

# Aktualne możliwości przyżyciowej diagnostyki zakażeń *Rhodococcus equi* u źrebiąt

ZBIGNIEW GRĄDZKI, ANNA ZIĘTEK, LILIANA BOGUTA, STANISŁAW WINIARCZYK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin

Grądzki Z., Ziętek A., Boguta L., Winiarczyk S.

## Current possibilities of antemortem diagnosis of *Rhodococcus equi* infections in foals

### Summary

The multi-organ location of inflammatory lesions along with the insidious onset and course of rhodococcosis equi are often responsible for the mistaken and untimely diagnosis of the disease as well as for its incorrect therapy. The effective methods of active immunoprophylaxis of rhodococcosis are as of yet unknown. Therefore, early antemortem diagnosis of a disease in foals is important in order to undertake timely and specific antibiotic therapy and to improve its effectiveness. The survey of currently used methods of laboratory antemortem diagnosis of rhodococcosis in foals is described.

**Keywords:** diagnosis; *Rhodococcus equi*; foals

Rodokokoza jest chorobą zakaźną młodych źrebiąt, przebiegającą z objawami ropno-ziarniniakowatego zapalenia oskrzeli i płuc (7, 8). Zmianom w płucach towarzyszyć może wrzodziejące zapalenie błony śluzowej okrężnicy i jelita ślepego, zapalenie węzłów chłonnych krezkowych, oskrzelowych i śródpiersiowych, aseptyczne lub ropne zapalenie stawów, a niekiedy zapalenie szpiku kostnego i gałki ocznej (8). Wielonarządowa lokalizacja procesów zapalnych w zakażeniach *R. equi* sprawia, że choroba często jest mylnie lub zbyt późno rozpoznawana i niewłaściwie leczona. Straty spowodowane występowaniem rodokokozy w stadninach związane są z padnięciami młodych źrebiąt oraz wysokimi kosztami długotrwałej terapii antybiotykowej. Nie opracowano dotychczas skutecznych metod swoistej, czynnej profilaktyki rodokokozy, dlatego wczesne, przyżyciowe rozpoznanie choroby u źrebiąt ma istotne znaczenie dla podjęcia we właściwym czasie specyficznej terapii oraz zwiększenia jej skuteczności (7, 8).

Choroba występuje aktualnie na całym świecie (7, 10, 11). Obserwacje kliniczne oraz ocena anatomopatologiczna źrebiąt padłych z objawami zapalenia płuc wskazują, że zakażenia *R. equi* występują także w niektórych stadninach koni w Polsce (7, 10). Dane na temat etiopatogenezy, kliniki i terapii rodokokozy źrebiąt przedstawiono we wcześniejszym artykule (10). Niniejszy stanowi przegląd aktualnie wykorzystywanych metod przyżyciowej, laboratoryjnej diagnostyki tej choroby.

## Izolacja i identyfikacja zarazka

Po fazie replikacji wewnątrz makrofagów pęcherzyków płucnych oraz w zamkniętych ropniach w płucach zarazek przedostaje się do światła oskrzelików i oskrzeli, skąd może być wydalany na zewnątrz. Bakterie często występują w wykrztusinie, rzadziej w ropnym wypływie z otworów nosowych (10). Materiał ten zawiera dodatkowo znaczną domieszkę innych drobnoustrojów, głównie będących komensalami błony śluzowej górnych dróg oddechowych lub wnikających przypadkowo do jamy nosowej z zanieczyszczonego środowiska. Wśród tych mikroorganizmów mogą znajdować się także niejadliwe szczepy *R. equi*. Dlatego badanie bakteriologiczne wymazu z nosa od źrebiąt chorych nie zawsze jest miarodajne. Korzystniejsze efekty uzyskuje się pobierając do badania wydzielinę tchawiczo-oskrzelową (1). W tym celu wykonuje się punkcję w 1/3 dolnej części tchawicy. Poprzez rurkę trokara do światła tchawicy wprowadza się elastyczny zgłębnik, którego końcówkę umiejscawia się w okolicy rozwidlenia oskrzeli. Przed pobraniem materiału wprowadzić można dotchawicowo 10-20 ml jałowego płynu fizjologicznego (1, 14). Zaletą tej techniki jest unikanie kontaminacji badanej próbki przez bakterie z górnych dróg oddechowych (14). Jako metoda inwazyjna może ona jednak spowodować komplikacje w postaci zakażeń miejscowych, krwotoku z tchawicy, uszkodzenia pierścieni tchawiczych lub odmy śródpiersiowej. Mniej skomplikowana technicznie i bardziej bezpieczna jest metoda opracowana przez

