

Przegląd metod wykorzystywanych do wykrywania i charakterystyki szczepów *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica**)

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, KATARZYNA STĘPNIEWSKA

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Stępniewska K.

Review of the methods applied for the detection and characterization of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* strains

Summary

Pasteurella multocida (Pm) and *Bordetella bronchiseptica* (Bbr) are important pathogens of humans and many species of animals. At present, several classic and modern techniques are applied for their detection and identification. The review presents an overview of the diagnostic methods that are the most widely used in laboratories, with special emphasis placed on highlighting their advantages and limitations. The choice of the technique depends on the aim of the study. The most often used are classical methods such as microbiological, serological, biochemical, and – in the case of atrophic rhinitis – likewise the morphometric analysis of the cross-section of a turbinated bone. The above-mentioned techniques are not accurate enough because most of the test results must be confirmed by more precise and sensitive techniques. The development of a wide spectrum of molecular techniques has facilitated the undoubted identification of Pm and Bbr. The widest used is PCR basing on the amplification of the gene encoding dermonecrototoxin of Pm and Bbr. Other molecular techniques could be useful for describing the connection among individual components of bacterial cells and their ability to develop the disease. Moreover they could also be used to describe the degree of phylogenetical relationship among field strains. Such information could be used to make a prognosis regarding the appearance of diseases on a particular area.

Taking into account the significance of the rapid and precise detection of the pathological agents for immediate and accurate therapy, the continuation of studies aimed at the developing of rapid and sensitive diagnostic techniques is fully recommended and justified.

Key words: *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, detection, characterization

Rezerwuarem patogennych szczepów *Pasteurella multocida* (Pm) i *Bordetella bronchiseptica* (Bbr) mogą być zarówno ludzie, jak i wiele gatunków zwierząt np.: świnie, kozy, owce, bydło, króliki, koty, psy, drób, szczury oraz małpy (5). U trzody chlewnej bakterie te wywołują zakaźne zanikowe zapalenie nosa (zzzn) – chorobę o dużym znaczeniu dla efektywnej produkcji trzody chlewnej. Objawia się ona zanikiem nabłonka migawkowego nosa oraz deformacją czaszki, co prowadzi do upośledzenia stymulacji węchowej, obniżenia apetytu i utrudnionego pobierania paszy, a w konsekwencji do spowolnienia tempa przyrostów masy ciała. W zależności od natężenia objawów chorobowych obecnie wyróżnia się dwie podjednostki chorobowe: PAR (progressive atrophic rhinitis) – progresywny zanikowy nieżyt nosa, wywołowany przez der-

monekrotoksyczne szczepy Pm (DNT Pm), oraz NPAR (nonprogressive atrophic rhinitis) – nieprogresywny nieżyt nosa wywołowany przez chorobotwórcze szczepy Bbr (16). *Pasteurella multocida* izoluje się zarówno od świń wykazujących objawy infekcji, jak i od świń klinicznie zdrowych, ale izolaty te charakteryzują się odmiennymi cechami genotypowymi. Z uwagi na fakt, że zakażone świnie mogą nie wykazywać zauważalnych objawów klinicznych, choroba może nie zostać wykryta. Jeśli PAR zostanie stwierdzone u 3-5% świń, może to wskazywać na występowanie infekcji u około 50-70% zwierząt z danej chlewni. Największe zagrożenie dla gospodarstw wolnych od PAR występuje przy wprowadzaniu nowych zwierząt o nieznanym statusie zdrowotnym podczas remontu stada, które jako potencjalny rezerwuuar Pm i Bbr mogą przyczynić się do infekcji pozostałych świń. Próby elimi-

*) Praca wykonana w ramach grantu MNiSW nr N N308 3228 33.

nacji wymienionych patogenów z fermy poprzez chemioterapię i szczepienia pociągają za sobą znaczne nakłady finansowe, przyczyniając się także do zmniejszenia rentowności gospodarstwa.

