

Identyfikacja drobnoustrojów z gatunku *Streptococcus suis* testem PCR

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANDRZEJ KOWALCZYK

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

Markowska-Daniel I., Kowalczyk A. Identifying *Streptococcus suis* using PCR

Summary

The Multiplex PCR test has been developed in order to identify *Streptococcus suis* (*S. suis*) using primers defining the conservative region of the gene encoding 16S rRNA which is characteristic for this pathogen. A modification of the classic multiplex test was applied allowing variability in genomic divergence (polymorphism) of the 16S rRNA gene among the 35 existing serotypes of *S. suis*. In addition the tested sample included an amplicon of the 23S rRNA sequence, characteristic for most bacteria, as an internal control for the presence of bacterial DNA. The primer sets were highly sensitive and 542 out of 584 tested samples (95%) were positive. No PCR products were observed in the other bacterial respiratory pathogens included in the test, nor were there any unspecific bands. The analytical sensitivity of the test was estimated as being approximately 2×10^5 cfu/ml. The obtained results indicate that elaborated tests may be a speedy, sensitive and specific tool in routine diagnosis of infections caused by *S. suis*.

Keywords: *Streptococcus suis*, diagnosis, PCR, sequence of 16S rDNA

Infekcje świń wywoływane przez paciorkowce z gatunku *Streptococcus suis* (*S. suis*) uznawane są, szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu, za jeden z ważniejszych problemów zdrowotnych występujących we współczesnych systemach produkcji trzody chlewnej w Polsce oraz na świecie (7, 14, 19). Ostry przebieg choroby objawia się zwykle zapaleniem opon mózgowych, stawów, wsierdza, płuc, a także posocznica z towarzyszącymi jej nagłymi padnięciami zwierząt (7).

Naturalnym miejscem bytowania *S. suis* jest górny odcinek dróg oddechowych, głównie migdałki i zatoki nosowe, a ponadto układ rozrodczy i przewód pokarmowy (3). Drobnoustrój ten izolowany jest coraz częściej od wielu gatunków ssaków, głównie hodowlanych, ptaków oraz ludzi (szczególnie mających na co dzień kontakt z trzodą chlewną – hodowców, lekarzy weterynarii oraz pracowników rzeźni).

Do identyfikacji *S. suis* wykorzystuje się głównie serotypowanie, bazujące na obecności specyficznych polisacharydów otoczkowych (capsular polysaccharide, CPS) oraz ocenę właściwości biochemicznych tych drobnoustrojów (1). Wymienione metody cechują się jednak dużym prawdopodobieństwem błędu, pozostawiając badane patogeny jako nietypujące się. W celu wyeliminowania ograniczeń wynikających z niedoskonałości metod fenotypowej charakterystyki bakterii, obecnie w diagnostyce weterynaryjnej coraz powszechniej stosuje się czułe i specyficzne metody biologii molekularnej, oparte na technikach analizy kwasów nukleinowych, w tym reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Umożliwiają

one szybką i czułą identyfikację oraz różnicowanie mikroorganizmów, nie tylko w obrębie rodzaju i gatunku, ale również całego genomu bądź wybranych markerów genetycznych, które są łatwo rozpoznawalnymi sekwencjami, sprzężonymi z cechami fenotypowymi, charakterystycznymi dla danego gatunku (2).

Do najbardziej popularnych markerów genetycznych wykorzystywanych do identyfikacji mikroorganizmów, w tym paciorkowców, należą sekwencje genu kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną 16S rRNA (1, 15), z tego powodu, że jest to region bardzo stabilny i konserwatywny, a jednocześnie specyficzny gatunkowo, ponadto w komórce bakteryjnej obecna jest znaczna liczba kopii sekwencji repetytywnych tego regionu (heterogenny obszar V2) (3).

Celem badań była identyfikacja molekularna *S. suis* w oparciu o opracowany test multiplex PCR (mPCR) oraz porównanie uzyskanych wyników w zakresie czułości i swoistości z dotychczas stosowanymi metodami diagnostycznymi.

Materiały i metody

Szczepy bakteryjne. Poddane badaniu izolaty *S. suis* pochodziły z materiału patologicznego przesłanego do Zakładu Chorób Świń PIWet do badań diagnostycznych z ferm trzody chlewnej zlokalizowanych na obszarze całego kraju w latach 2001-2004. Ogółem przebadano 584 izolaty terenowe, zakwalifikowane na podstawie wstępnych badań bakteriologicznych (typowej dla *S. suis* morfologii, z uwzględnieniem charakterystycznej hemolizy typu α na podłożu agarowym z dodatkiem krwi baraniej) oraz biochemicznych do gatunku *S. suis*.

