

Identyfikacja i określanie zjadliwości cytotoksycznych szczepów *E. coli* metodami klasycznymi i PCR

JOLANTA KARAKULSKA, PAWEŁ NAWROTEK

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-460 Szczecin

Karakulska J., Nawrotek P.

Identification and virulence determination of cytotoxigenic *E. coli* strains by conventional methods and PCR

Summary

The pathogenic strains of Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) are a real epidemiological threat for humans and animals. It is very difficult to identify these virulent strains, so it is very important to work out diagnostic methods which will detect these pathogens in the environment quickly and effectively. In the present paper the virulence properties of 8 *E. coli* strains were analyzed. Determination of heat-labile enterotoxin LT and verocytotoxins VT1 (SLT-II) and VT2 (SLT-II) was accomplished in the reversed passive latex agglutination (RPLA). *E. coli* strains were also tested for verocytotoxin production using an amplification of SLT-IA and SLT-IIA genes by the PCR procedure. Its ability to decompose urea and sorbitol (in order to identification of O157:H7 *E. coli* strains) was defined as well as its capacity to produce haemolysin. Biochemical tests of PCR reaction and RPLA kits proved also useful to identify pathogens belonging to Verocytotoxin-producing and enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. These tests save time and give appropriate diagnostic efficiency.

Keywords: Verocytotoxin-producing *E. coli*, Enterotoxigenic *E. coli*, pathogenic strains, verotoxins, enterotoxins, diagnostics, monitoring, SLT genes, polymerase chain reaction.

Począwszy od 1982 r. obserwuje się wzrost liczby sporadycznych zachorowań oraz przypadków epidemii krwawej biegunki u ludzi, wywołanych przez Verocytotoksyczne szczepy *Escherichia coli* (VTEC). Przypadki tych zachorowań miały miejsce przede wszystkim w: Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Wielkiej Brytanii i Japonii. Analiza możliwych źródeł i dróg zakażenia pozwoliła uznać te szczepy za grupę zoonotycznych patogenów, wywołujących groźne zespoły chorobowe człowieka. Najczęściej występującymi u człowieka infekcjami spowodowanymi przez VTEC są: krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC – Haemorrhagic colitis), hemolityczny zespół mocznicowy (HUS – Haemolytic uraemic syndrome) oraz małopłytkowa plamica zakrzepowa (TTP – Thrombotic thrombocytopenic purpura). Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, iż odpowiedzialne za te zespoły kliniczne drobnoustroje to przede wszystkim pałeczki *E. coli*, należące do serotypu O157:H7. Niektórzy autorzy wskazują jednak na występowanie, u ludzi i zwierząt, również innych serotypów *E. coli* o właściwościach vero-cytotoksycznych, m.in. O26:H11, O91:H21, O:128:H2, O139:H1 (5, 14). Przypadki zachorowań stwierdzano najczęściej po spożyciu zanieczyszczonej żywności zwierzęcego pochodzenia –

mięsa, mleka i produktów mlecznych. Ponadto większość chorujących stołowała się w restauracjach, które specjalizowały się w przygotowywaniu prostych i „szybkich” potraw mięsnych, takich jak np. hamburgery, beefburgery itp. (4, 5, 12, 14, 16, 17). Badania epidemiologiczne wykazały, że ważnym rezerwuarem szczepów VTEC są zwierzęta gospodarskie, w tym głównie bydło i świnie, zarówno osobniki zdrowe, jak i z objawami biegunki. Natomiast głównym źródłem zakażenia człowieka – produkty spożywcze, z tych zwierząt uzyskiwane (13, 14, 16, 17).

Specyficzne właściwości hodowlane i biochemiczne szczepów VTEC, w tym głównie serotypu O157:H7 (brak fermentacji sorbitolu podczas 24h inkubacji, ujemna reakcja z 4-metyloumbelliferylo- β -D-glukuronidem, wzrost w temperaturach +10°C, +44 ÷ +45°C i minusowych oraz oporność na zmiany pH) stanowią, obok metod immuno-serologicznych, podstawę diagnostyki tej grupy drobnoustrojów chorobotwórczych (5, 14). W diagnostyce szczepów VTEC i ETEC, ważne wydają się też cechy, których identyfikacja służy nie tylko wykryciu patogena, ale także określeniu jego chorobotwórczości. Należą do nich m.in. właściwości hemolityczne i ich związek z wytwarzaniem przez szczepy ETEC toksyny LT oraz zdolność do syntety-

zowania ureazy (7, 11, 15). Z uwagi na fakt, iż zasadniczą patogenność szczepów VTEC przejawia się zdolnością do wytwarzania trzech różnych Verocytotoksyn: SLT-I (VT1), SLT-II (VT2) i SLT-IIv (VTe), wykrywanie tych właśnie czynników zjadliwości stanowi podstawę w identyfikowaniu tej groźnej grupy patogenów.

Znaczne trudności związane z wyizolowaniem bakterii VTEC z badanego materiału oraz istnienie bezobjawowego nosicielstwa wśród zwierząt spowodowały, że w diagnostyce zakażeń, wywołanych przez te szczepy, zaczęto wykorzystywać – znacznie dokładniejsze i szybsze – metody genetyczne. Wśród nich wykorzystuje się głównie technikę PCR oraz hybrydyzację DNA. Pozwalają one wykrywać geny kodujące określone charakterystyczne cechy danej bakterii, a tym samym nie tylko identyfikować tę bakterię, ale również określać stopień jej potencjalnej zjadliwości. W przypadku szczepów VTEC celem diagnostyki mogą być geny strukturalne SLT-I (VT1) i SLT-II (VT2), odpowiedzialne za wytwarzanie Verocytotoksyn typu 1 i 2, albo też te fragmenty genów SLT-I i SLT-II, które determinują produkcję jednej z podjednostek określonej Verotoksyny, np. podjednostki A (6, 10, 18).

Nowe techniki diagnostyczne oparte, m.in. na biologii molekularnej oraz odpowiednio dobranych metodach biochemicznych i serologicznych, umożliwiają pełniejsze niż dotychczas przeprowadzanie dochodzeń epidemiologicznych oraz monitoringu, w kierunku wykrywania szczepów VTEC (1, 2). Celem niniejszej pracy było zestawienie i porównanie wybranych technik diagnostycznych, które mogą być rutynowo wykorzystywane w szybkiej identyfikacji i monitoringu Verocytotoksycznych szczepów *E. coli*, ze zwróceniem szczególnej uwagi na przydatność PCR w diagnostyce VTEC.

Materiał i metody

Badaniami objęto 8 szczepów *Escherichia coli* (tab. 1). Dwa spośród nich wyizolowano z przypadków kolibakteriozy prosiąt, natomiast sześć pozostałych uzyskano z PZH w Warszawie oraz z PIW w Puławach.

Badania biochemiczne i serologiczne. Szczepy *E. coli* oznaczono serologicznie przy użyciu surowic anty-OK, anty-O i monospecyficznych absorbowanych anty-K (uzyskanych z PIW w Puławach, wyprodukowanych w Katedrze Immunologii i Mikrobiologii AR Szczecin oraz zakupionych w firmie Difco).

Na podłożu Sorbitol Mac Conkey Agar (Oxoid) oraz na podłożu płynnym zawierającym sorbitol (3), oceniano zdolność analizowanych szczepów do hydrolizy tego alkoholu po 24h inkubacji w temp. 37°C; w przypadku wyniku ujemnego przedłużano czas inkubacji do 7 dni. Obecność bezbarwnych kolonii na podłożu Sorbitol Mac Conkey Agar, a także zmianę zabarwienia podłoża płynnego, oceniano jako wynik dodatni (rozkład sorbitolu). Oceny chorobotwórczości badanych szczepów *Escherichia coli* dokonano na podstawie analizy kilku wyznaczników patogenności. Zdolność

do rozkładania mocznika badano na podłożu Urea Agar Base (Oxoid) z dodatkiem 40% tego substratu. Posiane na tym podłożu szczepy inkubowano w temp. 37°C przez 7 dni, dokonując odczytu wyników co 24h; o wyniku dodatnim świadczyła zmiana zabarwienia podłoża. Właściwości hemolityczne analizowanych szczepów określano na podłożu Blood Agar Base (Oxoid) z dodatkiem 7% krwi baraniej. Ponadto analizowano aktywność toksynotwórczą szczepów *E. coli*, przy użyciu szybkich testów lateksowych (odwrócona bierna aglutynacja lateksowa – RPLA) oraz reakcji PCR. W testach RPLA określano aktywność chromosomalnych i plazmidowych czynników patogenności (verotoksyczną i enterotoksyczną) badanych szczepów, natomiast w teście PCR – aktywność verotoksyczną, determinowaną przez geny zlokalizowane w chromosomalnym DNA. Czulość tego testu wynosiła 1-2 ng toksyny w 1 ml; reakcji PCR – 1 pg DNA.

W testach RPLA opłaszczone przeciwciałami – anty-VT1, anty-VT2 lub anty-LT – cząsteczki lateksu wiążą się ze swoistymi antygenami (toksynami bakteryjnymi). Określanie enterotoksyny ciepłochwicznej LT realizowano w oparciu o test VET-RPLA (Oxoid). Szczepy bakteryjne posiewano na podłożu Mundell'a (9) i inkubowano w temp. 37°C przez 18-24h. Następnie dodawano polimyksynę B (Merck), po czym hodowlę inkubowano przez kolejne 4h w temp. 37°C; hodowlę odwirowywano (4000 rpm) przez 20 min. i do dalszych analiz wykorzystywano supernatant. Natomiast w celu wykrycia aktywności verocytotoksycznej zastosowano test VTEC-RPLA. Wyizolowane szczepy posiewano na podłożu Brain Heart Infusion Agar (Oxoid) i inkubowano w temp. 37°C przez 18-20h. Po inkubacji, bakterie zawieszano w roztworze soli fizjologicznej, zawierającej polimyksynę B (Merck), po czym kontynuowano inkubację przez 30 min. w temp. 37°C. Po tym czasie hodowlę odwirowywano (4000 rpm) przez 20 min. i otrzymany supernatant wykorzystywano do dalszych badań.

Metoda PCR. DNA izolowano w oparciu o protokół izolacji i oczyszczania chromosomalnego DNA bakterii Gram-ujemnych, firmy EPICENTRE Technologies; 1 ml bulionowej hodowli bakteryjnej (24h w temp. 37°C), odwirowywano przy 7000 rpm (mikrowirówka 320a, PM Warszawa). Komórki bakteryjne zawieszono w buforze lizującym i inkubowano w temp. 80°C (łaźnia wodna) przez 5 min., a następnie chłodzono na lodzie przez 2-3 min. Do roztworu zlizowanych komórek bakteryjnych dodawano roztwór precypitacyjny i worteksowano przez 20-30 sek., po czym ponownie inkubowano na lodzie przez 2 min. Roztwór wirowano przez 2-3 min. przy 7000 rpm, a uzyskany supernatant przenoszono do 1,5 ml próbki (Eppendorf) i dodawano izopropanol, mieszano, a następnie inkubowano przez 10 min. w temp. 22-25°C. Całość wirowano 5 min. przy 7000 rpm. Supernatant zlewano, a pozostającą próbkę DNA dwukrotnie płukano 70% etanolem. Po usunięciu etanolu próbkę DNA suszono w suchym powietrzu (22°-25°C) przez 10 min. Następnie DNA zawieszano w buforze TE i inkubowano przez 12h w temp. 22°-25°C. Izolację i oczyszczanie bakteryjnego DNA zmodyfikowano, skracając czas wstępnego namnażania w bulionie do 6h w temp. 37°C oraz inkubując wyizolowane DNA w buforze TE przez 1 h w temp. 65°C.

Tab. 1. Szczepy *Escherichia coli* wybrane do badań

Serotyp	Pochodzenie
A-1/O157:H7***	PZH w Warszawie (wyizolowany od człowieka)
O157:H7 (345/96)***	PZH w Warszawie (wyizolowany z mleka)
G 1253*/O147:K89, K88ac	Katedra Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie (wyizolowany od prosięcia)
E 68II*/O141:K85ab (725**)	Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach
E 68I*/O141:K85ab, K88ab	Katedra Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie (wyizolowany od prosięcia)
G 205*/O8:K87, K88ac (1565**)	Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach
O157:H7 (1644**)	Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach
E 68I*/O141:K85ab, K88ab	C.V.L. Weybridge

Objaśnienia: *oznaczenie serotypu wg C.V.L. Weybridge; **numer szczepu *E. coli*, nadany przez PIW w Puławach; ***numer szczepu *E. coli*, nadany przez PZH w Warszawie.

Tab. 2. Zestawienie wybranych metod diagnostycznych (badania biochemiczne, serologiczne – RPLA, genetyczne – PCR), wykorzystywanych w celu szybkiej identyfikacji oraz określania potencjalnej zjadliwości szczepów VTEC, na podstawie wykrywanych właściwości biologicznych, biochemicznych, toksynotwórczych i/lub toksynogennych

Szczep <i>E. coli</i>	Badania biochemiczne				Toksynotwórczość/ – genność*				
	rozkład sorbitolu		synteza ureazy	β -hemoliza	VT1		VT2		LT
	< 24h	> 24h			PCR	RPLA	PCR	RPLA	RPLA
A-1/O157:H7	-	+ (144h)**	-	-	+	+	-	-	-
O157:H7 (345/96)	-	+ (96h)**	-	-	-	-	+	+	-
G 1253/O147:K89, K88ac	+		+ (72h)**	+	-	-	+	-	+
E 68II/O141:K85ab (725)	+		+ (72h)**	+	-	-	+	-	-
E 68I/O141:K85ab, K88ab	+		+ (48h)**	+	-	-	-	-	+
G 205/O8:K87, K88ac (1565)	+		-	+	-	-	-	-	+
O157:H7 (1644)	-	+ (96h)**	-	-	-	-	+	+	-
E 68I/O141:K85ab, K88ab (C.V.L.)	+		-	+	-	-	+	-	+

Objaśnienia: *toksynogenność – istnienie genetycznego uwarunkowania do produkcji toksyny VT (SLT), bez jego fenotypowego efektu; **okres czasu (godziny), po którym odnotowano ujawnienie się danej cechy.

W celu identyfikacji bakteryjnego DNA w wyizolowanym materiale, przeprowadzano reakcję PCR ze starterami flankującymi regiony genomu Vero-cytotoksycznych szczepów *Escherichia coli*, zdefiniowane jako SLT-IA i SLT-IIA – determinujące syntezę podjednostki A Vero-cytotoksyny typu 1 i 2. Wszystkie startery wyselekcjonowano w oparciu o ich wzory przedstawione przez Hilla (6). Amplifikację bakteryjnego DNA wykonano zgodnie z wcześniejszymi wystandardyzowanymi warunkami reakcji PCR. Reakcję przeprowadzano w objętości 20 µl, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej substraty: wodę dejonizowaną, 10-krotnie stężony bufor do Taq polimerazy, 25 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), parę starterów (A1 i A2) – specyficznych dla SLT-IA lub parę starterów (B1 i B2) – specyficznych dla SLT-IIA, Taq polimerazę; substraty reakcji PCR stanowiły produkty firmy EPICENTRE Technologies oraz Integrated DNA Technologies, Inc. Do każdej mieszaniny reakcyjnej (19 µl), dodawano 1 µl roztworu, zawierającego wcześniej wyizolowany i oczyszczony DNA bakteryjny. Amplifikację wykonywano w termocyklerze Omn – E „Hybaid”, firmy Hybaid Limited. Próby poddawano wstępnej denaturacji przez 3 min. w temp. 95°C, a następnie wykonywano 35 cykli amplifikacji. Na każdy cykl składały się: denaturacja – 30 sek. w 93°C, przyłączanie starterów – 45 sek. w 60°C oraz synteza komplementarnego DNA (wydłużanie łańcucha DNA) – 30 sek. w 72°C. W ostatnim 35 cyklu wydłużano etap syntezy komplementarnego DNA do 2 min. w temp. 72°C.

Produkty PCR analizowano poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Próbkę (10 µl) produktu amplifikacji mieszało z 6-krotnie stężonym buforem, stosowanym do nanoszenia próbek DNA w studzienki żelu (0,25% błękit bromofenolowy, 0,25% ksylen cyjanu FF, 30% glicerol w wodzie), wg Kura (8), po czym nanoszono na żel. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w temp. 22–25°C, (350 V, 70 mA). Żele barwiono wodnym roztworem bromku etyldyny (2 µl/30 ml żelu). Dla identyfikacji produktów PCR stosowano marker PCR, firmy DNA – Gdańsk M1 (pUC19/MspI). Żele analizowano obserwując powstałe prążki DNA i porównując je z markerem M1, po podświetleniu w transiluminatorze UV (TL – 1, Biometra).

Wyniki i omówienie

Czas trwania poszczególnych testów był zróżnicowany. Wyniki reakcji PCR uzyskiwano już po około 24 h, testu RPLA po 48 h, zaś w przypadku technik biochemicznych (rozkładanie sorbitolu, synteza ureazy i β-hemolityczność) po 24-96 h. Ponadto ustalono, iż wykonanie PCR można skrócić nawet do 10-12 h, prowadząc etap wstępnego namnażania w bulionie przez 6 h w temp. 37°C i przeprowadzając końcową inkubację wyizolowanego DNA w buforze TE przez 1 h w temp. 65°C.

Brak zdolności rozkładania sorbitolu w czasie 24-godzinnej inkubacji jest cechą diagnostyczną, umożliwiającą odróżnienie szczepów *E. coli*, należących do serotypu O157:H7 od pozostałych szczepów tego gatunku. Badane trzy szczepy *E. coli* O157:H7 – nr 1, 2,

7 (tab. 1), charakteryzowały się brakiem zdolności rozkładania sorbitolu w czasie 14-godzinnej inkubacji w temp. 37°C (tab. 2). Hydroliza sorbitolu, w przypadku tych szczepów, obserwowana była dopiero po 4 i 6 dniach (96 h i 144 h), podczas gdy pozostałych pięć szczepów: G 1253/O147, E 68II/O141, E 68I/O141 – nr 5 (tab. 1), G 205/O,8 E 68I/O141 – nr 8 (tab. 1), rozkładało sorbitol w ciągu 24 h (tab. 2). Obecność enzymu ureazy wykryto w trzech, spośród ośmiu przebadanych, serotypach *E. coli*: G 1253/O147, E 68II/O141, E 68I/O141 – nr 5 (tab. 1). Rozkład mocznika, w przypadku tych szczepów, obserwowano po 2-3 dniach (tab. 2). Wykazano syntezę hemolizyny w przypadku pięciu serotypów *E. coli*: G 1253/O147, E 68II/O141, E 68I/O141 – nr 5 (tab. 1), G 205/O8, E 68I/O141 – nr 8 (tab. 1), natomiast nie wykryto właściwości β-hemolitycznych w żadnym z przebadanych szczepów należących do serogrupy O157 (tab. 2). Wykazano, że wyizolowane od prosiąt szczepy: G 1253 i E 68I oraz szczepy referencyjne: G 205 – PIW i E 68I – C.V.L., syntetyzują enterotoksynę ciepłochwiejną LT. Pozostałe szczepy nie wykazywały właściwości enterotoksycznych (tab. 2). W trzech szczepach, należących do serogrupy O157, wykryto aktywność verotoksyczną (RPLA) oraz genetyczne uwarunkowania tej aktywności (PCR). Szczep A-1/O157:H7 syntetyzował toksynę VT1, natomiast O157:H7 (345/96) i O157:H7 (1644) wytwarzały – VT2 (tab. 2). Testem RPLA nie stwierdzono zdolności wytwarzania Vero-cytotoksyn przez pozostałe szczepy *E. coli*. W przypadku szczepów: G 1253/O147, E 68II/O141, E 68I/O141 – nr 8 (tab. 1), uzyskano pozytywne wyniki w reakcji PCR dla VT2 (SLT-IIA), natomiast w teście RPLA wyniki okazały się jednoznacznie ujemne (tab. 2). Pozwoliło to zakwalifikować te szczepy do grupy patogenów potencjalnie Vero-cytotoksycznych. Jedynie w przypadku dwóch szczepów: E 68I/O141 – wyizolowanego od prosięcia i G 205/O8 – uzyskanego z PIW w Puławach, nie stwierdzono aktywności verotoksynotwórczej oraz verotoksynogenności, potwierdzając to zarówno metodą RPLA, jak i PCR (tab. 2).

Podsumowanie

W szybkiej diagnostyce mikrobiologicznej szczepów VTEC i ETEC, warto wykorzystywać testy, które pozwalają na identyfikację wybranej charakterystycznej cechy zjadliwości, takiej jak np. synteza ureazy, β-hemolityczność, czy produkowanie Vero-cytotoksyn i/lub enterotoksyn. Polimerazowa reakcja łańcuchowa jest bardzo przydatna w szybkiej identyfikacji oraz określaniu zjadliwości Vero-cytotoksycznych szczepów *E. coli* i może być wykorzystywana w badaniach monitoringowych tej grupy patogenów. Natomiast testy biochemiczne oraz serologiczne (RPLA), można zastosować do dalszych analiz mikrobiologicznych, w celu bardziej szczegółowego ich typowania. Wykonane badania w kierunku określenia zdolności bakterii

do rozkładania sorbitolu w czasie 24-godzinnej inkubacji i uzyskane wyniki, potwierdziły przydatności tej metody w diagnostyce mikrobiologicznej patogenów należących do serotypu O157:H7. Analiza właściwości hemolitycznych przebadanych szczepów *E. coli* wykazała korelację pomiędzy ich aktywnością enterotoksyczną a zdolnością do hemolizy. Żaden ze szczepów niehemolitycznych nie wytwarzał enterotoksyny ciepłochwiejnej, natomiast na pięć szczepów hemolitycznych – cztery ujawniły aktywność enterotoksyczną. Wydaje się, że brak właściwości enterotoksycznych hemolitycznego serotypu E 68II/O141, może być związany z utratą plazmidowego DNA, odpowiedzialnego za produkcję LT. Nie pokrywające się wyniki testów PCR i RPLA, w przypadku trzech analizowanych szczepów, mogą świadczyć o tym, iż bakterie te zachowując genetyczną determinantę produkcji Verotoksyny VT2 (SLT-II), nie wykazują jednocześnie fenotypowego efektu, ujawniającego się w postaci jej syntetyzowania. Inną przyczyną rozbieżności wyników może być zbyt mała czułość testu RPLA, w przypadku gdy analizowane szczepy charakteryzują się bardzo niewielką aktywnością toksynotwórczą. Jeśli syntetyzowana toksyna występuje w stężeniu mniejszym niż 1-2 ng w 1 ml supernatantu, nie może zostać wykryta w teście RPLA.

Piśmiennictwo

1. Allmann M., Hofelein C., Koppel E., Luthy J., Meyer R., Niederhauser C., Wegmuller B., Candrian U.: Res. Microbiol. 146, 85, 1995.
2. Burnens A. P., Frey A., Lior H., Nicolet J.: J. Vet. Med. B 42, 311, 1995.
3. Edward P. R., Ewing W. H.: The Genus Escherichia, w: Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, red. W. H. Ewing, Elsevier Sci. Pub. New York 1986, s. 516.
4. Esposito C., Parrillo M. A., Giannelli C.: Igiene Moderna 99, 299, 1993.
5. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D.: Przeg. Epid. 50, 341, 1996.
6. Hill W. E.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36, 123, 1996.
7. Janowski H., Pejsak Z., Szveda W.: Choroby zakaźne, w: Szczegółowa patologia i terapia chorób świń, red. H. Janowski, W. Szveda, T. E. Janowski, t. 2, Wyd. AR-T, Olsztyn 1994, s. 104.
8. Kur J.: Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy. Wyd. PG, Gdańsk 1994.
9. Mundell D. H., Anselmo C. R., Wishnow R. M.: Inf. Immunity 14, 383, 1976.
10. Read S. C., Clarke R. C., Martin A., Grandis S. A.-de, Hii J., McEwen S., Gyles C. L.: Molecular Cell. Probes 6, 153, 1992.
11. Ryan K. J.: Enterobacteriaceae, w: Medical Microbiology an Introduction to Infectious Diseases, red. J. C. Sherris, Elsevier Sci. Publi., New York 1984, s. 241.
12. Sharp J. C. M.: Health Bull. 52, 96, 1994.
13. Smith H. R., Willshaw G. A., Scotland S. M., Thomas A., Rowe B.: Zntbl. Bakteriol., 278, 436, 1993.
14. Sobieszczanska B. M., Franiczek R.: Post. Mikrobiol. 36, 207, 1997.
15. Sojka W. J.: Escherichia coli in Domestic Animals and Poultry. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, England 1965.
16. Waltner-Toews D.: J. Food Prot. 53, 258, 1990.
17. Willshaw G. A., Thirlwell J., Jones A. P., Parry S., Salmon R. L., Hickey M.: Letters Appl. Microbiol. 19, 304, 1994.
18. Woodward M. J., Carroll P. J., Wray C.: Vet. Microbiol. 31, 251, 1992.