Dla skutecznego zwalczania infekcji lub ochrony przed zakażeniem stad wolnych od PAR ważne jest szybkie wykrycie obecności patogennych szczepów, zdolnych do produkcji dermonekrotoksyny. Do metod najczęściej stosowanych w diagnostyce choroby zalicza się: analizę morfometryczną, badania bakteriologiczne oraz testy: biochemiczne, biologiczne i molekularne.

Podstawą uznania stada za wolne od PAR są ujemne wyniki poubojowego badania morfometrycznego, potwierdzone wynikami badania serologicznego (16, 19). Badanie morfometryczne przekroju poprzecznego małżowin nosowych wykonuje się u podejrzanych o chorobę 10 tuczników, o masie ciała około 100 kg. Pozwala ono na określenie wielkości szczeliny między małżowiną a ścianą boczną lub przegrodą nosa w miejscu, w którym jest ona największa. Do określenia stopnia zmian w małżowinach nosowych stosuje się 5-stopniową skalę opracowaną przez Done (6), wg której stopień I traktowany jest jako słabe odchylenie od normy, a stopień V jako całkowity zanik małżowin. Za wynik dodatni uważa się sumę pomiarów szczelin w lewej i prawej jamie nosowej przekraczającą 6 mm. W przypadku, gdy zanik małżowin jest niewielki, ale stwierdza się wyraźną deformację przegrody nosowej, wynik traktuje się również jako dodatni.

Materiałem używanym do diagnostycznych badań laboratoryjnych w kierunku PAR są wymazy pobrane przyżyciowo z nosa świń oraz surowice, a poubojowo migdałki i bioptaty z chorobowo zmienionych płuc.

Istotne znaczenie w badaniu bakteriologicznym ma właściwe pobranie materiału do badań (dotyczy to zwłaszcza wymazów z nosa świń). Świnie powinny być odpowiednio przytrzymane, tak, aby nie zaciskać im nozdrzy. Nozdrza zewnętrzne powinny być powierzchownie oczyszczone. Wymaz pobiera się komercyjnymi sterylnymi wymazówkami bądź przy użyciu waty nawiniętej na patyczek plastikowy lub metalowy. Wymazówkę wkłada się dośrodkowo do przedSIONKA nosa wzdłuż brzusznej ściany otworu nosowego, kierując się w stronę przegrody nosowej, następnie, po przejściu przedSIONKA nosa należy delikatnie kierować ją w stronę nozdrzy tylnych, równoległe do płaszczyzny strzałkowej głowy i wykonując ruch obrotowy pobrać wymaz. Wymazy należy pobierać dość szybko i sprawnie, ponieważ świnie broniąc się niekiedy szarpną gwałtownie głową lub zaciskają nozdrza, co utrudnia pozyskanie materiału.

Powierzchnowe pobranie wymazu, zbyt długi czas pomiędzy pobraniem a wysiewem materiału czy niewłaściwe warunki transportu (brak schłodzenia) uniemożliwiają potencjalną izolację patogenów. *Bordetella bronchiseptica* potrzebuje więcej czasu do wzrostu

(nawet 72 godziny), który może być tłumiony przez wzrost innych, szybko rosnących bakterii, co może dać w konsekwencji fałszywie ujemny wynik badania.

Wstępną metodą diagnostyczną jest badanie bakteriologiczne. W celu izolacji *Pm* i *Bbr* badany materiał posiewany jest równoległe na agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi końskiej, a także na podłoża MacConkeya oraz Smith-Baskerville'a (SB). Po inkubacji w 37°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych, z wyjątkiem hodowli na podłożu SB, która wymaga dłuższego czasu inkubacji (około 48 godzin), dokonuje się oceny makromorfologicznej wyrosłych kolonii. *Pasteurella multocida* nie wykazuje wzrostu na podłożu MacConkeya, a na agarze z krwią kolonie przybierają charakterystyczny kształt kropli rosy. Kolonie *Bbr* na agarze z krwią są drobne, białe, wypukłe, zaś na podłożu MacConkeya są drobne, przejrzyste, z różową poświatą. *Bordetella bronchiseptica*, rosnąc na podłożu SB, powodują jego alkalizację, co prowadzi do zmiany zabarwienia z zielonej na niebieską. Lariveire i wsp. (13) wykazali, że na podłożu SB pozabawionym ze swego składu amfoterycyny B uzyskuje się znaczny wzrost efektywności izolacji *Bbr* z materiału biologicznego.

