

# Przydatność metody PCR i badania hodowlanego do przyżyciowej diagnostyki rodokokozy źrebiąt

ZBIGNIEW GRĄDZKI, ANNA ZIĘTEK-BARSZCZ

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Grądzki Z., Ziętek-Barszcz A.

## Suitability of PCR and culture for antemortem diagnosis of rhodococcosis in foals

### Summary

The aim of the study was to assess the suitability of multiplex PCR and culture for the detection of virulent *R. equi* in tracheobronchial aspirate (TBA) and feces of foals from enzootic farms. Fecal and TBA samples were taken randomly from a representative group of foals aged between 1 and 6 months. The solid selective medium NANAT was used for culture examination. Multiplex PCR reaction was performed with the use of two sets of primers complementary to the conservative gene fragment encoding the 16S subunit of ribosomal RNA of *R. equi* and the plasmid gene encoding virulence associated protein A (VapA), which determines bacterial virulence. During clinical observations three experimental groups (A, B, C), differing in the intensity of respiratory signs, were selected for further studies. In foals from group A, showing no clinical signs from the respiratory tract, the results of the examinations of TBA and fecal samples were negative irrespective of the method used. In group B, showing moderate respiratory signs, 15 TBA and fecal samples were examined. PCR results were positive for 7 TBA samples and 2 fecal samples, whereas culture examinations were positive for only 3 TBA samples from this group. In group C, consisting of 6 foals with severe respiratory signs, positive PCR and culture results were obtained for all TBA samples and for 3 fecal samples.

**Keywords:** *Rhodococcus equi*, foals, diagnostics, PCR, culture

Rodokokoza jest bakteryjną chorobą układu oddechowego źrebiąt, która występuje najczęściej u zwierząt w wieku od 1. do 6. miesiąca życia. Choroba przebiega z objawami ropnego zapalenia płuc, węzłów chłonnych i sporadycznie błony śluzowej jelit (7, 15). U źrebiąt zakażonych w warunkach naturalnych, objawy kliniczne ujawniają się zwykle w wieku poniżej 4. miesiąca życia (7, 32). Rozwój choroby jest powolny, a w początkowej fazie zakażenia objawy mogą być słabo nasilone i łatwo dają się przeoczyć (7, 8). Wczesne, przyżyciowe rozpoznanie zakażeń *Rhodococcus equi* u źrebiąt ma istotne znaczenie dla podjęcia we właściwym czasie specyficznej terapii antybiotykowej oraz zwiększenia jej skuteczności (13, 22). Antybiotykoterapia przyczynia się także do zmniejszenia zanieczyszczenia środowiska zewnętrznego zjadliwymi szczepami *R. equi* (8, 10) oraz rzutuje na wyniki ekonomiczne uzyskiwane w stadninach.

Nadzorem lekarsko-weterynaryjnym oraz badaniami przesiewowymi winny być objęte zwłaszcza stadniny, w których rodokokoza występuje enzootycznie (5, 8). Z uwagi na powszechne występowanie niezjadliwych szczepów *R. equi* w środowisku hodowlanym wiarygodna metoda diagnostyki rodokokozy powin-

na, poza identyfikacją gatunkową zarazka, uwzględnić także określenie markerów zjadliwości (18, 28).

Celem badań było określenie przydatności metody PCR-multiplex i badania hodowlanego do wykrywania zjadliwych szczepów *R. equi* w popłuczynie tchawiczo-oskrzelowej (PTO) i kale źrebiąt pochodzących ze stadnin z enzootycznie występującą rodokokozą.

### Materiał i metody

Badania wykonano w ciągu jednego sezonu hodowlanego. Zwierzęta do badań pochodziły z dwóch stadnin (K, M), zlokalizowanych w różnych regionach geograficznych Polski, w których rodokokoza występuje enzootycznie od wielu lat. Średni współczynnik chorobowości w tych stadninach wynosił w ostatnich latach 15-25%, natomiast współczynnik śmiertelności był zróżnicowany i wynosił średnio 10% dla stadniny K oraz 7% w stadninie M.

Materiał do badań stanowiły próbki kału oraz popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej, które pobierano losowo od reprezentatywnej grupy źrebiąt w przedziale wiekowym od 1. do 6. miesiąca życia. Ogółem próbki do badań pobrano od 41 źrebiąt.

