

Wykrywanie *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica* – czynników etiologicznych zakaźnego zanikowego zapalenia nosa świń przy pomocy testów PCR*)

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, KATARZYNA STĘPNIEWSKA, ZYGMUNT PEJSAK

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

Markowska-Daniel I., Stępniewska K., Pejsak Z.

Detection of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* – etiological agents of atrophic rhinitis, by means of PCR tests

Summary

Dermonecrotogenic (DNT) strains of *Pasteurella multocida* (Pm) and *Bordetella bronchiseptica* (Bbr), etiological agents of atrophic rhinitis (AR) of swine, are usually detected by conventional microbiological methods. Currently the main tasks in the diagnosis of infectious diseases is to detect the specific genes of pathogens directly from clinical samples within the shortest possible period of time by using sufficiently specific and sensitive methods.

In this study two PCR tests were developed for the detection of genes encoding DNT in Pm and Bbr directly in nasal swabs. They were used for examining 481 nasal swabs collected from pigs raised in 56 farms, suspected of AR or displaying clinical symptoms of PAR. Additionally, the usefulness of PCR in the routine diagnosis of AR was compared with standard microbiological and serological methods. DNT+ Pm were directly evidenced in 74 samples (15.4%) from 27 tested herds (48.2%) while DNT+ Bbr were detected in 196 swabs (40.7%) from 41 farms (73.2%). Using the standard microbiological examination, the presence of bacterial cultures of the morphology typical of Pm was observed in 114 tested samples (23.7%) and those typical of Bbr, in 156 samples (32.45%). In the PCR test performed to confirm the presence of the DNT-encoding gene in Pm isolates, positive results were obtained in 26 samples (22.8%), while among isolated Bbr strains, 95 out of 156 (60.1%) possessed the gene encoding DNT. In the ELISA test, 22 out of 26 isolates (84.6%) were DNT+. In the case of DNT- isolates of PM, the results of ELISA were in full agreement with PCR results. In total, PAR was detected in 27 farms (48.2%), NPAR in 21 farms (37.5%), and 8 farms (14.8%) were diagnosed as free from AR since no positive results were obtained by either method.

Summarizing, the results of serological, bacteriological and molecular examinations clearly demonstrated the usefulness of PCR in the routine diagnosis of AR directly from clinical material.

Keywords: swine, AR, dermonecrotogen, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, PCR

Zakaźne zanikowe zapalenie nosa (zzzn) może występować w dwóch postaciach: jako progresywne zapalenie nosa (PAR), wywoływane przez szczepy *Pasteurella multocida* (Pm) wytwarzające dermonekrotoksynę (DNT), przy współudziale dermonekrotoksycznych szczepów *Bordetella bronchiseptica* (DNT+ Bbr), lub jako nieprogresywne zapalenie nosa, którego czynnikiem etiologicznym są szczepy DNT+ Bbr (9). Wśród najważniejszych objawów klinicznych PAR wymienia się: kichanie, śluzowo-ropny lub krwi-

sty wypływ z nosa, deformacje kości trzewioczaszki oraz upośledzenie drożności przewodów łzowych. Chorobie często towarzyszy zapalenie płuc, wynikające z zaniku małżowin nosowych i oddychania nieogrzzanym i nieoczyszczonym powietrzem, co sprzyja wnikaniu innych patogenów do dolnych dróg oddechowych (4, 15, 17). Należy zaznaczyć, że zmiany obserwowane w przebiegu PAR mają charakter nieodwracalny, natomiast objawy będące konsekwencją zakażenia świń Bbr mogą ulec cofnięciu.

Wystąpienie PAR w stadzie jest przyczyną poważnych strat ekonomicznych związanych z wydłużeniem

*) Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy nr NN 308 3228 33.

czasu tuczu (nawet do 14 dni), spadkiem masy ciała (m.c.) od 20% do 30% oraz wzrostem zużycia paszy na kg przyrostu m.c. (15). Z wymienionych powodów szybka i prawidłowa identyfikacja patogenów odpowiedzialnych za wywoływanie zzzn, będąca podstawą zwalczania choroby, jest istotna. W rozpoznawaniu choroby przydatne są różne badania. Obecnie do identyfikacji Pm oraz Bbr najczęściej stosowane są klasyczne metody mikrobiologiczne oraz testy serologiczne. Wyizolowane na podłożach bakteriologicznych kolonie, na podstawie ich morfologii, klasyfikowane są wstępnie do gatunku, a następnie poddawane identyfikacji przy użyciu szybkich testów biochemicznych. Badanie bakteriologiczne, pomimo długiego czasu niezbędnego do uzyskania wyniku, nadal uważane jest za „złoty standard” w diagnostyce wielu chorób, w tym PAR (2).

