

# Właściwości genotypowe bakterii izolowanych z błony śluzowej górnych dróg oddechowych koni

ZBIGNIEW GRĄDZKI, LILIANA BOGUTA

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

Grądzi Z., Boguta L.

## Genotyping of bacteria isolated from nasal mucosa of the upper respiratory tract of horses

### Summary

The aim of the study was to compare genetic profiles of selected bacterial groups isolated from nasal mucosa of horses with upper respiratory tract infections. The RAPD method with the use of a commercial test (Ready-To-Go RAPD Analysis Kit, Amersham Pharmacia Biotech, USA) was used in the study. The representative group of bacterial strains isolated from different horse farms in our earlier studies was subjected to the analysis of the genetic polymorphism. At the preliminary stage all isolates were phenotypically characterized. In total 26 strains of *Staphylococcus xylosus*, 25 strains of *Staphylococcus sciuri*, 7 strains of *Staphylococcus lentus* and 15 strains of *Bordetella bronchiseptica* were examined. The biggest genetic differentiation was shown within the strains of the *St. lentus* species, in which 4 different RAPD patterns within 7 strains examined were found (57.1%). In other bacterial species polymorphism of 40%, 53.8% and 26.7% was found in the case of *St. sciuri*, *St. xylosus* and *B. bronchiseptica* respectively. The results showed prominent genetic differentiation within coagulase-negative staphylococci isolated from horses, mainly in *St. xylosus* species. They also presented different biochemical properties. In contrast, *B. bronchiseptica* strains constituted a relatively uniform bacterial group both from the genetic perspective as well as based on their phenotypic properties.

**Keywords:** horse, bacteria, upper respiratory tract, genotyping, RAPD

Możliwość śledzenia źródła zakażenia w przypadku chorób szerzących się drogą łańcuchowo-kontaktową jest jednym z warunków przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się infekcji w obrębie populacji. W stosowanych do tego celu badaniach epidemiologicznych wykorzystywane są różne systemy typowania drobnoustrojów, pozwalające ustalić tożsamość izolowanych w ognisku choroby szczepów oraz ich pokrewieństwo. Dobry system typowania bakterii powinien spełniać określone kryteria (7, 11, 12, 16-18). Stosowana metoda powinna być powtarzalna, dyskryminująca oraz łatwa do wykonania i interpretacji. Podstawowy podział metod typowania drobnoustrojów uwzględnia techniki fenotypowe i genotypowe (11, 16-18). Pierwsza grupa metod, oceniająca produkty ekspresji genów limitowana jest możliwością występowania zmian określonych cech zależnie od warunków wzrostu drobnoustrojów, fazy namnażania oraz częstości występowania spontanicznych mutacji (16). Wyniki typowania uzyskiwane z użyciem metod genotypowych w znacznie mniejszym stopniu obciążone są błędem związanym z naturalną zmiennością badanych cech (17). Ograniczony wpływ na nie mogą mieć jednak takie zjawiska, jak: insercja lub delecja fragmentów

DNA w obrębie chromosomu, pozyskiwanie lub utrata przez komórkę pozachromosomalnego DNA, a także przypadkowe mutacje przyczyniające się do tworzenia lub eliminacji miejsc restrykcyjnych (17, 18).

Jedną z szerzej wykorzystywanych ostatnio metod genotypowania bakterii jest odmiana łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR), polegająca na zastosowaniu w reakcji amplifikacji jednego krótkiego startera, niewykazującego komplementarności do jakiegokolwiek specyficznej sekwencji w obrębie genomowego DNA (4, 8, 12, 17). W warunkach niskiej temperatury hybrydyzacji (annealing) starter przyłącza się w różnych przypadkowych miejscach do chromosomu bakteryjnego oraz inicjuje syntezę nici DNA. Przy zachowaniu niewielkiej odległości pomiędzy starterami syntetyzowanych jest kilka fragmentów DNA, podlegających amplifikacji w kolejnych cyklach reakcji (AP-PCR, RAPD). Po zakończeniu reakcji w rozdiale elektroforetycznym widoczne są prążki amplifikowanego DNA, których liczba oraz masa są charakterystyczne dla danego szczepu bakterii.