Do pobierania popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej wykorzystano metodę aspiracji nosowo-tchawicowej wg Ha-

shikura i wsp. (12) w modyfikacji własnej (31). Kał do badań pobierano z prostnicy od źrebiąt lub ze ściółki i transportowano do laboratorium w plastikowych pojemnikach (Medlab, Polska). Do badania hodowlanego wykorzystywano stałe podłoże wybiórczo-namnażające NANAT opracowane przez Woolcock i wsp. (29). Posiewy inkubowano w temp. 30°C przez 48 godz. Ekstrakcję DNA wykonywano metodą trawienia enzymatycznego z użyciem CTAB w odniesieniu do popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej oraz trawienia enzymatycznego z użyciem sproszkowanego szkła w przypadku kału. Techniczne szczegóły obydwu metod podano we wcześniejszych publikacjach (30, 31).

Oligonukleotydy użyte jako startery reakcji PCR wyselekcjonowano w oparciu o dane piśmiennictwa (3, 22). Do reakcji amplifikacji użyto 2 par starterów (Rqfor, Rqrev i Vp1, Vp2) komplementarnych, odpowiednio, do konserwatywnego fragmentu genu kodującego podjednostkę 16S rybosomowego RNA *R. equi* oraz fragmentu plazmidowego genu *vapA*, kodującego białko VapA warunkujące zjadliwość zarazka (tab. 1). Zastosowanie podwójnych starterów umożliwiło potwierdzenie przynależności bakterii do gatunku *Rhodococcus equi* oraz wykazanie ich zjadliwości. Reakcję amplifikacji przeprowadzono według procedury podanej przez Bell i wsp. (3). Produkty reakcji analizowano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Sigma) w obecności wzorca masowego (100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Litwa).

## Wyniki i omówienie

Na podstawie obserwacji klinicznych w stadninach z enzootycznie występującą rodokokozą wyodrębniono 3 grupy doświadczalne (A, B, C) liczące łącznie 41 źrebiąt. Grupa A obejmowała 20 źrebiąt nie wykazujących w okresie pobierania próbek klinicznych objawów ze strony układu oddechowego. Grupa B obejmowała 15 źrebiąt, u których badaniem klinicznym stwierdzono zapalenie górnych dróg oddechowych, manifestujące się podwyższeniem ciepłoty wewnętrznej (39,0-40,5°C), osowieniem, powiększeniem węzłów chłonnych żuchwowych, zmniejszeniem apetytu, surowiczym lub śluzowo-ropnym wypływem z otworów nosowych oraz kaszlem. Osłuchiwaniami u wszystkich źrebiąt z tej grupy stwierdzano zaostrenie szmeru pęcherzykowego, słyszalne zwłaszcza w okolicy płatów dogłowych. Grupa C obejmowała 6 źrebiąt, u których przyżyciowo na podstawie badania klinicznego postawiono podejrzenie, a w dalszym etapie badań metodą PCR potwierdzono rozpoznanie zapalenia płuc wywołanego przez zjadliwe szczepy *R. equi*. W grupach B i C źrebięta poddawane były terapii antybiotykowej.

U źrebiąt z grupy A, nie wykazujących klinicznych objawów ze strony układu oddechowego, wyniki badania próbek PTO i kału były negatywne, niezależnie

Tab. 1. Sekwencje starterów reakcji multiplex PCR

Nazwa startera	Kierunek (5' → 3')	Sekwencja (5' → 3')	Region	Produkt
Rq for. Rq rev.	→ ←	TCGTCCGTGAAAACCTGGG CGACCACAAGGGGGCCGT	16S rRNA	441 pz
Vp1 Vp2	→ ←	GAGGGATCCGGTTCTCGTAACGCTACAATC TTTGAATTCTCTACACCCACCTCACACCT	<i>vapA</i>	875 pz

Tab. 2. Porównanie wyników badania metodą multiplex PCR i hodowlanego próbek popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej i kału źrebiąt w zależności od nasilenia klinicznych objawów ze strony układu oddechowego

	Grupa A (n = 20)		Grupa B (n = 15)		Grupa C (n = 6)	
	PTO	kał	PTO	kał	PTO	kał
Metoda PCR	-	-	7	2	6	3
Badanie hodowlane	-	-	3	-	6	3

Objaśnienia: A – źrebięta nie wykazujące klinicznych objawów ze strony układu oddechowego; B – źrebięta ze słabo nasilonymi objawami ze strony układu oddechowego (opis w tekście); C – źrebięta z silnie wyrażonymi objawami ze strony dolnych dróg oddechowych (opis w tekście)

od zastosowanej metody (tab. 2). W grupie B, obejmującej źrebięta wykazujące słabo nasilone objawy ze strony układu oddechowego w postaci kaszlu oraz śluzowo-ropnego wypływu z nosa z towarzyszącą gorączką, na 15 badanych próbek PTO i kału pozytywny wynik reakcji PCR uzyskano w 7 próbkach PTO oraz w 2 próbkach kału, natomiast wynik badania hodowlanego był dodatni tylko w przypadku 3 próbek PTO. W grupie C, obejmującej 6 źrebiąt z silnie wyrażonymi objawami ze strony płuc, dodatni wynik reakcji PCR oraz badania hodowlanego uzyskano we wszystkich badanych próbkach PTO i w 3 próbkach kału.

W toku obserwacji klinicznych w stadninach z enzootycznie występującą rodokokożą wyselekcjonowano do dalszych badań trzy grupy doświadczalne, różniące się stopniem nasilenia klinicznych objawów ze strony układu oddechowego. Taki schemat postępowania umożliwił grupowanie uzyskiwanych wyników badań w zależności od klinicznego stadium rozwoju choroby oraz ułatwił ich interpretację. Podobny tok postępowania przyjmowany jest w odniesieniu do większości badań eksperymentalnych dotyczących zakażeń *R. equi* u źrebiąt (25, 32).

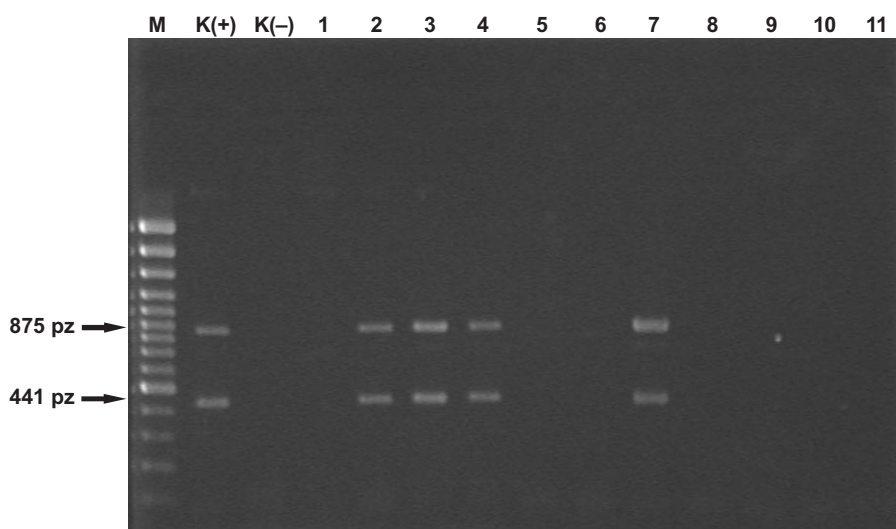
Spośród aktualnie dostępnych metod przyżyciowego rozpoznawania rodokokozy źrebiąt badanie kliniczne ma ograniczoną wartość diagnostyczną (14). Częstym zjawiskiem jest brak widocznych objawów we wczesnych stadiach zakażenia, a niekiedy nawet w zaawansowanych stadiach rozwoju choroby (7, 13). Znaczenie tego badania wiąże się natomiast z możliwością selekcjonowania na jego podstawie źrebiąt do wykonania dalszych szczegółowych badań, a także stwierdzania objawów zlokalizowanych poza układem oddechowym, np. zapalenia wielostawowego (7, 13).

Podstawową metodą diagnostyki zakażeń *R. equi* u źrebiąt jest badanie hodowlane, polegające na izolacji oraz identyfikacji zarazka na podłożach selektyw-

nych (7, 9). Najlepsze efekty uzyskuje się, pobierając do badania popłuczynę tchawiczo-oskrzelową, z uwagi na znikomy stopień zanieczyszczenia próbki florą towarzyszącą (1). Materiał ten można wykorzystać dodatkowo do bezpośredniego badania mikroskopowego, cytologicznego oraz do ekstrakcji kwasów nukleinowych, poddawanych amplifikacji metodą PCR (1, 3, 7). Badanie hodowlane popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej uznawane jest niekiedy za „złoty standard” w laboratoryjnej diagnostyce rodokokozy i często stanowi układ odniesienia dla innych metod (7). Materiał powinno się posiewać na podłoża wybiórcze, zawierające antybiotyki hamujące wzrost flory konkurencyjnej (7, 9). Jednym z częściej stosowanych tego typu podłoży jest pożywka NANAT, opracowana przez Woolcock i wsp. (29), która została wykorzystana w badaniach własnych.

Analiza wyników badań własnych potwierdza skuteczność badania hodowlanego z użyciem selektywnego podłoża NANAT do izolacji szczepów *R. equi* z popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej (ryc. 1). O specyficzności izolacji bakterii należących do gatunku *R. equi* decyduje niewątpliwie skład podłoża NANAT ograniczający namnażanie się flory towarzyszącej (9, 29). Warto podkreślić, że badanie takie nie wnosi żadnych informacji odnośnie do markerów zjadliwości izolowanych szczepów, których określenie jest istotne z punktu widzenia wyboru metody postępowania ze źrebkami chorymi lub podejrzanymi o chorobę (16, 18). Wprawdzie z naturalnych przypadków zakażeń źrebki najczęściej izolowane są szczepy *R. equi* o zaprogramowanej genetycznie zjadliwości (24), w próbkach badanego materiału należy jednak liczyć się także z obecnością szczepów niezjadliwych (5, 24). Uwarunkowane jest to ich powszechnym występowaniem w środowisku bytowania zwierząt oraz zanieczyszczeniem bakteryjnym drobin kurzu i pyłu w pomieszczeniach stajennych i na wybiegach (4, 5, 7, 10). Ponadto badanie hodowlane może dawać wyniki fałszywie ujemne, zwłaszcza jeśli w okresie przed pobraniem materiału stosuje się u zwierząt terapię antybiotykową (16, 20).

W przebiegu rodokokozy zarazek, poza płucami, często lokalizuje się także w przewodzie pokarmowym (7). Dotyczy to zwłaszcza młodych źrebki, w wieku do 3 miesięcy życia, u których bakterie ulegają replikacji w jelitach, osiągając liczbę  $10^4$ - $10^5$  komórek w 1 g kału (24). Skutkiem kolonizacji przewodu pokarmowego jest siewstwo zjadliwych drobnoustrojów z kałem oraz trwałe zanieczyszczenie środowiska zewnętrznego. Ten fakt pozwala na wykorzystywanie



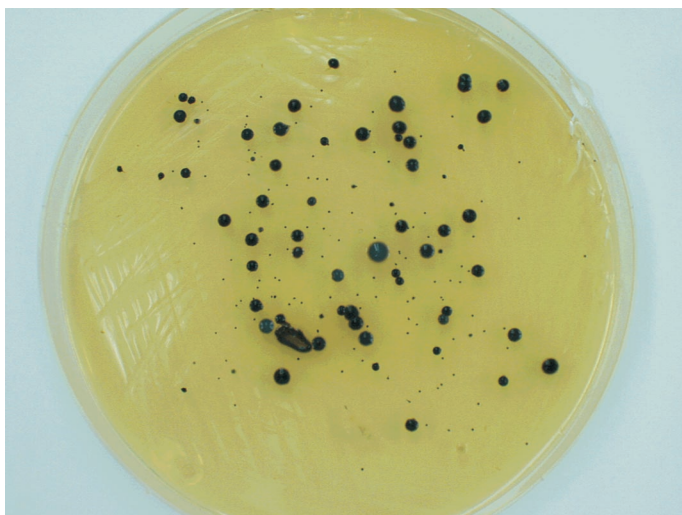
**Ryc. 1.** Produkty reakcji PCR-multiplex o długości 441 i 875 pz uzyskane z użyciem starterów Rq for, Rq rev oraz Vp1, Vp2 komplementarnych, odpowiednio, do genu 16S rRNA i genu vapA na matrycy DNA izolowanego z popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej źrebki

Objaśnienia: M – marker masy cząsteczkowej (100 bp DNA ladder, MBI, Fermentas Litwa); K (-) – kontrola negatywna; K (+) – kontrola pozytywna (DNA *R. equi* ATCC 33701); nr 1, 5, 6, 8, 9, 10, 11 – próbki popłuczyny pobrane od źrebki z grupy A; nr 2, 3, 4, 7 – próbki popłuczyny pobrane od źrebki z grup B i C

izolacji *R. equi* z kału źrebki w wieku do 3. miesiąca życia jako alternatywnej metody przyżyciowej diagnostyki rodokokozy (1, 7), którą zastosowano w badaniach własnych.

W wielu laboratoriach do rozpoznawania rodokokozy źrebki wykorzystuje się aktualnie, obok klasycznych technik bakteriologicznych, metodę PCR (17, 21, 26, 27). Stało się to możliwe dzięki poznaniu i opublikowaniu sekwencji nukleotydowej genu vapA, kodującego białko antygenowe o tej samej nazwie (19). Na tej podstawie wytypowano i opublikowano sekwencje kilku par starterów reakcji, komplementarnych do konserwatywnych regionów plazmidowego DNA (2, 21-23, 26). Alternatywnie w diagnostyce rodokokozy wykorzystać można startery komplementarne do fragmentu chromosomalnego DNA, kodującego podjednostkę 16S rybosomowego RNA (rRNA) (3, 6, 11, 21). Uwzględniając dane piśmiennictwa z zakresu molekularnej diagnostyki zakażeń *R. equi*, w badaniach własnych wykorzystano 2 pary starterów (tab. 1), których użycie umożliwiło wykazanie przynależności gatunkowej izolowanych drobnoustrojów, a także określenie specyficznego dla *R. equi* markera zjadliwości (3, 21). Z danych piśmiennictwa wynika, że metoda PCR stosowana była dotychczas głównie do określania zjadliwości szczepów *R. equi* izolowanych uprzednio w badaniu hodowlanym (1, 18, 21, 26). W badaniach własnych podjęto próbę wykorzystania tej metody do wykrywania materiału genetycznego *R. equi* bezpośrednio w próbkach materiału biologicznego oraz do różnicowania szczepów zjadliwych i niezjadliwych, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia przyżyciowej diagnostyki choroby oraz podejmowanej terapii.





Ryc. 2. 3-dniowa hodowla *R. equi* izolowanego z popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej źrebięcia na podłożu selektywnym NANAT

W stadninach z enzootycznie występującą rodokokozą źrebięta, u których doszło do zakażenia, znajdują się przeważnie w różnych stadiach klinicznych rozwoju choroby, co rzutuje na koncentrację zarazka w materiale dostępnym do badania, a także na możliwości jego wykrywania dostępnymi metodami (7, 13). W badaniach własnych posiewy na pożywcę NANAT i reakcję PCR wykonywano w odniesieniu do próbek popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej i kału pobieranych od źrebiąt, które podzielono na trzy grupy (A, B, C) w zależności od nasilenia klinicznych objawów ze strony układu oddechowego. Wykazano, że w każdej z tych grup, niezależnie od użytej metody badania, bardziej przydatną diagnostycznie okazała się popłuczyna tchawiczo-oskrzelowa w porównaniu do kału (tab. 2). Ten fakt tłumaczyć można wyższą koncentracją *R. equi* w popłuczynie, w której w niepowikłanych przypadkach rodokokozy oraz przy zachowaniu właściwych zasad pobierania materiału oczekiwać należy jednorodnej zawiesiny bakterii. W badaniu próbek kału uwzględnić natomiast należy udział towarzyszącej flory bakteryjnej oraz przeważnie niższą liczbę zarazka w 1 g próbki, zwłaszcza u źrebiąt w wieku powyżej 3. miesiąca życia. W badaniach wykazano także większą przydatność diagnostyczną metody PCR w porównaniu do badania hodowlanego tak w odniesieniu do kału, jak i popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej. Wyniki te świadczą o wyższej czułości metody PCR w porównaniu z badaniem hodowlanym. W interpretacji wyników tych badań uwzględnić należy także fakt stosowania terapii antybiotykowej u źrebiąt w grupach B i C, która niewątpliwie rzutuje na możliwości wykrywania zarazka w badaniu hodowlanym. Na ten problem zwrócili także uwagę Sellon i wsp. (21), którzy wykazali, że u leczonych źrebiąt badanie hodowlane może dawać wynik ujemny, podczas gdy metodą PCR stwierdza się w badanym materiale obecność materiału genetycznego zjadliwych szczepów *R. equi*. Do

przyżyciowej diagnostyki zakażeń *R. equi* u źrebiąt bardziej celowe wydaje się zatem pobieranie popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej niż kału. Konieczne jest także ustalenie, czy badane źrebięta były lub są aktualnie poddawane terapii antybiotykowej. W przypadku stosowania antybiotyków wskazane jest użycie metody PCR, dającej większe prawdopodobieństwo potwierdzenia zakażenia w porównaniu do badania hodowlanego.