Szczepy referencyjne *S. suis* pochodziły z Duńskiego Instytutu Weterynaryjnego w Kopenhadze oraz z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Montrealu.

Amplifikacja materiału genetycznego. W celu ekstrakcji matrycowego DNA badane izolaty terenowe namnażano w 8 ml podłoża Todd Hewitt z dodatkiem 5% surowicy końskiej, przez 24 godz., w temp. 37°C, w atmosferze 8% CO₂. Następnego dnia hodowlę odwirowywano przez 20 min., w temp. 4°C, stosując 2500 r.p.m. Osad komórek zawieszano w 100 µl 10 mM roztworu TE. Ekstrakcję prowadzono z wykorzystaniem elucji przez kolumny ze złożem krzemionkowym (A&A Biotechnology, Polska). Produkt ekstrakcji zawieszano w 100 µl 10 mM roztworu TE.

Do opracowania testu PCR wykorzystano startery definiujące konserwatywne fragmenty genów kodujących mniejszą rybosomalną podjednostkę 16S rRNA charakterystyczną dla gatunku *S. suis*. Zastosowano modyfikację klasycznej metody mPCR, uwzględniającą polimorfizm genu 16S rRNA wśród istniejących 35 serotypów *S. suis*, polegającą na użyciu dwóch starterów dla końca 5' (SUIS 10F i SUIS 15F) i czterech starterów dla końca 3' (SUIS 20R, SUIS 25R, SUIS 26R, SUIS 3KR). Dodatkowo do każdego testu włączono parę starterów umożliwiających amplifikację większej podjednostki rybosomu, 23S rRNA, specyficznej dla większości patogenów. Stanowiła ona wewnętrzną kontrolę prawidłowości przeprowadzonego testu PCR oraz kontrolę obecności bakteryjnego DNA. Charakterystykę użytych starterów przedstawiono w tab. 1.

Amplifikację fragmentów genomowych wykonywano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 50 µl, zawierającej: 5 mM MgCl₂, 40 µM każdego z nukleotydów, 0,5 U polimerazy Taq DNA oraz startery. Reakcję PCR wykonano w termocyklurze produkcji Biometra, przy użyciu programu o następujących parametrach: 94°C – 5 min. (denaturacja wstępna), a następnie 35 cykli składających się z: denaturacji w temp. 94°C przez 1 min., przyłączania starterów w temp. 51°C przez 1 min. i procesu elongacji w temp. 72°C przez 1 min. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 10 minut. Wyniki reakcji analizowano po rozdiale elektroforetycznym uzyskanych produktów DNA, w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1X TBE, barwionym bromkiem etydy, po wizualizacji w świetle UV.

Do określenia limitu detekcji DNA wykorzystano komórki bakteryjne referencyjnego szczepu *S. suis* serotypu 2, które namnażano w 300 ml podłoża Todd Hewitt z dodatkiem 5% surowicy końskiej. Hodowlę prowadzono w termostacie z wstrząsarką, przez 24 godz., w temp. 37°C, w atmosferze 8%

CO₂. Przygotowano zawiesinę bakteryjną o gęstości 2 × 10⁹ jtk/ml, po czym wykonywano kolejne rozcieńczenia dziesiętne zawiesiny w 10 mM Tris HCl, które wykorzystano do ekstrakcji oraz amplifikacji DNA zgodnie z procedurą przedstawioną powyżej.

Do kontroli swoistości testu wykorzystano materiał genetyczny, wyekstrahowany i zamplifikowany analogicznie z przedstawionym powyżej sposobem postępowania, z następujących drobnoustrojów wywołujących infekcje układu oddechowego świń: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* oraz *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Wyniki i omówienie

Wynik reakcji PCR uznawano za dodatni w przypadku, gdy uzyskiwano dwa prążki elektroforetyczne: na wysokości 959 pz, flankujące obszar między pozycją 75 a 1034 w przypadku amplikonu 16S rRNA oraz 662 pz (dla amplikonu 23S rRNA) (ryc. 1). Należy podkreślić, że długość sekwencji amplikonu odgrywa znaczącą rolę w stabilności nici DNA – dłuższa sekwencja jest mniej wrażliwa na działanie czynników degradujących (18).

