno dokazuju da se *S. suis*

prenosi sa krmače na prasid tokom i neposredno posle prašenja. Ovi autori su u svojim istraživanjima upoređivali DNK sekvence *S. suis* serotip 5, soja koji je bio prisutan u vaginalnom iscetku, sa sojevima *S. suis* u usnoj šupljini prasidi iste krmače. Analizom DNK je utvrđeno da soj iz vaginalnog iscetka krmača genetski potpuno odgovara soju iz usne šupljine prasidi. Smatra se da skoro sva prasid nose neki od sojeva *S. suis*, ali da samo mali broj njih nosi soj koji je sposoban da izazove oboljenje posle odvajanja prasidi od krmače (**Torremorell i sar., 1998**). Autori zaključuju da je kolonizacija prasidi sojevima *S. suis* slična na većini farmi i da se dešava veoma rano nakon rođenja, tako da do momenta odbijanja prasidi većina njih već nosi sojeve bakterije u svojim tonzilama. Isti autori smatraju da je kolonizacija prasidi sojevima serotipa 2 *S. suis* manja od ukupne kolonizacije i da se kolonizacija virulentnim sojevima dešava tek posle 15 dana starosti. **Clifton-Hadley i sar. (1984)** naglašavaju da je najveći broj kliconoša u uzrastu od 4 do 10 nedelja starosti. *Streptococcus suis* može da perzistira u tonzilama kliconoša duže od jedne godine, čak i u prisustvu opsonizujućih antitela, ili čak i pri ishrani svinja hranom koja sadrži 300 mg/kg penicilina.

Horizontalna transmisija *S. suis* je veoma značajna, naročito u slučaju bolesnih svinja, koje izlučuju veliki broj bakterija u okolinu i time povećavaju transmisiju aerosolom ili direktnim kontaktom.

Cloutier i sar. (2003) su utvrdili da je kod svinja koje nose različite sojeve serotipova 2 i 5 *S. suis*, obično jedan od serotipova odgovoran za kliničke znake bolesti. **Martinez i sar. (2002)** su u ispitivanju genetskog diverziteta sojeva serotipa ½ *S. suis* pokazali da su sojevi ovog serotipa kod bolesnih životinja veoma genetski slični sojevima koje nose svinje bez kliničkih znakova bolesti. **Berthelot-Herault i sar. (2001)** su konstatovali mogućnost prenošenja putem aerosola bez direktnog kontakta sa svinjama. Istovremeno autori navode da svinje inficirane virulentnim sojevima serotipa 2 *S. suis* i karakterističnom kliničkom slikom mogu lako da inficiraju svinje koje se ne nalaze u istom oboru, kod kojih se posle određenog vremena razvijaju isti klinički simptomi.

Brisevi tonzila živih svinja pokazuju nivo kliconoštva koje varira od 0 do 100% (**Mwaniki i sar., 1994**), a izolacija *S. suis* iz tonzilarnih kripti u klanicama pokazuje gotovo 100% prisustvo ovog patogena kod svinja (**Clifton-Hadley i sar., 1986**). Prema **Elliot i sar. (1966)** krmače su verovatno najznačajniji izvor infekcije. Iako se prasadi mogu inficirati prilikom sisanja, najverovatnije je da se infekcija dešava pri mešanju ove prasadi sa već inficiranom prasadi iz drugih obora (**Clifton-Hadley i sar., 1986**). Stoga, **Clifton-Hadley i Alexander (1980)** smatraju da bi trebalo sprečiti unošenje kliconoša u zdrave populacije svinja. Iako je kliconoštvo važan faktor, ono ipak nije indikator kliničke pojave bolesti unutar zapata (**Brisebois i sar., 1990**). Čak i kad je prisustvo sojeva *S. suis* kod svinja 100%, klinički znaci oboljenja se retko javljaju na više od 5% inficiranih jedinki (**Clifton-Hadley, 1986**).

Kliconoštvo nije jedini izvor infekcije, jer je *S. suis* izolovan i kod SPF (specific pathogen free) jedinki i kod prasadi koja su oprášena carskim rezom (**Robertson i Blackmore, 1989**). Infekcije ovih životinja su verovatno posledica kontaminirane sredine, radnika na farmi i kontaminirane opreme. Kao i kod mnogih bakterijskih i virusnih infekcija, stres značajno utiče na pojavu oboljenja. Prepunjenost obora, slaba ventilacija, iznenadna promena vremena, mešanje, premeštanje, vakcinacija i primarne bolesti predstavljaju osnovu za pojavu stresa i predisponiraju infekciju svinja izazvanu serotipom 2 *S. suis* (**Sanford, 1989**). Patogen najčešće utiče na svinje u intenzivnoj proizvodnji, naročito u gusto naseljenoj populaciji svinja (**Clifton-Hadley, 1984**).

Vektori mogu imati značajnu ulogu u širenju infekcije koju izaziva *S. suis*. Kućna muva može da nosi *S. suis* od 2 do 5 dana i predstavlja izvor infekcije oko 4 dana, a njen značaj kao vektora je u tome što migrira među farmama svinja (**Enright i sar., 1987**). Miševi, koji su eksperimentalno inficirani oralno i nazalno serotipom 2 *S. suis*, uspeali su da inficiraju i druge miševe, a smatra se da mogu da inficiraju i svinje (**Williams i sar., 1988; Robertson i Blackmore, 1990**).

Značaj ostalih životinja kao rezervoara ili vektora *S. suis* još uvek nije utvrđen, mada **Sala i sar. (1989)** ukazuju na ulogu ljudi u prenošenju infekcije koju izaziva vrsta *S. suis*.

2.8. Epidemiologija infekcije koju izaziva *S. suis*

Epidemiologija infekcije koju izaziva *S. suis* je veoma dobro objašnjena. Smatra se da broj obolelih ljudi zavisi od njihovog kontakta sa neobrađenim svinjskim mesom ili od bliskog kontakta sa svinjama. Među najugroženijima i onima koji najčešće obolevaju su farmeri, radnici u klanicama, prevoznici svinja, inspektori na klanicama, mesari i veterinari (Walsh i sar., 1992; Huang i sar., 2005; Tang i sar., 2006). U Velikoj Britaniji i Francuskoj ova infekcija je na listu industrijskih bolesti stavljena 1983., odnosno 1995. godine. U Hong Kongu je 2005. godine infekcija, koju izaziva *S. suis* klasifikovana kao bolest koja se redovno prijavljuje (Amendment to quarantine and prevention of disease ordinance, 2005).

Manipulacija i kontakt sa obelelim svinjama svakako povećava rizik infekcije ljudi (Staats i sar., 1997; Higgins i Gottschalk, 2006). Međutim, smatra se da manifestacija bolesti kod svinja nije potrebna za infekciju ljudi koji sa svinjama dolaze u kontakt. Kao što je već napomenuto, zdrave svinje mogu biti kliconoše, te mogu biti i izvor infekcije. Zbog toga što se najveći broj pacijenata inficira u profesionalnom radu sa svinjama ili njihovim proizvodima, veće prisustvo infekcije kod odraslih muškaraca lako se može objasniti (Wertheim i sar., 2009). U Holandiji, zemlji sa najvećim brojem zabeleženih infekcija izazvanih vrstom *S. suis* kod ljudi, rizik od *S. suis* infekcije među klaničnim radnicima i farmerima se procenjuje na otprilike tri osobe na 100 000 ljudi, što je 1500 puta više nego kod osoba koje ne rade u svinjarskoj industriji. Obolevanje mesara se procenjuje na oko 1,2/100 000, a ovaj procenat je nešto veći u Velikoj Britaniji (Walsh i sar., 1992).

U Aziji stepen pojavljivanja infekcija izazvanih vrstom *S. suis* kod ljudi je daleko veći nego u zapadnim zemljama. U Hong Kongu taj odnos je 32/100 000 kod ljudi koji rade u svinjarskoj industriji, što je 350 puta više nego kod drugih ljudi (0,09/100 000) i 30 puta više nego u Holandiji. Veći stepen oboljenja ljudi, koji su profesionalno vezani za svinjarsku industriju, u Hong Kongu u poređenju sa Holandijom može se objasniti višom prevalencom *S. suis* kod svinja u Aziji, iako za ovakve tvrdnje još nema valjanih dokaza. S druge strane, razlika u stepenu pojave

obolevanja radnika u svinjarskoj industriji i ostale populacije u Hong Kongu (350 puta više u svinjarskoj industriji) i istog odnosa u Holandiji (1500 puta više u svinjarskoj industriji), može se objasniti činjenicom da u Azijskim zemljama daleko veći broj ljudi dolazi u kontakt sa svinjama i njihovim proizvodima zbog čega je i veći rizik od infekcije nego u zapadnim zemljama.

U Nemačkoj je utvrđeno da visoko rizične grupe (mesari, radnici u klanicama itd.) u 5,3% slučajeva nose serotip 2 *S. suis* u nazofarinksu, dok je kod ljudi, koji nemaju kontakt sa svinjama, taj rezultat negativan (**Strangmann i sar., 2002**). Ponovnim testiranjem istih osoba tri nedelje kasnije potvrđeno je prisustvo *S. suis* serotipa 2, što ukazuje na to da bakterija ostaje u tonzilama ljudi duže vreme kao i kod svinja, iako se rekolonizacija ovih ljudi nije mogla isključiti. I drugi autori potvrđuju da se *S. suis* može izolovati kod zdravih klaničnih radnika (**Sala i sar., 1989**). Smatra se da radnici koji vrše evisceraciju organa, odnosno oni koji su uključeni u uklanjanju grkljana i pluća iz zaklanih svinja, imaju veći rizik od *S. suis* infekcije nego ostali klanični radnici (**Arends i Zanen, 1988**). Skorija serološka ispitivanja u Sjedinjenim Američkim Državama, gde su do sada zabeležena samo dva slučaja bolesti koju izaziva *S. suis* (**Lee i sar., 2008; Willenburg i sar., 2006**), pokazala su da osobe, koje dolaze u kontakt sa svinjama, imaju više titre antitela protiv *S. suis* nego osobe koje ne dolaze u kontakt sa svinjama (**Smith i sar., 2008**). Slični rezultati dobijeni su ranije i na Novom Zelandu (**Robertson i sar., 1989**).

Svi dosad dobijeni rezultati pokazuju da je infekcija koju izaziva *S. suis* kod ljudi češća nego što se trenutno misli, a izlaganje ljudi zdravim ili bolesnim svinjama dovodi do kolonizacije gornjeg respiratornog sistema, najčešće bez ikakvih zdravstvenih posledica. Samo u nekim slučajevima dolazi do razvoja kliničkih znakova bolesti.

Smatra se da alkoholizam ili splenektomija mogu biti predisponirajući faktor u razvoju ozbiljnih bolesti izazvanih *S. suis* (**Auer i sar., 2001; Tambzah i sar., 2001; Kopic i sar., 2002; Lopreto i sar., 2005; Watkins i sar., 2005**). Tako, fatalan ishod infekcija izazvanih vrstom *S. suis* posle splenektomije je skoro 80%. Stoga se sugeriše da ljudi koji nemaju slezinu, ne bi trebali da rade u klanicama, mesarama ili farmama

svinja (**Gallagher i sar., 2001**). Studija na Tajlandu je pokazala da 75% obolelih pacijenata konzumira ili je konzumiralo veće količine alkoholnih pića (**Suankratay i sar., 2004**). Osobe koje imaju reumatska oboljenja srca, oboljenja valvula srca ili ventrikularni septalni defekt su podložnije *S. suis* infektivnom endokarditisu (**Huang i sar., 2005**). Smatra se da, kao i kod *Streptococcus bovis*, postoji povezanost *S. suis* infekcije i karcinoma kolona (**Voutsadakis, 2006**). Predisponirajući faktori verovatno imaju značajnu ulogu u bolesti izazvanoj *S. suis*, ali njihova uloga nije esencijalna u razvoju bolesti. Mnogi izveštaji pokazuju da najveći broj obolelih pacijenata inficiranih *S. suis* nisu imali nikakve bolesti koje bi dovodile do imunosupresije (**Chang i sar., 2006; Bahloul i sar., 2008; Van De Beek i sar., 2008**).

Značajno je istaći da, kao i domaće svinje, i divlje svinje mogu biti rezervoari *S. suis* i izvor infekcije za lovce i lovokradice (**Grebe i sar., 1997; Halaby i sar., 2000; Rosenkranz i sar., 2003**). Prevalencija *S. suis* serotipa 2 kod divljih svinja (11%) je slična onoj kod domaćih svinja (14%) u Nemačkoj. Veliki broj bolničkih izveštaja pokazuje da se značajan procenat obolelih ne seća da je imao ikakav kontakt sa svinjama ili proizvodima od svinja. Postoji podatak da je jedan pacijent tvrdio da nije imao nikakv kontakt sa rizičnom grupom životinja (svinje), već je radio sa pilićima (**Hidalgo i sar., 2007**).

Ulazna vrata infekcije izazvane *S. suis* kod ljudi su najčešće male posekotine na koži, mada u nekim slučajevima posekotine se ne mogu ni ustanoviti. *S. suis* može da kolonizuje gastrointestinalni sistem, izazivajući dijareju i prodromalni sindrom (**Fongcom i sar., 2001**). Smatra se da je oralni put verovatno glavni način infekcije kod ljudi koji nemaju kontakt sa svinjama u Azijskim zemljama, kao što su Hong Kong, Tajland i Vijetnam, gde je konzumiranje sveže i/ili sirove svinjetine veoma uobičajeno (**Wangsomboonsiri i sar., 2008; Wertheim i sar., 2009**). Slučajevi oboljenja u ovim zemljama uključuju značajan broj domaćica, koje su se verovatno inficirale konzumacijom sirove svinjetine, kao i osoba koje nisu bile svesne da su imale kontakt sa svinjskim mesom (**Wangkaew i sar., 2006; Wertheim i sar., 2009**). Marketi na otvorenom, u kojima se svinje i svinjsko meso prodaju u izobilju, su veoma prisutni u Azijskim zemljama, tako da se indirektna infekcija ljudi ne može isključiti (**Wangkaew**

i sar., 2006). Direktnim kulturnim metodama dokazano je da je više od 6% uzoraka svinjskog mesa bilo pozitivno na prisustvo *S. suis* u marketima u Hong Kongu (**Ip i sar., 2007).**

Prisustvo bakterije može se ustanoviti ne samo u području tonzila, već i na drugim delovima zaklanih svinja kao što su vrat, glava, jezik, creva, kosti, rep, a koji se veoma često koriste u Azijskoj kuhinji. Iako se smatra da su čisto meso, tj. mišići, relativno slobodni od ovog patogena, utvrđeno je da se *S. suis* može izolovati iz čistog mesa čuvanog u hladnjacima. Korišćenjem osetljivijih metoda (najčešće PCR tehnike), utvrđeno je da je prevalencija kontaminiranog svinjskog mesa verovatno veća nego što se misli (**Cheung i sar., 2008).** Važno je pomenuti da ljudi, koji su jeli dobro skuvanu ili pečenu svinjetinu, nisu pokazali kliničke znake bolesti (**Lun i sar., 2007).** Do sada su zabeležena samo dva slučaja u kojima se bolest razvila kod ljudi koji su jeli kuvanu hranu i to u slučaju infekcije odojčeta (**Vilaichone i sar., 2002)** i fatalne infekcije trudnice (**Wangsomboonsiri i sar., 2008).**

Iako postoje neke fenotipske razlike između humanih i svinjskih sojeva *S. suis* serotipa 2, većina studija dokazuje da su sojevi izolovani od ljudi fenotipski i genotipski slični onima izolovanim od svinja u istom geografskom području (**Berthelot-Herault i sar., 2002; Pedrolu i sar., 2003; Marois i sar., 2006; Yu i sar., 2006; Rehm i sar., 2007).** Dok je varijanta visoke molekularne mase EF proteina (EF*) obično povezana sa sojevima koji su patogeni za ljude, neke studije pokazuju da su MRP/EF profili ljudskih izolata, uopšteno gledajući, identični odgovarajućim svinjskim sojevima u istoj zemlji. Slično kao i kod svinjskih sojeva u Severnoj Americi, i sojevi izolovani od ljudi u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama su MRP, EF i suilizin negativni (**Chatellier i sar., 1999).**

Taradas i sar. (2001) su prijavili dva slučaja meningitisa kod mesara i jednog klaničnog radnika koji su bili u kontaktu sa mesom, poreklom sa tri farme svinja. Analizom serotipa 2 *S. suis* sojeva, dobijenih iz tonzila zdravih svinja sa ovih farmi, utvrđena je genotipska sličnost ali ne i identičnost sa sojevima obolelih radnika. Male razlike među izolatima verovatno oslikavaju adaptaciju bakterije na novog domaćina, ili

verovatnije nedostatak metode za otkrivanje ovih razlika. Virulentna svojstva sojeva izolovanih od svinja i kod ljudi su veoma slična (**Charland i sar., 2000; Halaby i sar., 2000; Lalonde i sar., 2000; Segura i sar., 2002**).

Infekcije ljudi koje izaziva *S. suis* su dugo smatrane sporadičnim, jer su imale nisku prevalenciju i samo su zahvatale ljude koji rade sa svinjama i njihovim proizvodima. Međutim, značajna epidemija 2005. godine u Kini, koja je zahvatila više od 200 ljudi sa stepenom mortaliteta od više od 20%, je promenila perspektivu i percepciju koju ovaj patogen predstavlja po ljudsko zdravlje. Od tada, opisan je veći broj infekcija izazvanih *S. suis*, koji se sada smatra značajnim patogenom.

2.9. Faktori virulencije *S. suis*

Streptococcus suis se karakteriše velikim brojem fenotipova koji poseduju ili ne poseduju kapsulu, odnosno imaju ili nemaju različite tipove površinskih ili sekretovanih proteina. Ove varijacije, u kombinaciji sa putem ulaska patogena i imunim statusom svinje ili čoveka, određuju potencijal virulencije određenog izolata.

Streptococcus suis je promenljiv patogen, koji poseduje veliki broj faktora virulencije, a koji u različitim kombinacijam učestvuju u invaziji organizma. Prisustvo ili odsustvo specifičnih faktora virulencije ne znači da se određeni soj može proglasiti virulentnim ili avirulentnim. Sekvencioniranje genoma ove bakterije značajno je proširilo listu faktora virulencije, od kojih su neki vezani za površinu bakterijske ćelije, a neki se aktivno sekretuju. Jedan od problema u identifikaciji faktora virulencije je nedostatak jasne definicije virulencije kod *S. suis* zbog postojanja različitih parametara za određivanje virulentih ili avirulentnih sojeva (**Gottschalk i sar., 1999**). Najveći broj istraživanja faktora virulencije vršeno je na serotipu 2 *S. suis*, koji se smatra visoko patogenim sojem i koji je do sada dovodio do najvećeg broja oboljenja kod svinja i ljudi (**Gottschalk i Segura, 2000**).

Od 2006. godine, smatra se da je jedini kritični faktor virulencije kapsularni polisaharid (**Charland et al., 1998; Smith et al., 1999**). Međutim, najveći broj

avirulentnih sojeva poseduje kapsulu, čime se nagoveštava da su i drugi faktori odgovorni za virulenciju patogena (**Gottschalk i Segura, 2000**). **Gottschalk i sar. (2007)** smatraju da, izuzimajući fibronektin i fibrinogen vezujući protein, koji su delimično uključeni u virulenciju, drugi faktori nisu esencijalni za virulenciju i mogu se naći i kod avirulentnih sojeva, ili njihova važnost nije mogla biti potvrđena kod „knockout” mutanata. Knockout mutanti za druge navodne faktore virulencije postoje, ali njihova virulencija još nije ispitana. Još jedan od mogućih faktora virulencije je serumski faktor (serum opacity factor, OFS), koji poseduje strukturalnu homologiju sa MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) familijom molekula, i smatra se kritičnim za virulenciju (**Baums et al., 2006**). Međutim, kao i kapsularni polisaharid, i serumski faktor se može naći i kod virulentnih i kod avirulentnih sojeva *S. suis*. Dakle, uloga faktora virulencije (osim kapsularnog polisaharida) u patogenezi *S. suis* i dalje ostaje nerazjašnjena i treba je dokazati.

Još jedan problem je razdvajanje faktora virulencije i markera virulencije (**Gottschalk i sar., 2007**). Uprkos nedostatku dokaza da neki od mogućih faktora virulencije imaju kritičnu ulogu u virulenciji, može se dokazati da ovi faktori služe kao markeri virulencije. Ovo je slučaj sa muramidaza oslobađajućim proteinom (muramidase - released protein, MRP) i ekstraćelijskim proteinskim faktorom (extracellular protein factor, EF) (**Vecht i sar., 1991**), kao i sa suilizinom, hemolizinom koga stvaraju neki sojevi *S. suis*.

Uloga muramidaza oslobađajućeg proteina i ekstraćelijskog faktora još uvek nije sasvim jasna. Međutim, suilizin je identifikovan kao toksičan faktor za različite tipove ćelija. Iako mutanti, kojima nedostaju MRP, EF ili suilizin pokazuju virulenciju kao i izvorni roditeljski soj (**Smith i sar., 1996**), utvrđeno je da postoji korelacija između prisustva ovih proteina i virulencije Evroazijskih sojeva. Ovome ide u prilog i činjenica da još nisu izolovani avirulentni sojevi koji poseduju MRP, EF ili suilizin. S druge strane, odsustvo ovih faktora ne znači da određeni soj nije virulentan. Potvrda ovome su neki virulentni Evropski i Severno Američki sojevi koji ne proizvode ove faktore. Postoji hipoteza da su Evroazijski virulentni sojevi serotipa 2, naročito oni koji ekspimiraju MRP, EF i suilizin, virulentniji nego Severno Američki virulentni sojevi

(Gottschalk i Segura, 2000). Ovo može objasniti visoko prisustvo serotipa 2 u infekcijama svinja i ljudi u evropskim i azijskim državama. Ova pretpostavka je i potvrđena u eksperimentalnim infekcijama serotipom 2 poreklom iz Evrope i Kanade (Berthelot-Herault i sar., 2005).

Uprkos činjenici da je znanje o faktorima virulencije i dalje veoma ograničeno, najznačajniji potencijalni faktori virulencije *S. suis* su: kapsularni polisaharid (capsular polysaccharide, CPS), muramidaza oslobađajući protein (muramidase - released protein, MRP), vanćelijski (ekstraćelijski) proteinski faktor (extracellular protein factor, EF), hemolitični i citotoksični suilizin (suilysin) i adhezini (Gottschalk i Segura, 2000). Međutim, prema Baums i sar. (2009) svi utvrđeni i mogući faktori virulencije i patogeneze mogu se podeliti na:

1. komponente ćelijskog zida i faktori vezani za njega, u koje spadaju kapsula, tj. kapsularni polisaharid (CPS), peptidoglikan, teihoična i lipoteihoična kiselina, pilusi i sortaze;
2. proteini sa C-terminalnim sortirajućim signalom vezanim za ćelijski zid (CWS proteini), u koje spadaju muramidaza oslobađajući protein (MRP), hijaluronidaza (HylA), SAO protein, serumski faktor neprozirnosti *S. suis* (SOF, OFS) i ciklična nukleotid fosfodiesteraza (SntA);
3. površinski vezani proteini bez CWS signala, u koje spadaju fibronektin i fibrinogen vezujući protein (FBPS), arginin deiminaza (ArcA) i enolaza;
4. Hemaglutinini;
5. Lipoproteini;
6. U faktore virulencije koje luči *S. suis*, ubrajaju se suilizin i drugi hemolizini, zatim, fosfolipaza C, ekstraćelijski faktor (EF), bakteriocinu slične inhibitorne supstance (bacteriocin - like inhibitory substance, BLIS) i imunoglobulin G vezujući protein.

Dodatak ovoj podeli je i biofilm, koji može da formira *S. suis*, a uloga mu je ista kao i kod ostalih biofilm produkujućih bakterija.

2.9.1. Kapsularni polisaharid (CPS)

Ispitivanjem serotipa 2 *S. suis* dokazano je da je kapsula važan faktor virulencije (Charland i sar., 1998; Smith i sar., 1999). Gottschalk i Segura (2000) smatraju da je CPS do sada jedini dokazani kritični faktor virulencije. Charland i sar. (1998) su u modelu infekcije dokazali da su nekapsulirani sojevi avirulentni za svinje. Međutim, sada se zna da i nekapsulirani *S. suis* sojevi takođe mogu invadirati tkivo domaćina, ali u manjem obimu. Ovo je dokazano izolacijom izogenih nekapsuliranih mutanata iz seroza, zglobova i centralnog nervnog sistema posle intranazalne infekcije (Smith i sar., 1999). Velike razlike u virulenciji su opisane i kod sojeva koji pripadaju istom serotipu (Vecht i sar., 1992), što ukazuje na činjenicu da kapsula *S. suis* nije dovoljna za punu virulenciju i da su i drugi faktori uključeni u patogenezu *S. suis*.

Serotipizacija *S. suis* bazirana je na razlici u sastavu i strukturi polisaharidne kapsule različitih sojeva. Smatra se da CPS postoji u 35 različitih varijanti, na osnovu kojih je i *S. suis* podeljen na 35 serotipova, pri čemu su najfrekventnije 2, 3, ½, 8 i 4 varijante CPS. Distribucija serotipova, tj. varijanti CPS-a varira geografski. Najučestaliji u Evropi je CPS 2, dok je u Americi njegova frekvencija znatno manja. Kapsula serotipova 1 i 2 sojeva *S. suis* je građena od N-acetil neuraminske kiseline (sijalinska kiselina) i četiri šećera: glukoze, galaktoze, N-acetil glukozamina i N-acetil galaktozamina (serotip 1), odnosno ramnoze (serotip 2) (Elliott i Tai, 1978). Smith i sar. (1999) su sekvencionisali cps2 lokus *S. suis* i identifikovali gene (geni cps E-K) koji kodiraju glukozil, galaktozil, N-acetilglukozaminil i ramnozil transferaze. Utvrđeno je da sojevi serotipova 1, 2, 14, 27 i ½ nose gene za sintezu sijalinske kiseline (Smith i sar., 2000).

Kod velikog broja bakterija, sijalinska kiselina učestvuje u patogenezi tako što interferira u aktivaciji alternativnog puta komplementa povećavajući afinitet C3b za faktor H. Ovim se sprečava formiranje C3 konvertaze C3bBb, čime se ograničava depozicija C3b na površini ćelije patogena (Marques i sar., 1992). Kod serotipa 2 *S. suis* sijalinska kiselina povećava adherenciju bakterije za makrofage (Segura i Gottschalk, 2002). Međutim adherencija za makrofage ne dovodi do fagocitoze.

Ovakav nalaz podržava teoriju modifikovanog Trojanskog konja, koju predlažu **Gottschalk i Segura (2000)**. Teorija modifikovanog trojanskog konja navodi da sojevi *S. suis*, uglavnom suilizin negativni sojevi, mogu da prođu krvno-moždanu barijeru (blood-brain barrier, BBB) preko adherencije za ćelije imunog sistema, pre svega monocite, koji funkcionišu kao sredstvo prolaska kroz BBB. Nasuprot divljim patogenim sojevima, izogeni nekapsulirani mutanti se lako eliminišu preko alveolarnih makrofaga (**Smith i sar., 1999**). Iste rezultate dobijaju **Segura i sar. (1998)** sa ćelijskom linijom J774 makrofaga. **Segura i sar. (2004)** nalaze da za razliku od kapsuliranog divljeg soja, nekapsulirani mutanti indukuju fosforilaciju fosfatidil inozitol-3 kinaza Akt i PKC kod J774 linije makrofaga, čime su utvrdili signalni put fagocitoze nekapsuliranih sojeva *S. suis*. Isti autori primećuju da se fagocitoza nekapsuliranih sojeva *S. suis* povećava kod tirozin fosfataze (SHP-1) deficijentnih makrofaga. Deficijencija SHP-1 je direktno povezana sa Akt fosforilacijom, čime autori dokazuju da kapsula aktivira SHP-1 i da je ova aktivacija sredstvo kojom kapsula posreduje u rezistenciji fagocitoze *S. suis*.

U svim dosadašnjim eksperimentima utvrđeno je da i nekapsulirani sojevi *S. suis*, uključujući i *cps2* mutante, pokazuju invazivnost, verovatno preko receptor posredovane endocitoze. Vrlo je moguće da različiti fenotipovi kapsuliranih i nekapsuliranih sojeva *S. suis* smanjuju kapsularnu ekspresiju da bi povećali adheziju za epitelne ćelije, a povećavaju ekspresiju kapsule, kako bi se odbranili od fagocitoze čim uđu u cirkulaciju (**Gottschalk i Segura, 2000**). **Wibawann i Lammler (1994)** utvrđuju povećanu debljinu kapsule tokom kultivacije *S. suis* u tečnim podlogama sa serumom. Povećana debljina kapsule se takođe može uočiti prilikom intraperitonealne kultivacije *S. suis* (**Quessy i sar., 1994; Charland i sar., 1996**).

Smith i sar. (2001) su identifikovali *in-vivo* indukovani gen *S. suis* koji kodira protein koji je visoko homolog (73% homologije) sa CpsY, regulatorom ekspresije kapsule *Streptococcus agalactiae*. Značajne dokaze o regulaciji ekspresije kapsule kod *S. suis* predstavljaju **Pan i sar. (2009)**, koji ispituju CovR regulator. Primećeno je da covR deficijentni mutant stvara deblju kapsulu sa dužim gradivnim lancima. Stoga je prihvaćeno da se *cps2C* gen i gen koji kodira CMP-N-acetil neuraminsku kiselinu

kontrolišu putem covR regulatora. Ovo je u skladu sa teorijom koju su predložili **Smith i sar. (1999)** da je cps2C gen odgovoran za dužinu lanaca i lučenje polisaharida za produkciju kapsule.

Odsustvo CPS je direktno povezano sa povećanom hidrofobnošću i povećanom fagocitozom *S. suis* od strane fagocita svinja. Međutim, i nekapsulirani *S. suis* sojevi takođe mogu invadirati tkivo domaćina, iako u manjem obimu. Ovo je dokazano izolacijom izogenih nekapsuliranih mutanata iz seroza, zglobova i centralnog nervnog sistema posle intranazalne infekcije (**Smith i sar., 1999**). Velike razlike u virulenciji su opisane i kod sojeva koji pripadaju istom serotipu (**Vecht i sar., 1992**), što ukazuje na činjenicu da kapsula *S. suis* nije dovoljna za punu virulenciju i da su i drugi faktori uključeni u patogenezu infekcije izazvane vrstom *S. suis*.

Smatra se da kapsula *S. suis* ima i imunomodulatornu funkciju. Komponente ćelijskog zida *S. suis* indukuju značajno oslobađanje proinflamatornih citokina TNF α , IL-1b, i IL-6 i hemokina IL-8 i MCP-1 (monocyte chemoattractant protein). Kapsula može da redukuje oslobađanje ovih citokina blokiranjem interakcije komponenti ćelijskog zida sa receptorima, pre svega TLR 2 (toll-like receptor 2). S druge strane, kapsula serotipa 2 *S. suis* sama može da indukuje oslobađanje MCP-1 makrofaga preko TLR-2 i MyD88 receptora (**Graveline i sar., 2007**). **Song i Patcher (2004)** pretpostavljaju da je indukcija MCP-1 mehanizam koji *S. suis* koristi da bi prošao krvno-moždanu barijeru (BBB, blood-brain barrier) jer su utvrdili da MCP-1 *in vitro* menja ekspresiju proteina koji stvaraju jaku vezu među moždanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama (BMEC).

Adhezija nekapsuliranih sojeva serotipa 2 *S. suis* za epitelne ćelije je relativno niska i uvek je ispod 5% (**Lalonde i sar., 2000**), ili prema drugim autorima oko 1%. Nasuprot kapsuliranim, nekapsulirani sojevi *S. suis*, uključujući i izogene cps2 mutante, pokazuju adheziju koja se kreće od 15% do 60% (**Benga i sar., 2004**). Zanimljivo je da ekspresija kapsule interferira sa adhezijom na moždane mikrovaskularne endotelne ćelije (BMEC) svinja (**Vanier i sar., 2004**), ali ne i na BMEC ljudi (**Charland i sar., 2000**). Stoga, **Vanier i sar. (2004)** smatraju da BMEC svinja, ali ne i BMEC ljudi, vrše

ekspresiju receptora koje prepoznaju nekapsulirani, ali ne i kapsulirani sojevi *S. suis*. Međutim, do danas takav receptor još nije identifikovan.

Kapsula *S. suis* je slabo imunogena materija. Serumi prebolele ili imunizovane prasadi imaju generalno veoma nizak titar specifičnih antitela protiv kapsularnih polisaharida (**Campo Sepulveda i sar., 1996; Wisselink i sar., 2001; Baums i sar., 2009**). **Baums i sar. (2009)** su uspeli da indukuju stvaranje veoma visokog titra IgG imunizacijom konjugovanim kapsularnim polisaharidom serotipa 2. Ovakvi serumi dovode do opsonizacije homologih serotipova 2 *S. suis* i ubijanje istih od strane svinjskih neutrofila. Međutim isti autori primećuju da ovakvi serumi ne vrše opsonizaciju heterologih serotipova 9 *S. suis*. Stoga, **Baums i sar. (2009)** zaključuju da bi kombinacija konjugovanih polisaharida različitih serotipova mogla da dovede do zaštite svinja protiv infekcije izazvane vrstom *S. suis*, slično imunoprofilaksi pneumokoknih infekcija kod ljudi.

2.9.2. Peptidoglikan

U ćelijskom zidu gram pozitivnih bakterija vlakna glikana su građena od β -1-4 N-acetil glikozamina i N-acetil neuraminske kiseline, koji su međusobno povezani kratkim peptidnim vezama (**Vollmer i sar., 2008**).

Fittipaldi i sar. (2008) su istraživali muropeptide *S. suis* pomoću dve eksperimentalne tehnike. Prema ovim autorima muropeptidi *S. suis* imaju uglavnom D-izoglutamin na poziciji 2 i L-lizin na poziciji 3 u peptidnom stablu. Za razliku od većine ostalih gram pozitivnih bakterija, peptidoglikan *S. suis* nema interpeptidne mostove. Tehnikom veoma osetljive Fourier masene spektrometrije, navedeni autori su uspeli da detektuju N-deacetyl muropeptide u veoma niskim količinama, ispod 1%, kod *S. suis*. Peptidoglikan polisaharid deacetilaza (Pgda) *S. suis* pokazuje homologiju sa Pgda *Streptococcus pneumoniae*. Modifikacija peptidoglikana procesom deacetilacije ima za rezultat otpornost na lizozim (**Vollmer, 2008**). *Streptococcus suis* je veoma osetljiv na

dejstvo lizozima *in vitro*, što se dovodi u vezu sa niskim sadržajem N-deacetil muropeptida.

Streptococcus suis PgdA mutant pokazuje slabiju virulenciju u eksperimentalnim infekcijama svinja. Ovo smanjenje virulencije je vezano za brzo opadanje broja bakterija u cirkulaciji. Saglasno ovome, primećeno je da neutrofili veoma brzo ubijaju PgdA deficijentne mutante za razliku od divljih sojeva *S. suis*. Takođe, eksperimentalnom infekcijom miševa utvrđena je smanjena produkcija citokina, pre svega IFN- γ i IL-6 kod PgdA deficijentnih mutanata za razliku od infekcije divljim sojem (Fittipaldi i sar., 2008a).

Komponente ćelijskog zida *S. suis* pogoršavaju inflamatorni odgovor na infekciju jer indukuju značajno otpuštanje proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1b i IL-6) i hemokina (IL-8 i MCP-1) (Segura i sar., 2006). Produkcija ovih molekula, pre svega IL-6, IL-8 i MCP-1 je indukovana ne samo kod tkiva u zapaljenju, već i kod moždanih mikrovaskularnih endotelnih ćelija (BMEC) (Vadeboncoeur i sar., 2003). Produkcija hemokina od strane BMEC je jedna od presudnih inflamatornih reakcija koju indukuje *S. suis* pri invaziji moždanog tkiva, pri čemu u ovoj interakciji svakako važnu ulogu ima i peptidoglikan.

2.9.3. Teihoična (TA) i lipoteihoična kiselina (LTA)

Teihoična kiselina (TA) je sekundarni polimer α -glicerol fosfata, dok lipoteihoična kiselina (LTA) osim ovoga poseduje i glikolipidnu komponentu.

Osnovna struktura LTA *S. suis* je slična TA *Streptococcus pyogenes* sa određenim glikozilnim promenama u molekulu. Lipoteihoična i teihoična kiselina *S. suis* su ranije bile okarakterisane kao antigeni koje prepoznaje streptokokni antiserum grupe D (Elliot i sar., 1977). Gottschalk i sar. (2007) detaljno opisuju kako je ranije svrstavanje *S. suis* u Lancefield grupe R, S i T bilo veoma nepouzđano, jer je ekstrakcija antigena bila uglavnom iz kapsule, a ne iz ćelijskog zida.

Lipoteihoična i teihoična kiselina doprinose adherenciji patogenih streptokoka i stafilokoka na ciljane ćelije. Kod *S. suis*, adhezija na BMEC svinja, koje su deo krvno-moždane barijere, se smanjuje ako se na ove ćelije pre infekcije deluje sa LTA, što ukazuje da je LTA delimično uključena u adhezivna svojstva *S. suis* (Vanier i sar., 2007). U interakciji sa svinjskim BMEC *S. suis* vrši ekspresiju DltA, enzima koji katalizuje D-alanilaciju LTA (Fittipaldi i sar., 2007, 2008b). Ova modifikacija LTA je kritična u rezistenciji *S. suis* na katjonske antimikrobne peptide, verovatno preko redukcije negativnog naboja membrane. Primećeno je da neutrofilu veoma efikasno ubijaju *S. suis* DltA deficijentne mutante, ali ne i divlje sojeve *S. suis* u eksperimentima na CD1 miševima (Fittipaldi i sar., 2008b).

2.9.4. Pilusi

Formiranje pilusa je detektovano kod brojnih gram pozitivnih bakterija uključujući i streptokokne vrste *S. pyogenes*, *S. agalactiae* i *S. pneumoniae* (Telford i sar., 2006). Kod ovih streptokoka, geni koji kodiraju stvaranje pilusa, se nalaze na delovima DNK koji kodiraju patogene faktore. Kod *S. pneumoniae*, dokazano je da pilusi imaju važnu ulogu u adheziji na epitelne ćelije pluća i virulenciju, što je demonstrirano u eksperimentu intranazalne infekcije miševa (Barocchi i sar., 2006).

Ultraspektroskopna ispitivanja *S. suis* pokazuju izraštaje na površini ćelije, dužine oko 250 nm i širine oko 2 nm, a koji liče na piluse gram pozitivnih patogenih bakterija (Jacques i sar., 1990). Sekvenciona analiza dva soja serotip 2 *S. suis* pokazala je prisustvo delimične homologije sa delom DNK *S. agalactiae*, koji kodira piluse (PI-2b), a koja uključuje dva gena koji kodiraju glavnu i pomoćnu subjedinicu pilina označenu kao srtF (Takamatsu i sar., 2009). Prvi gen (ssu0424 ili sipF) iz serije gena koji kodiraju *S. suis* verziju PI-2b, kodira signalnu peptidazu čija se ekspresija vrši u interakciji *S. suis* sa svinjskim BMEC (Fittipaldi i sar., 2007). Neki sojevi *S. suis* imaju mutacije u pilusnoj grupi gena, stoga ovi sojevi ne vrše ekspresiju funkcionalnih pilusnih struktura. Takamatsu i sar. (2009) opisuju i pilusnu grupu gena srtBCD koja ima strukturalnu homologiju sa rlrA genima pneumokoka. Ova grupa gena ne poseduje

gen koji kodira protein koji je homolog RlrA proteinu, ali poseduje gene koji kodiraju proteinske subjedinice pilusa.

Buduća istraživanja tek bi trebala da razjasne da li proizvodi gena PI-2b *S. suis* dovode do formacije pilusa i da li su ovi pilusi značajni za interakciju u patogenezi *S. suis*.

2.9.5. Sortaze

Sortaze su transpeptidaze koje sekretovane proteine vezuju kovalentno za ćelijski zid preko C-terminalnog sortirajućeg signala (cell wall sorting signal, CWS) proteina. Serotip 2 *S. suis* poseduje od 2 do 6 gena (srtA-F) koji kodiraju sortaze, što je veliki broj za jednu streptokoku (**Osaki i sar., 2002; Wang i sar., 2009**). Gen SrtA je detektovan kod 28 različitih serotipova *S. suis* što može ukazati da verovatno svi serotipovi poseduju ovaj gen. Ovaj gen poseduje značajne alelne varijacije, za koje se smatra da su nastale evolucionom divergencijom (**Osaki i sar., 2003**). Geni SrtA serotipa 2 *S. suis* pokazuju značajnu homologiju (65%) sa srtA genom *Streptococcus gordonii*.