autorów japońskich, polegająca na wykonaniu intubacji nosowo-tchawicowej za pomocą elastycznej rurki silikonowej (1). Zabieg taki jest łatwy do wykonania w warunkach terenowych, a ryzyko powstania komplikacji jest niewielkie. Ponadto dzięki tej technice materiał można pobierać kilkakrotnie od tego samego zwierzęcia w dowolnych odstępach czasu. Mankamentem jest jednak możliwość zanieczyszczenia próby przez florę bakteryjną górnych dróg oddechowych, w tym przez niezdadliwe szczepy *R. equi* (1). Alternatywnie do pobierania materiału z dolnych dróg oddechowych zastosować można endoskopię z wykorzystaniem profesjonalnego sprzętu, co nie zawsze jest możliwe do wykonania w warunkach terenowych. Wydzielinę tchawiczo-oskrzelową można wykorzystać do bezpośredniego badania mikroskopowego, badania hodowlanego oraz cytologicznego. Dwie ostatnie metody uznawane są aktualnie za tzw. złoty standard (gold standard) w laboratoryjnej diagnostyce rodokokozy źrebąt (8). Badany materiał posiewa się na podłoże podstawowe (agar z krwią) oraz na wybrane podłoża selektywne, zawierające antybiotyki hamujące wzrost flory konkurencyjnej (3, 8, 9). Posiewy inkubuje się w warunkach tlenowych w temp. 30-37°C. Na agarze z krwią kolonie średnicy 1-3 mm, nie hemolizujące, błyszczące, rozlewające się, śluzowate, barwy jasnoróżowej do czerwonej pojawiają się po 48-72 godzinach. Charakterystyczny pigment uwidacznia się niekiedy dopiero po kilku dniach przechowywania wyrosniętej hodowli w temperaturze pokojowej (17).

Spośród podłoży wybiórczych do izolacji *R. equi* z materiału biologicznego polecana jest najczęściej pożywka NANAT z dodatkiem kwasu nalidyksowego, nowobiocyny i cykloheksimidu (9, 25). Wykazano także przydatność podłoża TANP, zawierającego cykloheksimid, kwas nalidyksowy i penicylinę (3), M3T, zawierającego cykloheksimid i tiaminę (18), NC z dodatkiem norfloksacyny, cefoperazonu i nystatyny (9), CAZ-NB, zawierającego ceftazimidynę, nowobiocynę i cykloheksimid (9) oraz pożywki Tinsdale z dodatkiem cystyny (3, 9). Większość podłoży selektywnych zawiera dodatkowo telluryn potasowy ( $K_2TeO_3$ ), pełniący rolę inhibitora wzrostu saprofitycznych bakterii gramdodatnich. Identyfikacji zarazka dokonuje się w oparciu o morfologię kolonii oraz komórek bakterii po zabarwieniu metodą Grama, a także na podstawie cech biochemicznych (10, 11, 17). Właściwością przydatną do identyfikacji *R. equi* jest kwasooporność lub częściowa kwasooporność (17). Wykazanie tej cechy możliwe jest po zastosowaniu specjalnego barwienia preparatów, np. zmodyfikowanej metody Kinyoun. *R. equi* cechuje się ograniczoną reaktywnością biochemiczną (13), co stanowi cechę różnicującą ten gatunek z innymi z rodzaju *Rhodococcus*, nie odgrywającymi roli w patologii źrebąt. Do określenia wybranych cech biochemicznych zarazka można wykorzystać komercyjne zestawy API-ZYM (13).

