Praca oryginalna *Original paper*

Właściwości fizjologiczne i zmienność genomowa szczepów Corynebacterium pseudotuberculosis wyizolowanych od kóz w Polsce*)

ILONA STEFAŃSKA, MAGDALENA RZEWUSKA, MARIUSZ NOWICKI*, JAROSŁAW KABA*, MARIAN BINEK

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa
*Zakład Chorób Zakaźnych i Epidemiologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Stefańska I., Rzewuska M., Nowicki M., Kaba J., Binek M.

Physiological properties and genomic diversity of Corynebacterium pseudotuberculosis strain isolates from goats in Poland

Summary

The aim of the present study was the phenotypic and genotypic characterization of Corynebacterium pseudotuberculosis strains isolated from goats with symptoms of caseous lymphadenitis, derived from herds in Poland. Sixty one isolates were studied and their morphology of colonies and cells, biochemical properties, production of phospholipase D were determined. All strains were genotyped by ADSRRS-fingerprinting.

The results of the study showed the significant variability in biochemical and genetic properties of C. pseudotuberculosis strains. Among all isolates, 11 distinct biochemical groups were determined. All strains produced phospholipase D, the main virulence factor of C. pseudotuberculosis, and all but one isolate had no ability to reduce nitrate to nitrite. We also found a variability in the activity of alkaline phosphatase, alfa-glucosidase, pyrazinamidase and fermentation of maltose and sucrose. Genotyping of strains showed 10 distinct genome patterns consisting of 11 to 20 bands between approximately 1400-100 bp. The obtained results indicate that ADSRRS-fingerprinting technique could be a useful tool for the screening of genome differentiation and establishing relationships between clinical isolates of C. pseudotuberculosis.

Keywords: Corynebacterium pseudotuberculosis, caseous lymphadenitis, ADSRRS-fingerprinting

Corynebacterium pseudotuberculosis jest Gram-dodatnią, nieregularną i mikroaerofilną pałeczką. Jest jednym z ważniejszych maczugowców chorobotwórczych dla zwierząt (15). Liczne dane piśmiennictwa wskazują, że zakażenia tym drobnoustrojem od wielu lat stanowią poważny problem w chowie i hodowli zwierząt w wielu krajach na świecie i w Polsce (6, 9, 11, 12, 14). *Corynebacterium pseudotuberculosis* jest czynnikiem etiologicznym serowaciejącego zapalenia węzłów chłonnych u kóz i owiec, jednej z ważniejszych chorób bakteryjnych małych przeżuwaczy. Choroba rzadko kończy się śmiercią, jest jednak przyczyną poważnych strat ekonomicznych. Prowadzi m.in. do spadku kondycji zwierząt, obniżenia przyrostów, spadku masy ciała i wydajności mlecznej, a także produkcji wełny u owiec (9, 12). Antybiotykoterapia zakażeń jest mało skuteczna z uwagi na tworzenie się otorbionych ropni, do których przenikanie antybiotyków jest utrudnione (13).

*) Badanie wykonane w ramach projektu badawczego KBN nr: N308 037 31/0522 oraz grantu SGGW nr: 504-02340019.

Celem badań było określenie fenotypu i genotypu szczepów *C. pseudotuberculosis* wyizolowanych od kóz z objawami klinicznymi serowaciejącego zapalenia węzłów chłonnych.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań wykorzystano 61 szczepów *C. pseudotuberculosis*, wyizolowanych z ropni węzłów chłonnych u kóz pochodzących z 20 stad zlokalizowanych na obszarze całego kraju, będących pod oceną użytkowości oraz szczep referencyjny *C. pseudotuberculosis* ATTC 43927 (LGC Promochem).

Badanie właściwości fenotypowych izolatów *C. pseudotuberculosis* obejmowało określenie cech wzrostu, morfologii komórek w preparatach barwionych metodą Grama, oznaczenie właściwości biochemicznych, w tym zdolności do produkcji fosfolipazy D (PLD). Cechy wzrostu *C. pseudotuberculosis* określano na podłożu agarowym wzbogaconym (Biomed) z dodatkiem 5% krwi baraniej (AK), po 48-godzinnej inkubacji w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych. Do charakterystyki biochemicznej wykorzystano test API

Coryne, wykonany zgodnie z procedurą podaną przez producenta (BioMérieux). Wytwarzanie PLD wykrywano w teście CAMP. W teście wykorzystano szczep *Staphylococcus aureus* wytwarzający beta toksynę oraz szczep *Rhodococcus equi*. Wyniki odczytywano po 24 i 48 godzinach inkubacji w 37°C.

Analiza genomowa. Genomowy DNA izolowano z komórek *C. pseudotuberculosis* przy pomocy zestawu Genomic Mini AX BACTERIA (A&A Biotechnology). W celu rozbicia ściany komórkowej bakterii, komórki preinkubowano w roztworze lizozymu (10 mg/ml; Sigma) w 37°C przez 16 godzin. Dalsze etapy izolacji przebiegały zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Do genotypowania szczepów wykorzystano technikę ADSRRS-fingerprinting (Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites) według Krawczyk i wsp. (8). DNA genomowy poszczególnych szczepów trawiono 2 enzymami restrykcyjnymi – NotI (5 U) i BglII (5 U). Reakcja trawienia przebiegała w 37°C przez 16 godzin, a następnie uzyskany DNA oczyszczano z mieszaniny enzymów restrykcyjnych poprzez precypitację w obecności izopropanolu. Otrzymane produkty trawienia enzymatycznego poddawano reakcji ligacji z odpowiednio zaprojektowanymi adaptorami, składającymi się z dwóch oligonukleotydów: adaptora krótkiego dla enzymu NotI:

5'-GGCCGTCGACGTT-3'

3'-CAGCTGCAACCACCTACTTCC-5'

i adaptora długiego dla enzymu BglII:

5'-GATCCGTCGACAACGGCGTTCCT TCGTCTACCATCC-3'

3'-GCAGCTGTTGCCGCAAGGAAGCAGATGGTAGG-5'

DNA po precypitacji rozpuszczano w 20 µl mieszaniny zawierającej: 2 µl buforu do ligacji, po 20 pM każdego z adaptorów, 1 µl T4 DNA ligazy (MBI Fermentas) i wodę do objętości 20 µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 16°C przez 16 godzin. Produkty reakcji precypitowano izopropanolem, DNA rozpuszczano w 20 µl buforu TE, a następnie przeprowadzano reakcję amplifikacji. Mieszanina reakcyjna składała się z 2,5 µl buforu dla polimerazy DNA (10 ×), 5 µl dNTP Mix (2 mM; MBI Fermentas), 2 µl $MgCl_2$ (50 mM), 50 pM każdego ze starterów (5'-GGATGGTAGACGAAGGAACGC-3' i 5'-CCTTCATCCACCAACGTCGAC-3') (IBB PAN), 3 µl produktów reakcji ligacji, 1 U Pwo DNA polimerazy (DNA Gdańsk II) oraz wody do objętości 25 µl. Reakcję przeprowadzano w warunkach opisanych przez Krawczyk i wsp. (8). Rozdział produktów PCR prowadzono metodą elektroforezy w 8% żelu poliakryloamidowym (Serva), w buforze TAE przy napięciu 110 V. Po elektroforezie żel wybarwiano w roztworze bromku etydyny (0,5 µg/ml, Sigma). Analizę porównawczą otrzymanych profili elektroforetycznych przeprowadzono przy pomocy programu Quantity One (VersaDoc; Bio-Rad).

Wyniki i omówienie

Badane szczepy *C. pseudotuberculosis* na podłożu AK po 48-godzinnej inkubacji tworzyły drobne kolonie (ok. 0,5-1,5 mm średnicy), okrągłe, wypukłe, nieprzejrzyste, matowe, skórzaste, o nieregularnym brzegu i białym zabarwieniu. Duża zawartość związków lipidowych w ścianie komórkowej bakterii powodowała woskowy wygląd kolonii oraz łatwe przesuwanie ich po powierzchni podłoży stałych (15). Wokół kolonii widoczna była wąska strefa hemolizy typu beta, jako przejaw aktywności wytwarzanej przez *C. pseudotuberculosis* PLD (1). Po dłuższej inkubacji (powyżej 72 godzin) kolonie przyjmowały zabarwienie jasnożółte, kremowe i stawały się suche, rozpadając się pod dotknięciem ezy. Po przesunięciu kolonii widoczne były gołym okiem, niewielkie wgłębienia w podłożu, będące skutkiem aktywności proteolitycznej drobnoustrojów.