Mutanti za gen SrtA serotipa 2 *S. suis* pokazuju slabiju adherenciju i invaziju prema BMEC, čime se ukazuje na ulogu CWS proteina u patogenezi *S. suis* (**Wang i sar., 2009**). Takođe, kod srtA mutanata smanjeno je vezivanje za plazma i ćelijski fibronektin i kolagen tipa 1. Međutim, vezivanje *S. suis* za ove proteine nije kompletno onemogućeno kod srtA mutanata, čime se nagoveštava i moguća uloga nekih drugih sortaza u vezivanju adhezina ili da su u adheziju uključeni i neki drugi a ne samo CWS proteini (**Vanier i sar., 2008**). U eksperimentalnom modelu sa CD1 miševima isti autori ukazuju da je izogeni srtA mutant pokazao istu virulenciju kao i divlji soj bakterije. Nasuprot ovome, intravenskom infekcijom prasadi srtA mutantom kineskog STSS soja utvrđena je smanjena virulencija. Upporedni eksperimenti sa divljim sojem, pokazuju da je srtA mutant slabije vrši kolonizaciju mozga i pluća (**Wang i sar., 2009**). Zbog

kontradiktornosti različitih eksperimenata, i dalje je teško proceniti značaj sortaze A u funkciji i patogenezi *S. suis*.

2.9.6. Muramidaza oslobađajući protein (MRP)

Razlike u virulenciji među sojevima serotipa 2 *S. suis* zavise od ekspresije MRP i ekstraćelijskog faktora (EF). Međutim, MRP nije esencijalni faktor virulencije serotipa 2 *S. suis*, što je i dokazano na izogenim MRP mutantima koji su virulentni koliko i divlji soj bakterije (Smith i sar., 1996). Protein MRP je molekulske mase od 136 kDa koji je kod *S. suis* otkriven posle delovanja muramidazom. Signalna sekvenca i CWS ovog proteina su odavno poznate (Smith i sar., 1992). Osim ovoga dokazano je i da je MRP supstrat sortaze A (Osaki i sar., 2002). Muramidaza oslobađajući protein sadrži C-terminalni kraj koji je bogat prolinom.

Funkcija MRP je i dalje nepoznata. Smith i sar. (1992) nisu dokazali da MRP može da vezuje fibronektin. Tan i sar. (2008) ukazuju da se ekspresija MRP vrši samo prilikom infekcije. Njihove podatke potvrđuju Beineke i sar. (2008), koji dokazuju ekspresiju MRP pri eksperimentalnoj infekciji vrstom *S. suis*, pri čemu je ovaj soj dovodio do gnojno-fibrinoznog meningitisa i granulomatoznog encefalitisa. Ekspresija ovog proteina je dokazana kod serotipova 1, 2, ½, 14 i 15.

Takođe su opisane i velike (MRP^{*}) i male (MRP^S) varijante ovog proteina koje se mogu naći kod gotovo svih serotipova *S. suis* (Wisselink i sar., 2000). Serotip 1 MRP^S EF+ soj izazvao je visok mortalitet kod prasadi 48 časova posle intranazalne infekcije. Izogeni MRP^S mutant tog soja nema smanjenu virulenciju u odnosu na divlji soj (Smith i sar., 1996). U centralnoj Evropi za oko 20% bolesti izazvanih *S. suis* je odgovoran soj MRP^{*} EF- serotip 9. (Wisselink i sar., 2000; Silva i sar., 2006). Za veći molekul MRP^{*} serotipa 9 *S. suis* odgovorna je intermedijarna ponavljajuća sekvenca u mrp genskom kodu (Silva i sar., 2006). Kod serotipa 7 *S. suis* varijacije u veličini mrp genskog koda su veoma izražene iako one nemaju uticaja na sam molekul MRP (Silva i sar., 2006). Određivanje mrp i epf genotipova kao dodatak serotipizaciji je rutina nekih

laboratorija koje se bave problemom *S. suis*. Ove analize omogućavaju identifikaciju dva najvažnija Evropska patotipa, MRP+ EF+ serotip 2 i MRP* EF-serotipa 9. Međutim interpretacija ovih rezultata i dalje ostaje nejasna usled nejasne funkcije MRP i EF proteina.

Iako je MRP marker virulencije kod serotipa 2 *S. suis*, nije sasvim jasno da li je njegova funkcija značajna i kod ostalih serotipova. Čak i sama varijanta MRP+ EF-serotipa 2 nije još upoređena sa ostalim mogućim fenotipovima istog serotipa (MRP+ EF+, MRP+ EF* and MRP- EF-) u eksperimentalnim infekcijama na prasadima, čime se otežava ocena virulentnosti svakog pojedinačnog fenotipa. **Wei i sar. (2009)** su u eksperimentalnoj infekciji miševa utvrdili da su MRP+ EF- serotip 2 sojevi *S. suis* manje virulentni nego MRP+ EF+ sojevi istog serotipa. Međutim, određivanje virulencije na miševima i dalje ostaje problematično jer se rezultati drastično razlikuju od onih dobijenih na prasadima (**Vecht i sar., 1997**). Pošto se i sam gen za MRP ne eksprimira kod nekih sojeva (npr. serotip 7) (tzv. tihi gen), može se raspravljati o tome da li treba raditi fenotipizaciju pre nego genotipizaciju u dijagnostičkim laboratorijama. Ipak, identifikacija dva najvažnija Evropska patotipa *S. suis* mrp+ epf+ cps2 i mrp* epf-cps9 kao i visoko virulentnog mrp^S epf+ cps1 patotipa se za sada smatra veoma pouzdanom metodom u određivanju virulentnosti. Međutim, ni genotipizacija, a ni fenotipizacija ovih markera ne dozvoljava klasifikaciju sojeva u avirulentne, jer ni MRP, a ni EF nisu esencijalni za virulenciju.

Protein MRP je visoko imunogen. Serum prebolele prasadi koja su bila inficirana ili MRP+ serotipom 2 ili MRP* serotipom 9 soja *S. suis* sadrži visoke nivoe specifičnih antitela (**Zhang i Lu, 2007**). Takođe, imunizacija MRP bakterin vakcinama dovela je do stvaranja specifičnih antitela u serumu prasadi (**Baums i sar., 2009**). Antiserum protiv rekombinantnog MRP proteina (rMRP) imao je u eksperimentima 90% baktericidnu aktivnost protiv serotipa 2 *S. suis* u ljudskoj krvi (**Geng i sar., 2008**). Međutim, **Baums i sar. (2009)** nisu uočili stvaranje opsonizirajućih antitela kod MRP bakterin imunizovane prasadi iako su ova prasad imala visok titar antitela protiv MRP proteina. Stoga se može zaključiti da MRP specifična antitela nisu zaštitna, iako se mogu smatrati dobrim markerom infekcije.

2.9.7. Hijaluronidaza (HylA)

Hijaluronska kiselina (HA) je glikozaminoglikan koji sačinjava najveći deo vanćelijskog matriksa kao i kapsule određenih bakterija. Najveći broj serotipova 3 i 7 *S. suis* razgrađuju HA tako što sekretuju hijaluronidazu molekulske mase 130 kDa (takođe zvanu i hijaluronat lijaza) (Allen i sar., 2004; King i sar., 2004). Prilikom sprovođenja kultivacije sojeva utvrđeno je da ovi sojevi osim što razgrađuju hijaluronsku kiselinu, fermentiraju i degradacione proizvode hijaluronske kiseline. Nasuprot serotipovima 3 i 7, aktivnost hijaluronidaze se ne može detektovati kod nekih drugih serotipova kao što su serotip 1, ½, 5, 6, 9, 10, 14 i 22 *S. suis*. Neki virulentni sojevi serotipa 2 i sojevi serotipova 1, ½, 5 i 14 stvaraju izmenjenu verziju enzima, koji ne poseduje hijaluronidaznu aktivnost.

Eksperimenti o ekspresiji hijaluronidaze na različitim sojevima *S. suis* pokazuju da hijaluronidazna aktivnost nije presudna za patogenezu meningitisa izazvanog *S. suis* i drugih bolesti koje ovaj uzročnik izaziva, jer je primećeno da i visoko virulentni sojevi *S. suis* ne pokazuju hijaluronidaznu aktivnost. S druge strane, ne može se isključiti da je ekspresija hijaluronidaze važan faktor u patogenezi bolesti (npr. pneumonija) koja je vezana za različite patotipove, pre svega serotip 7 kod koga je uočena visoka aktivnost hijaluronidaze (King i sar., 2004). Zanimljivi su podaci do kojih su došli Allen i sar. (2004) da prisustvo suilizina i hijaluronidazna aktivnost stoje u obrnutoj korelaciji.

Genetske analize HylA gena otkrivaju visok diverzitet na 5' kraju i dokaze da je rekombinacija uticala na varijaciju molekula HylA. Neki HylA aleli sadrže duplirajuće sekvence od po 2-4 bazna para za koje je u suštini poznato da su veoma nestabilne. Opravdano je verovati da ekspresija hijaluronidaze zavisi od stvaranja i isecanja ovih ponavljajućih sekvenci tokom infekcije (King i sar., 2004).

2.9.8. Površinski antigen 1 (Surface antigen one, SAO)

Li i sar. (2006) su otkrili površinski antigen 1 (SAO) kao imunogeni protein *S. suis* koji reaguje sa serumom prebolelih svinja. Navedeni autori su dokazali da je to

površinski protein korišćenjem metode imunoelektro mikroskopije. Protein sadrži C-terminalni signal za vezivanje za ćelijski zid (CWS) i brojne ponavljajuće sekvence na tom C-terminalnom kraju. Variranje broja ponavljajućih sekvenci dovodi do razlika u molekularnoj masi različitih SAO varijanti čak i unutar serotipa 2 sojeva *S. suis* (**Li i sar., 2006; Feng i sar., 2007**).

Funkcija SAO proteina je i dalje nepoznata. Imunizacija miševa i prasadi sa rekombinovanim SAO (rSAO) pokazuje zaštitni imunski odgovor protiv serotipa 2 sojeva *S. suis* koji vrše ekspresiju različitih varijanti SAO proteina (**Li i sar., 2007**). **Zhang i sar. (2009)** opisuju zaštitni imunitet protiv serotipova 2 i 7 posle imunizacije miševa sa rSAO. Međutim **Baums i sar. (2009)** su pokazali da vakcina koja sadrži SAO nije dovela do stvaranja opsonizujućih antitela niti do zaštite protiv serotipova 2 i 9 uprkos visokom titru IgG2 SAO specifičnih antitela. Različiti rezultati pri ispitivanju zaštitne uloge SAO proteina mogu se objasniti različitim eksperimentalnim uslovima u kojima je vakcina testirana.

2.9.9. Serumski faktor neprozirnosti (SOF, OFS)

Serumski faktor neprozirnosti (serum opacity factor, SOF) je otkriven 1938. godine kao supstanca koju proizvode streptokoke A grupe, a ime je dobila zbog činjenice da dovodi do pojave zamućenja, neprozirnosti seruma sisara. Ekspresiju ovog proteina vrši oko 50% kliničkih izolata *S. pyogenes*, koji je važan patogen ljudi a koji izaziva faringitis, tonzilitis, impetigo, nekrotizujući fascitis i toksični šok sindrom. Serumski faktor neprozirnosti je veliki protein mase oko 110 kDa i nalazi se pričvršćen za površinu ćelije. Kao i FBPS i SOF pripada MSCRAMM grupi proteina. **Courtney i sar. (2006)** su pokazali da je N-terminalni domen SOF odgovoran za kidanje lipoproteina visoke gustine (high density lipoprotein, HDL), što dovodi do nagmilavanja njihovih ostataka u serumu i slike zamućenja seruma. Mutanti SOF su pokazali slabiju virulentnost u eksperimentima na miševima. Pošto HDL ima antiinflamatornu ulogu, smatra se da SOF ima ulogu u patogenezi streptokoknih infekcija. Protein koji odgovara SOF proteinu opisan je i kod *S. suis* i nazvan OFS

(opacity factor of *S. suis*) (**Baums i sar., 2006**). Opisani OFS protein sasvim odgovara SOF proteinu streptokoka, kako po sličnosti u građi, tako i po funkciji.

Takamatsu i sar. (2008) su identifikovali tri genotipa OFS. Razlika između tipa 1 i tipa 2 OFS proteina je u broju C terminalnih ponavljajućih sekvenci, kojih tip 1 ima tri dok OFS tipa 2 broji 4 ponavljajuće sekvence. Osim ovih, isti autori primećuju različite varijante OFS proteina koje su nastale ili tačkastim mutacijama ili genetskim insercijama. Ove varijacije ne pokazuju detektabilnu aktivnost u serumu. U eksperimentalnoj intranazalnoj infekciji svinja OFS mutant sojem, veoma mali broj svinja je pokazao znake bolesti, za razliku od infekcije divljim sojem koji je doveo do mortaliteta od 70-90 % (**Baums i sar., 2006; Kock i sar., 2009**).

Baums i sar. (2006) su testirali živu OFS mutant vakcinu intranazalnom aplikacijom. Mortalitet kod vakcinisanih svinja je bio manji nego kod kontrolne grupe, međutim ova razlika nije bila značajna. Vakcina pripremljena od serotipa 2 OFS mutanta nije dovela do stvaranja zaštitnih antitela protiv infekcije serotipom 9 *S. suis* (**Kock i sar., 2009**). Imunizacioni eksperimenti pokazuju da je OFS protein imunogena supstanca. S druge strane, nije ustanovljen povećan titar antitela u serumu prebolelih svinja protiv OFS, što ukazuje na to da *S. suis* vrši ekspresiju ovog proteina samo u ograničenim količinama i u kratkom periodu infekcije.

Iako, aktivnost OFS proteina nije dokazana kao esencijalna u patogenezi *S. suis*, smatra da ima značajnu ulogu. Buduća istraživanja tek treba da rasvetle ulogu OFS u patogenezi *S. suis*, pre svega u modulaciji imunskog odgovora domaćina i preživljavanju *S. suis* u cirkulaciji.

2.9.10. Cilična nukleotid fosfodiesteraza (SntA)

Streptococcus suis sortaza A vezuje cikličnu nukleotid fosfodiesterazu (SntA) za ćelijski zid. Ekspresiju SntA (zvana i cpdB) su posmatrali **Li i sar. (2009)** pri uskraćivanju gvožđa u ishrani svinja. Do danas, funkcija SntA *S. suis* još nije poznata.

Smatra se da SntA možda ima ulogu u interakciji *S. suis* sa ćelijama inficiranog organizma tako što se vezuje za integrine na njihovoj površini (**Osaki i sar., 2002**).

2.9.11. Fibronektin i fibrinogen vezujući protein (FBPS)

De Greef i sar (2002) nalaze da je fibrinogen i fibronektin vezujući protein *S. suis* (fibrinogen/fibronectin binding protein, FBPS) vrlo verovatno jedan od mogućih faktora virulencije. Postoje dve forme fibronektina, i to: ćelijski fibronektin, koji je nerastvorljivi glikoproteinski dimer i služi za povezivanje u ekstraćelijskom matriksu i koga proizvode fibroblasti, hondrociti, endotelijalne ćelije, makrofagi i neke epitelne ćelije, i plazma fibronektin, koji je rastvorljivi disulfidni dimer a proizvode ga hepatociti i otpuštaju ga u slobodnoj formi u plazmu. Serotip 2 *S. suis* vezuje kako fibronektin plazme, tako i ćelijski fibronektin (**Esglas i sar., 2005**). Međutim, isti autori naglašavaju da, do sada nije dokazano da FBPS učestvuje u vezivanju *S. suis* za fibronektin ili fibrinogen.

De Greef i sar (2002) su ispitivali ulogu FBPS u patogenezi *S. suis* na eksperimentalno inficiranim prasadima. Podaci do kojih su došli jasno su ukazivali da je mutant koji ne poseduje gen za FBPS vršio kolonizaciju tonzila svinja u istom obimu kao i roditeljski soj. Ovaj podatak govori da FBPS nije uključen u kolonizaciju tonzila svinja. Međutim, autori navode da FBPS ima ulogu u kolonizaciji specifičnih organa jer je nađeno da je roditeljski divlji soj daleko više kolonizovao zglobove i CNS svinja. Kao dodatak ovome, daleko veći broj bakterija divljeg soja je reizolovano iz organa inficiranih svinja nego što je to slučaj sa mutant sojem, što govori o slabljenju mutant soja. Iako je u eksperimentu ovih autora broj svinja koje su inficirane bio relativno mali, dobijeni podaci jasno govore da je FBPS mutant manje virulentan nego divlji soj *S. suis*. **De Greef i sar (2002)** takođe su demonstrirali da je FBPS reagovao sa serumom prebolelih svinja, što jasno dokazuje da je FBPS imunogen kod svinja i da se ekspresija FBPS vrši samo u uslovima *in vivo*. **Tan i sar. (2008)** potvrđuju veću ekspresiju FBPS *in vivo* nego u izolovanim bakterijskim kulturama.

Geni koji kodiraju FBPS su identifikovani *in vivo* (Smith i sar., 2001). Upoređivanjem sekvenci FBPS utvđena je značajna homologija ovog proteina *S. suis* sa istim proteinima *S. gordonii* i *S. pyogenes* i iznosi oko 80%. De Greef i sar (2002) su utvrdili da je FBPS gen prisutan kod svih serotipova *S. suis*, osim serotipova 32 i 34, međutim svi sojevi ne vrše ekspresiju ovog gena.

Sama činjenica da je FBPS dobar imunogen i da je prisutan kod virulentnih sojeva *S. suis* može se smatrati pogodnim za pripremu vakcina.

2.9.12. Arginin deiminaza (Arginine deiminase, ArcA)

Arginin deiminaza (ArcA) pripada arginin deiminaza sistemu (ADS), enzimskom kataboličkom putu koji je poznat kod većine bakterija, pa i kod streptokoka. Arginin deiminaza katalizuje konverziju arginina u ornitin, ugljen dioksid i amonijak, čime se generiše energija u obliku ATP-a (Cunin i sar., 1986; Zuniga i sar., 2002). Winterhoff i sar. (2002) su identifikovali ADS i kod *S. suis* i ustanovili da je enzimski sistem ćelijskog zida i da se indukuje temperaturom. Arginin deiminazu kodiraju tri glavna gena, arcA, arcB i arcC koji se transkribuju sa AD operona. ArcA kodira arginin deiminazu (AD), arcB kodira ornitin karbamoiltransferazu (OCT), a arcC je gen za karbamat kinazu (CK) (Gruening i sar., 2006). Operon AD je vezan za arginin-ornitin antiporter (arcD), Xaa-His dipeptidazu (arcT) i endo-beta galaktozidazu (arcH). Prema Gruening i sar., (2006) ovaj operon je kontrolisan od strane nekoliko faktora, CcpA koji vrši represiju ugljenik katabolita, metaboličkom regulacijom fumarat i nitrat redukcijom (FNR) regulator proteinom (FlpS) i ArgR represorom koji pripada ArgR/AhrC familiji regulatora.

Moguća uloga ADS u streptokoknoj patogenezi je prvo uočena kod *S. pyogenes*, jer je dokazano da je ADS ove bakterije uključen u adheziju na epitelne ćelije i invaziju organizma (Degnan i sar., 2000). Kod *S. suis* je otkriveno da ekspresija ADS utiče značajno na mogućnost preživljavanja u kiselim delovima epitelnih ćelija. Takođe, uočeno je da mutanti koji ne poseduju gene za ADS ne stvaraju amonijak i ne mogu da

neutrališu nizak pH u uslovima *in vitro*, kao i da je onemogućen njihov opstanak u uslovima niskog pH i niske koncentracije kiseonika (**Benga i sar., 2004 ; Gruening i sar., 2006**).

Značaj ADS u patogenezi *S. suis* još nije potpuno jasan. Međutim, ekspresija ArcA na površini streptokoka, i eksperimenti sa AD mutantima ukazuju da ADS ima ulogu u preživljavanju *S. suis* tokom infekcije.

2.9.13. Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)

Enzim GAPDH pripada glikolitičkom putu, a vezan je za površinu ćelije patogenih streptokoka i uključen u interakciju streptokoka sa proteinima i ćelijama inficiranog organizma (**Pancholi i Fischetti, 1992**). Površinski vezana GAPDH je otkrivena kod *S. suis* kao protein koji vezuje albumin (**Quessy i sar., 1997**). **Brassard i sar. (2004)** kloniranjem i sekvencioniranjem GAPDH gena serotip 2 *S. suis* utvrđuju visoku homologiju sa homolognim genima ostalih streptokoka uključujući i *S. pneumoniae* i *S. pyogenes*. Isti autori nešto ranije otkrivaju da mutanti serotip 2 *S. suis* koji ne vrše ekspresiju GAPDH imaju smanjenu adheziju za goveđe i svinjske trahealne epitelne ćelije čime se nagoveštava da bi GAPDH mogao imati uticaja u adheziji na ćelije inficiranog organizma (**Brassard i sar., 2001**). Kao dodatak ovome, vezivanje plazminogena za površinu *S. suis* je smanjeno za 25% kod GAPDH deficijentnih mutanata što govori o ulozi GAPDH u vezivanju plazminogena (**Jobin i sar., 2004**). Eksperimenti sa kulturama ćelija poreklom od ljudi koje sekretuju plazminogen aktivatore pokazuju da se time može aktivirati plazminogen koji se vezuje za površinu *S. suis*, što pokazuje još jedan aspekt patogenog delovanja (**Jobin i sar., 2005**).

2.9.14. Enolaza

Kao i GDPH, enolaza nije samo citosolni enzim glikolitičkog puta, već i površinski vezan faktor različitih patogenih streptokoka i učestvuje u interakciji sa proteinima inficiranog organizma (**Pancholi i Fischetti, 1998**). Jedna od glavnih uloga

streptokokne površinske enolaze (SEN) je vezivanje za plazmin (-ogen). Smatra se da je aktivacija fibrinolitičke aktivnosti plazmina na površini bakterije jedan od važnih mehanizama u invaziji tkiva. **Esgleas i sar. (2008)** su otkrili SEN *S. suis* dok su tragali za fibronektin vezujućim proteinom (FBPS). Isti autori su utvrdili da SEN *S. suis* vezuje i plazminogen i fibronektin sa veoma visokim afinitetom. Vredi pomenuti da je SEN *S. suis* jedina do sada poznata enolaza koja vezuje fibronektin. Međutim, nepoznato je da li ova fibronektin vezujuća aktivnost zavisi od ekspresije SEN.

Enolaza *S. suis* je imunogeni protein jer je utvrđeno da serum prebolelih životinja kao i serum imunizovanih prasadi sadrži specifična antitela (**Yhang i Lu, 2007**). Međutim, imunizacijom miševa rekombinantnom enolazom dobijeni su kontradiktorni rezultati. Stoga, i dalje ostaje nerešeno pitanje da li se SEN imunizacijom mogu zaštititi svinje od invazivnih infekcija izazvanih *S. suis*.

2.9.15. Hemaglutinini

Streptococcus suis vrši ekspresiju adhezina sličnih lektinu koji vezuje disaharid Gal (α 1-4) Gal glikolipida triheksosilceramida (GbO₃) (**Hataja i sar., 1996**). Ova vezujuća aktivnost adhezina dovodi do hemaglutinacije, a sam adhezin pripada podtipovima P_N i P_O i ima molekulska masu od 18 kDa. N-acetilgalaktozamin inhibira vezivanje P_N, dok galaktoza inhibira vezivanje i P_N i P_O. Gal(α 1-4)Gal adhezin je prisutan kod sojeva različitih serotipova. Smatralo se da inkapsulacija remeti ulogu adhezina. Međutim, eksperimenti imunizacije na miševima sa pročišćenim Gal(α 1-4) adhezinom dovode do stvaranja opsonizujućih antitela (**Tikkanen i sar., 1996**).

Osim ovih, određeni broj sojeva vrši ekspresiju nekih drugih hemaglutinina koji vezuju sijalisanu-poli-N-acetilgalaktozamin komponentu površine eritrocita (**Liukkonen i sar., 1992**). Do sada nisu identifikovani geni za ove hemaglutinine.

2.9.16. Lipoproteini

Prolipoproteini sadrže konzervisani sekvencioni element u signalnoj sekvenci koja se zove „lipoboks” a koja dovodi do aktivisanja određenih reakcija. Prolipoprotein diacilgliceril transferaza (Lgt) prebacuje polovinu diacilglicerila sa lipidne membrane u konzervisani cistein lipoboks čime se uspostavlja tioetarska veza. Odmah zatim lipoprotein signalna peptidaza (Lsp) seče prolipoprotein u lipoboksu ostavljajući modifikovani cistein na N-terminalnom kraju (**Hutchings i sar., 2009**).

Moguće je da ovakav Lgt gen sadrže kineski sojevi *S. suis* koji su kod ljudi izazvali streptokokni toksični šok sindrom (STSS), ali do sada ovi geni nisu detaljno okarakterisani (**Chen i sar., 2007**). Takođe, **de Greeff i sar. (2003)** su identifikovali Lsp kod serotipa 2 *S. suis*. Analizom sekvenci ovog Lsp identifikovana su četiri njegova transmembranska regiona. Lsp “knock-out“ mutant virulentnog serotipa 2 *S. suis* pokazao je promene u metabolički obeleženim lipoproteinima koje su dovele do akumulacije lipoproteina u ćeliji. U eksperimentalnoj infekciji Lsp “knock-out“ mutant nije pokazao slabiju virulentnost u odnosu na parentalni soj. Ovakve rezultate je teško interpretirati, smatraju **de Greeff i sar (2003)** jer se neki lipoproteini mogu obraditi drugim putevima.

Jedan od tri identifikovana lipoproteina SsuiDRAFT 0103 koji su opisali **Aranda i sar. (2008)** dovodio je do značajne zaštite kod miševa. Drugi protektivni lipoprotein je identifikovan imunoproteomskom analizom proteina ćelijskog zida. Pretpostavlja se da je ovaj protein, nazvan SSU98 1094 deo ABC transportnog sistema (**Geng i sar., 2008**). Imunizacija pacova ovim lipoproteinom dovela je do stvaranja visokih titara opsonizujućih antitela. Serum konvalescentnih ljudi (ljudi koji su preboleli meningitis ili STSS) i prasadi kao i serum imunizovanih prasadi sadrži visok titar antitela protiv SSU98 1094 lipoproteina.

Na osnovu ove imunoproteomske analize serotipa 2 *S. suis*, predloženo je da SSU98 1094 kao i ostala dva površinska lipoproteina SSU98 0197 i SSU1664 budu potencijalni antigeni u vakcinama i mogući ciljni antigeni koji bi se koristili za dijagnostiku infekcija izazvanih *S. suis*.

2.9.17. Suilizin (Hemolizin)

Streptococcus suis proizvodi suilizin, toksin koji pripada tiol aktivisanim hemolizinima (**Jacobs i sar, 1994**). Suilizin je holesterol zavistan citotoksin (CDC) čiju ekspresiju vrše mnogi virulentni sojevi *S. suis* i jedini je do sada poznati CDC hemolizin koji se sekretuje. Suilizin pripada familiji toksina koji su antigenski slični holesterol vezujućim toksinima. Tiol aktivisani toksini u koje se ubraja i suilizin gube svoju aktivnost usled oksidacije ali čim se redukuju veoma brzo im se vraća aktivnost. Suilizin dovodi do stvaranja transmembranskih pora veličine oko 7 nm u prečniku na ciljnim ćelijama. Sličan mehanizam delovanja imaju i ostali tiol aktivisani hemolizini, kao što je streptolizin O, ali se sličan mehanizam može ustanoviti i kod hemolizina drugih bakterija kao što je *E.coli* ili stafilokoknog toksina. Primećeno je da suilizin *S. suis* poseduje takozvani „multihit“ litički sistem jer je potrebno više od jednog molekula suilizina da bi se lizirao eritrocit, jer je ustanovljen umanjen intenzitet hemolize sa povećanjem koncentracije eritrocita (**Gottschalk i sar., 1995**).

Kao dodatak činjenici da se ubraja u grupu tiol aktivisanih toksina je i sličnost N-terminalne amino sekvence suilizina sa istom sekvencom perfringolizina, streptolizina, listeriolizina, alveolizina i pneumolizina. Zanimljivo je da je pozicija izoleucina na mestu 6, leucina na mestu 13 i tirozina na mestu 15 u N-terminalnoj amino sekvenci suilizina visoko konzervirana, tj. nepromenljiva, što ukazuje na ulogu ovih aminokiselina u značajnim funkcijama kao što su prepoznavanje receptora i litička aktivnost.

Sekvenciranjem gena koji kodiraju suilizin otkrivena je visoka sličnost sa pneumolizinom (52% homologije), toksinom koji proizvodi *Streptococcus pneumoniae* (**Segers i sar., 1998**), kao i sa nekim drugim toksinima kao što su streptolizin O i listeriolizin. Takođe, njegova molekulska masa upravo odgovara molekulskoj masi tiol aktivisanih toksina koja se kreće od 52 do 60 kDa. Molekulska masa toksina zavisi od soja *S. suis*. **Gottschalk i sar (1995)** su u svom istraživanju ustanovili da je suilizin serotipa 2 *S. suis* molekulske mase od 64 kDa. Međutim **Jacobs i sar (1994)** su na serotipovima 1 i 7 *S. suis* ustanovili molekulsku masu suilizina od 54 kDa.

Prisustvo holestorola u membranama ćelija izgleda da je kritična determinanta koja određuje prijemčivost ćelija na uticaj sulizina, dok je slobodan holesterol veoma jak inhibitor svih tiol aktivisanih toksina pa i sulizina. Prema **Jacobs i sar. (1994)**, sulizini brzo gubi hemolitičku aktivnost pri oksidaciji ili inhibicijom holesterolom. Najveći broj hemolizina poseduje temperaturnu zavisnost, što je i dokazano činjenicom da većina hemolizina ne pokazuje hemolitičku aktivnost na temperaturi od 4°C. Ovo nije slučaj sa hemolizinom *S. suis* koji je aktivan i na temperaturi od 4°C, iako je za hemolizu na ovoj temperaturi potrebno duže vreme (**Gottschalk i sar., 1995**). Isti autori napominju da je najsnažnija hemolitička aktivnost sulizina na temperaturi od 37°C, dok je srednja aktivnost sulizina na temperaturi od 25°C.

Prema **Jacobsu i sar. (1994)**, eritrociti najvećeg broja domaćih životinja su gotovo podjednako osetljivi na dejstvo sulizina. Isti autori su ispitali dejstvo pročišćenog sulizina na eritrocite ljudi, goveda, ćurki, goluba, miša, kokošaka, ovaca, zamoraca, zečeva, mačaka, pasa i svinja, i svi eritrociti su gotovo podjednako bili osetljivi sa određenim razlikama u količini sulizina potrebnog za hemolizu. Međutim, veći broj autora opisuje razliku u hemolizi koja zavisi od količine fosfatidil holina prisutnog u ćelijskom zidu eritrocita i s tim različitu osetljivost eritrocita na dejstvo hemolizina. **Gottschalk i sar. (1995)** dokazuju da je osetljivost eritrocita na dejstvo sulizina najveća kod eritrocita O grupe ljudi, a zatim slede eritrociti konja, ovce, krave i svinje.

Sly gen, gen koji kodira sulizini pokazuje veoma ograničen genetski diverzitet. Oko 80% sly+ izolata *S. suis* koje su izolovali **King i sar. (2001)** imalo je identične sly alele. Na osnovu sekvenciranja i Southern blot analiza smatra se da *S. suis* dobija sly gen, koji se verovatno lateralno prenosi sa jednog soja na drugi mehanizmom koji uključuje prirodnu transformaciju i homologu rekombinaciju (**Takamatsu i sar., 2002**). Za razliku od gena ostalih faktora virulencije kao što su mvp i fbps, ekspresija sulizini iRNA (mRNA) se indukuje tokom kasne faze infekcije, otprilike 48 časova od infekcije, što je utvrđeno pri veštačkoj infekciji sojevima serotipa 2 *S. suis* (**Tan i sar., 2008**).

Suilizin deluje citotoksično na različite epitelne ćelije (**Lalonde i sar., 2000**), moždane mikrovaskularno endotelijalne ćelije (BMEC) (**Charland i sar., 2000**) i makrofage (**Segura i Gottschalk, 2002**). Suilizin takođe indukuje određene ćelijske promene i u sublitičnim koncentracijama. **Norton i sar. (1999)** sugerišu da suilizin virulentnih sojeva serotipa 2 *S. suis* verovatno učestvuje u invaziji istih na gornje partije respiratornog sistema. Međutim, ovo pitanje i dalje ostaje sasvim nerazjašnjeno. Prema **Chabot-Roy i sar. (2006)**, suilizin doprinosi otpornosti kapsularnih sojeva serotipa 2 *S. suis* na dejstvo neutrofila svinja. Isto viđenje imaju i **Benga i sar. (2008)**.

Domingez-Punaro i sar. (2007) su ispitivali inflamatorne reakcije u mozgu CD1 miševa posle eksperimentalne infekcije sulizin produkujućim sojevima serotipa 2 *S. suis*. Ovi autori su primetili aktivnost TLR 2 (toll like receptors), u manjoj meri TLR 3 dok nije postojala sinteza iRNK za TLR 4. Ovaj nalaz ukazuje na različit mehanizam patogeneze suilizina u odnosu na pneumolizin. Pneumolizin aktivacija TLR 4 predstavlja glavni nespecifični (urođeni) imunski odgovor na infekciju pneumokokama (**Malley i sar., 2003**), dok TLR 4 imunski odgovor ne postoji prilikom infekcije izazvane vrstom *S. suis*.

Ne postoji razlika u ekspresiji citokina (IL-1, IL-6 i TNF- α) i hemokina (IL-8 i MCP-1) pri eksperimentalnoj infekciji divljim sojem ili suilizin deficijentnim mutantom (**Segura i sar., 2006**). Nasuprot ovome, prema eksperimentu koji su izvršili **Lun i sar. (2003)**, rekombinantni suilizin je dovodio do oslobađanja TNF α iz monocita ljudi i IL-6 iz plućnih makrofaga i monocita svinja. Primećeno je da i endotelne ćelije ljude sekretuju veće količine IL-6 i IL-8, ali ne i MCP-1 posle stimulacije sa prečišćenim sulizinom u supkliničkim koncentracijama (**Vadeboncoeur i sar., 2003**).

Pošto se smatra da suilizin ima više funkcija u interakciji *S. suis* sa ćelijama domaćina, treba očekivati značajno oslabljenu virulenciju suilizin deficijentnih mutanata. Međutim, slabljenje virulencije kod sulizin deficijentnih mutanata dokazano je samo na miševima (**Allen i sar., 2001**). Nasuprot ovome, kod prasadi izogeni suilizin mutanti serotipa 2 *S. suis* pokazuju istu virulentnost kao i divlji soj (**Lun i sar., 2003**), ili samo blago smanjenje virulencije (**Allen i sar., 2001**). Suilizin gen je učestaliji među

izolatima od svinja sa kliničkim znacima meningitisa, septikemije i artritisa nego kod svinja sa pneumonijom (Silva i sar., 2006). Postoje i geografske razlike u prisustvu sly+ sojeva. Prisustvo sulizin pozitivnih sojeva u severnoj Americi je značajno manje od prisustva istih u Evropi i Aziji (Gottschalk i sar., 1998).

Imunizacija miševa prečišćenim suliznim potpuno štiti ove životinje od infekcije visoko virulentnim sojevima serotipa 2 *S. suis* (Jacobs i sar., 1994), a samo delimično štiti prasid od infekcije (Jacobs i sar., 1996). Međutim, prema Kock i sar. (2009) živa vakcina ne štiti prasid od infekcije serotipovima 2 i 9 *S. suis* iako u serumu ove prasidi mogu da se detektuju antitela protiv sulizina.

Iako sulizin nije esencijalan za virulenciju *S. suis*, eksperimenti *in vitro* ukazuju da sulizin verovatno ima važnu ulogu u intereakciji ovog patogena sa ćelijama domaćina.

2.9.18. Ostali hemolizini

Analizom kineskog STSS soja HA9801 i avirulentnog Evropskog soja T15 serotipa 2 otkriven je fragment DNK koji verovatno kodira hemolizin tipa 3. Ova DNK sekvenca je nađena i kod mnogih virulentnih sojeva serotipova 2 i 9 (Jiang i sar., 2009). Sekvenciranjem genoma serotipa 2 *S. suis* otkriveni su još neki DNK fragmenti koji vrlo verovatno kodiraju još neke hemolizine. Međutim, do sada ne postoje eksperimentalni dokazi koji govore da *S. suis* vrši ekspresiju još nekog hemolizina sem sulizina.

2.9.19. Fosfolipaza C

Kultura sojeva serotipa 2 *S. suis* dovodi do razgradnje fosfatidilholina na diacilglicerol i holinfosfat (ali ne i fosfatidnu kiselinu), što ukazuje na to da ova bakterija sekretuje fosfolipazu C (Jobin i sar., 2005a). Aktivnost fosfolipaze C je identifikovana u eksperimentima delovanja *S. suis* na oslobađanje arahidonske kiseline

iz moždanih mikrovaskularnih endotelijalnih ćelija (brain microvascular endothelial cells, BMEC). Oslobođanje arahidonske kiseline iz BMEC je bilo smanjeno kada su kulture ćelija bile izložene mutantu deficijentnom za sulilizin, ali oslobođanje arahidonske kiseline uopšte nije bilo kada su kulture bile tretirane pročišćenim sulilizinom. Na osnovu ovoga autori zaključuju da postoji sinergistički efekat sulilizina i fosfolipaze C na oslobođanje arahidonske kiseline iz BMEC, što može da ima veoma važnu ulogu u patogenezi meningitisa koji je izazvan vrstom *S. suis*.

2.9.20. Vanćelijski (ekstraćelijski) proteinski faktor (EF)

Ekstraćelijski faktor je protein molekulske mase 110 kDa, koji kodira epf gen i identifikovan je kao faktor virulencije serotipova 1 i 2 sojeva *S. suis* (Vecht i sar., 1991). Funkcija ekstraćelijskog faktora je i dalje nepoznata. Izogeni EPF mutanti serotipa 1 i 2 sojeva *S. suis* su virulentni kao i divlji sojevi pri eksperimentalnoj infekciji što ukazuje da EF nije esencijalan za virulenciju (Smith i sar., 1996). Do sada su EF produkujući sojevi identifikovani kod serotipova 1, 2, ½, 14 i 15 (Wisselink i sar., 2000). Neki sojevi serotipa 2 *S. suis* vrše ekspresiju teških varijanti (>110 kDa) vanćelijskog proteina (EF*), koje karakterišu duga C-terminalna tandem ponavljanja (svaka duga 76 aminokiselina). Ove ponavljajuće sekvence ne mogu se naći u normalnim varijantama EF koje imaju masu od 110 kDa. Na osnovu ponavljajućih sekvenci može se razlikovati pet klasa EF* (Smith i sar., 1993). Diferencijacija klasa EF* može se obaviti PCR testovima (Silva i sar., 2006).

Posle eksperimentalne intranazalne infekcije prasadi MRP+ EF+ (110 kDa protein) sojevima *S. suis* uočen je visok morbiditet i mortalitet, što nije slučaj sa MRP+ EF* sojevima (Vecht i sar., 1992). Ovakav nalaz je potpuno suprotan visokoj prevalenci MRP+ EF* serotip 2 sojevima među visoko invazivnim izolatima u epidemiološkim ispitivanjima (Silva i sar., 2006; Martinez i sar., 2003). Prema Baums i sar. (2007) oko 10% divljih svinja u severozapadnoj Nemačkoj nosi MRP+ EF* Cps2 sojeve u svojim tonzilama dok se MRP+ EF + Cps2 sojevi ne mogu naći kod ovih životinja, za razliku od domaćih svinja. Stoga, ovi autori smatraju da je moderno

svinjarstvo dovelo do prirodne selekcije visoko virulentnih MRP⁺ EF⁺ (110 kDa) sojeva serotipa 2 *S. suis*. Visoka virulencija ovih sojeva je verovatno specifična za domaće svinje, jer serotipa 2 *S. suis* izolati ljudi u Evropi obično vrše ekspresiju teške (EF*) varijante ovog proteina a ne standardne verzije proteina od 110 kDa. (Smith i sar., 1993; Baums i sar., 2007). Prevalencija različitih EF⁺ i EF* pozitivnih sojeva pokazuje značajna geografska variranja. Nasuprot Evropi, MRP⁺ EF⁺ i MRP⁺ EF* sojevi serotipa 2 *S. suis* su izolovani samo u jednom slučaju u severnoj Americi (Gottschalk i sar., 1998).

