



FUNKČNÍ VZOREK

**Diagnostický set k identifikaci nových sérotypů
Streptococcus suis pomocí multiplexní PCR**

**Mgr. Natálie Králová
MVDr. Ol'ga Legrádyová
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.**

**6491
2024**

Funkční vzorek 6491/2024

Diagnostický set k identifikaci nových sérotypů *Streptococcus suis* pomocí multiplexní PCR

Autoři:

Mgr. Natálie Králová

MVDr. Ol'ga Légrádyová

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR NCK NaCeBiVet TN02000017

ISBN: 978-80-7672-062-6

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno, 2024

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl funkčního vzorku	3
3. Vlastní popis funkčního vzorku	3
3.1. Složení	4
3.2. Reakční podmínky	6
4. Srovnání novosti postupu	6
5. Uplatnění funkčního vzorku	6
6. Ekonomické aspekty	7
 Příloha 1: Doklad o testování funkčního vzorku (ověření vlastností)	 8

1. Úvod

Streptococcus suis je významný zoonotický patogen, který je původcem závažných infekčních onemocnění prasat a také lidí. Hlavními hostiteli *S. suis* jsou prasata (prase domácí). V současné době se infekce *S. suis* vyskytují v chovech prasat na celém světě a jsou odpovědné za vznik závažných onemocnění, často končících úhynem, zejména u selat po odstavu, s negativním dopadem na ekonomickou situaci. *S. suis* byl izolován také z klinických vzorků jiných druhů zvířat (koně, zebry, psi, kočky, papoušci, kachny), a také člověka. Patogenní kmeny *S. suis* u prasat způsobují onemocnění, jehož klinický obraz charakterizují meningitidy, artritidy, endokarditidy, polyserozitidy nebo septikemie u selat i prasat ve výkrmu. Kmeny, které jsou izolovány z mozku, srdce nebo kloubů, jsou považovány za primární patogeny. Některé kmeny jsou pouze oportunistickými patogeny, samy onemocnění nezpůsobí, ale podílí se na koinfekcích s jinými bakteriálními nebo virovými patogeny. Některé kmeny jsou vyloženě komensální a jsou tedy běžně přítomny v horních cestách dýchacích prasat. V diagnostice onemocnění je proto potřeba brát v úvahu, že ne všechny izoláty *S. suis* z klinických vzorků nemocných zvířat jsou původcem onemocnění a je potřeba je dobře charakterizovat, typizovat.

Kmeny *S. suis* nejsou antigenně jednotné. Na základě odlišnosti kapsulárních polysacharidů (CPS) bylo postupně popsáno 35 různých sérotypů (1-34 a 1/2), avšak na základě jejich genomové analýzy byly některé sérotypy přeřazené k jiným bakteriálním druhům. Běžnými metodami v diagnostických laboratořích bylo doposud rozlišováno tedy 29 sérotypů *S. suis*, velká část izolátů však zůstávala netypizovatelná, tzn. nepatřila k žádnému dosud známému sérotypu.

Za zlatý standard pro určení sérotypu jsou stále považovány sérologické metody – aglutinační nebo koaglutinační test s využitím sérotypově-specifických antisér. Nevýhodou této metody je časová náročnost, pracnost a především nutnost využití živých laboratorních zvířat k produkci protilátek. Pro snadnější a rychlejší odlišení jednotlivých sérotypů *S. suis* byly postupem času vypracovány PCR metody založené na detekování genů kódujících produkci CPS jednotlivých sérotypů.

Informace o sérotypu je velmi důležitá z epidemiologického hlediska, neboť některé sérotypy mají schopnost způsobovat závažnější onemocnění (sérotyp 7) a jen některé sérotypy mohou způsobit onemocnění lidí (především sérotyp 2 a v menší míře pak sérotyp 14). Výskyt sérotypů může být odlišný u různých chovů a liší se také v různých geografických oblastech, což také způsobuje problémy při vývoji účinné komerční vakcíny.

Podle našich předchozích studií je zhruba 20% izolátů, získaných z klinických vzorků nemocných nebo uhynulých prasat, stávajícími sérotypizačními metodami netypizovatelných. Náš funkční vzorek umožňuje rozšíření sérotypizace o další, nové, sérotypy.