Dane piśmiennictwa dotyczące wykorzystania różnych metod przyżyciowego rozpoznawania zakażeń *R. equi* u źrebiąt potwierdzają większą przydatność metody PCR w porównaniu z metodami konwencjonalnej diagnostyki bakteriologicznej (20, 21, 26, 27). Sellon i wsp. (21) wykazali, że przy użyciu metody amplifikacji DNA możliwa była identyfikacja *R. equi* w popłuczynie tchawiczo-oskrzelowej u 34% źrebiąt w wieku 2-8 miesięcy, natomiast w badaniu hodowlanym zarazek wyizolowano z tego samego materiału tylko od 17% źrebiąt. Wyniki te jednoznacznie wskazują na większą czułość metody PCR, której dodatkową zaletą jest możliwość określenia zjadliwości szczepów. Autorzy w swoich badaniach wskazują także na niektóre słabsze strony metody PCR, do których obok problemów natury technicznej zaliczyć można brak możliwości wykrywania u źrebiąt zakażeń współistniejących lub częste uzyskiwanie wyników fałszywie dodatnich, spowodowane zanieczyszczeniem materiału biologicznego niezjadliwymi szczepami pochodzącymi ze środowiska. W badaniach własnych problem ten udało się wyeliminować poprzez zastosowanie do wykrywania *R. equi* reakcji PCR-multiplex z użyciem starterów komplementarnych do dwóch różnych fragmentów genomu zarazka (ryc. 2). Pozwoliło to na równoczesne potwierdzenie przynależności gatunkowej bakterii obecnych w badanym materiale oraz obecności lub braku genu *vapA* kodującego białko determinujące zjadliwość *R. equi*.

Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość zastosowania reakcji PCR i badania hodowlanego do przyżyciowej diagnostyki zakażeń *R. equi* u źrebiąt. Wynik badania uzależniony jest jednak od nasilenia objawów klinicznych i rodzaju badanego materiału (tab. 2). Metoda PCR z użyciem podwójnych starterów jest przydatna do wykrywania w warunkach przyżyciowych zjadliwych szczepów *R. equi* oraz różnicowania ich ze szczepami niezjadliwymi. Metoda ta może być szczególnie przydatna do badania popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej we wczesnym okresie zakażenia, w którym zjadliwe zarazki w większości znajdują się wewnątrz komórek fagocytarnych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań dotyczących możliwości przyżyciowego rozpoznawania zakażeń *R. equi* u źrebiąt w stadninach z enzootycznie występującą rodokokożą można przyjąć, że najbardziej wiarygodne wyniki uzyskuje się w odniesieniu do badania popłuczyny tchawiczo-oskrzelowej metodą PCR.