Ekstraćelijski faktor i sve njegove verzije su imunogeni proteini. Serum prebolelih životinja ili životinja veštački inficiranih sa MRP⁺ EF⁺ ili MRP⁺ EF* sojevima serotipa 2 *S. suis* uglavnom sadrže visok titar antitela protiv EF. Imunizacija sa EF proteinom nije dovoljna da zaštiti svinje protiv MRP⁺ EF⁺ sojeva serotipa 2 *S. suis*, ali vakcina koja sadrži kombinaciju MRP i EF pruža solidnu zaštitu (Wisselink i sar., 2001). Međutim, glavni problem EF vakcina je to što mnogi virulentni sojevi *S. suis*, uključujući i serotip 9, ne vrše ekspresiju ovog proteina.

2.9.21. Inhibitorne supstance slične bakteriocinu (Bacteriocin-like inhibitory substance, BLIS)

Streptococcus suis nije samo važan invazivni patogen, već i veoma uspešan kolonizator gornjeg respiratornog, genitalnog i digestivnog sistema (Baele i sar., 2001; Su i sar., 2008). Kao deo ekosistema mikroorganizama, *S. suis* se sreće sa velikim brojem drugih bakterija, uključujući i ostale sojeve *S. suis*. Melancon i Grenier (2003) su potvrdili produkciju BLIS kod 4 od 36 testiranih *S. suis* sojeva, koji su bili veoma aktivni protiv ostalih *S. suis* sojeva i drugih bakterijskih vrsta koje naseljavaju određene organske sisteme svinje. Ove BLIS su osetljive na proteinazu K, pronazu i elastazu što ukazuje da su proteinske prirode. Ovakva prednost *S. suis* za opstanak u ekosistemu mikroorganizama još nije potvrđena.

2.9.22. Imunoglobulin G vezujući protein

Različiti sojevi *S. suis* vrše ekspresiju najmanje jednog Ig G vezujućeg proteina. Serotip 2 *S. suis* sekretuje 52 kDa težak IgG vezujući protein koji reaguje sa velikim brojem IgG i IgA molekula sisara (Serhir i sar., 1995). Vezivanje IgG ne zavisi od stepena glikolizacije molekula imunoglobulina. *Streptococcus suis* IgG vezujući protein pokazuje manji afinitet prema IgG nego protein A i protein G, naročito prema IgG ljudi. Za razliku od proteina A i proteina G, *S. suis* vezujući protein može da vezuje i pileće IgG.

2.9.23. Biofilm

Biofilm se definiše kao kolonije bakterija koje se međusobno spajaju i lepe za tvrde površine, a koje su okružene zajedničkim ekstracelularnim matriksom. Formiranje biofilma je mehanizam koji omogućava bakterijama da postanu otporni kolonizatori, da se opiru eliminaciji od strane imunskog sistema domaćina, da poveća njihovu otpornost na antibiotike, kao i da im omogući bolju razmenu genetskog materijala (Donlan i Costerton, 2002). *Streptococcus suis* izolati, koji izazivaju meningitis, stvaraju veoma gust biofilm čija produkcija zavisi od stvaranja vanćelijskog matriksa koji sadrži sekretovane polisaharide i proteine (Grenier i sar., 2007). Sposobnost sojeva *S. suis* da formiraju biofilm je verovatno jedan od faktora virulencije koji doprinosi mogućnosti ove bakterije da izazove infekciju.

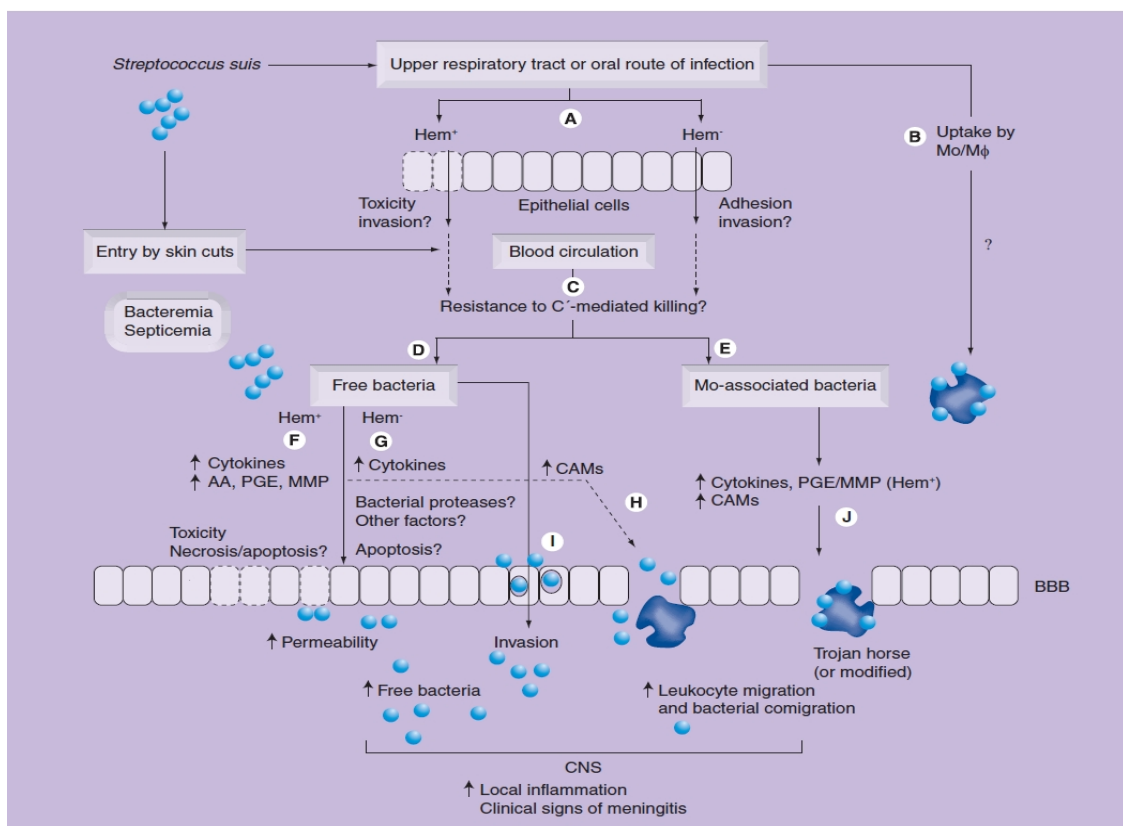
2.10. Patogeneza

Mehanizam koji omogućava *S. suis* da inficira životinju, tj. da se veoma lako diseminuje u telu domaćina nije sasvim najbolje objašnjen. Bakterija se sistemski širi iz nazofarinksa, izazivajući septikemiju, meningitis i bez tretmana obolelih veoma brzo dovodi do smrtnog ishoda (Gottschalk i Segura, 2000; Madsen i sar., 2002). Nepčane i faringealne tonzile su takođe moguća vrata infekcije, kojima se infekcija koju izaziva

S. suis hematogeno i limfogeno širi (**Madsen i sar., 2002**). Kod ljudi, smatra se da su sitne posekotine i oštećenja kože i oralne mukoze vrata infekcije, iako kolonizacija nazofarinksa i gastrointestinalnog sistema može biti odgovorna za određene slučajeve infekcija (**Gottschalk, 2004**). Iako se putevi ulaska bakterije kod ljudi (uglavnom posekotine na koži i oralna mukoza) i svinja (uglavnom respiratorni sistem) mogu razlikovati, smatra se da se patogenezna infekcija dešava sličnim mehanizmom (**Gottschalk i sar., 2010**).

Nije poznato kako je moguće da *S. suis*, uprkos malom broju bakterija na mukoznim površinama, prođe prvu liniju odbrane i započne infekciju. Da bi započela infekciju bakterija prvo mora da prođe kroz mukozni epitel u gornjem respiratornom sistemu. Do sada je mali broj autora istraživao interakciju *S. suis* i epitelnih ćelija, a često su rezultati studija po ovom pitanju kontradiktorni. Prema **Norton i sar. (1999)** *S. suis* može da invadira do određenog stepena ljudske epitelne ćelije čoveka. Ovi autori su dokazali da suilizin pozitivni sojevi *S. suis* imaju citotoksično dejstvo na ćelije i da se ovo dejstvo može inhibirati anti-suilizin antitelima. Citotoksičnost suilizina za ćelije epitela utvrđuju i **Lalonde i sar. (2000)** na ćelijskoj liniji poreklom od svinja. **Norton i sar. (1999)** zaključuju da su suilizin pozitivni sojevi *S. suis* sposobni da izvrše invaziju i lizu ćelija i na taj način probiju epitel mukoza. Suilizin negativni sojevi u ovoj studiji nisu pokazivali citotoksičan efekat na epitelne ćelije, ali nažalost mogućnost invazije ovih sojeva nije ispitana. S druge strane, **Lalonde i sar. (2000)** nisu uočili nikakvu invaziju *S. suis*, u eksperimentu u kojem su koristili ćelijske linije ljudi i različitih životinja, uključujući i svinje. Ovi autori, međutim, uočavaju visok nivo adhezije različitih sojeva *S. suis* za ćelije testiranih linija. Nastala adhezija je posredovana komponentama ćelijskog zida i značajno se smanjuje u prisustvu kapsule. Međutim, prisustvo kapsule ne smanjuje adheziju *S. suis* za mikrovaskularne endotelijalne ćelije mozga (BMEC) (**Charland i sar., 2000**). **St.Geme i Cutter (1996)** predlažu teoriju modulacije formiranja bakterijske kapsule, u kojoj bakterija ne eksprimira kapsulu tokom kolonizacije epitelnih ćelija, a čim uđe u cirkulaciju eksprimira kapsulu da bi se zaštitila od ćelija imunog sistema, dok sama kapsula ne sprečava potpunu adheziju za druge vrste ćelija.

Utvrđeno je da *S. suis* proizvodi daleko veću količinu kapsularnog polisaharida (CPS) u uslovima *in vivo* nego u uslovima *in vitro* (Charland i sar., 1996). Takođe, Haataja i sar. (1996) smatraju da ekspresija kapsule utiče na raspoloživost Po i Pn adhezina *S. suis*. Isti autori smatraju da i hemaglutinini *S. suis* imaju ulogu u infekciji. Benga i sar. (2004) i Valentin-Weigand (2004) prijavljuju moguću invaziju epitelnih ćelija nekapsuliranim (verovatno i avirulentnim) sojevima *S. suis*. Do danas, međutim, ne postoje dokazi o modulaciji ekspresije kapsule kod *S. suis*. Uopšten prikaz patogeneze infekcija koju izaziva *S. suis* prikazan je na slici 3.

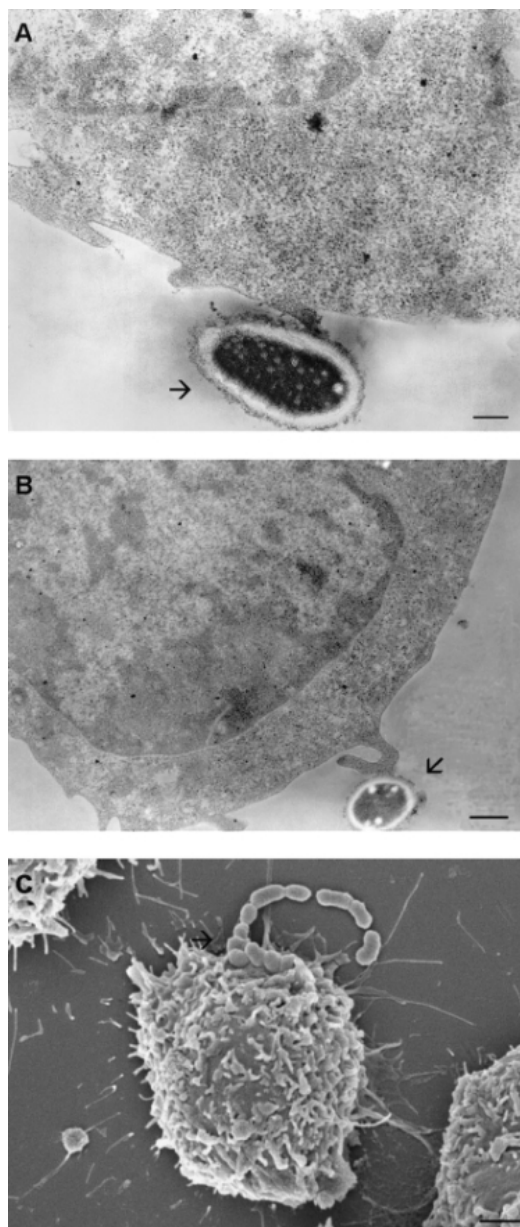


Slika 3. Uopšteni prikaz patogeneze *S. suis* (Gottschalk i sar., 2010)

Preživljavanje bakterije u cirkulaciji omogućava kapsularni polisaharid (CPS), koji efikasno sputava fagocitozu. Sijalinska kiselina, komponenta CPS-a, koja se nalazi na terminalnoj poziciji je verovatno i delom odgovorna za antifagocitna svojstva

kapsularnog polisaharida (CPS) (Van Calsteren i sar., 2008). Iako preuranjena, teorija Trojanskog konja (Williams, 1990; Williams i Blakemore, 1990) sugerisala je na to da monociti fagocituju bakteriju (u odsustvu specifičnih antitela), koja preživljava intracelularno i tako invadira centralni nervni sistem (CNS). Međutim, studije sprovedene u različitim laboratorijama u poslednjoj deceniji utvrđuju da bakterija putuje ekstracelularno, ne intracelularno, slobodna u cirkulaciji ili vezana za površinu monocita (Segura i Gottschalk, 2002). Stoga se *S. suis* zaista može smatrati ekstracelularnim patogenom. U slučajevima u kojim *S. suis* ne dovodi do akutne fatalne septikemije, bakterija uspeva da dopre do centralnog nervnog sistema (CNS) mehanizmom koji nije sasvim poznat, ali koji podrazumeva adheziju, sa ili bez toksičnog uticaja, i invaziju na mikrovaskularne endotelne ćelije mozga (BMEC) (Vanier i sar., 2004; Benga i sar., 2005). One, zajedno sa epitelnim ćelijama horoidnog plesusa (CPEC) čine strukturu krvno-moždane barijere (BBB). Dokazano je da *S. suis* takođe utiče na integritet i funkciju CPEC kod svinja. Iako apoptoza učestvuje u smrti CPEC, izgleda da je nekroza ipak dominantni mehanizam proboja *S. suis* kroz ove ćelije. Smatra se da je ovo verovatno mehanizam kojim *S. suis* vrši invaziju centralnog nervnog sistema (CNS) (Tenenbaum i sar. 2005). *Streptococcus suis* izaziva masovnu reorganizaciju „tight junction” proteina ZO-1, okcludina i kladina-1 i gubitak aktina na apikalnom polu ćelija kao i indukciju bazolateralnih vlakana stresa. Ovi i verovatno neki drugi mehanizmi učestvuju u olakšavanju invazije *S. suis* u CNS (Tenenbaum i sar., 2005; Tenenbaum i sar., 2006; Tenenbaum i sar., 2008; Tenenbaum i sar., 2009).

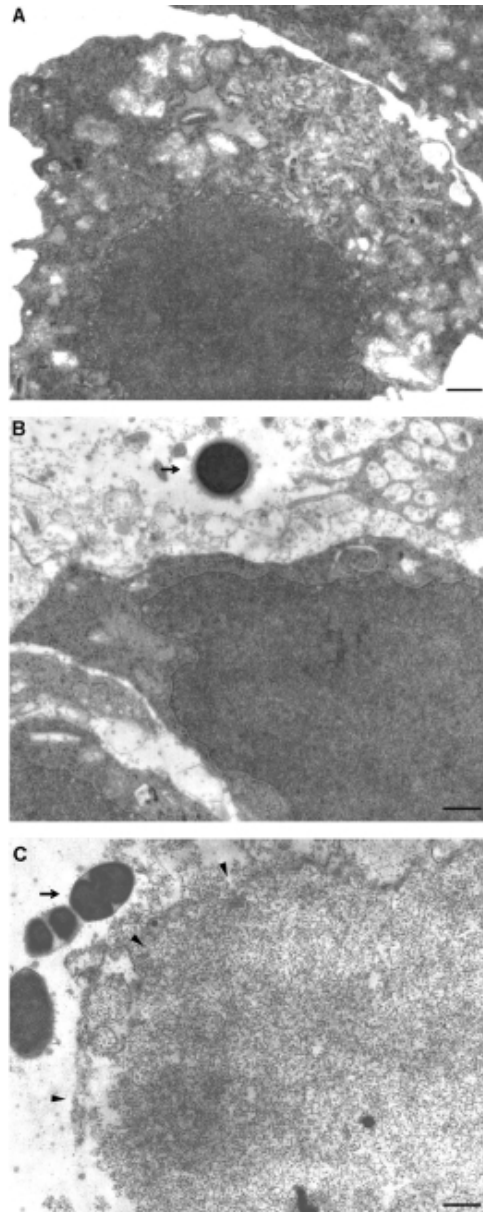
Različiti istraživači su dokazali da kapsulirani sojevi *S. suis* mogu lako da se odupru fagocitoznim sposobnostima od strane monocita/makrofaga inficiranih svinja a kapsularni polisaharid (CPS) je odgovoran za otpornost na fagocitozu. Segura i Gottschalk (2002) dokazuju da *S. suis* stupa u interakciju sa makrofagima i ostaje ekstracelularno vezan za površinu ćelije u J774 kulturi makrofaga. Elektronska mikroskopija otkriva da se *S. suis* hvata za protruzije na ćelijskoj površini ili direktno za plazma membranu makrofaga (Slika 4)



Slika 4. Adhezija *S. suis* na površinu ćelija, Segura i Gottschalk (2002)

Ova adhezija *S. suis* je slična adheziji *Brucella suis* na monocite. Međutim, kod *B. suis* adhezija ne rezultira ingestijom bakterije, što se ponekad dešava kod adhezije *S. suis*. Brza interakcija *S. suis* sa makrofagima je slična onoj koju **Albanyan i sar. (2000)** ustanovljavaju za B grupu streptokoka i polimorfonuklearnih neutrofila. Zanimljivo je

da više ćelija *S. suis* teže da se vežu međusobno pre nego što se u obliku lanca vežu za makrofage (Slika 5, C).



Slika 5. Formiranje lanaca ćelija *S. suis* pre adhezije na površinu ćelije, Segura i Gottschalk (2002)

Ovakav fenomen je primećen i kod B grupe streptokoka (Albanyan i sar., 2000). Segura i Gottschalk (2002) dokazuju da suilizin pozitivni sojevi *S. suis* ne samo da se vezuju za makrofage već prema njima ispoljavaju citotoksičan efekat koji se

povećava pri većoj koncentraciji bakterija. Ova citotoksičnost je u saglasnosti sa predloženim „multihit” načinom dejstva sulizina. Postoje mnogi dokazi da je sulizin odgovoran za citotoksičnost. Prvo, samo sulizin-producujući sojevi ispoljavaju ovakvo dejstvo. Drugo, samo veći broj bakterija ispoljava ovakvo dejstvo, a poznato je da se sulizin ekskretuje samo pri rastu bakterija. Treći dokaz je taj da pročišćeni sulizin ispoljava citotoksično dejstvo dok holesterol inhibira ovakvo dejstvo sulizina. Sulizin *S. suis* je dokazano citotoksičan i za mikrovaskularne endotelne ćelije mozga (BMEC) i verovatno učestvuje u diseminaciji bakterija. Takođe, sulizin deficijentni mutanti (sly mutanti) nisu toksični za makrofage, što podržava tvrdnje **Allen i sar (2001)** da je sulizin jedini citolizin koji stvara *S. suis*. Sulizin je toksičan ne samo za monocite i neutrofile već i za epitelne i endotelne ćelije što još više ukazuje na značaj izbegavanja odgovora imunog sistema pri infekciji izazvanoj *S. suis*. Osim ovoga, izgleda da sulizin utiče na eliminaciju bakterija koja zavisi od komplementa, jer smanjuje opsonizaciju *S. suis* i baktericidni kapacitet neutrofila (**Segura i sar., 2006; Chabot-Roy i sar., 2006**). Veći broj autora se slaže, da su sojevi *S. suis* negativni u produkciji sulizina svakako podložniji eliminaciji putem leukocita.

Chabot-Roy i sar. (2006) ukazuju na činjenicu da ni monociti ni neutrofile nisu sposobni da eliminišu *S. suis* u odsustvu specifičnih antitela. Studija ovih autora pokazuje da neutrofile mogu imati važnu ulogu u odbrani od infekcija *S. suis*. Takođe, pomenuti autori su demonstrirali značaj komplementa i naročito specifičnih antitela u baktericidnoj aktivnosti leukocita protiv *S. suis*. Ovakvi rezultati pokazuju značaj indukcije stvaranja specifičnih antitela koju bi vakcine, koje štite od *S. suis*, trebale da imaju.

Postoji veliki broj dokaza da imunski sistem igra važnu ulogu ne samo u razvoju zaštite protiv infekcija koju izaziva *S. suis* već i u patologiji koju izaziva patogen. Nekolicina infektivnih zapaljenjskih oboljenja je udruženo sa hiperprodukcijom proinflamatornih citokina i hemokina, i stvaranjem i aktivacijom različitih populacija leukocita što i jeste obeležje akutne inflamacije. S obzirom da se citokini mogu detektovati u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (CSF) tokom septičnog šoka i invazivnih meningealnih infekcija, sposobnost *S. suis* da indukuje stvaranje ovih citokina

verovatno ima biološki značaj (Verhoef i Mattsson, 1995). Segura i sar. (2002) dokazuju sposobnost *S. suis* da kod monocita poreklom od ljudi indukuje produkciju proinflamatornih citokina.

Inflamatorna svojstva *S. suis* mogu da se detektuju i u krvi svinja (Segura i sar., 2006). Ovi autori dokazuju da žive ćelije *S. suis* indukuju stvaranje visokih nivoa tumorskog nekrotičnog faktora α (TNF- α , tumor necrosis factor), interleukina 1b (IL-1 β) i interleukina 6 (IL-6) i srednjeg novoa interleukina 8 (IL-8) i monocitnog hemotaksičnog proteina 1 (MCP-1) u krvi svinja. Ćelijski zid bakterija predstavlja glavnu komponentu indukcije citokina, dok je ekspresija kapsule *S. suis* odgovorna za aktivaciju MCP-1. Prisustvo specifičnih supresivnih antitela dovode do smanjenja produkcije citokina. Dakle, smatraju Segura i sar. (2006), fagocitoza bakterija koja je posredovana specifičnim antitelima u sadejstvu sa supresijom inflamacije mogu biti strategija u poboljšanju stanja organizma pri infekciji izazvanoj *S. suis*. Isti autori su u uslovima *in vitro* ispitivali i koji se receptori aktiviraju pri infekciji izazvanoj *S. suis*. Stimulacijom monocita poreklom od ljudi kapsuliranim *S. suis* ili prečišćenim komponentama njegovog ćelijskog zida dolazi do ekspresije receptora TLR 2 (toll-like receptor) i CD 14 iRNK. Ova stimulacija pokreće oslobađanje citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6 i hemokina IL-8 i MCP-1, dok se oslobađanje ovih medijatora može značajno smanjiti TLR 2 ali ne i TLR 4 neutralizujućim antitelima. U eksperimentu sa makrofazima miša takođe je dokazano da TLR 2 deficijenti makrofagi imaju smanjenu produkciju IL-6 i MCP-1. S obzirom da je proces produkcije citokina i hemokina kompletno obustavljen kod makrofaga deficijenti za MyD88 receptor, smatra se da su osim TLR 2 i drugi TLR uključeni u produkciju citokina izazvanu kapsularnim *S. suis*. Takođe, dokazano je da CPS (kapsularni polisaharid) modulira interakciju *S. suis* sa TLR. U odsustvu kapsule, komponente ćelijskog zida indukuju produkciju citokina i hemokina preko TLR 2 ali i drugim receptor nezavisnim putevima. Međutim CPS doprinosi produkciji MCP-1 koja ne zavisi od ekspresije MyD88 receptora (Graveline i sar., 2007).

Infekciju izazvanu *S. suis* prati inflamatorni odgovor tipa 1. Nemogućnost inficiranog organizma da kontroliše ovu zapaljensku kaskadu doprinosi kliničkoj

manifestaciji bolesti i čestom nepovoljnom ishodu infekcija (**Dominguez-Punaro i sar., 2007**). Pošto se najveći broj pomenutih citokina javlja pri kliničkom pogoršanju bolesti, višestrukom otkazivanju organa i smrti, smatra se da je ovo metod kojim *S. suis* dovodi do septičnog šoka ljudi.

Meningitis je svakako najuočljiviji klinički simptom infekcije koju izaziva *S. suis*, a zapaljenske reakcije do kojih dovodi ovaj patogen u centralnom nervnom sistemu (CNS) igraju važnu ulogu u patologiji oboljenja. Edem, fibrinski i ćelijski infiltrati meningi su tipičan patološki nalaz tokom *S. suis* meningitisa (**Madsen i sar., 2002**). *Streptococcus suis* indukuje oslobađanje arahidonske kiseline iz mikrovaskularno-endotelnih ćelija mozga (BMEC), što je mehanizam koji omogućava bakteriji da proдре u CNS i modulira lokalnu inflamaciju (**Jobin i sar., 2005**). Dodatno, CPS *S. suis* podstiče ljudske makrofage da sekretuju prostaglandin (PGE) i matriksnu metaloproteinazu 9 koji su dodatno uključeni u disrupciju krvno-moždane barijere (BBB) (**Jobin i sar., 2006**). Takođe, *S. suis* indukuje oslobađanje proinflamatornih citokina i hemokina iz BMEC koji regulišu ekspresiju adhezivnih molekula na ljudskim monocitima, što dovodi do povećane adherencije *S. suis* aktivisanih monocita na endotelijalne ćelije (**Al-Numani i sar., 2003**).

Eksperimenti u uslovima *in vivo* na miševima koji su preživeli septikemičnu fazu bolesti pokazuju ozbiljne znake inflamacije CNS-a, sa gnojnim i nekrotičnim lezijama na meningama i parenhimu mozga, naročito u korteksu, hipokampusu, talamusu, hipotalamusu i corpus callosum. Hibridizacija *in situ* u kombinaciji sa imunocitohemijskim metodama pokazala je aktivaciju TLR 2 i TLR 3 kao i CD14, NF- κ B, IL-1 β , MCP-1 i TNF- α u navedenim strukturama mozga. Smatra se da su mikroglia/makrofagne ćelije verovatno glavni izvor indukcije citokina u mozgu. Rana transkripcionalna aktivacija TLR 2 i CD14 i prisustvo inflamatornih citokina u horoidnom pleksusu i endotelnim ćelijama mozga sugerise da su ove strukture mozga verovatno ulazna vrata patogena ka CNS-u (**Gottschalk i Segura, 2000; Vanier i sar., 2004; Dominguez-Punaro i sar., 2007**). Svi ovi podaci ukazuju na važnu ulogu inflamatornog odgovora u patogenezi infekcija koju izaziva *S. suis*.

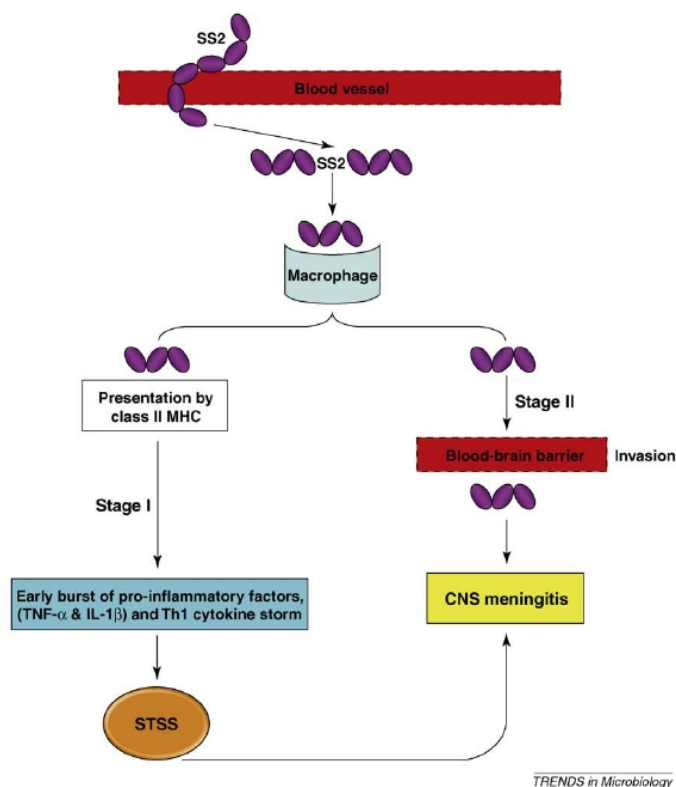
Klinička prezentacija infekcija izazvanih vrstom *S. suis* varira od asimptomatske bakterijemije do veoma brze sistemske bolesti, slične sepsi koju izazivaju gram negativne bakterije. Ozbiljnost infekcija koju izaziva *S. suis* kod ljudi u slučajevima septičnog šoka ili sindromu sličnom toksičnom šoku, se ogleda u veoma kratkom inkubacionom periodu, brzom napredovanju bolesti i visokom stepenu mortaliteta, što ukazuje na masivne inflamacione procese i naglašava potrebu za boljim razumevanjem interakcije između *S. suis* i imunskog sistema domaćina.

2.10.1. Patogeneza STSS (Streptococcal toxic shock syndrome)

Toksični šok sindrom, koji se obično može videti kod ozbiljnih infekcija izazvanih bakterijama iz roda *Staphylococcus* (**Bassaris i sar., 1981; Schutzer i sar. 1983**), predstavlja visoko invazivnu infekciju dubokih tkiva udruženu sa visokom produkcijom bakterijskih superantigena (npr. stafilokokni i streptokokni egzotoksini), koji izazivaju nekontrolisanu aktivaciju T limfocita i ne zahteva obradu i prezentaciju putem makrofaga (**Bergdoll i sar., 1981; Cohen i sar., 1981**). Ova bolest se ponekad, u sporadičnim slučajevima javlja pri infekciji ljudi sa *Streptococcus pyogenes*, streptokokom grupe A (GAS) (**Cone i sar., 1987; Musser i sar., 1991**). Protein M, koji je glavni faktor virulencije *S. pyogenes* igra glavnu ulogu u razvoju ove bolesti (**Lappin i Ferguson, 2009**). Nakon toga, sindrom je preimenovan u STSS. Generalno, STSS se definiše na osnovu nekoliko sledećih kliničkih kriterijuma: čisti eritematozni bleđi osip, krvave tačke i petehije, iznenadna pojava visoke temperature, hipotenzija, dijareja i disfunkcija mnogih organa (akutni respiratorni sindrom, otkazivanje funkcija jetre i srca, diseminovana intravaskularna koagulacija i akutno otkazivanje bubrega) (**Tang i sar., 2006; Yu i sar., 2006; Ma i sar., 2009**). Epidemiološki i klinički podaci su pokazali da su svi smrtni slučajevi u dve epidemije koju izaziva serotip 2 *S. suis* u Kini zadovoljavali STSS kriterijume (**Tang i sar., 2006; Yu i sar., 2006**). Ovi podaci su bili neočekivani, jer do ovih epidemija nije bilo poznato da serotip 2 *S. suis* može da izazove ovaj sindrom, međutim, nakon epidemija utvrđeno je da i streptokoka koja ne pripada A grupi, kao što je to *S. suis* može da izazove STSS. Retrospektivom prethodnih

studija uočeno je da su slučajevi STSS izazvani serotipom 2 *S. suis*. već prijavljeni na Tajlandu (Leelarasamee i sar., 1997) i Francuskoj (Francois i sar., 1998). Tramontana i sar. (2008) su prijavili slučaj STSS u Australiji nakon kontakta sa mesom svinja.

Feng i sar. (2009) smatraju da bi trebalo uporediti izolate serotipa 2 *S. suis* koji su izazvali STSS u različitim državama da bi se ustanovio molekularni mehanizam kojim *S. suis* izaziva STSS. Nakon analize genoma *S. suis*, Chen i sar. (2007) su predložili teoriju po kojoj je specifično gensko ostrvo (PAI), poznato i kao 89K, odgovorno za visoku virulentnost kineskih sojeva serotipa 2 *S. suis*, pa čak i za razvitak STSS kod ljudi. Posle imunoloških istraživanja Yu i sar. (2009) su predložili dvostepenu hipotezu radi objašnjenja STSS kod ljudi inficiranih serotipom 2 *S. suis*. Prema ovim autorima, nakon dejstva faktora virulencije *S. suis*, među kojima je značajan tiol-aktivisani toksin suilizin, dolazi do eksplozivnog lučenja citokina (kao što su citokini Th 1 ćelija), koji su odgovorni za kliničku manifestaciju STSS (Slika 6).



Slika 6. Dvostepena hipoteza razvitka STSS (Yu i sar., 2009)

Iako treba još dodatnih istraživanja radi testiranja dve teorije (uticaj 89k i dvostepene hipoteze) razvitka STSS, ove teorije su dobra polazna tačka za razjašnjavanje mehanizma kojim serotip 2 *S. suis* dovodi do STSS kod ljudi.

2.11. Klinički znaci bolesti svinja

Čak i kada su svinje 100% inficirane vrstom *S. suis*, pojava bolesti periodično varira i uglavnom iznosi ispod 5% (**Clifton-Hadley i sar., 1986**). Svinje mogu biti kliconoše najvirulentnijeg serotipa 2 *S. suis* bez kliničkih znaka bolesti (**Clifton-Hadley i sar., 1984**). Prema ovim autorima korelacija između nivoa infekcije i pojave bolesti gotovo da i ne postoji.

Najveći broj oboljenja izazvanih *S. suis* zahvata mali broj svinja i traje do nekoliko nedelja. Morbiditet i mortalitet pri infekciji izazvanoj vrstom *S. suis* zavisi od populacije svinja. Morbiditet varira od manje od 1% do preko 50 % (**Heard, 1991**). Prema ovom autoru, visok stepen infekcije obično se pripisuje niskom nivou higijene i postojanju infekcije sa još nekim patogenom. Mortalitet svinja zavisi od uslova gajenja i pravovremene antibiotske terapije. Prema **Cloutier i sar. (2003)** ukoliko se sa antibiotskim tretmanom svinja ne krene na vreme, mortalitet svinja dostiže i 20%. Međutim, ukoliko se lečenje svinja obavi na vreme mortalitet je relativno mali i iznosi 0-5% (**Windsor, 1977**).

U najvećem broju slučajeva bolesne životinje su uglavnom starosti od 5 do 10 nedelja, ali opisani su i slučajevi svinja starih i 32 nedelje, kao i prasadi stare samo nekoliko časova (**Reams i sar., 1996; MacInnes i Desrosiers, 1999**) (Slika 7). Prema nekim drugim autorima, prasad obole najčešće u starosti od 4 do 12 nedelja (**Clifton-Hadley i sar., 1984; Guise i sar., 1985**). **Reams i sar. (1996)** ukazuju da je u Sjedinjenim Američkim Državama najveći broj svinja (oko 75%) koje su obolele od infekcije koju izaziva *S. suis* mlađi od 16 nedelja.



Slika 7. Prikaz *S. suis* infekcije kod veoma mlade prasadi (<http://www.thepigsite.com>)

Bolest se najčešće javlja kod prasadi posle odbijanja (oko 6 nedelje starosti) ili mešanja svinja iz različitih obora (**Lamont i sar., 1980**). Generalno, svinje bilo koje starosti mogu oboleti ali se osetljivost svinja smanjuje sa starošću (**Lamont i sar., 1980**; **Chengappa i sr., 1986**). Međutim, u nekim zapažanjima je primećeno masovna pojava meningitisa izazvanog vrstom *S. suis* kod svinja pred klanje (**Tokach, 1993**). Najraniji znak oboljenja je povećanje rektalne temperature čak i do 42,5°C. Povećanje temperature se često dešava bez drugih vidljivih kliničkih znaka. Prve kliničke znake oboljenja obično prati bakterijemija, tj. izražena septikemija, koja ako se ne leči može trajati i do 3 nedelje. Tokom ovog perioda telesna temperatura značajno varira, a svinje pokazuju različit stepen inapetence i depresije, a česta je pojava i naizmenične hromosti (**Clifton-Hadley i sar., 1984**). Neretko se javlja i perakutni tok bolesti u kome se mogu naći uginule svinje koje prethodno nisu pokazivale nikakve znake oboljenja (**Slika 8**).



Slika 8. Perakutni tok infekcije izazivan sojem *S. suis* – iznenadna smrt prasadi u tovu
(<http://www.rakbankerd.comagriculturepage.phpid=432&s=tblanimal>)

Najistaknutija karakteristika oboljenja je meningitis, na osnovu čega se uglavnom bazira dijagnostička pretpostavka. Rani nervni simptomi bolesti su najčešće inkoordinacija, „veslanje“ nogama, opistotonus, konvulzije i nistagmus (Staats i sar., 1997). Oči životinja su obično iskolačene, dok su sluznice obično jako zacrvenjene (Slika 9).



Slika 9. Klinička slika meningitisa koji izaziva *S. suis* kod prasadi u tovu
(<http://www.thepigsite.com>)

Septikemija, artritis i pneumonija su manje uočljive manifestacije bolesti, i na osnovu njih se teško može pretpostaviti dijagnoza. Osim ovih simptoma, druge manifestacije oboljenja koje izaziva *S. suis* uključuju endokarditis, rinitis, pobačaje i vaginitis (**Sanford i Tilker, 1982**).

U Severnoj Americi *S. suis* je najčešći infektivni agens koji se može izolovati u slučajevima endokarditisa svinja. Svinje kod kojih je *S. suis* izazvao endokarditis često umiru iznenada, ili mogu pokazivati različite stepene dispnoe, cijanoze i slabe fizičke kondicije. Takođe, u Severnoj Americi *S. suis* se najčešće može izolovati u slučajevima pneumonije (**Ericsson i sar., 1984**). U Velikoj Britaniji, infekcija koju izaziva serotip 2 *S. suis* najčešće dovode do septikemije i meningitisa prasadi u tovu (**Windsor i Elliott, 1975**). S ovim nalazom se slažu i **Heath i sar. (1996)**, koji *S. suis* serotip 14 najčešće nalaze u slučajevima septikemije, meningitisa, poliartritisa, ali retko u slučajevima pneumonije. U Holandiji, serotip 2 *S. suis* je najčešće bio izazivač pneumonije (42%), zatim meningitisa (18%), endokarditisa (18%) i poliserozitisa (10%) (**Vecht i sar., 1985**). Do sada je zabeleženo da se i izolati *S. suis* koji ne pripadaju serotipu 2 mogu naći u slučajevima bronhopneumonije, i to u Argentini (**Vena i sar., 1991**), Danskoj (**Perch i sar., 1983**), Belgiji (**Hommeze i sar., 1986**), Holandiji (**Vecht i sar., 1985**), Finskoj (**Sihvonen i sar. 1988**), Australiji (**Gogolewski i sar., 1990**), Kanadi (**Gottschalk i sar., 1990**) i Sjedinjenim Američkim Državama (**Reams i sar., 1994**).

Moguća uloga *S. suis* kao primarnog izazivača plućnih promena, u odsustvu drugih patogena je i dalje sasvim nerazjašnjena (**Staats i sar., 1997**). Do sada jedini zabeleženi slučaj u kojem je *S. suis* serotip 2 sam izazvao pneumoniju je kod SPF (specific pathogen free) eksperimentalne prasadi (**Berthelot-Herault i sar. 2001**).

Smatra se, da se nijedan klinički znak, niti patološka promena ne mogu pripisati specifičnom serotipu *S. suis* (**Reams i sar., 1996**).

2.12. Patološki nalaz

Obdukциони nalazi kod svinja koje su uginule od infekcije koju izaziva *S. suis* zavise od trajanja infekcije i distribucije *S. suis* u tkivima. Svinje, koje uginu u akutnom ili perakutnom toku bolesti, najčešće nemaju nikakve promene i uglavnom su dobro uhranjene (**Windsor, 1977; Power, 1978**). Čak i kod svinja koje pokazuju znake artritisa i meningitisa, drugih patoloških nalaza osim ovih obično nema (**Clifton-Hadley i Alexander, 1991**). Značajne mikroskopske promene su obično ograničene na mozak, pluća, srce i zglobove (**Reams i sar., 1994**). Mikroskopske lezije nisu vezane za serotip *S. suis* koji je izazvao infekciju (**Reams i sar., 1994**).

Najčešće patološke promene kod uginulih svinja su kongestija meningi (**Slika 10**), limfnih čvorova i pluća dok se najučestalije histopatološke promene mogu uočiti unutar horioidnog pleksusa (**Williams i Blakemore, 1990; Clifton-Hadley i Alexander, 1991**). Encefalitis, edem i kongestija mozga takođe mogu biti uobičajen nalaz (**Windsor, 1977**).