W rozpoznawaniu PAR wykorzystuje się również metodę ELISA (1, 3, 10). Ma ona zastosowanie wyłącznie do badania szczepów Pm. Surowice pochodzące od świń podejrzanych o PAR analizowane są w kierunku obecności przeciwciał przeciwko antygenowi DNT Pm. Za pomocą tego testu możliwe jest również wykrycie obecności antygeny DNT Pm w czystej kulturze bakteryjnej.

Metody: bakteriologiczna, biochemiczna oraz serologiczna umożliwiają identyfikację patogenów chorobotwórczych wyizolowanych od żywych zwierząt. W celu stwierdzenia PAR poubojowo stosowane jest badanie morfometryczne, polegające na pomiarze stopnia zaniku małżowin nosowych, przy zastosowaniu pięciostopniowej skali według Done (6). Warto pamiętać, że stwierdzenie zmian klinicznych choroby u 3-5% świń wskazuje, że zmiany morfometryczne w obrębie małżowin nosowych mogą występować aż u około 50-70% zwierząt w chlewni dotkniętej PAR.

Obecnie w diagnostyce chorób zakaźnych coraz bardziej powszechnie stosowane są techniki biologii molekularnej. Umożliwiają one szybkie, precyzyjne oraz bezpośrednie badanie materiału klinicznego, z pominięciem etapu hodowli bakterii (7, 13). W Zakładzie Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zostały opracowane testy PCR do identyfikacji genów kodujących DNT Pm oraz Bbr bezpośrednio w wymazach z nosa świń oraz w kulturze bakteryjnej.

Celem pracy jest przedstawienie wyników rutynowych badań diagnostycznych stad świń w kierunku zzzn uzyskanych przy pomocy opracowanych testów oraz ich porównanie do dotychczas stosowanych konwencjonalnych metod laboratoryjnych (badanie hodowlane, badanie serologiczne).

Materiał i metody

Materiał biologiczny. Próbkę do badań stanowiły wymazy z nosa pobrane od 481 świń odchowanych w 56 krajowych fermach trzody chlewnej. Dwadzieścia dziewięć



Ryc. 1. Objawy kliniczne PAR – deformacja trzewioczaszki i niedrożność przewodów łzowych, stwierdzone w jednej z objętych badaniem ferm

chlewni (51,78%) było podejrzanych o występowanie zzzn, w 22 gospodarstwach (39,29%) obserwowano objawy kliniczne PAR (ryc. 1), w 5 fermach (8,93%) nie stwierdzano objawów choroby, a status zdrowotny w omawianym zakresie nie był znany. Wymazy pobrano z gospodarstw zlokalizowanych na obszarze województw: lubelskiego, kujawsko-pomorskiego, mazowieckiego, łódzkiego i wielkopolskiego.

Pobrany materiał poddawano równolegle badaniu mikrobiologicznemu i molekularnemu.

Badanie bakteriologiczne. Wymazy posiewano równolegle na dwa podłoża: agar odżywczy z dodatkiem 5% krwi końskiej w celu izolacji bakterii z gatunku Pm i Bbr oraz na podłoże G20G zawierające w swym składzie błękit bromotymolowy oraz antybiotyki (penicylinę krystaliczną 10 mg/ml, nitrofurantoinę 10 mg/ml, gentamycynę 10 mg/ml oraz nystatynę 10 mg/ml) w celu izolacji Bbr. Wysiany materiał inkubowano, odpowiednio, w 37°C przez 24 godz. w atmosferze 7,5% CO₂ w przypadku agaru z krwią lub przez 48-96 godz. bez dostępu CO₂, w przypadku płytek z podłożem G20G.

Po inkubacji kolonie bakteryjne o morfologii typowej dla Pm lub Bbr poddawano analizie profilu biochemicznego przy użyciu testów Api 32E (BioMerieux), w celu ich identyfikacji, a w dalszej kolejności badaniu testami PCR, w celu stwierdzenia obecności genów kodujących DNT.