2. Cíl funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku je rozšíření metody sérotypizace identifikováním sekvencí DNA specifických pro nové sérotypy a sestavením reakčních směsí pro detekci nových sérotypů *S. suis* pomocí multiplexních PCR, vedoucí k rozšíření diagnostických možností u *S. suis* a zpřesnění diagnostiky.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

Pomocí celogenomového sekvenování jsme identifikovali specifické sekvence DNA v lokusu, který je zodpovědný za tvorbu kapsuly. S využitím těchto specifických sekvencí jsme navrhli vhodné primery a sestavili reakční směsi pro multiplexní PCR, díky kterým je možné detekovat 18 nových sérotypů *S. suis*

ve čtyřech reakcích. Detekční set tedy sestává ze čtyř směsí pro provedení 4 multiplexních PCR (mPCR) reakcí. Sekvence navržených primerů a velikost PCR produktů jsou uvedeny v tabulce 1.

3.1. Složení

Směs pro mPCR 1:

Složení (množství na 1 vzorek):

Plain PP Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika).....	10 µl
Primer NK001F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK001R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK018F-skA (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK018R-skA (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK031F-skB (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK031R-skB (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK236F-skC (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK236R-skC (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK229F-skD (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK229R-skD (100pmol/µl).....	0,1 µl
RNasa free H2O	7 µl
testovaná DNA	2 µl

Směs pro mPCR 2:

Složení (množství na 1 vzorek):

Plain PP Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika).....	10 µl
Primer NK014F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK014R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK098F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK098R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK219F-skE (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK219R-skE (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK235F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK235R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK238F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK238R (100pmol/µl).....	0,1 µl
RNasa free H2O	7 µl
testovaná DNA	2 µl

Směs pro mPCR 3:

Složení (množství na 1 vzorek):

Plain PP Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika).....	10 µl
Primer NK071F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK071R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK083F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK083R (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK241F (100pmol/µl).....	0,1 µl
Primer NK241R (100pmol/µl).....	0,1 µl

Primer NK242F (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK242R (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK243F (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK243R (100pmol/μl).....0,1 μl
 RNasa free H2O 7 μl
 testovaná DNA2 μl

Směs pro mPCR 4:

Složení (množství na 1 vzorek):

Plain PP Master Mix (Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká republika).....10 μl
 Primer NK028F (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK028R (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK084F (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK084R (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK247F (100pmol/μl).....0,1 μl
 Primer NK247R (100pmol/μl).....0,1 μl
 RNasa free H2O 7,4 μl
 testovaná DNA2 μl

Tabulka 1. Primery specifické pro průkaz nových sérotypů *Streptococcus suis*

mPCR 1				
Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK001	cpsI	NK001F NK001R	TCTATTGGAGGAGACTGGGGTTG CCTCATTGCATAGGAAGCGTTCA	236
skupina A (NK018)	cpsJ	NK018F-skA NK018R-skA	CCTTGCTTTTGACAGGGAGATCG CCAAACTGCCCCGATTAGACTTGG	403
skupina B (NK093)	cpsK	NK093F-skB NK093R-skB	TCATCGTCAAAGAAAGATGCCAGA TTCCA CTCTCGTTTGTTGATGCT	748
skupina C (NK236)	cpsK	NK236F-skC NK236R-skC	ACAGCCTCCACTACTTTGCTACT GTTATGCTGTTGCCTATCCTGACG	106
skupina D (NK229)	cpsP	NK229F-skD NK229R-skD	GGGCTCTCTCACGCATTTTACA TGGTTCAGGCTATGATTACGGGG	189
mPCR 2				
Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK014	cpsO	NK014F NK014R	CGCTCCACCTTATCTTTTCCTCC ACGAGAGCCCTCTGATTATTTGC	366
NK098	cpsK	NK098F NK098R	CGGAAATACCACCAATAGCAGCC TTTGAAGGGAAGCGAGGACTGTA	866
skupina E (NK219)	cpsQ	NK219F-skE NK219R-skE	CCCCTGGTCATTAGTTCAAGGTCT GAGTAAACCAAGGCACCCAAACA	290
NK235	cpsM	NK235F NK235R	AGGAGCCATCACCTGTTTCTGTAT ATTATGTGGGCATTGGGCTTTCA	549
NK238	cpsN	NK238F NK238R	TTGAAAGGGTTTGTGTCTTCCCA AGGGTGATTTGCTTTACTGCTTCC	212

