

Występowanie szczepów *Rhodococcus equi* w glebie w stadninach z występującą rodokokozą

ZBIGNIEW GRĄDZKI, ANNA ZIĘTEK, EMILIA HETMAN, STANISŁAW WINIARCZYK

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Grądzki Z., Ziętek A., Hetman E., Winiarczyk S.

Prevalence of *Rhodococcus equi* strains in soil samples from studs with rhodococcosis

Summary

The aim of the study was to assess the prevalence of virulent and non-virulent *R. equi* strains in horse farms with enzootic and sporadic rhodococcosis. Based on the microbiological culture, a progressive growth of the number of bacteria in soil samples was found that was correlated with the air temperature growth and independent of the farm enzootic status. The number of virulence strains in the soil was dependent on the time of sample collection and type of stud. PCR is a useful method for classifying bacteria from the *R. equi* species and to detect the virulence marker. Comparison of microbiological culture and PCR suggests caution in interpreting culture results in terms of the identification of all bacterial colonies as belonging to *Rhodococcus equi* species.

Keywords: *Rhodococcus equi*, soil

Rhodococcus equi jest drobnoustrojem wywołującym ropno-ziarniniakowate zapalenie płuc i niekiedy zapalenie błony śluzowej jelit u młodych źrebiąt w wieku do 6. miesiąca życia (2, 5). Rodokokoza występuje na całym świecie, także w Polsce i powoduje straty w przychowku, zwłaszcza u źrebiąt nie poddawanych terapii antybiotykowej (3). W niektórych stadninach koni choroba występuje enzootycznie, w innych sporadycznie, natomiast w wielu fermach w ogóle nie jest notowana. Czynniki wpływające na różnicowanie występowania zachorowań w poszczególnych fermach nie zostały dokładnie poznane. Istotne znaczenie przypisywane jest uwarunkowaniom środowiskowym oraz podatności osobniczej źrebiąt (7). Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą inhalacyjną, a głównym źródłem bakterii jest zanieczyszczona gleba oraz pył i kurz z opłaszczonymi na powierzchni cząstkami drobnoustrojów.

Z przypadków zapalenia płuc źrebiąt izolowane są wyłącznie szczepy posiadające w strukturze plazmidu o wielkości 85 lub 90 kbp, w obrębie którego znajduje się gen *vapA* kodujący białko o masie 15-17 kDa, będące głównym determinanem zjadliwości zarazka (2). Odsetek szczepów z genetycznie uwarunkowaną wirulencją w populacji środowiskowych izolatów *R. equi* jest różnicowany i zależy od rodzaju stadniny. Pojęcia na temat zależności pomiędzy obecnością i koncentracją zjadliwych szczepów zarazka w glebie i występowaniem choroby w stadninie są różnicowane (4). Badania ekologiczne z zakresu rodokokozy źrebiąt nie były dotychczas wykonywane w warunkach krajowych.

Wymagają one użycia selektywnych podłoży do izolacji drobnoustrojów z próbek gleby oraz zastosowania genetycznych i/lub fenotypowych metod identyfikacji i różnicowania szczepów zjadliwych i niezjadliwych.

Celem badań było określenie występowania zjadliwych i niezjadliwych szczepów *R. equi* w środowisku hodowlanym, w stadninach z enzootycznie i sporadycznie występującą rodokokozą źrebiąt. Do izolacji i identyfikacji drobnoustrojów w glebie wykorzystano badanie hodowlane z użyciem podłoża selektywnego oraz metodę PCR.

Materiał i metody

Badania prowadzono w okresie od kwietnia do lipca 2005 r. w trzech stadninach koni (A, B, C), zlokalizowanych w różnych regionach geograficznych Polski. W stadninie A, prowadzącej hodowlę koni pełnej krwi angielskiej i w stadninie B – hodującej konie czystej krwi arabskiej rodokokoza występuje enzootycznie, a straty spowodowane padnięciami źrebiąt wynosiły w ostatnich latach 5-10% pogłowia rocznie. W stadninie C, prowadzącej hodowlę koni czystej krwi arabskiej, na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat notowano jedynie pojedyncze przypadki zachorowań źrebiąt. We wszystkich fermach przeważa typ gleby piaszczystej, co w okresie wiosenno-letnim wiąże się z dużym zapyleniem powietrza. Z uwagi na wieloletni okres użytkowania, tereny wokół obiektów inwentarskich są silnie zanieczyszczone nawozem końskim. Średnia temperatura powietrza w okresie prowadzenia badań wahała się od 8-12°C w kwietniu do 20-25°C w czerwcu i lipcu. Próbkę gleby pobierano 4-krotnie w odstępach miesięcznych z wierzchniej warstwy (0-5 cm) w ilości około 10 g,

uwzględniając miejsca najczęściej użytkowane przez kłaczki ze źrebkami i źrebki. Jednorazowo w każdej ze stadnin pobierano próbki z 15-20 miejsc.