Celem badań było porównanie profili genetycznych wybranych grup bakterii izolowanych z błony śluzowej nosa koni chorujących z objawami zapalenia gór-

nych dróg oddechowych. W badaniach wykorzystano metodę RAPD z użyciem przypadkowych starterów.

### Materiał i metody

**Szczepy bakteryjne.** Analizą polimorfizmu genomowego objęto reprezentatywną grupę szczepów bakteryjnych wyizolowanych od koni we wcześniejszych badaniach ze środowisk, w których notowano przypadki zakażeń górnych dróg oddechowych (2). Wszystkie badane izolaty zostały wstępnie scharakteryzowane pod względem podstawowych cech fenotypowych (2, 3). Ogółem przebadano 26 szczepów *Staphylococcus xylosus*, 25 szczepów *Staphylococcus sciuri*, 7 szczepów *Staphylococcus lentus* i 15 szczepów *Bordetella bronchiseptica*.

**Izolacja genomowego DNA.** Izolację DNA wykonywano metodą fenolowo-chloroformową, wg procedury opracowanej w ENVL, Francja (2). Badany szczep wysiewano na dwie płytki Petriego z podłożem Mueller-Hintona i inkubowano w temperaturze 35°C przez 18-20 godzin. Kolonie z jednej lub dwóch płytek zawieszano w 5 ml buforu TES (Tris-HCl, EDTA, NaCl, pH = 8,0). Do zawiesiny dodawano 100 µl lizozymu (10 mg/ml, Sigma, USA) i 100 µl RN-azy (Ribonuclease A, 10 mg/ml, Sigma, USA) oraz, w przypadku bakterii Gram-dodatnich, 100 µl lizostafiny (Lysostaphine, 5 mg/ml, Sigma, Niemcy). Zawiesinę inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsarką w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Następnie dodawano 250 µl 10% SDS, energicznie mieszano przez 10 sekund i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Po inkubacji dodawano 100 µl proteinazy K (Proteinase K, 10 mg/ml, Sigma, USA) i ponownie inkubowano w temperaturze 50°C przez 1,5 godziny. Po inkubacji próbkę poddawano dwukrotnej ekstrakcji przy użyciu mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy oraz precypitacji etanolowej. Wytrącony DNA przenoszono do próbówki typu Eppendorf, zawieszano w 250 µl wody (miliQ) i pozostawiano do uwodnienia w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Koncentrację DNA określano spektrofotometrycznie (Bioblock Scientific, Milton Roy, Francja), przy długości fali  $\lambda = 260$  nm, przyjmując, że jedna jednostka absorbancji ( $1OD_{260}$ ) odpowiada 50 µg dwuniciowego DNA w 1,0 ml roztworu. W celu kontroli czystości wyizolowanego DNA oraz jego integralności 10 µl zawiesiny kwasu nukleinowego poddawano elektroforezie w 0,8% żelu agarozowym (90 mV, 1 godzina, 1 × TAE). Wyizolowany kwas nukleinowy przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C.

**Analiza polimorfizmu genomowego DNA drobnoustrojów.** Polimorfizm genomowego DNA wyizolowanych szczepów bakteryjnych w obrębie gatunku badano metodą RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) PCR, przy użyciu komercyjnego zestawu odczynników (Ready-To-Go RAPD Analysis Kit, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Skład jednostkowej mieszaniny reakcyjnej RAPD PCR był następujący:

- liofilizat standaryzowanej mieszaniny, zawierającej polimerazę AmpliTaq® i fragment Stoffela, 0,4 mM każdego z dNTPs, 2,5 µl BSA, bufor dla polimerazy (3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 10 mM Tris, pH = 8,3),
- 5 µl startera (5 pmol/µl) – do wyboru jeden z 6: Starter 1: 5' GGTGCGGGAA 3'; Starter 2: 5' GTTTCGCTCC

3'; Starter 3: 5' GTAGACCCGT 3'; Starter 4: 5' AAGAGCCCGT 3'; Starter 5: 5' AACGCGCAAC 3'; Starter 6: 5' CCCGTCAGCA 3',

- 40 ng DNA i woda destylowana do 25 µl.