mPCR 3

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK071	cpsJ	NK071F NK071R	TAGCGTCTGCTGCTTTTGTGAC GATGCGGGAGATTTGGAAGTTGG	787
NK083	cpsI	NK083F NK083R	TGACCGGCAAAACACCATTGATA TGGCGACATATAACGGTGAAAGAT	344
NK241	cpsI	NK241F NK241R	AGTGCCTGTGTCATCGGAGAG GAAAGAGGTTACAAGGTCACGGTT	269
NK242	cpsL	NK242F NK242R	TCGAGTAGCGTGAGTGCAAATGA CGAAAGAGTTTTGTTGCTCCGAC	168
NK243	cpsM	NK243F NK243R	TCGTAGCATTGATTGGAAGATTGCG GTAAACCAAAACCACAAGCGACC	114

mPCR 4

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK028	cpsO	NK028F NK028R	GGCGGGACTTATAGTGTTGGGAT CATTACTACCGCAGCAGTCACC	397
NK084	cpsI	NK084F NK084R	CGAAATGGAGGGGCTACTGTGTAT AGGCAAAAGAAATACATCCATCGCA	684
NK247	cpsI	NK247F NK247R	CTTTAAGGGAGTGACGAAGTGGC TACCGTCGAAGGAAACAGTGAGT	298

3.2. Reakční podmínky

Amplifikační podmínky byly nastaveny s přihlédnutím na T_m (melting temperature) použitých primerů a na velikost PCR produktů. Počáteční denaturace při 95 °C po dobu 2 minut, po které následuje 29 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 15 s, annealing při 60 °C po dobu 30 s, extenze při 72 °C po dobu 30 s a konečné prodloužení při 72 °C po dobu 10 minut. Produkty amplifikace byly detekovány standardní gelovou elektroforézou ve 2% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem a PCR produkty byly vizualizovány pod ultrafialovým světlem. Každá gelová elektroforéza zahrnovala marker (PCRBio ladder IV., PCR Biosystems Ltd., London, UK).

4. Srovnání novosti postupu

Dosud bylo popsáno 29 sérotypů *S. suis*, diagnostické laboratoře vyšetřovaly jen tyto známé sérotypy. Díky našemu funkčnímu vzorku je možné identifikovat dalších 18 nových dosud nepopsaných sérotypů, a to ve čtyřech multiplexních PCR reakcích.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Diagnostický set umožňuje rozšířit a zpřesnit diagnostiku infekcí *S. suis*, umožňuje identifikaci nových sérotypů *S. suis*. Rozšiřuje možnost typizace kmenů, které se vyskytují v chovech prasat. Identifikace nových sérotypů umožní vyhodnotit jejich virulenci. Bližší charakterizace izolátů je tak důležitá pro odhadnutí virulence kmene a vyhodnocení dalších postupů při léčbě a zavádění opatření proti šíření

infekce. Určování a znalost sérotypů izolátů, které se vyskytují v chovech, může významně pomoci při vývoji účinné vakcíny proti tomuto infekčnímu onemocnění. Funkční vzorek má také význam při sledování epizootologické situace v chovech. Funkční vzorek využijí zejména diagnostické laboratoře a poradenské firmy.

6. Ekonomické aspekty

Funkční vzorek má přímý ekonomický přínos pro diagnostické laboratoře, protože mohou ve svých službách nabídnout identifikaci dalších 18 sérotypů *S. suis*, které se vyskytují v chovech prasat v ČR. Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat zisk z provedených vyšetření. Výsledky vyšetření mohou pak pomoci při zacílení léčby a při zavádění preventivních opatření, v konečném důsledku se uživatelům výsledků vyšetření, tedy chovatelům, sníží ekonomické náklady na léčbu a prevenci onemocnění v chovu a zvýší se tržby za prodej zdravotně nezávadného kvalitního masa. Chovatel tak může ušetřit desítky tisíc korun ročně.

Příloha 1

Doklad o testování funkčního vzorku (ověření vlastností)

Funkční vzorek byl testován na izolátech *S. suis*, získaných z chovů prasat v ČR. Tyto izoláty byly podrobeny celogenomovému sekvenování a byl u nich identifikován *cps* lokus, kde je kódována tvorba specifického kapsulárního polysacharidu, který má být zachycen naším diagnostickým setem.