Ekstrakcja DNA. DNA ekstrahowano bezpośrednio z wymazów z nosa, jak również z czystej kultury bakteryjnej Pm oraz Bbr, wykorzystując zestaw Genomic DNA Prep Plus – izolacja z czystej kultury bakteryjnej, zgodnie z protokołem producenta zestawu (A&A Biotechnology, Gdańsk). W przypadku izolacji materiału genetycznego bezpośrednio z wymazów w początkowym etapie procesu zastosowano modyfikację własną, polegającą na zalaniu wymazówek 1 ml płynu fizjologicznego, intensywnym wstrząsaniu zawiesiny i jej odwirowaniu (5 min., 13 000 rpm, temperatura pokojowa). Po odwirowaniu supernatant usuwano, a peletki traktowano zgodnie z protokołem przeznaczonym dla tkanki świeżej. Wyekstrahowane DNA wykorzystywano bezpośrednio do jego amplifikacji w testach PCR bądź przechowywano w -80°C do dalszych badań.

Tab. 1. Sekwencja starterów amplifikujących geny kodujące dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica*

Nazwa gatunku	Nazwa startera	Sekwencja	Oczekiwana wielkość produktu PCR
<i>P. multocida</i>	ToxA6	5'-TGC TCA AAT CCT AAA TCA CCT-3'	501 pz
	ToxA7	5'-ACT ACA GAT TCC TAA CAA AGG-3'	
<i>B. bronchiseptica</i>	dntF	5'-GCG GTA CTT GGG ATA ATA GA-3'	224 pz
	dntR	5'-ATA AAG ATG AAT CGG CAT TG-3'	

Tab. 2. Warunki amplifikacji w testach PCR dla genów kodujących dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica*

Etapy reakcji PCR	Temperatura (°C)	Czas	Liczba cykli
1. Wstępna denaturacja dsDNA	95	10 min.	1
2. Denaturacja	94	30 s	40 – Pm
3. Przyłączanie starterów	56	30 s	
4. Synteza nici DNA	72	30 s – Pm 20 s – Bbr	45 – Bbr
5. Końcowe wydłużanie nici DNA	72	7 min.	1

Testy PCR. DNA izolowane bezpośrednio z wymazów oraz z czystych kultur bakteryjnych badano w kierunku obecności genów kodujących DNT u Pm oraz Bbr, przy pomocy opracowanych testów PCR (12, 18). Do amplifikacji fragmentu genu DNT Pm zastosowano parę starterów ToxA6, ToxA7, zaprojektowanych przez Register i wsp. (16). Użyte stężenie starterów wynosiło 1,4 μ M. Powielały one fragment o wielkości 501 pz. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziła H₂O wolna od RNaz i DNaz (Qia-gen), 10 \times PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, Roche), 10 mM dNTPs (Fermentas), MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems, Roche) oraz polimeraza AmpliTaq Gold 5 U/ μ l (Applied Biosystems, Roche).

Do amplifikacji genu kodującego DNT w szczepach Bbr zastosowano startery dntF i dntR, które zostały zaprojektowane w ramach badań własnych, na podstawie sekwencji genu DNT Bbr umieszczonej w GeneBanku. Do tego celu wykorzystano program do projektowania starterów pakietu LaserGene. Oczekiwana wielkość amplifikowanego produktu wynosiła 224 pz. Zoptymalizowana koncentracja starterów wynosiła 1,2 μ M/reakcję. Skład mieszaniny reakcyjnej był analogiczny jak w przypadku testu do amplifikacji DNT w szczepach Pm.

Sekwencje użytych starterów przedstawiono w tab. 1, a warunki reakcji PCR w tab. 2.

Badanie serologiczne. Wszystkie szczepy Pm, które wyrosły na podłożu agarowym z dodatkiem 5% krwi końskiej i posiadały gen odpowiedzialny za produkcję DNT, co potwierdzano testem PCR, poddano badaniu testem ELISA (Oxoid) do wykrywania antygenu DNT w czystej kulturze bakteryjnej, zgodnie z protokołem polecanym przez producenta zestawu.

W celu weryfikacji ujemnych wyników uzyskanych badaniem molekularnym testem ELISA przebadano 50 losowo wybranych izolatów Pm DNT–.

Wyniki i omówienie

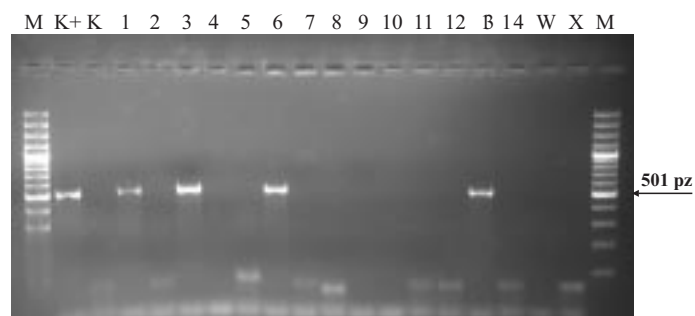
Szczegółowe wyniki badań własnych przedstawiono na ryc. 2 i 3 oraz w tab. 3.

Ogółem testami PCR przebadano 751 próbek DNA, z czego 481 próbek stanowiło DNA wyekstrahowane bezpośrednio z wymazów z nosa, 114 – DNA wyizolowane z hodowli izolatów Pm oraz 156 – materiał genetyczny wyekstrahowany z hodowli komórek Bbr.

Podczas bezpośredniego badania wymazów wynik dodatni dla genu kodującego DNT Pm stwierdzono w 74 próbkach, co stanowiło 15,4% przebadanych wymazów. Dodatkowo wyniki w teście PCR dla DNT Bbr uzyskano w przypadku 196 wymazów (40,7% ogółu analizowanych próbek).

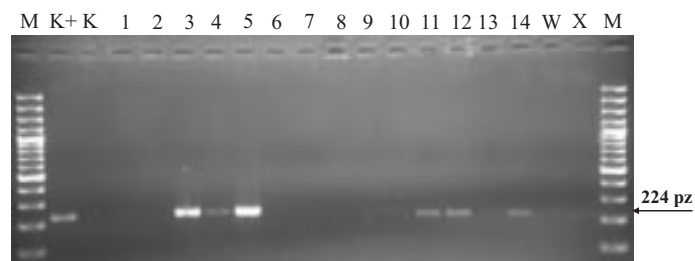
Obecność materiału genetycznego DNT+ Pm stwierdzono w 27 fermach (48,2%), natomiast materiał genetyczny DNT Bbr wykryto w 41 fermach (73,2%). Należy zaznaczyć, że wynik dodatni wyłącznie przy pomocy testu PCR wykonanego bezpośrednio z wymazów uzyskano w 18 gospodarstwach (32,1%) w odniesieniu do detekcji szczepów DNT+ Pm oraz w 15 fermach (26,8%), w których wykryto obecność szczepów DNT+ Bbr.

W badaniu hodowlanym, na podłożu agarowym stwierdzono wzrost kolonii bakteryjnych morfologicznie charakterystycznych dla Pm w przypadku 114 próbek (23,7%). Po ekstrakcji DNA bezpośrednio z kul-



Ryc. 2. Wyniki testu PCR dla genu kodującego dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* bezpośrednio w wymazach z nosa świń

Objaśnienia: M – marker wielkości, K(+) – kontrola dodatnia, K(-) – kontrola ujemna, 1-14 badane próbki wymazów z nosa, W – woda, X – mix



Ryc. 3. Wyniki testu PCR dla genu kodującego dermonekrotoksynę *Bordetella bronchiseptica* bezpośrednio w wymazach z nosa świń

Objaśnienia: jak na ryc. 2

Tab. 3. Wyniki badania próbek pobranych w 56 fermach, testem PCR w kierunku obecności genów kodujących dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica* w wymazach z nosa świń i czystych kulturach bakteryjnych

Numer fermy	Wyjściowy status zdrowotny fermy			Liczba próbek	<i>Pasteurella multocida</i>				<i>Bordetella bronchiseptica</i>				Diagnoza
	zzzn	podejrzanie zzzn	nieznany		bezpośrednio z wymazu		z hodowli bakteryjnej		bezpośrednio z wymazu		z hodowli bakteryjnej		
				próbki przebadane / wynik +	% wyników+	próbki przebadane / wynik +	% wyników+	próbki przebadane / wynik +	% wyników+	próbki przebadane / wynik +	% wyników+		
1		x		10	10/2	20,0	2/0	0	10/0	0	0/0	0	PAR
2		x		10	10/0	0	0/0	0	10/0	0	0/0	0	-
3		x		7	7/1	14,3	4/2	50,0	7/3	42,8	3/3	100	PAR
4		x		7	7/0	0	0/0	0	7/0	0	0/0	0	-
5		x		10	10/3	30,0	4/1	25,0	10/3	30,0	10/6	60,0	PAR
6		x		10	10/1	10,0	3/0	0	10/2	20,0	2/2	100	PAR
7		x		14	14/4	28,6	14/5	35,7	14/1	7,1	1/1	100	PAR
8	x			9	9/1	11,1	3/0	0	9/1	11,1	0/0	0	PAR
9	x			8	8/2	25,0	2/0	0	8/5	62,5	2/2	100	PAR
10	x			7	7/3	42,8	3/0	0	7/1	14,3	0/0	0	PAR
11	x			5	5/0	0	0/0	0	5/4	80,0	3/1	33,3	NPAR
12	x			5	5/0	0	0/0	0	5/0	0	0/0	0	-
13		x		10	10/6	60,0	0/0	0	10/10	100	3/3	100	PAR
14		x		10	10/0	0	4/0	0	10/8	80,0	7/5	71,4	NPAR
15		x		10	10/1	10,0	0/0	0	10/6	60,0	6/4	66,6	PAR
16		x		5	5/1	20,0	2/0	0	5/1	20,0	0/0	0	PAR
17		x		5	5/0	0	2/0	0	5/0	0	0/0	0	-
18			x	5	5/0	0	1/0	0	5/1	20,0	0/0	0	NPAR
19		x		4	4/0	0	0/0	0	4/0	0	0/0	0	-
20		x		5	5/0	0	0/0	0	5/4	80,0	1/1	100	NPAR
21		x		5	5/0	0	1/0	0	5/1	20,0	0/0	0	NPAR
22		x		10	10/0	0	0/0	0	10/3	30,0	1/1	100	NPAR
23	x			12	12/5	41,6	3/0	0	12/4	33,3	0/0	0	PAR
24		x		8	8/0	0	1/0	0	8/0	0	0/0	0	-
25		x		5	5/0	0	1/0	0	5/1	20,0	0/0	0	NPAR
26		x		4	4/0	0	1/0	0	4/2	50,0	2/1	50,0	NPAR
27		x		2	2/0	0	1/0	0	2/1	50,0	2/2	100	NPAR
28		x		2	2/0	0	0/0	0	2/0	0	0/0	0	-
29		x		3	3/0	0	1/0	0	3/0	0	1/1	100	NPAR
30		x		2	2/1	50,0	0/0	0	2/0	0	0/0	0	PAR
31		x		21	21/0	0	0/0	0	21/7	33,3	5/5	100	NPAR
32		x		25	25/1	4,7	1/0	0	25/13	52,0	17/11	64,7	PAR
33		x		39	39/9	23,1	19/7	36,8	39/20	51,3	26/17	65,4	PAR
34		x		26	26/15	57,7	14/5	35,7	26/23	88,5	20/7	35,0	PAR
35		x		7	7/2	28,6	0/0	0	7/0	0	0/0	0	PAR
36		x		7	7/0	0	0/0	0	7/5	71,4	5/3	60,0	NPAR
37	x			5	5/2	40,0	3/1	33,3	5/0	0	1/0	0	PAR
38			x	5	5/1	20,0	1/0	0	5/5	100	5/2	40,0	PAR
39	x			5	5/1	20,0	1/0	0	5/1	20,0	1/0	0	PAR
40	x			3	3/0	0	0/0	0	3/2	66,6	1/0	0	NPAR
41	x			3	3/0	0	0/0	0	3/1	33,3	0/0	0	NPAR
42	x			3	3/1	33,3	0/0	0	3/3	100	3/2	66,6	PAR
43	x			3	3/1	33,3	0/0	0	3/0	0	0/0	0	PAR
44	x			3	3/0	0	0/0	0	3/0	0	0/0	0	-
45			x	15	15/1	6,6	0/0	0	15/1	6,6	0/0	0	PAR
46	x			4	4/0	0	1/0	0	4/2	50,0	4/2	50,0	NPAR
47			x	5	5/0	0	0/0	0	5/1	20,0	0/0	0	NPAR
48			x	5	5/0	0	0/0	0	5/1	20,0	2/1	50,0	NPAR
49	x			5	5/0	0	0/0	0	5/3	60,0	3/0	0	NPAR
50	x			15	15/2	14,3	3/2	66,6	15/7	46,6	0/0	0	PAR
51	x			15	15/0	0	1/0	0	15/8	53,3	3/1	33,3	NPAR
52	x			15	15/1	6,6	8/2	25,0	15/13	86,6	14/9	64,3	PAR
53	x			5	5/0	0	1/0	0	5/4	80,0	1/1	100	NPAR
54	x			5	5/1	20,0	1/0	0	5/4	80,0	1/1	100	PAR
55	x			15	15/5	33,3	7/1	14,3	15/0	0	0/0	0	PAR
56	x			13	13/0	0	0/0	0	13/10	76,9	0/0	0	NPAR
Σ	22	29	5	481	481 / 74	15,4	114 / 26	22,8	481 / 196	40,7	156 / 95	60,1	

tury bakteryjnej i jego przebadaniu testem PCR wynik dodatni dla genu DNT Pm uzyskano w 26 próbkach, co stanowiło 22,8% wyrosłych kolonii Pm.

Szczepy Pm DNT+ w badaniu testem PCR zostały poddane weryfikacji metodą ELISA, przeprowadzoną bezpośrednio z czystej kultury bakteryjnej. Wynik dodatni uzyskano w odniesieniu do 22 próbek (84,6%), natomiast 4 próbki (15,4%) okazały się ujemne, mimo dodatniego rezultatu w teście PCR.

Na podłożu G20G uzyskano wzrost 156 izolatów Bbr, które również przebadano testem PCR, w celu wykrycia obecności genu kodującego DNT. Okazało się, że 95 izolatów (60,1%) posiadało poszukiwany gen. W przypadku trzech ferm, oznaczonych numerami: 5, 27 oraz 29 stwierdzono obecność genu DNT Bbr testem PCR z kultury bakteryjnej w większej liczbie próbek niż w teście PCR wykonanym bezpośrednio z wymazów. Taka sytuacja może wynikać z faktu, że posiewy na podłożu G20G często były inkubowane dłużej niż 72 godz. i dopiero po upływie tak długiego czasu stwierdzano wzrost kolonii bakteryjnych. Przypuszczalnie w badanej próbce klinicznej znajdowała się zbyt mała ilość materiału, którą można było wykryć, stosując opracowany test PCR lub duża ilość niespecyficzných inhibitorów reakcji PCR, obniżająca jego czułość. Wiadomym jest, że czułość reakcji PCR określona w warunkach eksperymentalnych, na podstawie badania oczyszczonego DNA uzyskanego z namnożonych kultur bakteryjnych, może odbiegać od czułości osiąganą w przypadku bezpośredniej analizy materiału biologicznego, co wynika ze złożoności chemicznej próbek klinicznych i występowania w nich wielu niespecyficzných inhibitorów, które mogą hamować amplifikację. Z tego powodu klasyczne badania bakteriologiczne nadal są uznawane za „złoty” standard w diagnostyce (2).

Na podstawie szczegółowej analizy uzyskanych wyników ustalano postać zzzn w poszczególnych fermach. W przypadku 27 ferm (48,2%) stwierdzono PAR, w 21 z tych gospodarstw uzyskano dodatnie wyniki w testach PCR dla obydwu patogenów, natomiast w 6 chlewniach (oznaczonych numerami: 1, 30, 35, 37, 43, 55) wynik dodatni uzyskano tylko w PCR dla DNT Pm.

Wykrycie w badanych fermach obecności genu DNT tylko w szczepach Bbr stanowiło podstawę stwierdzenia występowania drugiej formy zzzn – NPAR. Taka sytuacja miała miejsce w przypadku 21 gospodarstw (37,5%).

W ośmiu fermach (14,8%) nie uzyskano dodatnich wyników badań. Fermę tę uznano za wolną od zzzn, aczkolwiek przy interpretacji takich wyników należy zachować ostrożność, ponieważ nie można wykluczyć, że wynik ujemny mógł mieć związek z nieprawidłowym pobraniem materiału do badań (zbyt powierzchowne pobranie wymazu) bądź zbyt długim okresem między pobraniem a przesłaniem próbek i rozpoczęciem analizy.

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na przydatność opracowanych testów molekularnych do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej zzzn.