W przebiegu rodokokozy zarazek, poza płucami, często lokalizuje się także w przewodzie pokarmowym (8, 10). U starszych koni stwierdza się jedynie bierne nosicielstwo bakterii w jelitach, natomiast u młodych źrebąt, w wieku do 3. miesiąca życia, zarazek ulega replikacji osiągając miano  $10^4$ - $10^5$  komórek w 1 g kału (25). Skutkiem kolonizacji przewodu pokarmowego jest siewstwo zjadliwych drobnoustrojów z kałem oraz zanieczyszczenie nimi środowiska zewnętrznego.

W sprzyjających warunkach zarazek ulega replikacji także pozaustrojowo, tj. w nawozie końskim oraz glebie zanieczyszczonej kałem. Czynniki stymulującymi namnażanie *R. equi* w środowisku zewnętrznym są: wysoka temperatura otoczenia, duża zawartość związków organicznych pochodzenia roślinnego oraz obecność w kale końskim większej ilości lotnych kwasów tłuszczowych (7, 10). W takim środowisku w ciągu kilkunastu dni z jednej komórki bakteryjnej może powstać do 10 000 cząstek potomnych, natomiast w 1 g pylistej ziemi znajdować się może nawet kilka milionów zjadliwych zarazków. Izolacja *R. equi* z kału źrebąt w wieku do 3. miesiąca życia wykorzystywana jest, obok badania wydzieliny tchawiczo-oskrzelowej, w przyżyciowej diagnostyce rodokokozy (1, 8). Wykrywanie zarazka w nawozie i glebie jest natomiast przydatne do określenia stopnia zanieczyszczenia środowiska bytowania zwierząt zjadliwymi szczepami *R. equi* oraz do badań epidemiologicznych. Materiał do badania stanowi kał z prostnicy od źrebąt lub świeżo pobrany ze ściółki, a także wierzchnia warstwa gleby z miejsc, w których przebywają kłacze ze źrebętami (15). Do badania bakteriologicznego wykorzystuje się 1 g kału lub ziemi, z którego sporządza się zawiesinę w kolejnych 10-krotnych rozcieńczeniach w jałowym płynie fizjologicznym. Poszczególne rozcieńczenia wysiewa się na podłoże selektywne (NANAT). Po inkubacji liczy się kolonie odpowiadające morfologią *R. equi* oraz ustala miano drobnoustrojów w 1 g badanej próby. Dalszą analizę fenotypową izolowanych szczepów prowadzi się w oparciu o identyfikację markerów zjadliwości – lipoproteiny powierzchniowej VapA o masie 15-17 kDa lub genu *vapA* w obrębie plazmidu wirulencji. Badania w tym zakresie wykazały brak istotnych różnic w średniej liczbie bakterii w próbkach ziemi oraz kału kłaczy i źrebąt, pochodzących ze stadnin zapowietrzonych oraz środowisk, w których choroba nie występowała (23). Wykazano natomiast przewagę ilościową zjadliwych szczepów *R. equi* w środowiskach z endemicznie występującą rodokokozą w porównaniu do stadnin wolnych od choroby.

### Test CAMP

Jest fenotypową metodą umożliwiającą identyfikację wyizolowanych bakterii, klasyfikowanych wstępnie jako *R. equi* na podstawie cech morfologicznych kolonii i komórek bakteryjnych. Nazwa testu jest akronimem, wyprowadzonym od nazwisk jego odkrywców