Testování funkčnosti diagnostického setu

U všech 4 reakcí byl použit následující PCR program:

1. 95°C 2 min iniciální denaturace
2. 94°C 15s denaturace
3. 60°C 30s annealing
4. 72°C 30s extenze
5. Go to 2); 29x
6. 72°C 10 min finální extenze
7. 10°C zchlazení a udržení teploty

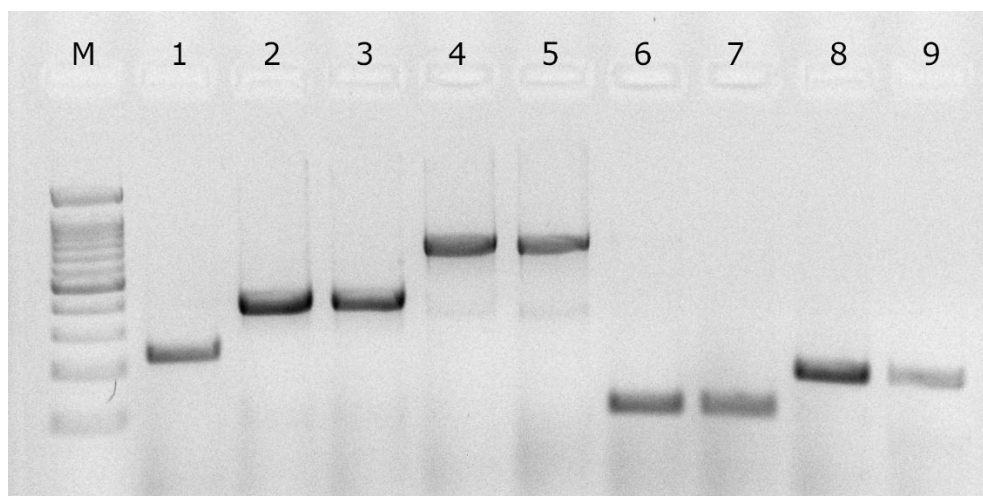
1) Testování směsi pro mPCR 1:

Testované izoláty: NK001, skupina A (NK018, NK031), skupina B (NK093, NK121), skupina C (NK157, NK236), skupina D (NK229, NK233)

Primery použité v mPCR 1:

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK001	<i>cpsI</i>	NK001F NK001R	TCTATTGGAGGAGACTGGGGTTG CCTCATTGCATAGGAAGCGTTCA	236
skupina A (NK018)	<i>cpsJ</i>	NK018F-skA NK018R-skA	CCTTGCTTTTGACAGGGAGATCG CCAAACTGCCCCGATTAGACTTGG	403
skupina B (NK093)	<i>cpsK</i>	NK093F-skB NK093R-skB	TCATCGTCAAAGAAAGATGCCAGA TTCCACTCTCGTTTGTTGATGCT	748
skupina C (NK236)	<i>cpsK</i>	NK236F-skC NK236R-skC	ACAGCCTCCACTACTTTGCTACT GTTATGCTGTTGCCTATCCTGACG	106
skupina D (NK229)	<i>cpsP</i>	NK229F-skD NK229R-skD	GGGCTCTCTCACGCATTTTACA TGGTTCAGGCTATGATTACGGGG	189

Výsledky:



mPCR 1: M – 100 bp DNA marker; 1 – izolát NK001 (236 bp); 2 - izolát NK018 (403 bp); 3 - izolát NK031 (403 bp); 4 - izolát NK093 (748 bp); 5 - izolát NK121 (748 bp); 6 - izolát NK157 (106 bp); 7 - izolát NK236 (106 bp); 8 - izolát NK229 (189 bp); 9 - izolát NK233 (189 bp)

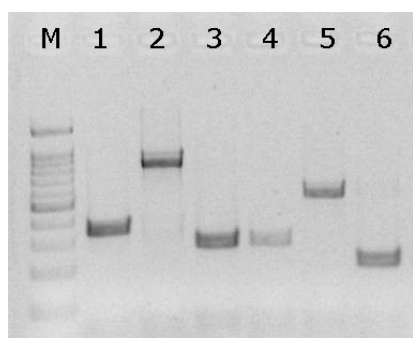
2) Testování směsi pro mPCR 2:

Testované izoláty: NK014, NK098, skupina E (NK006, NK219), NK235, NK238

Primery použité v mPCR 2:

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK014	cpsO	NK014F NK014R	CGCTCCACCTTATCTTTTCCTCC ACGAGAGCCCTCTGATTATTTGC	366
NK098	cpsK	NK098F NK098R	CGGAAATACCACCAATAGCAGCC TTTGAAGGGAAGCGAGGACTGTA	866
skupina E (NK219)	cpsQ	NK219F-ske NK219R-ske	CCCCTGGTCATTAGTTCAAGGTCT GAGTAAACCAAGGCACCCAAACA	290
NK235	cpsM	NK235F NK235R	AGGAGCCATCACCTGTTTCTGTAT ATTATGTGGGCATTGGGCTTTCA	549
NK238	cpsN	NK238F NK238R	TTGAAAGGGTTTGTGTCTTCCCA AGGGTGATTGCTTTACTGCTTCC	212

Výsledky:



mPCR 2: M – 100 bp DNA marker; 1 – izolát NK014 (366 bp); 2 - izolát NK098 (866 bp); 3 - izolát NK006 (290 bp); 4 - izolát NK219 (290 bp); 5 - izolát NK235 (549 bp); 6 - izolát NK238 (212 bp)

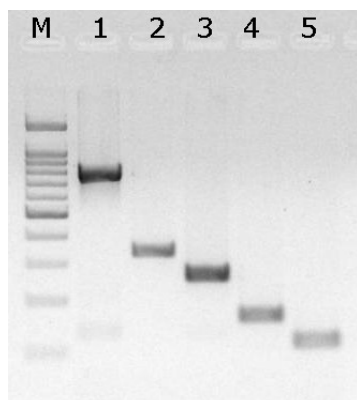
3) Testování směsi pro mPCR 3:

Testované izoláty: NK071, NK083, NK241, NK242, NK243

Primery použité v mPCR 3:

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK071	cpsJ	NK071F NK071R	TAGCGTCTGCTGCTTTTGTGAC GATGCGGGAGATTTGGAAGTTGG	787
NK083	cpsI	NK083F NK083R	TGACCGGCAAAACACCATTGATA TGGCGACATATAACGGTGAAAGAT	344
NK241	cpsI	NK241F NK241R	AGTGCCTGTGTCATCGGAGAG GAAAGAGGTTACAAGGTCACGGTT	269
NK242	cpsL	NK242F NK242R	TCGAGTAGCGTGAGTGCAATGA CGAAAGAGTTTTGTTGCTCCGAC	168
NK243	cpsM	NK243F NK243R	TCGTAGCATTGATTGGAAGATTGCG GTAAACCAAAACCACAAGCGACC	114

Výsledky:



mPCR 3: M – 100 bp DNA marker; 1 – izolát NK071 (787 bp); 2 - izolát NK083 (344 bp); 3 - izolát NK241 (269 bp); 4 - izolát NK242 (168 bp); 5 - izolát NK243 (114 bp)

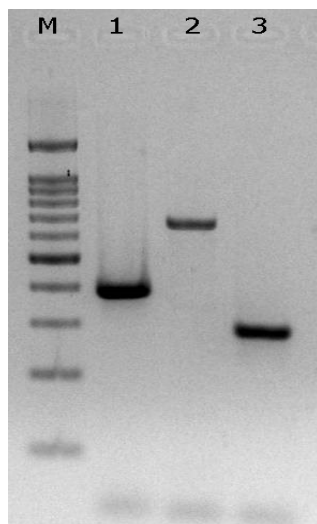
4) Testování směsi pro mPCR 4:

Testované izoláty: NK028, NK084, NK247

Primery použité v mPCR4:

Kontrola (č. izolátu)	Gen	ID primeru	Sekvence primeru (5' → 3')	Velikost PCR produktu (bp)
NK028	cpsO	NK028F	GGCGGGACTTATAGTGTGGGAT	397
		NK028R	CATTACTACCGCAGCAGTCACC	
NK084	cpsI	NK084F	CGAAATGGAGGGGCTACTGTGTAT	684
		NK084R	AGGCAAAAGAAATACATCCATCGCA	
NK247	cpsI	NK247F	CTTTAAGGGAGTGACGAAGTGGC	298
		NK247R	TACCGTCGAAGGAAACAGTGAGT	

Výsledky:



mPCR 3: M – 100 bp DNA marker; 1 – izolát NK028 (397 bp); 2 - izolát NK084 (684 bp); 3 - izolát NK247 (298 bp)

Závěr: U všech testovaných izolátů *S. suis* vznikl PCR produkt očekávané velikosti.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz