

IDENTYFIKACJA FENOTYPOWA
ORAZ GENOTYPOWA BAKTERII
Z RODZINY *PASTEURELLACEAE*
IZOLOWANYCH OD PSÓW I KOTÓW

Jarosław Król

IDENTYFIKACJA FENOTYPOWA
ORAZ GENOTYPOWA BAKTERII
Z RODZINY *PASTEURELLACEAE*
IZOLOWANYCH OD PSÓW I KOTÓW



6

WSPÓŁCZESNE PROBLEMY
MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ



Opiniodawca
prof. dr hab. Marian Binek

Redaktor merytoryczny
prof. dr hab. Wojciech Zawadzki

Opracowanie redakcyjne
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Korekta
Magdalena Kozińska

Łamanie i projekt okładki
Halina Sebzda

Monografie CLI

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2012

ISSN 2083-5531
ISBN 978-83-7717-108-0

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU
Redaktor Naczelny – prof. dr hab. inż. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328 12 77
e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 6,0. Ark. druk. 5,5
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. WSTĘP	9
1.1. Znaczenie kliniczne i epidemiologiczne bakterii z rodziny <i>Pasteurellaceae</i> występujących u psów i kotów	11
1. 2. Identyfikacja bakterii z rodziny <i>Pasteurellaceae</i>	12
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	16
3. MATERIAŁ I METODY	18
3.1. Szczepy terenowe.....	18
3.2. Opinia Lokalnej Komisji Etycznej	18
3.3. Szczepy referencyjne i kontrolne.....	18
3.4. Izolacja i przechowywanie szczepów.....	19
3.5. Badanie mikroskopowe i próby biochemiczne	19
3.6. Izolacja DNA bakterii	22
3.7. Identyfikacja szczepów na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA	22
3.8. Opracowanie starterów swoistych gatunkowo oraz warunki PCR	23
3.9. Identyfikacja genotypowa podgatunków <i>Pasteurella multocida</i> izolowanych od psów i kotów	25
3.10. Analiza sekwencyjna genów 16S rRNA i <i>rpoB</i> szczepów <i>Pasteurella dagmatis</i>	25
3.11. Analiza porównawcza sekwencji genów 16S rRNA i <i>rpoB</i> psich i kocich szczepów <i>Pasteurella dagmatis</i> oraz innych przedstawicieli rodziny <i>Pasteurellaceae</i>	26
3.12. Różnicowanie szczepów <i>Pasteurella dagmatis</i> występujących u psów i kotów.....	27
3.13. Oznaczenia nowych sekwencji DNA umieszczonych w GenBanku	27
4. WYNIKI	28
4.1. Właściwości biochemiczne oraz identyfikacja fenotypowa pałeczek z rodziny <i>Pasteurellaceae</i> izolowanych od psów i kotów.....	28
4.2. Identyfikacja badanych szczepów pałeczek <i>Pasteurellaceae</i> przy użyciu metody sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA.	31
4.3. Identyfikacja bakterii z rodziny <i>Pasteurellaceae</i> izolowanych od psów i kotów przy użyciu gatunkowo swoistych testów PCR.....	33
4.4. Przynależność gatunkowa pałeczek z rodziny <i>Pasteurellaceae</i> izolowanych od psów i kotów.	35
4.5. Identyfikacja genotypowa oraz właściwości fenotypowe podgatunków <i>Pasteurella multocida</i>	35

4.6. Zastosowanie starterów swoistych gatunkowo do identyfikacji szczepów <i>Pasteurellaceae</i> przy użyciu metody multiplex-PCR	38
4.7. Zróżnicowanie genotypowe oraz analiza filogenetyczna szczepów <i>Pasteurella dagmatis</i> izolowanych od psów i kotowatych	40
4.8. Różnicowanie szczepów <i>Pasteurella dagmatis</i> przy użyciu metody RFLP-PCR.....	44
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	45
6. WNIOSKI	59
7. PIŚMIENNICTWO.....	60
Wykaz publikacji wykorzystanych w monografii.....	66
SPIS FOTOGRAFII	66
SPIS RYCIN	67
SPIS TABEL	67
ZAŁĄCZNIKI	73

WYKAZ SKRÓTÓW

gen 16S rRNA (*rrs*) – gen kodujący rybosomalny kwas rybonukleinowy (rRNA), wchodzący w skład podjednostki małej rybosomów u *Procaryota*

atpD – gen kodujący podjednostkę β syntetazy adenozynotrifosforanu (ATP)

rpoB – gen kodujący podjednostkę β polimerazy RNA

sodA – gen kodujący mangan-zależną dysmutazę nadtlenną

kmt – gen kodujący białko KMT-1 wchodzące w skład błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych

p.z. – para zasad

PCR – (*Polymerase Chain Reaction*), reakcja łańcuchowa polimerazy, polimerazowa reakcja łańcuchowa

PCR-RFLP – (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphism*), odmiana PCR wykazująca polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

CCUG – Culture Collection, University of Göteborg (Szwecja)

NCTC – National Collection of Type Cultures (Wielka Brytania)

ATCC – American Type Culture Collection (Stany Zjednoczone)

MCCM – Medical Culture Collection Marburg (Niemcy)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Stany Zjednoczone)

CNP – Centre National des Pasteurella (Francja)

ODC – dekarboksylaza ornitynowa

BT16 – Bisgaard Taxon 16

BT46 – Bisgaard Taxon 46

1. WSTĘP

Rodzina *Pasteurellaceae* Pohl 1981 zaklasyfikowana została do typu *Proteobacteria*, klasy *Gammaproteobacteria* oraz rzędu *Pasteurellales* [Garrity i in. 2005]. Należą tu Gram-ujemne drobne pałeczki lub ziarniako-pałeczki długości 0,4–2 μm , nieruchome i niewytwarzające przetrwalników. Są to bakterie tlenowe lub względnie beztlenowe, a ich typowym miejscem bytowania są błony śluzowe układu oddechowego, pokarmowego oraz rozrodczego kręgowców (głównie ssaków i ptaków). Mogą powodować zakażenia u ludzi oraz innych ssaków, a także ptaków i gadów. Niektóre gatunki bakterii z tej rodziny mają duże znaczenie ekonomiczne jako patogeny zwierząt gospodarskich [Songer, Post 2005].

Analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała, że *Pasteurellaceae* stanowią zwartą jednostkę taksonomiczną, dającą się łatwo odróżnić od filogenetycznie najbliższych rodzin: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* oraz *Aeromonadaceae* [Dewhirst i in. 1992]. Mimo wielu badań przeprowadzonych w ostatnich latach taksonomia rodziny *Pasteurellaceae* wciąż nie jest ostatecznie ustalona, a grupa ta podlega ciągłym rewizjom systematycznym. Obecnie do *Pasteurellaceae* należy 67 zatwierdzonych gatunków zgrupowanych w 15 rodzajach (<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>), jednak sądzi się, że istnieje jeszcze co najmniej 40 taksonów wymagających dalszych badań filogenetycznych [Christensen 2004b]. Również w obrębie poszczególnych rodzajów wiele gatunków ma niepewną pozycję taksonomiczną.

Do najważniejszych rodzajów w obrębie rodziny *Pasteurellaceae* należą (w nawiasach podano liczbę gatunków): *Actinobacillus* (17), *Avibacterium* (5), *Bibersteinia* (1), *Gallibacterium* (4), *Haemophilus* (12), *Histophilus* (1), *Mannheimia* (5) oraz *Pasteurella* (12). Uważa się, że wiele gatunków z omawianej rodziny wykazuje przystosowanie do poszczególnych zwierząt-gospodarzy, a nawet do specyficznych miejsc w organizmie gospodarza [Bisgaard 1993].

U psów i kotów stwierdzono kilka gatunków należących do *Pasteurellaceae* (tab. 1). Niektóre z nich (*Pasteurella canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *H. felis*) wydają się być drobnoustrojami związanymi głównie (lub nawet wyłącznie) z tymi zwierzętami, natomiast *P. multocida* (z podgatunkami *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* i *P. multocida* subsp. *gallicida*) oraz *P. pneumotropica* występują u wielu gatunków gospodarzy. Od psów i zwierząt kotowatych (w tym dzikich) izoluje się ponadto szczepy o niewyjaśnionej do końca pozycji systematycznej, reprezentujące osobne taksony w obrębie rodziny *Pasteurellaceae*: Bisgaard Taxon 16, 45 i 46 oraz *Pasteurella* sp. B [Mutters i in. 1985, Bisgaard 1993, Christensen i in. 2005].

Na podstawie wyników badań przeprowadzonych przez różnych autorów [Hellmann i in. 1987, Biberstein i in. 1991, Van Sambeek i in. 1995, Muhairwa i in. 2001a, Forsblom i in. 2002] wykazano, że u kotów dominującym drobnoustrojem z omawianej rodziny jest *Pasteurella multocida*, natomiast u psów – *P. canis*. Pozostałe gatunki *Pasteurellaceae* izolowane są od tych zwierząt rzadziej. W dostępnym piśmiennictwie istnieją jednak dość duże rozbieżności dotyczące częstotliwości występowania gatunków bakterii z rodziny

Pasteurellaceae u różnych gospodarzy. Wymienieni autorzy prezentują różne opinie na temat częstości izolacji od zwierząt mięsożernych poszczególnych podgatunków *P. multocida*. Wspomniane różnice mogą być spowodowane czynnikami geograficznymi, brakiem standaryzacji metod diagnostycznych oraz odmiennymi celami badań (określanie nosicielstwa bakterii u zwierząt zdrowych lub izolacja z przypadków zakażeń). Ponadto, większość wspomnianych autorów stosowała wyłącznie fenotypowe metody identyfikacji, które w przypadku *Pasteurellaceae* okazują się często niepewne [Kuhnert i in. 2000, Christensen i in. 2004a].

Tabela 1
Table 1

Bakterie z rodziny *Pasteurellaceae* występujące u psów i zwierząt kotowatych
Bacteria belonging to the family *Pasteurellaceae* occurring in dogs and felids

Gatunek/takson Species/taxon	Występowanie Occurrence	Piśmiennictwo Reference
<i>Pasteurella canis</i>	pies, kot dog, cat	Mutters i in. 1985, Hellmann i in. 1987, Biberstein i in. 1991, Bisgaard 1993
<i>P. dagmatis</i>	pies, kot dog, cat	Mutters i in. 1985, Bisgaard 1993, Muhairwa i in. 2001a
<i>P. multocida</i> (z podgatunkami <i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i> , <i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i> oraz <i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>)	pies, kot, lew, tygrys dog, cat, lion, tiger	Heddleston 1976, Burdge i in. 1985, Muhairwa i in. 2001a, Forsblom i in. 2002, Christensen i in. 2005
<i>P. stomatis</i>	pies, kot dog, cat	Mutters i in. 1985, Hellmann i in. 1987, Bisgaard 1993
<i>P. pneumotropica</i>	kot cat	Bisgaard 1993
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	pies dog	Bisping, Amsberg 1988, Songer, Post 2005
<i>H. felis</i>	kot cat	Inzana i in. 1992
Bisgaard Taxon 16	pies, kot dog, cat	Bisgaard, Mutters 1986, Muhairwa i in. 2001a, Forsblom i in. 2002
Bisgaard Taxon 45 („ <i>P. leonis</i> ”, „ <i>P. multocida</i> subsp. <i>tigris</i> ”)	lew, tygrys lion, tiger	Capitini i in. 2002, Christensen i in. 2005
Bisgaard Taxon 46	pantera ¹ leopard ¹	Christensen i in. 2005
<i>Pasteurella</i> species B	pies, kot dog, cat	Mutters i in. 1985, Hellmann i in. 1987

¹ szczepy izolowane od ludzi z ran kłasnanych powodowanych przez pantery
strains isolated from leopard bite wounds in humans

1.1. Znaczenie kliniczne i epidemiologiczne bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów

Drobnoustroje należące do rodziny *Pasteurellaceae* występują fizjologicznie na błonach śluzowych układu oddechowego, jamy ustnej oraz układu rozrodczego u psów i kotów. W sprzyjających warunkach, wskutek upośledzenia miejscowych mechanizmów obronnych, wcześniejszych zakażeń wirusowych, urazów mechanicznych, ran kłasnanych itp., mogą powodować u tych zwierząt zakażenia miejscowe lub uogólnione [Greene 1984]. Do najczęściej stwierdzanych procesów patologicznych, w których uczestniczą bakterie z omawianej grupy, należą zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych, ropniaki opłucnej (*empyema pleurae*), stany zapalne gardła, zakażenia układu moczopłciowego, posocznice, zakażenia ran kłasnanych oraz ropnie podskórne [Maclachlan, Hopkins 1978, Hellmann i in. 1987, Mohan i in. 1997, Scott i in. 2001, Król i in. 2004]. Jako czynnik etiologiczny tych zakażeń najczęściej jest wymieniana *Pasteurella multocida*, jednak z uwagi na zmiany dotyczące klasyfikacji rodziny *Pasteurellaceae* w ostatnich latach, wiele danych literaturowych dotyczących chorobotwórczości tego gatunku musi być interpretowanych z pewną ostrożnością.

Drugim ważnym problemem związanym z nosicielstwem omawianej grupy bakterii u zwierząt mięsożernych jest możliwość transmisji tych drobnoustrojów na zwierzęta gospodarskie lub dzikie oraz na człowieka. Wyniki badań niektórych autorów wskazują, że psy i kotyzymane na fermach drobiu mogą przyczyniać się do występowania pasterellozy ptaków [Snipes i in. 1988, Van Sambeek i in. 1995, Muhairwa i in. 2001b]. Curtis i Ollerhead [1982] wykazali, że część szczepów *Pasteurella multocida*, izolowanych od kotów żyjących na fermach indyków, należy do tego samego serotypu co szczepy tej bakterii pochodzące od zakażonych ptaków, a także wykazuje patogenność dla kurcząt. Z kolei Korbel i in. [1992] stwierdzili, że zakażenia wywołane przez *Pasteurella multocida* u dziko żyjących ptaków mogą być konsekwencją ran kłasnanych powodowanych przez koty. Mimo tych przesłanek rzeczywiste znaczenie psów i kotów jako rezerwuaru bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* dla zwierząt gospodarskich pozostaje dość trudne do oceny [Muhairwa i in. 2001b].

Psy i koty stanowią również poważne źródło zakażeń drobnoustrojami z rodziny *Pasteurellaceae* u człowieka. Jest to stosunkowo dobrze poznany i udokumentowany problem epidemiologiczny [Weber i in. 1984, Holst i in. 1992, Talan i in. 1999, Donnio i in. 2004]. Zdecydowana większość tych infekcji powodowana jest przez różne gatunki z rodzaju *Pasteurella* (głównie *P. multocida*), chociaż opisywano także przypadki zakażeń wywołanych przez *Haemophilus haemoglobinophilus* [Frazer, Rogers 1972], Bisgaard Taxon 45 [Capitini i in. 2002] oraz Bisgaard Taxon 46 [Christensen i in. 2005]. Uważa się, że pałeczki *Pasteurella* sp. nie są typowymi komensalami błon śluzowych człowieka, jednak niekiedy stwierdza się nosicielstwo tych bakterii na błonie śluzowej gardła u osób mających częsty kontakt ze zwierzętami [Avril i in. 1990] albo w układzie oddechowym pacjentów z chorobami płuc [Weber i in. 1984]. Infekcje u ludzi powodowane przez przedstawicieli rodzaju *Pasteurella* sp. można podzielić na 3 grupy:

1. Zakażenia będące następstwem pogryzienia lub podrapania. Z uwagi na stosunkowo dużą liczbę przypadków pokąsań ludzi przez psy i koty oraz powszechne nosicielstwo pastereli w jamie ustnej tych zwierząt infekcje tego typu występują najczęściej. Drobnoustroje z rodzaju *Pasteurella* izolowane są z 50–75% zakażonych ran powodowanych przez koty i z 20–50% ran powodowanych przez psy [Talan i in. 1999, Taplitz 2004]. W wyniku zakażenia może dojść do tworzenia się ropni i zapalenia

tkanki podskórnej (*cellulitis*), a w przypadkach głębokich ran kończyn – do zapalenia pochewek ścięgowych, stawów i szpiku kostnego. Jako powikłania ran kłasnanych stwierdzano również posocznicę, zapalenie opon mózgowych, ropnie mózgu oraz zapalenie otrzewnej [Weber i in. 1984, Holst i in. 1992, Jones i in. 1999]. Gatunkami izolowanymi najczęściej są *Pasteurella multocida* (z ran kłasnanych powodowanych przez koty) oraz *P. canis* (z ran powodowanych przez psy) [Talan i in. 1999]. Ma to bezpośredni związek z częstością występowania tych bakterii w jamie ustnej obu gatunków zwierząt. Drobnoustroje z rodziny *Pasteurellaceae* były również stwierdzane w przypadkach zakażeń ran kłasnanych powodowanych u ludzi przez lwy, tygrysy oraz lamparty [Burdge i in. 1985, Christensen i in. 2005].

2. Zakażenia, często o ciężkim przebiegu, dotyczące układu oddechowego. Manifestują się one zapaleniem zatok przynosowych, zapaleniem płuc, ropniakami opłucnej oraz ropniami płuc [Weber i in. 1984, Arashima i in. 1992]. W większości przypadków kolonizacji lub infekcji układu oddechowego stwierdzano wcześniejszy kontakt pacjentów ze zwierzętami, a do zakażeń mogło dochodzić przez inhalację aerozolu zakaźnego lub, pośrednio, poprzez środowisko zanieczyszczone wydzielinami zwierząt [Chen i in. 2002].
3. Inne zakażenia układowe, jak np. posocznica, zapalenie opon mózgowych, zapalenie otrzewnej oraz ropnie w obrębie jamy brzusznej [Weber i in. 1984, Wallet i in. 2000, Cooke i in. 2004]. Również te infekcje w zdecydowanej większości przypadków można było powiązać z bezpośrednim lub pośrednim kontaktem ze zwierzętami domowymi [Holst i in. 1992].

Wielu autorów zwraca przy tym uwagę na wzrost liczby przypadków zakażeń bakteriami z rodzaju *Pasteurella* u ludzi w ostatnich latach [Weber i in. 1984, Arashima i in. 1992]. Jest to spowodowane m.in. częstszymi i ściślejszymi kontaktami pomiędzy ludźmi i zwierzętami towarzyszącymi.

Implikacje kliniczne i epidemiologiczne nosicielstwa drobnoustrojów z rodziny *Pasteurellaceae* u psów i kotów sprawiają, że dużego znaczenia nabiera szybka i precyzyjna diagnostyka mikrobiologiczna omawianej grupy bakterii. Dokładna identyfikacja izolowanego drobnoustroju pozwala nie tylko na określenie jego potencjalnej roli w procesie patologicznym, ale również na ustalenie ewentualnego źródła zakażenia, co ma szczególne znaczenie w zapobieganiu nawrotom infekcji, zwłaszcza u ludzi [Cooke i in. 2004]. Ponadto, niektórzy autorzy uważają, że poszczególne gatunki i podgatunki w obrębie rodzaju *Pasteurella* mogą wykazywać pewne różnice w zjadliwości, np. *P. multocida* bywa częściej izolowana z „poważniejszych przypadków zakażeń” u ludzi [Holst i in. 1992], w tym posocznicy. Stwierdzono także, że *P. multocida* subsp. *multocida* wykazuje większe powinowactwo do układu oddechowego i powoduje statystycznie częściej infekcje płuc niż *P. multocida* subsp. *septica*, która z kolei częściej izolowana jest z zakażonych ran kłasnanych powodowanych przez koty [Chen i in. 2002].

1.2. Identyfikacja bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*

Przez wiele lat identyfikacja drobnoustrojów z omawianej grupy opierała się głównie na badaniu cech fenotypowych, zwłaszcza biochemicznych i enzymatycznych. Również obecnie, mimo wprowadzenia wielu nowoczesnych metod z zakresu biologii molekularnej, identyfikacja fenotypowa jest główną procedurą stosowaną w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej [Dousse i in. 2008, Dziva i in. 2008]. Jednak już w latach 70. i 80. XX w. niektórzy autorzy

zwracali uwagę, że szczepy klasyfikowane do rodzaju *Pasteurella* (szczególnie *P. multocida* oraz *P. pneumotropica*) często wykazują dużą zmienność cech fenotypowych [Heddleston 1976, Svoboda i in. 1981]. Powodowało to problemy z definiowaniem oraz identyfikacją poszczególnych gatunków oraz wiązało się z istnieniem wielu biotypów, co dodatkowo utrudniało badania porównawcze dotyczące występowania i znaczenia epidemiologicznego tych bakterii [Bisgaard 1993, Christensen i in. 2004a]. Przeprowadzone badania genetyczne doprowadziły do reklasyfikacji rodzaju *Pasteurella* [Mutters i in. 1985], w wyniku której wyodrębniono kilka nowych gatunków tego rodzaju, a sam gatunek *P. multocida sensu stricto* został podzielony na 3 podgatunki. Konsekwencją opisanych zmian była konieczność rozszerzenia procedury diagnostycznej o dodatkowe testy. Obecnie identyfikacja fenotypowa *Pasteurellaceae* wymaga wykonania wielu różnorodnych prób biochemicznych (tab. 2), co sprawia, że diagnostyka tej grupy bakterii opierająca się na metodach tradycyjnych jest żmudna, pracochłonna i czasochłonna, a z uwagi na opisywane zróżnicowanie właściwości biochemicznych wśród szczepów należących do poszczególnych gatunków nie zawsze jest pewna [Lindberg i in. 1998, Petersen i in. 1998, Kuhnert i in. 2000, Christensen i in. 2004a]. Diagnostykę fenotypową utrudnia także fakt, że zminiaturyzowane systemy identyfikacyjne (API 20 NE, VITEK itp.), stosowane rutynowo przez wiele laboratoriów, również nie pozwalają na poprawną identyfikację poszczególnych gatunków *Pasteurellaceae* [Boot i in. 2004, Król i in. 2004, Dziva i in. 2008, Guillard i in. 2009, Akahane i in. 2011].