(Christie, Atkins, Munch, Petersen). Istotą metody jest wykazanie charakterystycznej, dopełniającej strefy hemolizy na agarze z krwią, tworzącej się w bezpośrednim sąsiedztwie badanej hodowli bakterii oraz *Staphylococcus aureus*. Obydwa posiewy wykonuje się w układzie liniowym, prostopadle do siebie, zachowując niewielki odstęp pomiędzy liniami wzrostu. Powstanie strefy synergistycznej hemolizy w postaci charakterystycznego efektu „strzałki” (arrowhead effect) lub „łopaty” (shovel effect) uwarunkowane jest wzajemną interakcją wytwarzanych do podłoża metabolitów –  $\beta$ -hemolizyny gronkowcowej oraz egzoenzymów (tzw. equi factors), do których należą: fosfolipaza C, oksydaza cholesterolowa i fosfohydrolaza cholinowa. Zamiast *S. aureus* w teście wykorzystać można *Corynebacterium pseudotuberculosis*, produkujący fosfolipazę D (17).

### Metoda PCR

Postęp w diagnostyce mikrobiologicznej sprawia, że konwencjonalne metody wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych są uzupełniane lub zastępowane nowoczesnymi technikami biologii molekularnej. W wielu laboratoriach do rozpoznawania rodokokozy źrebiąt wykorzystuje się aktualnie metodę PCR (19, 24). Stało się to możliwe dzięki poznaniu i opublikowaniu sekwencji nukleotydowej genu *vapA*, kodującego białko antygenowe o tej samej nazwie. Na tej podstawie wytypowano sekwencje kilku par starterów reakcji, komplementarnych do konserwatywnych regionów plazmidowego DNA (19, 20, 24). Alternatywnie w diagnostyce rodokokozy wykorzystać można startery komplementarne do fragmentu chromosomalnego DNA (genu), kodującego podjednostkę 16S rybosomowego RNA (rRNA) (5, 19). U większości bakterii, sekwencje nukleotydowe tego genu są wysoce konserwatywne i nie ulegają większym modyfikacjom w trakcie rozwoju filogenetycznego. Występujące w obrębie tej sekwencji regiony zmienne są natomiast charakterystyczne dla poszczególnych drobnoustrojów, co umożliwi ich identyfikację i różnicowanie (5). Zaletą metody PCR, bazującej na wykrywaniu genu kodującego podjednostkę 16S rRNA, jest możliwość wykrywania wszystkich szczepów *R. equi*, w tym bakterii niejadliwych oraz o zaprogramowanej genetycznie zjadliwości. Technika z wykorzystaniem starterów komplementarnych do genu *vapA* pozwala natomiast na identyfikację wyłącznie szczepów patogennych i znajduje zastosowanie do potwierdzania klinicznego rozpoznania rodokokozy w przypadku jej występowania u źrebiąt.

Materiałem do badań może być wydzielina tchawiczo-oskrzelowa, kał, krew, wycinki chorobowo zmienionych płuc oraz próbki ziemi pobranej z okólników (5, 20, 24). Ekstrakcję DNA wykonywać można przy użyciu standardowych procedur. Zastosowanie do tego celu komercyjnych zestawów do izolacji i oczyszczania

DNA pozwala na wydatne uproszczenie i skrócenie czasu uzyskiwania matrycy.

Technika PCR cechuje się wysoką czułością i specyficznością. Do uwidocznienia swoistych amplikonów DNA w żelu wystarcza obecność w badanej próbce  $10^1$ - $10^2$  cząstek bakteryjnych w 1 ml wysięku tchawiczo-oskrzelowego (20). Metoda daje ponadto wiarygodne wyniki w przypadku badania prób pochodzących od zwierząt leczonych antybiotykami, kiedy zawiodą metody hodowlane (8).