Ocena makromorfologiczna hodowli bakteryjnej pozwala na wstępną identyfikację wyrosłych drobnoustrojów, jest jednak niewystarczająca do stwierdzenia, czy wyizolowana *Pm* jest czy nie jest szczepem dermonekrotokstycznym.

Kolejną metodą stosowaną w wykrywaniu omawianych patogenów jest badanie mikroskopowe. Bezpośrednie badanie mikroskopowe ma niewielką wartość diagnostyczną przy identyfikacji *Bbr*, natomiast stwierdzenie pałeczek wybarwionych dwubiegunowo błękitem metylenowym w metodzie Loefflera wskazuje na obecność bakterii z rodzaju *Pasteurella spp* (13).

Potwierdzeniem wstępnej identyfikacji bakteriologicznej izolatów *Pm* i *Bbr* są badania biochemiczne wyizolowanych czystych kultur bakteryjnych. *Pasteurella multocida subsp. multocida* nie powoduje hemolizy, wytwarza katalazę, oksydazę oraz indol, nie wytwarza ureazy oraz powoduje dekarboksylację ornityny. Ponadto fermentuje ona glukozę, mannitol, sorbitol i galaktozę. Niektóre szczepy fermentują również laktozę, ksylozę i trehalozę. *Bordetella bronchiseptica* charakteryzuje się tym, że wytwarza katalazę i oksydazę, ma zdolność ruchu, powoduje redukcję azotanów, wytwarza ureazę (już po 4 godzinach inkubacji), wykazuje wzrost w obecności cytrynianu oraz nie wytwarza brązowego barwnika na podłożu agarowym z krwią z dodatkiem L-tyrozyny (1 g/L) (10). Szybką analizę biochemiczną można przeprowadzić przy użyciu zestawów mini Api: ID 20 E (identyfikacja *Enterobacteriaceae* i innych niewymagających pałeczek Gram-ujemnych) oraz Api 20 NE (identyfikacja niejelitowych pałeczek Gram-ujemnych) (bioMerieux).

Testy biochemiczne, podobnie jak badanie bakteriologiczne, także nie pozwalają na rozróżnienie

szczepów DNT i nie-DNT. Ponadto ich zastosowanie w szybkiej diagnostyce bakteriologicznej zakażeń wywołanych przez *Pm* i *Bbr* ogranicza fakt, że nie są one przeznaczone do bezpośredniego badania materiału klinicznego, dlatego czas badania wydłuża się o izolację czystych kultur bakteryjnych.

Po identyfikacji bakteriologicznej i biochemicznej wyizolowanych *Pasteurella* ważne jest zaliczenie ich do grupy otoczkowej, a także ocena toksynotwórczości. *Pasteurella multocida* powodująca PAR u świń należy głównie do serotypu D, ale stwierdzano również szczepy chorobotwórcze należące do serotypu A. Oznaczenia grupy otoczkowej *Pm* dokonuje się poprzez wykonanie testu z akryflawiną w hodowlach bulionowych BHI (bulion mózgowo-rdzeniowy). Obecność grubych, kłaczkowatych strąków wskazuje na typ otoczkowy D, jednolicie mętna struktura hodowli wskazuje na typ otoczkowy A. Przynależność do grupy A można potwierdzić za pomocą testu na wytwarzanie hialuronidazy. Polega on na poprzecznym posiewie liniowym *Pm* i jednocześnie pod kątem prostym do tej linii posiewie *Staphylococcus aureus* wytwarzającego hialuronidazę. Zredukowany wzrost *Pm* w pobliżu wyrosłego gronkowca wskazuje na grupę otoczkową A (11).