Adres autora: mgr Jolanta Karakulska, ul. Rugiańska 16/33, 71-653 Szczecin

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

WIERZBOWSKI S., KOSINIAK-KAMYSZ K.: Kierowany rozród koni. Wydawnictwo Drukpol s.c. Kraków, 1998. str. 204. ISBN 83-907553-3-5

W ostatnich latach konie, a zwłaszcza ich rozród, stają się dla medycyny weterynaryjnej narastającym problemem. Wzrastającemu zainteresowaniu rozrodem koni przez praktyków towarzyszą niestety duże zaniedbania edukacyjne, pogłębione ponadto przez brak podręczników z tego zakresu. Ostatnio ukazała się nowa książka pt. Kierowany rozród koni, autorstwa S. Wierzbowskiego i K. Kosiniaka-Kamysza, która dobrze wypełnia lukę w fachowym piśmiennictwie. Stąd też należy odnieść się z dużym uznaniem dla Autorów i wydawcy tej książki za trafność wyboru tematyki oraz aktualność tematyczną.

Treść podręcznika podzielona jest na 3 problemy tematyczne, dotyczące procesów rozrodczych u klaczy, ogierów oraz zagadnień wspólnych dla klaczy, ogierów i źrebiąt.

Część poświęcona procesom rozrodczym u klaczy jest zawarta w 12 rozdziałach dotyczących anatomii, fizjologii i hormonalnej regulacji czynności układu rozrodczego, badań klinicznych i uzupełniających narządu płciowego w przebiegu cyklu i ciąży oraz takich procesów jak ruja, owulacja, ciąża, poród, okres poporodowy, funkcja gruczołu mlekowego wraz z ich najistotniejszymi zaburzeniami. Wiele uwagi zwrócono również na schorzenia noworodków, a także metody oceny i cechy określające przydatność klaczy do rozrodu.

Rozdział poświęcony procesom rozrodczym u ogierów składa się z 10 tematycznych podrozdziałów i jest skonstruowany podobnie jak część dotycząca klaczy. Przedstawiono w nim także zasady pobierania i konserwacji nasienia oraz sztucznej inseminacji.

Końcowa część książki (4 rozdziały) to interesująco napisane zagadnienia wspólne dla obu płci związane z metodami kierowania rozrodem koni, chorobami zakaźnymi dotyczącymi układu rozrodczego, a także przepisami sanitarnymi regulującymi produkcję nasienia wraz z identyfikacją zwierząt.

Podręcznik jest bogato ilustrowany rysunkami, zdjęciami i tabelami oraz wzbogacony aktualnym piśmiennictwem krajowym i zagranicznym. Na podkreślenie zasługuje kompleksowe, a zarazem syntetyczne ujęcie złożonej problematyki rozrodu koni. Istotne jest także umieszczenie w podręczniku przeglądu nowoczesnych, praktycznie użytecznych metod jak ultrasonografia, sterowania rują i owulacją, konserwacja i mrożenie nasienia oraz przenoszenie zarodków.

Książka jest przeznaczona głównie dla lekarzy wet. i studentów Wydziałów Medycyny Weterynaryjnej, ale może być również cenną lekturą dla hodowców, zootechników i biologów.

Dystrybucja i sprzedaż: Katedra Hodowli Koni AR Kraków, tel (0-12) 634-12-69.

Prof. dr hab. T. Janowski, Olsztyn