Wyboru startera dokonywano w oparciu o ocenę wyników reakcji RAPD PCR przeprowadzonych z użyciem poszczególnych starterów na tej samej matrycy DNA. Do właściwego badania wybierano starter, który dawał wzór RAPD składający się z 5-10 wyraźnie oddzielonych prążków. Każdorazowo wykonywano próbę kontrolną negatywną, przygotowując mieszaninę reakcyjną bez DNA oraz kontrolę wewnętrzną odczynnikową, w której badany DNA zastępowano kwasem nukleinowym izolowanym z *E. coli* (3 µl, 10 ng/µl), a jako starter reakcji wykorzystywano oligonukleotydy 2. Warunki reakcji były następujące: denaturacja wstępna – 95°C, 5 minut, 45 cykli o następujących parametrach: denaturacja DNA – 95°C, 1 minuta, wiązanie startera – 36°C, 1 minuta, wydłużanie startera – 72°C, 2 minuty. Uzyskiwane produkty RAPD PCR schładzano do temperatury 4°C i przechowywano w -20°C. W celu analizy produktów reakcji wykonywano elektroforezę w 1% żelu agarozowym, w buforze 1 × TAE (czas 3 godziny, napięcie 100 V). Po zakończeniu reakcji żełe barwiono w roztworze bromku etydyny (1 µg/ml w 1 × TBE), oglądano w świetle promieni UV i wykonywano dokumentację fotograficzną przy użyciu aparatu Polaroid. Wielkość prążków oceniano względem profilu RAPD *E. coli*/starter 2 oraz wzorca masowego (100 bp DNA, Fermentas, Litwa).

W analizie wyników badań własnych, dotyczących interpretacji profili RAPD badanych szczepów bakteryjnych wykorzystano system oznaczania typów i podtypów, w obrębie poszczególnych gatunków drobnoustrojów, zaproponowany przez Tenover i wsp. (17, 18). Uwzględniając te zalecenia oraz przyjętą terminologię epidemiologiczną, szczepy różniące się między sobą maksymalnie 4 prążkami grupowane były w obrębie odrębnych typów i określane mianem ściśle spokrewnionych. Izolaty o zbliżonych profilach genetycznych, ale różniące się od pierwowzoru, charakterystycznego dla typu, liczbą oraz masą prążków DNA określane były mianem podtypów.

### Wyniki i omówienie

Profile RAPD badanych izolatów, pochodzących z poszczególnych środowisk, prezentują tabela 1 i ryciny 1, 2, 3, 4. Z analizy danych zawartych w tabeli oraz na rycinach wynika, że największe zróżnicowanie genetyczne występowało w obrębie gatunku *Staphylococcus lentus*, w przypadku którego uzyskano 4 różne wzory RAPD na 7 badanych szczepów (57,1%). W obrębie pozostałych gatunków bakterii stwierdzono polimorfizm rzędu, odpowiednio, 40% dla *Staphylococcus sciuri*, 53,8% dla *Staphylococcus xylosus*, 26,7% dla *Bordetella bronchiseptica*. Zgodnie z zaleceniami dotyczącymi interpretacji wyników badań genotypowych, podanymi przez Tenover i wsp. (17, 18), w obrębie izolatów *Staphylococcus xylosus* można wyróżnić 5 podstawowych typów, do których należą szczepy różniące się między sobą maksymalnie 4 prążkami. W obrębie typu A wyróżniono podty-

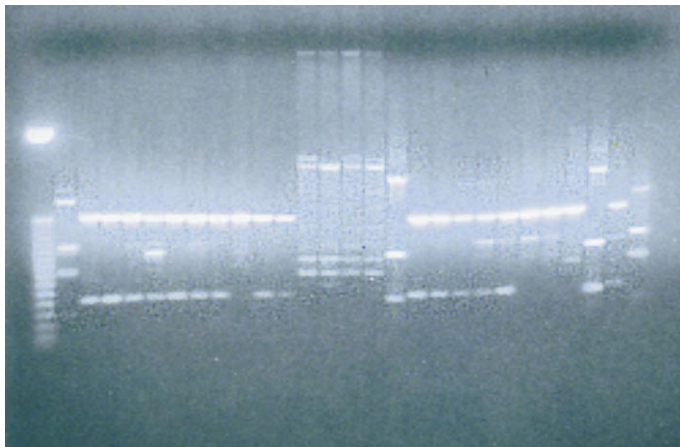
Tab. 1. Profile lekowrażliwości i genotypowe wybranych bakterii izolowanych z błony śluzowej górnych dróg oddechowych koni