Cenną alternatywę identyfikacji fenotypowej bakterii stanowią metody genotypowe. Pozwalają one nie tylko na wykrywanie bakterii w materiale klinicznym oraz precyzyjną identyfikację szczepów, ale także na badanie ich potencjalnej patogenności poprzez wykrywanie sekwencji DNA kodujących poszczególne toksyny i inne czynniki zjadliwości [Dziva i in. 2008]. Analiza genotypowa szczepów bakteryjnych okazała się także znakomitym narzędziem badań filogenetycznych, pozwalającym na określanie pokrewieństwa poszczególnych jednostek taksonomicznych. W ostatnich kilkunastu latach duże znaczenie zyskała, jako metoda referencyjna, identyfikacja bakterii na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA (*rrs*), kodującego kwas rybonukleinowy wchodzący w skład małej podjednostki rybosomu bakteryjnego [Fredericks, Relman 1996, Clarridge 2004]. Gen *rrs* zawiera zarówno regiony konserwatywne (wspólne dla wielu różnych bakterii), jak i swoiste gatunkowo, co umożliwia identyfikację rodzaju lub gatunku izolowanego szczepu poprzez porównywanie określanych sekwencji z dostępnymi bazami danych [Mignard, Flandrois 2006]. Analiza sekwencyjna genu 16S rRNA okazała się także dobrą metodą wyznaczania zależności ewolucyjnych (tzw. drzew filogenetycznych) bakterii, w tym *Pasteurellaceae* [Dewhirst i in. 1992, Kuhnert i in. 2000, Christensen i in. 2004b, Hayashimoto i in. 2005]. Główną niedogodnością badań bazujących na porównywaniu sekwencji genu *rrs* wydaje się niedostateczne różnicowanie w obrębie niektórych grup bakterii [Fox i in. 1992, Mignard, Flandrois 2006]. Nowsze badania wykazały, że analiza sekwencyjna także innych genów (tzw. housekeeping genes, tj. genów konstytucyjnych niezbędnych do zapewnienia podstawowych funkcji komórki) może być dobrą metodą zarówno identyfikacji bakterii, jak i badań filogenetycznych [Christensen i in. 2004b, Korczak i in. 2004, Gautier i in. 2005, Cattoir i in. 2006]. Stwierdzono, że niektóre z tych genów, np. *rpoB*, *atpD* czy *sodA* (kodujące odpowiednio: podjednostkę β polimerazy RNA, podjednostkę β syntetazy ATP oraz manganozależną dysmutazę nadtlenkową) mogą charakteryzować się większym potencjałem różnicującym niż 16S rRNA, a przez to lepiej nadawać się do diagnostyki grup bakteryjnych zawierających wiele blisko spokrewnionych ze sobą gatunków [Mollet i in. 1997, Poyart i in. 1998, 2001].

Tabela 2
Table 2

Właściwości biochemiczne bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów (wg Mutters i in. 1985, Piechulla i in. 1986, Muhairwa i in. 2001a, Forsblom i in. 2002, Christensen i in. 2005, Garrity i in. 2005, Songer, Post 2005)

Biochemical properties of bacteria from the family *Pasteurellaceae* occurring in dogs and cats (according to Mutters et al. 1985, Piechulla et al. 1986, Muhairwa et al. 2001, Forsblom et al. 2002, Christensen et al. 2005, Garrity et al. 2005, Songer, Post 2005)

Właściwości Characteristics	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>septicaea</i>	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	<i>Pasteurella canis</i>	<i>Pasteurella dagmatis</i>	<i>Pasteurella stomatis</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	Bisgaard Taxon 16	Bisgaard Taxon 45	Bisgaard Taxon 46	<i>Pasteurella</i> species B
Oksydaza – Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaza – Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol – Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureaza – Urease	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Dekarboksylaza ornitynowa Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Tworzenie kwasu z: Acid from:												
glukozy – glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
maltozy – maltose	-	-	-	-	+	-	d	-	+	-	+	+
sacharozy – sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
mannozy – mannose	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+
mannitolu – mannitol	+	+	+	-	-	-	BD	+	-	-	-	+
trehalozy – trehalose	d	+	-	d	+	+	BD	-	+	-	-	+
sorbitolu – sorbitol	+	-	+	-	-	-	BD	-	-	+	+	-
dulcytolu – dulcitol	-	-	+	-	-	-	BD	-	-	d	-	+

+, reakcja dodatnia u $\geq 90\%$ szczepów; -, reakcja dodatnia u $\leq 10\%$ szczepów; d, reakcja dodatnia u 11–89% szczepów; BD, brak danych

+, 90% or more of the strains are positive; -, 10% or less of the strains are positive; d, 11–89% of the strains are positive; BD, no data exist

Metody genotypowe identyfikacji bakterii oparte na analizie sekwencyjnej określonych genów mają również pewne wady i ograniczenia [Mignard, Flandrois 2006]. Badane sekwencje muszą być dobrej jakości, tak aby otrzymywane chromatogramy nie sprawiały problemów przy interpretacji. W przypadku mieszanych hodowli bakteryjnych może dochodzić do powstawania sekwencji chimerycznych, uniemożliwiających prawidłowe rozpoznanie szczepu [Wang, Wang 1997]. Konieczne są również wiarygodne i dostatecznie obszerne bazy danych,

uwzględniające zróżnicowanie genetyczne szczepów bakteryjnych pochodzących od poszczególnych gospodarzy i z różnych rejonów geograficznych. Wykazano np. że szczepy *Pasteurella multocida*, izolowane od różnych gatunków zwierząt, mogą wykazywać znaczne różnice w obrębie genu 16S rRNA [Davies 2004]. Podobna sytuacja ma również miejsce w przypadku *P. pneumotropica* [Hayashimoto i in. 2005, Dole i in. 2010] oraz *P. dagmatis* [Sellyei i in. 2010]. Opisane zróżnicowanie genotypowe powoduje, że diagnostyka mikrobiologiczna oparta na analizie sekwencyjnej wymaga uwzględnienia danych klinicznych i epidemiologicznych, a nierzadko również umiejętności interpretacji wykresów filogenetycznych [Mignard, Flandrois 2006]. Sekwencjonowanie DNA jest ponadto procedurą stosunkowo drogą, wymagającą odpowiedniego sprzętu i wykwalifikowanego personelu, a przez to często niemożliwą do przeprowadzenia w typowej pracowni bakteriologicznej.

Optymalnym rozwiązaniem przy identyfikacji pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae*, zwłaszcza w przypadku szczepów o nietypowych właściwościach fenotypowych, byłoby zastosowanie gatunkowo-swoistych reakcji łańcuchowych polimerazy (PCR). Jednak opracowane do tej pory testy PCR przeznaczone są jedynie do identyfikacji *Pasteurella multocida* – przede wszystkim u zwierząt gospodarskich [Townsend i in. 1998, Miflin, Blackall 2001, Rocke i in. 2002] oraz *P. pneumotropica* [Nozu i in. 1999]. Brakuje natomiast tego typu metod do identyfikacji pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych głównie od psów i kotów (*P. canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis*, *Haemophilus haemoglobinophilus*). Z tego między innymi powodu duża część zawartych w piśmiennictwie danych dotyczących występowania oraz patogenności omawianej grupy bakterii zwierząt towarzyszących, a także ich znaczenia epidemiologicznego dla człowieka, została uzyskana na podstawie nie zawsze miarodajnych wyników badań fenotypowych. Sprawia to, że wiele zagadnień związanych z ekologią, chorobotwórczością oraz diagnostyką bakterii *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów nie zostało do końca wyjaśnionych.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Przeprowadzone w latach 2004–2007 badania własne wykazały, że bakterie należące do rodziny *Pasteurellaceae* są stosunkowo często izolowane od psów i kotów zdrowych, a także wykazujących różne objawy kliniczne [Król i in. 2004, 2005, 2008]. Szybka i dokładna identyfikacja poszczególnych gatunków z tej grupy wciąż napotyka na duże trudności, a rutynowo stosowane metody diagnostyczne są skomplikowane, pracochłonne i często nie umożliwiają jednoznacznego rozpoznania wyizolowanego szczepu. Z kolei metody genotypowe oparte na analizie sekwencyjnej określonych genów, ze względu na duży koszt i możliwe problemy z interpretacją wyników, nie są również wygodne w diagnostyce laboratoryjnej. Dlatego w publikacji podjęto próbę opracowania innych metod genotypowania, szczególnie z wykorzystaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej oraz analizy restrykcyjnej odpowiednich fragmentów DNA. Wydaje się, że zastosowanie gatunkowo-swoistych testów PCR mogłoby być optymalnym rozwiązaniem przy identyfikacji pałeczek *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów. Diagnostyka taka byłaby stosunkowo szybka i tania, umożliwiając jednocześnie dokładne rozpoznawanie badanych szczepów bakteryjnych przy znacznym uproszczeniu etapu badań biochemicznych.

Realizacja powyższego celu głównego mogłaby zapewnić osiągnięcie dalszych zamierzeń, takich jak:

- określenie istotnych (z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej) cech fenotypowych i genotypowych szczepów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od zwierząt towarzyszących;
- opracowanie procedur diagnostycznych, stanowiących kombinację metod fenotypowych i genotypowych, pozwalających na szybką i dokładną identyfikację wyizolowanych szczepów;
- ustalenie składu gatunkowego bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów zdrowych oraz w przypadkach infekcji.

W pierwszym etapie pracy dokonano izolacji i wstępnej identyfikacji fenotypowej szczepów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* od psów i kotów klinicznie zdrowych oraz wykazujących objawy zakażeń. W celu przeprowadzenia badań porównawczych dołączono do niniejszego opracowania również kilka izolatów pałeczek *Pasteurellaceae* pochodzących od dzikich kotowatych żyjących w ZOO we Wrocławiu.

Reprezentatywną grupę badanych izolatów (w tym wszystkie te izolaty, których właściwości fenotypowe nie umożliwiły rozpoznania gatunkowego) poddano identyfikacji poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA. Wykonana następnie analiza sekwencyjna pozwoliła na rozpoznanie zdecydowanej większości tych szczepów. Jednak różnice dotyczące sekwencji nukleotydów w obrębie genu 16S rRNA u poszczególnych gatunków pałeczek *Pasteurellaceae* okazały się zbyt małe, by gen ten mógł zostać wykorzystany jako matryca w gatunkowo-swoistych testach PCR (wyjątek stanowiły *Haemophilus haemoglobinophilus* i Bisgaard

Taxon 16, w przypadku których w tej publikacji zaprojektowano startery DNA specyficzne dla odpowiednich fragmentów genu 16S rRNA tych gatunków). Dlatego też jednym z kierunków przeprowadzonych badań było znalezienie takiego genu (genów), który wykazywałby większe zróżnicowanie gatunkowe pozwalające na realizację założonych celów pracy. Na podstawie danych z piśmiennictwa wytypowano fragment genu *kmt* jako matrycę w opracowywanej reakcji PCR do identyfikacji *Pasteurella multocida* oraz fragment genu *sodA*, który byłby poddawany amplifikacji w testach PCR specyficznych dla pozostałych badanych gatunków z rodzaju *Pasteurella* (*P. canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis*). Zaprojektowane startery, komplementarne do wyżej wymienionych fragmentów genów, zostały następnie użyte do serii testów PCR, których celem była weryfikacja wyników identyfikacji szczepów pałeczek *Pasteurellaceae* przy użyciu analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA. W dalszej kolejności, po wykazaniu skuteczności nowo opracowanej metody, przeprowadzono reakcje PCR mające na celu identyfikację wszystkich badanych izolatów.

Dodatkowo podjęto próbę opracowania metody wykorzystującej różnice genotypowe do identyfikacji podgatunków *Pasteurella multocida* występujących u psów i kotów.

W trakcie prowadzonych badań okazało się, że wszystkie wyosobnione od kotów izolaty, zidentyfikowane za pomocą zarówno metod fenotypowych, jak i swoistej w odniesieniu do tego gatunku reakcji PCR jako *Pasteurella dagmatis*, miały sekwencje genu 16S rRNA identyczne ze znajdującą się w GenBanku sekwencją jednego ze szczepów referencyjnych *Pasteurella pneumotropica*. Fakt ten mógłby istotnie obniżyć wartość diagnostyczną nowo opracowanej metody opartej na gatunkowo specyficznych testach PCR. W celu rozstrzygnięcia kwestii przynależności gatunkowej izolatów pochodzących od kotów, w prezentowanej publikacji przeprowadzono dodatkowo analizę sekwencyjną genów 16S rRNA oraz *rpoB* wspomnianych izolatów oraz szczepów *P. dagmatis* izolowanych od innych zwierząt (psów i tygrysa), a także porównanie sekwencji tych genów z analogicznymi sekwencjami *P. pneumotropica* uzyskanymi z GenBanku.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Szczepy terenowe

Ogółem, badania przeprowadzono na 150 terenowych szczepach bakterii zakwalifikowanych do rodziny *Pasteurellaceae* na podstawie właściwości fenotypowych opisanych w punkcie 3.5. Spośród badanych drobnoustrojów 145 izolatów zostało wyosobnionych od 72 kotów (75 izolatów) oraz 64 psów (70 izolatów). Zwierzęta, od których pobierano materiał, należały do różnych ras i obu płci oraz pochodziły z różnych miejscowości na terenie Polski zachodniej i południowej. Wśród nich były psy i koty zarówno klinicznie zdrowe, jak i wykazujące objawy zakażeń o różnej lokalizacji. Pozostałe 5 badanych szczepów pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* wyizolowano z jamy ustnej od dzikich kotowatych pochodzących z Ogrodu Zoologicznego we Wrocławiu: 2 lwów (3 izolaty) i 1 tygrysa (2 izolaty). Lista wszystkich badanych szczepów terenowych wraz z ich pochodzeniem przedstawiona została w załączniku 1.

Szczepy bakteryjne od zwierząt klinicznie zdrowych izolowane były z błony śluzowej jamy ustnej lub gardła. W przypadku dzikich kotowatych materiał do badań pobierany był przy okazji rutynowych zabiegów pielęgnacyjnych i/lub lekarsko-weterynaryjnych przeprowadzanych przez obsługę zwierząt w ZOO. Materiał do badań od zwierząt wykazujących objawy kliniczne stanowiły wymazy nadsyłane do Zakładu Mikrobiologii przez różne zakłady lecznicze dla zwierząt.

Od większości badanych zwierząt wyosobniono po jednym izolacie bakteryjnym. Natomiast w przypadku 11 zwierząt (w tym 6 psów, 3 kotów, 1 lwa i 1 tygrysa) z badanego materiału uzyskano po 2 izolaty. Były one jednak traktowane w tej pracy jako odrębne szczepy ze względu na fakt, że różniły się właściwościami fenotypowymi lub należały do różnych gatunków z rodziny *Pasteurellaceae*.

3.2. Opinia Lokalnej Komisji Etycznej

Zgodnie z opinią II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu z dnia 22.01.2010 r. opisana powyżej procedura pobierania materiału od zwierząt zdrowych nie nosi znamion doświadczenia w rozumieniu Ustawy o doświadczeniach na zwierzętach z 21.01.2005 r. i nie podlega ocenie Komisji.

3.3. Szczepy referencyjne i kontrolne

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano ponadto następujące szczepy bakteryjne:

- Szczepy referencyjne uzyskane z kolekcji Uniwersytetu w Göteborgu (Culture Collection, University of Göteborg, CCUG) w Szwecji.

1. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* CCUG 26985
 2. *Pasteurella multocida* subsp. *septica* CCUG 27002
 3. *Pasteurella canis* CCUG 32817
 4. *Pasteurella stomatis* CCUG 48849
 5. *Pasteurella dagmatis* CCUG 32658
 6. *Pasteurella pneumotropica* CCUG 47008
 7. *Haemophilus haemoglobinophilus* CCUG 20967
 8. Bisgaard Taxon 16 CCUG 55993
 9. CDC Group EF-4a CCUG 1976
- Szczepy kontrolne (z kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii UP we Wrocławiu). Szczepy te zostały zidentyfikowane za pomocą metod fenotypowych oraz poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA (w nawiasach podano pochodzenie szczepu).
 1. *Mannheimia varigena*, szczep 137/07 (cieleń, płuca)
 2. *Escherichia coli*, szczep 558/09 (pies, kał)
 3. *Bergeyella zoohelcum*, szczep 249/1 (pies, gardło)
 4. *Bordetella bronchiseptica*, szczep 327/10 (pies, tchawica)
 5. *Neisseria weaveri*, szczep 260/11 (pies, oskrzela)

3.4. Izolacja i przechowywanie szczepów

Do izolacji szczepów terenowych użyto podłoża agarowego z krwią (Trypcase-soy Agar – bioMérieux, Francja, z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej) (fot. 1 i 2). Równolegle, badany materiał posiewany był na podłoże Mac Conkey'a (bioMérieux). Pożywki inkubowano w warunkach tlenowych, w temp. 37°C przez 24–48 godz. Wyizolowane kolonie bakteryjne przesiewane były na agar z krwią, a następnie przeprowadzano badania fenotypowe oraz izolację DNA bakteryjnego.

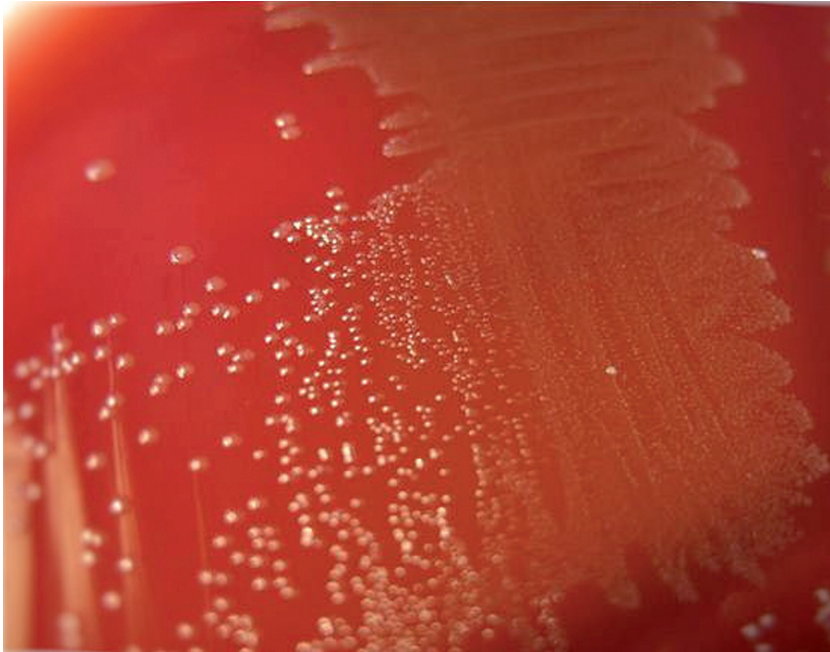
Do przechowywania badanych szczepów zastosowano ampułki systemu VIABANK (Medical Wire & Equipment, Wielka Brytania), które przechowywano w temp. -80°C.

3.5. Badanie mikroskopowe i próby biochemiczne

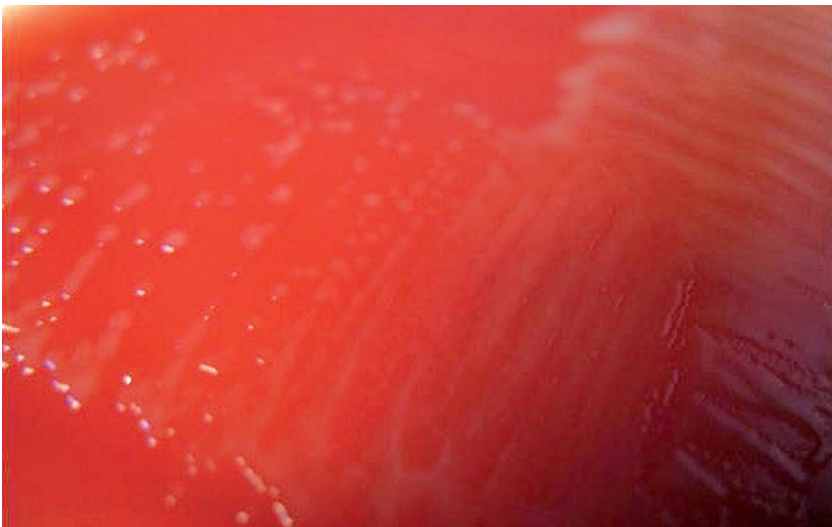
Badania wstępne obejmowały: barwienie metodą Grama, próbę na katalazę, oksydazę cytochromową (z użyciem odczynnika Oxidase Reagent–bioMérieux), indol (na bulionie tryptofanowym [Beef Extract – Difco, USA, 3,0 g, Bacto-Tryptone – Difco 10,0 g, NaCl 5,0 g, woda dest. 1000 ml], do którego po inkubacji dodawano odczynnika Ehrlicha) (fot. 3) oraz na oksydację/fermentację glukozy (na podłożu OF Medium–bioMérieux).

Próba na ureazę. Zdolność do rozkładu mocznika badano na podłożu Christensena wzbogaconym w wyciąg wątrobowy i glukozę [Forsblom i in. 2003] (fot. 4).

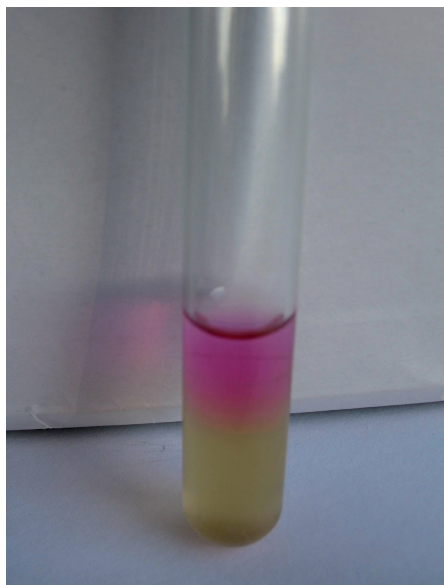
Próba na dekarboksylazę ornitynową (ODC). Próbę tę przeprowadzano przy użyciu tabletek diagnostycznych ODC (Rosco Diagnostica, Dania). W próbkach aglutynacyjnych 10 x 100 mm zawierających 0,25 ml gęstej zawiesiny badanego szczepu w płynie fizjologicznym (o gęstości min. 4 w skali McFarlanda) umieszczano tabletkę ODC, a następnie powierzchnię zawiesiny pokrywano płynną parafiną. Zawiesinę bakteryjną inkubowano przez 72 godz. w temp. 37°C. Wynik dodatni reakcji manifestował się wystąpieniem zabarwienia ciemnoniebieskiego lub fioletowego, natomiast ujemny – szarego lub jasnyniebieskiego (fot. 5).



Fot. 1. Kolonie *Pasteurella dagmatis* na podłożu agarowym z krwią (typ S-gładki)
Phot. 1. Colonies of *Pasteurella dagmatis* on blood agar (smooth or S-type)



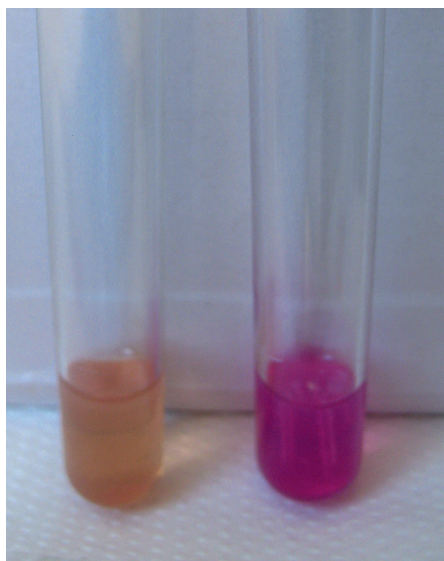
Fot. 2. Kolonie *Pasteurella multocida* na podłożu agarowym z krwią (typ M-śluzowy)
Phot. 2. Colonies of *Pasteurella dagmatis* on blood agar (mucooid or M-type)



Fot. 3. Wynik dodatni próby na indol
w bulionie tryptofanowym
Phot. 3. A positive indole test
in tryptophan broth



Fot. 5. Wynik ujemny (po lewej)
oraz dodatni (po prawej)
próby na dekarboksylazę ornitynową
Phot. 5. Negative (left) and positive (right)
ornithine decarboxylase tests



Fot. 4. Wynik ujemny (po lewej)
oraz dodatni (po prawej)
próby na urazę w podłożu Christensena
Phot. 4. Negative (left) and positive (right)
urease tests in Christensen medium

Wytwarzanie kwasu (oraz ewentualnie gazu) z węglowodanów. Zastosowano podłoże agarowe CTA Medium (Becton Dickinson, Francja) [Namioka 1978] z czerwonią fenolową jako wskaźnikiem pH. Badane węglowodany (glukoza, maltoza, mannoza, sacharoza, trehaloza, mannitol, sorbitol, dulcitol) dodawane były w ilości 1%. Reakcje odczytywano po 24, 48 i 72 godz. inkubacji. O wyniku dodatnim świadczyła zmiana barwy podłoża z czerwonej na pomarańczową lub żółtą (fot. 6). Dodatkowo, wytwarzany przez badaną bakterię gaz widoczny był w podłożu w postaci pęcherzyków.