### Określenie stężenia fibrynogenu w osoczu

Fibrynogen jest glikoproteiną, syntetyzowaną w ustroju przez komórki wątroby, odgrywającą istotną rolę w procesie krzepnięcia krwi i w zapaleniu (12). Stężenie tego białka wzrasta w niektórych stanach patologicznych, prowadzących do zaburzeń homeostazy ustrojowej. Zjawisko to jest jednym z elementów tzw. odpowiedzi ostrej fazy, uruchamianej w organizmie pod wpływem zakażeń, urazów, rozrostów nowotworowych lub martwicy tkanek (2). Stymulatorami zwiększonej syntezy fibrynogenu są cytokiny prozapalne, głównie interleukina 6 (IL-6), wytwarzane lokalnie w ognisku zapalenia przez monocyty i makrofagi (12). W przebiegu zakażenia *R. equi*, z reguły ma miejsce hiperfibrynogenemia, sporadycznie u chorych źrebiąt stężenie tego białka nie odbiega od norm fizjologicznych (8, 10). U zdrowych źrebiąt i koni starszych koncentracja fibrynogenu w osoczu wynosi 200-400 mg/dl i może wahać się w granicach od 100-500 mg/dl (10). W przypadkach rodokokozy stężenie tego białka wzrasta powoli i stopniowo. Wartości od 500-600 mg/dl charakterystyczne są przeważnie dla wstępnej fazy ostrego zapalenia. Wzrost koncentracji fibrynogenu powyżej 1000-1200 mg/dl wskazuje z reguły na zaawansowany proces chorobowy, którego zejście najczęściej jest niepomysłne (10, 11).

Oznaczanie stężenia fibrynogenu w osoczu źrebiąt jest pomocne w wykrywaniu wczesnych przypadków zakażeń *R. equi*, monitorowaniu przebiegu choroby i jej zejścia, jak również nadzorowaniu efektów terapii antybiotykowej i wyznaczeniu czasu jej trwania. Podstawową zasadą większości metod laboratoryjnych do oznaczania stężenia tego białka jest katalizowana trombiną przemiana rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę, a następnie dokonanie pomiaru koncentracji wytrąconego włókniaka. Ta zasada wykorzystana została, między innymi w metodzie Von Clausa oraz wg Blomback i Blomback (26). Obydwie techniki są rekomendowane przez WHO. Mniej skomplikowana technicznie i zapewniająca uzyskanie wyniku pomiaru w krótszym czasie jest metoda kinetyczna (Kinetic Fibrynogen Assay). Procedura ta omija dodatkowy etap rozpuszczania fibryny, a wynik pomiaru określany jest stopniem zmętnienia roztworu w wyniku reakcji fibrynogenu z trombiną. Jako metoda referencyjna oznaczania stężenia fibrynogenu uznawana jest technika gorącej precypitacji mikrohemato-

krytovej, polegająca na określeniu różnicy w koncentracji białek osocza przed i po ogrzaniu kapilar do temp. 56°C. Na tej zasadzie opiera się metoda opracowana przez Schalm, Millar oraz Ratnoff i Menzie (6). W stadninach, w których rodokokoza występuje endemicznie, określanie stężenia fibrynogenu w osoczu powinno się wykonywać u wszystkich źrebiąt w odstępach dwutygodniowych, począwszy od urodzenia do ukończenia 6. miesiąca życia.

### Badanie serologiczne

Alternatywną metodą rozpoznawania rodokokozy źrebiąt jest wykazanie obecności swoistych przeciwciał przeciwko *R. equi* w surowicy krwi. Do badań serologicznych wykorzystać można odczyn precypitacji w żelu agarowym (AGID – Agar Gel Immunodiffusion), test ELISA lub odczyn zahamowania synergistycznej hemolizy (SHI – Synergistic Haemolysis Inhibition).