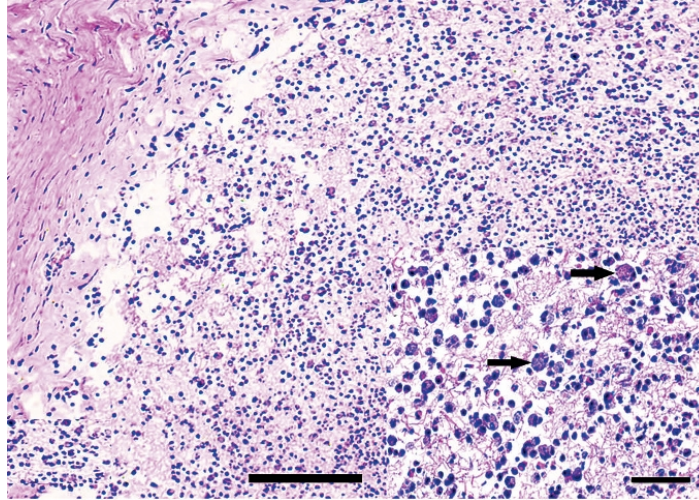
U centralnom nervnom sistemu (CNS) lezije koje prate meningitis i horioiditis se često mogu ustanoviti: edem leptomeningi i dure mater, hiperemija meningealnih krvnih sudova i povećanje količine cerebro-spinalne tečnosti (CSF) (**Sanford, 1987; Clifton-Hadley i Alexander, 1991**). Iako se gnojni cerebrospinalni eksudat makroskopski ne može uočiti, histopatološki nalaz gnojnog meningitisa je često prisutan (**Power, 1978**). Karakteristična histopatološka promena akutnog meningitisa koji izaziva *S. suis* je difuzni neutrofilni infiltrat (**Clifton-Hadley i Alexander, 1991**). Osim ovoga neretko se mogu naći naslage fibrina, edem i ćelijski infiltrati meningi i horioidnog pleksusa (**Sanford i Rosendal, 1984**). U ovakvim slučajevima leptomeningitis karakterišu fibrino-purulentni, limfo-leukocitni ili samo limfocitni infiltrati (**Sanford, 1987**). Granice horioidnog pleksusa su često prekinute, a u moždanim komorama se često može naći fibrin i ćelijski eksudat. Ponekada, moždanim komore mogu biti prepunjene tečnošću. Intracelularne bakterije se mogu naći u epitelu horioidnog pleksusa, i eksudatu moždanih komora i unutar perifernih krvnih monocita. Takođe mogu biti prisutne i fagocitovane bakterije u inflamatornim ćelijama CSF (**Williams i Blakemore, 1990**).



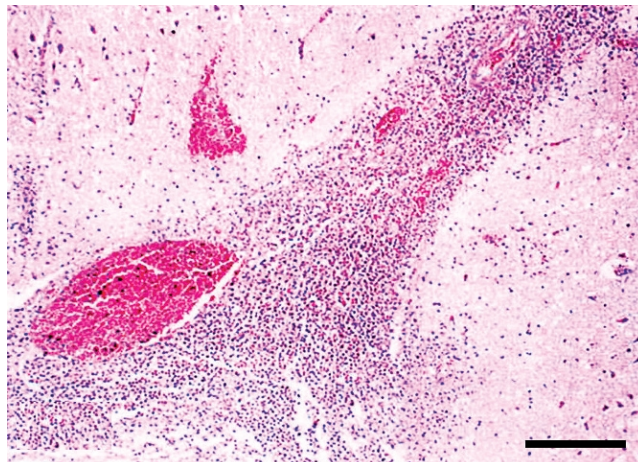
Slika 10 . Prikaz obdukcionog nalaza svinje uginule od infekcije koju je izazvao *S. suis*
– kongestija meningi i edem mozga

(www.rakbankerd.com/agriculturepage.php?id=432&s=tblanimal)

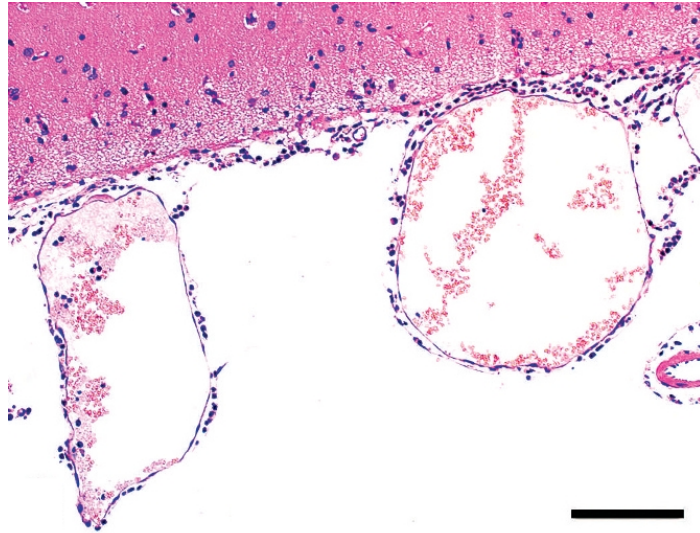
Zheng i sar. (2009) izlažu detaljnu patološku analizu mozga posle eksperimentalno inficirane pet nedelja stare prasadi serotipom 2 *S. suis* koji je i suilizin pozitivan. Patološki nalaz pokazuje kongestiju i stanjenje dura mater. Površina moždanih girusa je bila sravnjena verovatno usled kompresije otečenog mozga. Moždane brazde su plitke a količina cerebrospinalne tečnosti povećana. Mikroskopski, hemoragije i profuzni neutrofilni eksudat sa manjim broem makrofaga je prisutan u dura mater. Fokalni agregati neutrofila i varijabilna količina fibrinoznog eksudata su nađeni u unutrašnjoj ovojnici dura mater (**Slika 11**). Veliki broj neutrofila se može naći u subarahnoidnom i subpijalnom prostoru (**Slika 12**). Meningealni krvni sudovi su otečeni, a u njihovom lumenu se nalaze brojni neutrofilni i makrofagi oko kojih se nalaze leukociti (**Slika 13**).



Slika 11. Dura mater; fokalni agregati neutrofila i fibrinoznog eksudata (strelice)
(Zheng i sar., 2009)

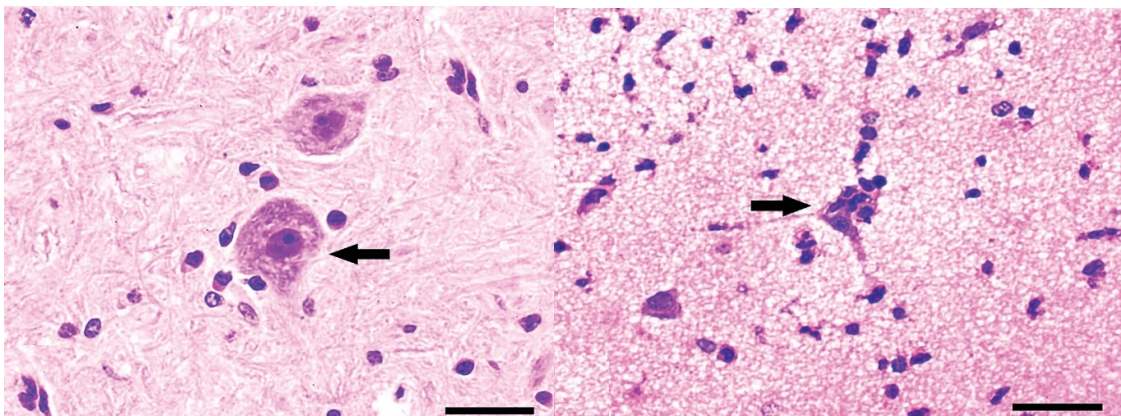


Slika 12. Subarahnoidni prostor; leptomeningitis sa prisustvom velikog broja neutrofila
i makrofaga (Zheng i sar., 2009)



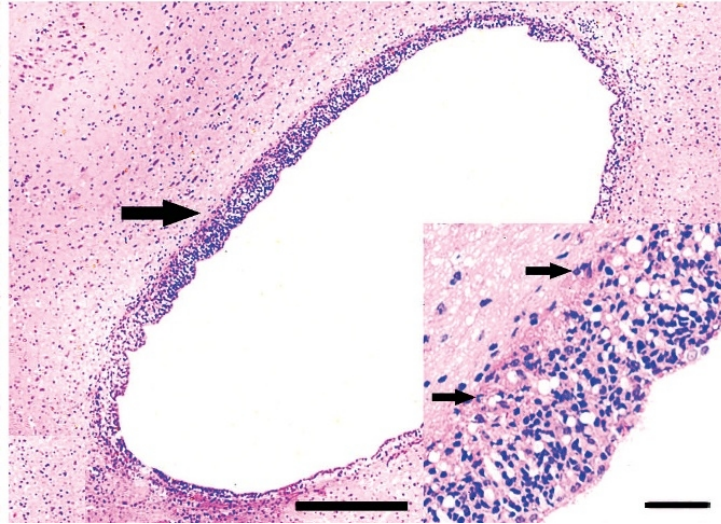
Slika 13. Subarahnoidni prostor; dilatirani krvni sudovi ispunjeni neutrofilima i makrofagima oko kojih se nalaze leukociti (Zheng i sar., 2009)

Encefalitis je udružen sa cerebralnim edemom koji karakteriše proširenje perivaskularnog i pericelularnog prostora, masovna infiltracija neutrofilima i značajna nekroza neurona. U površinskom delu korteksa može se uočiti infiltracija ćelija imuniteta, kao i fokalna proliferacija mikroglia ćelija i stvaranje rasejanih glijalnih čvorića. Inflamatorne reakcije kao što su perivaskularna neutrofilna infiltracija, satelitoza i neuronofagija su veoma uočljive (Slika 14).



Slika 14. Satelitoza i neuronofagija (strelice) (Zheng i sar., 2009)

Virchow-Robin-ovi prostori su prošireni, dok su endotelijalne ćelije i kapilari otečeni. Horioidni pleksusi lateralne, treće i četvrte komore pokazuju jasne znake kongestije sa oskudnim ćelijskim eksudatom. Inflamacija se takođe može uočiti i u ependimalnom sloju moždane komore (**Slika 15**).



Slika 15. Prikaz patohistološkog nalaza - Ependima je smanjena sa brojnim ćelijskim infiltracijama (strelice) (**Zheng i sar., 2009**)

Subependimalno tkivo pokazuje znake edema i infiltracije neutrofila. Promene se mogu uočiti i u kičmenoj moždini u vidu perivaskularnih infiltracija neutrofilima i makrofagima, u vidu neuronofagije i degeneracije mijelina. Ultrastruktura mnogih neurona i glija ćelija pokazuje degeneraciju i nekrozu, sa piknozom, fragmentacijom ili lizom jedra i gubitak organela.

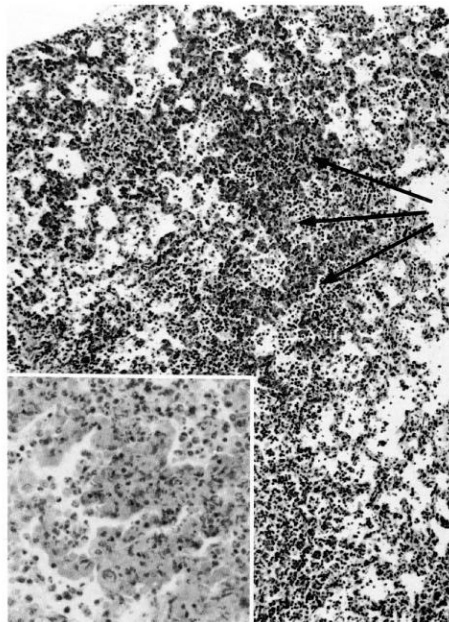
Prve uočljive promene u slučajevima artritisa koga izaziva *S. suis* su dilatacija sinovijalnih krvnih sudova i hiperemija (**Gogolewski i sar., 1990**). Ponekad se javlja i fibrinozni poliserozitis bez promena na zglobnim površinama. U zglobovima zahvaćenim infekcijom kapsula je obično istanjena, a sinovijalne membrane eritematozne. Količina sinovijalne tečnosti može biti povećana, sa manjom količinom purulentnog, fibrinoznog ili fibrinopurulentnog eksudata (**Clifton-Hadley i Alexander, 1991**) (**Slika 16**). Ukoliko je bolešću zahvaćen veći broj zglobova (poliartritis), karpalni i tarzalni zglobovi su obično najugroženiji (**Windsor i Elliott, 1975**).



Slika 16. Prikaz promena na zglobovima prilikom infekcije koju izaziva vrsta *S. suis* (www.rakbankerd.com/agriculturepage.php?id=432&s=tblanimal)

U grudnoj i trbušnoj duplji, čest nalaz su krpice fibrina i povećana količina tečnosti (**Sanford, 1987**). Promene na srcu su gotovo redovan nalaz i uključuju fibrino-purulentni perikarditis, vegetativni valvularni endokarditis, a ređe i hemoragično-nekrotični miokarditis koji liči na bolest dudolikog srca (mulberry heart disease) (**Sanford i Tilker, 1982; Sanford, 1987**). Histopatološki, u miokardu se mogu naći fokalna i difuzna područja nekroze i hemoragije. Perikard je obično istanjen i/ili proširen sa tankim slojem guste fibrinopurulentne tečnosti. Histološki, perikard obično sadrži eozinofilnu proteinsku tečnost, sa većim količinama fibrina i manjim brojem neutrofila i mononuklearnih ćelija. Plućne lezije su česte pri infekciji koju izaziva *S. suis*, ali se one razlikuju od slučaja do slučaja. Obično se mogu naći intersticijalna fibrinozna i fibrinohemoragična pneumonija, fibrinozna ili gnojna bronhopneumonija sa ili bez perivaskularnih, peribronhijalnih i peribronhiolarnih limfocitnih infiltrata, bronhiolitis, bronhitis, alveolarne hemoragije, spajanje lobula, interlobularni emfizem i fibrino-purulentni pleuritis (**Koehne i sar., 1979; Larson i Kott, 1983; Sanford i Rosendal, 1984; Clifton-Hadley i Alexander, 1991; Reams i sar., 1995**). Intersticijalna pneumonija se smatra sekundarnom lezijom koja prati septikemiju (**Reams i sar., 1994**). Alveolarne džinovske ćelije mogu se naći u slučajevima

intersticijalne fibrinozne pneumonije (Clifton-Hadley i Alexander, 1991). Retki slučajevi fibrino-hemoragične pneumonije i septalne nekroze se ponekad mogu naći pri obdukciji, i smatra se da ovakav nalaz ukazuje na infekciju koju izaziva *S. suis* a koja se karakteriše promenama u cirkulaciji (Reams i sar., 1995) (Slika 17). Druge bakterije se često mogu izolovati zajedno *S. suis* iz pluća svinja i smatra se da je njihovo prisustvo neophodno za razvoj fibrino-hemoragične pneumonije (Reams i sar., 1995). Međutim, Charland i sar. (2000) i Vanier i sar. (2004) nalaze da su suilizin pozitivni sojevi toksični za ćelije endotela, čime se sugeriše da za razvitak fibrino-hemoragične pneumonije i nije potrebno sadejstvo drugih bakterija.



Slika 17. Prikaz patohistološkog nalaza - Fibrino-hemoragična pneumonija koju izaziva *S. suis* – nekroza alveolarne septe i infiltracija neutrofila (strelice) (Reams i sar., 1995)

Od ostalih promena, koje prate infekciju koju izaziva *S. suis*, mogu se uočiti promene boje kože, limfadenopatija, kongestija nosnih turbina i kongestija parenhimatoznih organa, najčešće jetre (Windsor i Elliott, 1975; Power, 1978; Clifton-Hadley and Alexander, 1991). Mnoge od ovih promena su odraz

generalizovane septikemije i prisustva bakterija u zahvaćenim tkivima, naročito u nelečenim slučajevima (Taylor, 1986).

2.13. Osetljivost *S. suis* na antibakterijske lekove

Izbor najboljeg antibakterijskog leka protiv infekcije koju izaziva *S. suis* zasniva se na nekoliko kriterijuma, kao što su osetljivost bakterije, tip infekcije i način davanja leka. Korišćenjem Kirby-Bauer metode, utvrđena je visoka osetljivost *S. suis* na penicilin (Kataoka i sar., 2000; Han i sar., 2001; Marie i sar., 2002). Međutim, određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) pokazalo je da u mnogim slučajevima postoji srednja vrednost osetljivosti sojeva *S. suis* na penicilin, dok je stepen osetljivosti na amoksicilin i ampicilin oko 90% (Shryock i sar., 1992; Turgeon i sar., 1994). Zato se preporučuje da se penicilin koristi samo u slučajevima kada se testovima utvrdi da je *S. suis* osetljiv na dejstvo ovog antimikrobnog leka.

Različiti autori opisuju visok nivo otpornosti izolata *S. suis* na neke antibakterijske lekove, kao što su tetraciklin, klindamicin, eritromicin, kanamicin, neomicin i streptomycin (Reams i sar., 1993; Estoepangestie i Lammler, 1993; Turgeon i sar., 1994), dok je osetljivost na trimetprim-sulfametoksazolu izuzetno varijabilna (Shryock i sar., 1992; Kataoka i sar., 2000). Marie i sar. (2002) nalaze da su u Francuskoj svi sojevi *S. suis* osetljivi na dejstvo penicilina, amoksicilina, ceftiofura i gentamicina. Ovi autori smatraju da je 38% sojeva osetljivo na dejstvo linkomicina, dok je procenat osetljivost za tetracikline 18%, a da postoji visoka otpornost ovog patogena na kanamicin i streptomycin. U Španiji je, prema Vela i sar. (2005), preko 89% sojeva *S. suis* osetljivo na penicilin, amoksicilin, ceftiofur, gentamicin, spektinomycin i enrofloxacin i autori smatraju da se ovi lekovi još mogu koristiti kao primarni u lečenju infekcija izazvanih ovom bakterijom. U istoj studiji, preko 87% sojeva je bilo otporno na dejstvo tetraciklina, sulfonamida, makrolida i klindamicina, što se pripisuje značajnoj upotrebi ovih antimikrobnih lekova u prevenciji oboljenja.

Ispitivanja osetljivosti u Danskoj na sojevima izolovanim od 1992. do 1997. godine su pokazale razliku u osetljivosti na makrolide i tetracikline u zavisnosti od izolovanog serotipa i povećanu otpornost bakterije na tilozin i tetraciklin kao rezultat česte upotrebe u lečenju svinja u ovoj državi (**Aarestrup i sar., 1998**). Isti autori nalaze da je *S. suis* osetljiv na dejstvo penicilina, ampicilina, vankomicina i trimetoprima. Upoređujući osetljivost serotipova ovi autori utvrđuju da je 20,4% serotip 2 *S. suis*. i 44,8% serotip 7 *S. suis* otporno na makrolidne antibiotike (eritromicin, klindamicin), dok je 43,9% serotip 2*S.suis* i 15,9% serotip 7 *S. suis* otporno na dejstvo tetraciklina. Otpornost sojeva serotip 2 *S. suis*. na dejstvo sulfametoksazola u istoj studiji u Danskoj bila je 15,4% a u Švedskoj 57,1%, dok je otpornost serotipa 7 ove bakterije iznosila čak 91,4%. **Han i sar. (2001)**, međutim, ne nalaze korelaciju između antimikrobne osetljivosti i serotipa bakterije.

Tian i sar. (2004) nalaze visoku osetljivost serotipa 7 *S. suis* na ceftiofur, hloramfenikol, florfenikol, penicilin, ciprofloksacin, trimetoprim i trimetoprim+sulfonamid. Visoka frekvencija otpornosti je u ovoj studiji zabeležena za eritromicin (40,78%) i tetraciklin (24,27%). **MacInnes i Desrosiers (1999)** smatraju da su ampicilin, ceftiofur, gentamicin i tiamulin i kombinacija trimetoprima i sulfonamida najkorisniji lekovi u lečenju infekcije koju izaziva *S. suis*. Prema podacima **Wisselink i sar. (2006)**, koji su ispitali osetljivost *S. suis* na antibiotike koji su u upotrebi u najvećem broju zemalja Evrope, svi sojevi ove bakterije bili su osetljivi na enrofloksacin, ceftiofur, cefkvinom, florfenikol i penicilin. Autori nalaze da *S. suis* pokazuje visoku otpornost na tetracikline (75,1%) dok je ona znatno manja na gentamicin (1,3%) i na trimetoprim-sulfametoksazolu (6%). U nekim drugim studijama, međutim, utvrđena je visoka otpornost ovog patogena prema penicilinu (**Tarradas i sar., 1994**). **Seol i sar. (1996)** nalaze da je gentamicin imao najbolje dejstvo na *S. suis* (preko 90% osetljivih sojeva), dok je uočena visoka otpornost uzročnika na doksiciklin (70% otpornih sojeva), penicilin (51% otpornih sojeva), amoksicilin (36,4% otpornih sojeva), dok je otpornost na eritromicin i cefaleksin iznosila 9,1 odnosno 15%.

Studije u Kini govore da su β laktamski antibiotici i dalje izbor za lečenje infekcija izazvanih vrstom *S. suis*, dok je visok stepen otpornosti uočen na eritromicin,

klindamicin, tetraciklin, tilmikozin, sulfametoksazol i trimetoprim (**Zhang i sar., 2008**). Desetogodišnja studija u Japanu na 689 sojeva *S. suis* pokazala je da je ova bakterija veoma osetljiva na penicilin, cefazolin, ofloksacin i trimetoprim-sulfametoksazol, dok je 87% bilo otporno na dejstvo tetraciklina a 71,4%, odnosno 29,5% bilo otporno na kanamicin i streptomycin (**Kataoka i sar., 2000**).

Uopšteno gledajući, visok procenat sojeva *S. suis* u većini istraživanja je otporan na makrolide, linkozamine i tetracikline, varijabilno otporan na aminoglikozide i kombinaciju sulfonamid-trimetoprim, a najmanja otpornost je zabeležena na β laktamske antibiotike, vankomicin, hloramfenikol, florfenikol, enrofloksacin i ciprofloksacin.

Većina gena rezistencije na antimikrobne lekove *S. suis* je identifikovana, a među njima su najbolje okarakterisani geni i mehanizmi rezistencije na makrolide (ermB) (**Martel i sar., 2001**), tetracikline (tetM i tetO) (**Aarestrup i sar., 1998**), penicilin (PBP 1, PBP 2 i PBP3), fluorohinolone (point mutacije) i hloramfenikol (transpozoni).

2.14. Lečenje svinja obolelih od meningitisa koji izaziva *S. suis*

Pravovremeno prepoznavanje ranih kliničkih simptoma streptokoknog meningitisa i hitan početak parenteralne terapije pogodnim antibiotikom povećava mogućnost preživljavanja obolelih svinja (**Amass i sar., 1997**). Svinje koje su u ranoj fazi meningitisa je teško primetiti, stoga svinje treba obilaziti 2 do 3 puta dnevno radi kontrole njihovog zdravstvenog statusa. Prema istim autorima treba obratiti pažnju na svinje koje drže uši povijene unazad, žmirkaju očima ili sede u psećem položaju. Dodatna terapija antiinflamatornim lekovima se preporučuje i smanjuje rizik od većih oštećenja mozga. **Clark i sar. (1995)** pokazuju odlične rezultate u lečenju meningitisa koji izaziva *S. suis*, primenom injekcionih preparata penicilina i deksametazona. U perakutnoj formi bolesti, odgovor na antibiotsku terapiju je često nezadovoljavajući i preporučuje se terapija svih svinja iz obora u kojima su nađene naglo uginule svinje

(MacInnes i Desrosiers, 1999). Tretman svinja se može izvršiti pomoću medicinirane vode ili hrane. Zbog mogućeg brzog širenja bolesti, lečenje svinja treba početi što je ranije moguće. Koji god metod lečenja svinja da se primenjuje, važno je primeniti ga najmanje 5 dana (Denicourt i Le Coz, 2000).

2.15. Prevencija bolesti koju izazivaju sojevi *S. suis*

Infekcija koju izaziva *S. suis* obično je multifaktorijalne prirode i na nju utiču zdravstveni status populacije svinja (prateće bolesti i imunosupresija), stepen virulentnosti sojeva *S. suis* uključenih u infekciju i kvalitet ambijentalnih uslova na farmi. Villani (2003) primećuje da pravovremeno uključivanje prasadi u tov, upotreba autogenih vakcina i antibiotika na samom početku tova prasadi doprinosi smanjenom mortalitetu u prasilištu. Prenatrpani obori, loša ventilacija, visoke temperaturne varijacije i mešanje prasadi čija je starosna razlika veća od dve nedelje su verovatno najvažniji stres faktori koji utiču na podložnost svinja na infekciju *S. suis* (Dee i sar., 1993). Praksa gajenja “all-in/all-out” smanjuje učestalost pojave oboljenja. Podela velikih objekata na manje smanjuje temperaturnu razliku i razliku u starosti među svinjama i smanjuje rizik od infekcije. Detaljna sanitacija tovilišta pre useljavanja nove prasadi smanjuje broj bakterija i poboljšava zdravstveni status, dnevni prirast i konverziju hrane. Virusne infekcije potenciraju razvoj infekcije izazivane vrstom *S. suis*.

Iglesias i sar. (1992) dokazuju da su klinički znaci infekcije koju izaziva *S. suis* znatno teži u slučaju prateće virusne infekcije. Opšte je prihvaćeno da infekcija svinja virusom svinjskog reproduktivno-respiratornog sindroma (PRRSV) značajno povećava pojavu sekundarnih bakterijskih infekcija, kao što je infekcija koju izaziva *S. suis*. Ovo je i potvrđeno u eksperimentalnim infekcijama (Galina i sar. 1994; Thanawongnuwech i sar., 2000). Feng i sar. (2001) jasno dokazuju da *in utero* infekcija prasadi izazvane PRRSV čini prasad podložnijom i na infekciju serotipom 2.*S. suis*.

Grupna antimikrobna preventivna medikacija svinja kroz hranu ili vodu, protiv infekcije koju izaziva *S. suis* mora biti bazirana na nekoliko kriterijuma.

Bioraspoloživost, način davanja (hrana ili voda), kompeticija među svinjama (prenatrpani obori) i letalna koncentracija leka u serumu za *S. suis*, moraju se razmotriti pre početka profilaktičkog antimikrobnog tretmana (**Amass i sar., 1997**). Prokain penicilin umešan u hranu dokazano smanjuje pojavu streptokoknog meningitisa kod svinja (**McKellar i sar. 1987**). Oralna administracija prokain penicilina G dovodi do značajne koncentracije u serumu leka iako, kod ljudi ovaj antibiotik ima nisku biološku raspoloživost zbog slabe resorpcije u crevima. Visoka koncentracija penicilina u krvnoj plazmi, dovoljna za dejstvovanje protiv *S. suis*, zabeležena je posle davanja fenoksimetil penicilina.

Prema **del Castillo i sar. (1995)**, od svih tipova oralnih profilaktičkih tretmana sa penicilinom, samo penicilin V rastvoren u vodu daje dovoljne koncentracije u serumu potrebne za dejstvovanje protiv *S. suis*, dok penicilin G jedva da dostiže željene koncentracije. Međutim, umešan u hrani, penicilin V je samo kod nekoliko prasadi postigao potrebnu koncentraciju u serumu za dejstvovanje protiv *S. suis*. Stoga, prema istim autorima, penicilin treba davati samo kroz vodu jer hrana utiče na njegovu raspoloživost.

Prema **Denicourt i Le Coz (2000)** amoksicilin je lek izbora za lečenje i prevenciju meningitisa izazivanog vrstom *S. suis* jer brzo postiže visoke nivoe u plazmi, difunduje dobro u ekstracelularni prostor i potreban je nizak MIC za dejstvo protiv *S. suis*. Osim toga, perzistencija amoksicilina u limfnim čvorovima i tonzilama je dovoljna za kontrolu *S. suis*. Međutim, drugi autori (**Halbur i sar. 2000; Schmitt i sar. 2001**) iznose manje korisne rezultate u terapiji i prevenciji infekcije koju izaziva *S. suis*. Prema ovim autorima, upotreba ampicilina i penicilina G nije značajno uticala na pojavu bolesti kod svinja. Do sada je ustanovljeno da samo terapija ceftiofurom dovodi do smanjenja mortaliteta kod bolesti koju izaziva *S. suis*.

2.16. Imunizacija

Do sada, sve vakcine koje se koriste u zaštiti od infekcije koju izaziva *S. suis* pripadaju grupi autogenih bakterina i rezultati koje ove vakcine pokazuju nisu

zadovoljavajući (**Reams i sar., 1996; Torremorell i sar., 1997; Halbur i sar., 2000**). Uzroci loših rezultata vakcinacije ostaju i dalje nepoznati, ali moguća objašnjenja su degradacija protektivnih antigena i gubitak antigenske funkcije bakterija pod uticajem toplote ili formalina (**Holt i sar., 1990**), produkcija antitela za antigene koji nisu u vezi sa faktorima virulencije (**Holt i sar., 1988**) i slaba imunogenost kapsuliranih bakterija (**del Campo Sepulveda i sar. 1996**).

Pošto su obolele životinje obično starosti između 6 i 10 nedelja, treba uzeti u obzir i uticaj maternalnih antitela za uspešnost vakcinacije. Ovaj uticaj dokazuju **Lapointe i sar. (2002)** u istraživanjima sa serotipom $\frac{1}{2}$ *S. suis* u autogenoj vakcini. Ovi autori su otkrili da je serološki profil antitela protiv ovog serotipa pokazivao značajnu varijaciju kod prasadi starosti od 2 i 4 nedelja starosti, a razlike u nivou antitela mogu se pripisati razlikama u količini maternalnih antitela ili kasnoj resorpciji ovih antitela u crevima prasadi. U ovoj studiji dokazano je da životinje sa najnižim nivoima antitela protiv serotipa $\frac{1}{2}$ *S. suis* bolje odgovaraju na vakcinaciju nego one sa višim nivoima. Adjuvans u vakcinama igra važnu ulogu u vakcinaciji. **Wisselink i sar. (2001)** pokazuju da bakterin u emulziji vode i ulja daje bolje rezultate nego adjuvansi na bazi aluminijum hidroksida. Delimičnu zaštitu prasadi pružaju vakcine od živih avirulentnih sojeva serotipova 2 *S. suis* (**Busque i sar., 1997**). S druge strane, živi akapsularni sojevi ne obezbeđuju zaštitu prasadi od infekcije (**Wisselink i sar., 2002**). Pošto u nekim slučajevima, živi sojevi *S. suis* obezbeđuju sličnu zaštitu kao živi virulentni sojevi, smatra se da važni imunogeni ne pripadaju faktorima virulencije (**Gottschalk i Segura, 2000**). Korišćenjem malih doza virulentnih sojeva *S. suis*, **Schmitt i sar. (2001)** postigli su dobre rezultate u zaštiti prasadi, iako se kod određenog broja prasadi ispoljila virulencija ovih sojeva.

Uloga kapsule u imunizaciji prasadi je i dalje ostaje kontraverzna. Dokazano je da eksperimentalno ili prirodno inficirana prasad serotipom 2 *S. suis*, stvaraju samo niske nivoe antitela protiv kapsularnog polisaharida (**del Campo Sepulveda i sar., 1996**). S druge strane, **Wisselink i sar. (2002)** smatraju da su antitela protiv kapsularnog polisaharida esencijalna za punu zaštitu protiv homologih sojeva *S. suis*. Ostali proteini koji su zapravo faktori virulencije *S. suis* pokazuju mogućnost indukcije

dobre zaštite od infekcije. Prema **Wisselink i sar. (2001)** vakcina koja sadrži MRP i EF proteine kompletno štiti prasid od infekcije virulentnim sojevima serotipa 2 *S. suis*. . Tvrdnja ovih autora je u suprotnosti sa onom koju podržavaju **Jacobs i sar. (1996)**, a koji smatraju da je suilizin jedini protein koji pruža potpunu zaštitu protiv infekcije *S. suis*. Međutim, kao što je ranije i pomenuto, sva tri proteina (MRP, EF i suilizin) nisu prisutna kod svih virulentnih sojeva *S. suis*. Najveći broj eksperimenata vakcinacije do sada je izvršen na prasidima.

Amass i sar. (2000) smatraju da i vakcinacija krmača i nazimica može biti efektivna u pružanju zaštite prasidi od moguće infekcije *S. suis*. **Oliveira i sar. (2001)** smatraju da bi rana kolonizacija prasidi sojevima *S.suis* mogla biti jedna od mera prevencije bolesti. Ovi autori smatraju da je direktna inokulacija prasidi sojevima *S.suis*, koji su prisutni na farmi, mnogo efikasniji metod u smanjenju morbiditeta i mortaliteta nego kolonizacija prasidi pri nosnom kontaktu sa inokulisanim krmačama.

2.17. Iskorenjivanje bolesti

Pokušaji da se iskoreni infekcija uglavnom su bili fokusirani na serotip 2 *S. suis*. Rana medikacija nije dala dobre rezultate jer je *S. suis* veoma dobar kolonizator gornjeg respiratornog sistema. Carski rez krmača radi dobijanja prasidi slobodne od *S. suis* bili su jedan od pokušaja dobijanja populacije svinja slobodnih od *S. suis*. Međutim, i pri ovakvom postupku striktno mere biosigurnosti moraju biti primenjene radi eliminacije glodara i muva (**Amass i sar. 1997**). S obzirom da se infekcija prenosi tokom prašenja i da je izaziva veliki broj serotipova, a da tehnike monitoringa i dijagnostike nisu toliko uspešne u brznoj detekciji infekcije, trebalo bi usmeriti napore ka kontroli bolesti pre nego iskorenjivanju.

2.18. Klinička slika infekcije koju izaziva *S. suis* kod ljudi

Prvi prijavljeni slučaj oboljenja ljudi izazvano *S. suis* datira još iz 1968. godine u Danskoj (Perch i sar., 1968). Od tada je prijavljeno preko 250 slučajeva obolevanja ljudi izazvano ovim patogenom. Iako je u prošlosti bolest koju izaziva *S. suis* smatrana retkim slučajem, u Azijskim zemljama, pre svega Hong Kongu, ova bolest je identifikovana kao treća po izazivanju meningitisa ljudi, odmah posle meningitisa izazvanim *Streptococcus pneumoniae* i *Mycobacterium tuberculosis* (Hui i sar., 2005). Osim Danske, slučajevi ljudi obolelih od infekcije koju izaziva *S. suis* prijavljeni su i u mnogim drugim državama, u Holandiji, Italiji, Velikoj Britaniji, Belgiji, Hrvatskoj, Austriji, Švedskoj, Hong Kongu, Singapuru, Japanu, Kini, Tajlandu, Nemačkoj, Irskoj, Mađarskoj, Francuskoj, Grčkoj, Australiji, Argentini, na Novom Zelandu i Tajvanu (Tabela 4). U Kanadi, državi sa razvijenim svinjarstvom, do sada su prijavljena samo dva slučaja, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama prijavljen samo jedan slučaj infekcije koju izaziva *S. suis* kod ljudi.

Tabela 4. Broj obolelih od infekcije koju izaziva vrsta *S. suis* zabeleženih u svetu (Lun i sar., 2007)

	Zabeleženi slučajevi	Smrtni ishod (%)
Kina	283	54 (19,1%)
Tajland	47	12 (26%)
Holandija	34	1 (3%)
UK	6	1
Nemačka	6	1
Španija	6	0
Francuska	5	1
Hrvatska	4	2
Danska	3	0
Belgija	2	1
Japan	2	0
Italija	2	0
SAD	1	0
Argentina	1	0
Austrija	1	0
Kanada	1	0
Mađarska	1	0
Grčka	1	0
Novi Zeland	1	0
Singapur	1	0
Švedska	1	0
Ukupno	409	73 (17,8%)

Najveći broj infekciju izazvanih *S. suis* kod ljudi se pripisuje sojevima serotipa 2 *S. suis*, uglavnom nakon biohemijske analize komercijalnim biohemijskim kitovima. Međutim, iako proizvođači ovih kitova tvrde da oni mogu razlikovati serotip 2 od serotipa 1 *S. suis*, dokazano je da ne postoji korelacija između određenog serotipa i biohemijskih svojstava istog (**Michaud i sar., 1996**). Osim sojeva serotipa 2 *S. suis*, zabeleženi su slučajevi obolevanja ljudi nakon infekcije drugim serotipovima *S. suis*, i to: serotipom 4 *S. suis* (**Arends i Zanen, 1988**), serotipom 14 *S. suis* (**Gottschalk i sar., 1989**), serotipom 16 *S. suis*. U Hrvatskoj je prijavljen slučaj obolevanja ljudi od infekcije *S. suis* serotip 1, ali su ovi podaci dobijeni samo na osnovu biohemijskih osobina izolovanih sojeva, a ne i nakon serološke tipizacije (**Kopic i sar., 2002**).

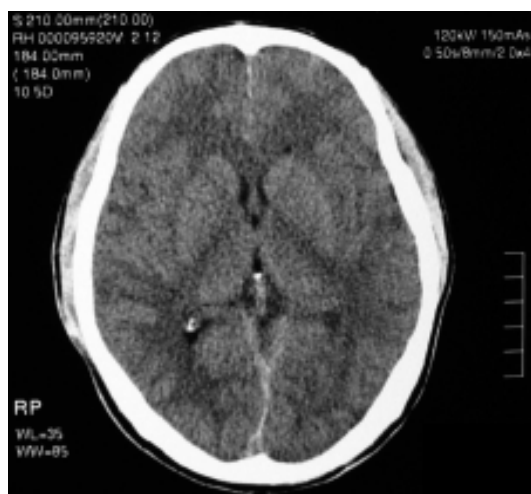
Kod ljudi, *S. suis* obično izaziva gnojni meningitis (**Arends i Zanen, 1988**). Osim meningitisa, neretko se mogu uočiti i endokarditis, celulitis, peritonitis, rabdomioliza, artritis, spondilodiscitis, pneumonija, uveitis i endofamilis (**Wertheim i sar., 2009**). U najvećem broju slučajeva, pojava artritisa je odraz generalizovane septikemije. Osim ovoga, opisani su i slučajevi perakutne infekcije sa šokom i visokom stopom mortaliteta. Inkubacioni period varira od nekoliko sati do 2 dana (**Fongcom i sar., 2001**).

Klinički simptomi bolesti mogu da variraju među obolelim osobama. U akutnoj formi meningitisa, simptomi uključuju groznicu, glavobolju, drhtavicu, mučninu, povraćanje i vrtoglavicu koje obično prate neki od sledećih simptoma: gubitak sluha, nemogućnost hodanja, koma, kočenje vrata, petehije, bolovi u zglobovima, periferna i facijalna paraliza, mialgija, ekhimoze, svrab i rabdomioliza (**Lun i sar., 2007**).

Najznačajnija posledica infekcije prebolelih osoba je gluvoća i/ili vestibularna disfunkcija koje gotovo redovno prate meningitis koji izaziva *S. suis* (**Lutticken i sar., 1996; Huang i sar., 2005; Navacharoen i sar., 2009**). Zabeležena pojava gluvoće nakon infekcije koju izaziva *S. suis* je uvek veća nego posle meningitisa koje izazivaju druge bakterije kao što su *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* i *Hemophilus influenzae*, i iznosi oko 50% u Evropskim zemljama i oko 73% u Aziji (**Walsh i sar., 1992; Navacharoen i sar., 2009**). Razlog ovako visoke pojave gluvoće

koja prati infekciju izazvanu *S. suis* je nepoznat. Gluvoća, unilateralna ili bilateralna je obično veoma izražena i često udružena sa vrtoglavicom. Studije su pokazale da akumulaciju ćelija inflamacije oko vestibularno-kohlearnog (osmog kranijalnog) nerva pri nije dovoljna da bi se poremetila normalna nervna provodljivost. Stoga se kohlearna sepsa, koja se javlja usled prolaska bakterije iz subarahnoidnog prostora u perilimfu preko kohlearnog akvadukta, smatra primarnim razlogom gubitka sluha nakon meningitisa izazvanog vrstom *S. suis* (Walsh i sar., 1992; Huang i sar., 2005). Samo je u jednom slučaju meningitisa koji je bio izazvan *S. suis* dijagnostikovao labyrinthitis ossificans (Navacharoen i sar., 2009).

Poboljšanje čula sluha varira među pacijentima, tako da se stanje kod nekih pacijenata poboljša tokom vremena, dok kod drugih ostaje isto (Wertheim i sar., 2009). Do sada nisu zabeleženi slučajevi gluvoće kod ljudi inficiranih *S. suis* bez znakova meningitisa. Hematološka analiza većine pacijenata sa sistemskom infekcijom koji je izazvao *S. suis* otkriva leukocitozu i neutrofiliju, dok subarahnoidna cerebrospinalna tečnost pacijenata sa meningitisom sadrži visok broj leukocita, visok procenat neutrofila, ima nizak sadržaj šećera i visok nivo proteina (Suankratay i sar., 2004). Kompjuterska tomografija (CT) obično otkriva otok mozga i gubitak kortikalne diferencijacije (Slika 18).