Próba na α -glukozydazę. Próba ta jest jedną z metod fenotypowych pozwalających na różnicowanie podgatunków *Pasteurella multocida* [Hunt Gerardo i in. 2001, Garrity i in. 2005]. Test na α -glukozydazę wykonywano w przypadku izolatów zidentyfikowanych jako *P. multocida*. Wykorzystano do tego celu tabletki diagnostyczne Alpha Glucosidase firmy Rosco Diagnostica (Dania). Tabletkę umieszczano w próbówce z 0,25 ml gęstej zawiesiny szczepu w płynie fizjologicznym, a następnie zawiesinę inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez 24 godz. O wytwarzaniu α -glukozydazy świadczyło pojawienie się żółtej barwy płynu (fot. 7).

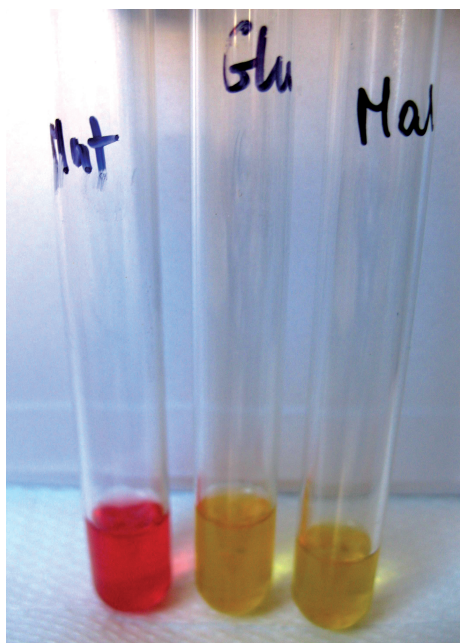
3.6. Izolacja DNA bakterii

Ekstrakcję genomowego DNA badanych bakterii przeprowadzano przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska) według instrukcji producenta. Komórki bakteryjne z 24-godzinnej hodowli na podłożu agarowym z krwią zawieszano w buforze Tris (10 mM TRIS-HCl, pH 8,5), a następnie poddawano lizie przy udziale buforu LT (zawierającego sole chaotropowe i detergenty niejonowe) oraz proteiny K. Z kolei mieszaninę наносzono na minikolumnę ze złożem krzemionkowym wiążącym DNA. Po przemyciu kolumny z resztek zanieczyszczeń, DNA wyplukiwane było buforem Tris ogrzanym do temp. 75°C.

3.7. Identyfikacja szczepów na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA

Sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA przeprowadzono u 91 wybranych izolatów terenowych należących do *Pasteurellaceae* (w tym u wszystkich 40 izolatów nie zidentyfikowanych metodami fenotypowymi). Podobnej procedurze poddano także szczepy kontrolne. Do amplifikacji fragmentu genu o wielkości 918 p.z. zastosowano następującą parę starterów: 16S-27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') oraz 16S-907r (5'- CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT -3') [<http://rdna4.ridom.de/static/primer.html>]. Mieszanina reakcyjna (25 μ l) zawierała 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l KCl, 0,08% Nonidet P40 (Fermentas, Litwa), po 5 pmoli starterów, po 0,2 mmol/l każdego deoksyrybonukleotydu (Fermentas), 2 U polimerazy Taq (Fermentas) oraz 2 μ l DNA. Reakcja PCR obejmowała 40 cykli, na które składały się kolejno: denaturacja (w temp. 94°C przez 30 sek.), przyłączanie starterów (50°C przez 30 sek.) oraz wydłużanie starterów (72°C przez 120 sek.). Produkt PCR był następnie oczyszczany poprzez dodanie do 5 μ l mieszaniny reakcyjnej 10 U egzonukleazy I *E. coli* (Exonuclease I, Fermentas) oraz 2 U termowrażliwej fosfatazy zasadowej (FastAP™, Fermentas). Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie Genomed Sp. z o.o. w Warszawie przy użyciu sekwenatora ABI Prism™ DYEnamic ET.

Otrzymane sekwencje DNA były następnie porównywane z sekwencjami dostępnymi w GenBanku przy użyciu programu BLAST [Altschul i in. 1990].



Fot. 6. Wynik ujemny (po lewej) oraz dodatni (w środku i po prawej) rozkładu węglowodanów (w podłożu CTA)
 Phot. 6. Negative (left) and positive (middle and right) carbohydrate fermentation tests (in CTA medium)



Fot. 7. Wynik ujemny (po lewej) oraz dodatni (po prawej) próby na α -glukozydazę
 Phot. 7. Negative (left) and positive (right) α -glucosidase tests

3.8. Opracowanie starterów swoistych gatunkowo oraz warunki PCR

Do identyfikacji genotypowej *Pasteurella multocida* użyte zostały dwa zestawy starterów:

1. startery KMT1T7 i KMT1SP6, opisane przez Townsend i in. [1998]. Oligonukleotydy te amplifikują fragment genu *kmt* (kodującego białko KMT-1 błony zewnętrznej) o wielkości ok. 460 p.z.
2. Nowe startery (KMTJB-for oraz KMTJB-rev) zaprojektowane w tej publikacji na podstawie analizy sekwencyjnej dostępnych w GenBanku sekwencji *P. multocida*. Startery te oskrzydlały bardziej konserwatywny fragment genu *kmt*, dając produkt o wielkości 168 p.z. Homologiczne sekwencje DNA porównywane były przy użyciu programu komputerowego BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Do identyfikacji *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis* oraz *P. pneumotropica* zaprojektowano startery komplementarne do specyficznych dla poszczególnych gatunków fragmentów genu *sodA*, kodującego enzym manganozależną dysmutazą nadtlennkową. Startery opracowane zostały przy użyciu programu Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft International). Startery specyficzne dla *Haemophilus haemoglobinophilus* oraz Bisgaard Taxon 16 zostały zaprojektowane na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA tych gatunków. Porównywano przy tym zarówno sekwencje dostępne w GenBanku, jak i uzyskane poprzez sekwencjonowanie szczepów terenowych obu gatunków bakterii.

Wszystkie startery opracowane w niniejszej pracy do identyfikacji gatunków *Pasteurella-ceae* izolowanych od psów i kotów przedstawione zostały w tabeli 3.

W celu potwierdzenia specyficzności gatunkowej zaprojektowanych oligonukleotydów przeprowadzono w pierwszym etapie szereg specyficznych reakcji PCR z użyciem jednej pary starterów. Metodę tę zastosowano (w różnych kombinacjach) w odniesieniu do szczepów referencyjnych oraz kontrolnych, a także do izolatów terenowych identyfikowanych za pomocą sekwencjonowania genu 16S rRNA. Reakcja amplifikacji wykonywana była w mieszaninie (25 µl) zawierającej 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l KCl, 0,08% Nonidet P40, po 20 pmol każdego startera, 0,2 mmol/l każdego deoksyrybonukleotydu, 1 U polimerazy Taq oraz 1 µl DNA. Reakcja obejmowała 35 cykli, na które składały się kolejno: denaturacja DNA w temp. 94°C przez 30 sek., przyłączanie starterów – w temp. 52°C (w przypadku identyfikacji *P. stomatis* oraz *H. haemoglobinophilus*) lub 57°C (w odniesieniu do pozostałych gatunkowo swoistych reakcji PCR) przez 30 sek. oraz wydłużanie starterów w temp. 72°C przez 30 sek. Produkty PCR (7,5 µl) były wybarwiane za pomocą bromku etydyny, a następnie poddawane elektroforezie w 2% żelu agarozowym (Prona) i uwidaczniane za pomocą systemu GelDoc XR (BioRad, Polska).

Zaprojektowane startery zostały użyte w trakcie pracy do identyfikacji pozostałych badanych szczepów terenowych.

Tabela 3

Table 3

Startery PCR zaprojektowane do identyfikacji *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. pneumotropica*, *H. haemoglobinophilus* oraz Bisgaard Taxon 16
 PCR primers designed for detection of *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. pneumotropica*, *H. haemoglobinophilus* and Bisgaard Taxon 16

Gatunek bakterii (gen) Bacterial species (gene)	Oznaczenie starterów Primer designation	Sekwencja starterów (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Wielkość produktu (p.z.) Amplicon size (bp)
<i>Pasteurella multocida</i> (<i>kmt</i>)	KMTJB-for KMTJB-rev	TGCCACTTGAAATGGGAAATG AATAACGTCCAATCAGTTGCG	168
<i>Pasteurella canis</i> (<i>sodA</i>)	Pcanissod-for Pcanissod-rev	GTAAATAATGCAAATGCGG GCCTTGCAAAGTAGTAC	186
<i>Pasteurella stomatis</i> (<i>sodA</i>)	Pstomsod-for Pstomsod-rev	CTCAGCAAATTATCGCTCGTC TGCCCAGCCTGAACCGAAACGA	218
<i>Pasteurella dagmatis</i> (<i>sodA</i>)	Pdagmsod-for Pdagmsod-rev	TAACAACGCTAACGCAGCGT CACCTTGTAATGTTGTACCT	184
<i>Pasteurella pneumotropica</i> (<i>sodA</i>)	Ppneumsod-for Ppneumsod-rev	GGTTTACCGGCTGAATTTACAGA- AATT ATGATTTGCATGGCCACCCGCA	116
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i> (<i>rrs</i>)	Hh-for Hh-rev	GGATAACCATTGGAAACGATG TCCTAAATGCTATTAACAT	329
Bisgaard Taxon 16 (<i>rrs</i>)	BT16-for BT16-rev	TAAAGACTGGGACCTACGGGCCAGT TACCAACTCTATTAAGTTGATA	284

3.9. Identyfikacja genotypowa podgatunków *Pasteurella multocida* izolowanych od psów i kotów

Do różnicowania *P. multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica* opracowano nową metodę genotypową opierającą się na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) fragmentu genu 16S rRNA. Na podstawie dostępnych w GenBanku sekwencji 16S rRNA *P. multocida* sporządzono mapę restrykcyjną, wykorzystując program komputerowy BioEdit. Do reakcji trawienia wybrano fragment wspomnianego genu wielkości 505 par zasad, zawierający region różnicujący oba podgatunki oraz miejsca rozpoznawane przez enzym restrykcyjny Ecl136II (5'.GAG↓CTC..3'). Do reakcji amplifikacji polimorficznego fragmentu 16S rRNA użyto następujących starterów:

- For: 5'-AAACTYAAAAGAATTGACGG-3'
- Rev: 5'-GTGTGACGGGCGGTGTGTAC-3'

Reakcję PCR wykonywano tak, jak podano w punkcie 3.7.

Trawienie przeprowadzano w temp. 37°C przez 1,5 godz., w mieszaninie zawierającej 10 µl produktu PCR, 1,5 µl enzymu Ecl136II (Fermentas), 3 µl 10×Buforu Ecl136II oraz 16 µl wody. Produkt reakcji (25 µl) poddawano następnie elektroforezie w 2,5% żelu agarozowym (Prona) barwionym bromkiem etydyny.

3.10. Analiza sekwencyjna genów 16S rRNA i *rpoB* szczepów *Pasteurella dagmatis*

Do badania użyto 16 szczepów terenowych, rozpoznanych jako *P. dagmatis* na podstawie badań fenotypowych oraz dodatkowo reakcji ze starterami specyficznymi dla tego gatunku. Wśród tych izolatów 11 było izolowanych od kotów, 4 od psów i 1 od tygrysa syberyjskiego. Dodatkowo, wykorzystano szczep referencyjny *P. dagmatis* CCUG32658 (pochodzący od psa).

Amplifikację fragmentów genów 16S rRNA oraz *rpoB* przeprowadzono z użyciem starterów podanych w tabeli 4. Reakcję PCR, oczyszczanie produktów oraz ich sekwencjonowanie wykonywano tak, jak podano w punkcie 3.7.

Badane szczepy *P. dagmatis* poddano dodatkowo identyfikacji genotypowej opartej na analizie sekwencyjnej genu 16S rRNA (przy użyciu algorytmu BLAST).

Tabela 4

Table 4

Startery PCR do amplifikacji genów 16S rRNA oraz *rpoB* *Pasteurella dagmatis*
PCR primers for amplification of the 16S rRNA and *rpoB* genes of *Pasteurella dagmatis*

Gen Gene	Sekwencja starterów (5' → 3') Primer sequence (5'→3')	Wielkość produktu (p.z.) Amplicon size (bp)	Poz. piśm. Reference
16S rRNA	For: AGAGTTTGATCATGGCTCAG Rev: GTGTGACGGGCGGTGTGTAC	1403	Kuhnert i in./et al. 1996
<i>rpoB</i>	For: GCAGTGAAAGARTTCTTTGGTTC Rev: GTTGCATGTTNGACCCAT	560	Korczak i in./et al. 2004

3.11. Analiza porównawcza sekwencji genów 16S rRNA i *rpoB* psich i kocich szczepów *Pasteurella dagmatis* oraz innych przedstawicieli rodziny *Pasteurellaceae*

Poznanie sekwencji nukleotydów fragmentów genów 16S rRNA i *rpoB* u *P. dagmatis* umożliwiło przeprowadzenie badań filogenetycznych określających wzajemne pokrewieństwo różnych szczepów tego gatunku bakterii, a także ich pokrewieństwo z innymi gatunkami rodzaju *Pasteurella*. W badaniach tych uwzględniono 16 izolatów *P. dagmatis* uzyskanych podczas badań własnych (w tym 11 izolowanych od kotów, 4 od psów oraz 1 od tygrysa syberyjskiego). Pozostałe sekwencje obu analizowanych genów uzyskane zostały z GenBanku. Oznaczenia tych sekwencji przedstawione zostały w tabeli 5.

Tabela 5

Table 5

Sekwencje nukleotydowe szczepów *Pasteurella* sp. oraz Bisgaard taxon 46 (uzyskane z GenBanku) wykorzystane do analiz filogenetycznych
Nucleotide sequences of *Pasteurella* sp. and Bisgaard taxon 46 strains (obtained from GenBank) used for phylogenetic studies

Gatunek/takson Species/taxon	Oznaczenie szczepu ¹ Strain designation	Oznaczenie sekwencji w GenBanku GenBank accession no.	
		16S rRNA	rpoB
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	ATCC 43137 ^T	AF294410	AY170216
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	Group37/9	EF579820	EF579861
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	CCUG 17977 ^T	AF294411	AY362970
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	Clin126	EF579834	EF579875
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	NCTC 10204 ^T	AY078998	AY362969
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	MCCM 00021	AF224297	–
<i>P. dagmatis</i>	CCUG 12397 ^T	AY362920	AY362966
<i>P. dagmatis</i> -like	1/1	GU177867	–
<i>P. dagmatis</i> -like	5/8	GU177868	–
<i>P. dagmatis</i> -like	8/4	GU177869	–
<i>P. stomatis</i>	CCUG 17979 ^T	AY362925	AY362971
<i>P. stomatis</i>	ATCC 43327	M75050	–
<i>P. canis</i>	CCUG 12400 ^T	AY362919	AY314038
<i>P. canis</i>	Group241/11	EF579840	EF579881
<i>P. pneumotropica</i>	NCTC 10827	AF224296	–
<i>P. pneumotropica</i>	CNP 160	AF012090	–
<i>P. pneumotropica</i>	NCTC 8141 ^T	AF362924	AY314034
<i>P. pneumotropica</i>	Q480011-V1	DQ875933	FJ685634
Bisgaard taxon 46	CDC A996	AY683491	AY683510
Bisgaard taxon 46	CDC F4646	AY683492	–

¹ CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Szwecja; NCTC, National Collection of Type Cultures, Wielka Brytania; MCCM, Medical Culture Collection Marburg, Niemcy; ATCC, American Type Culture Collection, Stany Zjednoczone; CNP, Centre National des Pasteurella, Francja; CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Stany Zjednoczone; ^T, szczep typowy
CCUG, Culture Collection, University of Göteborg, Sweden; NCTC, National Collection of Type Cultures, UK; MCCM, Medical Culture Collection Marburg, Germany; ATCC, American Type Culture Collection, USA; CNP, Centre National des Pasteurella, France; CDC, Centers for Disease Control and Prevention, USA; ^T, type strain

Wszystkie sekwencje zostały zestawione i wzajemnie dopasowane (multiple alignment) przy użyciu programu ClustalW (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Do badań porównawczych wybrano fragment genu 16S rRNA o długości 1308 p.z. (odpowiadający pozycjom 83-1390 w sekwencji *Escherichia coli* J01859 w GenBanku) oraz fragment genu *rpoB* o długości 501 p.z. (odpowiadający pozycjom 1543–2043 w sekwencji *E. coli* AB488804). Analizę pokrewieństwa szczepów *P. dagmatis* przeprowadzono za pomocą programu komputerowego MEGA (wersja 3.1) [Kumar i in. 2004]. Drzewa filogenetyczne (dendrogramy) konstruowane były przy użyciu metody najbliższego sąsiedztwa (neighbour-joining), weryfikowane dodatkowo próbą bootstrap zastosowaną dla 500 powtórzeń.

3.12. Różnicowanie szczepów *Pasteurella dagmatis* występujących u psów i kotów

Do odróżniania psich i kocich izolatów *P. dagmatis* opracowano nową procedurę opartą na metodzie PCR-RFLP, wykorzystującą różnice w położeniu miejsc restrykcyjnych w obrębie genu 16S rRNA tych szczepów. Na podstawie poznanych sekwencji genu *rrs* sporządzono jego mapę restrykcyjną (przy wykorzystaniu programu komputerowego BioEdit). Do reakcji trawienia wybrano fragment genu wielkości 476 par zasad, zawierający region polimorficzny rozpoznawany przez enzym restrykcyjny TaqI (5'.T↓CGA..3'). Reakcja amplifikacji tego fragmentu DNA przeprowadzona została przy użyciu następujących starterów: for 5'-CGA-ACGGTAGCAGGAAGAAAGCTTG-3' oraz rev 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' i wykonywana była analogicznie jak w punkcie 3.7. Trawienie przeprowadzano w temp. 65°C przez 60 min, w mieszaninie zawierającej 1 µl (10 U) enzymu TaqI (Fermentas), 3 µl 10× buforu TaqI, 10 µl produktu PCR oraz 16 µl wody. Produkt reakcji (15 µl) poddawano następnie elektroforezie w 2,5% żelu agarozowym (Prona) barwionym bromkiem etydyny.

3.13. Oznaczenia nowych sekwencji DNA umieszczonych w GenBanku

Otrzymane w niniejszym opracowaniu sekwencje genów 16S rRNA oraz *rpoB* *Pasteurella dagmatis* (p. zał. 2) przesłane zostały do GenBanku i oznaczone w następujący sposób:

- fragment genu 16S rRNA, o wielkości 1338 p.z., ze szczepu 197 *Pasteurella dagmatis* izolowanego od tygrysa: **HQ538835**
- fragment genu 16S rRNA, o wielkości 1338 p.z., ze szczepu 247 *Pasteurella dagmatis* izolowanego od kota: **HQ538836**
- fragment genu 16S rRNA, o wielkości 1338 p.z., ze szczepu 243 *Pasteurella dagmatis* izolowanego od kota: **HQ538837**
- fragment genu *rpoB*, o wielkości 501 p.z., ze szczepu 247 *Pasteurella dagmatis* izolowanego od kota: **HQ538838**
- fragment genu *rpoB*, o wielkości 501 p.z., ze szczepu 197 *Pasteurella dagmatis* izolowanego od tygrysa: **HQ538839**

4. WYNIKI

4.1. Właściwości biochemiczne oraz identyfikacja fenotypowa pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów

Na podstawie wstępnych badań fenotypowych (p. punkty 3.4 i 3.5) do rodziny *Pasteurellaceae* zakwalifikowano izolaty będące Gram-ujemnymi ziarniako-pałeczkami lub małymi pałeczkami, wytwarzające na podłożu agarowym z krwią kolonie szare, o średnicy 1–2 mm, niehemolizujące, nierosnące na podłożu Mac Conkey'a, katalazo- i oksydazododatnie, fermentujące glukozę na podłożu OF Medium. Dalszą identyfikację przeprowadzono opierając się na o właściwościach biochemicznych przedstawionych w tabeli 2. Ogółem, wykonane badania biochemiczne umożliwiły identyfikację 110 ze 150 analizowanych szczepów bakterii (73,3%, tab. 6).

Tabela 6

Table 6

Identyfikacja fenotypowa szczepów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotowatych*

Phenotypic identification of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids*

Gatunek/takson Species/taxon	Liczba izolatów ogółem [§] Total No. of isolates [§]	Liczba (%) szczepów zidentyfikowanych za pomocą metod fenotypowych No. (%) of strains identified by phenotypic methods
<i>Pasteurella multocida</i>	68	66 (97,1)
<i>Bisgaard Taxon 16</i>	34	22 (64,7)
<i>Pasteurella canis</i>	19	2 (10,5)
<i>Pasteurella dagmatis</i>	16	16 (100)
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	7	0
<i>Pasteurella stomatis</i>	6	4 (66,7)
RAZEM – TOTAL	150	110 (73,3)

* szczepy izolowane od 72 kotów, 64 psów, 2 lwów oraz 1 tygrysa; [§] przynależność gatunkowa badanych izolatów ustalona została za pomocą kombinacji metod fenotypowych, analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA oraz gatunkowo swoistych testów PCR

* strains isolated from 72 cats, 64 dogs, 2 lions and 1 tiger; [§] strains have been finally identified using a combination of phenotypic methods, 16S rRNA sequence analysis and PCR assays with species-specific primers

Zastosowane metody fenotypowe okazały się najbardziej skuteczne w identyfikacji *Pasteurella dagmatis* oraz *P. multocida* – z wyjątkiem dwóch szczepów *P. multocida* wszystkie izolaty należące do tych gatunków zostały rozpoznane poprawnie. Odsetek szczepów zidentyfikowanych był znacznie niższy w przypadku *P. stomatis* i Bisgaard Taxon 16 (wynosił on odpowiednio 66,7 i 64,7%), nie udało się natomiast rozpoznać ani jednego izolatu *Haemophilus haemoglobinophilus* oraz większości badanych szczepów *P. canis*.