Test PCR znalazł szerokie zastosowanie w diagnostyce chorób ludzi i zwierząt dzięki temu, że umożliwia wykrywanie patogenów w dużej liczbie próbek w bardzo krótkim czasie, w stosunku do klasycznych metod laboratoryjnych, a startery projektowane dla konkretnych genów drobnoustrojów gwarantują swoistość przeprowadzanej reakcji amplifikacji. Zastosowane w badaniach własnych startery do detekcji Pm, zaprojektowane przez Register i wsp. (16), amplifikowały fragment genu kodującego najważniejszy czynnik patogenności, jakim w przypadku bakterii z gatunku *Pasteurella multocida* jest dermonekrotoksyna (8). W pracy oryginalnej startery ToxA6 i ToxA7 były wykorzystane do analizy wyłącznie czystych kultur bakteryjnych Pm, natomiast w badaniach własnych, po nieznacznych modyfikacjach procedury, wykorzystano je z powodzeniem do bezpośredniej analizy materiału klinicznego pochodzącego od świń. Czułość opracowanego testu wynosiła $2,5 \times 10^3$ jtk/ml (12). Jak wskazują na to wyniki badań Choi i wsp. (5), znacznie wyższą czułość można osiągnąć przy zastosowaniu metody nested PCR. W teście opracowanym przez wymienionych autorów wykrywano już 20 komórek bakteryjnych w 1 ml (5).

Badania własne wykazały, że w blisko połowie przebadanych ferm stwierdzono obecność DNT+ Pm na podstawie testu PCR wykonanego bezpośrednio z wymazu. Badania zbliżone do własnych przeprowadzili Lichtensteiger i wsp. (11), którzy porównali wyniki testu PCR z kultury bakteryjnej Pm z testem ELISA do wykrywania antygeny DNT Pm. Wspomniani badacze przeanalizowali 40 szczepów Pm, z których 16 należało do typu otoczkowego A, a pozostałe do typu D. Cztery izolaty serotypu A były dodatnie zarówno w teście ELISA, jak i PCR, w przypadku pozostałych izolatów otrzymano wynik ujemny. Z kolei wśród szczepów reprezentujących serotyp D, 9 izolatów było ujemnych w obydwu testach. Tylko w odniesieniu do jednego izolatu serotypu D, w którym potwierdzono obecność DNT testem PCR, rezultaty uzyskane metodą molekularną nie potwierdziły się przy ich porównaniu z testem ELISA, co wynikało prawdopodobnie z supresji ekspresji genu kodującego antygen DNT. W badaniach własnych, przeprowadzonych z użyciem szczepów terenowych Pm, wyniki testu ELISA pokrywały się z rezultatami uzyskanymi testem PCR w 84,6%. Z kolei odnosząc się do wyników badań serologicznych z użyciem szczepów Pm nie wytwarzających DNT uzyskano 100% zgodność z testem PCR. Taki wynik wskazuje na większą czułość testów molekularnych w porównaniu do badań serologicznych.

Podobne do zaprezentowanych rezultatów badań uzyskali Amigot i wsp. (1), którzy dokonali analizy szczepów Pm wyizolowanych z ferm, gdzie obserwowano kliniczną postać PAR. Większość badanych przez

wymienionych autorów izolatów należała do serotypu A, natomiast około 40% szczepów nie posiadało antygeny otoczkowego dla serotypu A, w związku z czym określono je jako szczepy non-A. Trzy izolaty serotypu A dały dodatni wynik w teście PCR, chociaż prążki uzyskane w czasie elektroforezy produktów amplifikacji były mało wyraźne. Te same izolaty badane metodą ELISA okazały się ujemne. W przypadku izolatów Pm nie należących do serotypu A, dodatni wynik testu PCR był skorelowany z obecnością wyraźnych prążków po elektroforezie produktów reakcji PCR oraz z dodatnim wynikiem w teście ELISA.

Fakt, że w przypadku identyfikacji izolatów Bbr nie można oprzeć się na badaniach serologicznych, a klasyczne metody bakteriologiczne i biochemiczne znacznie wydłużają czas analizy próbki, skłonił do opracowania testu molekularnego dla potrzeb szybkiej i precyzyjnej diagnostyki laboratoryjnej PAR. Przy optymalizacji warunków reakcji zwrócono szczególną uwagę na możliwość zastosowania testu PCR zarówno do bezpośredniego badania wymazu z nosa, jak i kultury bakteryjnej. W początkowym etapie pracy sprawdzono przydatność starterów zaprojektowanych przez Register i wsp. (16), amplifikujących fragment genu kodującego flagelinę, do badania szczepów terenowych. Z uwagi na fakt, że stwierdzono znaczną liczbę produktów niespecyficznych, opracowano własne startery amplifikujące gen DNT Bbr. Okazały się one bardziej swoiste, dlatego wprowadzono je do stosowania w rutynowej diagnostyce zzzn prowadzonej w PIWet-PIB. Wprawdzie w 3 fermach liczba dodatnich wyników badania mikrobiologicznego była wyższa niż liczba dodatnich rezultatów badania molekularnego, co może sugerować większą czułość badania bakteriologicznego, jednakże oceniając uzyskane dane jako całość można stwierdzić, że badanie molekularne jest bardziej czułe. Świadczyć o tym może fakt, że w 15 analizowanych fermach obecność DNT+ Bbr została stwierdzona tylko za pomocą testu PCR wykonanego bezpośrednio z wymazu, co stanowi 36,6% dodatnich wyników dla tego genu. Niemniej jednak, w celu dalszego zwiększenia czułości i specyficzności metod molekularnych stosowanych do diagnostyki zzzn aktualnie w PIWet-PIB prowadzone są badania nad opracowaniem sond molekularnych.