Badanie hodowlane. Do izolacji drobnoustrojów z próbek gleby wykorzystano selektywne podłoże NANAT, opracowane przez Woolcock i wsp. (11). Badaną próbkę o masie 1,0 g rozcieńczano seryjnie 10-krotnymi objętościami jałowego płynu fizjologicznego i homogenizowano. Trzy kolejne rozcieńczenia (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) w objętości po 100 μ l wysiewano na stałe podłoże selektywne w płytkach Petriego. Posiewy inkubowano w temp. 30°C przez 2-3 dni. Po inkubacji liczono podejrzane kolonie bakteryjne w każdym z rozcieńczeń i określano liczbę drobnoustrojów w 1 g gleby. Do badań identyfikacyjnych przy użyciu metody PCR wybierano od 5-10 podejrzanych kolonii bakteryjnych z każdej próbki. Łącznie badaniu poddano 464 kolonie bakteryjne (tab. 3).

Metoda PCR. Pojedyncze kolonie bakterii, wyselekcjonowane w oparciu o cechy morfologiczne oraz barwienie metodą Grama, namnżano w płynnym podłożu LB w objętości 5,0 ml w hodowli rotacyjnej w temp. 30°C przez 24 godz. Reakcję PCR wykonywano w dwóch wariantach, w celu identyfikacji chromosomalnego DNA kodującego podjednostkę 16S rybosomalnego RNA (rRNA) *R. equi* – do określenia przynależności drobnoustroju do gatunku *R. equi* oraz identyfikacji genu *vapA* w obrębie plazmidowego DNA bakterii, kodującego białko powierzchniowe VapA, determinujące zjadliwość zarazka. Do ekstrakcji DNA wykorzystano metodę z użyciem proteinazy K, lizozymu i detergentu kationowego – CTAB (6). Wyizolowany kwas nukleinowy poddawano amplifikacji z użyciem trzech par starterów, Rq1 i Rq2 oraz Rq for. i Rq rev., komplementarnych do fragmentów DNA kodującego rRNA *R. equi* oraz Vp1 i Vp2, komplementarnych do fragmentu genu *vapA* (tab. 1). Starterów Rq for, Rq rev. oraz Vp1, Vp2 użyto do reakcji PCR-multiplex, służącej do równoczesnego potwierdzenia przynależności gatunkowej oraz wykrywania markera zjadliwości *R. equi*. Reakcję PCR wykonywano zgodnie z procedurą podaną przez Bell i wsp. (1) oraz Sellon i wsp. (6).

Wyniki i omówienie

Średnią koncentrację żywych drobnoustrojów w 1 g gleby wyliczoną dla każdej fermi w poszczególnych miesiącach analizy próbek przedstawiono w tab. 2. We wszystkich fermach największą liczbę drobnoustrojów w glebie stwierdzono w czerwcu i lipcu. Spośród badanych stadnin najwięcej drobnoustrojów wykazano w lipcu w fermie A.

Wyniki identyfikacji gatunkowej bakterii oraz markera zjadliwości przy użyciu metody PCR ilustruje tab. 3. Dane zawarte w tabeli wskazują, że w badanych stadninach odsetek szczepów należących do gatunku *R. equi*, izolowanych z próbek gleby, był zróżnicowany i zależny od okresu pobierania materiału. Największą liczbę bakterii stwierdzono we wszystkich stadninach w czerwcu i lipcu. We wcześniejszych okresach pobierania próbek (kwiecień, maj) odsetek izola-