Dermonekrotoksyczność izolatów *Pm* i *Bbr* można stwierdzić zarówno metodami *in vitro*, z uwzględnieniem: testu cytotoksyczności w hodowlach komórkowych, testu immunoenzymatycznego z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych czy PCR (Polymerase Chain Reaction), jak i metodami *in vivo*, w tym testem biologicznym przeprowadzonym na zwierzętach laboratoryjnych. Śmierć myszek białych po dootrzewnowym wstrzyknięciu supernatantu z płynnej hodowli wymienionych szczepów świadczy o dermonekrotoksyczności izolatów, podobnie jak wstrzyknięcie śródskórne supernatantu świnkom morskim wywołujące u nich zmiany nekrotyczne skóry (19).

Powszechnie stosowanymi metodami, wykorzystywanymi przede wszystkim do badań monitoringowych stad w kierunku zzzn są: antygenowy test ELISA służący do wykrywania antygeny *Pm* oraz serologiczny test ELISA do wykrywania przeciwciał dla DNT *Pm*. Jedyny dostępny na rynku zestaw komercyjny do wykrywania antygeny *Pm* nie pozwala na rozróżnienie izolatów *Pm* DNT(+) od *Pm* DNT(-). Natomiast testem serologicznym nie można rozróżnić przeciwciał anty-DNT *Pm*, które są efektem szczepienia profilaktycznego od przeciwciał, które powstały w wyniku stymulacji układu immunologicznego przez drobnoustrój (w toku zakażenia), dlatego nie powinien być on stosowany do oceny stanu zdrowia świń wprowadzanych do stad wolnych od PAR (14). Niewątpliwą zaletą testu ELISA jest natomiast prostota wykonania, możliwość przebadania dużej liczby próbek w krótkim okresie oraz łatwość interpretacji wyników.

Bowersock i wsp. (1) porównali czułość i specyficzność testu ELISA do wykrywania antygeny *Pm*,

opartego na przeciwciele monoklonalnym przeciwko DNT, z wynikami próby biologicznej, przeprowadzanej we wcześniej opisany sposób i testu cytotoksyczności w hodowli pneumocytów płodów kocich. Czułość i specyficzność opracowanego przez wymienionych autorów testu ELISA została określona na poziomie, odpowiednio, 80% i 85% i była zdecydowanie wyższa od dwóch pozostałych metod, obarczonych dodatkowo znacznym subiektywizmem w interpretacji wyników. Próba biologiczna dała wyniki zbliżone do metody immunoenzymatycznej, chociaż zdarzały się trudności podczas interpretacji rezultatów, co mogło wynikać z obecności obcych substancji w supernatancie użytym do immunizacji myszy, zaś w przypadku testu cytotoksyczności zanotowano znaczną niezgodność wyników z testem ELISA. Należy zaznaczyć, że izolaty ocenione jako dodatnie w teście ELISA zostały następnie przebadane z użyciem sondy molekularnej, celem weryfikacji. Uzyskany wynik był w 100% zgodny, co potwierdziło przydatność opracowanego testu do wykrywania obecności DNT *Pm* w wymazach z nosa świń.