Właściwości biochemiczne badanych szczepów należących do rodziny *Pasteurellaceae* przedstawione zostały w tabeli 7. Wszystkie izolaty zakwalifikowane do gatunku *Pasteurella multocida* były indolododatnie oraz wytwarzały kwas z glukozy, mannozy, sacharozy i mannitolu, przy czym reakcje te były widoczne zazwyczaj już po 24 godz. inkubacji. Zdecydowana większość (97,1%) szczepów tej bakterii wytwarzała także dekarboksylazę ornityny. Znacznie rzadziej obserwowano zdolność rozkładu maltozy (jedynie u 19,1% szczepów), natomiast żaden badany izolat nie wytwarzał ureazy, ani nie fermentował dulcytolu. W przypadku pozostałych przeprowadzonych prób biochemicznych (produkcja kwasu z trehalozy i sorbitolu oraz wytwarzanie α -glukozydazy) **uzyskiwano zróżnicowane wyniki, przy czym stwierdzono pewne różnice dotyczące tych właściwości u obu izolowanych podgatunków *P. multocida* (subsp. *multocida* i subsp. *septica*, p. punkt 4.5).**

Badane izolaty *P. canis* cechowały się znacznie słabiej wyrażonymi właściwościami biochemicznymi, zwłaszcza w odniesieniu do reakcji tworzenia kwasu z węglowodanów. Na podłożu CTA jedynie w przypadku 10 szczepów (52,6%) stwierdzono rozkład glukozy z wytworzeniem kwasu; jeszcze mniejszy odsetek izolatów (5,3–36,8%) dał wynik dodatni w reakcji rozkładu maltozy, mannozy, sacharozy i trehalozy. Pozostałe badane węglowodany nie były rozkładane w ogóle. Dlatego też właściwościami o największym znaczeniu w diagnostyce fenotypowej *P. canis* były próba na indol oraz na dekarboksylazę ornitynową (wynik dodatni stwierdzono u, odpowiednio, 100 i 84% szczepów).

W odróżnieniu od poprzedniego gatunku szczepy należące do *Pasteurella dagmatis* okazały się dość łatwe do identyfikacji biochemicznej ze względu na zdolność wytwarzania ureazy (cecha stwierdzona u wszystkich badanych izolatów). *P. dagmatis* charakteryzowała się ponadto stosunkowo silnie wyrażonymi właściwościami rozkładu węglowodanów (glukoza, maltoza, mannoza, sacharoza i trehaloza trawione były praktycznie przez wszystkie szczepy z wytworzeniem po 24 godz. inkubacji kwasu, a w niektórych przypadkach także gazu). Wszystkie szczepy produkowały też indol na podłożu tryptofanowym. Natomiast rzadko miało miejsce rozkład sorbitolu (cecha stwierdzona w 2 przypadkach, w tym u szczepu izolowanego od tygrysa) oraz mannitolu (w 1 przypadku). Jeden szczep (pochodzący od psa) okazał się dodatni w próbie na dekarboksylazę ornitynową.

Właściwości biochemiczne szczepów należących do *Pasteurella stomatis* oraz Bisgaard Taxon 16 (BT16) były często do siebie podobne. Oba gatunki były ureazo- i ODC-ujemne, nie tworzyły też kwasu z mannitolu (z wyjątkiem jednego szczepu BT16), sorbitolu i dulcytolu. W przypadku pozostałych użytych węglowodanów nierzadko obserwowano reakcję słabą lub opóźnioną (wynik dodatni stwierdzano dopiero po 48–72 godz.; miało to miejsce zwłaszcza w przypadku BT 16). Badane szczepy *P. stomatis* nie tworzyły kwasu z maltozy, natomiast izolaty należących do Bisgaard Taxon 16 były w zdecydowanej większości (94,1%) maltozododatnie. Zdolność do produkcji indolu przez Bisgaard Taxon 16 była często zróżnicowana – stwierdzano szczepy indoloujemne, słabo dodatnie (większość), a także takie, które dawały reakcję mocną.

Przeprowadzona diagnostyka fenotypowa nie pozwoliła na identyfikację ani jednego z 7 szczepów rozpoznanych przy użyciu metod genotypowych jako *Haemophilus haemoglobinophilus*. Izolaty te cechowały się dość zróżnicowanymi właściwościami biochemicznymi. Wszystkie wytwarzały indol z tryptofanu oraz kwas z glukozy i sacharozy, a także dawały reakcję ujemną na ureazę, sorbitol i dulcitol. Natomiast aktywność sacharolityczną w odniesieniu do mannitolu, trehalozy i mannozy stwierdzono jedynie u stosunkowo niewielkiego odsetka izolatów (14,3–42,9%). Jeden z badanych szczepów *H. haemoglobinophilus* (mannitolododatni i ODC-dodatni) został błędnie rozpoznany jako *Pasteurella multocida*, natomiast inny, mannitoloujemny i ODC-dodatni – jako *P. canis*.

Tabela 7

Table 7

Właściwości fenotypowe bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotowatych*
Phenotypic characteristics of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids*

Właściwości Characteristics	Liczba (odsetek) szczepów dających wynik dodatni No. (%) of strains giving a positive reaction					
	<i>P. multocida</i> (n=68)	<i>P. canis</i> (n=19)	<i>P. dagmatis</i> (n=16)	<i>P. stomatis</i> (n=6)	<i>H. haemoglobinophilus</i> (n=7)	Bisgaard Taxon 16 (n=34)
1	2	3	4	5	6	7
Indol – Indole	68 (100)	19 (100)	16 (100)	6 (100)	7 (100)	27 (79,4)
Ureaza – Urease	0	0	16 (100)	0	0	0
Dekarboksylaza ornityny Ornithine decarboxylase	66 (97,1)	16 (84,2)	1 (6,3)	0	2 (28,6)	0
Wytwarzanie kwasu (gazu) z: Acid (gas) from:						
glukozy – glucose	68 (100)	10 (52,6)	16 (100), gaz: 4	5 (83,3)	7 (100)	34 (100)
maltozy – maltose	13 (19,1)	1 (5,3)	16 (100), gaz: 7	0	6 (85,7)	32 (94,1)
sacharozy – sucrose	68 (100)	7 (36,8)	16 (100), gaz: 9	4 (66,7)	7 (100)	33 (97,1)
mannozy – mannose	68 (100)	3 (15,8)	15 (93,8), gaz: 5	3 (50)	3 (42,9)	32 (94,1)
trehalozy – trehalose	20 (29,4)	3 (15,8)	16 (100), gaz: 4	4 (66,7)	1 (14,3)	32 (94,1)
mannitolu – mannitol	68 (100)	0	1 (6,3)	0	1 (14,3)	1 (2,9)
sorbitolu – sorbitol	58 (85,3)	0	2 (12,5)	0	0	0
dulcitolu – dulcitol	0	0	0	0	0	0
α-glukozydaza α-glucosidase	18 (26,5)	NB	NB	NB	NB	NB

* przynależność gatunkowa badanych izolatów ustalona została za pomocą kombinacji metod fenotypowych, analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA oraz techniki PCR z użyciem starterów gatunkowo swoistych; NB, niebadane

* strains identified using a combination of phenotypic methods, 16S rRNA sequence analysis and PCR assays with species-specific primers; NB, not determined

4.2. Identyfikacja badanych szczepów pałeczek *Pasteurellaceae* przy użyciu metody sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA

U 91 badanych szczepów bakterii należących do rodziny *Pasteurellaceae*, reprezentujących różne biotypy (w tym u 40 izolatów niezidentyfikowanych metodami fenotypowymi), przeprowadzone zostało sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA. Analiza sekwencyjna tego genu pozwoliła na rozpoznanie większego, w porównaniu z identyfikacją fenotypową, odsetka izolatów (83,5%, tab. 8). W przypadku dwóch szczepów należących do *P. stomatis* oraz jednego *P. canis* sekwencjonowanie 16S rRNA nie dało jednoznacznych wyników. Ponadto, 11 izolatów pochodzących od kotów oraz 1 szczep izolowany od tygrysa, rozpoznane metodami fenotypowymi jako *P. dagmatis*, zidentyfikowane zostały przy użyciu programu BLAST jako *P. pneumotropica*. Sekwencje genu 16S rRNA tych izolatów wykazywały bowiem bardzo wysoki (98,58–99,85%) stopień podobieństwa z sekwencją jednego ze szczepów referencyjnych *P. pneumotropica* (AF224296) znajdującą się w GenBanku. Na podstawie przeprowadzonych badań genotypowych (analiza sekwencyjna genów 16S rRNA oraz *rpoB*, testy PCR specyficzne dla *P. dagmatis* i *P. pneumotropica*) wspomniana grupa izolatów została ostatecznie zakwalifikowana do *P. dagmatis* jako odrębna linia ewolucyjna tego gatunku bakterii występująca u zwierząt kotowatych. Kwestia ta poddana została dokładnej analizie w dalszej części pracy.

Tabela 8
Table 8

Identyfikacja bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*, izolowanych od psów i kotowatych, za pomocą sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA*
Identification of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids by partial sequencing of the 16S rRNA gene*

Gatunek/takson Species/taxon	Liczba badanych izolatów No. of isolates tested	Liczba (%) szczepów zidentyfikowanych No. (%) of strains identified
<i>Pasteurella multocida</i>	35	35 (100)
<i>Bisgaard Taxon 16</i>	19	19 (100)
<i>Pasteurella canis</i>	10	9 (90)
<i>Pasteurella dagmatis</i>	16	4 (25) [§]
<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>	6	6 (100)
<i>Pasteurella stomatis</i>	5	3 (60)
Razem – Total	91	76 (83,5)

* przynależność gatunkowa szczepów ustalona została za pomocą kombinacji metod fenotypowych, analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA oraz gatunkowo swoistych testów PCR; [§] szczepy tego gatunku izolowane od kotów (n=11) oraz od tygrysa (n=1) zostały zidentyfikowane jako *P. pneumotropica* za pomocą programu BLAST

* strains identified using a combination of phenotypic methods, 16S rRNA sequence analysis and species-specific PCR assays; [§] strains of this species isolated from cats (n=11) and from a tiger (n=1) were recognized as *P. pneumotropica* using the BLAST algorithm

Uzyskane wyniki sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA pozwoliły także na przeprowadzenie analizy porównawczej sekwencji nukleotydów tego genu u gatunków bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*, które izolowane były zarówno od psów, jak i od kotów. Stwierdzono, że w jedynie w przypadku *P. dagmatis* izolaty pochodzące od kotów wykazywały znacznego stopnia odrębność genotypową w stosunku do izolatów wyosobnionych od psów (p. 4.7 oraz 4.8). Nie zaobserwowano natomiast takich różnic w obrębie 16S rRNA u pozostałych porównywanych gatunków *Pasteurellaceae* (*P. multocida*, *P. stomatis*, Bisgaard Taxon 16).

4.3. Identyfikacja bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów przy użyciu gatunkowo swoistych testów PCR

Na podstawie wyników identyfikacji badanych izolatów za pomocą metod fenotypowych oraz sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA wytypowane zostały szczepy bakteryjne o ustalonej przynależności gatunkowej, które wraz ze szczepami referencyjnymi użyte zostały do weryfikacji nowo opracowanych, gatunkowo swoistych testów PCR. Nowa procedura diagnostyczna umożliwiła rozpoznanie wszystkich 150 izolatów należących do rodziny *Pasteurellaceae* analizowanych w niniejszej pracy, wśród nich również tych szczepów *P. dagmatis* pochodzących od kotów oraz od tygrysa, w przypadku których wyniki identyfikacji za pomocą metod biochemicznych i sekwencjonowania genu 16S rRNA okazały się rozbieżne.

4.3.1. Identyfikacja *Pasteurella multocida* przy użyciu gatunkowo swoistych reakcji PCR

Opisany przez Townsend i in. [1998] test PCR z użyciem starterów KMT1T7 oraz KMT1SP6 okazał się mało przydatny w identyfikacji szczepów *P. multocida* izolowanych od psów i kotów. Spodziewany produkt o masie 460 p.z. uzyskany został jedynie w przypadku 37,5% badanych szczepów tego gatunku; ponadto, otrzymywane w elektroforegramie prążki były często dość słabe mimo stosowania różnych temperatur przyłączania starterów w reakcji PCR.

W reakcjach PCR z użyciem nowo zaprojektowanych starterów: KMTJB-for i KMTJ-B-rev produkt wielkości 168 p.z. otrzymano w przypadku wszystkich szczepów rozpoznanych (na podstawie badań fenotypowych oraz sekwencjonowania genu 16S rRNA) jako *P. multocida* (ryc. 1, ścieżki 1–4). Uzyskany produkt PCR był identyczny u obu stwierdzonych podgatunków tej bakterii, tj. *P. multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica*. Przy zastosowaniu, jako matrycy, DNA pozostałych badanych izolatów *Pasteurellaceae* amplifikacja nie miała miejsca.

4.3.2. Identyfikacja pozostałych gatunków z rodzaju *Pasteurella*, *Haemophilus haemoglobinophilus* oraz Bisgaard Taxon 16 za pomocą gatunkowo swoistych reakcji PCR

Startery komplementarne do fragmentów genu *sodA*, specyficznych w przypadku *Pasteurella canis*, *P. dagmatis* oraz *P. stomatis*, pozwoliły na otrzymanie w przeprowadzonych testach PCR produktów (o wielkości odpowiednio: 186, 184 i 218 p.z., ryc. 1–ścieżki 5–7 i 9–14) jedynie wtedy, gdy używano matrycy DNA pochodzącej z odpowiedniego dla każdej reakcji gatunku bakterii. Nie obserwowano natomiast reakcji krzyżowych z pozostałymi szczepami *Pasteurellaceae* ani z badanymi przedstawicielami innych grup bakterii. Na uwagę zasługuje fakt, że w reakcji PCR z użyciem starterów specyficznych dla *P. dagmatis* wynik dodatni uzy-

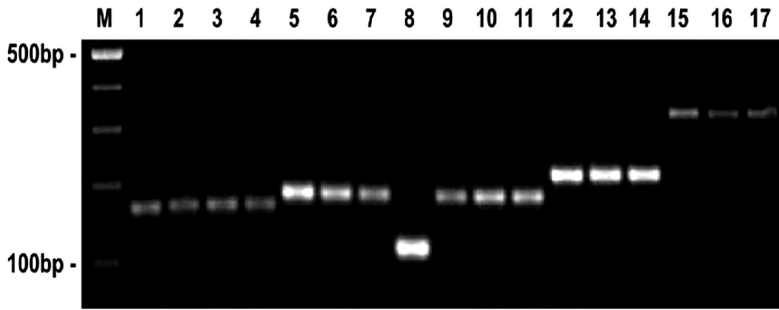
skano również w przypadku szczepów pochodzących od kotów, zidentyfikowanych poprzez porównywanie sekwencji genu 16S rRNA (program BLAST) jako *P. pneumotropica*, natomiast fenotypowo rozpoznanych jako *P. dagmatis*.

Test PCR zastosowany do identyfikacji *H. haemoglobinophilus* pozwolił na uzyskanie produktu wielkości 329 p.z. jedynie w przypadku użycia matrycy DNA pochodzącej ze szczepu referencyjnego tego gatunku bakterii oraz izolatów terenowych, rozpoznanych na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA (ryc. 1, ścieżki 15–17).

Analogicznie, w reakcji z użyciem starterów specyficznych dla Bisgaard Taxon 16, uzyskano amplifikację wyłącznie fragmentu genu 16S rRNA pochodzącego ze szczepu referencyjnego oraz szczepów terenowych tej bakterii (ryc. 2, ścieżki 1–2). Opracowana metoda okazała się ponadto bardzo skuteczna do odróżniania Bisgaard Taxon 16 od podobnego do niego (pod względem właściwości fenotypowych) gatunku *P. stomatis*. Do różnicowania obu drobnoustrojów wykorzystana została technika multiplex-PCR (ryc. 2, ścieżki 6–9).

4.3.3. Różnicowanie *P. dagmatis* oraz *P. pneumotropica* za pomocą gatunkowo swoistych testów PCR

Pochodzące od kotów szczepy rozpoznane za pomocą badań biochemicznych oraz w gatunkowo swoistej reakcji PCR jako *P. dagmatis* posiadały sekwencje genu 16S rRNA praktycznie identyczne z sekwencją szczepu NCTC10827 *P. pneumotropica* (oznaczoną w GenBanku jako AF224296). W celu wyjaśnienia przyczyn braku zgodności pomiędzy zastosowanymi metodami identyfikacji zaprojektowano dodatkową parę starterów, swoistych dla *P. pneumotropica*, komplementarnych do fragmentów genu *sodA* tej bakterii. Do projektowania starterów wykorzystano sekwencje umieszczone w GenBanku, o numerach AY702504 oraz AY702541 – AY702544 [Gautier i in. 2005]. W odpowiedniej reakcji PCR produkt (wielkości 116 p.z.) uzyskano jedynie wtedy, gdy jako matrycy używano DNA szczepu referencyjnego *P. pneumotropica* wykorzystanego w niniejszej pracy (ryc. 1, ścieżka 8); nie stwierdzono natomiast amplifikacji DNA w przypadku izolatów zidentyfikowanych jako *P. dagmatis* (pochodzących zarówno od kotów, jak i psów), jak również w odniesieniu do pozostałych badanych szczepów. Wyniki te mogą wskazywać, że wspomniany szczep referencyjny NCTC10827 został niewłaściwie zaklasyfikowany jako *P. pneumotropica*, co powodowało z kolei błędną identyfikację „kocich” izolatów *P. dagmatis* przy użyciu programu BLAST.

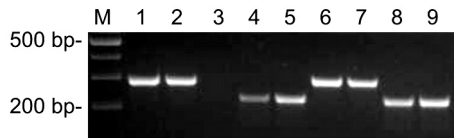


Ścieżki 1–4: *Pasteurella multocida*, wielkość produktu 168 p.z. (1: *P. multocida multocida* CCUG 26985, 2: *P. multocida septica* CCUG 27002, 3–4: szczepy terenowe); ścieżki 5–7: *P. canis*, wielkość produktu 186 p.z. (5: *P. canis* CCUG 32817, 6–7: szczepy terenowe); ścieżka 8: *P. pneumotropica* CCUG 47008, wielkość produktu 116 p.z.; ścieżki 9–11: *P. dagmatis*, wielkość produktu 184 p.z. (9: *P. dagmatis* CCUG 32658, 10–11: szczepy terenowe); ścieżki 12–14: *P. stomatis*, wielkość produktu 218 p.z. (12: *P. stomatis* CCUG 48849, 13–14: szczepy terenowe); ścieżki 15–17: *H. haemoglobinophilus*, wielkość produktu 329 p.z. (15: *H. haemoglobinophilus* CCUG 20967, 16–17: szczepy terenowe). M – wzorzec masy DNA (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Lanes 1–4: *Pasteurella multocida*, amplicon size 168 bp (1: *P. multocida multocida* CCUG 26985, 2: *P. multocida septica* CCUG 27002, 3–4: field isolates); lanes 5–7: *P. canis*, amplicon size 186 bp (5: *P. canis* CCUG 32817, 6–7: field isolates); lane 8: *P. pneumotropica* CCUG 47008, amplicon size 116 bp; lanes 9–11: *P. dagmatis*, amplicon size 184 bp (9: *P. dagmatis* CCUG 32658, 10–11: field isolates); lanes 12–14: *P. stomatis*, amplicon size 218 bp (12: *P. stomatis* CCUG 48849, 13–14: field isolates); lanes 15–17: *H. haemoglobinophilus*, amplicon size 329 bp (15: *H. haemoglobinophilus* CCUG 20967, 16–17: field isolates). M – size marker (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Ryc. 1. Elektroforegram produktów PCR otrzymanych w wyniku amplifikacji DNA badanych bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*. Do reakcji użyto starterów swoistych do sekwencji genów odpowiednich gatunków *Pasteurella* oraz *Haemophilus haemoglobinophilus*

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the DNA of various *Pasteurellaceae* strains. Primers specific to gene sequences of appropriate *Pasteurella* species and *Haemophilus haemoglobinophilus* were used



Ścieżki 1–2: BT16, wielkość produktu 284 p.z. (1: Bisgaard Taxon 16 CCUG 55993, 2: szczep terenowy); ścieżka 3: kontrola ujemna (PCR ze starterami dla BT16, gdzie jako matrycy użyto DNA pochodzący ze szczepu *Neisseria weaveri*); ścieżki 4–5: *P. stomatis*, wielkość produktu 218 p.z. (4: *P. stomatis* CCUG 48849, 5: szczep terenowy); ścieżki 6–9: reakcja multiplex PCR ze starterami dla BT16 i *P. stomatis* (6–7: Bisgaard Taxon 16, 8–9: *Pasteurella stomatis*). M – wzorzec masy DNA (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Lanes 1–2: BT16, amplicon size 284 bp (1: Bisgaard Taxon 16 CCUG 55993, 2: a field isolate); lane 3: a negative control (PCR assay with primers specific to BT16 run with the DNA of *Neisseria weaveri* as a template); lanes 4–5: *P. stomatis*, amplicon size 218 bp (4: *P. stomatis* CCUG 48849, 5: a field isolate); lanes 6–9: a multiplex PCR assay with primers specific to BT16 and *P. stomatis* (6–7: Bisgaard Taxon 16, 8–9: *Pasteurella stomatis*). M – size marker (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Ryc. 2. Elektroforegram produktów PCR otrzymanych w wyniku amplifikacji DNA Bisgaard Taxon 16 oraz *Pasteurella stomatis*. Do reakcji użyto starterów swoistych do odpowiednich fragmentów genów tych bakterii

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNA of Bisgaard Taxon 16 and *Pasteurella stomatis*. Primers specific to gene sequences of appropriate species were used

4.4. Przynależność gatunkowa pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów

Wyniki identyfikacji 150 izolatów z rodziny *Pasteurellaceae*, uzyskane na podstawie opisanych w punktach 4.1–4.3 metod fenotypowych oraz genotypowych, przedstawione zostały w tabeli 9. Ogółem, spośród wyizolowanych drobnoustrojów najliczniej stwierdzana była *P. multocida* (68 szczepów, w tym 56 od kotów, 8 od psów, 3 od lwów i 1 od tygrysa). Drugi pod względem częstości izolacji, Bisgaard Taxon 16, reprezentowany był przez 34 izolaty, pochodzące w większości od psów. W dalszej kolejności stwierdzono (w nawiasie liczba szczepów od poszczególnych gatunków zwierząt): *P. canis* (19, tylko od psów), *P. dagmatis* (16, w tym 11 od kotów, 4 od psów oraz 1 od tygrysa), *H. haemoglobinophilus* (7, tylko od psów) oraz *P. stomatis* (6, w tym 4 od kotów i 2 od psów). Ogółem, 83 (55,3%) badanych szczepów pochodziło od zwierząt zdrowych (w tym 78 izolatów od psów i kotów), natomiast 67 szczepów (44,7%) wyosobniono od zwierząt wykazujących objawy infekcji. Pałeczki z rodziny *Pasteurellaceae* stwierdzano w przypadkach zakażeń manifestujących się najczęściej jako zapalenie jamy nosowej (głównie u kotów; izolowane były przede wszystkim *P. multocida* oraz *P. dagmatis*), zapalenie jamy ustnej, zapalenie gardła (nieco częściej u psów; izolowane były *P. canis* oraz Bisgaard Taxon 16) oraz zapalenie ucha zewnętrznego (u kotów powodowane przez *P. multocida*, a u psów przez *P. multocida* i *P. canis*).