Gatunkowa specyficzność sekwencji 16S rRNA okazała się w naszych badaniach wystarczającym narzędziem do zidentyfikowania gatunku *S. suis* i potwierdziła swoją wysoką zachowawczość genetyczną, stwierdzoną we wcześniejszych doniesieniach (4, 7, 15).

Zastosowany zestaw starterów charakteryzował się dużą swoistością. Spośród 584 badanych izolatów pozytywne wyniki reakcji PCR stwierdzono w 542 przypadkach (95%). Czterdzieści dwa izolaty charakteryzujące się brakiem amplifikacji ze starterami dla genu 16S rRNA uznano w chwili obecnej za szczepy nie należące do gatunku *S. suis* (dla przykładu ryc. 1 ścieżka 10). Poddano je ponownie charakterystyce fenotypowej, z uwzględnieniem określenia serotypu. Sześć spośród wspomnianych 42 izolatów (1% badanych szczepów) charakteryzowało się typowymi dla paciorkowców właściwościami biochemicznymi, a na podstawie wyniku testu koagulacji zakwalifikowano je do serotypów: ½ i 7 (po 2 szczepy) oraz 1 i 2 (po 1 izolacie). Prawdopodobnie doszło w nich do mutacji punktowych w obrębie sekwencji użytego w badaniach genu, w związku z czym w badaniu metodą PCR uzyskano wynik fałszywie ujemny. Celem ostatecznego zakwalifikowania wspomnianych izolatów do określonego gatunku bakterii konieczne byłoby zastosowanie bardziej zaawansowanych technik diagnostycznych, jak np. sekwencjonowania.

Należy podkreślić, że nie stwierdzono pozytywnych wyników reakcji amplifikacji w odniesieniu do żadnego ze wspomnianych patogenów odpowiedzialnych za infekcje w obrębie układu oddechowego świń, co potwierdziło swoistość użytych w teście starterów. Nie odnotowano także niespecyficznych prążków świadczących o kontaminacji bądź niestabilności starterów.

Czułość opracowanego testu oszacowano na poziomie 2 × 10⁵ jtk/ml (rozcieńczenie zawiesiny 10⁻⁴). Wartość ekstynkcji zawiesiny wyjściowej przy OD 600 nm wynosiła 1,73 (ryc. 2).

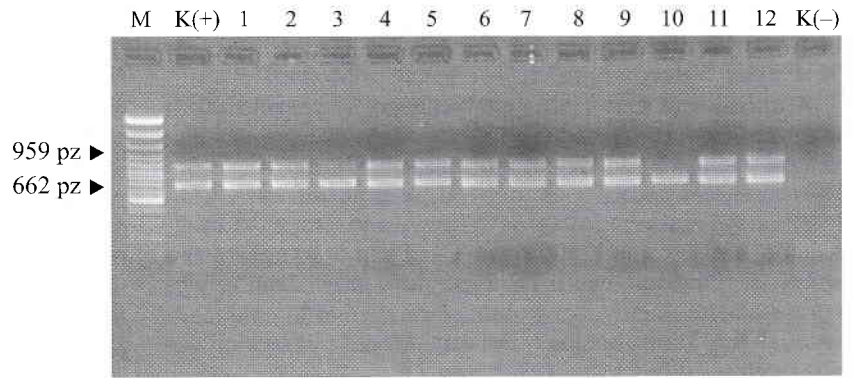
Tab. 1. Charakterystyka starterów wykorzystywanych do amplifikacji materiału genetycznego *S. suis* testem mPCR

Nazwa startera	Sekwencja 5' → 3'	Amplifikowany gen	Wielkość produktu (pz)	Stężenie
SUIS 10F	ACT AGA CGG ATG AGT TGC GA			
SUIS 15F	ACC ATT AAT CAT GAG TCG CGA			
SUIS 20R	GAT GCT CCG AAG AGA AAC C			
SUIS 25R	CCA GTG ATC CGA AGA AAA ATC			
SUIS 26R	CCA GTG TTC CGA AGA AAA ATC			
SUIS 3KR	CCG ATG TAC CGA AGT AAA ACT	16S rDNA	~ 959	20 µM
FWL 23S	CGA CGT TCT AAA CCC AGC TC			
WL 23SR	GCG AAA TTC CTT GTC GGG	23S rDNA	~ 662	90 µM