W ostatnich latach bardzo szerokie zastosowanie w diagnostyce bakteriologicznej znalazły techniki biologii molekularnej, szczególnie PCR, z uwagi na fakt, że przy jego użyciu możliwa jest bezpośrednia identyfikacja izolatów, z pominięciem etapu hodowli na podłożach, identyfikacji biochemicznej czy testu toksyczności. W konsekwencji czas niezbędny do postawienia rozpoznania jest bardzo krótki (kilka godzin). Ponadto do zalet metody PCR należą: wysoka czułość i specyficzność, prostota wykonania oraz możliwość wykorzystania każdego rodzaju materiału biologicznego jako matrycy. W przypadku *Pm* niewątpliwie głównym czynnikiem odpowiedzialnym za chorobotwórczość szczepów jest DNT, stąd metody PCR używane do rozpoznawania PAR opierają się najczęściej na powieleniu sekwencji genu *ToxA*, odpowiedzialnego za jej produkcję. Wymieniony gen jest uważany za specyficzny dla tego gatunku bakterii oraz charakterystyczny dla patogennych szczepów *Pm*, wywołujących objawy chorobowe u świń (15, 18, 20, 23). Niemniej jednak wg Kampa i wsp. (9) *E. coli* oraz *S. typhimurium* zawierają sekwencje homologiczne do powielanego regionu, co może wpływać na specyficzność metody.

Z kolei *Bbr* posiada wiele czynników mających wpływ na jej patogenność. Należą do nich: LPS, produkty III typu systemu sekrecyjnego, fimbrie, adhezyny, pertaktyna i cyklaza adenylowa. Za najważniejszy marker wirulencji uważa się jednak dermonekrotoksynę. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Brockmeiera i wsp. (2), zanik małżowin nosowych oraz odoskrzelowe zapalenie płuc rozwijało się tylko u świń zakażonych szczepami *Bbr* produkującymi DNT, jednakże szczepy jej pozbawione nie były całkowicie awirulentne. Ze względu na znaczenie DNT w patogenności *Bbr* w PIWet-PIB opracowano aktualnie test

PCR umożliwiającą amplifikację wymienionego genu (22).

Jak wskazują na to wyniki badań przeprowadzonych przez Choi i Chae (3), wiele zwierząt, które są nosicielami *Pm*, może nie zostać wykrytych podczas monitoringu prowadzonego za pomocą konwencjonalnego PCR, ponieważ fragment amplifikowanego genu może być zbyt duży. Z tego powodu wspomniani autorzy zastosowali test nested-PCR do detekcji DNT szczepów *Pm* z wymazów z nosa świń, modyfikując konwencjonalny PCR przez skrócenie jednego z używanych w reakcji starterów. W efekcie uzyskiwali oni krótsze produkty amplifikacji genu odpowiedzialnego za produkcję DNT (w wersji pierwotnej fragment powielany miał długość 846 pz, a po zmianie 690 pz). Warunki reakcji (długość cykli, temperatura kolejnych etapów) pozostały bez zmian. Zmniejszenie długości sekwencji powielanych nukleotydów znacznie poprawiło czułość testu mierzoną spektrofotometrycznie (z 10^{-5} do 10^{-8}), pozwalając wykryć 0,1 µg DNA/µl.

W genomie *Bordetella* spp. znajdują się powtarzające się sekwencje insercyjne, w wysokiej liczbie kopii, pozwalające na rozróżnienie szczepów. Właściwość tę wykorzystali Koidl i wsp. (12), opracowując technikę Real-Time PCR. Opracowana przez wymienionych autorów metoda stanowiła multipleks czterech niezależnych reakcji PCR. W pierwszej amplifikacji powielano sekwencję insercyjną IS481 o długości 81 pz, która jest obecna w dużej liczbie kopii u *B. pertussis*, *B. holmesii*, zaś okazjonalnie u *B. bronchiseptica*. W drugiej amplifikacji powielano fragment o długości 104 pz IS1001, obecny w dużej liczbie kopii u *B. parapertussis*, sporadycznie u *B. bronchiseptica* i *B. holmesii*. W obu reakcjach PCR użyto tego samego barwnika i mierzono fluorescencję przy tej samej długości fali (530 nm). Trzecia amplifikacja powielala sekwencję o długości 135 pz, specyficzną dla genu kodującego włóknikową hemaglutyninę, występującą jako pojedyncza kopia genu u *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* i u *B. pertussis*. Pomiar fluorescencji dla tego produktu był prowadzony przy 640 nm. W czwartej reakcji powielono heterologiczną wewnętrzną kontrolę, mierzając fluorescencję przy 704 nm. Analiza krzywej topnienia produktów PCR pozwalała na wykrywanie specyficznego produktu amplifikacji i różnicowanie gatunków *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* i *B. pertussis*, natomiast *B. holmesii* nie była wykrywana w tym systemie. Real-Time PCR okazał się zatem przydatną molekularną metodą wykrywającą i różnicującą DNA *Bordetella* spp., która może być używana w rutynowych badaniach diagnostycznych.