4.5. Identyfikacja genotypowa oraz właściwości fenotypowe podgatunków *Pasteurella multocida*

Analiza sekwencyjna genu 16S rRNA, przeprowadzona wśród 35 izolatów *P. multocida*, wykazała, że szczepy te należały do 2 odrębnych genotypów; genotyp pierwszy wykazywał sekwencję nukleotydów charakterystyczną w przypadku *P. multocida* subsp. *multocida*, natomiast genotyp drugi – dla *P. multocida* subsp. *septica*. Ponieważ oba te podgatunki wykazują pewne różnice sekwencji nukleotydów w obrębie genu 16S rRNA (dotyczące szczególnie regionu pomiędzy 973. i 1013. parą zasad, numeracja zgodna z sekwencją AF294410 w GenBanku) (tab. 10), do ich różnicowania wykorzystano także uzyskaną w wyniku badań własnych procedurę diagnostyczną opartą na metodzie PCR-RFLP. Stwierdzono, że technika ta daje wyniki w 100% zgodne z tymi, które otrzymano podczas sekwencjonowania DNA. Amplifikowany fragment genu 16S rRNA trawiony był przez enzym restrykcyjny Ecl 136II na fragmenty o wielkościach: 102 i 403 p.z. (w przypadku *P. multocida* subsp. *multocida*) oraz 130 i 375 p.z. (u *P. multocida* subsp. *septica*) (ryc. 3). Ogółem, spośród 68 badanych szczepów *Pasteurella multocida* 39 zakwalifikowano do podgatunku *P. multocida* subsp. *multocida* (57,4%, wśród nich 28 izolatów pochodziło od kotów, 7 od psów, 3 od lwów i 1 od tygrysa), a 29 (42,6%) do *P. multocida* subsp. *septica* (z tego 28 szczepów izolowanych było od kotów, a jeden od psa). Najważniejsze właściwości biochemiczne, które mogłyby być przydatne do identyfikacji fenotypowej obu podgatunków, przedstawione zostały w tabeli 11.

Bakterie z rodziny *Pasteurellaceae* wyizolowane od psów i kotów zdrowych oraz wykazujących objawy zakażeń*
Pasteurellaceae strains isolated from both healthy and infected dogs and felids*

Pochodzenie szczepów Origin of strains	Liczba szczepów – No. of strains (n=150)																			
	<i>P. multocida</i> (n=68)				<i>P. canis</i> (n=19)		<i>P. dagmatis</i> (n=16)			<i>P. stomatis</i> (n=6)		<i>H. haemoglobinophilus</i> (n=7)		Biggaard Taxon 16 (n=34)		Liczba szczepów ogółem Total No. of strains				
	Psy Dogs	Koty Cats	Lwy Lions	Tygrysy Tiger	Psy Dogs	Psy Dogs	Psy Dogs	Koty Cats	Tygrysy Tiger	Psy Dogs	Koty Cats	Psy Dogs	Psy Dogs	Psy Dogs	Koty Cats	Psy Dogs	Psy Dogs	Koty Cats	Lwy Lions	Tygrysy Tiger
Zwierzęta zdrowe (jama ustna/gardło) Healthy animals (oral cavity/throat)	2	21	3	1	13	4	4	1	2	1	5	24	2	50	28	3	2			
<i>Rhinitis</i>	1	16	0	0	0	0	4	0	0	1	0	1	0	2	21	0	0			
<i>Otitis externa</i>	1	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0			
<i>Stomatitis/gingivitis</i>	3	4	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2	3	10	0	0			
<i>Pharyngitis</i>	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	7	1	0	0			
<i>Conjunctivitis</i>	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0			
<i>Empyema pleurae</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0			
<i>Abscess</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0			
<i>Balanoposthitis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
<i>Vaginitis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	3	1	0	0			
<i>Laryngitis/tracheitis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0			
Zakażenia inne** Other infections**	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0			
Razem – Total	8	56	3	1	19	4	11	1	2	4	7	30	4	70	75	3	2			

* szczepy izolowane od 68 psów, 68 kotów, 4 lwów i 1 tygrysa; ** przetoka zęba; zmiany zapalne na opuszkach łap

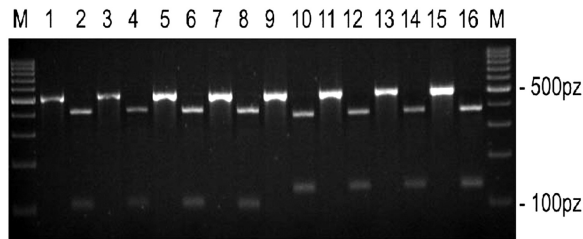
* strains isolated from 68 dogs, 68 cats, 4 lions and 1 tiger; ** dental fistula; inflammatory lesions on footpads

Porównanie sekwencji nukleotydów w obrębie fragmentu 973.–1013. p.z. genu 16S rRNA *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica**
 Comparison of nucleotide sequences in a 973.–1013. bp-fragment of the 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica**

	Pozycja nukleotydów (według sekwencji AF294410) Nucleotide position (relative to the AF294410 sequence)				
	973	981	991	1001	1011
<i>P. multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	TAAGAA	GA G↓CTC	AGAGAT	GAGTTTGTGC	CTTCGGGAAC TTA
<i>P. multocida</i> subsp. <i>septica</i>	AGAGAAGC	TTGCAGAGAT	GCGAGTGTGC	CTTCGGGAG↓C	TCT

* Czcionką czerwoną zaznaczono nukleotydy różniące się od przedstawionych w pierwszej sekwencji. Kolorem żółtym oraz strzałką oznaczono miejsce działania enzymu restrykcyjnego Ecl 136II w technice PCR-RFLP, opracowanej w niniejszej pracy do różnicowania obu podgatunków *Pasteurella multocida*

* The nucleotides differing from those of the topmost sequence are shown in red font. The action site of Ecl 136II restriction endonuclease, used for differentiation of both *Pasteurella multocida* subspecies, is indicated in yellow and marked with an arrow



Ścieżki 1–8 przedstawiają amplikony otrzymane z DNA czterech szczepów *P. multocida* subsp. *multocida*, ścieżki 9–16 – z DNA czterech szczepów *P. multocida* subsp. *septica*. W przypadku każdego izolatu elektroforezie poddano nietrawione produkty PCR (ścieżki oznaczone liczbami nieparzystymi) oraz produkty trawione enzymem Ecl136II (ścieżki oznaczone liczbami parzystymi). M – wzorzec masy DNA (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder [Fermentas])
 Lanes 1–8 represent amplicons obtained from DNA of four *P. multocida* subsp. *multocida* strains, lanes 9–16 from DNA of four *P. multocida* subsp. *multocida* strains. For each isolate, intact amplicons (lanes with odd numbers) and Ecl136II-digested ones (lanes with even numbers) were run. M – size marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Ryc. 3. Elektroforegram produktów trawienia fragmentu genu 16S rRNA (wielkości 505 p.z.)
 szczepów *Pasteurella multocida*

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of digestion products of a 505-bp fragment
 of the *Pasteurella multocida* 16S rRNA gene

Badane izolaty *P. multocida* subsp. *multocida* w zdecydowanej większości przypadków (94,9%) wytwarzały kwas z sorbitolu (tab. 11), natomiast bardzo rzadko produkowały kwas z trehalozy oraz enzym α -glukozydazę (wśród izolatów należących do tego podgatunku stwierdzono tylko jeden szczep trehalozododatni, pochodzący od kota, oraz jeden α -glukozydazododatni – izolowany od lwa). Rozkład sorbitolu obserwowano jednak stosunkowo często także u *P. multocida* subsp. *septica* (u 72,4% szczepów). Wyniki badań własnych nie wskazują również na dużą wartość diagnostyczną pozostałych cech fenotypowych wykorzystywanych przez innych autorów do różnicowania podgatunków *P. multocida* (badania

rozkładu trehalozy oraz produkcji α -glukozydazy). Obie te właściwości zostały stwierdzone jedynie u nieco ponad połowy (odpowiednio, u 65,5 i 58,6%) badanych szczepów należących do *P. multocida* subsp. *septica*. Zaobserwowano natomiast pewną korelację pomiędzy zdolnością do rozkładu trehalozy oraz produkcji α -glukozydazy: **szczepy tworzące kwas z trehalozy** (w przypadku *P. multocida* subsp. *septica*) były, poza nielicznymi wyjątkami, także α -glukozydazododatnie, natomiast te izolaty (należące do zarówno *P. multocida* subsp. *septica*, jak i *P. multocida* subsp. *multocida*), które nie rozkładały wspomnianego węglowodanu, wypadały z reguły również ujemnie w próbie na α -glukozydazę.

Tabela 11

Table 11

Właściwości biochemiczne przydatne do różnicowania szczepów *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica*, izolowanych od psów i kotowatych*
Differential characteristics for *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* strains isolated from dogs and felids*

Właściwości Characteristics	Liczba (%) szczepów dających reakcję dodatnią No. of strains displaying a positive reaction	
	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> (n=39)	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>septica</i> (n=29)
Wytwarzanie kwasu z sorbitolu Acid from sorbitol	37 (94,9)	21 (72,4)
Wytwarzanie kwasu z trehalozy Acid from trehalose	1 (2,6)	19 (65,5)
Wytwarzanie α -glukozydazy α -glucosidase production	1 (2,6)	17 (58,6)

*Identyfikacji podgatunków *P. multocida* dokonano opierając się na o metodach genotypowych (sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA, PCR-RFLP) oraz fenotypowych (ujemna reakcja na dulcitol)

*Identification of *P. multocida* subspecies was made by both genotypic (partial sequencing of the 16S rRNA gene, PCR-RFLP) and phenotypic methods (a negative reaction for dulcitol)

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że przedstawione powyżej właściwości biochemiczne *P. multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica* nie są dla nich na tyle charakterystyczne, by możliwe było absolutnie pewne różnicowanie obu podgatunków za pomocą rutynowo stosowanych metod fenotypowych.

4.6. Zastosowanie starterów swoistych gatunkowo do identyfikacji szczepów *Pasteurellaceae* przy użyciu metody multiplex-PCR

Zaobserwowane różnice w wielkościach produktów otrzymywanych w wyniku opisanych w punktach 4.3.1–4.3.3 reakcji PCR skłoniły do poszukiwania możliwości zastosowania przedstawionej metody w postaci zestawu testów z użyciem 2 lub więcej par starterów (tzw. *multiplex-PCR*). Pozwoliłoby to na opracowanie procedury diagnostycznej, w której metody genotypowe byłyby uzupełnieniem wstępnego badania biochemicznego.

Uwzględniając uzyskane wyniki badań fenotypowych, wytypowane zostały dwie reakcje biochemiczne (wytwarzanie dekarboksylazy ornitynowej oraz próba na ureazę), na podstawie których gatunki pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* występujące u psów i kotów podzielone zostały na 4 grupy fenotypowe. W obrębie każdej z tych grup zaproponowane zostało dalsze postępowanie

diagnostyczne przy użyciu odpowiednich reakcji PCR lub multiplex-PCR (tab. 12). Przeprowadzone badania pozwoliły na ustalenie optymalnych w każdej z tych reakcji warunków (zwłaszcza temperatury przyłączania starterów) i wykazały, że opisana procedura stanowi skuteczne narzędzie diagnostyczne do identyfikacji bakterii *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów.

Tabela 12

Table 12

Proponowany schemat identyfikacji bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów*
Flow chart proposed for the identification of *Pasteurellaceae* encountered in cats and dogs*

Wyniki testów na ODC oraz ureazę Results of the ODC and urease tests	Wstępna identyfikacja fenotypowa Presumptive phenotypic identification	Dalsza procedura diagnostyczna przy użyciu gatunkowo-swoistych reakcji PCR Further identification procedure using species-specific PCRs	Interpretacja wyników na podstawie wielkości produktów PCR Interpretation of the PCR based on amplicon size
ODC+, Ure+	<i>P. pneumotropica</i> lub (rzadko) <i>P. dagmatis</i> <i>P. pneumotropica</i> or (rarely) ODC- -positive <i>P. dagmatis</i>	Multiplex-PCR przy użyciu starterów dla <i>P. dagmatis</i> i <i>P. pneumotropica</i> (temp. przyłączania starterów 57°C) Multiplex PCR with primers for <i>P. dagmatis</i> and <i>P. pneumotropica</i> (annealing at 57°C)	184 p.z.: <i>P. dagmatis</i> 116 p.z.: <i>P. pneumotropica</i> 184 bp: <i>P. dagmatis</i> 116 bp: <i>P. pneumotropica</i>
ODC+, Ure-	<i>P. multocida</i> , <i>P. canis</i> lub (rzadko) <i>H. haemoglobinophilus</i> <i>P. multocida</i> , <i>P. canis</i> or (rarely) <i>H. haemoglobinophilus</i>	Multiplex-PCR przy użyciu starterów dla <i>P. multocida</i> i <i>P. canis</i> (temp. przyłączania starterów 57°C) Multiplex PCR with primers for <i>P. multocida</i> and <i>P. canis</i> (annealing at 57°C)	168 p.z.: <i>P. multocida</i> 186 p.z.: <i>P. canis</i> Brak produktu: <i>H. haemoglobinophilus</i> (potwierdzić odpowiednią reakcją PCR) 168 bp: <i>P. multocida</i> 186 bp: <i>P. canis</i> No amplicons: <i>H. haemoglobinophilus</i> (confirm by the specific PCR assay)
ODC-, Ure+	<i>P. dagmatis</i>	PCR przy użyciu starterów dla <i>P. dagmatis</i> (temp. przyłączania starterów 57°C) PCR with primers for <i>P. dagmatis</i> (annealing at 57°C)	184 p.z.: <i>P. dagmatis</i> 184 bp: <i>P. dagmatis</i>
ODC-, Ure-	<i>P. stomatis</i> , <i>H. haemoglobinophilus</i> lub Bisgaard Taxon 16 <i>P. stomatis</i> , <i>H. haemoglobinophilus</i> or Bisgaard Taxon 16	Multiplex PCR przy użyciu starterów dla <i>P. stomatis</i> , <i>H. haemoglobinophilus</i> i BT16 (temp. przyłączania starterów 52°C) Multiplex PCR with primers for <i>P. stomatis</i> , <i>H. haemoglobinophilus</i> and BT16 (annealing at 52°C)	218 p.z.: <i>P. stomatis</i> 329 p.z.: <i>H. haemoglobinophilus</i> 284 p.z.: Bisgaard Taxon 16 218 bp: <i>P. stomatis</i> 329 bp: <i>H. haemoglobinophilus</i> 284 bp: Bisgaard Taxon 16

*Wszystkie gatunki uwzględnione w tej tabeli są oksydazododatnie i indolododatnie. ODC, dekarboksylaza ornitynowa; Ure, ureaza; +, reakcja dodatnia; -, reakcja ujemna

*All species included here are oxidase- and indole-positive. ODC, ornithine decarboxylase; Ure, urease; +, positive reaction; -, negative reaction

4.7. Zróznicowanie genotypowe oraz analiza filogenetyczna szczepów *Pasteurella dagmatis* izolowanych od psów i kotowatych

Porównanie sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA izolatów *P. dagmatis* przy użyciu algorytmu BLAST wykazało, że szczepy tego gatunku izolowane od psów charakteryzowały się znacznym podobieństwem (99,78–99,85%) do znajdującej się w GenBanku sekwencji *P. dagmatis* AY362920, pochodzącej ze szczepu typowego tej bakterii (CCUG 12397^T). Natomiast wszystkie izolaty wyosobnione od kotów miały sekwencje 16S rRNA praktycznie identyczne (99,58–99,85%) ze szczepem *P. pneumotropica* NCTC 10827 (sekwencja w GenBanku o numerze AF224296). W przypadku szczepu *P. dagmatis* wyizolowanego od tygrysa, chociaż jego sekwencja wykazywała najlepsze dopasowanie również z sekwencją AF224296, to podobieństwo do niej było mniejsze i wynosiło 98,58%.

Sekwencje genu 16S rRNA wszystkich jedenastu szczepów izolowanych od kotów wykazywały dużego stopnia jednorodność; jedyne miejsce polimorficzne dotyczyło pozycji 842 (zgodnie z numeracją nukleotydów w sekwencji AF224296), gdzie u części szczepów występowała adenina, a u części tymina. Stwierdzono, że w sekwencjach 16S rRNA kocich izolatów *P. dagmatis* występowały stałe, charakterystyczne dla nich fragmenty, które różniły te izolaty od szczepów pochodzących od psów, a także od szczepu wyizolowanego od tygrysa (tab. 13).

Badania filogenetyczne, mające na celu ustalenie wzajemnego pokrewieństwa różnych szczepów *P. dagmatis* i pozostałych gatunków należących do rodzaju *Pasteurella sensu stricto*, przeprowadzone zostały na podstawie analizy sekwencji genów 16S rRNA oraz *rpoB*. W przypadku genu 16S rRNA, analizie poddano 36 sekwencji, w tym 16 sekwencji *P. dagmatis* poznanych w tej publikacji oraz 20 sekwencji znajdujących się w GenBanku (14 sekwencji *Pasteurella sensu stricto* „core group”, czterech *P. pneumotropica* oraz dwóch Bisgaard Taxon 46, p. tab. 5). Na podstawie różnic w sekwencjach nukleotydów sporządzono drzewo filogenetyczne przedstawione na rycinie 4. Z 19 węzłów otrzymanego dendrogramu, 15 zostało dodatkowo zweryfikowanych wartościami wyższymi niż 50% w próbie bootstrap. Analizowane sekwencje zostały podzielone na 8 grup (clusters). Grupę IA tworzyły: szczep NCTC10827 *P. pneumotropica*, dwa szczepy izolowane od kotów, oznaczone jako „*P. dagmatis*-like” 5/8 i 8/4 (sekwencje uzyskane zostały z GenBanku) oraz 11 własnych izolatów *P. dagmatis* pochodzących od kotów, analizowanych w bieżącej pracy. Grupa IB zawierała szczep własny izolowany od tygrysa (o numerze 197) i szczep koci „*P. dagmatis*-like” 1/1 (z GenBanku). *Pasteurella stomatis* oraz *P. canis* stanowiły, odpowiednio, grupę II i III. Cztery szczepy własne *P. dagmatis* izolowane od psów, jak również szczep typowy tego gatunku (CCUG12397^T, sekwencja uzyskana z GenBanku), tworzyły grupę IV. Przedstawiciele tej grupy wykazywali jedynie 97% podobieństwa sekwencji nukleotydów z grupą „kocia” *P. dagmatis* (IA). Grupy V, VI i VII składały się odpowiednio z Bisgaard Taxon 46, *Pasteurella multocida* subsp. *septica* i kompleksu *P. multocida* subsp. *multocida*/*P. multocida* subsp. *gallicida*. Trzy pozostałe analizowane sekwencje *P. pneumotropica* (inne niż AF224296) zostały zaszeregowane do odrębnych grup VIII i IX, wykazujących znacznie niższy stopień pokrewieństwa z gatunkami należącymi do grupy *Pasteurella sensu stricto*.

Tabela 13
Table 13

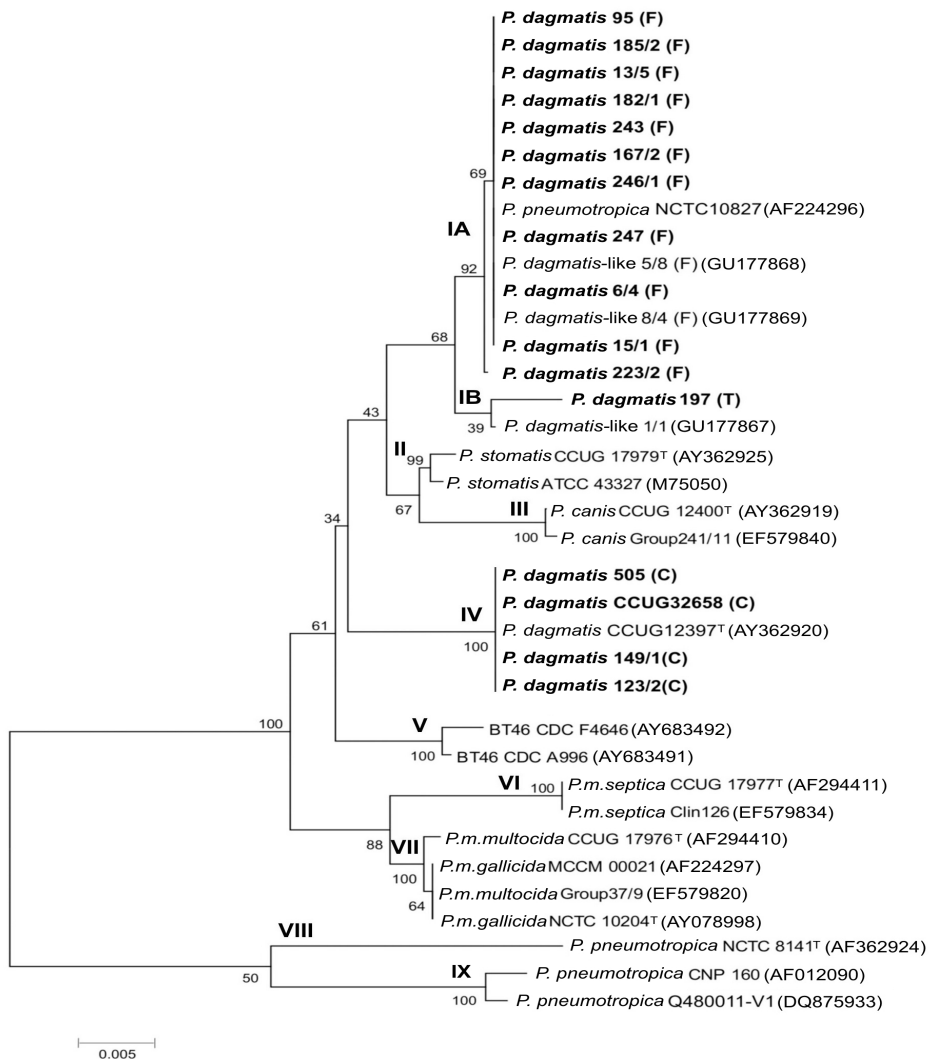
Rozmieszczenie miejsc polimorficznych w obrębie sekwencji genu 16S rRNA u szczepów *Pasteurella dagmatis* pochodzących od różnych gatunków gospodarzy*

Distribution of polymorphic nucleotide sites among 16S rRNA sequences of *Pasteurella dagmatis* of different host origin *

	157–186	448–449	589–601	980–995
	Pozycje nukleotydów (według sekwencji szczepu <i>P. dagmatis</i> CCUG12397 ^T [AY362920]) Nucleotide positions (relative to the sequence of <i>P. dagmatis</i> strain CCUG12397 ^T [AY362920])			
Szczepy <i>P. dagmatis</i> izolowane od psów (n=4, w tym szczep referencyjny CCUG 32658) Canine <i>P. dagmatis</i> strains (n=4, incl. the reference strain CCUG 32658)	GTAT↓CGA GAGATGA AAGGGTGGGA CCTTTCG	AT	CG AGCTTAACTTG	G CCGTAGAGAT ATGGC
Szczepy <i>P. dagmatis</i> izolowane od kotów (n=11) Feline <i>P. dagmatis</i> strains (n=11)	TTAT CGTAAGATGA AAGGGTGGGA CCATTT	GT	TG GGCTTAAACCTA	A ACTCARAGAT GAGTT
Szczep <i>P. dagmatis</i> izolowany od tygrysa (n=1) <i>P. dagmatis</i> strain from a tiger (n=1)	ATCT CTGAGGAGCA AAGGGTGGGA CCTTAG	GC	TG GGCTTAAACCTA	A ACTCARAGAT GAGTT