Slika 18. Prikaz CT mozga osobe obolele od meningitisa koji izazivanog vrstom *S. suis* - otok mozga (Sia i sar. 2006)

Infekcija koju izaziva *S. suis* kod ljudi se obično dešava sporadično, nevezano za godišnje doba. Međutim, postoji povećana tendencija infekcija ljudi tokom kišovitih i toplijih meseci (Navacharoen i sar., 2009). Mortalitet varira od 3% u razvijenim zapadnim državama do 26 % u Aziji (Lun i sar., 2007; Wertheim i sar., 2009).

Tipične kliničke karakteristike akutnog meningitisa vezane za infekciju izazvanu *S. suis* su se izmenile posle epidemije u Kineskoj provinciji Sičuan 2005. godine (Normile, 2005). Zvanični izveštaji Nacionalnog instituta za kontrolu i prevenciju zaraznih bolesti Kine ukazuju na podatke od 215 obolelih osoba, od kojih je 39 umrlo (Yu i sar., 2006). Najupadljivija odlika ove epidemije je bila visoka frekvencija sistemskog oboljenja sa relativno malim brojem slučajeva meningitisa. Kliničku prezentaciju u ovoj epidemiji je činio streptokokni toksični šok sindrom (STSS) (Yu i sar., 2006; Tang i sar., 2006). Toksični šok sindrom je dobro definisan sindrom koji izazivaju streptokoke A grupe i ređe neke druge streptokoke. U akutnoj formi toksičnog septičnog šoka, osim visoke temperature, drhtavice, glavobolje, povraćanja, vrtoglavice i bolova u stomaku uočeni su i drugi klinički znaci kao što je hipotenzija, tahikardija, otkazivanje funkcije jetre, potkožna krvarenja (purpura fulminans) (Slika 19), diseminovana intravaskularna koagulacija (DIC), akutno otkazivanje bubrega i respiratornih organa.



Slika 19. Purpura fulminans pri STSS koga je izazvao *S. suis* (Yu i sar., 2007)

Osim Kine, slučajevi STSS opisani su i kod 10 pacijenata na Tajlandu, čija je klinička manifestacija bolesti bila slična onoj u Kini (**Wangkaew i sar., 2006**). Nešto ranije zabeležen je i slučaj septičnog šoka radnika sa farme svinja koji nije bio izazvan serotipom 2 već serotipom 14 *S. suis* (**Watkins i sar., 2001**).

Postoji veliki broj opisanih patoloških i histopatoloških nalaza svinja uginulih od *S. suis* infekcije. Najznačajnije promene su kongestija meningi, limfnih čvorova, pluća, dok se najčešće histopatološke promene uočavaju u horoidnom pleksusu. Na pacijentima obolelim od *S. suis* meningitisa **Mazokopakis i sar. (2005)** su primetili veoma povećanu količinu cerebrospinalne tečnosti. Prema **Zhu i sar. (2005)** patološke promene kod uginulih svinja i preminulih pacijenata su slične. Obdukcijom pacijenata, koji su umrli od septičnog šoka, isti autori su prijavili veliki broj promena na organima, pre svega masovne hemoragije, naročito u stomaku i nadbubrežnim žlezdama, kongestiju leptomeningi, edem mozga, hiperemiju miokarda, diseminovanu intravaskularnu koagulaciju (DIC) i nemogućnost koagulisanja krvi, kao i ostale znake septikemije.

2.19. Dijagnoza infekcije koju izaziva *S. suis* kod ljudi

Za razliku od dijagnoze ove infekcije kod svinja, gde se ovaj patogen često može izolovati, situacija u dijagnostici infekcije ljudi je sasvim suprotna. Iako se bolest javlja sporadično, najčešće se ona pogrešno dijagnostikuje usled sličnosti ove bakterije sa mikroorganizmima sličnih osobina. Iako *S. suis* veoma dobro raste na podlogama koje se koriste za izolovanje bakterija koje izazivaju meningitis, veliki broj laboratorija najčešće nije svestan mogućnosti izolacije ovog patogena i često ga pogrešno identifikuju kao *Enterococcus* vrste, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, viridans *Streptococcus* ili čak kao *Listeria monocytogenes*.

Donsakul i sar. (2003) nalaze da je čak pet od osam infekcija koje izaziva *S. suis* pogrešno dijagnostikovano kao infekcije koje su bile izazvane viridans streptokokama. Pomenuti autori smatraju da se pogrešna dijagnoza postavlja uglavnom na osnovu bojenja po Gramu preparata iz cerebrospinalne tečnosti i na osnovu biohemijskih karakteristika. Takođe, naglašavaju da laboratorije moraju imati u vidu

pojavljivanje meningitisa izazvanih ovom bakterijom, posebno u oblastima sa intenzivnim svinjarstvom.

2.20. Terapija infekcije izazvane vrstom *S. suis* kod ljudi

Sojevi *S. suis* su obično osetljivi na penicilin, stoga je intravenski penicilin G antibiotik koji se i najčešće primenjuje kod infekcije ovom bakterijom. Međutim, treba naglasiti da su sojevi, otporni na penicilin, zabeleženi i kod infekcija ljudi (**Shneerson i sar., 1980**), dok je broj takvih sojeva kod prasadi daleko veći (**Marie i sar., 2002; Huang i sar., 2005**).

Osim penicilina, ceftriakson, cefotaksim, ampicilin, gentamicin, vankomicin i hloramfenikol se mogu koristiti u terapiji meningitisa (**Wangkaewa i sar., 2006; Lun i sar., 2007**). Preporučuje se lečenje ljudi antibioticima najmanje 14 dana. U dva do sada zabeležena slučaja došlo je do remisije bolesti 2 i 4 nedelje posle prestanka terapije (**Woo i sar., 1987; Kay i sar., 1995**). Rani početak terapije antibioticima nema uticaja na pojavu gubitka sluha posle meningitisa (**Lutticken i sar., 1986**). Smatra se da uključivanje deksametazona u terapiju daje povoljne rezultate u sprečavanju ozbiljnih oštećenja sluha (**Fittipaldi i sar., 2009**), dok prema drugim autorima deksametazon nema uticaja na ovu posledicu meningitisa (**Navacharoen i sar., 2009**).

Prema velikom broju autora, infekciju koju izaziva *S. suis* kod rizičnih grupa ljudi donekle je moguće sprečiti biološkim sigurnosnim merama, pogotovo ukoliko se ima u vidu da je *S. suis* slabo otporan na deterdžente i dezinficijense koji se redovno koriste na savremenim farmama svinja i klanicama.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Imajući u vidu literaturne podatke i sopstvena preliminarna ispitivanja, za cilj ove doktorske disertacije postavljeno je da se ispita prisustvo pojedinih serotipova *Streptococcus suis* na nekim farmama u Republici Srbiji.

Radi ispunjenja postavljenog cilja definisani su sledeći zadaci:

- da se ispita mogućnost preliminarne biohemijske identifikacije sojeva *Streptococcus suis* na osnovu određenog broja konvencionalnih biohemijskih testova
- da se ispituju biohemijske karakteristike izolovanih sojeva *Streptococcus suis* uz primeu komercijalnih testova
- da se ispita mogućnost identifikacije drugih bakterija sličnih morfoloških i biohemijskih osobina i njihova eventualna pogrešna identifikacija kao *Streptococcus suis*
- da se ispita mogućnost izolacije *Streptococcus suis* od živih, uginulih ili zaklanih svinja, kao i sa noževa za evisceraciju organa u klanici
- da se ispita prisustvo pojedinih serotipova *Streptococcus suis* na nekim farmama u Republici Srbiji
- da se ispita osetljivost izolovanih sojeva *Streptococcus suis* na antibiotike i hemioterapeutike koji se najčešće koriste u veterinarskoj i humanoj medicini za lečenje infekcija izazvanih ovom vrstom bakterije

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorkovanje i transport

U ispitivanjima je analizirano 226 uzoraka, od čega 81 bris nazofaringealnih tonzila klinički zdrave prasadi u tovu, 32 brisa nosa klinički zdrave prasadi u tovu, 11 briseva nazofaringealnih tonzila prasadi starosti 5 dana, 12 briseva nazofaringealnih tonzila klinički zdrave prasadi starosti 20 dana, 30 delova nazofaringealnih tonzila klinički zdravih tovnih svinja, 23 uzorka nazofaringealnih tonzila klinički zdrave prasadi u tovu, 5 briseva noževa sa klanica, 14 nasumičnih briseva trupova zaklanih svinja, 18 briseva organa (pluća, trbušna duplja, zglobovi) naglo uginule prasadi. Oznaka, poreklo i lokacija uzoraka prikazani su u tabeli koja sledi (**tabela 5**).

Tabela 5. Poreklo i lokacija uzorka

Mesto uzorkovanja	Vrsta uzorka	Kategorija životinja	Broj uzoraka
Farma svinja	bris tonzila	prasad u tovu	81
Farma svinja	bris nosa	prasad u tovu	32
Farma svinja	bris tonzila	prasad starosti 5 dana	11
Farma svinja	bris tonzila	prasad starosti 20 dana	12
Klanica	deo tonzile	tovne svinje	30
Klanica	cela tonzila	prasad u tovu	23
Klanica	bris noža	/	5
Klanica	bris trupa	tovne svinje	14
Klanica	bris organa	uginula prasad	18

Svi uzorci su, u roku od dva časa po uzorkovanju, transportovani do laboratorije u tripton soja bujonu. Odmah nakon transportovanja, uzorci su zasejavani na Columbia krvni agar (bioMerieux) i inkubirani 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije, izrasle kolonije, koje su ispoljile osobine kolonija roda *Streptococcus*, presejavane su do dobijanja čistih kultura.

4.2. Ispitivanje uzoraka

4.2.1. Hranljive podloge

U ispitivanjima su korišćene sledeće čvrste i tečne hranljive podloge : Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, moždano-srčana infuzija sa dodatkom 6,5% soli natrijum hlorida (BHI + 6,5% NaCl), tripton soja bujon (TSB), eskulin bujon, Andrade ugljenohidratni bujon sa indikatorom i trehalozom/salicinom.

Tripton soja bujon (Trypton soya broth, TSB, Oxoid) ima sledeći hemijski sastav:

- pankreasni digest kazeina	17,0 g;
- NaCl	5,0 g;
- pankreasni digest soje	3,0 g;
- dikalijum fosfat (K_2HPO_4)	2,5 g;
- glukoza	2,5 g;
- destilovana voda	1000,0 ml;

pH podloge treba da bude $7,3 \pm 0,2$ na 25°C .

Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana TSB podloga, u količini od 30,0 g, rastvorena u destilovanoj vodi i količina ukupne mešavine je dovedena do zapremine od 1000,0 ml. Nakon temeljnog mešanja i rastapanja, gotova podloga je razlivena u

epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 15 psi.

Podloga je korišćena za prenos briseva i uzoraka tkiva.

Moždano-srčana infuzija sa dodatkom 6,5% soli natrijum hlorida (BHI + 6,5% NaCl, BD diagnostic systems) ima sledeći hemijski sastav:

- | | |
|---------------------------------------------------------|------------|
| - pankreasni digest želatina | 14,5 g; |
| - moždano-srčani bujon | 6,0 g; |
| - pepsin digest animalnih tkiva | 6,0 g; |
| - NaCl | 5,0 g; |
| - glukoza | 2,0 g; |
| - dinatrijum fosfat (Na ₂ HPO ₄) | 2,5 g; |
| - destilovana voda | 1000,0 ml; |

pH podloge treba da bude pH 7,4 ± 0,2 na 25°C.

Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana podoga, u količini od 36,0 g, uz dodatak 60,0 g natrijum hlorida (NaCl), rastvorena u destilovanoj vodi i količina ukupne mešavine je dovedena do zapremine od 1000,0 ml. Nakon rastapanja, gotova podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 15 psi.

Podloga je korišćena za diferenciranje bakterija roda *Streptococcus*, koje ne mogu da rastu u prisustvu 6,5% NaCl, od bakterija roda *Enterococcus*, koje rastu u ovom medijumu.

Eskulin bujon (Esculin broth) ima sledeći hemijski sastav:

- | | |
|----------------------------------------|----------|
| - goveđe srce (suva materija infuzije) | 500,0 g; |
| - triptoza | 10,0 g; |

- NaCl 5,0 g;
- Agar 1,0 g;
- eskulin 1,0 g;
- destilovana voda 1000,0 ml;

pH podloge treba da bude $7,0 \pm 0,2$ na 25°C .

Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana podoga, u količini od 30,0 g, rastvorena u destilovanoj vodi i količina ukupne mešavine je dovedena do zapremine od 1000,0 ml. Nakon temeljnog mešanja i rastapanja, gotova podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 15 psi.

Podloga je korišćena za diferenciranje bakterija na osnovu njihove sposobnosti da hidrolizuju eskulin.

Andrade ugljenohidratni bujon sa indikatorom (Andrade's carbohydrate broth and indicator) ima sledeći hemijski sastav:

- pankreasni digest želatina 10,0 g;
- NaCl 10,0 g;
- ekstrakt goveđeg mesa 3,0 g;
- ugljenohidratni rastvor 100,0 ml;
- Andrade indikator 10,0 ml;
- destilovana voda 1000,0 ml;

pH podloge treba da bude $7,2 \pm 0,2$ na 25°C .

Za pripremu 26,0 ml *Andrade indikatora* korišćeno je 16,0 ml 1N rastvora NaOH, 0,21 g kiselog fuksina i destilovana voda.

Ugljenohidratni rastvor je pripremljen dodavanjem 5,0 g trehaloze ili salicina u destilovanu vodu do volumena od 100,0 ml. Nakon temeljnog mešanja, rastvor je sterilisan metodom filtracije.

Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana podoga, u količini od 23,0 g, uz dodatak Andrade indikatora, rastvorena u destilovanoj vodi i količina ukupne mešavine je dovedena do zapremine od 1000,0 ml. Nakon temeljnog mešanja i kuvanja do ključanja, rastvor je ohladjen. U 900,0 ml dobijenog rastvora dodato je aseptično 100,0 ml rastvora trehaloze ili salicina, temeljno promešano i razliveno u epruvete.

Podloga je korišćena za utvrđivanje sposobnosti bakterija da vrše fermentaciju trehaloze ili salicina.

MRVP bujon (MRVP broth, Methyl red Voges-Proskauer broth, BD diagnostic systems) ima sledeći hemijski sastav:

- | | |
|-----------------------------------------------------|------------|
| - glukoza | 5,0 g; |
| - kalijum fosfat (KH ₂ PO ₄) | 5,0 g; |
| - pankreasni digest kazeina | 3,5 g; |
| - pepsin digest životinjskog tkiva | 3,5 g; |
| - destilovana voda | 1000,0 ml; |

pH podloge treba da bude $6,9 \pm 0,2$ na 25°C.

Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana podoga, u količini od 17,0 g, rastvorena u destilovanoj vodi i količina ukupne mešavine je dovedena do zapremine od 1000,0 ml. Nakon temeljnog mešanja i rastapanja, gotova podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na temperaturi od 121°C i pritisku od 15 psi.

Podloga je korišćena za diferenciranje bakterija na osnovu njihove sposobnosti da stvaraju acetoin iz dekstroze (VP test, Voges-Proskauer).

Boje

Set za bojenje po Gramu

4.2.2. Identifikacija sojeva *Streptococcus suis*

Sve čiste kolonije, za koje je utvrđeno da pokazuju karakteristike kolonija roda *Streptococcus*, su ispitivane sledećim testovima u cilju identifikacije *S. suis*:

1. Karakteristika rasta (izgled kolonija i hemoliza na Columbia krvnom agaru sa 5% ovčije krvi);
2. Mikroskopski pregled;
3. Testovi katalaze (sa 3% vodonik peroksidom) i oksidaze (Diatabs™, Rosco Diagnostica A/S, DK-2630, Taastrup) sa kolonijama iz tripton soja bujona.
4. Preliminarni biohemijski testovi (razlaganje eskulina, fermentacija trehaloze i salicina, stvaranje acetoina iz glukoze i rast u podlozi sa 6,5% NaCl)
5. Biohemijski profil, primenom API 20 STREP
6. Biohemijski profil, primenom rapid ID32 STREP
7. Serološka tipizacija, precipitacijom sa serumima specifičnim za kapsularne antigene *S. suis* (Neufeld test - Quellung reakcija).

4.2.2.1. Kulturelne osobine

Na agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi *S. suis* je rastao u vidu sitnih, prozirnih kolonija, obično metalnog ili braon odsjaja. *S.suis* na agaru sa dodatkom ovčije krvi pokazuje uvek α hemolizu, te su samo takve kolonije uzete u obzir za dalju identifikaciju.

4.2.2.2. Mikroskopski izgled

Na preparatima bojenim po Gramu, *S. suis* je, kao i sve streptokoke, sitna, gram pozitivna koka, koja se u preparatima iz tečnih podloga nalazi pojedničano, u paru ili u

kraćim lancima, dok se u preparatima sa čvrstih podloga češće može uočiti u manjim ili većima grupicama.

4.2.2.3. Katalaza i oksidaza testovi

Sve α hemolitične streptokoke su zasejavane u tripton soja bujon i inkubirane 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima, a zatim ispitivane na prisustvo enzima katalaze i oksidaze. Svi sojevi koji su bili oksidaza i katalaza negativni dalje su ispitivani.

4.2.2.4. Preliminarna biohemijska identifikacija

Sve α hemolitične streptokoke (oksidaza i katalaza negativne) su podvrgnute preliminarnim biohemijskim testovima, i to: testu razlaganje eskulina, testu fermentacije trehaloze i salicina, testu rasta u bujonu sa dodatkom 6,5% NaCl i VP (Voges-Proskauer) testu (prema **Tarradas i sar., 1994; Gottschalk i sar. 1991**). Sve streptokoke koje su pokazale kulturne, mikroskopske i biohemijske osobine, koje odgovaraju karakteristikama *S. suis* u preliminarnim testovima ispitivane su standardizovanim biohemijskim sistemima, i to: API 20 STREP i rapid ID32 STREP.

4.2.2.4.1. Razlaganje eskulina

Bakterijske kulture sumnjive na *S. suis* su zasejane u eskulin bujon i inkubirane 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije, test razlaganja eskulina je interpretiran na dva načina: pod UV lampom i dodavanjem gvožđe-citrata. Sposobnost bakterije da razlaže eskulin je očitavana je pod UV lampom gde se uočavalo gubljenje opalescence bujona ili na osnovu stvaranja crne boje u bujonu nakon dodavanja gvožđe-citrata.

4.2.2.4.2. Fermentacija trehaloze i salicina

Svi ispitivani sojevi su zasejani u Andrade trehaloza i Andrade salicin bujon sa indikatorom i inkubirani 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Promena boje bujona iz crvenog u narandžastu (žutu) označavana je kao pozitivna reakcija u razlaganju ispitivanih šećera.

4.2.2.4.3. Stvaranje acetoina (acetilmetilkarbinola) iz glukoze (Voges-Proskauer test)

Svi ispitivani sojevi su blagom inokulacijom zasejani u 1 ml MRVP bujona i inkubirani 5 dana na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije u svaku epruvetu je dodato 15 kapi KOH i 5 kapi α naftola. Epruvete su, zatim, protrešene radi kontakta sa vazduhom. Nakon 15-30 minuta očitavana je reakcija. Pojava jasne crvene boje u epruveti je predstavljala pozitivnu VP reakciju.

4.2.2.4.4. Rast u medijumu sa 6,5% NaCl

Svi ispitivani sojevi su blagom inokulacijom zasejani u hranljivu podlogu sa dodatkom 6,5% NaCl i inkubirani 72 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Podloge su proveravane svakoga dana, a svaka pojava zamućenja bujona pre isteka roka od 72 časa smatrana je pozitivnom reakcijom.

4.2.2.5. Identifikacioni sistem API 20 STREP

Identifikacioni sistem API 20 STREP je standardizovana metoda, koja kombinuje 20 biohemijskih testova i omogućava identifikaciju grupe ili vrste najvećeg broja streptokoka koje se sreću u medicinskoj bakteriologiji.

Test se sastoji od 20 mikrotuba, koje sadrže dehidrovane substrate za dokazivanje enzimske aktivnosti fermentacije šećera. Mikrotube se inokulišu gustom

suspencijom čiste kulture bakterija, koja u isto vreme služi i za rehidraciju enzimskih substrata. Krajnji metabolički proizvodi, koji se dobijaju nakon inkubacije, se utvrđuju na osnovu spontanijih reakcije u promeni boja ili nakon dodavanja regenasa. Fermentacija ugljenih hidrata se utvrđuje na osnovu promene pH vrednosti u mikrotubi i promenom boje. Reakcije u mikrotubama se očitavaju na osnovu interpretacija reakcija, pri čemu se identifikacija dobija uvidom u analitički indeks profila ili korišćenjem identifikacionog softvera.

Kit API 20 STREP sadrži: 25 API 20 STREP testova (stripova), 25 inkubacionih kutija, 25 ampula GP medijuma, 25 obrazaca za očitane rezultate, 25 briseva i 1 uputstvo za upotrebu. Dodatni regensi i oprema, koji su potrebni za izvođenje testa, a koji nisu uključeni u standardni API 20 STREP kit, su: suspenzioni medijum (demineralizovana voda), ninhidrin reagens (NIN), VP 1 (40% KOH u demineralizovanoj vodi), VP 2 (6% α -naftol u etil alkoholu), ZYME A, ZYME B, mineralno ulje, McFarland standard br. 4 i API 20 STREP analitički indeks profila ili identifikacioni softver.

4.2.2.5.1. Izvođenje API 20 STREP testa

Nakon identifikacije pripadnosti bakterije rodu *Streptococcus* (gram pozitivna, katalaza negativna koka) i uočavanja vrste hemolize na krvnom agaru, pikira se jedna izolovana kolonija, suspenduje i dobro homogenizuje u 0,3 ml sterilne vode. Ovom suspencijom se inokuliše cela površina Columbia krvnog agara, direktno ili putem sterilnog brisa, a zatim agar inkubira 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Nakon inkubacije, kolonije bakterija se sterilnim brisem unose u suspenzioni medijum dok se ne dobije suspenzija gustine 4 McFarland standarda. Ovom suspencijom se inokuliše prva polovina stripa (od VP do ADH). Sterilnom pipetom (uz izbegavanje formiranja balončića) se u testove VP do LAP unosi oko 100 μl (oko 3 kapi iz Pasterove pipete) suspenzije, a ADH test se napuni do granice tubice. Ostatak suspenzije (oko 0,5 ml) se prebaci u GP medijum i dobro izmeša. Ova nova suspenzija se distribuira u drugi deo stripa (RIB do GLYG) do granice tubice. Inokulacija stripa se

završava dodavanjem mineralnog ulja u kupole testova od ADH do GLYG dok se ne formira konveksni meniskus. Stripovi se postavljaju na plastični nosač, čiji se bazenčići pre zatvaranja napune sterilnom vodom radi održavanja vlage u testu.

Zatvoreni test se inkubira 4 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, nakon čega se očitavaju prvi rezultati, i još 20 časova, kada se očitavaju drugi rezultati. Nakon 4 časa inkubacije na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u VP test se dodaje jedna kap VP 1 i VP 2 reagensa, a u HIP test - 2 kapi NIN reagensa, dok se u testove od PYRA do LAP dodaje po jedna kap ZYM A i ZYM B reagensa. Nakon 10 minuta čitaju se reakcije na osnovu tabele reakcija, koja se nalazi u uputstvu za upotrebu. Ukoliko je potrebno, strip treba izložiti jakom svetlu (10 sekundi ispod lampe od 1000W), kako bi se obezbojio višak reagenasa u tubama PYRA do LAP. Ukoliko se za 4 časa ne može doći do biohemijskog profila (nije došlo do promena boje u testovima ADH do GLYG), stripovi su reinkubiraju još 20 časova i nakon toga dobijaju definitivni biohemijski profili. Nakon 24 časa inkubacije ponovo se očitavaju reakcije u testovima ESC, ADH i RIB do GLYG, dok se reakcije u testovima VP do LAP, koje su dobijene nakon 4 časa inkubacije, ne očitavaju ponovo. Rezultati dobijeni nakon 24 časa inkubacije se upisuju u obrasce za očitavanje reakcija. Identifikacija sojeva se izvodi pomoću softverskog programa ApiWeb™ product no. 41207, VC 04/2005, bioMérieux® SA, 69280 Marcy l'Etoile, France. Najčešće reakcije koje *S. suis* prema uputstvu proizvođača pokazuje na API 20 STREP sistemu prikazani su u **tabeli 6** dok su pozitivna i negativna kontrola testova prikazani na **slikama 20 i 21**.

Tabela 6. Identifikaciona tabela za *S. suis*; pozitivne reakcije nakon 4/24 časa inkubacije na temperaturi od 35-37°C (%)

serotip	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
<i>S. suis</i> I	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91
<i>S. suis</i> II	0	1	70	41	91	91	52	3	100	95
serotip	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
<i>S. suis</i> I	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89
<i>S. suis</i> II	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96



Slika 20. Negativna kontrola API 20 STREP testa



Slika 21. Pozitivna kontrola API 20 STREP testa

4.2.2.6. Rapid ID 32 STREP identifikacioni sistem

Rapid ID 32 STREP je standardizovani sistem za identifikaciju streptokoka, enterokoka i njima srodnih bakterija u roku od 4 časa, za šta koriste 32 minijturna enzimska testa, koji sadrže dehidrovane substrate. Nakon 4 časa inkubacije na temperaturi od 37°C \pm 1°C u aerobnim uslovima, reakcija u testovima se očitava vizuelno, a identifikacija se dobija pomoću identifikacionog softvera.

Rapid ID 32 STREP kit sadrži: 25 rapid ID 32 STREP stripova, 25 inkubacionih poklopaca i 1 uputstvo za upotrebu. Dodatni reagensi i oprema, koji su potrebni za izvođenje testa, a koji nisu uključeni u standardni rapid ID 32 STREP kit, su: suspenzioni medijum 2 ml (demineralizovana voda), ninhidrin reagens (NIN), FB reagens, VP A + VP B reagensi i ApiWeb™ identifikacioni softver.

4.2.2.6.1. Izvođenje rapid ID 32 STREP testa

Nakon identifikacije pripadnosti bakterije rodu *Streptococcus* (gram pozitivna, katalaza negativna koka) i uočavanja vrste hemolize na krvnom agaru, pikira se po jedna izolovana kolonija, suspenduje u 0,3 ml sterilne vode i dobro homogenizuje. Ovom suspenzijom se inokuliše cela površina Columbia krvnog agara, direktno ili putem sterilnog brisa, a zatim se agar inkubira anaerobno 24 časa na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije, kolonije bakterija se sterilnim brisem suspenduju u 2 ml suspenzionog medijuma dok se ne napravi suspenzija gustine 4 McFarland standarda. Nakon dobre homogenizacije medijuma, u svaku test kupolu se unosi po 55 μl suspenzije pomoću graduirsane pipete, stavljaju poklopci, i test kupule inkubiraju na temperaturi od $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ u vremenu od 4 do 4 ½ časa. Nakon inkubacije, u kupulu VP testa se doda jedna kap VP A i VP B reagensa, u kupule testova od APPA do GTA se dodaje po jedna kap FB reagensa, a u kupulu HIP testa jedna kap NIN reagensa. Testovi se očitavaju nakona 5 minuta. Ostalim testovima u stripu se ne dodaju reagensi i oni se očitavaju odmah po vađenju stripova. Sojevi su identifikovani pomoću softverskog programa ApiWeb™ product no. 41207, VC 04/2005, bioMérieux® SA, 69280 Marcy l'Etoile, France. Najčešće reakcije koje *S. suis* prema uputstvu proizvođača pokazuje na Rapid ID 32 STREP sistemu prikazane su u **tabeli 7** dok su pozitivna i negativna kontrola testova prikazan na **slikama 22 i 23**.

Tabela 7. Identifikaciona tabela za *S. suis*; pozitivne reakcije nakon 4 ½ časa inkubacije na temperaturi od 36°C ± 2°C (%)

serotip	ADH	βGLU	βGAR	βGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC	TRE
<i>S. suis</i> I	95	60	36	99	85	9	0	5	0	98	100
<i>S. suis</i> II	99	85	25	90	100	1	0	1	0	99	99
serotip	RAF	VP	APPA	βGAL	PYRA	βNAG	GTA	HIP	GLYG	PUL	MAL
<i>S. suis</i> I	0	0	100	15	50	40	45	0	85	100	0
<i>S. suis</i> II	100	0	100	36	30	10	41	0	99	99	100
serotip	MEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	MβDG	TAG	βMAN	CDEX		URE
<i>S. suis</i> I	0	100	15	50	40	45	0	85	2		0
<i>S. suis</i> II	0	100	36	30	10	41	0	99	5		2



Slika 22. Negativna kontrola rapid ID 32 STREP testa



Slika 23. Pozitivna kontrola rapid ID 32 STREP testa

4.2.2.7. Serološka tipizacija *S. suis*

Definitivna identifikacija *S. suis* obavljena je serološkom tipizacijom – precipitacijom sa serumima specifičnim za kapsularne antigene *S. suis* (Statens serum institut, Artillerivej 5, 2300 Copenhagen, Denmark), Neufeld testom (Quelling reakcija), prema uputstvu proizvođača.

4.2.2.7.1. Neufeld test (*Quellung reakcija*)

Svi sojevi, koji su nakon API 20 STREP ili rapid ID 32 STREP testa ukazivali na identifikaciju *S. suis*, presejani su na Columbia agar sa 5% ovčije krvi i inkubirani 18 časova na temperaturi od $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u aerobnim uslovima. Na mikroskopsku pločicu je stavljena jedna manja kap fiziološkog rastvora i u nju razmućena manja količina bakterijske kulture sa krvnog agara. Zatim je dodata ista količina specifičnog antiseruma, dobro promešana sa suspenzijom bakterija na mikroskopskoj pločici i odmah prekrivena pokrovnom ljusticom kako se ne bi osušila. Ovako pripremljen mikroskopski preparat je posmatran na faznom mikroskopu. Svaka pojava vidljivosti kapsule (tzv. otečena kapsula) označavala je pozitivnu reakciju. U slučaju negativne reakcije, postupak je ponavljan sa specifičnim serumima za druge serotipove do pojave pozitivne reakcije.

4.2.2.8. Ispitivanje osetljivosti *S. suis* na antimikrobne lekove

Ispitivanje osetljivosti sojeva *S. suis* izvedeno je disk - difuzionom metodom po Bauer-Kirby na Mueller Hinton agaru sa 5% ovčije krvi, korišćenjem diskova proizvođača BD diagnostics prema uputstvu proizvođača.

4.2.2.8.1. Disk - difuziona metoda

Čiste kolonije *S. suis* su sterilnim brisem sa Columbia agara koji sadrži 5% ovčije krvi prenešene su u epruvete sa 5 ml fiziološkog rastvora dok se nije dostiglo zamućenje od 0,5 McFarland standarda. Odmah zatim je novi sterilni bris uronjen u

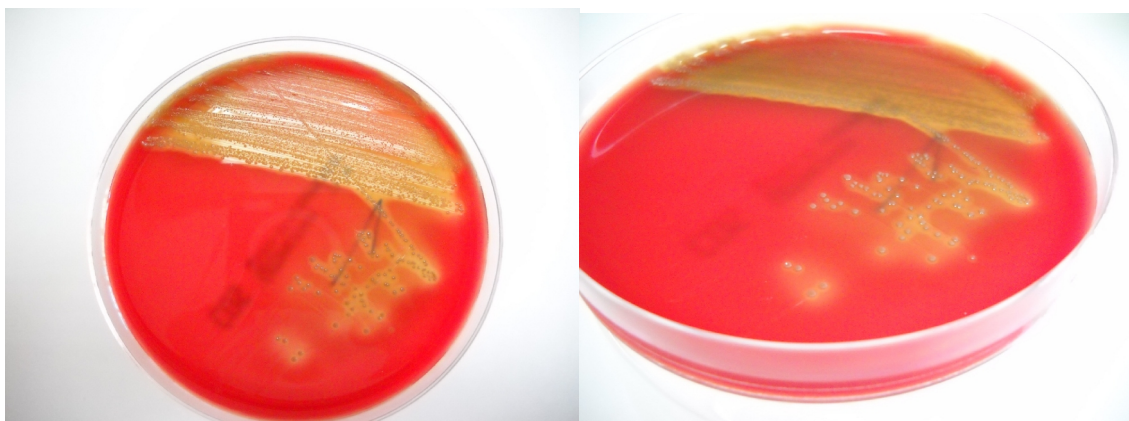
epruvete i nakon blagog ceđenja pamučnog vrha o zidove epruvete, njime je inokulisana cela površina Mueller Hinton agara sa 5% ovčije krvi. Nakon sušenja površine agara, posle 3-5 minuta, BD dispenzerom su sterilno nanešeni diskovi impregnirani antimikrobnim lekovima.

U ispitivanju osetljivosti izolovanih sojeva *S. suis* korišćeni su sledeći antibiotici i hemoterapeutski lekovi : penicilin G (P) (10µg), amoksicilin (AMX) (25µg), tetraciklin (TE) (30µg), sulfametoksazol+trimetoprim (SXT) (25µg), linkomicin (L) (15µg), klindamicin (CC) (2µg), eritromicin (E) (15µg), azitromicin (AZM) (15µg), , ciprofloksacin (CIP) (5µg), cefaleksin (CN) (30µg), cefotaksim (CTX) (30µg), ceftriakson (CRO) (30µg), cefepim (FIP) (30µg), hloramfenikol (C) (30µg) i vankomicin (Va) (30µg).

5. REZULTATI

5.1. Preliminarna biohemijska identifikacija *S. suis*

Od 226 uzoraka analiziranih u ovom ispitivanju, preliminarnim biohemijskim i kulturelnim testovima podvrgnuta su 134 uzorka, s obzirom da su dobijene kolonije bakterija u ovim uzorcima ispunjavale uslove koje primarno karakterišu *S. suis*, pre svega α hemolizu na Columbia krvnom agaru. Kolonije nastale nakon inkubacije ostala 92 uzorka, a imale su morfološke osobine streptokoka, na agaru sa dodatkom ovčije krvi ili nisu davale hemolizu (γ hemoliza) ili su davale β hemolizu, što nije karakteristika *S. suis*, i kao takve su eliminisane iz dalje identifikacije. Podloge za ispitivanje eskulina i trehaloze su inkubirane 24 časa na temperaturi od 37°C prema uputstvu proizvođača. Vreme nakon koga je očitavan test rasta u podlozi sa 6,5% NaCl je bilo 72 časa, dok je VP test konačno očitavan nakon 5 dana prema uputstvu proizvođača.



Slika 24 . Jasna zona α hemolize, koju *S. suis* daje na Columbia agaru sa 5% ovčije krvi

Rezultati preliminarnе identifikacije po broju ispitivanih bakterijskih sojeva prikazani su u **Tabeli 8**.

Tabela 8 . Rezultati preliminarnе biohemijske identifikacije

N°	Broj uzoraka	Preliminarna identifikacija			
		6,5% NaCl	Esc	Tre	VP
1.	40	-	+	+	-
2.	13	-	+	-	-
3.	36	-	-	-	-
4.	18	+	+	+	-
5.	6	-	+	+	+
6.	12	-	-	+	-
7.	9	+	+	+	+

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je 40 izabranih sojeva primenom metoda za preliminarnu identifikaciju (pozitivan test razlaganja eskulina, pozitivan test fermentacije trehaloze, negativan test rasta u 6,5% NaCl i negativan VP testa) prema **Tarradas i sar. (1994)** ispunili uslove, te su ti sojevi korišćeni za dalju identifikaciju *S. suis*. Od 94 bakterijska soja, koja nisu ispunjavala uslove preliminarnе identifikacije, 13 sojeva nije fermentisalo samo trehalozu, 12 sojeva nije vršilo hidrolizu eskulina, 36 sojeva nije razlagalo i trehalozu i eskulin, 18 sojeva je raslo u bujonu sa 6,5% NaCl, 6 sojeva je bilo pozitivno u VP testu, dok je 9 sojeva raslo u bujonu sa 6,5% NaCl i bilo pozitivno u VP testu. Bakterije, za koje se javila sumnja da imaju osobine *S. suis*, testirane su dodatno na test fermentacije salicina.

U **tabeli 9** su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem 40 izolata bakterija koje su ispunile uslove preliminarnе biohemijske identifikacije kao i stvarni rezultati identifikacije nakon dodatnih biohemijskih testova i serološke tipizacije.

Tabela 9 . Rezultati preliminarne biohemijske identifikacije

N°	Br. uzorka	Preliminarna identifikacija					Konačna identifikacija
		6,5% NaCl	Esc	Tre	VP	Sal	
1.	3BN	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
2.	14VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
3.	26VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
4.	3TP	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
5.	2TP	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
6.	49VF	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
7.	51VF	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
8.	64VF	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
9.	30TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
10.	40VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
11.	39VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
12.	43VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
13.	5BP	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
14.	4TP	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
15.	8TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
16.	5TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
17.	7BTUP	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
18.	25TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
19.	1BTUP	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
20.	24TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
21.	12BTR	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
22.	15TS	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
23.	17VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
24.	42VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
25.	22VF	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
26.	15VFN	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
27.	26VFN	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
28.	10VFN	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
29.	17TP	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
30.	31VFN	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
31.	13VFN	-	+	+	-	+	<i>S.suis</i>
32.	23MF20	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
33.	1MF5	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
34.	1BZ	-	+	+	-	-	<i>S.suis</i>
35.	2BP	-	+	+	-	-	nepoznato
36.	15VF	-	+	+	-	+	<i>S. sanguinis</i>
37.	43VF	-	+	+	-	+	<i>S. parasanguinis</i>
38.	68VF	-	+	+	-	+	<i>S. sanguinis</i>
39.	19MF20	-	+	+	-	+	<i>S. sanguinis</i>
40.	7MF5	-	+	+	-	+	<i>S. sanguinis</i>

Osim *S. suis*, dodatno su biohemijski ispitivane i bakterije koje nisu ispunile uslove preliminarne biohemijske identifikacije, a rezultati identifikacije ovih bakterija prikazani su u **Tabeli 10**.

Sojevi bakterija, koje su ispunile uslove preliminarne identifikacije prema **Tarradas i sar. (1994)**, kasnije su dodatno biohemijski i serološki ispitivane nakon čega su konačni rezultati biohemijske identifikacije upoređeni sa rezultatima dobijenim u preliminarnoj identifikaciji.

Tabela 10. Izolovani sojevi koji nisu ispunili uslov preliminarne identifikacije

N ^o	Br. uzoraka	Preliminarna identifikacija					Konačna identifikacija
		6,5% NaCl	Esc	Tre	VP	Sal	
1.	18	+	+	+	-	+/-	<i>A. viridans</i> , <i>E. faecium</i> <i>G. sanguinis</i>
2.	9	+	+	+	+/-	+/-	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
3.	6	-	+	+	+	+/-	<i>S. bovis</i> <i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i> <i>S. salivarius</i>
5.	36	-	-	-	-	+/-	<i>S. oralis</i> <i>S. mitis</i> <i>S. sanguinis</i>
6.	12	-	-	+	-	+/-	<i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i>
7.	13	-	+	-	-	+/-	<i>S. sanguinis</i> <i>S. salivarius</i>

5.2. Biohemijske osobine *S. suis* i upotreba identifikacionih sistema u dijagnostici

Do kasnih 70-tih godina prošlog veka mikrobiolozi su se u dijagnozi oslanjali na izolaciju bakterija uz pomoć kultivacije na hranljivim podlogama (bujonima, agarima i drugim specijalnim podlogama). Nakon *in vitro* kultivacije bakterija na standardnim mikrobiološkim podlogama, njihovih biohemijskih i metaboličkih karakteristika vršena je identifikacija. Izolacija infektivnog agensa iz kliničkih uzoraka obično zahteva vreme od 24 do 48 časova, dok biohemijski identifikacioni protokol zahteva najčešće još dodatnih 24 časa inkubiranja.

Brza postavljanje dijagnoze infekcije je i dalje glavni izazov sa kojim se susreću laboratorije kliničke mikrobiologije, a od brzine dijagnoze i naknadnog određivanja pravilne antimikrobne terapije zavisi klinički ishod bolesti. Zbog toga, od 60-tih godina prošlog veka kada su nastali, pa sve do danas, manuelni minijturni biohemijski identifikacioni sistemi, a kasnije i automatski, postaju standard u mikrobiološkim laboratorijama. Komercijalni identifikacioni sistemi, koji se danas koriste, uglavnom spadaju u neku od sledećih pet kategorija: sistemi kojima se može registrovati promena pH, enzimski identifikacioni sistemi, sistemi vizuelne detekcije bakterijskog rasta i sistemi detekcije masnih kiselina gasnom hromatografijom.