Inną molekularną metodą wykorzystywaną do różnicowania szczepów *Pm* jest REA (restriction endonuclease analysis) – analiza DNA całych komórek bakteryjnych przy użyciu enzymów restrykcyjnych. Gardner i wsp. (8) wykorzystali w tym celu enzymy SmaI oraz EcoRI. Zastosowanie SmaI pozwoliło na wyka-

zanie obecności różnych wzorów restrykcyjnych wśród przebadanych szczepów, natomiast użycie EcoRI spowodowało uzyskanie ogromnej liczby fragmentów restrykcyjnych, co utrudniało interpretację otrzymanych wyników. Uznano zatem, że analiza DNA metodą REA z zastosowaniem endonukleazy SmaI stwarza większe możliwości różnicowania wśród odmiennych fenotypowo szczepów *Pm* izolowanych od świń oraz śledzenia źródeł PAR w fermach trzody chlewnej.

Moreno i wsp. (17) używali do typowania szczepów *Pm subsp. multocida* izolowanych od świń chorych na zapalenie płuc, PAR i posocnicę, technikę SE-AFLP (single enzyme amplified fragment length polymorphism). Jest to prosta i łatwa do standaryzacji metoda służąca do badania polimorfizmu w genomie bakteryjnym. Polega ona na cięciu genomu jedną endonukleazą (w omawianym przypadku był to enzym HindIII należący do II grupy enzymów restrykcyjnych). Pocięte DNA dodano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej oligonukleotydy, ligazę T4 DNA, bufor i wodę. Zligowane DNA denaturowano w 80°C przez 10 min. i przeprowadzono reakcję PCR. Zamplifikowane fragmenty rozdzielano w 2% żelu agarozowym. Przy zastosowaniu SE-AFLP uzyskiwano 7-12 fragmentów DNA *Pm* o wielkości 400-1400 pz. Większość uzyskanych izolatów należało do typu D, jednakże największą genetyczną heterogenność zaobserwowano w obrębie typu A.

Kolejną techniką wykorzystywaną do wykrywania i charakterystyki szczepów *Pm* i *Bbr* jest PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). Służy ona do określenia genetycznych i epidemiologicznych zależności pomiędzy szczepami terenowymi, pozwalając na określenie stopnia ich pokrewieństwa filogenetycznego oraz efektywniejszą identyfikację i rozróżnienie gatunkowe niż np. rybotypowanie. Kędrak-Jabłońska (11) przy użyciu PFGE przebadala izolaty *Pm* uzyskane od bydła chorego na posocnicę krwotoczną. Do cięcia genomu bakteryjnego stosowała enzym ApaI, a następnie prowadziła rozdział elektroforetyczny w zmiennym pulsacyjnym polu elektrycznym i dokonywała analizy uzyskanych wzorów.

SDS-PAGE jest techniką umożliwiającą analizę profili białkowych błony zewnętrznej (OMP – outer membrane protein), które poddawane są rozdziałowi w 12% żelu poliakrylamidowym. Davies i wsp. (4) badali korelacje pomiędzy występowaniem genu *toxA* *Pm*, typem otoczkowym szczepu a rodzajem białek błony zewnętrznej. Okazało się, że 76% przebadanych szczepów *Pm* odpowiedzialnych za występowanie PAR, zawierających gen *toxA*, posiadało typ otoczkowy D i miało typ OMP - 4.1 oraz typ otoczkowy A i D o profilu OMP - 6.1. Większość szczepów wywołujących zapalenie płuc, nie posiadających genu *toxA*, należało do typu otoczkowego A o typie OMP: 1.1, 2.1, 3.1, 5.1, lub typu otoczkowego D, który posiadał OMP - 6.1. Wykazano tym samym silny związek typu otoczkowego D o profilu OMP - 6.1 powodującego PAR

i zapalenie płuc z posiadaniem lub nie genu *toxA*, odpowiedzialnego za produkcję DNT.