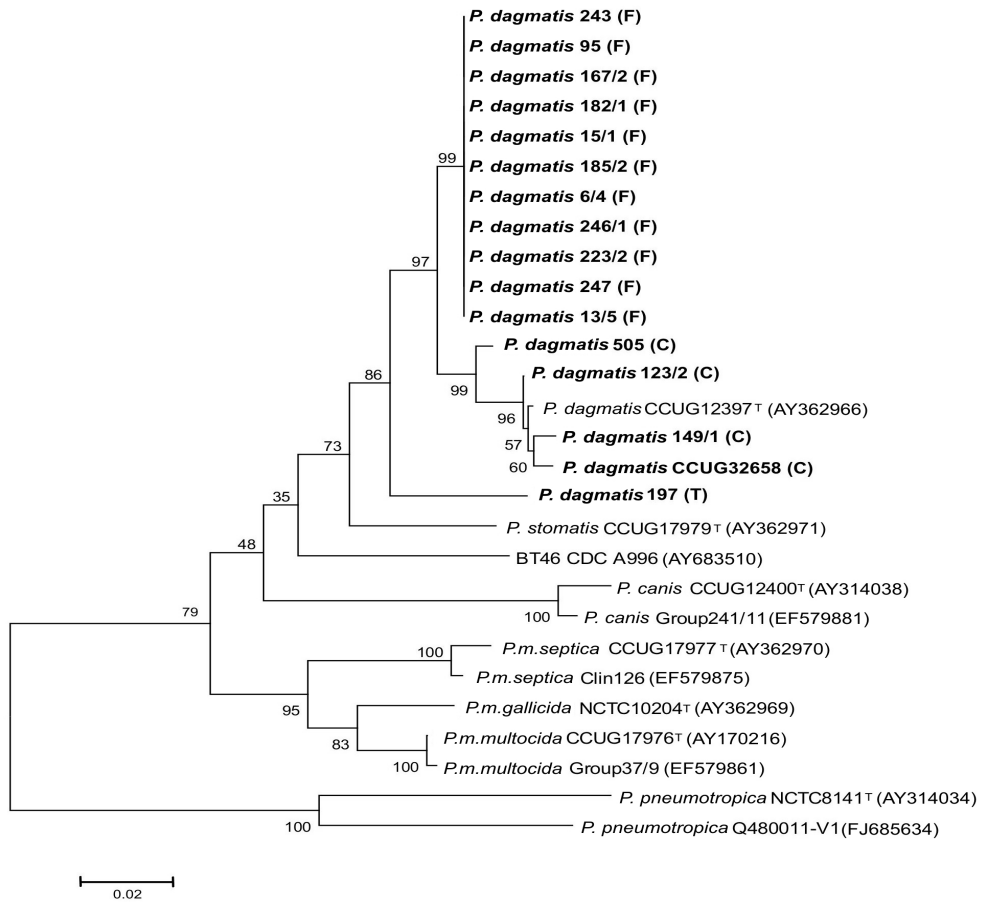
* Czcionką czerwoną zaznaczono nukleotydy różniące się od przedstawionych w pierwszej sekwencji. Kolorem żółtym oraz strzałką oznaczono miejsce działania enzymu restrykcyjnego TaqI w technice PCR-RFLP opracowanej w ramach niniejszej publikacji do różnicowania subpopulacji *Pasteurella dagmatis*

* The nucleotides differing from those of the topmost sequence are shown in red font. The action site of TaqI restriction endonuclease used for differentiation of *Pasteurella dagmatis* subpopulations is indicated in yellow and marked with an arrow



Ryc. 4. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Pasteurella sensu stricto* skonstruowane na podstawie porównania sekwencji genu 16S rRNA (fragmenty wielkości 1308 p.z.) 36 szczepów bakterii. Dendrogram otrzymany został przy użyciu metody „neighbour-joining”. Wartości procentowe „bootstrap” dla 500 powtórzeń zostały przedstawione przy każdym z węzłów. Sekwencje oznaczone czcionką pogrubioną ustalane były w niniejszej pracy. Oznaczenia: (F), szczepy izolowane od kotów; (C), szczepy izolowane od psów; (T), szczep izolowany od tygrysa; [†], szczep typowy

Fig. 4. Phylogenetic tree of the genus *Pasteurella sensu stricto* based on the comparison of 36 sequences of the 16S rRNA gene (1308 bp fragments). The tree was constructed using the neighbour-joining method. Bootstrap values of 500 replications are indicated as percent confidence values for particular branching. Sequences indicated in bold were determined in this study. Explanations: (F), isolates from cats; (C), isolates from dogs; (T), the isolate from a tiger; [†], the type strain



Ryc. 5. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Pasteurella sensu stricto* skonstruowane na podstawie porównania sekwencji genu *rpoB* (fragmenty wielkości 501 p.z.) 28 szczepów bakterii. Dendrogram otrzymany został przy użyciu metody „neighbour-joining”. Wartości procentowe „bootstrap” dla 500 powtórzeń zostały przedstawione przy każdym z węzłów. Sekwencje oznaczone czcionką pogrubioną ustalane były w niniejszej pracy. Oznaczenia: (F), szczepy izolowane od kotów; (C), szczepy izolowane od psów; (T), szczep izolowany od tygrysa; ^T, szczep typowy

Fig. 5. Phylogenetic tree of the genus *Pasteurella sensu stricto* based on the comparison of 28 *rpoB* sequences (501 bp fragments). The tree was constructed using the neighbour-joining method. Bootstrap values of 500 replications are indicated as percent confidence values for particular branching. Sequences indicated in bold were determined in this study. Explanations: (F), isolates from cats; (C), isolates from dogs; (T), the isolate from a tiger; ^T, the type strain

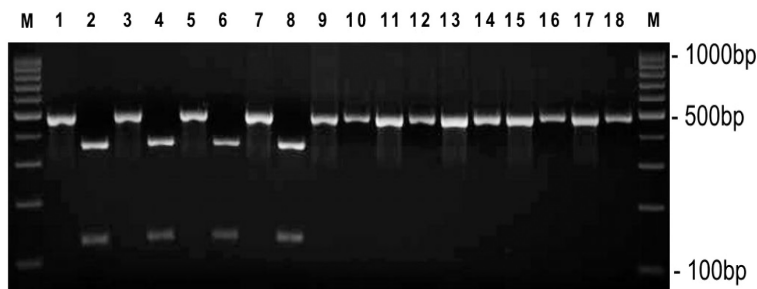
Porównanie sekwencji genu *rpoB* potwierdziło odrębność genetyczną „kociej” subpopulacji *Pasteurella dagmatis*. Wszystkie izolaty tej bakterii pochodzące od kotów miały taką samą sekwencję nukleotydów w obrębie analizowanego fragmentu *rpoB*. Wykazywały one podobieństwo na poziomie 97,4% (12 niezgodności na 501 porównywanych nukleotydów) ze szczepem typowym *P. dagmatis* CCUG12397^T (oznaczenie w GenBanku: AY362966). Natomiast sekwencje szczepów izolowanych od psów, chociaż różniły się nieznacznie pomiędzy sobą, wykazy-

wały wyraźnie wyższy stopień podobieństwa (98,6–99,6%, 2–7 niezgodności) do sekwencji AY362966. Szczep „tygrysi” *P. dagmatis* był najbardziej odległy filogenetycznie i wykazywał tylko 94,4% zgodności ze szczepem CCUG12397^T (28 różnic na 501 nukleotydy).

Drzewo filogenetyczne, oparte na analizie sekwencyjnej genu *rpoB* (ryc. 5), skonstruowane zostało na bazie 28 sekwencji (16 własnych i 12 z GenBanku). Uzyskane wyniki potwierdzone zostały w znacznym stopniu poprzez wysokie wartości „bootstrap” (powyżej 80% dla 12 z 17 węzłów). W tym dendrogramie szczepy *P. dagmatis* pochodzące od psów i kotów również zostały zaszeregowane do odrębnych grup. Jednak w przeciwieństwie do analizy filogenetycznej na bazie genu 16S rRNA, porównanie sekwencji *rpoB* wykazało, że obie subpopulacje *P. dagmatis* (szczepy pochodzące od psów i kotów) są ze sobą bardziej spokrewnione niż z innymi przedstawicielami *Pasteurella sensu stricto*. Szczep 197, pochodzący od tygrysa, stanowił odrębny takson „*P. dagmatis*-like”, nieco bardziej odległy filogenetycznie od obu pozostałych subpopulacji *P. dagmatis*. Pozostałe analizowane sekwencje genu *rpoB* tworzyły grupy odrębne dla każdego taksonu. W obu drzewach filogenetycznych szczepy *P. pneumotropica* (inne niż NCTC10827) wykazywały niski stopień pokrewieństwa z przedstawicielami rodzaju *Pasteurella sensu stricto*.

4.8. Różnicowanie szczepów *Pasteurella dagmatis* przy użyciu metody RFLP-PCR

Stwierdzone różnice w sekwencji nukleotydy genu 16S rRNA u szczepów *P. dagmatis* pochodzących od psów i kotów (p. tab. 13) pozwoliły na zastosowanie metody RFLP-PCR do szybkiego i dokładnego różnicowania obu subpopulacji tego gatunku bakterii. Zamplifikowane fragmenty genu 16S rRNA, o wielkości 476 p.z., trawione były przez enzym restrykcyjny TaqI jedynie w przypadku izolatów *P. dagmatis* pochodzących od psów. Jako produkty trawienia otrzymywano 2 fragmenty o wielkości 125 i 351 p.z. (ryc. 6). Produkty amplifikacji DNA szczepów tego gatunku bakterii izolowanych od kotów (a także szczepu 197 pochodzącego od tygrysa) pozostały niestrawione.



Ryc. 6. Elektroforegram produktów trawienia fragmentu genu 16S rRNA (wielkości 476 p.z.) szczepów *Pasteurella dagmatis* izolowanych od różnych gatunków zwierząt. Ścieżki 1–8 przedstawiają amplikony z DNA czterech szczepów pochodzących od psów, ścieżki 9–16 – z DNA czterech szczepów izolowanych od kotów, a ścieżki 17–18 – ze szczepu izolowanego od tygrysa. W przypadku każdego izolatu, elektroforezie poddano DNA nietrawione (ścieżki oznaczone liczbami nieparzystymi) oraz trawione enzymem TaqI (ścieżki oznaczone liczbami parzystymi). M – wzorzec masy DNA (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of digestion products of a 476-bp fragment of the 16S rRNA gene of *P. dagmatis* (strains isolated from different hosts). Lanes 1–8 represent amplicons obtained from the DNA of canine isolates, lanes 9–16 from DNA of feline isolates, and lanes 17–18 from the DNA of the isolate from a tiger. For each isolate, intact amplicons (lanes with odd numbers) and TaqI-digested ones (lanes with even numbers) were run. M – size marker (GeneRuler™100 bp DNA Ladder [Fermentas])

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DyskusJA

Jednym z głównych celów diagnostyki bakteriologicznej jest możliwie szybkie i dokładne rozpoznanie izolowanych drobnoustrojów. Pozwala ono na ocenę roli wyisobnionych z materiału klinicznego bakterii w procesie patologicznym oraz umożliwia podjęcie właściwych działań leczniczych i profilaktycznych. Ponadto, precyzyjna identyfikacja czynnika chorobotwórczego jest bardzo istotna w badaniach epidemiologicznych, szczególnie w przypadku mikroorganizmów powodujących zakażenia odzwierzęce u człowieka.

Na błonach śluzowych układu oddechowego, układu moczopłciowego oraz początkowych odcinków przewodu pokarmowego zdrowych psów i kotów występuje wiele gatunków bakterii należących do rodziny *Pasteurellaceae*. Drobnoustroje te mogą być izolowane z różnego rodzaju materiału klinicznego pochodzącego od tych zwierząt. Przedstawiciele omawianej grupy bakterii odznaczają się stosunkowo dużą różnorodnością cech fenotypowych, a w niektórych przypadkach również właściwościami genotypowymi, co może w dużym stopniu utrudniać ich identyfikację.

W przedstawionych badaniach własnych do identyfikacji wybranych gatunków bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów zastosowano trzy niezależne metody: klasyczną diagnostykę biochemiczną, sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA oraz nowo opracowane metody genotypowe na podstawie gatunkowo-swoistych reakcji PCR, a w określonych przypadkach wykorzystujących również analizę restrykcyjną odpowiednich fragmentów DNA bakterii (RFLP). Przeprowadzone badania umożliwiły nie tylko poznanie składu gatunkowego drobnoustrojów z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u badanych zwierząt, lecz również opracowanie nowej procedury diagnostycznej, która pozwala na szybką, dokładną i stosunkowo taną identyfikację bakterii należących do omawianej grupy.

Wykazano, że diagnostyka tych drobnoustrojów przy użyciu dotychczas stosowanych metod fenotypowych, a w niektórych przypadkach nawet genotypowych, może być mało skuteczna. Użycie klasycznej procedury diagnostycznej opierającej się na badaniach biochemicznych pozwoliło na rozpoznanie jedynie 73% badanych izolatów; ponadto, metody te okazały się mało przydatne do identyfikacji podgatunków *Pasteurella multocida*. Wcześniejsze badania własne, a także doniesienia innych autorów wskazują, że stosowane w wielu laboratoriach zminiaturyzowane systemy identyfikacyjne również mają małą wartość diagnostyczną w odniesieniu do pałeczek *Pasteurellaceae* [Hamilton-Miller 1993, Boot i in. 2004, Król i in. 2004, Guillard i in. 2009, Akahane i in. 2011]. Przykładowo, w bazie danych systemu API 20 NE (BioMérieux), przeznaczonego do rozpoznawania Gram-ujemnych pałeczek nie-*Enterobacteriaceae*, spośród gatunków z rodziny *Pasteurellaceae* stwierdzanych normalnie u psów i kotów uwzględniona została tylko *P. multocida*. Jednak identyfikacja tej bakterii przy użyciu wspomnianego systemu opiera się na zaledwie 3 testach biochemicznych (wytwarzanie oksydazy cytochromowej i indolu oraz redukcja azotanów do azotynów), które to cechy są wspólne dla większości przedstawicieli rodzaju *Pasteurella*. Dodatkowo, zastosowane w mikropróbów-

kach paska API podłoże może być niewystarczające do wzrostu tej grupy drobnoustrojów, ponieważ omawiane bakterie często mają podwyższone wymagania odżywcze. Utrudnia to też wykorzystanie poszczególnych reakcji biochemicznych, określanych przy użyciu mikrotestu, do rozpoznawania taksonów nie uwzględnionych w bazie danych systemu API. Z kolei te nieliczne doniesienia, które stwierdzają wysoką wartość diagnostyczną wspomnianych testów, mogą budzić pewne wątpliwości co do poprawności identyfikacji badanych drobnoustrojów. Przykładowo, Freshwater [2008], identyfikując szczepy *Pasteurella* izolowane z jamy ustnej kotów za pomocą testu API 20 NE, przyjęła zdolność fermentacji mannitolu jako jedyne kryterium różnicujące *P. multocida* (która wytwarza kwas z tego węglowodanu) od *P. stomatis*. Jednak w rzeczywistości test na fermentację mannitolu nie jest przeprowadzany przy użyciu zestawu API 20NE. Określana jest natomiast zdolność bakterii do asymilacji mannitolu (którą to reakcję, według bazy danych systemu API, przeprowadza jedynie 1% szczepów *P. multocida*). Dlatego jest dość prawdopodobne, że niektóre szczepy w cytowanej powyżej pracy mogły zostać błędnie rozpoznane, a skuteczność omawianego zestawu diagnostycznego jest w rzeczywistości mniejsza.

W porównaniu z diagnostyką fenotypową, sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA okazało się bardziej skuteczną metodą identyfikacji bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów. Jednak na 91 szczepów poddanych sekwencjonowaniu tego genu w badaniach własnych jedynie w 76 przypadkach (83,5%) otrzymane wyniki były zgodne z ostatecznymi wynikami identyfikacji tych izolatów, uzyskanymi przy użyciu kombinacji metod genotypowych (gatunkowo swoiste testy PCR) oraz biochemicznych. Brak poprawnej identyfikacji pozostałych 15 szczepów wynikał zarówno z błędów technicznych dotyczących samego procesu sekwencjonowania i/lub interpretacji uzyskanych chromatogramów, jak i z faktu, że znajdujące się w bazach danych sekwencje DNA były niedokładne albo nieprawidłowo oznaczone. Przykładowo, dla 3 badanych izolatów (dwóch należących do *P. stomatis* oraz jednego do *P. canis*) uzyskano wyniki niejednoznaczne: porównanie uzyskanych sekwencji z dostępnymi w GenBanku wykazało, że oba te gatunki były wskazane przez program BLAST z jednakowym prawdopodobieństwem. Przedstawiona sytuacja ma związek ze stosunkowo dużym stopniem homologii 16S rRNA tych bakterii (wynoszącym nawet 99%), co sprawia, że nawet pojedyncze nieprawidłowo rozpoznane (lub nieokreślone) nukleotydy w uzyskanej sekwencji DNA mogą spowodować błędną identyfikację danego szczepu. Nie stwierdzano natomiast tego typu problemów w przypadku drobnoustrojów wykazujących w mniejszym stopniu wzajemne podobieństwo 16S rRNA (*P. multocida*, Bisgaard Taxon 16 oraz *H. haemoglobinophilus*), u których rezultat sekwencjonowania tego genu był całkowicie zgodny z wynikami identyfikacji pozostałymi metodami. Największy wpływ na relatywnie niezbyt wysoką (83,5%) ogólną skuteczność identyfikacji pałeczek *Pasteurellaceae* za pomocą analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA miał jednak fakt, że wszystkie izolaty zakwalifikowane jako *P. dagmatis*, pochodzące od kotów (oraz od tygrysa), zostały rozpoznane jako *P. pneumotropica*. Było to spowodowane niewłaściwym oznaczeniem umieszczonej w GenBanku sekwencji jednego ze szczepów referencyjnych *P. pneumotropica* (NCTC10827), wynikającym z jego wcześniejszej błędnej identyfikacji (patrz dalsza część dyskusji).

Podsumowując, w niniejszej pracy stwierdzono, że identyfikacja bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* za pomocą sekwencjonowania genu 16S rRNA również jest nie zawsze skuteczna. Poza stosunkowo wysokimi kosztami omawiana metoda wykazuje również pewne niedogodności. Zwracali na nie uwagę także inni autorzy, którzy identyfikowali w ten sposób drobnoustroje należące do pozostałych grup taksonomicznych: konieczność istnienia w ba-

zach danych właściwie oznaczonych sekwencji [Clarridge 2004] oraz możliwy niedostateczny potencjał różnicujący metody opartej na analizie sekwencyjnej genu 16S rRNA w przypadku blisko ze sobą spokrewnionych gatunków bakterii [Mignard, Flandrois 2006]. Należy podkreślić, że odsetek szczepów zidentyfikowanych tą metodą w badaniach własnych jest porównywalny z wynikami uzyskiwanymi przez innych autorów [Drancourt i in. 2000, Mignard, Flandrois 2006].

Zaprezentowane w badaniach własnych gatunkowo swoiste testy PCR pozwoliły na identyfikację wszystkich wyizolowanych od psów i kotów szczepów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*. Umożliwiło to opracowanie nowej procedury diagnostycznej, będącej kombinacją testów biochemicznych oraz badań genotypowych, możliwej do wykorzystania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Postępowanie diagnostyczne, łączące charakterystykę fenotypową izolowanego szczepu z analizą genotypową, jest według aktualnych poglądów rozwiązaniem optymalnym, pozwalającym na szybkie, a jednocześnie dokładne rozpoznawanie drobnoustrojów z omawianej rodziny [Christensen i in. 2005, Dziva i in. 2008]. W przypadku powyższego schematu diagnostycznego izolowany od psa lub kota szczep bakteryjny poddawany jest wstępnej identyfikacji fenotypowej, mającej na celu zakwalifikowanie go do *Pasteurellaceae* (morfologia komórek i ich barwienie metodą Grama, morfologia kolonii na podłożu agarowym z krwią, brak wzrostu na podłożu McConkey'a, dodatnia próba na indol) oraz zszeregowanie do jednej z czterech grup fenotypowych, utworzonych na podstawie wyników reakcji na ureazę i dekarboksylazę ornitynową (ODC). Właściwości te zostały wytypowane ze względu na stwierdzony stosunkowo niski odsetek reakcji nietypowych, wykazywanych przez badane izolaty w odniesieniu do tych prób, a także możliwość różnicowania gatunków w obrębie każdej grupy na podstawie charakterystycznych dla każdego z nich produktów w reakcjach multiplex-PCR.

Przeprowadzone badania fenotypowe oraz genotypowe pozwoliły na lepsze poznanie składu gatunkowego drobnoustrojów z rodziny *Pasteurellaceae*, z uwzględnieniem ich aktualnej taksonomii, występujących u psów i zwierząt kotowatych. W przedstawionej pracy najczęściej stwierdzanym przedstawicielem omawianej grupy była *Pasteurella multocida*. Badania własne potwierdziły wyniki uzyskane przez innych autorów wskazujące, że drobnoustrój ten występuje bardzo często u kotów (zarówno zdrowych, jak i mających objawy chorobowe), natomiast stosunkowo rzadko u psów [Hellmann i in. 1987, Baldrias i in. 1988, Biberstein i in. 1991, Muhairwa i in. 2001a]. Stwierdzono ponadto obecność *P. multocida* u dzikich gatunków rodziny kotowatych – lwa i tygrysa. Z uwagi na częste występowanie omawianego drobnoustroju u zwierząt oraz jego duże znaczenie kliniczne i epidemiologiczne laboratoria diagnostyczne powinny dysponować odpowiednimi metodami do szybkiej i pewnej identyfikacji *P. multocida*, a w niektórych sytuacjach również do określania jej podgatunków [Chen i in. 2002, Dziva i in. 2008].

Klasyfikacja diagnostyka *P. multocida* opiera się na badaniu kilku cech fenotypowych, w tym morfologii kolonii, zdolności wytwarzania indolu, ODC oraz kwasu z mannitolu, dulcytolu, trehalozy i sorbitolu [Dousse i in. 2008]. Jest to zwykle wystarczające do identyfikacji tej bakterii. Stosunkowo często opisywane są jednak szczepy *P. multocida* o nietypowych właściwościach biochemicznych, w tym mannitoloujemne, ODC-ujemne oraz indoloujemne [Bisgaard i in. 1991, Kuhnert i in. 2000, Christensen i in. 2004, 2005, Mühldorfer i in. 2011], co może stanowić przyczynę pomyłek diagnostycznych. Również w badaniach własnych izolowano dwa szczepy *P. multocida*, które nie wytwarzały dekarboksylazy ornitynowej. Poza tym, relatywnie często (u 19% izolatów tego gatunku badanych w niniejszym opracowaniu)

obserwowano wytwarzanie kwasu z maltozy. Cecha ta, według wielu wcześniejszych doniesień, u *P. multocida* normalnie nie występuje [Mutters i in. 1985, Petersen i in. 1998]. Stosunkowo duża zmienność cech fenotypowych pałeczek *Pasteurellaceae* powoduje, że także inne gatunki z omawianej rodziny mogą być mylnie identyfikowane jako *P. multocida*. Przykładowo, w niniejszej pracy stwierdzono izolaty *H. haemoglobinophilus* wytwarzające dekarboksylazę ornitynową (jeden z nich był również mannitolododatni) oraz szczepy *P. dagmatis* wytwarzające ODC lub kwas z mannitolu (w tych ostatnich przypadkach identyfikacji fenotypowej dokonano na podstawie dodatniej próby na ureazę).