Identifikacija bakterija i gljivica olakšana je primenom kompjuterskog softvera i kompjuterski generisanih numeričkih kodova, koji opisuju biohemijske osobine mikroorganizama. Numerički kodovi se generišu na osnovu metaboličkog profila svakog mikroorganizma. Svaka metabolička reakcija ili fenotip se prevodi u dva moguća odgovora, i to: plus (+) za pozitivnu reakciju i minus (-) za negativnu reakciju. Pozitivne ili negativne reakcije se prevode u numeričke kodove i kao takve čuvaju u kompjuterskoj bazi podataka. Kada se dobije metabolički profil određenog mikroorganizma i on prevedu u numeričke kodove, procenat verovatnoće tačne identifikacije se određuje na osnovu upoređivanja ovog profila sa već poznatim profilima određenih mikroorganizama, koji se nalaze u bazi podataka. Što je više mikroorganizama uključeno u bazu podataka, određivanje roda i vrste je preciznije.

Utvrđivanje karakterističnih biohemijskih osobina bakterije *S. suis* u ovom ispitivanju vršeno je primenom biohemijskih identifikacionih sistema API 20STREP i rapid id32 STREP, koji su, za sada, jedini identifikacioni sistemi na tržištu Republike Srbije a koji u svojoj bazi podataka imaju *S. suis*. Sve bakterije, koje su ispunile uslove preliminarne biohemijske identifikacije testirane su jednim od ovih biohemijskih identifikacionih sistemima, pri čemu je 20 bakterija testirano primenom API 20 STREP identifikacionim sistemom, dok je ostalih 20 bakterija testirano rapid id32 STREP identifikacionim sistemom.

Rezultati analize biohemijskih osobina, dobijeni primenom identifikacionog sistema API 20 STREP, prikazani su u **tabelama 11 i 12**.

Tabela 11. Broj pozitivnih reakcija kod 18 serološki potvrđenih sojeva *S. suis* testiranih primenom API 20 STREP identifikacionog sistema

<i>S. suis</i>	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
	0	0	18	1	16	18	15	4	18	13
	<i>RIB</i>	<i>ARA</i>	<i>MAN</i>	<i>SOR</i>	<i>LAC</i>	<i>TRE</i>	<i>INU</i>	<i>RAF</i>	<i>AMD</i>	<i>GLYG</i>
	0	0	1	0	18	18	17	9	18	18

Tabela12. Procentualna vrednost pozitivnih reakcija kod 18 serološki potvrđenih sojeva *S. suis* testiranih primenom API 20 STREP identifikacionog sistema

<i>S. suis</i>	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH
	0	0	100	5,6	88,9	100	83,3	22,2	100	72,2
	<i>RIB</i>	<i>ARA</i>	<i>MAN</i>	<i>SOR</i>	<i>LAC</i>	<i>TRE</i>	<i>INU</i>	<i>RAF</i>	<i>AMD</i>	<i>GLYG</i>
	0	0	5,6	0	100	100	94,4	50	100	100

Rezultati rapid id32 STREP testa za 16 sojeva, koji su naknadnom serotipizacijom definitivno identifikovani kao *S. suis*, prikazani su u **tabelama 13 i 14**.

Tabela 13. Broj pozitivnih reakcija od 16 serološki potvrđenih sojeva *S. suis* testiranih primenom rapid id32 STREP identifikacionim sistemom

<i>S.suis</i>	ADH	βGLU	βGAR	βGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC		
	15	16	16	14	16	0	0	0	0	16		
	TRE	RAF	VP	APPA	βGAL	PYRA	βNAG	GTA	HIP	GLYG		
	16	16	0	16	15	14	4	15	0	16		
<i>S.suis</i>	PUL	MAL	MEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	MβDG	TAG	βMAN	CDE	URE
	16	16	2	0	16	0	0	15	9	1	0	0

Tabela 14. Procentualna vrednost pozitivnih reakcija od 16 serološki potvrđenih sojeva *S. suis* testiranih primenom rapid id32 STREP identifikacionim sistemom

<i>S.suis</i>	ADH	βGLU	βGAR	βGUR	αGAL	PAL	RIB	MAN	SOR	LAC		
	93,8	100	100	87,5	100	0	0	0	0	100		
	TRE	RAF	VP	APPA	βGAL	PYRA	βNAG	GTA	HIP	GLYG		
	100	100	0	100	93,4	87,5	25	93,4	0	100		
<i>S.suis</i>	PUL	MAL	MEL	MLZ	SAC	LARA	DARL	MβDG	TAG	βMAN	CDE	URE
	100	100	12,5	0	100	0	0	93,4	56,3	6,3	0	0

5.3. Prevalencija serotipova *S. suis* na ispitivanim farmama svinja

Serotipizacija bakterija, koje su API 20 STREP i rapid id32 STREP sistemima identifikovane kao *S. suis*, izvedena je serumima specifičnim za kapsularne antigene *S. suis* (Statens serum institut, Danska), Neufeld testom (Quellung reakcija), prema uputstvu proizvođača. Rezultati serotipizacije i poreklo uzorka prikazani su u **tabeli 15**.

Tabela 15 . Rezultati serotipizacije i poreklo uzorka

N°	Br. uzorka	Poreklo uzorka	serotip
1.	3BN	Bris noža na klanici	<i>S. suis</i> serotip 2
2.	14VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
3.	26VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 1
4.	3TP	Deo nazofaringealne tonzile praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
5.	2TP	Deo nazofaringealne tonzile praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
6.	49VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 1
7.	51VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
8.	64VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
9.	30TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 7
10.	40VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 9
11.	39VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
12.	43VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
13.	2BM	Bris meningi uginulog praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
14.	4TP	Deo nazofaringealne tonzile praseta	<i>S. suis</i> serotip 7
15.	8TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 2
16.	5TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 2
17.	7BTUP	Bris trbušne duplje uginulog praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
18.	25TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 2
19.	1BTUP	Bris trbušne duplje uginulog praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
20.	24TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 2
21.	12BTR	Bris trupa na klanici	<i>S. suis</i> serotip 2
22.	15TS	Deo nazofaringealne tonzile tovljenika	<i>S. suis</i> serotip 7
23.	17VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
24.	42VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 7
25.	22VF	Bris tonzila/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 7
26.	15VFN	Bris nosa/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
27.	26VFN	Bris nosa/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 7
28.	10VFN	Bris nosa/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 2
29.	17TP	Deo nazofaringealne tonzile praseta	<i>S. suis</i> serotip 2
30.	31VFN	Bris nosa/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 9
31.	13VFN	Bris nosa/prase u tovu	<i>S. suis</i> serotip 9
32.	23MF20	Bris tonzila/prase starosti 20 dana	<i>S. suis</i> serotip 2
33.	1MF5	Bris tonzila/prase starosti 5 dana	<i>S. suis</i> serotip 2
34.	1BZ	Bris zgloba uginulog praseta	<i>S. suis</i> serotip 2

Od 35 ispitanih izolata primenom specifičnih antiseruma za kapsularne polisaharide *S. suis*, serološka je tipizirano 34 izolata, dok jedan izolat nije mogao biti identifikovan antiserumima za *S. suis*

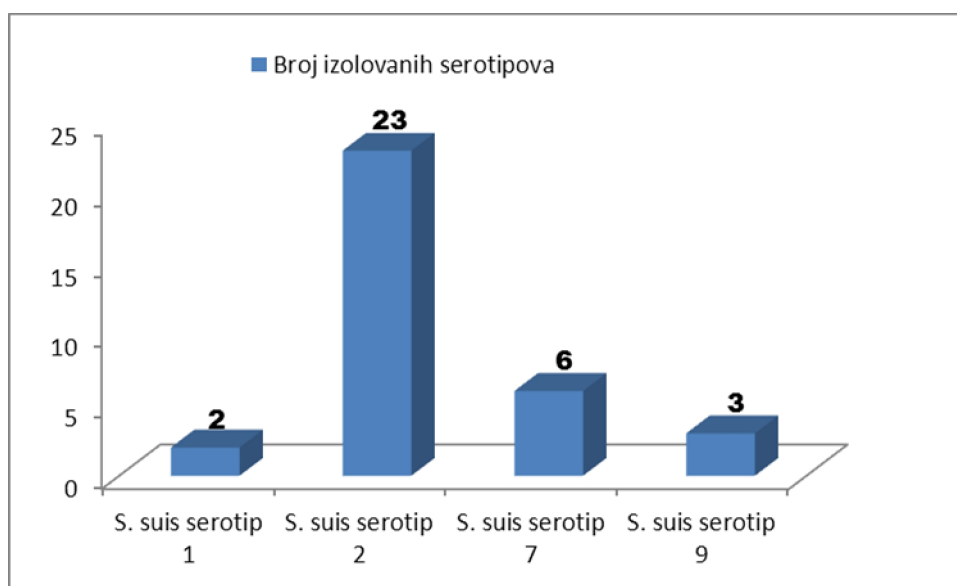
Od 226 uzoraka bolesnih i zdravih svinja, kao i briseva klaničnih instrumenata, *S. suis* je identifikovana u 34 slučaja, što iznosi 15%. Ako se izuzme slučaj izolovanja ovog patogena sa noža za evisceraciju organa u klanici, onda se može računati da su izolovana 33 soja *S. suis* iz briseva ili delova tkiva 221 živih, uginulih ili zaklanih svinja. Stoga se može konstatovati da je *S. suis* bila zastupljena kod 14,93 % svinja. Brisevi od živih jedinki u ovom istraživanju su uzimani od svinja svih starosnih kategorija. Od 11 prasadi starosti 5 dana, *S. suis* je izolovana u jednom slučaju, što čini prevalenciju od oko 9%. Isti rezultati su dobijeni izolacijom *S. suis* kod prasadi u starosti od 20 dana. Kod klinički zdrave prasadi u tovu (starosti oko 50 dana), iz 81 brisa nazofaringealnih tonzila, *S. suis* je izolovana u 10 slučajeva, što odgovara prevalenciji od 12,35%. Procenat izolovanja ovog patogena iz celih (prasad) ili delova (tovljenici) nazofaringealnih tonzila na klanici je nešto veći i iznosio je 18,9%, budući da je iz 53 uzoraka tonzila (30 od tovljenika i 23 od prasadi) *S. suis* izolovan u 10 slučajeva. Izolacija *S. suis* iz noseva klinički zdrave prasadi zabeležena je u pet slučajeva od ukupno 32 uzeta nosna brisa što iznosi oko 15,6 %).

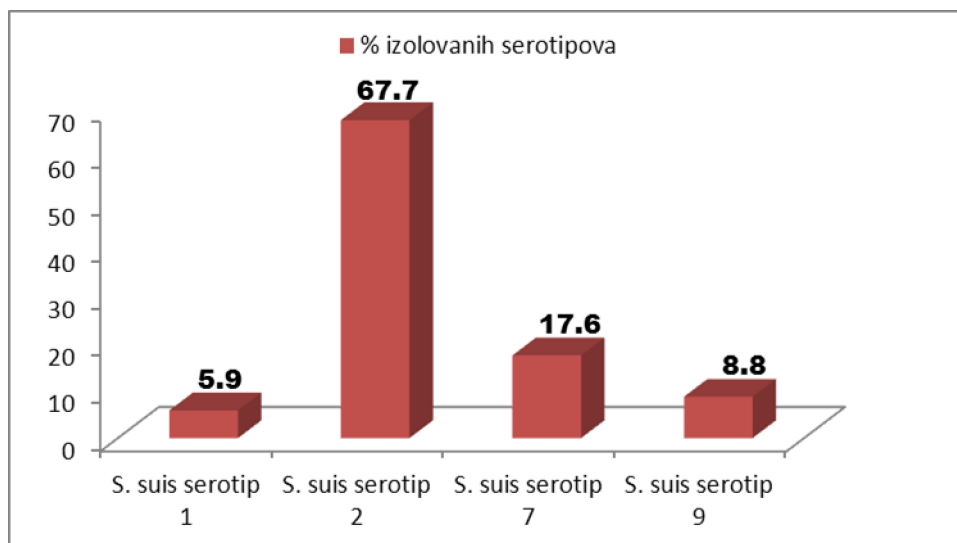
Od 18 briseva organa naglo uginule prasadi, *S. suis* je izolovana iz 2 brisa (11,1%) organa trbušne duplje, i po jednog brisa meningi i zglobova. *S. suis* je, takođe, izolovana i sa jednog od pet briseva noževa za evisceraciju organa u klanici, kao i sa jednog brisa obrađenog svinjskog trupa.

U ovim istraživanjima, koja su jednim delom izvedena na farmama Republike Srbije, izolovane su 4 serotia *S. suis*. Izolovani serotipovi *S. suis*, njihov broj i procentualna zastupljenost pojedinih serotipova prikazani su u **tabeli 16** i **grafikonima 1 i 2**.

Tabela 16 . Prikaz broja izolovanih serotipova *S. suis*

serotip	Broj izolovanih serotipova	%
<i>S. suis</i> serotip 1	2	5,9
<i>S. suis</i> serotip 2	23	67,7
<i>S. suis</i> serotip 7	6	17,6
<i>S. suis</i> serotip 9	3	8,8

Grafikon 1 . Broj izolovanih serotipova *S. suis*



Grafikon 2 . Procentualno učešće *S. suis* u izolovanim serotipovima

Na osnovu podataka iz **tabele 17** i **grafika 2** može se uočiti da najveću prevalenciju među izolovanim sojevima, koja iznosi 67,7%, ima serotip 2 *S. suis*, zatim slede *S. suis* serotip 7 sa prevalencijom od 17,6%, *S. suis* serotip 9 sa prevalencijom od 8,8%, i *S. suis* serotip 1 sa prevalencijom od 5,9%. Serotip 2 *S. suis* u ovom istraživanju je izolovan kako iz briseva nazofaringealnih tonzila prasadi, celih ili delova tonzila prasadi i svinja, tako i iz nosnih šupljina prasadi, ali i iz briseva organa uginule prasadi, briseva trupova zaklanih svinja i brisa uzetih sa noža za evisceraciju organa na klanici. Međutim, *S. suis* serotip 9 je u ovim istraživanjima izolovan iz jednog brisa tonzila praseta i iz dva brisa nosa prasadi, a nije izolovan iz briseva obolelih svinja. Slično ovom serotipu, ni serotipovi 1 i 7 *S. suis* nisu izolovani u slučajevima naglo uginule prasadi. Serotip 1 *S. suis* je izolovan samo iz briseva nazofaringealnih tonzila prasadi, dok je serotip 7 *S. suis* izolovan iz briseva nazofaringealnih tonzila, delova nazofaringealnih tonzila, ali i iz briseva nosa prasadi.

5.4. OSETLJIVOST SOJEVA *S. SUIIS* NA ANTIBIOTIKE

Korišćeni dijametri zona u ispitivanju osetljivosti *S. suis* na antimikrobne lekove su bili u skladu sa preporukama CLSI za gram pozitivne bakterije izolovane kod životinja (CLSI M31-S1, 2002; CLSI M31-A2, 2004), kao i u skladu sa dijametrima zona koje preporučuje proizvođač (BD diagnostics). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 su referentni sojevi korišćeni za kontrolu izvođenja metode osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike.

Rezultati ispitivanja osetljivosti na antibiotike i hemioterapeutike izolovanih sojeva *S. suis* prikazani su u **tabeli 17**. Od 34 izolovana soja *S. suis*, 32 su bila osetljiva na dejstvo penicilina, amoksicilina, ciprofloksacina, eritromicina i azitromicina, zatim, 2 soja su bila osetljiva na dejstvo sulfametoksazola i trimetoprima, dok su svi sojevi *S. suis* bili osetljivi na dejstvo cefaleksina, cefotaksima, ceftriaksona, cefepima, vankomicina i hloramfenikola. Svi ispitivani sojevi su bili rezistentni na tetraciklin, linkomicin i klindamicin.

Tabela 17 . Prikaz osetljivost izolovanih sojeva *S. suis* na antibiotike i hemioterapeutike

N°	Uzorak/ bris	ANTIBIOTICI														
		P	Amx	Te	Sxt	L	E	Cc	Azm	Cip	Cn	Ctx	Cro	Fep	Va	C
1	3BN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2	14VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	26VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	3TP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5	2TP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
6	49VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	51VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
8	64VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
9	30TS	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10	40VF	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
11	39VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
12	43VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
13	5BP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14	4TP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
15	8TS	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
16	5TS	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
17	7BTUP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
18	25TS	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
19	1BTUP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
20	24TS	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
21	12BTR	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
22	15TS	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
23	17VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
24	42VF	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
25	22VF	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
26	15VFN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
27	26VFN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
28	10VFN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
29	17TP	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
30	31VFN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
31	13VFN	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
32	23MF20	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
33	1MF5	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
34	1BZ	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Broj osetljivih i otpornih sojeva *S. suis* na ispitivane antimikrobne lekove i njihovo procentualno učešće prikazani su u **tabelama 18 i 19** i **grafikonima 3 i 4**.

Tabela 18. Broj osetljivih i rezistentnih sojeva *S. suis* na ispitivane antimikrobne lekove

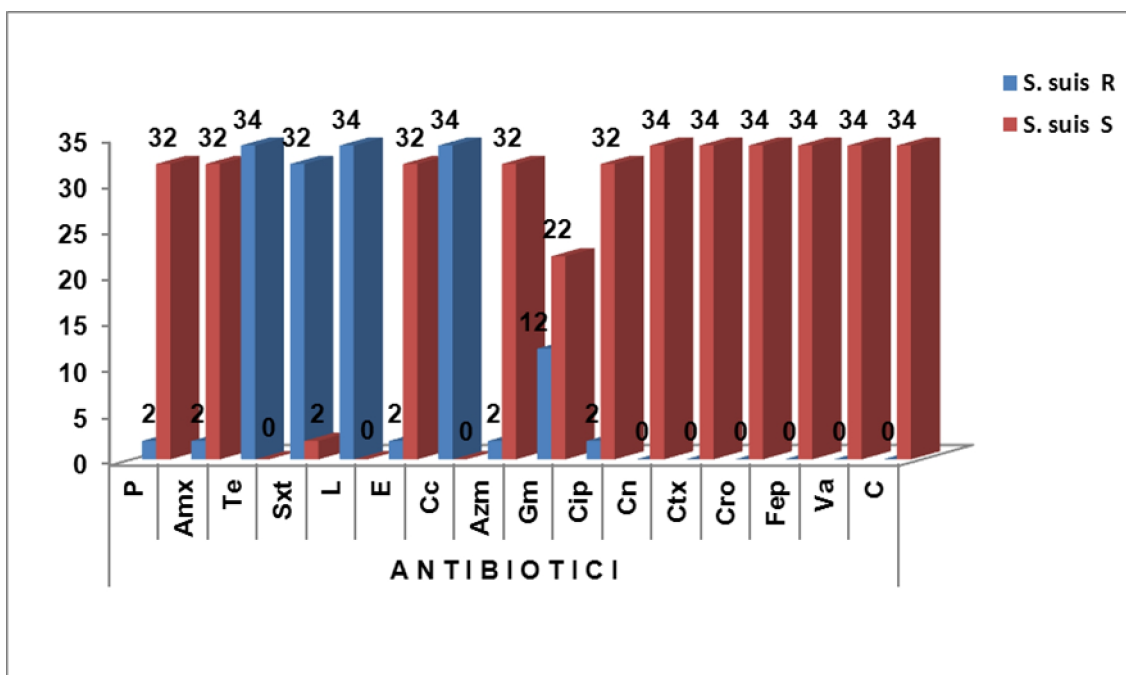
<i>S. suis</i>	Osetljivost	ANTIBIOTICI														
		P	Amx	Te	Sxt	L	E	Cc	Azm	Cip	Cn	Ctx	Cro	Fep	Va	C
R		2	2	34	32	34	2	34	2	2	0	0	0	0	0	0
S		32	32	0	2	0	32	0	32	32	34	34	34	34	34	34

*R – Otporan (Resistant); S – Osetljiv (Sensitive)

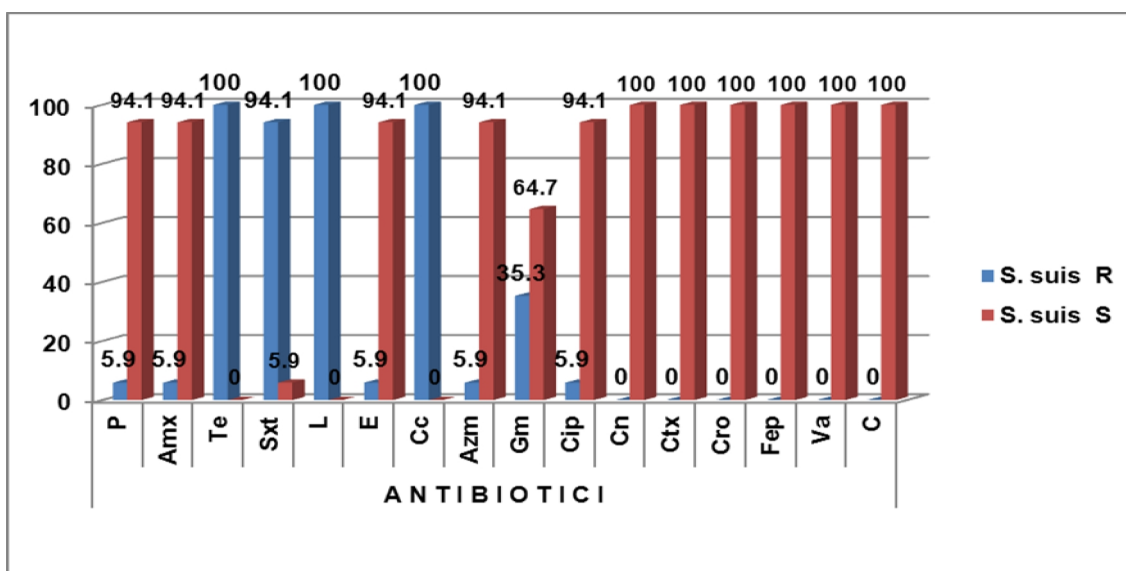
Tabela 19. Procenat osetljivih i rezistentnih sojeva *S. suis* na ispitivane antimikrobne lekove

<i>S. suis</i>	Osetljivost	ANTIBIOTICI														
		P	Amx	Te	Sxt	L	E	Cc	Azm	Cip	Cn	Ctx	Cro	Fep	Va	C
R		5,9	5,9	100	94,1	100	5,9	100	5,9	5,9	0	0	0	0	0	0
S		94,1	94,1	0	5,9	0	94,1	0	94,1	94,1	100	100	100	100	100	100

*R – Otporan (Resistant); S – Osetljiv (Sensitive)



Grafik 3. Broj osetljivih i rezistentnih sojeva *S. suis* na ispitivane antimikrobne lekove



Grafik 4. Procenat osetljivih i rezistentnih sojeva *S. suis* na ispitivane antimikrobne lekove

6. DISKUSIJA

Identifikacija, odnosno dijagnoza infekcije izazvane vrstom *S. suis* u mikrobiološkim laboratorijama, pogotovo pri oboljenju ljudi, ostaje dijagnostički izazov, imajući u obzir da se ova bakterija često pogrešno identifikuje kao *Enterococcus* vrsta, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus bovis*, viridans *Streptococcus* ili čak kao *Listeria monocytogenes*. Stoga se radi adekvatnog lečenja obolelih često koristi brza preliminarna identifikacija izolovanih sojeva klasičnim i komercijalnim biohemijskim testovima. U našem istraživanju se sasvim solidno pokazala metoda preliminarne identifikacije po **Tarradas i sar. (1994)** dok su brzi komercijalni testovi **API 20 STREP** i **Rapid ID 32 STREP** pokazali izuzetnu preciznost identifikacije.

Komparacijom rezultata preliminarne identifikacije sa rezultatima konačne identifikacije, uočava se da je metodom prema **Tarradas i sar. (1994)** u ovom slučaju postignuta tačnost identifikacije od 85% (34 od 40), što predstavlja veoma visok procenat, ako se ima u vidu broj testova, relativno lako njihovo izvođenje i ekonomska računica. Nedostatak testova preliminarne identifikacije *S. suis* je, svakako, dugo vreme izvođenja jer je za njihovo kompletiranje potrebno vreme od 5 dana, što se pre svega odnosi na izvođenje VP testa. Međutim, dobijeni rezultati za VP test ukazuju na neophodnost primene ovog testa u preliminarnoj biohemijskoj identifikaciji *S. suis*. U ovom ispitivanju primenom VP testa je veoma efikasno vršena diferencijacija *S. suis* i *S. bovis*, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili **Tarradas i sar. (1994)**, iako, prema ovim autorima, rezultati mogu biti lažno negativni. U našem ispitivanju primećena je pojava lažno negativnih VP testova kasnije, naročito ukoliko je inkubacija bila kraća od 72 časa, što i jeste u skladu sa istraživanjima **Tarradas i sar. (1994)**. Osim pomenutog, primećeno je da su neke bakterije koje daju negativan VP test pri klasičnim testovima u epruvetama, pokazale pozitivne VP rezultate u bateriji API 20 STREP i id32 STREP testova i, prema ovim identifikacionim sistemima, uvek jasno identifikovane kao *S. bovis*. Osim diferencijacije *S. suis* od *S. bovis*, VP test je, u jednom slučaju briseva uzetih kod prasadi starosti 5 dana, eliminisao kasnije identifikovan *Lactococcus lactis*

ssp cremoris, bakteriju koja se često može naći u mleku i nema značajnu ulogu u kliničkoj veterinarskoj mikrobiologiji. Lažno negativni rezultati za VP test u epruvetama, ali i pozitivan za rast u bujonu sa 6,5% NaCl, su u jednom slučaju dobijeni i kod bakterije, koja je naknadno API 20 STREP sistemom identifikovana kao *Enterococcus faecium*, i u ovim testovima pokazala VP pozitivnu reakciju. *E. faecalis* je u ovom ispitivanju bila imala sposobnost da raste u bujonu sa 6,5% NaCl i davala je pozitivan VP test. Bilo koji od ova dva testa može se koristiti za razlikovanje *S. suis* od *Enterococcus faecium*. Stoga, možemo zaključiti da je rast u bujonu sa 6,5% NaCl kritičan u preliminarnoj identifikaciji *S. suis*, što je u skladu sa nalazima drugih autora (**Kilper-Balz i Schleifer, 1987; Higgins i Gottschalk, 1990; Gottschalk i sar., 1991; Tarradas i sar., 1994**). Osim diferencijacije *S. suis* i bakterija roda *Enterococcus*, uočeno je da je ovaj test kritičan i u preliminarnoj diferencijaciji od *Aerococcus viridans* i *Globicatella sanguinis*, naročito iz briseva nosa i tonzila. Test hidrolize eskulina i u našem ispitivanju pokazao se veoma dobrim u diferencijaciji *S. suis* i viridans streptokoka *S. mitis* i *S. oralis*, koja ne razlaže eskulin, a u određenom broju slučajeva i *S. sanguinis*, iako je ova bakterija češće varijabilna u hidrolizi eskulina. Međutim, primećeno je da serološki potvrđeni sojevi *S. suis* u nekim slučajevima mogu davati nejasne reakcije hidrolize eskulina, ali je pojava sumnjivih reakcija ovih sojeva bila retka. Na osnovu ovih podataka može se konstatovati da je razlaganje eskulina osobina koja karakteriše *S. suis*, što je u skladu sa tvrdnjama **Tarradas i sar. (1994)**, koji ovaj test smatraju kritičnim u preliminarnoj identifikaciji *S. suis*. Fermentacija trehaloze u ovom ispitivanju je pokazala da se na osnovu ovog testa može isključiti *S. mitis*, ređe *S. oralis* koji neretko fermentiše trehalozu, dok *S. sanguinis* samo u jednom slučaju nije fermentisala trehalozu. U jednom slučaju test fermentacije trehaloze je bio kritičan za eliminaciju *S. salivarius* iz dalje identifikacije, iako se ova bakterija najčešće razlikuje od *S. suis* po pozitivnom VP testu.

Sojevi bakterija, koji su ispunili uslove preliminarne identifikacije prema **Tarradas i sar. (1994)**, kasnije su dodatno biohemijski i serološki okarakterisani, a konačni rezultati identifikacije upoređeni su sa rezultatima preliminarne identifikacije. Dobijeni rezultati govore u prilog tvrdnji koju iznosi **Facklam (2002)**, da je veoma

teško razlikovati *S. suis* od viridans streptokoka koje imaju slične biohemijske osobine i koje često mogu biti varijabilne u velikom broju biohemijskih testova. Ovo se, pre svega, odnosi na viridans streptokoke sanguinis grupe (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis*), od kojih je značajan broj (15%) ispunio uslove preliminarne identifikacije, a čije kulturelne i biohemijske osobine mogu potpuno odgovarati osobinama nekih sojeva *S. suis*.

Test fermentacije salicina, koji je dodatno urađen a koji predlažu **Higgins i Gottschalk (1990)** i **Gottschalk i sar. (1991)**, prema rezultatima dobijenim u našim istraživanjima, nije doprineo tačnosti rezultata preliminarne biohemijske identifikacije, iako ovi rezultati podržavaju tvrdnje navedenih autora da sojevi *S. suis* ne mogu biti negativni istovremeno u testu fermentacije trehaloze i salicina. Naime, prema ovim rezultatima, 38,2% (13 od 34) serološki tipiziranih sojeva *S. suis* nije razlagalo salicin, iako su svi dali pozitivan rezultat u fermentaciji trehaloze. Ovo je u skladu sa tvrdnjama **Tarradas i sar. (1994)**, koji smatraju da fermentacija salicina ne treba da bude indikator u identifikaciji *S. suis*. Stoga se može konstatovati da test fermentacije salicina ne treba da bude jedan od testova u preliminarnoj identifikaciji *S. suis*. Osim ovoga, **Higgins i Gottschalk (1990)** i **Gottschalk i sar. (1991)** u svoje testove preliminarne identifikacije *S. suis* ne uključuju test hidrolize eskulina, koji je prema našim rezultatima jedan od kritičnih testova u identifikaciji *S. suis*. Konačnom identifikacijom sojeva *S. suis* i analizom ovih rezultata utvrđeno je da svi sojevi, nezavisno od serotipa, vrše hidrolizu eskulina. Ukoliko bi se ovaj test isključio iz preliminarne identifikacije, dobijeni rezultati bi, svakako, umanjili tačnost identifikacije *S. suis*. Stoga, dobijeni rezultati podržavaju tvrdnje **Tarradas i sar. (1994)** da je hidroliza eskulina osobina *S. suis*, koja ima značaj u njegovoj identifikaciji.

Dobijeni rezultati preliminarne identifikacije prema **Tarradas i sar. (1994)** govore u prilog činjenici da izvođenje samo ova četiri testa nije dovoljno za definitivnu identifikaciju *S. suis*. Uzimajući u obzir činjenicu da je ovom metodom tačno dijagnostikovano 34 od 40 sojeva *S. suis*, može se zaključiti da su testovi prema pomenutim autorima sasvim solidna polazna tačka u dijagnostici oboljenja, odnosno,

infekcija izazvanih bakterijom *S. suis*, i kao takvi se mogu koristiti u manje opremljenim laboratorijama, koje nemaju mogućnosti obavljanja definitivne dijagnoze.

API 20 STREP i **Rapid ID 32 STREP** su pokazali izuzetnu tačnost s obzirom sa su svi sojevi koji su ovim sistemima identifikovani kao *S. suis* potvrđeni naknadnom serotipizacijom. Rezultati biohemijske identifikacije i karakterizacije serološki identifikovanih sojeva *S. suis* između korišćenih API 20 STREP i rapid id32 STREP identifikacionih sistema u ovom istraživanju pokazivali su značajne podudarnosti, ali i značajne razlike. Ove razlike se primarno odnose na ekspresiju onih enzima i fermentaciju onih šećera koji, prema gotovo svim autorima, i pokazuju osobinu varijabilnosti. Istovremeno sa identifikacijom biohemijskih osobina pomoću pomenutih sistema, sumirani su i utisci o njihovoj pouzdanosti u identifikaciji istih. Može se konstatovati da, iako je vreme za izvođenje ovog testa oko 24 časa i iako je složeniji za izvođenje, API 20 STREP daje daleko pouzdanije rezultate biohemijske identifikacije i karakterizacije *S. suis*. Nakon 24 časa inkubacije sistema, svaki pozitivan test produkcije enzima i identifikacije fermentacije šećera može se lako razlikovati od negativnog na osnovu promene boje, sa ili bez dodavanja reagenasa. Rapid id32 STREP identifikacioni sistem, iako brži i lakši za izvođenje, često pokazuje nedostatke u intenzitetu promene boja. Međutim, značajnija diferencijacija jasne promene boje na ovom sistemu se najčešće može uočiti u delu sistema na kome se nalaze testovi fermentacije šećera. Imajući u vidu da je *S. suis* najčešće varijabilna u fermentaciji velikog broja šećera (izuzev laktoze, trehaloze, inulina, skroba i glikogena), može se konstatovati da fermentacija ostalih šećera nema velikog uticaja na približnu identifikaciju *S. suis* na ovom identifikacionom sistemu. Jasna fermentacija šećera samo još više upotpunjuje sumnju na identifikaciju *S. suis*.

Svi sojevi *S. suis* su na korišćenom **API 20 STREP** identifikacionom sistemu razlagali eskulin (ESC), fermentisali trehalozu (TRE) i nisu vršili produkciju acetoina (VP). Ove reakcije su bile i očekivane, budući da je na osnovu njih i vršena selekcija bakterija, koje su bile podvrgnute nizu biohemijskih testova. Nijedan soj *S. suis* nije razlagao hipuričnu kiselinu (HIP), a isti rezultati su dobijeni i u reakcijama fermentacije riboze (RIB), arabinoze (ARA) i sorbitola (SOR). Dobijeni rezultati su u skladu sa

rezultatima koje su dobili **Tarradas i sar. (1994)** i **Kilper-Balz i Schleifer (1987)** (HIP negativan), zatim, **Facklam (2002)** (sorbitol negativan) i uputstvom proizvođača. Svi sojevi *S. suis* su u ovom istraživanju proizvodili β -glukuronidazu (β GUR), leucin aminopeptidazu (LAP), dok je najveći broj sojeva proizvodio α -galaktozidazu (α GAL) (88,9%) i β -galaktozidazu (β GAL) (83,3%), što je u skladu sa rezultatima **Tarradas i sar. (1994)**, kao i **Kilper-Balz i Schleifer (1987)**, koji ukazuju na to da je *S. suis* pozitivna za α -galaktozidazu, β -glukuronidazu i leucin arilamidazu i varijabilna u produkciji β -galaktozidaze, iako dva soja *S. suis* nisu proizvodila α -galaktozidazu. Samo 72,2% sojeva *S. suis* je stvaralo arginin dihidrolazu (ADH), te se može zaključiti da stvaranje ovog enzima nije uobičajena karakteristika ove bakterije. Jedan soj *S. suis* je bio pirolidonil arilamidaza (PYRA) i manitol (MAN) pozitivan, što je u skladu sa rezultatima **Facklam (2002)**, koji smatra da *S. suis* ne stvara enzim pirolidonil arilamidazu i gotovo je identičan onom koji su dobili **Tarradas i sar. (1994)**, a u suprotnosti sa uputstvom proizvođača, u kojem enzim stvara od 41 do 53% sojeva *S. suis* (zavisno od soja). Rezultati, koji se tiču fermentacije manitola, su očekivani, kako sa stanovišta ovih autora, tako i sa strane uputstva proizvođača. Alkalnu fosfatazu (PAL) je stvaralo 22,2% sojeva *S. suis* u našem istraživanju, čime se dobijeni rezultati istraživanja značajno razlikuju od onih koje su dobili **Kilper-Balz i Schleifer (1987)**, prema kojima *S. suis* ne proizvodi kiselu niti alkalnu fosfatazu, kao i u suprotnosti sa malim procentom koji navodi proizvođač (1-3%), a veoma slični onima koje za različite *S. suis* sojeve dobijaju **Tarradas i sar. (1994)**.

Svi sojevi *S. suis* su na API 20 STREP identifikacionom sistemu fermentisali laktozu (LAC), skrob (AMD) i glikogen (GLYG), dok je 94,4% sojeva fermentisalo inulin (INU), pa se može konstatovati da je fermentacija ova četiri šećera značajna fenotipska karakteristika *S. suis*. Slične rezultate u fermentaciji ovih šećera su dobili i drugi autori (**Perch i sar., 1981; Hoffman i sar., 1985; Hommezi i sar., 1986; Kilper-Balz i Schleifer, 1987; Silvonen i sar., 1988**). Rafinozu je fermentisalo 50% ispitivanih sojeva, što se podudara sa rezultatima **Kilper-Balz i Schleifer (1987)**, prema kojima se varijabilni rezultati fermentacije mogu očekivati sa rafinozom. Prema **Perch i sar. (1981)**, fermentacija rafinoze je dobar test za razlikovanje S grupe (serotip 1) od R

grupe (serotip 2) *S. suis*. Osim varijabilnih rezultata za fermentaciju rafinoze, u ovom istraživanju je ponovo potvrđeno da se na osnovu razlaganja rafinoze ne može diferencirati *S. suis* serotip 1 od ostalih serotipova ove bakterije, jer je naknadnim upoređivanjem rezultata serotipizacije sa rezultatima biohemijske analize utvrđeno da nijedan od dva potvrđena soja *S. suis* serotip 1 nije fermentisao rafinozu, dok su ostali serotipovi ove bakterije to činili.

Iako su mnogobrojne biohemijske karakteristike *S. suis* uglavnom opisane prilikom prvobitnog predstavljanja ove vrste, što su izvršili **Kilper-Balz i Schleifer (1987)**, one su kasnije u istraživanjima drugih autora više puta korigovane.

Komparacijom rezultata dobijenih na API 20 STREP i rapid id32 STREP identifikacionim sistemima, a imajući u vidu prethodnu preliminarnu biohemijsku identifikaciju, mogu se ustanoviti dominantne biohemijske karakteristike koje ispoljavaju sojevi *S. suis*, koji su obuhvaćeni u ovim istraživanjima i one su prikazane u tabeli 20.

Tabela 20. Dominantne biohemijske osobine sojeva *S. suis*

<i>S. suis</i>	6,5% NaCl	VP	HIP	Dodatni testovi	<i>GLYG</i>	ADH	<i>AMD</i>	M β DG	β GAL	SAC	<i>RIB</i>	<i>ARA</i>
	0	0	0		100	↑70	100	↑90	↑80	100	0	0
	hemoliza	ESC	<i>TRE</i>		β GUR	α GAL	<i>INU</i>	<i>LAC</i>	APPA	GTA	LAP	SOR
	α	100	100		↑80	↑80	↑90	100	100	↑90	100	0

Na osnovi dobijenih rezultata može se zaključiti da svi sojevi *S. suis* daju α hemolizu na agaru sa ovčijom krvi, da ne rastu u bujonu sa 6,5% NaCl, da su svi pozitivni u testu razlaganja eskulina i trehaloze i da su svi negativni u testu stvaranja acetoina (VP test) i razlaganja hipurične kiseline (HIP test). Navedene osobine sojeva *S. suis* u našem istraživanju se poklapaju sa osobinama sojeva u istraživanjima drugih autora (**Kilper-Balz i Schleifer, 1987; Tarradas i sar. 1994**). Ostale biohemijske

osobine mogu samo pomoći u dijagnozi *S. suis*, iako je za mnoge od njih ova bakterija u našem istraživanju bila 100% pozitivna ili 100% negativna, dok je za većinu ostalih u ovom slučaju pokazala varijabilne osobine. Ovim testovima je u četiri slučaja dijagnostikovano *S. sanguinis*, a u jednom slučaju *S. parasanguinis*. Jedna bakterija je dijagnostikovana kao *S. suis*, ali kasnije nije mogla biti serotipizirana specifičnim *S. suis* antiserumima. Stoga se može smatrati da se, u pogledu definitivne dijagnoze infekcija koje izaziva *S. suis*, rezultati ovih istraživanja poklapaju sa rezultatima ispitivanja većine autora (**Higgins i sar., 1990; Gottschalk i sar., 1991; Tarradas i sar. 1994; Higgins i Gottschalk, 2006**), prema kojima je serotipizacija jedini način definitivne dijagnoze, iako je na osnovu biohemijskih osobina moguće pretpostaviti da se radi o vrsti *S. suis*.

Serološka tipizacija specifičnim serumima za kapsulu *S. suis* je jedina metoda za definitivnu identifikaciju ove bakterije. S obzirom da je u ovom istraživanju od 35 bakterija uspešna serološka identifikacija dobijena kod 34 izabrana soja, upotrebom 1-34 antiseruma karakteristična za kapsularne antigene *S. suis*, može se zaključiti da se ovaj podatak u potpunosti slaže sa tvrdnjama **Higgins i Gottschalk (2000)**, prema kojim je broj izolata, koji se ne može tipizirati, relativno mali i sporadičan. Osim mogućnosti da ovaj izolat ne reaguje sa specifičnim *S. suis* antiserumima, postoji i verovatnoća da isti ne pripada vrsti *S. suis*, te i da nema kapsularni polisaharid koji bi regovao sa specifičnim antiserumima. Ova druga mogućnost podržava tvrdnje drugih autora (**Tarradas i sar., 1994; Higgins i sar., 1990; Gottschalk i sar., 1991; Facklam, 2002**) da je serološka tipizacija jedina potpuno sigurna metoda u identifikaciji sojeva *S. suis*, zbog mogućih identičnih biohemijskih osobina ovih sojeva sa viridans streptokokama.

Prevalencija infekcije koju izaziva *S. suis* bila je u našem istraživanju 14,67% što se gotovo potpuno poklapa sa podacima dobijenim u Nemačkoj, prema kojima je prevalencija u toj zemlji iznosila oko 14%. Ovi podaci su skladu sa podacima **Mwaniki i sar. (1994)**, koji ukazuju na to da brisevi tonzila živih svinja pokazuju nivo kliconoštva koji varira od 0 do 100%. Prevalencija *S. suis* kod prasadi starosti 5 i 20 dana bila je 9%. Izolaciju *S. suis* kod ovako mlade prasadi potvrđuju i **Elliot i sar. (1966)**, koji smatraju da su krmače verovatno najznačajniji izvor infekcije, kao i

Clifton-Hadley i sar. (1986), prema kojima je veoma moguća infekcija prasadi pri sisanju. Slična zakonitost je utvrđena i u istraživanjima **Mogollon i sar. (1991)**, u kojima se navodi da je prevalencija *S. suis* na farmama svinja veoma visoka i da se prasad inficira već u prvim danima života. Rezultati ovih ispitivanja su u skladu i sa onima koje su dobili **Torremorell i sar. (1998)**, koji konstatuju da je kolonizacija prasadi sojevima *S. suis* slična na većini farmi i da se dešava veoma rano nakon rođenja, tako da do momenta odbijanja prasadi, većina njih već nosi sojeve bakterije u svojim tonzilama. **Robertson i Blackmore (1989)** su dokazali da se prasad inficiranih krmača može inficirati na prašenju, pre prašenja ili neposredno posle prašenja, dok **Cloutier i sar. (2003)** smatraju da krmače inficiraju svoju prasad tokom prašenja i, verovatno, putem respiratornih aerosola. Budući da se i na farmama u Republici Srbiji *S. suis* može izolovati kod prasadi najmlađeg doba, smatramo da se dobijeni rezultati u potpunosti slažu sa rezultatima istraživanja prethodno navedenih autora.

Streptococcus suis se veoma lako može izolovati iz nazofaringealnih tonzila prasadi i svinja, što je i potvrđeno i u ovom istraživanju (prevalencija od 12,35%). Izolacija ovog patogena iz briseva nazofaringealnih tonzila klinički zdravih životinja na farmi, kao i celih ili delova nazofaringealnih tonzila zaklanih životinja se poklapa sa rezultatima drugih autora (**Devriese i sar., 1994**), prema kojima je *S. suis* normalan stanovnik gornjeg respiratornog sistema i vrlo uspešan kolonizator tonzila svinja (**Mwaniki i sar., 1994**), a da do odbijanja prasadi od krmače gotovo sva prasad nose neki od serotipova *S. suis* u svojim tonzilama (**Mogollon i sar., 1991**). Nešto veća prevalencija kod prasadi u tovu govori u prilog tvrdnji **Clifton-Hadley i sar. (1984)** da je najveći broj kliconoša uzrasta od 4 do 10 nedelja starosti. Međutim izolacija iz celih (prasad) ili delova (tovljenici) nazofaringealnih tonzila na klanici je nešto veći i iznosio je 18,9% što se u velikoj meri razlikuje od podataka dobijenih u istraživanjima **Clifton-Hadley i sar. (1986)**, u kojima je utvrđeno da se *S. suis* iz tonzilarnih kripi može izolovati u gotovo 100% slučajeva. Izolacija *S. suis* iz noseva klinički zdrave prasadi zabeležena je u pet slučajeva od ukupno 32 uzeta brisa nosa (prevalencija oko 15,6 %) čime se može podržati mišljenje da se prasad najčešće inficira nazalno putem aerosola (**Mwaniki i sar., 1994; Cloutier i sar., 2003**), kao i tvrdnja drugih autora (**Robertson i**

Blackmore, 1989) da se serotip 2 *S. suis* može naći u nosnoj šupljini supkliničkih kliconoša.

Streptococcus suis je izolovan i iz slučajeva naglo uginule prasadi iz briseva organa trbušne duplje, meningi i zglobova, što uz kliničku sliku naglog uginuća, može predstavljati i definitivnu dijagnozu, uzimajući u obzir tvrdnje **Heath i sar. (1996)**, prema kojima se *S. suis* najčešće nalazi u slučajevima septikemije, meningitisa, poliartritisa, a retko u slučajevima pneumonije. Veoma značajna je izolacija *S. suis* sa noža ljudi koji vrše evisceraciju u klanici, kao i sa jednog brisa obrađenog svinjskog trupa. Ovi nalazi mogu govoriti u prilog tvrdnji da su farmeri, radnici u klanicama, prevoznici svinja, inspektori na klanicama, mesari i veterinari među najugroženijima i onima koji najčešće obolevaju od infekcije koju izaziva ovaj patogen (**Walsh i sar., 1992; Huang i sar., 2005; Tang i sar., 2006**). Takođe, **Arends i Zanen (1988)** smatraju da evisceratori, koji su uključeni u odstranjivanju (evisceraciji) grkljana i pluća iz zaklanih svinja, imaju veći rizik od *S. suis* infekcije nego ostali klanični radnici. Takođe, prema **Ip i sar., (2007)**, direktnim kulturelnim metodama dokazano je da je više od 6% uzoraka svinjskog mesa bilo pozitivno na prisustvo *S. suis* u marketima u Hong Kongu, a da se prisustvo bakterije može ustanoviti ne samo u području tonzila, već i na drugim delovima zaklanih svinja kao što su vrat, glava, jezik, creva, kosti i rep. Izolacija *S. suis* sa trupa u našem istraživanju svakako potvrđuje nalaze pomenutih autora o prisustvu ove bakterije u sirovom svinjskom mesu.

Na osnovu dobijenih, ranije iznetih podataka može se uočiti da najveću prevalenciju među izolovanim sojevima, koja iznosi 67,7%, ima serotip 2 *S. suis*, zatim slede *S. suis* serotip 7 sa prevalencijom od 17,6%, *S. suis* serotip 9 sa prevalencijom od 8,8%, i *S. suis* serotip 1 sa prevalencijom od 5,9%. Ukoliko se pogleda prisustvo serotipova *S. suis* u različitim Evropskim zemljama sa razvijenim svinjarstvom, može se primetiti da najčešće izolovani serotipovi pripadaju upravo onima koji su izolovani i u našem istraživanju. Međutim, prevalencija ovih serotipova se u velikoj meri razlikuje u zavisnosti od zemlje u kojoj je istraživanje izvedeno, kao i delovima zemalja i na kojim farmama je izvršen monitoring prisutnih serotipova. Međutim, svi nalazi prevalencije serotipova, pa tako i nalazi naših istraživanja, se

poklapaju u tome da je najveća prevalencija serotipa 2 *S. suis*. Ovaj nalaz se podudara sa nalazima dobijenim u nekim drugim Evropskim zemljama, gde je serotip 2 najčešći izolovani serotip, prvenstveno u Francuskoj, Italiji, Španiji (**Berthelot-Herault i sar. 2000; Wisselink i sar. 2000**), Japanu (**Kataoka i sar., 1993**) i Brazilu (**Martinez i sar., 2003**). U Italiji, najveći broj serotipova pripada *S. suis* serotipu 2, a zatim slede serotip 9 i serotip 1 (**Princivalli i sar., 2009**), dok je u Belgiji najdominantniji serotip 2 *S. suis*, a zatim slede serotip 9 i serotip 7 (**Martel i sar., 2001**). Međutim, **Vela i sar. (2003)** navode de je u Španiji najfrekventniji kaspularni tip 9 (67,4%), a zatim slede serotip 2 (14,8%) i serotip 7 (6,0%). Može se primetiti da se gotovo u svim Evropskim zemljama na prva tri mesta po zastupljenosti pojavljuju serotipovi 2, 9 i 7 *S. suis*, ali njihov međusobni odnos u velikoj meri varira u zavisnosti od istraživanja. Može se konstatovati da i podaci, dobijeni u našim ispitivanjima, podržavaju prethodne, jer je i našim farmama koje su bile obuhvaćene ispitivanjem utvrđeno prisustvo prisustvo tri navedena serotipa *S. suis*, iako u različitim odnosima u odnosu na one dobijene u drugim Evropskim zemljama.

Osim *S. suis* serotipa 2, koji je najzastupljeniji serotip u Evropi, najveći broj autora je utvrdio da je serotip 9 *S. suis* drugi serotip po zastupljenosti (**Aarestrup i sar., 1998; Allgaier i sar., 2001; Berthelot-Herault i sar., 2000; Luque i sar., 1998; Prieto i sar., 1993; Tarradas i sar., 2001; Wisselink i sar., 2000**), što nije u skladu sa našim istraživanjima, u kojima je utvrđeno da je serotip 7 bio na drugom mestu po zastupljenosti među izolovanim sojevima. Prevalencija serotipa 1 *S. suis* u ovom istraživanju je bila 5,9%, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u većini Evropskih zemalja, koji ukazuju na to da se serotip 1 *S. suis* neretko može izolovati iz klinički zdravih svinja, a ređe u slučajevima oboljenja. Imajući u vidu da je serotip 2 *S. suis* jedini serotip koji je izolovan iz svih vrsta uzoraka i jedini izolata iz briseva naglo uginule prasadi, može se potvrditi konstatacija da se serotip 2 *S. suis* najčešće može izolovati iz bolesnih i uginulih svinja. Slične podatke su u Italiji dobili **Princivalli i sar. (2009)**. Prema ovim autorima serotipovi 2 i 9 *S. suis* se najčešće mogu naći kod obolelih svinja i pripadaju tzv. invazivnim sojevima.

U ovim istraživanjima je posebno značajan podatak da je serotip 2 *S. suis* izolovan, kako sa noževa kojima se vrši evisceracija organa u klanici, tako i sa obrađenog trupa svinje. Pošto su dva glavna načina prenosa infekcije sa svinja na ljude uglavnom preko posekotina na koži i oralno (**Gottschalk i sar., 2010**), može se i na osnovu rezultata ovih istraživanja konstatovati da su pomenuti putevi infekcije ljudi vrlo mogući. Iako postoje neke fenotipske razlike između sojeva serotipa 2 *S. suis* izolovanih od ljudi i svinja, u većina studija se potvrđuje da su sojevi izolovani od ljudi fenotipski i genotipski slični onima izolovanim kod svinja u istom geografskom području (**Berthelot-Herault i sar., 2002; Pedrol i sar., 2003; Marois i sar., 2006; Yu i sar., 2006; Rehm i sar., 2007**). Iako i drugi serotipovi mogu izazvati oboljenja svinja i ljudi, smatra se da je serotip 2 *S. suis* najpatogeniji serotip u Evropi i Kini (**Gottschalk i sar., 2007**). Stoga, izolacija ovog serotipa iz mesa i sa noža dobija još veći značaj ako se zna da su ovi putevi infekcije kod ljudi najčešći.

Osetljivost odnosno rezistencija sojeva *S. suis* poreklom sa različitih farmi svinja u mnogome je bila očekivana uzimajući u obzir tipove antibiotika i hemioterapeutika koji se nalaze na našem tržištu. Prema dobijenim rezultatima za dva β laktamska antibiotika (penicilin i amoksicilin), koji se najčešće koriste za lečenje svinja u Republici Srbiji, *S. suis* je pokazao visoki stepen osetljivosti na oba antibiotika (94,1%), ali su dva soja ove bakterije bila otporna na njihovo. Rezultati osetljivosti *S. suis* na ispitivane antibiotike, dobijeni u ovim istraživanjima, su u velikoj meri saglasni sa rezultatima velikog broja prethodnih istraživanja kako u Evropskim (**Aarestrup i sar., 1998; Marie i sar., 2002; Tian i sar., 2004; Vela i sar., 2005; Wisselink i sar. 2006**), tako i u Azijskim državama (**Zhang i sar., 2008; Kataoka i sar., 2000**), prema kojima je *S. suis* i dalje visoko osetljiv na dejstvo penicilina, amoksicilina i njima srodnih antibiotika. Međutim, podaci **Tarradas i sar. (1994)** i **Seol i sar. (1996)** govore o visokoj otpornosti ovog patogena na dejstvo penicilina, što u našem istraživanju nije bio slučaj. Do neslaganja u rezultatima je verovatno došlo zbog toga što kontrolisana upotreba penicilina (fenoksimetilpenicilin i amoksicilin) u Republici Srbiji nije do te mere razvijena da bi se pojavio značajan procenat otpornih sojeva *S. suis*. Podatak da se na svim farmama, na kojima su uzimani uzorci za ova ispitivanja, amoksicilin koristi

veoma uspešno u kontrolisanom preveniranju različitih bakterijskih infekcija još više naglašava značaj dalje potencijalne primene ovih antibiotika u lečenju i preveniranju infekcija izazvanih *S. suis*. Stoga se može konstatovati da su tvrdnje **Denicourt i Le Coz (2000)** da je amoksicilin verovatno trenutno lek izbora u prevenciji infekcije svinja koju izaziva *S. suis* potpuno opravdane.

Osim β laktamskih antibiotika penicilina i amoksicilina, koji se često koriste u veterinarskoj medicini, osetljivost sojeva *S. suis* je bila ispitana i na β laktamske antibiotike, koji su čest izbor doktora humane medicine u empirijskom lečenju bakterijskih meningitisa, pa i onog koga izaziva sa *S. suis*. Antibiotici, na koje su ispitani svi sojevi *S. suis* pripadali su cefalosporinskoj grupi β laktamskih antibiotika i to: cefaleksin (I grupa cefalosporina), cefotaksim i ceftriakson (III grupa cefalosporina) i cefepim (IV generacija cefalosporina). Svi sojevi *S. suis* u ovom istraživanju bili su osetljivi na dejstvo ova četiri cefalosporinska antibiotika. Budući da se ljudi inficiraju bliskim kontaktom sa svinjama ili njihovim proizvodima kao i na činjenicu da su sojevi *S. suis*, koji inficiraju ljude, genetski identični i da je njihova osetljivost ista kao osetljivost sojeva poreklom od svinja, upotreba cefalosporina u lečenju infekcija ljudi izazvanih *S. suis* ima veliki značaj. Na osnovu dobijenih podataka može se očekivati da će, ako ne svi, onda najveći broj sojeva *S. suis*, koji mogu izazvati infekciju ljudi u Republici Srbiji, biti osetljivi na dejstvo cefalosporina. Stoga se može konstatovati da cefalosporini treba da budu antibiotici izbora pri svakom empirijskom lečenju mogućih infekcija izazvanih *S. suis*, pogotovo kod rizičnih kategorija ljudi, odnosno ljudi koji dolaze u svakodnevni kontakt sa svinjama ili njihovim mesom. Podaci i konstatacije iz ovih istraživanja se podudaraju sa onima koje navode **Wangkaewa i sar. (2006)** i **Lun i sar. (2007)** o uspešnoj upotrebi cefalosporina, pogotovo III generacije u lečenju meningitisa koji izaziva *S. suis*. Osetljivost na tetracikline, makrolide i linkozamine, koja je dobijena analizom izolovanih sojevima *S. suis*, pokazala je kako značajne podudarnosti, tako i dijametralne suprotnosti sa podacima prethodnih istraživanja u Evropskim i Azijskim zemljama. Naime, prema dobijenim podacima, svi sojevi *S. suis* su bili otporni na dejstvo tetraciklina, što je u potpunosti u skladu sa rezultatima nekih ispitivanja (**Estoepangestie i Lammler, 1993; Reams i sar., 1993; Turgeon i sar.,**

1994; Tarradas i sar., 1994; Aarestrup i sar., 1998; Seol i sar., 1996; Kataoka i sar., 2000; Han i sar., 2001; Marie i sar., 2002; Vela i sar., 2005; Wisselink i sar.; 2006; Zhang i sar., 2008), ali se u velikoj meri razlikuju od podataka Tian i sar. (2004) za *S. suis* serotip 7, prema kojima je otpornost iznosila samo 24,27%. Imajući u vidu činjenicu da se tetraciklini (hlortetraciklin, oksitetraciklin, a u novije vreme i doksiciklin) masovno koriste u kontrolisanoj prevenciji bolesti u svinjarskoj industriji, ne začuđuje činjenica da ovi antibiotici, prema našim, ali i istraživanjima drugih pomenutih autora, više nemaju nikakvog efekta u kontrolisanoj prevenciji infekcije koju izaziva *S. suis*. Međutim, prema podacima drugih autora (Marie i sar., 2002; Vela i sar., 2005; Wisselink i sar.; 2006; Zhang i sar., 2008), nigde otpornost ovog patogena nije dostigla 100%, što se slaže i sa našim istraživanjima, i uglavnom se kreće od 70-85%. Najverovatnije objašnjenje stoprocentne otpornosti *S. suis* sa ispitivanih farmi prema tetraciklinima je prekomerna upotreba ovih antibiotika u kontrolisanoj prevenciji različitih bolesti svinja. Stoga se može konstatovati da tetraciklini nikako ne bi trebali biti izbor, kako u terapiji, tako i u prevenciji oboljenja izazvanih vrstom *S. suis*.

Rezultati dobijeni u ispitivanju osetljivosti *S. suis* na makrolidne antibiotike (eritromicin i azitromicin) i linkozamine (linkomicin i klindamicin) bili su gotovo dijametralno suprotni. Nijedan soj *S. suis* nije pokazao osetljivost na linkozamine, kako na linkomicin, tako i na klindamicin, dok je osetljivost na makrolide, eritromicin i azitromicin bila visoka i iznosila je 94,1%. Ista otpornost ispitivanog patogena na linkomicin i klindamicin, kao i na eritromicin i azitromicin, je razumljiva usled njegove slične ukrštene otpornosti na pomenute antibiotike, na osnovu koje se otpornost na jedan od antibiotika može predvideti otpornost na drugi antibiotik. Marie i sar. (2002) su u Francuskoj dobili rezultate od 38% osetljivosti na linkomicin, Vela i sar. (2005) nalaze otpornost od preko 87%, Zhang i sar. (2008) u Kini utvršuju visoku otpornost sojeva *S. suis* na linkozamine, dok Aarestrup i sar. (1998) navode da otpornost sojeva *S. suis* na klindamicin zavisi od serotipa i da se kreće između 20 i 45%. Rezultati dobijeni u našim istraživanjima su u skladu sa onima dobijenim u Kini (Zhang i sar., 2008) i u Španiji (Vela i sar., 2005), ali se značajno razlikuju od rezultata koje su dobili Marie i sar. (2002) i Aarestrup i sar. (1998), budući da osetljivost sojeva na

linkozamine u našem istraživanju nije postojala. Ukoliko ima u vidu činjenica da je linkomicin jedan od najčešće korišćenih antibiotika u prevenciji respiratornih infekcija svinja (najčešće u kombinaciji sa spektinomycinom), ne začuđuje činjenica potpune otpornosti *S. suis* na ovaj antibiotik. Osetljivost sojeva *S. suis* na eritromicin i azitromicin iznosila je 94,1%, čime se naši rezultati u velikoj meri razlikuju od rezultata prethodnih istraživanja (**Aarestrup i sar., 1998; Han i sar., 2001; Marie i sar., 2002; Tian i sar., 2004; Vela i sar., 2005**), koji ukazuju na relativnu malu osetljivost sojeva *S. suis* na makrolidne antibiotike. Dobijeni rezultati o visokoj osetljivosti *S. suis* u našem istraživanju poklapaju se jedino sa rezultatima koje su dobili **Seol i sar. (1996)**, koji su utvrdili da je 91,9% sojeva ove bakterije bilo osetljivo na dejstvo eritromicina.. Utvrđena mala otpornost na eritromicin sojeva *S. suis* izolovanih sa naših farmi svinja je verovatno posledica daleko manje primene ovog antibiotika u kontrolisanoj prevenciji i lečenju bolesti svinja, za razliku od njegove upotrebe u većini zemalja Evropske Unije, koje su preventivni kapacitet ovog antibiotika u velikoj meri iscrpele.

Medikacija svinja kroz hranu ili vodu kombinacijom sulfametoksazola i trimetoprima je na farmama svinja i privatnim gazdinstvima u Republici Srbiji standardna mera kontrolisanog preveniranja i lečenja različitih infekcija svinja (najčešće gastrointestinalnih). Rezultati dobijeni u ispitivanju osetljivosti *S. suis* na sulfametoksazol-trimetoprim ukazuju na visoku otpornost ovog patogena svinja i ljudi na ovu kombinaciju lekova. Naime, od 34 ispitivana soja *S. suis* samo su dva soja (5,9%) bila osetljiva na sulfametoksazol-trimetoprim. Dobijeni rezultati su gotovo identični onima koje su u Španiji dobili **Vela i sar. (2005)**, prema kojima je najveći broj izolata *S. suis* otporan na ovu kombinaciju antibiotika, i u skladu su onima koje su za serotip 7 *S. suis* dobili **Aarestrup i sar. (1998)** (91,4% otpornosti). Podatke o manjoj osetljivosti *S. suis* na sulfametoksazol-trimetoprim su dobili i **Zhang i sar. (2008)**, što je takođe u skladu sa našim dobijenim rezultatima. Potpuno suprotne rezultate su dobili **Wisselink i sar. (2006)** (94% osetljivosti) u Holandiji, **Tian i sar. (2004)** u Danskoj i **Kataoka i sar. (2000)** u Japanu, koji navode da je *S. suis* vrlo osetljiva na kombinaciju lekova sulfametoksazol-trimetoprim.

Osetljivost izolata *S. suis* na vankomicin i hloramfenikol, odnosno antibiotke koji se koriste u ozbiljnijim slučajevima meningitisa i sepse kod ljudi, u našem istraživanju je iznosila 100%. Ovakvi rezultati su očekivani, budući da ih prijavljuju i **Aarestrup i sar. (1998)** i **Tian i sar. (2004)**. Međutim, nađeno je da su dva izolata *S. suis* (5,9%) bila otporna na ciprofloksacin, hemioterapeutik iz grupe hinolona, koji je svakako jedan od najčešće upotrebljivanih antimikrobnih lekova u terapiji po život opasnih infekcija. Iako se ciprofloksacin ne koristi niti u kontrolisanoj prevenciji niti u terapiji infekcija domaćih životinja, pa tako i svinja, na tržištu u Republici Srbiji je u velikoj meri prisutan enrofloksacin, takođe hemioterapeutik iz grupe hinolona, čiji je ciprofloksacin glavni metabolit. Dugotrajna upotreba enrofloksacina u kontrolisanoj prevenciji i terapiji različitih oboljenja svinja je na većini farmi u Republici Srbiji standardna uzgojna procedura i sigurno je da omogućava dugotrajan kontakt vrste *S. suis* sa ovim antimikrobnim lekom i njegovim glavnim metabolitom ciprofloksacinom, čime se i povećava mogućnost stvaranja otpornosti na isti. Takođe, sve veća upotreba florfenikola, varijante antibiotika koji se za razliku od hloramfenikola može koristiti u lečenju različitih infektivnih bolesti svinja, verovatno da će u budućnosti dovesti do pojave sojeva *S. suis* koji su otporni kako na ovaj antibiotik, tako i na hloramfenikol. Ovakvi slučajevi su već zabeleženi i u drugim zemljama gde se florfenikol intenzivno koristi u terapiji respiratornih oboljenja svinja (**Zhang i sar., 2008**).

Ispitivanje osetljivosti sojeva *S. suis* na antibiotike u našem istraživanju izvedeno je na onim farmama u Republici Srbiji koje imaju svoju tehnologiju proizvodnje i problematiku koja prati uzgoj svinja. Sastavni deo uzgoja svinja je upotreba antibiotika, bilo u terapiji specifičnih bakterijskih oboljenja, bilo u kontrolisanoj prevenciji onih infekcija koje dovode do najvećih gubitaka u svinjarstvu. S obzirom da svaka farma ima različite " navike " u kontrolisanoj preventivnoj i terapijskoj primeni antibiotika, za očekivati je da će sojevi *S. suis*, izolovani sa ovih farmi, vrlo verovatno pokazivati specifičnosti u otpornosti na antibiotike koji se koriste na tim farmama. Ukoliko se pogledaju rezultati ispitivanja osetljivosti *S. suis* na antimikrobne lekove u različitim državama, može se primetiti da se rezultati u velikoj

meri razlikuju kako među državama u kojima je vršeno ispitivanje, tako i među farmama u istoj državi.

Budući da je značajnija otpornost ovog patogena zabeležena u nekim državama Evropske Unije, iz kojih u Republiku Srbiju i najčešće stižu priplodna grla svinja, može se konstatovati da intenzivan uvoz istih može dovesti do povećanja procenta sojeva *S. suis* koji su otporni na β laktamske, ali i neke druge antibiotike.

7. ZAKLJUČCI

1. Zbog velikog broja različitih vrsta streptokoka, kao i drugih srodnih vrsta koje se mogu izolovati kod svinja, neophodna je primena komercijalnih biohemijskih sistema za definitivnu identifikaciju *Streptococcus suis*.
2. Radi bržeg postavljanja sumnje na *Streptococcus suis* i eliminisanja morfološki sličnih vrsta kao što su *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus parasanguinis* neophodna je primena i nekih klasičnih biohemijskih testova- razlaganje eskulina, fermentacija trehaloze, rast u podlozi sa 6,5% NaCl i Vogesproskauer reakcija (VP).
3. *Streptococcus suis* se može izolovati iz briseva tonzila, celih tonzila i organa uginulih svinja, kao i sa noževa za evisceraciju organa što upućuje na činjenicu da su radnici na farmama svinja, kao i radnici u klaničnoj industriji ugroženi od moguće infekcije ovim patogenom.
4. Među izolovanim sojevima sa farmi i klanica svinja koje su bile obuhvaćene ispitivanjem ustanovljeno je prisustvo četiri serotipa vrste *Streptococcus suis*: *Streptococcus suis* serotip 1 (5,9%) , *Streptococcus suis* serotip 2 (67,7%), *Streptococcus suis* serotip 7 (17,6%) i *Streptococcus suis* serotip 9 (8,8%).
5. Kod svih sojeva *Streptococcus suis* izolovanih sa nekoliko farmi i klanica svinja u Republici Srbiji ustanovljena je visoka osetljivost na cefalosporinske antibiotike, vankomicin i hloramfenikol (100%), manja na penicilin, amoksicilin, ciprofloksacin, eritromicin i azitromicin (94,1%), veoma niska na kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima (5,9%), dok je kod svih sojeva utvrđena rezistencija na tetraciklin, klindamicin i linkomicin.

8. SPISAK LITERATURE

1. Aarestrup F.M., Jorsal S.E., Jensen N.E. (1998): Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Veterinary Microbiology*, Vol. 60, 59–66.
2. Aarestrup F.M., Rasmussen S.R., Artursson K., Jensen N.E. (1998): Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Veterinary Microbiology*, Vol. 63, 71–80.
3. Albanyan E.A., Vallejo J.G., Smith C.W., Edwards M.S. (2000): Nonopsonic binding of type III group B streptococci to human neutrophils induces interleukin 8 release mediated by the p38 mitogen activated protein kinase pathway. *Infection and Immunity*, Vol. 68, 2053–2060.
4. Allen A.G., Bolitho S., Lindsay H., Khan S., Bryant C., Norton P. et al. (2001): Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin. *Infection and Immunity*, Vol. 69, 2732–2735.
5. Allen A.G., Lindsay H., Seilly D., Bolitho S., Peters S.E., Maskell D.J. (2004): Identification and characterisation of hyaluronate lyase from *Streptococcus suis*. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 36, 327–335.
6. Allgaier A., Goethe R., Wisselink H.J., Smith H.E., Valentin Weigand P. (2001): Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 39, 445–453.
7. AIRNumani D., Segura M., Dore M., Gottschalk M. (2003): Upregulation of ICAMR1, CD11a/CD18 and CD11c/CD18 on human THPR1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 133, 67–77.
8. Amass S.F., San Miguel P., Clark L.K. (1997): Demonstration of vertical transmission of *Streptococcus suis* in swine by genomic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, 1595–1596.
9. Amass S.F., Stevenson G., Vyverberg B., Huxford T., Knox K., Grote L.A. (2000): Administration of a homologous bacterin to sows preparturition provided partial protection against streptococcosis in their weaned pigs. *Journal of Swine Health and Production*, Vol. 8, 217–219.
10. Amass S.F., Struve R., Clark L.K., Wu C.C. (1996): Cesarean section: A surgical method to derive pigs free of *Streptococcus suis*. *Swine Health and Production*, Vol. 4, 196R199.
11. Amendment to Quarantine and Prevention of Disease Ordinance (2004): Cap 141, www.chp.gov.hk/letters.asp?lang=en&id=31&pid=13.

12. Aranda J., Garrido M.E., Cortes P., Llagostera M., Barbe J. (2008): Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalentcation limited conditions. *Infection and Immunity*, Vol. 76, 1590–1598.
13. Arends J.P., Zanen H.C. (1988): Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Reviews of Infectious Diseases*, Vol. 10, 131–137.
14. Auer J., Berent R., Porodko M., Eber B. (2001): *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet*, Vol. 357, No. 9262, 1130.
15. Baele M., Chiers K., Devriese L.A., Smith H.E., Wisselink H.J., Vaneechoutte M., Haesebrouck F. (2001): The Gram positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 91, 997–1003.
16. Bahloul H., Mofredj A., Mrabet A., Gineyt G., Rousselier P. (2008): *Streptococcus suis* meningitis after oral contamination? *Médecine et Maladies Infectieuses*, Vol.38, No. 5, 281–282.
17. Barocchi M.A., Ries J., Zogaj X., Hemsley C., Albiger B., Kanth A., Dahlberg S. et al. (2006): A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, Vol. 103, 2857–2862.
18. Bassaris H.P., Venezio F.R., Morlock B.A., Phair J.P. (1981): *Staphylococcus aureus* in toxic shock syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 144, 386–387.
19. Baums C.G., Kock C., Beineke A., Bennecke K., Goethe R., Schroder C., Waldmann K. et al. (2009): *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 16, 200–208.
20. Benga L., Friedl P., Valentin Weigand P. (2005): Adherence of *Streptococcus suis* to porcine endothelial cells. *Journal of Veterinary Medicine, Section B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, Vol. 52, 392–395.
21. Benga L., Goethe R., Beilage E.G., Valentin Weigand P. (2004): Immunogenicity of murein associated proteins from temperature stressed *Streptococcus suis* cultures. *Journal of Veterinary Medicine, Section B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, Vol. 51, 272–277.
22. Benga L., Goethe R., Rohde M., Valentin Weigand P. (2004): Non encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular Microbiology*, Vol. 6, 867–881.
23. Bergdoll M.S., Crass B.A., Reiser R.F., Robbins R.N., Davis J.P. (1981): A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*, Vol. 1, 1017–1021.
24. Berthelot Hérault F., Gottschalk M., Labbe A., Cariolet R., Kobisch M. (2001): Experimental airborne transmission of *Streptococcus suis* capsular type 2 in pigs. *Veterinary Microbiology*, Vol. 82, 69–80.

25. 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*, Vol. 40, 615–619.
26. Berthelot Hérault F., Morvan H., Kéribin A.M., Gottschalk M., Kobisch M. (2000): Production of muraminidase released protein (MRP), extracellular factor (EF) and haemolysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Veterinary Research*, Vol. 31, 473–479.
27. Blume V., Luque I., Vela A.I., Borge C., Maldonado A., Domínguez L., Tarradas C., Fernández Garayzábal J.F. (2009): Genetic and virulence phenotype characterization of serotypes 2 and 9 of *Streptococcus suis* swine isolates. *International Microbiology*, Vol. 12, 161R166.
28. Brisebois L.M., Charlbois R., Higgins R., Nadeau, M. (1990): Prevalence of *Streptococcus suis* in four to eight week old clinically healthy pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 54, 174R177.
29. Brousseau R., Hill J.E., Prefontaine G., Goh S.H., Harel J., Hemmingsen S.M. (2001): *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, 4828–4833.
30. Busque P., Higgins R., Caya F., Quessy S. (1997): Immunization of pigs against *Streptococcus suis* serotype 2 infection using a live avirulent strain. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 61, 275–279.
31. Campo Sepulveda E.M., Altman E., Kobisch M., D’Allaire S., Gottschalk M. (1996): Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen based indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, Vol. 52, 113–125.
32. Chabot Roy G., Willson P., Segura M., Lacouture S., Gottschalk M. (2006): Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 41, 21–32.
33. Chang B., Wada A., Ikebe T. et al.: Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, Vol. 59, No. 6, 397–399 (2006).
34. Charland N., Harel J., Kobisch M., Lacasse S., Gottschalk M. (1998): *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, Vol. 144, No. 2, 325–332.
35. Charland N., Kobisch M., Martineau Doize B., Jacques M., Gottschalk M. (1996): Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 14, 195–203.
36. Charland N., Nizet V., Rubens C.E., Kim K.S., Lacouture S., Gottschalk M. (2000): *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, Vol. 68, 637–643.

37. Chatellier S., Gottschalk M., Higgins R., Brousseau R., Harel J. (1999): Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 37, No. 2, 362–366.
38. Chen C., Tang J., Dong W., Wang C., Feng Y., Wang J., Zheng F., Pan X., Liu D., Li M., Song Y., Zhu X., Sun H., Feng T., Guo Z., Ju A., Ge J., Dong Y., Sun W., Jiang Y., Wang J., Yan J., Yang H., Wang X., Gao G.F., Yang R., Wang J., Yu J. (2007): A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *Streptococcus suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE*, Vol. 2, e315.
39. Chengappa M.M., Maddux R.L., Kadel W.L., Greer S.C., Herren, C.E. (1986): *Streptococcus suis* infection in pigs: incidence and experimental reproduction of the syndrome. U: Vorhies M.W. (ed.) *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Louisville, Vol. 29, 25R38.
40. Cheung P., Lo K.L., Cheung T.T., Yeung W.H., Leung P.H., Kam K.M. (2008): *Streptococcus suis* in retail markets: how prevalent is it in raw pork? *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 127, 316–320.
41. Clark L.K. (1995): SEW: Program, problems, performances, potential profits and methods of implementation for various herd sizes. *Proceedings of the George A. Young Swine Conference*, 1–14.
42. Clifton Hadley F., Alexander T. (1991): Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. U: Boden E. (ed.) *Swine Practice*, Baillie©re Tindall, London, 115R126.
43. Clifton Hadley F.A. (1984): Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Veterinary Research Communications*, Vol. 8, 217R227
44. Clifton Hadley F.A., Alexander T.J.L. (1981): Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection. *Proceedings of the Pig Veterinary Society*, Vol. 8, 8R17.
45. Clifton Hadley F.A., Alexander T.J.L., Enright M.R. (1986): Diagnosis of *Streptococcus suis* infection in pigs. *Proceedings of the Pig Veterinary Society*, Vol. 14, 27–34.
46. Clifton Hadley F.A., Alexander T.J.L., Enright M.R., Guise J. (1984): Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. *Veterinary Record*, Vol. 115, 562–564.
47. Clifton Hadley F.A., Enright M.R. (1984): Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *Veterinary Record*, Vol. 117, 585R587.
48. Clifton Hadley F.A., Enright M.R., Alexander T.J.L. (1986): Survival of *Streptococcus suis* type 2 in pig carcasses. *Veterinary Record*, Vol. 118, 275.
49. Clinical and Laboratory Standards Institute (2002): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, approved Standard, Second Edition, M31RA2, Wayne, PA.

50. 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*, Vol. 97, 135–151.
51. Cohen M.L., Falkow S. (1981): Protein antigens from *Staphylococcus aureus* strains associated with toxic shock syndrome. *Science*, Vol. 211, 842–844.
52. Cone L.A., Woodard D.R., Schlievert P.M., Tomory G.S. (1987): Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. *New England Journal of Medicine*, Vol. 317, 146–149.
53. De Greeff A., Hamilton A., Sutcliffe I.C., Buys H., van Alphen L., Smith H.E. (2003): Lipoprotein signal peptidase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiology*, Vol. 149, 1399–1407.
54. de Moor D.E. (1963): Septicaemic infection in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R,S, and T. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 29, 272.
55. Dee S.A., Corey M.M. (1993): The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment. *Swine Health and Production*, Vol. 1, 17R20.
56. del Campo Sepulveda E.M., Altman E., Kobisch M., D'Allaire S., Gottschalk M. (1996): Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen based indirect ELISA. *Veterinary Microbiology*, Vol. 52, 113–125.
57. del Castillo J., Martineau G.P., Messier S., Higgins R. (1995): The use of pharmacokinetics to implement penicillin prophylaxis for streptococcal diseases. *Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference*, Minnesota, 93–96.
58. Denicourt M., Le Coz P. (2000): *Streptococcus suis* 2000 update: nine strategic and practical steps to quickly understand *Streptococcus suis* infection and disease. Martineau G.P. (ed.), Virbac.
59. Devriese L.A., Ceysens K., Hommez J., Kilpper Balz R., Schleifer K.H. (1991): Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Veterinary Microbiology*, Vol. 26, 141R150.
60. Devriese L.A., Hommez J., Pot B., Haesebrouck F. (1994): Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 77, 31R36.
61. Dominguez Punaro M.C., Segura M., Plante M., Lacouture S., Rivest S., Gottschalk M. (2007): *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *Journal of Immunology*, Vol. 179, No. 3, 1842R1854.
62. Donsakul K., Charunghai D., Witoonpanich R. (2003): *Streptococcus suis*: clinical features and diagnostic pitfalls. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Vol. 34, 154–158.

63. Dramsi S., TrieuRCuot P., Bierne H. (2005): Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram positive bacteria. *Research in Microbiology*, Vol. 156, 289–297.
64. Elliott S.D., Alexander T.J.L., Thomas J.H. (1966): Streptococcal infection in young pigs, II, Epidemiology and experimental production of the disease. *Journal of Hygiene*, Vol. 64, 213R220.
65. Elliott S.D., McCarty M., Lancefield R.C. (1977): Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis (*Streptococcus suis*). *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 145, 490–499.
66. Elliott S.D., Tai J.Y. (1978): The typeRspecific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 148, 1699–1704.
67. Enright M.R., Alexander T.J.L., Clifton Hadley F.A. (1987): Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *Veterinary Record*, Vol. 121, 132R133.
68. Erickson E.D., Doster A.R., Pokorny T.S. (1984): Isolation of *Streptococcus suis* from swine in Nebraska. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol. 185, 666–668.
69. Estoepangestie S., Lammler C. (1993): Distribution of capsular types 1 to 28 and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from various European countries. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Vol. 279, 394–403.
70. Facklam R. (2002): What happened to the streptococci: overview of raxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, No. 4, 613–630.
71. Feng W., Laster S.M., Tompkins M., Brown T., Xu J.S., Altier C., Gomez W., Benfield D., McCaw M.B. (2001): *In utero* infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *Journal of Virology*, Vol. 75, 4889–4895.
72. Feng Y., Zhang H., Ying M., Gao G.F. (2010): Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent. *Trends in Microbiology*, Vol. 18, No. 3, 124R131.
73. Feng Y., Zheng F., Pan X., Sun W., Wang C., Dong Y., Ju A.P., Ge J., Liu D., Liu C., Yan J., Tang J., Gao G.F. (2007): Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 275, 80–88.
74. Field H.I., Buntan D., Done J.T. (1954): Studies on piglet mortality, I, Streptococcal meningitis and arthritis. *Veterinary Record*, Vol. 66, 454R455.
75. Fittipaldi N., Collins T., Prothero B., Gottschalk M. (2009): *Streptococcus suis* meningitis, Hawaii. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 15, No. 12, 2067–2069.
76. Fittipaldi N., Gottschalk M., Vanier G., Daigle F., Harel J. (2007): Use of selective capture of transcribed sequences to identify genes preferentially

- expressed by *Streptococcus suis* upon interaction with porcine brain microvascular endothelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, 4359–4364.
77. Fittipaldi N., Sekizaki T., Takamatsu D., Dominguez Punaro M.L., Harel J., Bui N.K., Vollmer W., Gottschalk M. (2008): Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of *Streptococcus suis*. *Molecular Microbiology*, Vol. 70, 1120–1135.
78. Fittipaldi N., Sekizaki T., Takamatsu D., Harel J., Dominguez Punaro M.L., Von Aulock S., Draing C., Marois C., Kobisch M., Gottschalk M. (2008): D alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*, Vol. 76, 3587–3594.
79. Fongcom A., Pruksakorn S., Mongkol R., Tharavichitkul P., Yoonim N. (2001): *Streptococcus suis* infection in northern Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, Vol. 84, No. 10, 1502–1508.
80. Francois B., Gissot V., Ploy M.C., Vignon P. (1998): Recurrent septic shock due to *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36, 2395.
81. Galina L., Pijoan C., Sitjar M., Christianson W.T., Rossow K., Collins J.E. (1994): Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen free piglets. *Veterinary Record*, Vol. 134, 60–64.
82. Gallagher F. (2001): *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet*, Vol. 357, No. 9262, 1129–1130.
83. Geng H., Zhu L., Yuan Y., Zhang W., Li W., Wang J., Zheng Y., Wei K., Cao W., Wang H., Jiang Y. (2008): Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Proteome Research*, Vol. 7, 4132–4142.
84. Gogolewski R.P., Cook R.W., O'Connell C.J. (1990): *Streptococcus suis* serotypes associated with disease in weaned pigs. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 67, 202–204.
85. Gottschalk M. (2004): Porcine *Streptococcus suis* strains as potential sources of infections in humans: an underdiagnosed problem in North America? *Journal of Swine Health and Production*, Vol. 12, No 4, 197R199.
86. 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*, Vol. 3, 60R65.
87. Gottschalk M., Higgins R., Jacques M., Mittal K.R., Henrichsen J. (1989): Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 27, 2633R2636.

88. Gottschalk M., Lebrun A., Wisselink H., Dubreuil J.D., Smith H., Vecht U. (1998): Production of virulence related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 62, 75–79.
89. Gottschalk M., Segura M. (2000): The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary Microbiology*, Vol. 76, 259–272.
90. 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*, Vol. 8, 29–45.
91. Gottschalk M., Xu J., Calzas C., Segura M. (2010): *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? *Future Microbiology*, Vol. 5, No. 3, 371–391
92. Gottschalk M., Xu J., Lecours M., Grenier D., Fittipaldi N., Segura M. (2010): *Streptococcus suis* infections in humans: what is the prognosis for Western countries? Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, Vol. 32, 12.
93. Graveline R., Segura M., Radzioch D., Gottschalk M. (2007): TLR2Rdependent recognition of *Streptococcus suis* is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. *International Journal of Immunology*, Vol. 19, 375–389.
94. Grebe T., Bergenthal D., Fahr A.M., Scheja H.W. (1997): Meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2 in an adult. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, Vol. 122, No. 41, 1244–1247
95. Guise H.J., Penny R.H.C., Duthie, A.N.S. (1985): Streptococcal meningitis in pigs: field trial to compare the effects of two different treatments. *Veterinary Record*, Vol. 117, 65R66.
96. Haataja S., Tikkanen K., Hytonen J., Finne J. (1996): The Gal alpha 1–4 Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*, a gram positive meningitis associated bacterium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 408, 25–34.
97. Halaby T., Hoitsma E., Hupperts R., Spanjaard L., Luirink M., Jacobs J. (2000): *Streptococcus suis* meningitis, a poacher's risk. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 19, No. 12, 943–945.
98. 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*, Vol. 38, 1156–1160.
99. Han D.U., Choi C., Ham H.J., Jung J.H., Cho W.S., Kim J., Higgins R., Chae C. (2001): Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 65, 151–155.

- 100.Hardie J.M. (1984): *Streptococcus*. U: Kreig N.R., Holt J.G. (eds) Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Williams and Wilkins,Baltimore, 1043R1047.
- 101.Heard T. (1991): *Streptococcus suis* type 2 in British pig herds. U: Boden E. (ed.) Swine Practice, BailliereTindall, London, 105R114.
- 102.Heath P.J., Hunt B.W. (2001): *Streptococcus suis* serotypes 3 to 28 associated with disease in pigs. *Veterinary Record*, Vol. 148, 207–208.
- 103.Heath P.J., Hunt B.W., Duff J.P., Wilkinson J.D. (1996): *Streptococcus suis* serotype 14 as a cause of pig disease in the UK. *Veterinary Record*, Vol. 139, 450–451.
- 104.Heidt M.C., Mohamed W., Hain T., Vogt P.R., Chakraborty T., Domann E. (2005): Human infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, 4898–4901.
- 105.Hidalgo A., Ropero F., Palacios R., Garcia V., Santos J. (2007): Meningitis due to *Streptococcus suis* with no contact with pigs or porcine products. *Journal of Infection*, Vol. 55, No. 5, 478.
- 106.Higgins R, Gottschalk M. (2001): Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 2000. *Canadian Veterinary Journal*, Vol. 42, 223.
- 107.Higgins R., Gottschalk M. (1990): An update on *Streptococcus suis* identification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 2, 249R252.
- 108.Higgins R., Gottschalk M. (2005): Streptococcal diseases. U: Diseases of Swine, Straw B.E., D'allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (eds.), Iowa State University, IA, USA, 769–783.
- 109.Higgins R., Gottschalk M., Mittal K.R., Beaudoin M. (1990): *Streptococcus suis* infection in swine: a sixteen month study. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 54, 170R173.
- 110.Hill J.E., Gottschalk M., Brousseau R., Harel J., Hemmingsen S.M., Goh S.H. (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*, Vol. 107, 63–69.
- 111.Hoffman L., Henderson L. (1985): The significance of *Streptococcus suis* in swine diseases: clinical, pathologic and bacteriologic data from a two year study. *Proceedings of Annual Meeting American Association Veterinary Laboratory Diagnosis*, Vol. 28, 201R210.
- 112.Hogg A., Amass S.F., Hoffman L.J., Wu C.C., Clark L.K. (1996): A survey of *Streptococcus suis* isolations by serotype and tissue of origin. *Proceedings of the American Association on Swine Practitioners*, 79–81.
- 113.Holden M.T., Hauser H., Sanders M. (2009): Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One*, Vol. 4, No. 7, 6072.

114. Holt M.E., Enright M.R., Alexander T.J.L. (1990): Immunization of pigs with killed cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Research in Veterinary Science*, Vol. 48, 23–27.
115. Hommez J., Devriese L.E., Henrichsen J., Castryck F. (1986): Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, Vol. 11, 349–355.
116. Hommez L., Wullepit J., Cassimon P. (1986): Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, Vol. 2, 349R355.
117. Huang Y.T., Teng L.J., Ho S.W., Hsueh P.R. (2005): *Streptococcus suis* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, Vol. 38, No. 5, 306–313.
118. Hui A.C., Ng K.C., Tong P.Y., Mok V., Chow K.M., Wu A., Wong L.K. (2005): Bacterial meningitis in Hong Kong: 10 years' experience. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, Vol. 107, 366–370.
119. Hutchings M.I., Palmer T., Harrington D.J., Sutcliffe I.C. (2009): Lipoprotein biogenesis in Gram positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends in Microbiology*, Vol. 17, 13–21.
120. Iglesias J.G., Trujano M., Xu J. (1992): Inoculation of pigs with *Streptococcus suis* type 2 alone or in combination with pseudorabies virus. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 53, 364–367.
121. Ip M., Fung K.S., Chi F. (2007): *Streptococcus suis* in Hong Kong. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 57, No. 1, 15–20.
122. Jacobs A.A.C., Loeffen P.L.W., van den Berg A.J.G., Storm P.K. (1994): Identification, purification, and characterization of a thiol activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and Immunity*, Vol. 62, 1742–1748.
123. Jacques M., Gottschalk M., Foiry B., Higgins R. (1990): Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 172, 2833–2838.
124. Jensen J., van Dorssen C.A. (1951): MeningoRencephalitis bij vafkens door streptococcen. *Tijdschrift voor Diergeneeskund*, Vol. 76, 815R832.
125. Jiang H., Fan H.J., Lu C.P. (2009): Identification and distribution of putative virulent genes in strains of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology*, Vol. 133, 309–316.
126. Jobin M.C., Fortin J., Willson P.J., Gottschalk M., Grenier D. (2005): Acquisition of plasmin activity and induction of arachidonic acid release by *Streptococcus suis* in contact with human brain microvascular endothelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 252, 105–111.
127. 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*, Vol. 62, 1053–1057.

128. Kay R., Cheng A.F., Tse C.Y. (1995): *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. *QJM*, Vol. 88, No. 1, 39–47.
129. Kilpper Balz R., Schleifer K.H. (1987): *Streptococcus suis* sp. nov.; nom.rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 37, 160–162.
130. King S.J., Allen A.G., Maskell D.J., Dowson C.G., Whatmore A.M. (2004): Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, 4740–4747.
131. Koehne G., Maddux F.L., Cornell W.D. (1979): Lancefield group R streptococci associated with pneumonia in swine. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 40, 1640R1641.
132. Kopic J., Paradzik M.T., Pandak N. (2002): *Streptococcus suis* infection as a cause of severe illness: 2 cases from Croatia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Vol. 34, No. 9, 683–684.
133. Lalonde M., Segura M., Lacouture S., Gottschalk M. (2000): Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology*, Vol. 146, 1913–1921.
134. Lamont M.H., Edwards P.T., Windsor R.S. (1980): Streptococcal meningitis in pigs: results of a five year survey. *Veterinary Record*, Vol. 107, 467R469.
135. Lappin E., Ferguson A.J. (2009): Gram positive toxic shock syndromes. *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 9, 281–290
136. Larson D.J., Kott B. (1983): Iowa State University veterinary diagnostic laboratory cases of swine pneumonia and meningitis associated with *Streptococcus suis*. U: Moorehouse L.G. (ed.) *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Las Vegas, Vol. 26, 121R130.
137. Lee G.T., Chiu C.Y., Haller B.L., Denn P.M., Hall C.S., Gerberding J.L. (2008): *Streptococcus suis* meningitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14, No. 1, 183–185.
138. Leelarasamee A., Nilakul C., Tien Grim S., Srifuengfung S., Susaengrat W. (1997): *Streptococcus suis* toxic shock syndrome and meningitis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, Vol. 80, 63–68.
139. Li W., Liu L., Chen H., Zhou R. (2009): Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 292, 123–133.
140. Li Y., Gottschalk M., Esgleas M., Lacouture S., Dubreuil J.D., Willson P., Harel J. (2007): Immunization with recombinant Sao protein confers protection against *Streptococcus suis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 14, 937–943.

141. Li Y., Martinez G., Gottschalk M., Lacouture S., Willson P., Dubreuil J.D., Jacques M., Harel J. (2006): Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infection and Immunity*, Vol. 74, 305–312.
142. Lopreto C., Lopardo H.A., Bardi M.C., Gottschalk M. (2005): Primary *Streptococcus suis* meningitis: first case in humans described in Latin America. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, Vol. 23, No. 2, 110.
143. Lun S.C., Perez Casal J., Connor W., Willson P.J. (2003): Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 34, 27–37.
144. Lun Z.R., Wang Q.P., Chen X.G., Li A.X., Zhu X.Q. (2007): *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 7, No. 3, 201–209.
145. Luque I., Tarradas C., Arenas A., Maldonado A., Astorga R., Perea A. (1998): *Streptococcus suis* serotypes associated with different disease conditions in pigs. *Veterinary Record*, Vol. 142, 726–727.
146. Lutticken R., Temme N., Hahn G., Bartelheimer E.W. (1986): Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Infection*, Vol. 14, No. 4, 181–185.
147. Ma E., Chung P.H., So T. (2008): *Streptococcus suis* infection in Hong Kong: an emerging infectious disease? *Epidemiology and Infection*, Vol. 136, No. 12, 1691–1697.
148. Ma Y., Feng Y., Liu D., Gao G.F. (2009): Avian influenza virus, *Streptococcus suis* serotype 2, severe acute respiratory syndromeRcoronavirus and beyond: molecular epidemiology, ecology and the situation in China. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, Vol. 364, 2725–2737.
149. MacInnes J.I., Desrosiers R. (1999): Agents of the “suisRide diseases” of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 63, 83–89.
150. Madsen L.W., Svensmark B., Elvestad K., Aalbaek B., Jensen H.E. (2002): *Streptococcus suis* serotype 2 infection in pigs: new diagnostic and pathogenetic aspects. *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 126, 57–65.
151. Malley R., Henneke P., Morse S.C., Cieslewicz M.J., Lipsitch M., Thompson C.M., Kurt Jones E., Paton J.C., Wessels M.R., Golenbock D.T. (2003): Recognition of pneumolysin by Toll like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, Vol. 100, 1966–1971.

152. Marie J., Morvan H., Berthelot R., Herault F., Sanders P., Kempf I., Gautier Bouchardon A.V., 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*, Vol. 50, 201–209.
153. Marois C., Le Devendec L., Gottschalk M., Kobisch M. (2006): Molecular characterization of *Streptococcus suis* strains by 16S–23S intergenic spacer polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 70, 94–104.
154. Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K., Wessels M.R. (1992): Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infection and Immunity*, Vol. 60, 3986–3993.
155. Martinez G., de Castro A.F.P., Pagnani K.J.R., Nakazato G., da Silveira W.D., Gottschalk M. (2003): Clonal distribution of an atypical MRPS, EF*, and suilysin (S) phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 67, 52–55.
156. Martinez G., Harel J., Lacouture S., Gottschalk M. (2002): Genetic diversity of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 1/2 isolates recovered from carrier pigs in closed herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 66, 240–248.
157. Martinez G., Pestana de Castro A.F., Jordão Ribeiro Pagnani K., Nakazato G., Dias da Silveira W., Gottschalk M. (2003): Clonal distribution of an atypical MRPS, EF*, and suilysin S phenotype of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains in Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 67, 52–55.
158. Mazokopakis E.E., Kofteridis D.P., Papadakis J.A., Gikas A.H., Samonis G.J. (2005): First case report of *Streptococcus suis* septicaemia and meningitis from Greece. *European Journal of Neurology*, Vol. 12, 487–89.
159. McKellar Q.A., Baxter P., Taylor D., Bogan J.A. (1987): Penicillin therapy of spontaneous streptococcal meningitis in pigs. *Veterinary Record*, Vol. 121, 347–350.
160. Melancon D., Grenier D. (2003): Production and properties of bacteriocin R like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, 4482–4488.
161. Michaud S., Duperval R., Higgins R. (1996): *Streptococcus suis* meningitis: first case reported in Quebec. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, Vol. 7, 329–331.
162. Mogollon J.D., Pijoan C., Murtaugh M.P., Collins J.E., Cleary P.P. (1991): Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 29, No. 4, 782–787.

163. Monter Flores J.L., 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. *Canadian Veterinary Journal*, Vol. 34, 170–171.
164. Musser J.M., Hauser A.R., Kim M.H., Schlievert P.M., Nelson K., Selander R.K. (1991): *Streptococcus pyogenes* causing toxic shocklike syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, Vol. 88, 2668–2672.
165. Mwaniki C.G., Robertson I.D., Trott D.J., Atyeo R.F., Lee B.J., Hampson D.J. (1994): Clonal analysis and virulence of Australian isolates of *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiology and Infection*, Vol. 113, 321R334.
166. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004): Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals: informational supplement M31–S1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
167. Navacharoen N., Chantharochavong V., Hanprasertpong C., Kangsanarak J., Lekagul S. (2009): Hearing and vestibular loss in *Streptococcus suis* infection from swine and traditional raw pork exposure in northern Thailand. *Journal of Laryngology & Otology*, Vol. 123, No. 8, 857–862.
168. Normile D. (2005): Infectious diseases: WHO probes deadliness of China's pigborne disease. *Science*, Vol. 309, 1308R1309.
169. Norton P.M., Rolph C., Ward P.N., Bentley R.W., Leigh J.A. (1999): Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of sullysin. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 26, 25R35.
170. 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*, Vol. 218, 79–84.
171. Orr J., Copeland S., Chirino Trejo M. (1989): *Streptococcus suis* type 9 outbreak in swine. *Canadian Veterinary Journal*, Vol. 30, 680.
172. Osaki M., Takamatsu D., Shimoji Y., Sekizaki T. (2002): Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of GramRpositive bacteria. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, 971–982.
173. Osaki M., Takamatsu D., Shimoji Y., Sekizaki T. (2003): Allelic variation in srtAs of *Streptococcus suis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 219, 195–201.
174. Pancholi V., Fischetti V.A. (1998): Alpha enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, 14503–14515.
175. Pedroli S., Kobisch M., Beauchet O., Chaussinand J.P., Lucht F. (2003): *Streptococcus suis* bacteremia. *Presse Médicale*, Vol. 32, 599–601.

176. Perch B., Kjems E., Slot P., Pedersen K.B. (1981): Biochemical and serological properties of R, S and RS streptococci. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section B*, Vol. 89, 167R171.
177. Perch B., Kristjansen P., Skadhauge K. (1968): Group R streptococci pathogenic for man: two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Vol. 74, 69–76.
178. Perch B., Pedersen K.B., Henrichsen J. (1983): Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 17, 993–996.
179. Power S.B. (1978): *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs. *Veterinary Record*, Vol. 102, 215R216.
180. Prieto C., Peña J., Suárez P., Imaz M., Castro J.M. (1993): Isolation and distribution of *Streptococcus suis* capsular types from diseased pigs in Spain. *Journal of Veterinary Medicine B*, Vol. 40, 544–548.
181. Princivalli M.S., Palmieri C., Magi G., Vignaroli C., Manzin A., Camporese A., et al. (2009): Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003R2007). *Eurosurveillance*, Vol. 14, No. 33, 19310.
182. Quessy S., Dubreuil J.D., Jacques M., Malouin F., Higgins R. (1994): Increase of capsular material thickness following *in vivo* growth of virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 115, 19–26.
183. Reams R.Y., Glickman L.T., Harrington D.D., Bowersock T.L., Thacker H.L. (1993): *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases, Part I. Epidemiologic factors and antibiotic susceptibility patterns. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 5, 363–367.
184. Reams R.Y., Glickman L.T., Harrington D.D., Thacker H.L., Bowersock T.L. (1994): *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases, Part II, Clinical signs, gross and microscopic lesions, and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 6, 326–334.
185. Reams R.Y., Harrington D.D., Glickman L.T., Thacker H.L., Bowersock T.L. (1996): Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 8, 119–121.
186. Reams R.Y., Harrington D.D., Glickman L.T., Thacker H.L., Bowersock T.L. (1995): Fibrinohemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *Streptococcus suis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 7, 406R408.
187. Reams R.Y., Harrington D.D., Glickman L.T., Thacker H.L., Bowersock T.L. (1996): Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol. 8, 119–121.

188. Rehm T., Baums C.G., Strommenger B., Beyerbach M., Valentin R., Weigand P., Goethe R. (2007): Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence associated genes and clinical background. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 56, 102–109.
189. Robertson I.D., Blackmore D.K. (1989): Occupational exposure to *Streptococcus suis* type 2. *Epidemiology and Infection*, Vol. 103, 157–164.
190. Robertson I.D., Blackmore D.K., Hampson D.J., Fu Z.F. (1991): A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. *Epidemiology and Infection*, Vol. 107, 119–126.
191. Rosenkranz M., Elsner H.A., Sturenburg H.J., Weiller C., Rother J., Sobottka I. (2003): *Streptococcus suis* meningitis and septicemia contracted from a wild boar in Germany. *Journal of Neurology*, Vol. 250, No. 7, 869–870.
192. Sala V., Colombo A., Gerola L. (1989): Infection risks of *Streptococcus suis* type 2 localizations in slaughtered swine. *Archivio Veterinario Italiano*, Vol. 40, No. 3, 180–184.
193. Sanford S.E. (1987): Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs, II, Central nervous system lesions. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 51, 486–489.
194. Sanford S.E. (1987): Gross and histopathological findings in unusual lesions caused by *Streptococcus suis* in pigs, I, Cardiac lesions. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 51, 481–485.
195. Sanford S.E. (1989): *Streptococcus suis*: a strategic update. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, Des Moines, 193–195.
196. Sanford S.E., Rosendal S. (1984): *Streptococcus suis* type II: is this a respiratory pathogen of swine? *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, Des Moines, 112–115.
197. Sanford S.E., Tilker A.M.E. (1982): *Streptococcus suis* type II-associated diseases in swine: Observations of a one year study. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Vol. 181, 673–676.
198. Schmitt C.S., Halbur P.G., Roth J.A., Kinyon J.M., Kasornrorkbua C., Thacker B. (2001): Influence of ampicillin, ceftiofur, attenuated live PRRSV vaccine, and reduced dose *Streptococcus suis* exposure on disease associated with PRRSV and *S. suis* coinfection. *Veterinary Microbiology*, Vol. 78, 29–37.
199. Schutzer S.E., Fischetti V.A., Zabriskie J.B. (1983): Toxic shock syndrome and lysogeny in *Staphylococcus aureus*. *Science*, Vol. 220, 316–318.
200. Segers R.P.A.M., Kenter T., de Haan L.A.M., Jacobs A.A.C. (1998): Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 167, 255–261.

201. Segura M., Gottschalk M. (2002): *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774: adhesion and cytotoxicity. *Infection and Immunity*, Vol. 70, 4312–4322.
202. Segura M., Vadeboncoeur N., Gottschalk M. (2002): CD14Rdependent and R independent cytokine and chemokine production by human THP 1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2. *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 127, 243–254.
203. Segura M., Vanier G., AIRNumani D., Lacouture S., Olivier M., Gottschalk M. (2006): ProRinflammatory cytokine and chemokine modulation by *Streptococcus suis* in a wholeblood culture system. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 47, 92–106.
204. Segura M.A., Cleroux P., Gottschalk M. (1998): *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 21, 189–195.
205. Seol B., Kelneric Z., Hajsig D., Madic J., Naglic T. (1996): Susceptibility to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* capsular type 2 strains isolated from pigs. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, Vol. 283, 328–331.
206. Serhir B., Dubreuil D., Higgins R., Jacques M. (1995): Purification and characterization of a 52 kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *Journal of Bacteriology*, Vol. 177, 3830–3836.
207. Serhir B., Higgins R., Foiry B., Jacques M. (1993): Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in *Streptococcus suis*. *Journal of General Microbiology*, Vol. 139, 2953–2958.
208. Shneerson J.M., Chattopadhyay B., Murphy M.F., Fawcett I.W. (1980): Permanent perceptive deafness due to *Streptococcus suis* type II infection. *Journal of Laryngology & Otology*, Vol. 94, No. 4, 425–427.
209. Shryock T.R., Mortensen J.E., Rhoads S.L. 1992. Antibiotic susceptibility in *Streptococcus suis*. *Current Therapeutic Research* Vol. 52:419–424.
210. Sia Y.S., Kan P.G., Wong Y.T. (2006): *Streptococcus suis*: what has been found in the past decades? *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*, Vol. 13, 46R49.
211. Sihvonen L., Kurl D.N., Ilenrichsen J. (1988): *Streptococcus suis* isolated from pigs in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 29, 9R13.
212. Silva L.M., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., ValentinRWeigand P. (2006): VirulenceRassociated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology*, Vol. 115, 117–127.

213. Smith H.E., Buijs H., de Vries R.R., Wisselink H.J., Stockhofe Zurwieden N., Smits M.A. (2001): Environmentally regulated genes of *Streptococcus suis*: identification by the use of iron restricted conditions in vitro and by experimental infection of piglets. *Microbiology*, Vol. 147, 271–280.
214. Smith H.E., Damman M., van der Velde J., Wagenaar F., Wisselink H.J., Stockhofe Zurwieden N., Smits M.A. (1999): Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infection and Immunity*, Vol. 67, 1750–1756.
215. Smith H.E., de Vries R., van't Slot R., Smits M.A. (2000): The cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: genetic determinant for the synthesis of sialic acid. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 29, 127–134.
216. Smith H.E., Reek F.H., Vecht U., Gielkens A.L.J., Smits M.A. (1993): Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infection and Immunity*, Vol. 61, 3318–3326.
217. Smith H.E., Vecht U., Gielkens A.L.J., Smits M.A. (1992): Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136 kilodalton surface protein (muramidase released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity*, Vol. 60, 2361–2367.
218. Smith H.E., Vecht U., Wisselink H.J., Stockhofe Zurwieden N., Biermann Y., Smits M.A. (1996): Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infection and Immunity*, Vol. 64, 4409–4412.
219. Smith T.C., Capuano A.W., Boese B., Myers K.P., Gray G.C. (2008): Exposure to *Streptococcus suis* among US swine workers. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14, No. 12, 1925–1927.
220. St. Geme III J., Cutter D. (1996): Influence of pili, fibrils, and capsule on *in vitro* adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Molecular Microbiology*, Vol. 21, 21R31.
221. Staats J.J., Feder I., Okwumabua O., Chengappa M.M. (1997): *Streptococcus suis*: past and present. *Veterinary Research Communications*, Vol. 21, 381–407.
222. Strangmann E., Froleke H., Kohse K.P. (2002): Septic shock caused by *Streptococcus suis*: case report and investigation of a risk group. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Vol. 205, No. 5, 385–392.
223. Su Y., Yao W., Perez Gutierrez O.N., Smidt H., Zhu W.Y. (2008): Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 66, 546–555.

224. Suankratay C., Intalapaporn P., Nunthapisud P., Arunyingmongkol K., Wilde H. (2004): *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, Vol. 35, No. 4, 868–876.
225. Takamatsu D., Nishino H., Ishiji T., Ishii J., Osaki M., Fittipaldi N., Gottschalk M., Tharavichitkul P., Takai S., Sekizaki T. (2009): Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*, Vol. 138, 132–139.
226. Takamatsu D., Osaki M., Sekizaki T. (2002): Evidence for lateral transfer of the suilysin gene region of *Streptococcus suis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, 2050–2057.
227. Tambyah P.A., Lee K.O. (2001): *Streptococcus* infection and splenectomy. *Lancet*, Vol. 357, No. 9262, 1130–1131.
228. Tan C., Liu M., Jin M., Liu J., Chen Y., Wu T., Fu T., Bei W., Chen H. (2008): The key virulence-associated genes of *Streptococcus suis* type 2 are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 278, 108–114.
229. Tang J., Wang C., Feng Y. (2006): Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Medicine*, Vol. 3, No. 5, e151.
230. 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*, Vol. 32, 578R580.
231. Tarradas C., Luque I., De Andre's D., AbdelRAziz Shahein Y.E., Pons P., Gonzalez F., Borge C., Perea A. (2001): Epidemiological relationship of human and swine *Streptococcus suis* isolates. *Journal of Veterinary Medicine B*, Vol. 48, 347–355.
232. Tarradas M.C., Arenas A., Maldonado A., Vicente S., Miranda A., Perea A. (1994): Susceptibility of *Streptococcus suis* to various antimicrobial agents. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B*, Vol. 41, 685–688.
233. Telford J.L., Barocchi M.A., Margarit I., Rappuoli R., Grandi G. (2006): Pili in gram-positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 4, 509–519.
234. Tenenbaum T., Adam R., Eggelnpohler I. (2005): Strain dependent disruption of blood–cerebrospinal fluid barrier by *Streptococcus suis* *in vitro*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 44, No. 1, 25–34.
235. Tenenbaum T., Essmann F., Adam R. (2006): Cell death, caspase activation, and HMGB1 release of porcine choroid plexus epithelial cells during *Streptococcus suis* infection *in vitro*. *Brain Research*, Vol. 1100, No. 1, 1–12.
236. Tenenbaum T., Matalon D., Adam R. (2008): Dexamethasone prevents alteration of tight junction associated proteins and barrier function in porcine choroid plexus epithelial cells after infection with *Streptococcus suis* *in vitro*. *Brain Research*, Vol. 1229, No. 1, 1–17.

237. Tenenbaum T., Papandreou T., Gellrich D. (2009): Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood–cerebrospinal fluid barrier *in vitro*. *Cell Microbiology*, Vol. 11, No. 2, 323–336.
238. Thanawongnuwech R., Brown G.B., Halbur P.G., Roth J.A., Royer R.L., Thacker B.J. (2000): Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induced increase in susceptibility to *Streptococcus suis* infection. *Veterinary Pathology*, Vol. 37, 143–152.
239. Tian Y., Aarestrup F.M., Lu C.P. (2004): Characterization of *Streptococcus suis* serotype 7 isolates from diseased pigs in Denmark. *Veterinary Microbiology*, Vol. 103, 55–62.
240. Tikkanen K., Haataja S., Finne J. (1996): The galactosylRalpha 1–4 galactose binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infection and Immunity*, Vol. 64, 3659–3665.
241. Tikkanen K., Haataja S., Francois Gerard C., Finne J. (1995): Purification of a galactosylRalpha 1–4 galactose binding adhesin from the GramRpositive meningitis associated bacterium *Streptococcus suis*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, 28874–28878.
242. Torremorell M., Calsamiglia M., Pijoan C. (1998): Colonization of suckling pigs by *Streptococcus suis* with particular reference to pathogenic serotype 2 strains. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 62, 21–26.
243. Torremorell M., Pijoan C., Trigo E. (1997): Vaccination against *Streptococcus suis*: effect on nursery mortality. *Journal of Swine Health and Production*, Vol. 5, 139–143.
244. Tramontana A.R., Graham M., Sinickas V., Bak N. (2008): An Australian case of *Streptococcus suis* toxic shock syndrome associated with occupational exposure to animal carcasses. *Medical Journal of Australia*, Vol. 188, 538–539.
245. Tsai H.C., Lee S.S., Wann S.R., Huang T.S., Chen Y.S., Liu Y.C. (2005): *Streptococcus suis* meningitis with ventriculoperitoneal shunt infection and spondylodiscitis. *Journal of the Formosan Medical Association*, Vol. 104, 948–950.
246. Turgeon P.L., Higgins R., Gottschalk M., Beaudoin M. (1994): Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates. *British Veterinary Journal*, Vol. 150, 263–269.
247. Vadeboncoeur N., Segura M., Al Numani D., Vanier G., Gottschalk M. (2003): ProRinflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol. 35, 49–58.

248. Valentin Weigand P. (2004): Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, Vol. 117, 459–463.
249. Van Calsteren M.R., Gagnon F., Guertin N. (2008): Structural characterization of *Streptococcus suis* type 2 capsular polysaccharide. XXIV International Carbohydrate Symposium, University of Oslo, Oslo, Norway, July 27–August 1, 2008.
250. Van De Beek D., Spanjaard L., De Gans J. (2008): *Streptococcus suis* meningitis in the Netherlands. *Journal of Infection*, Vol. 57, No. 2, 158–161.
251. Vanier G., Segura M., Friedl P., Lacouture S., Gottschalk M. (2004): Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and Immunity*, Vol. 72, 1441–1449.
252. Vanier G., Segura M., Gottschalk M. (2007): Characterization of the invasion of porcine endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Vol. 71, 81–89.
253. Vanier G., Sekizaki T., Dominguez Punaro M.C., Esgleas M., Osaki M., Takamatsu D., Segura M., Gottschalk M. (2008): Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Veterinary Microbiology*, Vol. 127, 417–424.
254. Vecht U., Stockhofe Zurwieden N., Tetenburg B.J., Wisselink H.J., Smith H.E. (1997): Murine and pig models of *Streptococcus suis* type 2 infections are incompatible. *Streptococci and the Host*, Vol. 418, 827–829.
255. Vecht U., van Leengoed L.A.M.G., Verheijen E.R.M. (1985): *Streptococcus suis* infections in pigs in the Netherlands (Part I). *Veterinary Quarterly*, Vol. 7, 315–321.
256. Vecht U., Wisselink H.J., Jellema M.L., Smith H.E. (1991): Identification of 2 proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity*, Vol. 59, 3156–3162.
257. Vecht U., Wisselink H.J., van Dijk J.E., Smith H.E. (1992): Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity*, Vol. 60, 550–556.
258. Vela A.I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M.A., Borge C., Perea A.J., Domínguez L., Fernández Garayzábal J.F. (2003): Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 6, 2498–2502.
259. Vela A.I., Moreno M.A., Cebolla J.A., González S., Latre M.V., Domínguez L., Fernández Garayzábal J.F. (2005): Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Veterinary Microbiology*, Vol. 105, 143–147.

260. Vena M.M., Miquet J.M., Isern S. (1991): *Streptococcus suis* isolated from an outbreak of pig pneumonia. *Veterinaria Argentina*, Vol. 8, 316–319.
261. Verhoef J., Mattsson E. (1995): The role of cytokines in Gram positive bacterial shock. *Trends in Microbiology*, Vol. 3, 136–140.
262. Vilaichone R.K., Vilaichone W., Nunthapisud P., Wilde H. (2002): *Streptococcus suis* infection in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand*, Vol. 85, Suppl. 1, 109–117.
263. Villani D. (2003): A retrospective evaluation of actions taken to control *Streptococcus suis* infection. *Journal of Swine Health and Production*, Vol. 11, 27–30.
264. Vollmer W. (2008): Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 287–306.
265. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. (2008): Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 32, 149–167.
266. Voutsadakis I.A. (2006): *Streptococcus suis* endocarditis and colon carcinoma: a case report. *Clinical Colorectal Cancer*, Vol. 6, No. 3, 226–228.
267. Walsh B., Williams A.E., Satsangi J. (1992): *Streptococcus suis* type 2: pathogenesis and clinical disease. *Reviews in Medical Microbiology*, Vol. 3, No. 1, 65–71.
268. Wang C., Li M., Feng Y., Zheng F., Dong Y., Pan X., Cheng G., Dong R., Hu D., Feng X., Ge J., Liu D., Wang J., Cao M., Hu F., Tang J. (2009): The involvement of sortase A in high virulence of STSS causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Archives of Microbiology*, Vol. 191, 23–33.
269. Wangkaew S., Chaiwarith R., Tharavichitkul P., Supparatpinyo K. (2006): *Streptococcus suis* infection: a series of 41 cases from Chiang Mai University Hospital. *Journal of Infection*, Vol. 52, No. 6, 455–460.
270. Wangsomboonsiri W., Luksananun T., Saksornchai S., Ketwong K., Sungkanuparph S. (2008): *Streptococcus suis* infection and risk factors for mortality. *Journal of Infection*, Vol. 57, No. 5, 392–396.
271. Watkins E.J., Brooksby P., Schweiger M.S., Enright S.M. (2001): Septicaemia in a pig farm worker. *Lancet*, Vol. 357, No. 9249, 38.
272. Wei Z., Li R., Zhang A., He H., Hua Y., Xia J., Cai X., Chen H., Jin M. (2009): Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Veterinary Microbiology*, Vol. 137, 196–201.
273. Wertheim H.F., Nghia H.D., Taylor W., Schultz C. (2009): *Streptococcus suis*: an emerging human pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 48, No. 5, 617–625.
274. Wibawan I.W., Lammler C. (1994): Relation between encapsulation and various properties of *Streptococcus suis*. *Zentralblatt Veterinärmedizin, Rheine B*, Vol. 41, 453–459.

275. Willenburg K.S., Sentochnik D.E., Zadoks R.N. (2006): Human *Streptococcus suis* meningitis in the United States. *New England Journal of Medicine*, Vol. 354, No. 12, 1325.
276. Williams A.E. (1990): Relationship between intracellular survival in macrophages and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 isolates. *Microbial Pathogenesis*, Vol. 8, 189–196.
277. Williams A.E., Blakemore W.F. (1990): Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *Journal of Infectious Disease*, Vol. 162, 474R481
278. Windsor R.S. (1977): Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis* type 2. *Veterinary Record*, Vol. 101, 378R379.
279. Windsor R.S., Elliott S.D. (1975): Streptococcal infection in young pigs, IV, An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *Journal of Hygiene*, Vol. 75, 69R78.
280. Wiseman B., Morrison R., Dial G. (1992): Medicated early weaning: Influence of age on growth performance and disease. *Proceedings of the American Association on Swine Practitioners*, 469R475.
281. Wisselink H.J., Joosten J.J., Smith H.E. (2002): Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, 2922–2929.
282. Wisselink H.J., Smith H.E., 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*, Vol. 74, 237–248.
283. Wisselink H.J., Stockhofe Zurwieden N., Hilgers L., Smith H.E. (2002): Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on non encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Veterinary Microbiology*, Vol. 84, 155–168.
284. Wisselink H.J., Vecht U., Stockhofe Zurwieden N., Smith H.E. (2001): Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase released protein and extracellular factor vaccine. *Veterinary Record*, Vol. 148, 473–477.
285. Wisselink H.J., Veldman K.T., Van den Eede C., Salmon S.A., Mevius D.J. (2006): Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licenced in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, Vol. 113, 73–82.
286. Woo J., Li E.K. (1987): *Streptococcus suis* meningitis requires prolonged treatment with penicillin. *Infection*, Vol. 15, No. 2, 129–130.

287. Ye C., Zheng H., Zhang J., Jing H., Wang L., Xiong Y., Wang W., Zhou Z., Sun Q., Luo X., Du H., Gottschalk M., Xu J. (2009): Clinical, experimental, and genomic differences between intermediately pathogenic, highly pathogenic, and epidemic *Streptococcus suis*. *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 199, 97–107
288. Ye C., Zhu X., Jing H. (2006): *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, No. 8, 1203–1208.
289. Yu H., Jing H., Chen Z., Zheng H., Zhu X., Wang H., Wang S., Liu L., Zu R., Luo L., Xiang N., Liu H., Liu X., Shu Y., Lee S.S., Chuang S.K., Wang Y., Xu J., Yang W. (2006): Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, 914–920.
290. Zhang A., Chen B., Mu X., Li R., Zheng P., Zhao Y., Chen H., Jin M. (2009): Identification and characterization of a novel protective antigen, enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*, Vol. 27, 1348–1353.
291. Zhang C., Ning Y., Zhang Z., Song L., Qiu H., Gao H. (2008): *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Veterinary Microbiology*, Vol. 131, 386–392.
292. Zhang W., Lu C.P. (2007): Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics*, Vol. 7, 4468–4476.
293. Zheng P., Zhao Y.X., Zhang A.D., Kang C., Chen H.C., Jin M. L. (2009): Pathologic analysis of the brain from *Streptococcus suis* type 2 experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology*, Vol. 46, 531–535.
294. Zhu J., Tang J.Q., Guo H.B., Zhang Y., Tao K.H. (2000): Epidemiologic and pathogenic study on an outbreak of acute streptococcal disease in pigs. *Chinese Journal of Preventive Medicine, PLA 2000*, Vol. 18, 257–259.

Biografija

Aleksandar B. Stanojković je rođen 09.05.1979. godine u Smederevu, gde je završio osnovnu školu i Gimnaziju. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, Univerziteta u Beogradu upisao je 1998/99. godine i 2004. godine diplomirao sa prosečnom ocenom 8.59. Iste godine počinje svoj pripravnički staž u veterinarskoj ambulanti u Smederevu a 30.06.2005. godine polaže stručni ispit doktora veterinarske medicine. Deo svog pripravničkog staža obavljao je i u Štutgartu, Nemačka u ambulanti za dijagnostiku i terapiju preživara. Od avgusta 2005. godine radi u veterinarskoj ambulanti „Nutrivet” čiji je osnivač. U 2006. godini dobija licencu za primenu ultrazvuka u veterinarskoj medicini. U oktobru 2008. godine upisuje doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu na katedri za mikrobiologiju. Kao autor ili koautor objavio je ili saopštio 13 radova u domaćim i međunarodnim časopisima i na domaćim i međunarodnim skupovima. Tečno govori engleski jezik a služi se nemačkim i francuskim.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Александар Станојковић _____

број уписа _____ 12/27 _____

Изјављујем

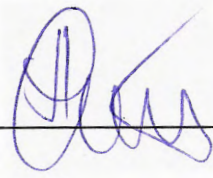
да је докторска дисертација под насловом

**ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА И СЕРОТИПСКЕ ПРИПАДНОСТИ ВРСТЕ
STREPTOCOCCUS SUIS У МАТЕРИЈАЛИМА ПОРЕКЛОМ ОД СВИЊА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 21.09.2012. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Александар Станојковић _____

Број уписа _____ 12/27 _____

Студијски програм _____ Микробиологија _____

Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА И СЕРОТИПСКЕ ПРИПАДНОСТИ ВРСТЕ
STREPTOCOCCUS SUIIS У МАТЕРИЈАЛИМА ПОРЕКЛОМ ОД СВИЊА

Ментор _____ Проф.Др Ружица Ашанин _____

Потписани _____ Александар Станојковић _____

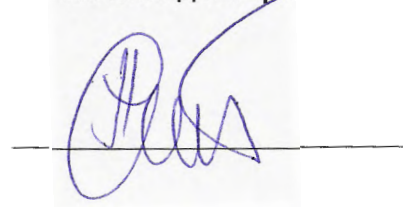
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 21.09.2012. године

Потпис докторанта



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА И СЕРОТИПСКЕ ПРИПАДНОСТИ ВРСТЕ
STREPTOCOCCUS SUIIS У МАТЕРИЈАЛИМА ПОРЕКЛОМ ОД СВИЊА**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 21.09.2012. године

Потпис докторанта