Nr szczepu	Nr fermy	Antybiotyko-wrażliwość nr typu	Profil RAPD typ-podtyp
<i>Bordetella bronchiseptica</i>			
1	IV	1	B 2
2	IV	2	B 2
3	IV	2	B 2
4	IV	2	A 1
5	IV	2	B 2
6	IV	2	B 2
7	IV	2	B 2
8	VI	3	B 2
9	VI	3	B 2
10	VI	4	B 3
11	VI	4	B 3
12	V	5	B 4
13	V	5	B 4
14	V	5	B 4
15	V	5	B 4
<i>Staphylococcus sciuri</i>			
1	VI	1	A 1
2	VI	1	A 1
3	IX	2	A 2
4	IX	3	A 3
5	X	2	A 1
6	X	3	A 2
7	X	2	A 1
8	IV	1	A 4
9	IV	4	A 1
10	IV	4	A 1
11	V	5	B 5
12	V	6	B 6
13	V	2	B 5
14	V	2	B 5
15	V	6	C 7
16	V	7	A 1
17	V	7	A 1
18	I	2	A 8
19	I	8	A 9
20	I	9	A 2
21	I	10	A 10
22	I	11	A 10
23	I	11	A 4
24	II	12	C 7
25	II	12	A 2

Nr szczepu	Nr fermy	Antybiotyko-wrażliwość nr typu	Profil RAPD typ-podtyp
<i>Staphylococcus xylosum</i>			
1	III	3	C 13
2	I	6	D 10
3	I	4	A 5
4	I	3	A 9
5	I	3	B 2
6	I	9	A 5
7	I	10	A 9
8	I	4	D 10
9	I	7	C 11
10	I	7	A 5
11	IV	13	B 2
12	IV	2	B 3
13	IV	1	E 4
14	IV	3	A 5
15	IV	12	A 1
16	IX	16	A 5
17	IX	11	A 5
18	V	4	A 7
19	V	8	B 8
20	VI	14	B 6
21	VI	15	B 3
22	XI	7	E 12
23	II	5	C 13
24	II	3	C 14
25	II	3	B 8
26	VII	3	C 13
<i>Staphylococcus lentus</i>			
1	IX	1	A 1
2	IX	2	A 1
3	III	3	B 2
4	III	4	A 3
5	VII	5	A 4
6	VII	3	A 3
7	VII	6	A 1

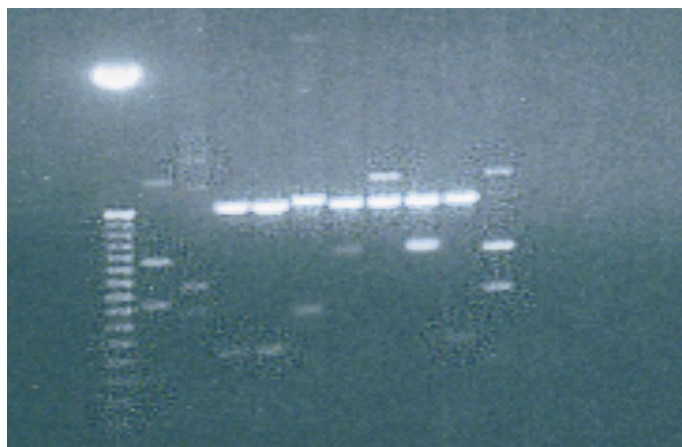
py A1, A5, A7 i A9, w obrębie typu B – podtypy B2, B3, B6 i B8, w obrębie typu C – podtypy C11, C13 i C14, w obrębie typu D – podtyp D10 i w obrębie typu E – podtypy E4 i E12. Podobnie wśród szczepów *Staphylococcus sciuri* wyróżniono typ A – z podtypami A1, A4, A8, A9 i A10, typ B – z podtypami B5 i B6, typ C – z podtypem C7. W obrębie szczepów *Staphylococcus lentus* wyróżniono typ A oraz podty-