Opisana różnorodność właściwości biochemicznych *P. multocida* oraz pewne trudności w rutynowej identyfikacji tej bakterii skłoniły mikrobiologów do poszukiwania metod alternatywnych, opartych na cechach genotypowych. Do tej pory opisano kilka tego typu testów [Dziva i in. 2008], polegających na analizie sekwencyjnej wybranych genów [Kuhnert i in. 2000, Gautier i in. 2005, Kuhnert i in. 2006] albo wykorzystujących tradycyjną technikę PCR [Townsend i in. 1998, Miflin, Blackall 2001] lub real-time PCR [Corney i in. 2007]. Jednak dotychczasowe metody oparte na reakcji PCR przeznaczone są do wykrywania i identyfikacji *P. multocida* pochodzących od zwierząt gospodarskich (bydła, drobiu oraz świń), natomiast ich skuteczność nie była nigdy oceniana w odniesieniu do szczepów tej bakterii występujących od psów i kotów.

Do identyfikacji genotypowej *P. multocida* w badaniach własnych próbowano zastosować technikę PCR opisaną przez Townsend i in. [1998], polegającą na amplifikacji fragmentu genu *kmt* przy użyciu pary starterów KMT1T7 i KMT1SP6. Chociaż metoda ta była opracowana do rozpoznawania szczepów *P. multocida* izolowanych głównie od bydła i trzody chlewnej [Townsend i in. 1998, 2000], uważana jest jednak za metodę uniwersalną, pozwalającą na identyfikację praktycznie wszystkich izolatów tej bakterii [Hunt i in. 2000, Dziva i in. 2008, Hotchkiss i in. 2011]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują jednak, że opisana metoda identyfikacji *P. multocida* nie jest skuteczna w odniesieniu do szczepów tego gatunku izolowanych od psów i kotów, ponieważ spodziewany produkt o wielkości 460 p.z. został uzyskany tylko u części (37,5%) badanych izolatów. Przeprowadzona analiza dostępnych w GenBanku sekwencji genu *kmt* wykazała, że gen ten cechuje się stosunkowo dużą zmiennością sekwencji nukleotydów, a brak produktu reakcji PCR w badaniach własnych mógł mieć związek z odrębnością genetyczną analizowanych szczepów *P. multocida*, spowodowaną czynnikami geograficznymi i pochodzeniem od innych zwierząt-gospodarzy. Tezę tę potwierdzają dane z piśmiennictwa, wskazujące na bardzo duże zróżnicowanie genotypowe *P. multocida*, dotyczące nawet izolatów występujących u tego samego gatunku zwierząt na stosunkowo niewielkim obszarze [Loubinoux i in. 1999, Petersen i in. 2001, Davies 2004, Mühlendorfer i in. 2011, Pors i in. 2011]. Hotchkiss i in. [2011] wykazali ostatnio, że szczepy *P. multocida* izolowane z układu oddechowego bydła stanowią grupę o charakterze klonalnym, różniącą się od izolatów powodujących posocznicę krwotoczną u tych zwierząt. Z kolei szczepy tej bakterii pochodzące od innych zwierząt (ptaków, świń i owiec) reprezentowały odrębne typy sekwencyjne, wykazujące znacznie większe zróżnicowanie genotypowe. Było ono m.in. związane z pochodzeniem geograficznym izolatów. Przykładowo, stwierdzono różnice pomiędzy szczepami *P. multocida* izolowanymi od owiec w Hiszpanii i Nowej Zelandii [Hotchkiss i in. 2011].

Trudności w identyfikacji izolatów własnych *P. multocida* przy użyciu metody opisanej przez Townsend i in. spowodowały, że w przedstawionej pracy postanowiono zaprojektować nową parę starterów (oznaczonych jako KMTJBfor oraz KMTJBrev), oskrzydlających krótszy,

specyficzny dla wszystkich dostępnych sekwencji DNA, fragment genu *kmt* tej bakterii. Wykazano, że dzięki nowo opracowanym starterom możliwa była identyfikacja szczepów *P. multocida* izolowanych nie tylko od psów i kotów, ale także od innych zwierząt, np. drobiu, bydła, świń i królików. Z drugiej strony, w przypadku szczepów innych gatunków bakterii analizowanych w badaniach własnych – należących zarówno do rodziny *Pasteurellaceae*, jak i blisko spokrewnionych rodzin – nie stwierdzono zakładanego produktu PCR (o wielkości 168 p.z.) w reakcji z nowo zaprojektowanymi starterami, co świadczy o wysokiej swoistości przedstawionej metody.

Podobnie jak w przypadku identyfikacji *P. multocida* metodami biochemicznymi duży problem diagnostyczny może także stanowić fenotypowe różnicowanie podgatunków tej bakterii. Mutters i in. [1985], dokonując reklasyfikacji rodzaju *Pasteurella* oraz wyróżniając w obrębie gatunku *Pasteurella multocida* 3 podgatunki (subsp. *multocida*, *septica* i *gallicida*), zaproponowali schemat ich różnicowania na podstawie zdolności do rozkładu dulcytolu oraz sorbitolu. W następnych latach pojawiło się wiele doniesień poświęconych identyfikacji biochemicznej *P. multocida* i charakterystyce jej podgatunków [Bisgaard i in. 1991, Korbel i in. 1992, Fegan i in. 1995, Blackall i in. 1997]. Badania te wykazały, że w przypadkach zakażeń u małych zwierząt oraz u człowieka zdecydowanie dominują 2 podgatunki dulcitoloujemne, tj. *P. multocida* subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica*, a ich identyfikacja w trakcie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej może mieć pewne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne [Biberstein i in. 1991, Holst i in. 1992]. We wszystkich wspomnianych pracach zdolność do fermentacji sorbitolu była jedynym kryterium odróżniającym podgatunek *P. multocida* subsp. *multocida* (który uważano za sorbitolododatni) od *P. multocida* subsp. *septica*. Zastosowanie metod genotypowych (sekwencjonowanie genu 16S rRNA, REP-PCR, PCR-fingerprinting) do różnicowania szczepów *P. multocida* wykazało jednak, że wyniki badania rozkładu sorbitolu nie są zgodne z identyfikacją genetyczną podgatunków tej bakterii. Przykładowo, Kuhnert i in. [2000] stwierdzili, że na 9 badanych fenotypowo izolatów *P. multocida* subsp. *septica* aż 6 (66,7%) wykazuje zdolność do tworzenia kwasu z sorbitolu. Także Hunt Gerardo i in. [2001], którzy poddali analizie fenotypowej oraz genotypowej (metodą PCR z użyciem pojedynczego startera M13) 35 izolatów klinicznych *P. multocida* pochodzących z zakażonych ran kąsanych u człowieka, wykazali, że rozkład sorbitolu nie jest miarodajnym kryterium różnicowania obu podgatunków. Osiem (33,3%) z badanych przez nich szczepów *P. multocida* subsp. *septica* było sorbitolododatnich, 13 dawało wynik ujemny w tej reakcji, natomiast w przypadku 3 pozostałych izolatów uzyskano wyniki niejednoznaczne. Wspomniani autorzy zwrócili przy tym uwagę na fakt, że na wynik wykonywanych testów fermentacji węglowodanów stosunkowo duży wpływ ma użyte do testu podłoże oraz wskaźnik pH. Stanowi to dodatkowy problem w diagnostyce fenotypowej pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae*, gdyż stosowane rutynowo metody biochemiczne nie są na ogół ustandaryzowane, a przez to wyniki uzyskiwane przez różnych autorów są nie zawsze porównywalne.

Ponieważ reakcja wytwarzania kwasu z sorbitolu okazała się mieć małą wartość diagnostyczną przy różnicowaniu *P. multocida* subsp. *multocida* i *P. multocida* subsp. *septica*, Hunt Gerardo i in. [2001] zaproponowali do tego celu dodatkową próbę biochemiczną – wytwarzanie α -glukozydazy. Cecha ta zdawała się wykazywać znacznie większą – w porównaniu z reakcją rozkładu sorbitolu – korelację z wynikami badań genotypowych. Cytowani autorzy stwierdzili, że wszystkie szczepy zidentyfikowane przez nich na podstawie metody PCR jako *P. multocida* subsp. *septica* były α -glukozydazododatnie, natomiast większość (81,8%) izolatów *P. multocida* subsp. *multocida* dała wynik ujemny.

Wykazana przez powyższych autorów zmienność fenotypowa obu tych podgatunków *P. multocida* powoduje, że mogą być one rozróżniane w sposób absolutnie pewny jedynie metodami genotypowymi. Oprócz technik opartych na sekwencjonowaniu określonych genów opisano również kilka innych metod wykorzystujących reakcję łańcuchową polimerazy, w tym RAPD-PCR [Hunt Gerardo i in. 2001] oraz REP-PCR [Chen i in. 2002]. Obie te techniki są znacznie prostsze i szybsze niż sekwencjonowanie DNA, mają jednak również pewne ograniczenia. W metodzie PCR-fingerprinting [Hunt Gerardo i in. 2001], przy zastosowaniu stosunkowo niskiej temperatury przyłączania starterów, w elektroforegramie otrzymuje się bardzo liczną i zróżnicowaną u poszczególnych szczepów liczbę prążków. Ponieważ identyfikacja *P. multocida* subsp. *septica* i *P. multocida* subsp. *multocida* odbywa się tu na podstawie występowania lub braku któregoś z 4 prążków (A, B, C, D) o określonych wielkościach, odczyt i interpretacja wyników mogą być utrudnione. Również w metodzie REP-PCR obserwowano pewną zmienność dotyczącą ilości i wielkości otrzymanych produktów reakcji [Chen i in. 2002]. Twórcy tej metody jako powód nieregularnego występowania prążków w swoich elektroforegramach podali różnice w intensywności zabarwienia poszczególnych produktów PCR bromkiem etydydy, jednak wydaje się, że istotną przyczyną może być również zmienność genetyczna szczepów *Pasteurella multocida*.

Stosunkowo wysoki koszt technik sekwencjonowania oraz przedstawione powyżej trudności w interpretacji wyników przy istniejących metodach PCR skłoniły do opracowania w badaniach własnych nowej techniki różnicowania *P. multocida* subsp. *septica* i *P. multocida* subsp. *multocida*, możliwej do zastosowania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Zaproponowana w niniejszej pracy metoda PCR-RFLP jest stosunkowo prosta i szybka, a jej wyniki, całkowicie zgodne z wynikami sekwencjonowania, są znacznie łatwiejsze do interpretacji, gdyż amplifikowany jest fragment względnie konserwatywnego genu, jakim jest 16S rRNA, a w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym Ecl 136 II uzyskuje się jedynie 2 produkty (prążki), które u obu podgatunków mają różne wielkości.

Do identyfikacji trzeciego z wyróżnionych w obrębie *Pasteurella multocida* podgatunku, *P. multocida* subsp. *gallicida*, wykorzystuje się głównie jego zdolność do fermentacji dulcytolu [Mutters i in. 1985, Muhairwa i in. 2001, Davies 2004, Dousse i in. 2008]. Jediną metodą alternatywną, która mogłaby być zastosowana do odróżnienia tego podgatunku od dwóch pozostałych w diagnostyce mikrobiologicznej, jest analiza sekwencyjna niektórych genów konserwatywnych, np. 16S rRNA [Kuhnert i in. 2000] lub *sodA* [Gautier i in. 2005]. Jak jednak wykazano, różnice genotypowe między *P. multocida* subsp. *gallicida* oraz *P. multocida* subsp. *multocida* są często niewielkie (przykładowo, niezgodności w obrębie genu 16S rRNA pomiędzy tymi dwoma podgatunkami dotyczą jedynie 2 nukleotydów na 1364 porównywalnych) [Kuhnert i in. 2000], co przy uwzględnieniu znacznego zróżnicowania sekwencji 16S rRNA u szczepów *P. multocida* pochodzących od różnych zwierząt [Davies 2004] sprawia, że ten sposób identyfikacji jest niezbyt pewny. W dostępnym piśmiennictwie brak jest poza tym informacji na temat występowania szczepów dulcytolododatnich u podgatunków innych niż *P. multocida* subsp. *gallicida* (w przypadku gdy do ich identyfikacji stosowano zarówno metody genotypowe, jak i fenotypowe).

W niniejszym opracowaniu żaden szczep *P. multocida* poddany sekwencjonowaniu genu 16S rRNA nie miał typowej dla *P. multocida* subsp. *gallicida* sekwencji nukleotydów, nie stwierdzono też u badanych izolatów zdolności do fermentacji dulcytolu. Zatem przeprowadzone badania własne z wykorzystaniem zarówno metod fenotypowych, jak i genotypowych wykazały, że analizowane szczepy *P. multocida* należały do 2 podgatunków:

P. multocida subsp. *multocida* oraz *P. multocida* subsp. *septica*. Oba te podgatunki występowały z mniej więcej równą częstością u kotów (zarówno zdrowych, jak i z objawami zakażeń), natomiast u psów częściej była izolowana *P. multocida* subsp. *multocida*. Należy zaznaczyć, że dostępne dane literaturowe na temat częstotliwości izolacji obu podgatunków, zwłaszcza od kotów, są dość rozbieżne oraz nie zawsze miarodajne. Według niektórych autorów [Helmann i in. 1987, Biberstein i in. 1991, Ganiere i in. 1993] u kotów częściej występuje *P. multocida* subsp. *multocida* (stanowiąc od 58% do nawet 74% izolowanych szczepów *P. multocida*). Odmienne wyniki uzyskali natomiast autorzy szwajcarscy [Kuhnert i in. 2000], którzy na podstawie analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA stwierdzili wyłącznie izolaty należące do *P. multocida* subsp. *septica*, uznając go za podgatunek dominujący u kotów. Rozbieżność tych wyników i rezultatów badań własnych może wynikać z różnych przyczyn. W przypadku wcześniej wymienionej grupy opracowań, opublikowanych w latach 80. i 90. XX w., ich autorzy stosowali wyłącznie fenotypowe metody identyfikacji podgatunków *P. multocida* (m.in. próbę na sorbitol). Odsetek stwierdzonych izolatów *P. multocida* subsp. *multocida* mógł przez to zostać fałszywie zawyżony i wynikać z błędnego rozpoznania części szczepów sorbitolododatnich, które w rzeczywistości należały do podgatunku *P. multocida* subsp. *septica*. Z kolei autorzy szwajcarscy, wykorzystujący technikę sekwencjonowania 16S rRNA, przeprowadzili swe obserwacje na stosunkowo małej grupie (11 szczepów) *P. multocida*. Możliwe też, że częstotliwość występowania poszczególnych podgatunków omawianej bakterii jest różna w poszczególnych rejonach geograficznych.

Zastosowanie i porównanie w badaniach własnych dwóch alternatywnych sposobów identyfikacji (za pomocą testów biochemicznych oraz badań genotypowych) obu analizowanych podgatunków *P. multocida* pozwoliło na weryfikację metod fenotypowych stosowanych dotychczas w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje innych autorów, że zdolność do tworzenia kwasu z sorbitolu nie jest dobrym kryterium różnicującym oba podgatunki, gdyż większość izolatów należących zarówno do *P. multocida* subsp. *multocida* (95%), jak i do *P. multocida* subsp. *septica* (72%) dała wynik dodatni w tej reakcji. Dodatkowo w przedstawionej pracy wykazano, że stosunkowo małą wartość diagnostyczną mają również inne testy stosowane przez niektórych autorów do różnicowania *P. multocida*: próba na **α -glukozydazę oraz na rozkład trehalozy** [Hunt Gerardo i in. 2001, Dousse i in. 2008]. Chociaż właściwości tych praktycznie nie obserwowano w przypadku izolatów własnych *P. multocida* subsp. *multocida*, to jednak stwierdzono je tylko u nieco powyżej połowy (odpowiednio 58,6 i 65,5%) izolatów *P. multocida* subsp. *septica*. Powoduje to, że obecnie brak jest miarodajnych kryteriów fenotypowych do identyfikacji podgatunku *P. multocida* subsp. *multocida*, natomiast *P. multocida* subsp. *septica* może być rozpoznana na podstawie właściwości biochemicznych tylko w przypadku pozytywnej próby na trehalozę i/lub **α -glukozydazę**. **Co ciekawe, przedstawiona sytuacja rodzi pewną sprzeczność z zaleceniami podkomitetu do spraw taksonomii Pasteurellaceae, według których przy wyróżnianiu podgatunków w obrębie tej grupy bakterii powinna być podana co najmniej jedna cecha fenotypowa umożliwiająca ich różnicowanie** [Christensen i in. 2007].

Drugim pod względem liczby izolatów drobnoustrojem stwierdzonym w badaniach własnych okazał się Bisgaard Taxon 16 (BT16). Był on izolowany przede wszystkim od psów (u których okazał się najczęstszym przedstawicielem rodziny Pasteurellaceae), a znacznie rzadziej od kotów. Mimo dość powszechnego występowania u psów drobnoustrój ten nie wydaje się mieć dużego znaczenia klinicznego; zdecydowana większość izolatów własnych pochodziła od zwierząt klinicznie zdrowych. Przymuszczalnie z tego też powodu omawiana bakteria

często nie jest uwzględniana w schematach identyfikacyjnych adresowanych do weterynaryjnych pracowni mikrobiologicznych [Dousse i in. 2008]. Brak jest też doniesień dotyczących zakażeń wywołanych przez Bisgaard Taxon 16 u człowieka.

Omawiany drobnoustrój wykazuje dość duże podobieństwo właściwości biochemicznych do *Pasteurella stomatis* [Bisgaard, Mutters 1986, Biberstein i in. 1991], co utrudnia, a nawet często uniemożliwia identyfikację fenotypową obu tych bakterii. Jak wynika z badań własnych i doniesień innych autorów [Muhairwa i in. 2001, Forsblom i in. 2002], *P. stomatis* występuje u psów i kotów znacznie rzadziej niż Bisgaard Taxon 16, może jednak mieć dużo większe znaczenie kliniczne i epidemiologiczne [Holst i in. 1992, Dousse i in. 2008]. Dlatego kwestią dość istotną jest szybkie i pewne różnicowanie tych drobnoustrojów. W dostępnym piśmiennictwie istnieją jednak kontrowersje dotyczące niektórych cech fenotypowych obu gatunków. Według części autorów [Mutters i in. 1985, Muhairwa i in. 2001] *P. stomatis* – w przeciwieństwie do BT16 – nie wytwarza kwasu z maltozy. Natomiast w innym opracowaniu [Forsblom i in. 2002] większość badanych izolatów *P. stomatis* (4 z 6 szczepów terenowych oraz szczep referencyjny tego gatunku) dała wynik dodatni w tej reakcji. Wyniki badań własnych potwierdzają pierwszą z powyższych opinii, gdyż żaden szczep zakwalifikowany metodami genotypowymi jako *P. stomatis* nie rozkładał maltozy; stwierdzono jednak, że maltozoujemne okazały się również niektóre izolaty BT16. Proponowane przez niektórych autorów różnicowanie obu gatunków na podstawie próby na β -galaktozydazę (ONPG) może także być mylące, ponieważ wszystkie szczepy należące do BT16, analizowane w pracy Forsblom i in. [2002], okazały się dodatnie w tej próbie, podczas gdy inni autorzy [Muhairwa i in. 2001] uzyskali wynik ujemny.

Dobrym rozwiązaniem dla przedstawionych powyżej trudności diagnostycznych okazało się wykorzystanie nowo opracowanej w badaniach własnych techniki PCR z użyciem starterów gatunkowo-specyficznych. Metoda ta umożliwia nie tylko szybką identyfikację *Pasteurella stomatis* oraz BT 16, ale również, przy zastosowaniu jednej reakcji multiplex-PCR, jednoznaczne odróżnianie obu tych gatunków od siebie.

Podobnie jak Bisgaard Taxon 16 *Pasteurella canis* należy do stosunkowo często stwierdzanych przedstawicieli rodziny *Pasteurellaceae*. Gatunek ten występuje na błonach śluzowych jamy ustnej i górnych dróg oddechowych u różnych zwierząt, zwłaszcza psów [Biberstein i in. 1991, Bisgaard 1993, Forsblom i in. 2002, Dousse i in. 2008], a także może być izolowany z przypadków zakażeń u ludzi [Holst i in. 1992, Talan i in. 1999, Albert, Stevens 2010]. W badaniach własnych *P. canis* izolowana była wyłącznie od psów – zarówno klinicznie zdrowych, jak i wykazujących objawy zapalenia ucha zewnętrznego lub gardła; nie stwierdzono natomiast tej bakterii u kotów. Podobne wyniki uzyskało również wielu innych autorów [Hellmann i in. 1987, Ganiere i in. 1993, Mohan i in. 1997, Muhairwa i in. 2001, Dousse i in. 2008]. Biberstein i in. [1991] wykazali obecność *P. canis* u kilku gatunków zwierząt (w tym u kotów), jednak u tych ostatnich drobnoustrój występował stosunkowo rzadko (stanowił 5,4% ogólnej liczby szczepów z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych przez cytowanych badaczy). Zdecydowanie odmienne wyniki uzyskali natomiast Baldrias i in. [1988], według których *P. canis* jest bardzo częstym składnikiem mikroflory bakteryjnej błony śluzowej gardła u kotów (stanowiąc aż 18% izolowanych szczepów należących do rodzaju *Pasteurella*). Wyniki badań uwzględniających identyfikację genotypową sugerują jednak, że *P. canis* jest mikroorganizmem mającym wysoki stopień przystosowania ewolucyjnego do błon śluzowych psów. Chociaż drobnoustrój ten może być czasem izolowany również od innych zwierząt, to tak częste nosicielstwo u kotów jest mało prawdopodobne. Można przy-

puszczać, że stwierdzony przez Baldrias i in. [1988] znaczny odsetek szczepów *P. canis* u kotów wynika raczej z błędnej identyfikacji tego gatunku bakterii przez wspomnianych autorów. Trudno jest jednak zweryfikować te dane, gdyż we wspomnianej pracy brakuje szczegółów dotyczących zarówno stosowanej metodyki, jak i właściwości biochemicznych poszczególnych izolatów. Ponadto badacze ci nie stosowali żadnych metod genotypowych w celu potwierdzenia uzyskanych wyników. Badania innych autorów wykazują, że rozpoznawanie fenotypowe *P. canis* może być niepewne; np. Kuhnert i in. [2000] zarejestrowali, że spośród 11 szczepów *P. multocida* subsp. *septica*, poddanych przez nich analizie metodami genotypowymi, trzy były wcześniej rozpoznane fenotypowo jako *P. canis*.