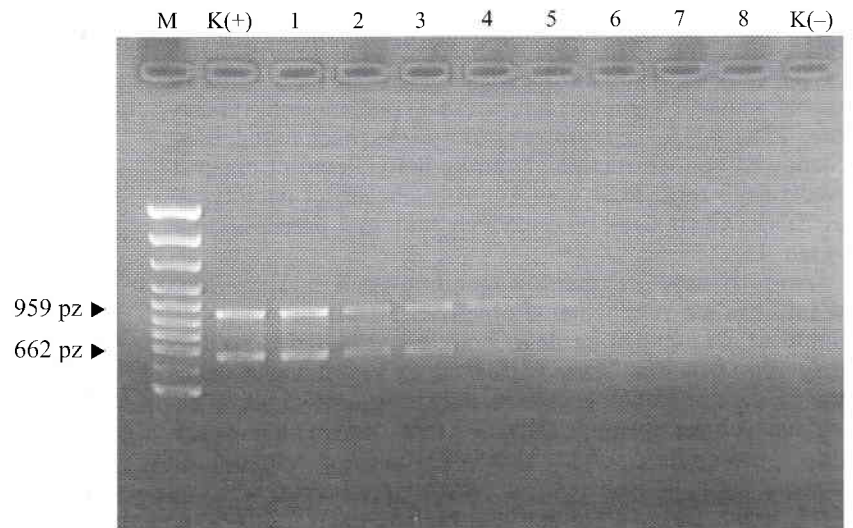
Sekwencja genu kodującego podjednostkę rybosomalną 16S rRNA była wykorzystywana jako marker genetyczny przez wielu badaczy. Między innymi Chatellier i wsp. (4) amplikonem sekwencji 16S rRNA posłużyli się jako matrycą dystansu genetycznego między 35 serotypami tego gatunku paciorkowca świń. Stwierdzone wysokie podobieństwo gatunkowe *S. suis* kształtowało się na poziomie od 93% do 100%. Jednocześnie marker genetyczny 16S rRNA nie kwalifikuje *S. suis* jako blisko spokrewnionego z sześcioma opisanymi grupami filogenetycznymi paciorkowców występujących u świń, a mianowicie: *mitis*, *anginosus*, *salivarius*, *bovis*, *mutans*, *pyogenic* (10). Jako znacznik genetyczny, fragment 16S rRNA różnicuje zatem gatunek w obrębie rodzaju, a zarazem pozostaje konserwatywny w obrębie gatunku, spełniając tym samym podstawowe cechy markerów genetycznych (2).

W badaniach prowadzonych przez Drancourt i wsp. (6) zsekwencjonowano obszar 16S rRNA szeregu gatunków szczepów bakteryjnych, należących do 47 różnych rodzajów, w tym 4 gatunków rodzaju *Streptococcus* (6). Wymienieni badacze wykazali wysoką stabilność genetyczną i konserwatywność badanej sekwencji. Stwierdzili oni podobieństwo genetyczne na poziomie powyżej 97% w odniesieniu do 159 spośród 177 badanych izolatów. Wyniki ich dalszych badań sugerowały, iż podobieństwo poniżej 97% sekwencji 16S rRNA daje podstawy do uznania izolatów bakteryjnych za odrębne gatunki (5). Nie oznacza to jednak, jak podkreślają wspomniani autorzy, że homologia genu 16S rRNA na poziomie > 97% jednoznacznie klasyfikuje szczepy do jednego gatunku. Polimorfizm sekwencji 16S występuje na różnym poziomie, w zależności od rodzaju i gatunku. Gen kodujący 16S rRNA nie jest zatem perfekcyjnym wskaźnikiem rozbieżności międzygatunkowej. Istnieje pewna liczba szczepów, gdzie homologia całego genomu na poziomie poniżej 50% wskazuje na klasyfikację do oddzielnych gatunków, mimo wyraźnego podobieństwa (w granicach 99-100%) w obrębie genu 16S rRNA (16). Jest to jednak sekwencja na tyle konserwatywna i dobrze poznana wśród opisanych i zdeponowanych w banku genów izolatów bakteryjnych, że pozwala na szerokie wykorzystanie jej do badań identyfikacyjnych danego gatunku, opartych na metodzie PCR.