Podsumowując, opracowane testy PCR do wykrywania genu kodującego DNT Pm i DNT Bbr mają praktyczne zastosowanie w diagnostyce PAR, zarówno w bezpośrednich badaniach próbek klinicznych, jak również przy badaniu czystej kultury bakteryjnej. PCR pozwala ponadto na szybkie rozróżnienie szczepów DNT+ od DNT-, z pominięciem czasochłonnego etapu izolacji oraz identyfikacji patogenów przy użyciu klasycznych metod laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

- Amigot J. A., Torremorell M., Pijoan C.: Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998, 10, 169-173.
- Anon.: Atrophic rhinitis of swine, [w:] OIE Terrestrial Manual. Paryż, Francja 2008, 1083-1091.
- Bowersock T. L., Hooper T., Pottenger R.: Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992, 4, 419-422.
- Brockmeier S. L., Register K. B., Magyar T., Lax A. J., Pullinger G. D., Kunkle R. A.: Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in pathogenesis of respiratory disease in swine. *Inf. Immun.* 2002, 70, 481-490.
- Choi C., Chae C.: Enhanced detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs using a nested polymerase chain reaction. *Vet. J.* 2001, 162, 255-258.
- Done J. T., Upcott D. H., Frewin D., Herbert C. N.: Atrophic rhinitis snout morphometry for quantitative assessment of conchal atrophy. *Vet. Rec.* 1984, 114, 33-35.
- Hozbor D., Fouque F., Guiso N.: Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 1999, 150, 333-431.
- Janda W. M., Muters R.: *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Kingella*, *Capnocytophaga* and other miscellaneous gram-negative rods, [w:] Borriello S. P., Murray P. R., Funke G.: *Topley and Wilson's Microbiology*, Vol. 2. *Bacteriology*. Hodder Education, Londyn, Wielka Brytania 2005, 1650-1655.
- Jong-de M. F.: Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis, [w:] Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J.: *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA 2006, 577-602.
- Lariviere S., Leblanc L., Mittal K. R., Martineau G. P.: Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 364-367.
- Lichtensteiger C. A., Steenbergen S. M., Lee R. M., Polson D. D., Vimr E. R.: Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 3035-3039.
- Markowska-Daniel I., Jabłoński A., Nowak A., Stepniewska K., Pejsak Z.: Opracowanie testu PCR do wykrywania genu kodującego dermonekrotoksynę *Pasteurella multocida* w wymazach z nosa świń. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 542-545.
- Nagai S., Someno S., Yagihashi T.: Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1004-1010.
- Parton R.: *Bordetella*, [w:] Borriello S. P., Murray P. R., Funke G.: *Topley and Wilson's Microbiology*, Vol. 2. *Bacteriology*. Hodder Education, Londyn, Wielka Brytania 2005, 1786-1817.
- Pejsak Z.: Pastereloza, Zakaźne zanikowe zapalenie nosa, Nieprogressywne zakaźne zanikowe zapalenie nosa (bordeteloza), [w:] *Ochrona zdrowia świń*. PWR, Poznań 2007, 287-297.
- Register K. B., DeJong K. D.: Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.* 2006, 117, 201-210.
- Roop R. M., Veit H. P., Sinsky R. J., Veit S. P., Hewlett E. L., Kornegay E. T.: Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Inf. Immun.* 1987, 55, 217-222.
- Stepniewska K., Markowska-Daniel I.: Elaboration of PCR test for detection of dermonecrotin in *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Bull. Vet. Ins. Pulawy – w druku*.

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