Tab. 1. Sekwencje starterów reakcji PCR

Nazwa startera	Kierunek (5' → 3')	Sekwencja (5' → 3')	Region	Produkt PCR
Rq1 Rq2	→ ←	GGTCTAATACCGGATATGAGCTCCTGTG CGCAAGCTTGGGGTTGAGCCCAA	16S rRNA	450 pz
Rq for. Rq rev.	→ ←	TCGTCCGTGAAAACTTGGG CGACCACAAGGGGGCCGT	16S rRNA	441 pz
Vp1 Vp2	→ ←	GAGGGATCCGGTTCTCGTAACGCTACAATC TTTGAATTCTACACCCACCTCACACCTT	vap-A	875 pz

tów z gatunku *R. equi* był odpowiednio 4-krotnie i 2,5-krotnie niższy. Analiza wyników badań metodą PCR z użyciem różnych par starterów wykazała, że w stadninach A i B, niezależnie od okresu pobierania próbek, większy odsetek szczepów *R. equi* identyfikowano z użyciem starterów Rq1 i Rq2 w porównaniu do pary Rq for., Rq rev., natomiast w stadninie C stwierdzono zależność odwrotną. Wyniki badań uzyskanych przy wykorzystaniu starterów Vp1 i Vp2, służących do identyfikacji genu *vapA* kodującego białko determinujące zjadliwość *R. equi*, wykazały wyraźną zależność pomiędzy liczbą szczepów zjadliwych w danym środowisku oraz okresem pobierania próbek do badań i typem stadniny (tab. 3). Najwięcej szczepów o genetycznie zaprogramowanej zjadliwości stwier-

Tab. 2. Średnia liczba bakterii w 1 g gleby, wyliczona w oparciu o liczbę kolonii na podłożu NANAT

Miesiąc	Stadnina		
	A	B	C
IV	$2,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
V	$2,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
VI	$4,3 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$
VII	$5,8 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$

Tab. 3. Identyfikacja gatunkowa oraz markera zjadliwości *R. equi* metodą PCR

Miesiąc	Stadnina	Liczba badanych kolonii	Liczba (%) próbek dodatnich		
			Rq 1/2	Rq for/rev	Vp 1/2
IV	A	20	12 (60)	7 (35)	4 (20)
	B	23	5 (21,74)	4 (17,39)	0
	C	22	4 (18,18)	5 (22,72)	0
V	A	25	14 (56)	9 (36)	5 (20)
	B	16	5 (31,25)	4 (25)	3 (18,75)
	C	18	3 (16,66)	6 (33,33)	1 (5,55)
VI	A	42	36 (85,71)	15 (35,71)	7 (16,66)
	B	64	53 (82,81)	40 (62,5)	9 (14,06)
	C	60	18 (30)	45 (75)	2 (3,33)
VII	A	44	36 (81,82)	18 (40,91)	8 (18,18)
	B	68	58 (85,29)	43 (63,23)	11 (16,18)
	C	62	25 (38,46)	52 (83,87)	1 (1,61)

dzono w miesiącach letnich (czerwiec, lipiec) w stadninach A i B, w których rodokokoza występuje enzootycznie. W stadninie C, w której choroba występuje sporadycznie, w poszczególnych okresach badań stwierdzono znacznie mniejszą liczbę szczepów zjadliwych.

Określenie stopnia zanieczyszczenia środowiska hodowlanego zjadliwymi szczepami *R. equi* ma istotne znaczenie dla oceny skali zagrożenia młodych źrebiąt rodokokozą oraz pozwala na podjęcie we właściwym czasie działań, zmierzających do ograniczenia ekspozycji na zakażenie (9, 10). *Rhodococcus equi* zawsze uważany był za mikroorganizm glebowy, ale jego izolacja z próbek pochodzących ze środowiska była znacznie utrudniona z uwagi na zanieczyszczenie badanego materiału konkurencyjną florą bakteryjną i grzybiczą (4). Opracowanie przez Woolcock i wsp. (11) selektywnego podłoża do izolacji *R. equi* z gleby stworzyło podstawy do przeprowadzenia szerzej zakrojonych badań ekologicznych i epidemiologicznych dotyczących tego zarazka oraz umożliwiło wykazanie związku pomiędzy obecnością drobnoustrojów w glebie i przewodzie pokarmowym źrebiąt i koni dorosłych a występowaniem rodokokozy (4, 8, 10). W badaniach tych wykazano, że *R. equi* aktywnie namnaża się w glebie i kale źrebiąt, co umożliwia, zwłaszcza w okresie wiosenno-letnim, szerokie rozprzestrzenienie zarazka w populacji koni i w środowisku hodowlanym. Progresywny wzrost koncentracji żywych drobnoustrojów w glebie w miesiącach letnich, wykazany w badaniach własnych, stanowi potwierdzenie wyników badań ekologicznych uzyskiwanych przez innych autorów. Porównanie wyników badania hodowlanego i metody PCR sugeruje ostrożność w interpretacji wyników posiewów odnośnie do identyfikacji wszystkich kolonii bakteryjnych jako należących do gatunku *R. equi* (tab. 3).