Czułość opracowanego testu jest zadowalająca, aczkolwiek nie jest ona zbyt wysoka, co jest często stwierdzanym problemem w odniesieniu do testów mPCR. Nie wiele danych publikowano dotychczas na temat optymalizacji czynników decydujących o wydajności procesu amplifikacji w teście mPCR, takich jak np. koncentracja buforu, równowaga między stężeniem magnezu a nukleotydów czy parametrów temperaturowych poszczególnych cykli (9). Kluczowym elementem wpły-



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji PCR uzyskanych ze starterami flankującymi genu: 16S rDNA (959 pz) oraz 23S rDNA (662 pz) wybranych szczepów *S. suis*. Poszczególne ścieżki: M – 100 pz, standard masy molekularnej; K (+) szczep referencyjny serotypu 2; 1-12 izolaty terenowe *S. suis*; K (-) kontrola reakcji PCR (H_2O)



Ryc. 2. Ocena czułości testu multiplex PCR dla kolejnych rozcieńczeń wyjściowej zawiesiny komórkowej referencyjnego szczepu *S. suis* serotyp 2 o liczbie CFU = $2,7 \times 10^9$ /ml. Poszczególne ścieżki: M – 100 pz, standard masy molekularnej; K (+); 1-8 kolejne rozcieńczenia od 10^0 do 10^{-7} ; K (-) kontrola reakcji PCR (H_2O)

wającym na wydajność procesu amplifikacji regionu kodującego obydwie jednostki rybosomalnego RNA jest ich koncentracja w reakcji PCR (9). Jedną z teorii uzupełniających tę zależność jest różna liczba kopii regionu 16S-23S u różnych gatunków bakterii, co również przyczynia się do rozbieżności wyniku (17).

Niektórzy autorzy donoszą o dziesięcio- lub nawet stukrotnym spadku czułości testu mPCR w porównaniu z simplex PCR, wykorzystywanym do detekcji tego samego docelowego DNA (17). Powodem jest najprawdopodobniej współzawodnictwo o wykorzystanie wolnych nukleotydów oraz polimerazy Taq w sytuacji, gdy w jednej reakcji użyto złożonych starterów (11). Dla przykładu w teście simplex PCR, bazującym na markerowej sekwencji 16S czułość metody została oszacowana na granicy 633-403 jtk/ml. Test został opracowany do wykrywania gatunku *Streptococcus canis*, gdzie równolegle prowadzono analizę sekwencji regionu interstycjalnego między blokami kodującymi mniejszą i większą podjednostkę rybosomalnego RNA, 16S-23S rRNA (ribosomal internal transcribed spacer – RITS) oraz ge-

nem czynnika CAMP (CAMP factor gene – cfp) (8). Czulość w testach PCR wynosiła dla tych markerów odpowiednio: dla regionu 16S-23S – 10⁷-300 jtk/ml oraz dla genu cfp – 92-143 jtk/ml, co wskazuje na mniejszą efektywność amplifikacji odcinka kodującego 16S rRNA.

Inni badacze (13) opracowali test simplex PCR, w którym, amplifikując region 16S genomu *Streptococcus agalactiae*, uzyskali produkt reakcji przy koncentracji bakterii 1 jtk/ml, natomiast przy bezpośredniej izolacji z zainfekowanego materiału wykrywali DNA przy liczbie bakterii w granicach od 10⁴ do 10⁵ jtk/ml. Analogiczne wyniki w zakresie czulości uzyskali Phuektes i wsp. (17), którzy wykrywali materiał genetyczny *Staphylococcus aureus* metodą mPCR przy koncentracji bakterii 10⁴ jtk/ml, a stosując namnażanie wstępne nawet 1 jtk/ml.

Z kolei w teście wykorzystującym tylko jedną parę starterów dla odcinka genu oksydazy mleczanowej do identyfikacji *Streptococcus iniae* granica wykrywalności DNA mieściła się na poziomie 62-31 komórek na reakcję PCR (12).

Wisselink i wsp. (19), prowadząc badania z zakresu epidemiologii, opracowali test mPCR, pozwalający na różnicowanie szczepów *S. suis* serotypów 1, 2, 1/2, 7, 9, 14, jak również wirulentnego serotypu 1 i wysoce zjadliwego serotypu 2. Test bazował na amplifikacji genu kodującego czynnik pozakomórkowy EF (extracellular protein factor, epf) oraz genu kodującego polisacharyd otoczkowy (CPS). Autorzy ci określili różnice w wielkości prążków charakterystycznych dla regionu cps zjadliwego serotypu 9 i mniej zjadliwego serotypu 7 *S. suis*. Opracowana przez nich metoda umożliwiała także wykrywanie fragmentu odpowiadającego sekwencji genu spokrewnionego z epf, zwanego genem epf*. Jest to gen zawierający kilka kodujących motywów repetytywnych, przez co niesie informację o syntezie białka charakteryzującego się większą masą cząsteczkową od typowej formy białka EF, powszechnie występującej w warunkach naturalnych. Z uwagi na występowanie odmiany wysoko cząsteczkowej białka EF, głównie w populacji mało zjadliwego serotypu 2 *S. suis*, sugerowali oni możliwość wykorzystania testu do odróżniania tego serotypu od wirulentnych serotypów 1 i 2. Czulość metody określono na poziomie 10 fg materiału genetycznego.