M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 M



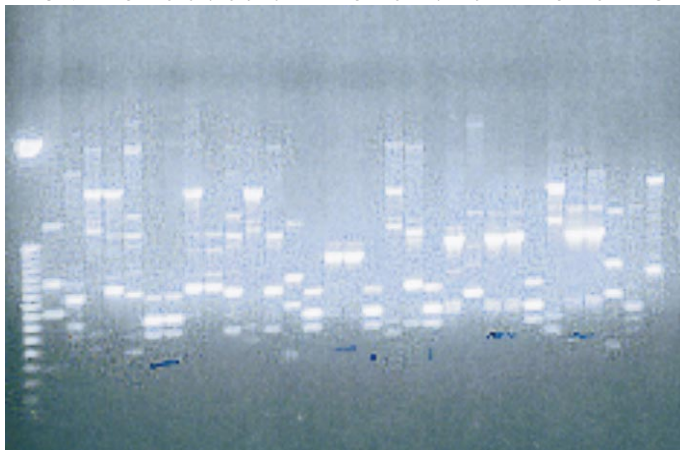
Ryc. 1. Profil RAPD *S. sciuri*; starter 1, M – marker masowy (50 bp Promega); C – *E. coli*/starter 2; nr 1-2 – ferma VI; nr 3-4 – ferma IX; nr 5-7 – ferma X; nr 8-10 – ferma IV; nr 11-17 – ferma V; nr 18-21 – ferma I; nr 22-25 – ferma II

M C N 1 2 3 4 5 6 7 C



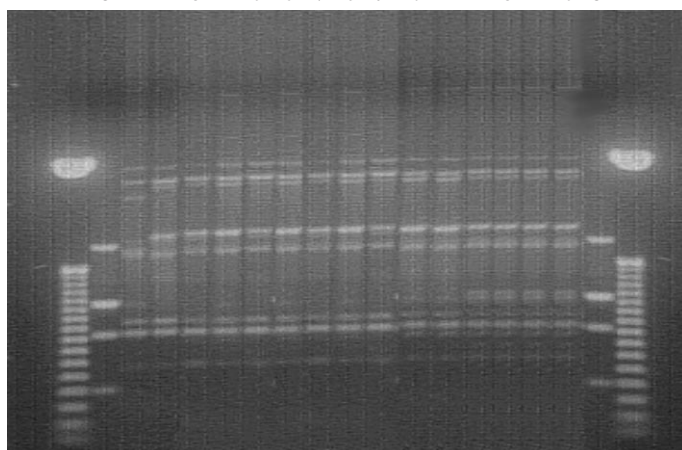
Ryc. 2. Profil RAPD *S. lentus*; starter 1, M – marker masowy (50 bp Promega); C – *E. coli*/starter 2; N – próba odczynnikowa ujemna; nr 1-2 – ferma IX; nr 3-4 – ferma III; nr 5-7 – ferma VII

M C N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 13 15 17 19 21 23 25 M C



Ryc. 3. Profil RAPD *S. xylosus*; starter 5, M – marker masowy (50 bp Promega); C – *E. coli*/starter 2; N – próba odczynnikowa ujemna; nr 1 – ferma III; nr 2-10 – ferma I; nr 11-15 – ferma IV; nr 16-17 – ferma IX; nr 18-19 – ferma V; nr 20-21 – ferma VI; nr 22 – ferma XI; nr 23-25 – ferma II, nr 26 – ferma VII

M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 C M



Ryc. 4. Profil RAPD *Bordetella bronchiseptica*; starter 1, M – marker masowy (50 bp Promega); C – *E. coli*/starter 2; nr 1-7 – ferma IV; nr 8-11 – ferma VI; nr 12-15 – ferma V

py A1, A3 i A4 oraz typ B – z podtypem B2, natomiast wśród szczepów *Bordetella bronchiseptica* wyodrębniono typ A – z podtypem A1 oraz typ B – z podtypami B2, B3 i B4.