W preparatach mikroskopowych stwierdzano Gram-dodatnie, drobne pałeczki, wykazujące często znaczny polimorfizm (formy maczugowate lub ziarenkowate). Komórki w preparacie mikroskopowym tworzyły zwykle skupiska, układając się w charakterystyczny sposób przypominający pismo klinowe. Zaobserwowano także, że w starszych hodowlach lub po wielokrotnym pasażowaniu komórki *C. pseudotuberculosis* ulegały silnemu skróceniu, tworząc formy ziarniakowate.

Przeprowadzone badania biochemiczne wykazały duże zróżnicowanie szczepów *C. pseudotuberculosis* wyizolowanych od kóz w Polsce i potwierdziły sygnalizowaną przez innych badaczy zmienność fenotypową tych drobnoustrojów (7, 14). Wszystkie szczepy fermentowały glukozę i rybozę z wytworzeniem kwasu, natomiast zdolność do wykorzystania maltozy stwierdzono u 43 szczepów (70%). U dwóch izolatów (3%) wykryto także zdolność do fermentowania sacharozy. Wyniki testów na fermentację pozostałych cukrów – ksylozy, mannozy, laktozy i glikogenu, były ujemne. Wszystkie izolaty charakteryzowały się aktywnością katalazy i ureazy oraz nie hydrolizowały eskuliny i żelatyny. Badane szczepy wykazywały zmienną aktywność trzech enzymów: fosfatazy alkalicznej, α-glukozydazy oraz pirazynoamidazy. Ostatni enzym wykryto tylko u jednego szczepu, co potwierdza bardzo rzadkie wytwarzanie tego enzymu przez *C. pseudotuberculosis*. Aktywność enzymatyczną fosfatazy alkalicznej wykryto u 33 izolatów (54%), reakcja ta była jednak w większości przypadków słaba. Natomiast α-glukozydazę wytwarzały 44 szczepy (72%). U żadnego z izolatów nie stwierdzono reakcji dodatniej w próbach na obecność arylamidazy pirolidonylowej, β-galaktozydazy, β-glukuronidazy oraz N-acetylo-β-glukozaminidazy. W przypadku jednego izolatu stwierdzono jego zdolność redukcji azotanów do azotynów. W 1989 r. Biberstein i wsp. na podstawie tej właściwości wyróżnili w obrębie gatunku *C. pseudotuberculosis* dwa biotypy. Uznano, że szczepy, które są izolowane od małych przeżuwaczy, nie redukują azotanów, należą do biotypu *ovis*, natomiast szczepy izolowane od koni i bydła cechuje reakcja dodatnia i należą one do biotypu *equi* (2). Badanie szczepów należących do różnych biotypów, z wykorzystaniem technik biologii molekularnej, jak REA, RFLP i PFGE, potwierdziło istnienie pomiędzy nimi różnic nie tylko fenotypowych, ale także genotypowych (4, 14, 16). Dotychczas nie wyjaśniono, czy może do-

chodzić do transmisji *C. pseudotuberculosis* biotypu *equi* do kóz i owiec oraz do koni biotypu *ovis* (3).

Na podstawie badań własnych wyodrębniono wśród poddanych analizie 61 szczepów 11 grup różniących się biochemicznie (tab. 1). Sześć grup obejmuje więcej niż jeden szczep (od 2 do 15), podczas gdy pięć pozostałych grup reprezentowanych jest przez pojedyncze izolaty *C. pseudotuberculosis*.

Tab. 1. Grupy biochemiczne wyznaczone dla 61 izolatów *C. pseudotuberculosis*

Właściwości	Grupa biochemiczna(liczba szczepów)										
	A (15)	B (13)	C (11)	D (11)	E (4)	F (2)	G (1)	H (1)	I (1)	J (1)	K (1)
Redukcja azotanów	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Pirazynoamidaza	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Fosfataza alkaliczna	–	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+
Alfa-glukozydaza	+	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+
Maltoza*	+	+	–	+	–	–	+	+	–	+	+
Sacharoza*	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–