Odczyn podwójnej immunodyfuzji w żelu agarowym (AGID) jest mało skomplikowany i technicznie łatwy do wykonania w każdej pracowni. Tą metodą wykrywane są głównie swoiste przeciwciała precypitujące, skierowane przeciwko niektórym rozpuszczalnym antygenom zarazka, w tym egzoenzymom – fosfolipazie C, oksydazie cholesterolowej i fosfohydrolazie cholinowej (4, 8). Zależnie od składu antygeny diagnostycznego w tym teście mogą być wykrywane także przeciwciała przeciwko antygenowi somatycznemu zarazka – białku VapA, odpowiedzialnemu za zjadliwość. W Ameryce Północnej i Południowej dostępny jest komercyjny zestaw – Rhodiagnos firmy Clinica Equina S. R. L. do diagnostyki rodokokozy metodą AGID. Swoiste przeciwciała przeciwko *R. equi* u zakażonych naturalnie źrebiąt można wykryć tą metodą począwszy od 26. dnia życia (4, 8). Zaletą metody jest wysoka specyficzność, natomiast mankamentem – niska czułość, wynosząca około 70% (4). Według niektórych autorów dzięki tej właściwości test AGID częściej wykrywa przeciwciała skierowane przeciwko zjadliwym szczepom *R. equi*, wywołującym w ustroju silniejszą stymulację antygenową niż szczepy niezjadliwe, powszechnie występujące w środowisku bytowania koni (8, 22). U źrebiąt z klinicznymi objawami rodokokozy zastosowanie testu immunodyfuzji powinno się łączyć z wykonaniem badania jedną z metod bezpośrednich, np. z oceną bakteriologiczną i/lub cytologiczną wysięku tchawiczo-oskrzelowego.

Bardziej czułym od immunodyfuzji testem serologicznym jest odczyn ELISA. W warunkach laboratoryjnych opracowano i przetestowano kilka wariantów tej metody, różniących się składem antygeny diagnostycznego (8). We wszystkich wariantach antygenem był wyciąg komórkowy, zawierający, zależnie od metody przygotowania, różne frakcje białkowe zarazka. Wykazano, że z diagnostycznego punktu widzenia najbardziej przydatnym antygenem był ekstrakt białkowy otrzymywany przy użyciu detergentu Tween-20 (22).

W uzyskiwanym tą metodą ekstrakcie dominującą komponentą był antygen otoczkowy. Stwierdzono, że duże znaczenie dla interpretacji wyników testu ELISA ma szczep zarazka użytego do produkcji antygeny. Takai i wsp. (22) wykorzystali do ekstrakcji białka antygenowego z użyciem Tween'u-20 szczep z kolekcji ATCC 6939, nie zawierający plazmidu wirulencji. Badania pilotażowe wykazały, że ten izolant, spośród wszystkich testowanych szczepów, dawał w teście ELISA najwięcej reakcji krzyżowych z przeciwciałami indukowanymi przez inne szczepy. Prescott i wsp. (16) zastosowali do przygotowania antygeny do testu ELISA Triton X-114. Przy użyciu tego detergentu ekstrahowano pełny materiał komórkowy plazmidowego szczepu *R. equi*, w którym dominującą frakcją było białko VapA, odpowiedzialne za zjadliwość. Testem ELISA opracowanym na bazie tego antygeny można było wykazać serokonwersję u zakażonych naturalnie, lecz nie wykazujących objawów klinicznych źrebiąt pomiędzy 8.-10. tygodniem życia. W warunkach eksperymentalnych tą samą metodą serokonwersję wykazano u źrebiąt po 2 tygodniach po doświadczalnym zakażeniu zjadliwym szczepem *R. equi* (16). Krew do badania serologicznego testem ELISA powinno się pobierać między 35.-65. dniem życia źrebiąt, ponieważ w tym okresie większość zakażonych sztuk wykazuje serokonwersję (4).

Ogólna zasada metody zahamowania synergistycznej hemolizy (SHI – Synergistic Haemolysis Inhibition) jest analogiczna do testu CAMP z tym, że dodatni wynik, informujący o obecności swoistych przeciwciał surowicznych przeciwko egzoenzymom *R. equi* manifestuje się w tym przypadku ograniczeniem lub zahamowaniem wystąpienia strefy dopełniającej hemolizy (21). Stopień tego zahamowania można zmierzyć i dzięki temu test SHI spełnia kryteria metody ilościowej. Badania terenowe dowiodły skuteczności tej metody w wykrywaniu źrebiąt z zapaleniem płuc, spowodowanym naturalnymi zakażeniami *R. equi* (21). Mankamentem jest natomiast ograniczona możliwość identyfikacji źrebiąt będących w początkowym, subklinicznym stadium choroby, jakkolwiek w tym zakresie SHI przewyższa metodę AGID (8). Większą ilość subklinicznych przypadków rodokokozy można wykryć stosując warianty testu SHI, cechującego się większą czułością, np. test REO (reverse Elek – Ouchterlony) lub test EFN (equi-factor neutralizing antibodies) (21). Istotną wadą testu SHI, jak również wariantów tej metody, są trudności natury technicznej ograniczające stosowanie tych metod w badaniach większej ilości prób.

Badanie surowicy krwi na obecność przeciwciał nie zawsze daje wiarygodne wyniki w diagnostyce rodokokozy (8, 21). Reakcje nieswoiste – fałszywie dodatnie pojawiają się w przypadku utrzymywania się u źrebiąt przeciwciał siarowych. Ich miano obniża się powoli i wysokoczułe testy serologiczne jak np. ELISA są w stanie wykryć je jeszcze u 8.-10. tygodniowych



źrebiąt (8). Inną przyczyną występowania wyników fałszywie dodatnich jest stymulacja układu immunologicznego koni przez ubikwitarne występujące w środowisku niepatogenne szczepy *R. equi*. Żadna z opisanych metod serologicznych nie różnicuje przeciwciał indukowanych przez szczepy zjadliwe i niezjadliwe.

Z przeglądu aktualnie dostępnych metod rozpoznawania rodokokozy źrebiąt wynika, że konwencjonalne metody diagnostyczne obciążone są ograniczeniami utrudniającymi ich stosowanie w wykrywaniu zakażeń naturalnych lub uniemożliwiających jednoznaczna interpretację uzyskiwanych wyników. Upowszechnienie metody PCR oraz zastosowanie tej techniki w badaniach przesiewowych w stadninach pozwoli na wczesną identyfikację wszystkich zakażonych źrebiąt, która jest warunkiem skuteczności terapii antybiotykowej oraz ograniczenia strat związanych z chorobą.

### Piśmiennictwo

1. Anzai T., Wada R., Nakanishi A., Kamada M., Takai S., Shindo Y., Tsubaki S.: Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 335-345.
2. Auer D. E., Ng J. C., Thompson H. L., Inglis S., Seawright A. A.: Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *Vet. Rec.* 1989, 124, 235-239.
3. Barton M. D., Hughes K. L.: Comparison of three techniques for isolation of Rhodococcus equi from contaminated sources. *J. Clin. Microbiol.* 1981, 13, 219-221.
4. Becu T., Polledo G., Gaskin J. M.: Immunoprophylaxis of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 193-204.
5. Bell K. S., Philp J. C., Christofi N., Aw D. W. J.: Identification of Rhodococcus equi using the polymerase chain reaction. *Letters Appl. Microbiol.* 1996, 23, 72-74.
6. Campbell M. D., Bellamy J. E. C., Searcy G. P.: Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42, 100-104.
7. Frymus T.: Zwalczenie rodokokozy źrebiąt. *Życie wet.* 1994, 2, 52-54.
8. Giguere S., Prescott J. F.: Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of Rhodococcus equi infections in foals. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 313-334.
9. Graevenitz A., Punter-Streit V.: Development of a new selective plating medium for Rhodococcus equi. *Microbiol. Immunol.* 1995, 39, 283-284.
10. Grądzki Z., Ziętek A., Boguta L., Winiarczyk S., Wołoszyn S.: Rodokokoza źrebiąt. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 915-920.
11. Grądzki Z., Ziętek A., Boguta L., Winiarczyk S.: Rodokokoza – wyniszczająca choroba źrebiąt, [w:] Problemy zdrowia narządu oddechowego młodych zwierząt gospodarskich, Rozpoznawanie i zapobieganie nieinfekcyjnym i infekcyjnym przyczynom zachorowań. Wrocław 2002, 99-107.
12. Herrick S., Blanc-Brude O., Gray A., Laurent G.: Fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, 31, 741-746.
13. Makrai L., Fodor L., Csivinesik A., Varga J., Senoner Zs., Szabo B.: Characterisation of Rhodococcus equi strains isolated from foals and from immunocompromised human patients. *Acta Vet. Hung.* 2000, 48, 253-259.
14. Mansmann R. A., Knight H. D.: Transtracheal aspiration in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1972, 160, 1527-1529.
15. Martens R. J., Takai S., Cohen N. D., Chaffin M. K., Liu H., Sakurai K., Sugimoto H., Lingweiler S. W.: Association of disease with isolation and virulence of Rhodococcus equi from farm with pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000, 217, 220-225.
16. Prescott J. F., Fernandez A. S., Nicholson V. M., Patterson M. C., Yager J. A., Viel L., Perkins G.: Use of a virulence-associated protein based enzyme-linked immunosorbent assay for Rhodococcus equi serology in horses. *Equine Vet. J.* 1996, 28, 344-349.
17. Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K., Carter G. R. (red.): *Corynebacterium species and Rhodococcus equi*. W: *Clinical Veterinary Microbiology*. Harcourt Publishers Ltd. Edinburgh 1999, 137-143.
18. Rowbotham T. J., Cross T.: Ecology of Rhodococcus coprophilus and Actinomyces in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* 1977, 100, 231-240.
19. Sellon D. C., Besser T. E., Vivrette S. L., McConnico R. S.: Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 1289-1293.
20. Sellon D. C., Walker K., Suyemoto M., Altier C.: Nucleic acid amplification for rapid detection of Rhodococcus equi in equine blood and tracheal wash fluids. *Am. J. Vet. Res.* 1997, 58, 1232-1237.
21. Skalka B., Svastova A.: Two techniques for detection of antibodies against Corynebacterium (Rhodococcus) equi in horse sera. *Vet. Microbiol.* 1984/85, 10, 293-300.
22. Takai S., Kawazu S., Tsubaki S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Corynebacterium (Rhodococcus) equi infection in foals. *Am. J. Vet. Res.* 1985, 46, 2166-2170.
23. Takai S., Ohbushi S., Koike K., Tsubaki S., Oishi H., Kamada M.: Prevalence of virulent Rhodococcus equi in isolates from soil and faces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2887-2889.
24. Takai S., Vigo G., Ikushima H., Higuchi T., Hagiwara S., Hashikura S., Sasaki Y., Tsubaki S., Anzai T., Kamada M.: Detection of virulent Rhodococcus equi in tracheal aspirate samples by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of *R. equi* pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.* 1998, 61, 59-69.
25. Takai S.: Epidemiology of Rhodococcus equi infections: a review. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 167-176.
26. Tan W., Doyle Ch. J., Budzynski A.: Comparison of the kinetic fibrinogen assay with the von Clauss method and the clot recovery method in plasma of patients with conditions affecting fibrinogen coagulability. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995, 104, 455-462.

Adres autora: dr hab. Zbigniew Grądzki, ul. Bursztynowa 15/109, 20-576 Lublin

## STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE, według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w czerwcu 2003 r. \*)

- 1) **Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w 2 województwach: lubelskim (2-2) i wielkopolskim (1-1). Stwierdzono ją u 3 kotów.
- 2) **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 6 województwach: dolnośląskim (1-1), lubelskim (2-2), podkarpackim (1-1), podlaskim (1-1), warmińsko-mazurskim (2-2), wielkopolskim (5-5). Zanotowano ją u 8 lisów, 2 jenotów, 1 borsuka i 1 nietoperza.
- 3) **Zgnielec amerykański pszczoł** – wystąpił w 6 województwach: lubelskim (1-1), małopolskim (1-1), podkarpackim (1-1), podlaskim (1-1), śląskim (1-1) i wielkopolskim (1-1).

\*) W nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.