Wśród szczepów *Staphylococcus xylosus* najliczniej występował typ A (10 szczepów) oraz podtyp A5 (6 szczepów). W poszczególnych fermach od zwierząt izolowano drobnoustroje, które można zaszereżować do jednego, dwóch, trzech lub czterech typów. Bakterie należące do jednego typu lub podtypu prezentowały różne cechy fenotypowe, z drugiej strony – szczepy o takich samych cechach fenotypowych posiadały różne profile RAPD. W obrębie gatunku *Staphylococcus lentus* dominował typ A (6 szczepów), podtyp A1 (3 szczepy). W przypadku *Staphylococcus sciuri* były to, odpowiednio, typ A (19 szczepów) i podtyp A1 (8 szczepów). Bakterie z rodzaju *Bordetella bronchiseptica* najczęściej prezentowały typ B (14 szczepów),

podtyp B2. W jednej fermie stwierdzano występowanie jednego lub dwóch podtypów. Podtyp B2 obejmował 3 różne fenotypy lekowrażliwości i dwa typy biochemiczne. Podtypy A1 i B4 były zgodne z typem oporności na antybiotyki oraz typem biochemicznym (2, 3).

Podstawową korzyścią, wynikającą z typowania drobnoustrojów jest, obok aspektu poznawczego, możliwość śledzenia źródeł i dróg zakażenia oraz szerzenia infekcji, a także ustalanie udziału konkretnych typów zarazków, odpowiedzialnych za wybuchy epidemii i endemii. Genotypowe metody badania drobnoustrojów stały się niezbędnym narzędziem w pracach nad taksonomią i filogenezą bakterii, w prowadzeniu dochodzenia epidemiologicznego oraz w diagnostyce mikrobiologicznej. W odróżnieniu od klasycznych metod fenotypowych dają one znacznie większe możliwości typowania mikroorganizmów, są szybkie, po-

wtarzalne oraz pozwalają uniknąć ograniczeń, związanych z trudnościami w hodowli niektórych zarazków (17). W odniesieniu do wielu patogennych drobnoustrojów, takich jak *Staphylococcus aureus*, *E. coli* czy *Salmonella sp.* gromadzone są aktualnie dane o genotypach występujących na danym terenie, co pozwala na aktualizację sytuacji epidemiologicznej, prognozowanie wystąpienia zakażeń oraz opracowywanie strategii zwalczania infekcji i profilaktyki swoistej (10, 11, 14, 16).

Chronologicznie najwcześniej wprowadzoną metodą typowania bakterii była technika z użyciem bakteriofagów (cyt. 1). Pomimo istotnych zalet metody typowania z użyciem kolekcji fagowych ma ona kilka mankamentów, które uniemożliwiają określenie typu u wszystkich badanych szczepów. Dodatkowo nakładają się tu problemy natury technicznej, w postaci dostępu do specjalistycznych laboratoriów, w których takie badania mogłyby być prowadzone.

Spośród innych metod typowania drobnoustrojów na uwagę zasługują analiza profilów plazmidowych oraz analiza restrykcyjna plazmidowego DNA bakterii. Najnowsze metody typowania bakterii polegają na analizie restrykcyjnej chromosomalnego DNA, elektroforezie chromosomalnego DNA w zmiennym, pulsowym polu elektrycznym (PFGE) oraz wykorzystaniu reakcji PCR (18). Technika elektroforezy pulsacyjnej okazuje się szczególnie użyteczna do różnicowania szczepów, uznawanych za bardzo podobne w oparciu o badania przy użyciu innych metod (11). Przykładowo, metodą tą można wykazać, że epidemia wywoływana teoretycznie przez jeden szczep bakteryjny w rzeczywistości przebiegała z udziałem kilku różnych szczepów.