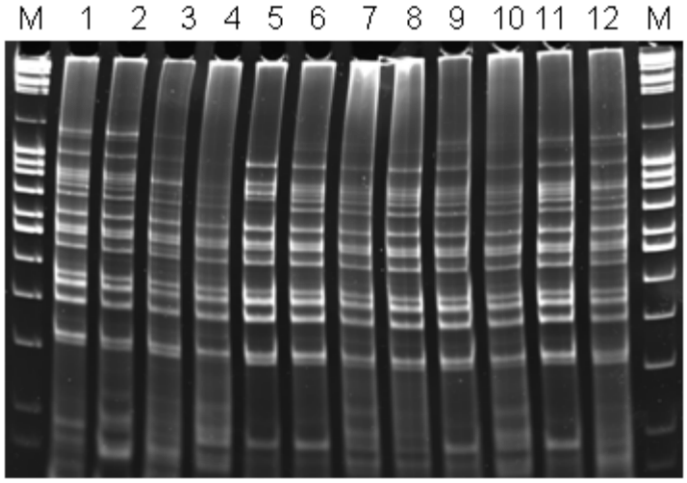
Objaśnienie: * – fermentacja

Za jeden z głównych czynników determinujących zjadliwość szczepów *C. pseudotuberculosis* i odgrywających bardzo ważną rolę w mechanizmie chorobotwórczości tych pałeczek, uważa się enzym o aktywności hemolitycznej – fosfolipazę D (1, 15). W teście CAMP z użyciem beta-toksycznego szczepu *S. aureus* wszystkie badane szczepy *C. pseudotuberculosis* powodowały zahamowanie aktywności hemolitycznej gronkowca. Pod wpływem PLD sfingomielina, obecna w błonie komórkowej erytrocytów ssaków, hydrolizowana zostaje do fosforanu ceramidu, który nie jest wykorzystywany jako substrat dla gronkowcowej fosfolipazy C (PLC) (1, 15). Natomiast w teście CAMP, w którym użyto szczepu *R. equi* uzyskano efekt nasilenia hemolizy przez wszystkie izolaty *C. pseudotuberculosis*, PLD oraz wytwarzana przez *R. equi* PLC działają sekwencyjnie. Pochodzący z rozpadu sfingomieliny fosforan ceramidu jest substratem dla wytwarzanej przez szczepy *R. equi* PLC. W efekcie dochodzi do całkowitej degradacji sfingomieliny oraz uszkodzenia błony komórkowej erytrocytów i ich lizy (1). Wyniki testu CAMP, a także obecność wąskiej strefy hemolizy pojawiającej się wokół kolonii każdego z izolatów wskazują, że wszystkie wytwarzają PLD.

W wyniku genotypowania 62 szczepów *C. pseudotuberculosis* (61 izolatów oraz szczep referencyjny) metodą ADSRRS-fingerprinting otrzymano złożone wzory amplifikacyjne, na które składało się od 11 do 20 prążków DNA o zróżnicowanej wielkości, od około 1400 do 100 pz (ryc. 1). Dziewięć fragmentów jednakowej wielkości stwierdzono u wszystkich szczepów. Analiza uzyskanych wyników umożliwiła wyróżnienie wśród badanych szczepów *C. pseudotuberculosis* 10 odmiennych profili genotypowych, oznaczonych od I do X. Największą liczbę szczepów zaliczono do genotypu I (38 izolatów). U 5 szczepów stwierdzono wzory unikatowe (genotypy VI-X). Pozostałe genotypy obejmowały odpowiednio 8 (II), 5 (III), 4 (IV) i 2 (V) izolaty.

Szczepy izolowane od kóz z tego samego stada nie zawsze cechowały się identycznym profilem ADSRRS. Natomiast w przypadku niektórych szczepów izolowanych od zwierząt pochodzących z różnych stad, z różnych regionów kraju, wykazano przynależność do tego samego genotypu. Interesujące wyniki uzyskano dla dwóch badanych szczepów, które zostały wyizolowane od tego samego zwierzęcia – jeden z ropnia węzła chłonnego przyuszniczego, a drugi z ropnia węzła chłonnego przedłopatkowego. Szczepy te cechują różne właściwości fenotypowe i genotypowe. Pierwszy izolat wytwarzał fosfatazę alkaliczną i nie fermentował maltozy, drugi natomiast wykazywał zdolność do fermentacji maltozy, ale nie wytwarzał fosfatazy alkalicznej. Na tej podstawie badane izolaty zostały zakwalifikowane odpowiednio do grupy biochemicznej E i A. Dla obu szczepów uzyskano także odrębne wzory amplifikacyjne, charakterystyczne odpowiednio dla VIII i II profilu genomowego.

Dotychczas nie opisano przypadku izolacji od małych przeżuwaczy szczepu *C. pseudotuberculosis*, który wykazywałby zdolność do redukcji azotanów. Costa i wsp. (5) wyizolowali szczep *C. pseudotuberculosis* od konia, który nie wytwarzał reduktazy azotanowej. Jednakże rybotypowanie tego izolatu wykazało podobieństwo do innych szczepów biotypu *equi*, redukujących azotany. Mimo fenotypowych właściwości charakterystycznych dla szczepów biotypu *ovis*, genotypowo ten szczep różnił się od pozostałych. Wyizolowany w prezentowanych badaniach szczep wytwarzający reduktazę azotanową został zaliczony do profilu



Fot. 1. Profile ADSRRS uzyskane dla 12 izolatów (ścieżki 1-12). Ścieżka M – wzorzec masowy DNA MassRuler DNA Ladder, Mix (MBI Fermentas)

genomowego ADSRRS I, który stwierdzono u przeważającej liczby badanych izolatów nie redukujących azotanów. Wydaje się zatem, że zdolność szczepów do redukcji azotanów nie zawsze pozwala na jednoznaczne określenie ich przynależności do biotypu.

Szczep referencyjny *C. pseudotuberculosis* wykazywał właściwości fenotypowe charakterystyczne dla grupy biochemicznej A oraz profil genotypu I, identycznego z tym, który stwierdzono u większości krajowych izolatów.

Dotychczas do badań genotypowych *C. pseudotuberculosis* wykorzystywane były takie techniki, jak: REA, RFLP, PFGE oraz RAPD. W wyniku analizy restrykcyjnej szczepów *C. pseudotuberculosis* nie wykazano polimorfizmu DNA u izolatów należących do tego samego biotypu (14). Dopiero technika RFLP pozwoliła na wykrycie niewielkich różnic wśród szczepów zaliczanych do jednego biotypu (16). Znacznie bardziej przydatne w dochodzeniu epidemiologicznym, do typowania i oceny pokrewieństwa klinicznych izolatów *C. pseudotuberculosis*, okazały się metody PFGE oraz RAPD. Wykorzystując pierwszą z nich, wśród 47 szczepów izolowanych od małych przeżuwaczy, stwierdzono 5 różnych wzorów restrykcyjnych (4). PFGE jest uznawana obecnie za najbardziej miarodajną technikę genotypowania drobnoustrojów. Jednakże jest bardzo kosztowna, wymaga specjalistycznej aparatury oraz dużego doświadczenia badawczego. Porównywalnie czuła, a jednocześnie szybsza i mniej kosztowna jest metoda RAPD. Genotypowanie tą techniką 48 szczepów *C. pseudotuberculosis* izolowanych od koni, pozwoliło na wyróżnienie 8 odmiennych profili amplifikacyjnych (6). Dużą wadą metody RAPD jest niska odtwarzalność wyników, zwłaszcza w skali międzylaboratoryjnej.

ADSRRS-fingerprinting jest nową metodą genotypowania, wykorzystywaną w epidemiologii (8, 10), która nie była dotychczas stosowana do oceny zmienności genetycznej wśród szczepów *C. pseudotuberculosis*. Wyniki badań potwierdzają jej duży potencjał dyskryminacyjny oraz przydatność do różnicowania genomowego izolatów klinicznych *C. pseudotuberculosis* pochodzących od kóz.

Porównanie cech fenotypowych i genotypowych 61 szczepów *C. pseudotuberculosis*, wyizolowanych od kóz, nie wykazało żadnych istotnych korelacji pomiędzy genotypem izolatów a ich profilem biochemicznym. W tej samej grupie genotypowej stwierdzono szczepy *C. pseudotuberculosis*, należące do różnych genotypów. Badanie cech biochemicznych pozwoliło na zaszeregowanie wszystkich izolatów do 11 grup o odmiennych profilach aktywności enzymatycznej. Natomiast badania na poziomie molekularnym, z wykorzystaniem techniki ADSRRS-fingerprinting, doprowadziły do wyodrębnienia 10 profili genomowych.

Cechy fenotypowe bakterii, w tym wytwarzanie określonych enzymów oraz ich aktywność, są znacznie mniej stabilne niż cechy genotypowe i mogą ulegać znacznym zmianom pod wpływem warunków środowiska. W środowisku laboratoryjnym, poza organizmem gospodarza, może dochodzić np. do zahamowania ekspresji pewnych genów, co uwidacznia się w fenotypie. Cechy genotypowe są znacznie bardziej stabilne i nie podlegają tak dużym wpływom warunków środowiska jak cechy fenotypowe. Dotychczas na temat zmienności genomowej *C. pseudotuberculosis* wiadomo niewiele.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują na występowanie różnych fenotypowo i genotypowo, ale w każdym przypadku zjadliwych, szczepów *Corynebacterium pseudotuberculosis* u kóz w Polsce. Czynniki przyczynowe stwierdzonej zmienności są słabo poznane. Uzyskane wyniki mogą być pomocne w badaniach epidemiologicznych i umożliwią skuteczne monitorowanie zmienności genomowej izolowanych od zwierząt szczepów *C. pseudotuberculosis*.

Piśmiennictwo

1. *Bernheimer A., Linder R., Avigad L. S.*: Stepwise degradation of membrane sphingomyelin by corynebacterial phospholipases. Infect. Immun. 1980, 29, 123--131.
2. *Biberstein E. L., Knight H. D., Jang S.*: Two biotypes of Corynebacterium pseudotuberculosis. Vet. Rec. 1971, 89, 691-692.
3. *Brown C. C., Olander H. J., Biberstein E. L., Moreno D.*: Serologic response and lesions in goats experimentally infected with Corynebacterium pseudotuberculosis of caprine and equine origins. Am. J. Vet. Res. 1985, 46, 2322-2326.
4. *Connor K. M., Quirie M. M., Baird G., Donachie W.*: Characterization of United Kingdom isolates of Corynebacterium pseudotuberculosis using pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 2633-2637.
5. *Costa L. R. R., Spier S. J., Hirsh D. C.*: Comparative molecular characterization of Corynebacterium pseudotuberculosis of different origin. Vet. Microbiol. 1998, 62, 135-143.
6. *Foley J. E., Spier S. J., Mihalyi J., Drazenovich N., Leutenegger C. M.*: Molecular epidemiologic features of Corynebacterium pseudotuberculosis isolated from horses. Am. J. Vet. Res. 2004, 65, 1734-1737.
7. *Hommez J., Devriese L. A., Vaneechoutte M., Riegel P., Butaye P., Haesebrouck F.*: Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 954-957.
8. *Krawczyk B., Lewandowski K., Bronk M., Samet A., Myjak P., Kur J.*: Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. J. Microbiol. Methods 2003, 52, 341--351.
9. *Lloyd S., Lindsay H. J., Slater J. D., Jackson P. G. G.*: Corynebacterium pseudotuberculosis infection (caseous lymphadenitis) in goats. Goat Vet. Soc. J. 1990, 11, 55-62.
10. *Masny A., Płucienniczak A.*: Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. Biotechniques 2001, 31, 930-934.
11. *Nowicki M., Stefańska I., Szaluś O., Kaba J., Rzewuska M.*: Występowanie zakażeń Corynebacterium pseudotuberculosis u kóz w Polsce. Sympozjum „Zoonozy – aktualne zagrożenia". Wydział Medycyny Wet. SGGW, Warszawa 2006, s. 70.
12. *Rizvi S., Green L. E., Glover M. J.*: Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern. Vet. Rec. 1997, 140, 586-587.
13. *Rzewuska M., Kaba J., Nowicki M., Stefańska I., Frymus T., Binek M.*: Susceptibility of Corynebacterium pseudotuberculosis strains isolated from goats in Poland. Annual Symposium „Novelties in Pathology and Breeding of Domestic Animals", Faculty of Veterinary Medicine Cluj-Napoca 2003, 307-309.
14. *Songer J. G., Bechenbach K., Marshall M. M., Olsen G. B., Kelley L.*: Biochemical and genetic characterization of Corynebacterium pseudotuberculosis. Am. J. Vet. Res. 1988, 49, 223-226.
15. *Stefańska I., Rzewuska M., Binek M.*: Corynebacterium pseudotuberculosis – zakażenia u zwierząt. Post. Mikrobiol. 2007, 46 (2), 101-112.
16. *Sutherland S. S., Hart R. A., Buller N. B.*: Genetic differences between nitrate--negative and nitrate-positive Corynebacterium pseudotuberculosis strains using restriction fragment length polymorphisms. Vet. Microbiol. 1996, 49, 1-9.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Binek, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marian_binek@sggw.pl