Eun-Kyung i wsp. (7) różnicowali szczepy *Bbr* stosując analizę RAPD (random amplified polymorphic DNA) i PFGE. Przy pomocy metody PFGE analizowane jest całe chromosomalne DNA, w przeciwieństwie do RAPD, które stosuje się do badania chromosomalnych rozproszonych *loci*, sekwencji polimorficznych regionów komplementarnych do użytych starterów oraz polimorfizm amplifikowanych obszarów. Obie metody były zastosowane do wykrywania różnic genotypowych wśród szczepów *Bbr* wyizolowanych od świń. Można je wykorzystywać w badaniach epidemiologicznych, śledząc np. rozprzestrzenianie się gatunków bakterii odpowiedzialnych za infekcję. Wykazano większą przydatność PFGE w różnicowaniu wyizolowanych szczepów niż RAPD. Dodatkową zaletą PFGE była odtwarzalność wyników genotypowania.

Szybką i efektywną metodą jednoczesnego wykrywania *Bbr* i toksynotwórczych *Pm* jest technika dwukolorowej hybrydyzacji materiału wyizolowanego z czystej kultury. Etap hybrydyzacji jest poprzedzony wklonowaniem odpowiednich fragmentów genu *ToxA* *Pm* i genu *AlcA* *Bbr* do genomu *E. coli*. Odpowiednio przygotowane membrany poddaje się hybrydyzacji z sondami wyznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. Fluoresceiną wyznakowany jest gen *ToxA*, natomiast z digoxygeniną związany jest gen *AlcA*. Detekcja odbywa się po dodaniu odpowiednich substratów. Różowy sygnał hybrydyzacji jest specyficzny tylko dla DNT izolatów *Pm*, natomiast sygnał fioletowy charakterystyczny jest tylko dla *Bbr*. Metoda dwukolorowej hybrydyzacji jest szybka, specyficzna i użyteczna do analizy dużej liczby próbek, w porównaniu z metodami opierającymi się o analizę morfologii kolonii i testy biochemiczne. Wadą tej metody jest znaczny koszt odczynników, które przewyższają ceny reagentów stosowanych w konwencjonalnych metodach kolorymetrycznych czy chemiluminescencyjnych. Nie bez znaczenia jest też dość skomplikowany proces samego wklonowywania genów (21).

Podsumowując przedstawione w artykule metody, aktualnie dysponujemy szeregiem klasycznych i nowoczesnych technik pozwalających na wykrywanie i charakterystykę omawianych drobnoustrojów. Mają one szereg zalet, ale i określone ograniczenia. Wybór właściwej metody uzależniony jest przede wszystkim od celu analizy. Biorąc pod uwagę znaczenie szybkiego i precyzyjnego rozpoznania przyczyny zachorowań dla niezwłocznego zastosowania odpowiedniego leczenia, kontynuacja badań nad rozwojem szybkich i czułych metod diagnostycznych wydaje się w pełni uzasadniona. Precyzyjna diagnostyka pozwala także na bezpieczny remont stada, umożliwia ograniczenie występowania zzzn w fermach, a nawet całkowite uwolnienie stad od tej choroby, co z pewnością przekłada się na korzystny bilans ekonomiczny i rentowność produkcji trzody chlewnej.