Pomimo stale powiększającego się zasobu technik laboratoryjnych, służących do typowania bakterii oraz możliwości ich wykorzystania w badaniach epidemiologicznych nie wszystkie opisane dotąd metody znalazły szersze zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej. Przykładowo, z punktu widzenia potrzeb i oczekiwań klinicznej epidemiologii, w odniesieniu do szczepów MRSA wystarczające może się okazać określenie profilów antybiotykooporności zważywszy, że większość izolatów klinicznych gronkowców wykazuje *in vitro* oporność na określony zestaw antybiotyków. Trudno się jednak nie zgodzić z opinią, że oznaczanie lekowrażliwości gronkowców, jakkolwiek technicznie łatwe do wykonania, w rzeczywistości dostarcza niewielu informacji na temat różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami. Uwaga ta szczególnie odnosi się do izolatów MRSA, z których większość cechuje się zbliżoną opornością wielolekową. Niektóre metody biologii molekularnej są w stanie różnicować szczepy bakteryjne w stopniu większym niż jest to potrzebne i konieczne do rutynowych badań epidemiologicznych. Wydaje się zatem, że rozwiązaniem idealnym byłoby stosowanie kilku metod typowania i w oparciu o uzyskiwane wyniki wybór optymalnej.

Celem genotypowania przeprowadzonego w ramach badań własnych było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego szczepów bakteryjnych izolowanych z klinicznych przypadków zapalenia górnych dróg oddechowych koni, należących do różnych gatunków. Wybór RAPD jako metody badawczej podyktowany był tym, że skupia ona większość zalet tej grupy technik, tj.: prostotę wykonania, szybkość oraz wysoką zdolność różnicowania blisko spokrewnionych izolatów, a także, po standaryzacji warunków reakcji, powtarzalność (12, 17, 18).

Uzyskane wyniki wykazały znaczne zróżnicowanie genetyczne szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych, izolowanych od koni z zapaleniem górnych dróg oddechowych. Dotyczy to zwłaszcza bakterii z gatunku *Staphylococcus xylosus*. Drobnoustroje te cechowały się także różną opornością na chemioterapeutyki oraz różnymi właściwościami biochemicznymi (2, 3).

W przeciwieństwie do gronkowców bakterie z gatunku *Bordetella bronchiseptica* stanowiły stosunkowo jednorodną grupę drobnoustrojów, tak pod względem genotypu, jak i badanych cech fenotypowych. Gdyby dalsze badania, uwzględniające większą liczbę szczepów, potwierdziły ten fakt, mogłoby to stanowić punkt wyjścia dla rozważań dotyczących immunoterapii tych zakażeń.

Dane piśmiennictwa wskazują na możliwość zastosowania metody RAPD w badaniach genotypowych różnych drobnoustrojów oraz w różnych celach. Tseng i wsp. (19) wykorzystali tę technikę do różnicowania szczepów *E. coli*, pochodzących od ludzi oraz trzech gatunków zwierząt. W oparciu o uzyskane wyniki stworzono bibliotekę, w której unikatowe profile DNA bakteryjnego pogrupowane zostały w określone wzory gatunkowe. W przypadku wystąpienia zachorowań na tle *E. coli* możliwe będzie określenie pochodzenia gatunkowego izolowanych szczepów poprzez porównanie ich profili RAPD ze wzorami zgromadzonymi w bibliotece. Ma to istotne znaczenie dla ustalania ludzkich i zwierzęcych źródeł zakażenia oraz jest pomocne w określaniu dróg szerzenia się infekcji, co wykorzystywane jest w prowadzeniu dochodzenia epidemiologicznego (15). Ten sam schemat postępowania wykorzystać można także do ustalania źródła zanieczyszczenia wody pitnej. Myllys i wsp. (9) oraz Lipman i wsp. (6), stosując metodę RAPD do analizy genotypowej bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*, wykazali, że zakażenia gruczołu mlekowego bydła, wywoływane przez te drobnoustroje, mają charakter infekcji przewlekłych, a w wielu przypadkach nosicielstwo szczepów patogennych utrzymuje się długo i mimo podejmowanego leczenia. Pereira i wsp. (13) wykorzystali metodę RAPD do badania szczepów gronkowca złocistego, izolowanych od ludzi oraz z przypadków *mastitis* bydła. Autorzy wykazali duże zróżnicowanie genetyczne w obrębie gatunku oraz powszechność występowania określonych typów zarazka, niezależne od regionu geograficznego i gatun-