Region cps jako marker genetyczny wykorzystali także badacze amerykańscy do różnicowania wewnątrzgatunkowego serotypów 1, 2, 1/2, 7, 9 i 14 *S. suis*, na podstawie długości amplikonu w danym serotypie (14). W reakcji mPCR wykorzystali oni zestawy starterów odpowiednie dla różnicowanych serotypów, flankujące sekwencję kodującą polisacharyd otoczkowy. Jako kontrola reakcji wykorzystana została konserwatywna dla wszystkich serotypów *S. suis* sekwencja kodująca dehydrogenazę glutaminową (GDH).

Główną zaletą testów mPCR jest ich efektywność (17). Użycie kilku par starterów pozwala na jednoczesną detekcję kilku patogenów w jednej reakcji, dzięki czemu ogranicza się zużycie reagentów, takich jak np. polimeraza Taq. Tego typu test wymaga także mniejszych nakładów związanych z preparatyką biomolekuł oraz ich analizą.

Podsumowując można stwierdzić, że opracowany test multiplex PCR umożliwia identyfikację paciorkowców świń na podstawie markera genetycznego 16S rRNA. Zastosowana w nim kombinacja wielu starterów dla tej sekwencji, pozwala na amplifikację różnych jej odmian występujących w obrębie poszczególnych 35 serotypów gatunku *S. suis*. Jest on przydatnym testem diagnostycznym umożliwiającym identyfikację wymienionego gatunku bakterii.

Piśmiennictwo

1. Abdulmawjood A., Weiss R., Lammler C.: Species identification of *Streptococcus porcicus* by restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. Res. Vet. Sci. 1998, 65, 85-86.
2. Bednarek P. T., Chwedorzewska K.: Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. Biotechnologia 2001, 52, 9-34.
3. Bentley R. W., Leigh J. A., Collins M. D.: Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991, 41, 487-494.
4. Chatellier S., Harel J., Zhang Y., Gottschalk M., Higgins R., Devriese L. A., Brousseau R.: Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998, 48, 581-589.
5. Drancourt M., Berger P., Raoult D.: Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 2197-2202.
6. Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J. P., Raoult D.: 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentified bacterial isolates. Clin. Microbiol. 2000, 38, 3623-3630.
7. Gottschalk M., Segura M.: The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet. Microbiol. 2000, 76, 259-272.
8. Hassan A. A., Khan I. U., Abdulmawjood A., Lammler C.: Development of PCR assays for detection of *Streptococcus canis*. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 28, 209-214.
9. Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H.: Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques 1997, 23, 504-511.
10. Kawamura Y., Hou X. G., Sultana F., Miura H., Ezaki T.: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1995, 45, 406-408.
11. Madico G., Quinn T. C., Boman J., Gaydos C. A.: Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 1085-1093.
12. Mata A. I., Blanco M. M., Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J. F., Gibello A.: Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. Vet. Microbiol. 2004, 21, 109-116.
13. Meiri-Bendek I., Lipkin E., Friedmann A., Leitner G., Saran A., Friedman S., Kashi Y.: A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. J. Dairy Sci. 2002, 85, 1717-1723.
14. Okwumabua O., O'Connor M., Shull E.: A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 218, 79-84.
15. Okwumabua O., Staats J., Chengappa M. M.: Detection of genomic heterogeneity in *Streptococcus suis* isolates by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes (ribotyping). J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 968-972.
16. Patel J. B.: 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol. Diagn. 2001, 6, 313-321.
17. Phuektes P., Mansell P. D., Browning G. F.: Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 2001, 84, 1140-1148.
18. Schuurman T., de Boer R. F., Kooistra-Smid A. M., van Zwet A. A.: Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J. Clin. Microbiol. 2004, 42, 734-740.
19. Wisselink H. J., Joosten J. J., Smith H. E.: Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 2922-2929.

Adres autora: doc. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: iwondam@piwet.pulawy.pl