## 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. Arriaga J., Cohen N., Derr J., Chaffin M., Martens R.: Detection of Rhodococcus equi by polymerase chain reaction using species-specific nonproprietary primers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002, 14, 347-353.
3. Bell K. S., Philp J. C., Christofi N., Aw D. W.: Identification of Rhodococcus equi using the polymerase chain reaction. *Letters Appl. Microbiol.* 1996, 23, 72-74.
4. Chaffin M. K., Cohen N. D., Martens R. J., Edwards R. F., Nevill M.: Foal-related risk factors associated with development of Rhodococcus equi pneumonia on farms with endemic infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, 223, 1791-1799.
5. Cohen N. D., O'Connor M. S., Chaffin M. K., Martens R. J.: Farm characteristics and management practices associated with development of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 226, 404-413.
6. Costa Krewer C., Spricigo D., Avila Botton S., Costa M., Schrank I., Vargas A.: Molecular characterization of Rhodococcus equi isolates of horse breeding farms from an endemic region in south of Brazil by multiplex PCR. *Brazil. J. Microbiol.* 2008, 39, 188-193.
7. Giguere S., Prescott J. F.: Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of Rhodococcus equi infections in foals. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 313-334.
8. Giguere S., Prescott J. F.: Strategies for the control of Rhodococcus equi infections on enzootic farms. *Pediatrics II*. In: *AAEP Proceedings 1997*, 43, 65-70.
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., Hetman E., Winiarczyk S.: Występowanie szczepów Rhodococcus equi w glebie w stadninach z występującą rodokokozą. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1310-1312.
11. Halbert N., Reitzel R., Martens R., Cohen N.: Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Rhodococcus equi and the vapA gene. *Am. J. Vet. Res.* 2005, 66, 1380-1385.
12. Hashikura S., Higuchi T., Taharaguchi S., Orota Y., Nanao Y., Takai S.: Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Equine Vet. J.* 2000, 32, 560-564.
13. Heidmann P., Madigan J. E., Watson J. L.: Rhodococcus equi pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. *Clin. Tech. Equine Pract.* 2006, 5, 203-210.
14. Higuchi T., Taharaguchi S., Hashikura S., Hagiwara S., Gojo Ch., Satoh S., Yoshida M., Takai S.: Physical and serologic examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of Rhodococcus equi infection on endemically infected farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 212, 976-981.
15. Hillidge C. J.: Review of Corynebacterium (Rhodococcus) equi lung abscesses in foals: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Vet. Rec.* 1986, 119, 261-264.
16. Hondalus M. K.: Pathogenesis and virulence of Rhodococcus equi. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 257-268.
17. Ladron N., Fernandez M., Agüero J., Zorn G., Vazquez-Boland J., Navas J.: Rapid identification of Rhodococcus equi by a PCR assay targeting the choE gene. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 3241-3245.
18. Martens R. J., Takai S., Cohen N. D., Chaffin M. K., Liu H., Sakurai K., Sugimoto H., Lingsweiler S. W.: Association of disease with isolation and virulence of Rhodococcus equi from farm soil and foals with pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000, 217, 220-225.
19. Sekizaki T., Ogawa Y., Ikeda T., Ito H., Tsubaki S.: Sequence of the Rhodococcus equi gene encoding the virulence-associated 15-17-kDa antigens. *Gene* 1995, 155, 135-136.
20. Sellon D., Besser T., McConnico R., Vivrette S.: Diagnosis of Rhodococcus equi Pneumonia in Foals: PCR or Culture? *AAEP Proceedings 2000*, 46, 268-269.
21. 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.
22. 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.
23. Takai S., Ikeda T., Sasaki Y., Watanabe Y., Ozawa T., Tsubaki S., Sekizaki T.: Identification of Virulent Rhodococcus equi by Amplification of Gene Coding for 15- to 17-Kilodalton Antigens. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1624-1627.
24. Takai S., Ohbushi S., Koike K., Tsubaki S., Oishi H., Kamada M.: Prevalence of virulent Rhodococcus equi in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2887-2889.
25. Takai S., Sasaki Y., Tsubaki S.: Rhodococcus equi infection in foals – current concepts and implication for future research. *J. Equine Sci.* 1995, 6, 105-119.
26. 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.
27. Venner M., Heyers P., Strutzberg-Minder K., Lorenz N., Verspohl J., Klug E.: Detection of Rhodococcus equi by microbiological culture and by polymerase chain reaction in samples of tracheobronchial secretions of foals. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2007, 120, 126-133.
28. Vivrette S. L., Sellon D. C., Gibbons D. S.: Clinical application of a polymerase chain reaction in the diagnosis of pneumonia caused by Rhodococcus equi in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2000, 217, 1348-1350.
29. Woolcock J. B., Farmer A. M., Mutimer M. D.: Selective medium for Corynebacterium equi isolation. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 9, 640-642.
30. Ziętek-Barszcz A., Grądzki Z.: Optimisation of the DNA-extraction method from foal faeces for the diagnosis of Rhodococcus equi infections using PCR. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 345-349.
31. Ziętek-Barszcz A., Grądzki Z.: The suitability of selected methods of nucleic acid extraction for detecting Rhodococcus equi DNA in tracheobronchial wash fluid using PCR. *Polish J. Vet. Sci.* 2010, 13, 409-413.
32. Zink M. C., Yager J. A., Smart N. L.: Corynebacterium equi infections in horses, 1958-1984: A review of 131 cases. *Can. Vet. J.* 1986, 27, 213-217.

Adres autora: prof. dr hab. Zbigniew Grądzki, ul. Bursztynowa 15/109, 20-576 Lublin; e-mail: gradzki@up.lublin.pl