ku gospodarza. Hermans i wsp. (5) dzięki zastosowaniu metody RAPD dokonali zróżnicowania chorobotwórczych i mało zjadliwych szczepów gronkowca złocistego, izolowanych od królików. Uzyskane w tych badaniach wyniki mają stanowić podstawę eliminacji z hodowli zwierząt zakażonych, będących nosicielami szczepów wirulentnych.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki analizy genotypowej mogą, podobnie jak w pracy Tseng i wsp. (19), stanowić początek tworzenia bazy danych o genotypach bakterii izolowanych od koni, zwłaszcza tych o niekwestionowanym znaczeniu klinicznym, stanowiących przyczynę trudnych do diagnozowania i terapii zakażeń w obrębie górnych dróg oddechowych. Objęcie badaniami genotypowymi większej liczby szczepów bakteryjnych mogłoby zaowocować w przyszłości opracowaniem krajowego preparatu do swojej immunoprofilaktyki bakteryjnych zakażeń górnych dróg oddechowych koni.

### Piśmiennictwo

1. Aarts J. M., Boumedine K., Nesme X., Cloeckaert A.: Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Vet. Res.* 2001, 32, 363-380.
2. Boguta L.: Wybrane aspekty etiologii i epidemiologii molekularnej zakażeń górnych dróg oddechowych koni. Praca doktorska AR, Lublin 2004.
3. Grądzki Z., Boguta L.: Lekowrażliwość bakterii izolowanych od koni z zakażeniami górnych dróg oddechowych. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 75-79.
4. Gzyl A., Augustynowicz E.: Technical aspects of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique in genotyping of bacterial strains. *Acta Microbiol. Pol.* 1999, 48, 243-259.
5. Hermans K., Haesebrouck F., Vanechoutte M., Devriese L. A., Godard C., Herdt P.: Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* 2000, 72, 311-319.
6. Lipman L. J. A., Nijls A., Lam T. J. G. M., Rost J. A., Dijk L., Schukken Y. H., Gastra W.: Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 51-55.
7. Meunier J. R., Grimont A. D.: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 1993, 144, 373-379.
8. Micheli M. R., Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E.: Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 1921-1922.
9. Myllys V., Ridell J., Bjorkroth J., Biese I., Pyoralta S.: Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clone as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* 1997, 51, 245-251.
10. Nowrouzian F., Wold A. E., Adlerberth I.: Computer-based analysis of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) fingerprints for typing of intestinal *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Today* 2001, 2, 5-10.
11. Osek J.: Metody genotypowe różnicowania patogennych szczepów *Escherichia coli* stosowane w epidemiologii molekularnej. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 367-371.
12. Osek J.: Zastosowanie metody losowej amplifikacji DNA techniką PCR w typowaniu molekularnym bakterii. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 10-14.
13. Pereira M. S., Leal N. C., Sobreira M., de Almeida A. M., Siqueira-Junior J. P.: Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. *Letters Appl. Microbiol.* 2002, 1, 32-36.
14. Schwarz S., Blickwede M., Kehrenberg C., Brenner Michael G.: Phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of veterinary important bacterial pathogens of the genera *Staphylococcus*, *Salmonella*, and *Pasteurella*. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 2003, 116, 401-416.
15. Tanner M. A., Everett C. L., Youvan D. C.: Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to humane. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1628-1631.
16. Tarasiuk K., Truszczyński M.: Znaczenie fenotypowych i genotypowych metod klasyfikacji bakterii w epidemiologii i zwalczaniu chorób zakaźnych. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 323-326.
17. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V.: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologist. *Inf. Control Hospital Epidemiol.* 1997, 18, 426-439.
18. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B. E., Persing D. H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2233-2239.
19. Tseng C., Ting E., Johnson D., Saluta M., Dunst R.: Use of RAPD fingerprinting for differentiating *E. coli* isolates from human and animal sources. *Life Science News* 2001, 7, 10-11.
20. Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 6531-6535.

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