O łatwości namnażania *R. equi* w glebie decyduje podwyższona temperatura zewnętrzna oraz obecność dużej ilości materii organicznej (2). Wcześniejsze badania wykazały, że w stadninach z enzootycznie występującą rodokokozą zanieczyszczenie gleby zjadliwymi szczepami *R. equi* jest zwykle duże, natomiast w fermach, w których choroba występuje sporadycznie lub wcale nie występuje – minimalne (7). Taką zależność jednoznacznie potwierdzają wyniki badań własnych.

Populacja drobnoustrojów glebowych należących do gatunku *R. equi* nie jest jednorodna. Od źrebiąt padłych z objawami zapalenia płuc izolowane są natomiast wyłącznie szczepy o zaprogramowanej genetycznie zjadliwości (2, 7). Wyniki badań izolatów własnych, pochodzących z próbek gleby, na obecność genu *vapA*, warunkującego zjadliwość *R. equi* są zbliżone do uzyskiwanych w badaniach innych autorów (9). Wskazują one także na przydatność metody PCR do wykrywania markera zjadliwości bakterii, co pozwala na ocenę stopnia zanieczyszczenia środowiska hodowlanego

szczepami zjadliwymi oraz narażenia źrebiąt na zakażenie. Dodatkową zaletą techniki PCR jest, w odróżnieniu od standardowych metod analizy profilu plazmidowego i białkowego, prostota i szybkość wykonania, a także niezależność uzyskiwanych wyników od czynników oddziałujących na plazmidy oraz ekspresję białka w komórkach bakteryjnych, jak np. warunki hodowli.

W pojedynczych próbkach gleby, pochodzących z terenu tej samej stadniny, znajdować się mogą różne szczepy tego samego gatunku *R. equi* (4). Analogicznie materiał do badań, pochodzący z ferm zlokalizowanych w różnych regionach geograficznych może zawierać drobnoustroje różniące się między sobą cechami fenotypowymi oraz strukturą materiału genetycznego. Ten fakt tłumaczy stwierdzaną niekiedy rozbieżność wyników badań diagnostycznych uzyskiwanych w różnych laboratoriach oraz przy wykorzystaniu różnych technik badawczych (4). Analiza wyników badań własnych, dotyczących zastosowania metody PCR z użyciem różnych par starterów do identyfikacji DNA kodującego rRNA *R. equi* wskazuje na zróżnicowanie genetyczne szczepów pochodzących ze stadnin A, B i C. Zastosowanie starterów reakcji komplementarnych do różnych fragmentów chromosomalnego DNA zarazka pozwala zatem na identyfikację w badanym materiale większej liczby szczepów należących do gatunku *R. equi* oraz znacznie podnosi wiarygodność wyników. Uzyskane w badaniach własnych wyniki pośrednio wskazują także na możliwość zastosowania pojedynczej reakcji PCR lub PCR-multiplex do typowania molekularnego szczepów *R. equi*.

Piśmiennictwo

- Bell K. S., Philp J. C., Christofi N., Aw D. W.: Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 1996, 23, 72-74.
- Giguere S., Prescott J. F.: Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 313-334.
- Grądzki Z., Ziętek A., Boguta L., Winiarczyk S., Wołoszyn S.: Rodokokoza źrebiąt. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 915-920.
- Martens R. J., Takai S., Cohen N. D., Choffin 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.
- Meijer W. G., Prescott J. F.: *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.* 2004, 35, 383-396.
- 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.
- Takai S.: Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 167-176.
- Takai S., Fujimori T., Katsuzaki K., Tsubaki S.: Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farms. *Vet. Microbiol.* 1987, 14, 233-239.
- 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.
- Takai S., Tsubaki S.: The incidence of *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* in domestic animals and soil. *Jpn J. Vet. Sci.* 1985, 47, 493-496.
- Woolcock J. B., Farmer A. M., Mutimer M. D.: Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 9, 640-642.

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