Piśmiennictwo

1. Bowersock T. L., Hooper T., Pottenger R.: Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 419-422.
2. Brockmeier S. L., Register K. B., Magyar T., Lax A. J., Pullinger G. D., Kunkle R. A.: Role of the dermonecrotic toxin of *B. bronchiseptica* in pathogenesis of respiratory disease in swine. *Inf. Immun.* 2002, 70, 481-490.
3. Choi C., Chae C.: Enhanced detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs using a nested polymerase chain reaction. *Vet. J.* 2001, 162, 255-258.
4. Davies R. L., MacCorquodale R., Baillie S., Caffrey B.: Characterisation and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.* 2003, 52, 59-67.
5. de Jong M. F.: Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis, [w:] Disease of swine. Wyd. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA 2006, 577-602.
6. Done J. T., Upcott D. H., Frewin D. C., Herbert C. N.: Atrophic rhinitis: snout morphometry for quantitative assessment of conchal atrophy. *Vet. Rec.* 1984, 114, 33-35.
7. Eun-Kyung S., Yeon-Soo S., Jeong Hee H., Tae-Wook H.: Diversity of swine *Bordetella bronchiseptica* isolates evaluated by RAPD analysis and PFGE. *J. Vet. Sci.* 2007, 8, 65-73.
8. Gardner I. A., Kasten R., Eamens G. J., Snipes K. P., Anderson R. J.: Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 442-447.
9. Kamp E. M., Bokken G. C. A., Vermeulen T. M. M., de Jong M. F., Buys H. E., Reek F. H., Smits M. A.: A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *P. multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996, 8, 304-309.
10. Kaneman E. W., Winn W. C.: Miscellaneous fastidious gram-negative bacilli, [w:] Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Wyd. Lipicott Williams&Wilkins 2006, 416-431.
11. Kędrak A.: Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Pasteurella multocida* wyisobnionych od bydła. Praca doktorska, Puławy 2004.
12. Koidl C., Bozic M., Burmeister A., Hess M., Marth E., Kessler H. H.: Detection and differentiation of *Bordetella* spp. by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 347-350.
13. Lariveire S., Leblanc L., Mittal K. R., Martineau G. P.: Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 364-367.
14. Levonen K., Frandsen P. L., Seppanen J., Veijalainen P.: Detection of toxigenic *Pasteurella multocida* infections in swine herds by assaying antibodies in sow colostrums. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996, 8, 455-459.
15. Lichtensteiger C. A., Steenbergen S. M., Lee R. M., Polson D. D., Vimr E. R.: Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 3035-3039.
16. Markowska-Daniel I., Samorek M., Stepniewska K.: Współczesne poglądy na temat epidemiologii progresywnego i nieprogresywnego zakaźnego zanikowego zapalenia nosa świń. *Lecznica Dużych Zwierząt* 2008, 1, 18-24.
17. Moreno A. M., Baccaro M. R., Ferreira A. J. P., Pestana de Castro A. F.: Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 1743-1746.
18. Nagai S., Someno S., Yagihashi T.: Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *P. multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1004-1010.
19. Pejsak Z.: Pastereloza, Zakaźne zanikowe zapalenie nosa, Nieprogresywne zakaźne zanikowe zapalenie nosa (bordeteloza), [w:] Ochrona zdrowia świń. PWR Poznań, 2007, 287-297.
20. Register K. B., DeJong K.: Analytical verification of a multiplex PCR *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.* 2006, 117, 201-210.
21. Register K. B., Lee R. M., Thomson C.: Two-color hybridization assay for simultaneous detection of *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* from swine. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 3342-3346.
22. Stepniewska K., Markowska-Daniel I.: Opracowanie testu PCR do diagnostyki zakażeń świń wywołanych przez *Bordetella bronchiseptica*. *Bull. Vet. Inst. Puławy* – w druku.
23. Townsend K. M., Hanh T. X., O'Boyle D., Wilkie I., Phan T. T., Wijewardana T. G., Trung N. T., Frost A. J.: PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. *Vet. Microbiol.* 2000, 72, 69-78.