Identyfikacja biochemiczna *P. canis* w badaniach własnych również okazała się trudna i stosunkowo mało skuteczna. Było to spowodowane przede wszystkim tym, że większość izolatów tego gatunku dawała bardzo słabą lub opóźnioną reakcję rozkładu węglowodanów na podłożu CTA. W konsekwencji, często jedyną reakcją biochemiczną charakterystyczną dla tej bakterii było wytwarzanie dekarboksylazy ornitynowej. Nie jest to jednak cecha występująca w każdym przypadku, gdyż trzy z badanych szczepów *P. canis* (15,8%) okazały się ODC-ujemne. Z drugiej strony, jako *P. canis* został mylnie rozpoznany jeden z izolatów *Haemophilus haemoglobinophilus* (dodatni w próbie na ODC i niewytwarzający kwasu z mannitolu). Opisane powyżej trudności diagnostyczne spowodowały, że tylko niewielki odsetek (ok. 10%) badanych szczepów *P. canis* został jednoznacznie zidentyfikowany przy użyciu metod fenotypowych, natomiast w przypadku większości pozostałych rozpoznanie określono jako niepewne. Warto podkreślić, że stwierdzona w przedstawionej pracy mała aktywność biochemiczna izolatów tej bakterii w odniesieniu do rozkładu węglowodanów była również opisywana przez innych autorów [Ganiere i in. 1993]. Wydaje się więc, że zjawisko to jest związane nie tylko z rodzajem zastosowanego podłoża lub wskaźnika pH, ale może też wynikać ze specyficznych właściwości metabolicznych przynajmniej części szczepów *P. canis*.

Kolejnym drobnoustrojem z rodziny *Pasteurellaceae*, którego identyfikacja fenotypowa w badaniach własnych okazała się praktycznie niemożliwa, był *Haemophilus haemoglobinophilus*. Chociaż za typowe miejsce bytowania tej bakterii uważa się błony śluzowe układu rozrodczego psów [Kilian, Frederiksen 1981, Garrity i in. 2005, Songer, Post 2005], większość szczepów analizowanych w niniejszej pracy pochodziła z jamy ustnej i gardła tych zwierząt, a tylko dwa izolowane były z przypadków zapalenia pochwy (*vaginitis*). Należy podkreślić, że *H. haemoglobinophilus* nie był notowany w żadnym wcześniejszym doniesieniu, w którym przy użyciu metod fenotypowych identyfikowane były drobnoustroje występujące w jamie ustnej u psów [Ganiere i in. 1993, Muhairwa i in. 2001a, 2001b, Forsblom i in. 2002]. Gatunek ten był natomiast stwierdzony przez Elliota i in. [2005], którzy rozpoznawali bakterie izolowane z powierzchni dziąseł oraz ze śliny psów za pomocą sekwencjonowania genu 16S rRNA. Uwzględniając wyniki badań własnych, jest więc bardzo prawdopodobne, że *H. haemoglobinophilus* występuje u psów znacznie powszechniej niż do tej pory sądzono, a fakt, że jest on stosunkowo rzadko wykazywany przez innych autorów, bierze się głównie z relatywnie niskiej patogenności tego drobnoustroju (zwłaszcza jeśli chodzi o zakażenia zlokalizowane poza układem rozrodczym) oraz z trudności w jego identyfikacji fenotypowej. Przypuszczalnie też z tych powodów *H. haemoglobinophilus* nie jest zwykle uwzględniany w schematach rutynowej identyfikacji bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* u zwierząt [Forsblom i in. 2002, Dousse i in. 2008].

W badaniach własnych *H. haemoglobinophilus* okazał się bakterią o stosunkowo dobrze zaznaczonej aktywności biochemicznej, jednak wśród izolowanych szczepów obserwowano

też bardzo duże zróżnicowanie właściwości fenotypowych. Dodatkowo ani badania własne, ani wyniki uzyskane przez innych autorów [Piechulla i in. 1986] nie pozwalają na ustalenie charakterystycznej dla tego gatunku cechy lub kombinacji cech, które umożliwiłyby jego rozpoznanie. W efekcie ani jeden z 7 badanych izolatów *H. haemoglobinophilus* nie został zidentyfikowany fenotypowo; wśród nich dwa szczepy – dodatkowo w próbie na dekarboksylazę ornitynową – rozpoznano błędnie jako *P. multocida* oraz *P. canis*.

Podobnie jak w przypadku poprzednio omawianych gatunków należących do rodziny *Pasteurellaceae*, zastosowanie gatunkowo swoistych reakcji PCR pozwoliło na szybką i pewną identyfikację zarówno *P. canis*, jak i *H. haemoglobinophilus*. Nowo opracowana metoda okazała się równie skuteczna jak diagnostyka oparta na analizie sekwencyjnej odpowiednich fragmentów DNA bakterii, natomiast zdecydowanie szybsza i tańsza, a przez to łatwiejsza do wykorzystania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej.

Kolejny gatunek z omawianej rodziny, *Pasteurella dagmatis*, identyfikowany jest zwykle fenotypowo na podstawie dodatniej próby na ureazę oraz ujemnej na dekarboksylazę ornitynową [Dousse i in. 2008, Guillard i in. 2009, Sellyei i in. 2010]. Wykazano jednak, że sporadycznie mogą być też stwierdzane szczepy tej bakterii o nietypowych właściwościach biochemicznych, tj. ureazoujemne i ODC-dodatnie [Muhairwa i in. 2001]. Ponadto, *P. dagmatis* wykazuje pewne podobieństwo cech fenotypowych (wytwarzanie ureazy) do Bisgaard Taxon 46 oraz *P. pneumotropica*, co może stwarzać pewne problemy w rutynowej identyfikacji tych 3 gatunków w laboratorium. Jak dotąd, Taxon 46 izolowany był wyłącznie od ludzi z ran kłasnanych powodowanych przez pantery [Christensen i in. 2005]. Natomiast *P. pneumotropica* jest drobnoustrojem występującym dość powszechnie, a przez to izolowanym znacznie częściej. Chociaż gatunek ten stwierdzany jest przede wszystkim u zwierząt laboratoryjnych – głównie myszy i szczurów [Nozu i in. 1999, Songer, Post 2005, Dole i in. 2010], to jednak był również izolowany od kota [Bisgaard 1993], a także może powodować zakażenia u człowieka [Frebourg i in. 2002]. Sprawia to, że w niektórych sytuacjach, szczególnie w przypadkach szczepów o nietypowych właściwościach biochemicznych lub przy badaniach epidemiologicznych, konieczna staje się także identyfikacja genotypowa izolatów należących do opisanej grupy ureazododatnich pałeczek *Pasteurellaceae*.

W badaniach własnych wyizolowano 16 szczepów *P. dagmatis*, w tym 11 od kotów, 4 od psów i 1 od tygrysa. Ich właściwości fenotypowe były w większości przypadków typowe dla tego gatunku bakterii. Wyjątek stanowił jeden izolat dodatni w próbie na dekarboksylazę ornitynową i jeden rozkładający mannitol (oba pochodzące od psów) oraz 2 szczepy sorbitolododatnie – od kota i od tygrysa. Wszystkie badane izolaty dały wynik dodatni w reakcji PCR z nowo opracowanymi starterami specyficznymi w przypadku *P. dagmatis*. Okazało się jednak, że szczepy tego gatunku pochodzące od psów oraz kotów różniły się dość istotnie od siebie pod względem sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA. Zróżnicowanie to miało swoje odzwierciedlenie w wynikach identyfikacji przy użyciu algorytmu BLAST. Szczepy wyizolowane od psów (w tym szczep referencyjny CCUG32658, badany w niniejszej pracy) miały sekwencje 16S rRNA praktycznie identyczne z sekwencją szczepu typowego *P. dagmatis* CCUG12397^T (oznaczoną w GenBanku numerem AY362920). Natomiast izolaty pochodzące od kotów wykazywały 99,5–99,9% podobieństwa do jednego ze szczepów referencyjnych *Pasteurella pneumotropica* (NCTC10827, sekwencja 16S rRNA oznaczona jako AF224296), co powodowało, że były one identyfikowane jako *P. pneumotropica* przy użyciu programu BLAST. W celu wyjaśnienia powstałej niezgodności, w badaniach własnych zostały dodatkowo zaprojektowane startery specyficzne w przypadku *P. pneumotropica*. W przeprowa-

dzanej reakcji PCR wynik dodatni otrzymano jedynie w przypadku szczepu referencyjnego *P. pneumotropica* (CCUG47008), użytego jako kontrola dodatnia metody. Produktu reakcji nie stwierdzono natomiast w przypadku izolatów *P. dagmatis* (zarówno od psów, jak i kotów, a także od tygrysa), rozpoznanych za pomocą metod fenotypowych oraz przy użyciu nowo opracowanej metody PCR. Uzyskane w ten sposób wyniki wskazują, że analizowane szczepy pochodzące od kotów, chociaż identyfikowane jako *P. pneumotropica* na podstawie programu BLAST, są w rzeczywistości odrębną subpopulacją *P. dagmatis*, różniącą się genetycznie od izolatów tego gatunku pochodzących od psów. W celu jednoznacznego wyjaśnienia tego problemu przeprowadzono w prezentowanej pracy dodatkowo serię badań filogenetycznych, aby ustalić pozycję taksonomiczną szczepów izolowanych od kotów i uznanych za subpopulację *P. dagmatis* oraz określić stopień ich pokrewieństwa z izolatami *P. dagmatis* pochodzącymi od psów, a także z różnymi szczepami *P. pneumotropica* (innymi niż NCTC10827).

Wykonane porównanie sekwencji nukleotydów dwóch genów: 16S rRNA oraz *rpoB* potwierdziło, że szczepy *P. dagmatis* izolowane od kotów stanowią jednorodną i spójną grupę, wyraźnie wyodrębnioną wśród gatunków należących do *Pasteurella sensu stricto*. Wykazano ponadto, że izolat 197 pochodzący z jamy ustnej tygrysa syberyjskiego różnił się pod względem genetycznym od pozostałych badanych szczepów omawianego gatunku bakterii. Co ciekawe, chociaż drobnoustroje należące do *P. dagmatis* mogą być izolowane od różnych zwierząt [Bisgaard 1993, Songer, Post 2005, Dousse i in. 2008], przedstawione zjawisko zróżnicowania genetycznego szczepów tej bakterii w zależności od gatunku gospodarza, jak dotąd, nie było przedmiotem dokładniejszych badań. Temat ten został poruszony jedynie w niedawno opublikowanej pracy autorów węgierskich [Selyei i in. 2010], którzy opisali nietypowe szczepy *P. dagmatis* izolowane od kotów. Podczas gdy właściwości biochemiczne wspomnianych izolatów były charakterystyczne dla tego gatunku bakterii, z uwagi na nietypowy wygląd ich kolonii zostały one określone jako „*P. dagmatis*-like”. Przeprowadzona przez tych badaczy analiza sekwencyjna genu 16S rRNA kilku wybranych szczepów wykazała, że podobnie jak w przypadku analizowanych w badaniach własnych izolatów pochodzących od kotów sekwencje te były tylko w 97% zgodne ze znanymi sekwencjami *P. dagmatis*, cechowały się natomiast dużym (około 99,5%) podobieństwem do genu 16S rRNA *Pasteurella pneumotropica* NCTC10827. Jednak oprócz stwierdzenia samego faktu istnienia u kotów odrębnych genetycznie szczepów podobnych do *P. dagmatis* wspomniani autorzy nie wyciągnęli wniosków dotyczących znaczenia ekologicznego i epidemiologicznego tego zjawiska. Prawdopodobnie wynikało to z faktu, że poddali oni sekwencjonowaniu gen 16S rRNA zaledwie trzech (z 12 wyizolowanych) szczepów „*P. dagmatis*-like”. Ponadto, w przeprowadzonych przez nich badaniach porównawczych nie uwzględnili sekwencji tych szczepów *P. dagmatis*, które miały udokumentowane pochodzenie od psów. Większość autorów w przeprowadzanych przez siebie analizach filogenetycznych wykorzystuje bowiem sekwencje DNA otrzymane ze szczepów typowych danego gatunku bakterii; w przypadku *P. dagmatis* jest to szczep ATCC43325 (oznaczony w innych kolekcjach jako NCTC11617 lub CCUG12397), wyizolowany z układu oddechowego człowieka. Jak się przyjmuje, w normalnych warunkach ludzie nie są nosicielami drobnoustrojów z rodzaju *Pasteurella* [Garrity i in. 2005]. Wspomniany szczep typowy ma więc niewątpliwie pochodzenie odzwierzęce, jednak brak znajomości jego pierwotnego źródła powoduje, że w badaniach nad występowaniem określonych populacji *P. dagmatis* u zwierząt szczep ten jest mało przydatny. Przeprowadzone w badaniach własnych porównanie sekwencji 16S rRNA i *rpoB* u izolatów *P. dagmatis* wyosobnionych od kotów oraz u szczepów izolowanych od psów (w tym zastosowanego w niniejszej pracy szczepu referencyjnego

CCUG 32658, również pochodzącego od psa) udowodniło, że *P. dagmatis* jest gatunkiem heterogennym, zróżnicowanym genetycznie na dwie linie ewolucyjne, z których każda jest specyficzna dla określonego gatunku zwierzęcia-gospodarza.

Jest prawdopodobne, że izolowany od tygrysa szczep 197 reprezentuje jeszcze inną, do tej pory nie opisaną, subpopulację *P. dagmatis*. W celu potwierdzenia tej tezy niezbędne są jednak dalsze badania, uwzględniające większą liczbę izolatów pochodzących od tygrysów, jak również ewentualne kolejne szczepy „*P. dagmatis*-like” od innych dzikich kotowatych. Porównanie sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA szczepu 197 z sekwencjami dostępnymi w GenBanku wykazało, że izolat od tygrysa jest genetycznie najbardziej zbliżony do wyosobnionego przez badaczy węgierskich [Sellyei i in. 2010] od kota szczepu „*P. dagmatis*-like” 1/1 (GU177867) oraz szczepu referencyjnego *P. pneumotropica* NCTC10827 (podobieństwo wynosi, odpowiednio, 99,08 i 98,58%). Stwierdzono także relatywnie wysoki (97,78–98,15%) stopień homologii 16S rRNA pomiędzy szczepem 197 a opisanym wcześniej Bisgaard Taxon 46 (BT46), izolowanym z ran kłasnanych powodowanych przez pantery. Oba te pochodzące od dużych kotów drobnoustroje wykazują pewne podobieństwo właściwości biochemicznych (m.in. dodatnią reakcję na ureazę); szczep 197 różnił się jednak fenotypowo od BT46 zdolnością do fermentacji sacharozy. Ponadto, wyniki analiz filogenetycznych, opierające się na porównaniu sekwencji genów 16S rRNA i *rpoB* wskazują, że szczep izolowany od tygrysa spokrewniony jest bardziej z *P. dagmatis* niż z BT46.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że wszystkie szczepy *P. dagmatis* izolowane od kotów stanowią genetycznie spójną grupę, wykazującą blisko 100% podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA z węgierskimi szczepami „*P. dagmatis*-like” 5/8 i 8/4 (sekwencje w GenBanku o numerach GU177868 i GU177869) oraz szczepem oznaczonym jako *P. pneumotropica* NCTC10827, wyraźnie zaś różniącą się od szczepów *P. dagmatis* wyosobnionych od psów. Nie wiadomo, czy ta odmienność genetyczna dotyczy tylko szczepów występujących u zwierząt w Europie Środkowej, czy też ma charakter bardziej powszechny. Pewne fakty wskazują jednak, że specyficzne dla kotów szczepy *P. dagmatis* stwierdzane były również w Europie Zachodniej. Jako przykład może posłużyć opisany w literaturze przypadek zapalenia otrzewnej u człowieka, spowodowany przez *P. dagmatis* [Wallett i in. 2000]. Na podstawie danych z wywiadu za źródło zakażenia uznano przebywające w otoczeniu pacjentki koty, od których bakteria została przeniesiona na elementy wchodzące w skład aparatu do dializy otrzewnowej. Wyizolowany szczep poddany został badaniu metodami fenotypowymi oraz genotypowymi (sekwencjonowanie genu 16S rRNA), a stwierdzony stopień podobieństwa (97%) tego genu do istniejących w GenBanku sekwencji *P. dagmatis* był identyczny z tym, jaki obserwowano w przypadku grupy „kociej” tej bakterii (w badaniach własnych) oraz „*P. dagmatis*-like” (u autorów węgierskich [Sellyei i in. 2010]). Ponieważ jednak wspomniany szczep izolowany od człowieka nie został przekazany do żadnej publicznej kolekcji ani uzyskanej od niego sekwencji DNA nie umieszczono w ogólnie dostępnej bazie danych, potwierdzenie powyższej hipotezy jest na tej podstawie niemożliwe.

Przedstawione wyniki badań własnych oraz wykonanych przez Sellyei i in. [2010] wskazują, że szczep referencyjny znajdujący się w National Collection of Type Cultures (Wielka Brytania), oznaczony jako NCTC10827, został błędnie zidentyfikowany jako *P. pneumotropica*, a co za tym idzie, sekwencję jego genu 16S rRNA (AF224296) błędnie opisano w GenBanku; w rzeczywistości należy on do tej samej subpopulacji *P. dagmatis*, która występuje u kotów. Szczep NCTC10827, wyizolowany w roku 1971 z przypadku posocznicy u człowieka, został oznaczony jako *P. pneumotropica* na podstawie właściwości biochemicznych (głównie

dotatniej reakcji na ureazę) [Rogers i in. 1973]. W wyniku reklasyfikacji rodzaju *Pasteurella* [Mutters i in. 1985] niektóre izolaty *P. pneumotropica* (należące do biotypu Henriksen) zostały przeniesione do nowo utworzonego gatunku *P. dagmatis*. Prawdopodobnie z uwagi na genetyczną odrębność szczepu NCTC10827 od „klasycznych” izolatów *P. dagmatis* pozostał on w dalszym ciągu w grupie *P. pneumotropica* – chociaż traktowany był jako nietypowy przedstawiciel tego gatunku [Garrity i in. 2005, Sasaki i in. 2006]. Należy podkreślić, że również właściwości biochemiczne szczepu NCTC10827 są charakterystyczne bardziej dla *P. dagmatis* niż dla *P. pneumotropica*. Nie wytwarza on dekarboksylazy ornitynowej [Sellyei i in. 2010] – podczas gdy *P. pneumotropica* jest zwykle ODC-dodatnia [Guillard i in. 2009, Sasaki i in. 2006]. Ponadto, stwierdzona w przypadku omawianego szczepu zdolność produkcji gazu z niektórymi węglowodanów [Rogers i in. 1973] również przemawia za tym, że należy on raczej do grupy „*P. dagmatis*-like” niż do *P. pneumotropica*.

Kwestią otwartą pozostaje na razie pozycja taksonomiczna nowo opisanej subpopulacji *P. dagmatis* występującej u kotów. Analizy filogenetyczne, przeprowadzone na podstawie porównywania sekwencji genów 16S rRNA i *rpoB*, dały niejednoznaczne wyniki odnośnie stopnia odrębności genetycznej grupy „kociej” *P. dagmatis* od pozostałych gatunków z rodzaju *Pasteurella*. W dendrogramie uzyskanym na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA szczepu *P. dagmatis* izolowane od kotów nie tylko wykazują stosunkowo niski stopień pokrewieństwa z izolatami tego gatunku pochodzącymi od psów, ale jeszcze wydają się być bardziej spokrewnione z *Pasteurella stomatis* oraz *P. canis*. Podobieństwo sekwencji w obrębie genu 16S rRNA u obu badanych grup (psiej i kociej) *P. dagmatis* wynosi jedynie 97% – znacznie mniej, niż można by się spodziewać, biorąc pod uwagę ich praktycznie jednakowe właściwości biochemiczne. Podobne wartości (96,7–97,2%) stwierdzili również badacze węgierscy w odniesieniu do swoich szczepów *P. dagmatis*-like [Sellyei i in. 2010]. Według współczesnych kryteriów taksonomicznych, jest to wartość graniczna, przyjęta w celu definiowania i rozróżniania gatunków bakteryjnych [Stackebrandt, Goebel 1994]. Wyniki badań tych ostatnich autorów wskazują bowiem, że dwa porównywane drobnoustroje, wykazujące wysoki (wynoszący co najmniej 70%) stopień reasocjacji DNA-DNA i w związku z tym uznane za przedstawicieli tego samego gatunku, będą miały poziom homologii 16S rRNA wynoszący co najmniej 97%. W opisywanym przypadku stwierdzony stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA nie może zatem decydować o uznaniu szczepów izolowanych od kotów za odrębny gatunek w obrębie rodzaju *Pasteurella sensu stricto*. W tego typu sytuacjach wątpliwych sugerowane są inne metody genetyczne: określanie stopnia homologii DNA-DNA lub analiza sekwencyjna tzw. housekeeping genes (MLSA – Multilocus Sequence Analysis oraz MLST – Multilocus Sequence Typing) [Stackebrandt, Goebel 1994, Stackebrandt i in. 2002, Christensen i in. 2004, 2007]. Przeprowadzone porównanie sekwencji dwóch takich genów: *rpoB* (w prezentowanej publikacji) oraz *sodA* [Sellyei i in. 2010] wykazały, że występująca u kotów subpopulacja jest jednak najbardziej spokrewniona z *P. dagmatis*, a wykazana w badaniach własnych odrębność genetyczna tej grupy przemawia za przyznaniem jej rangi co najmniej podgatunku. W tym celu konieczne są jednak dalsze badania, m.in. dokładniejsza charakterystyka fenotypowa izolowanych szczepów. Zgodnie z zaleceniami podkomitetu do spraw taksonomii *Pasteurellaceae* [Christensen i in. 2007], aby genetycznie spójną grupę szczepów można było uznać za nowy podgatunek, musi być także określona chociaż jedna cecha fenotypowa, różniąca tę grupę od taksonów istniejących dotychczas i umożliwiająca jej identyfikację metodami konwencjonalnymi. Niestety, dotychczasowe badania nie pozwoliły na ustalenie takiej właściwości biochemicznej, która odróżniałaby od siebie izolaty

P. dagmatis pochodzące od psów oraz od kotów. Stąd w niniejszej pracy obie te grupy traktowane są jako subpopulacje należące do tego samego gatunku.

Ponieważ *Pasteurella dagmatis* może być przyczyną różnych zakażeń u człowieka [Holst i in. 1992, Sorbello i in. 1994, Talan i in. 1999, Wallet i in. 2000, Rosenbach i in. 2001, Ashley i in. 2004], wykazane w badaniach własnych różnicowanie genetyczne szczepów tej bakterii ma pewne znaczenie z epidemiologicznego punktu widzenia, zwłaszcza w przypadkach gdy źródło infekcji pozostaje nieznane. Drobnoustroje z rodziny *Pasteurellaceae* z reguły powodują u człowieka zakażenia oportunistyczne; infekcje te stwierdzane są głównie u osób starszych lub z upośledzoną funkcją układu immunologicznego i mają często skłonność do nawrotów [Fajfar-Whetstone i in. 1995, Cooke i in. 2004, Allison, Clarridge 2005]. Zaproponowana metoda różnicowania obu subpopulacji *P. dagmatis* przy użyciu techniki PCR-RFLP pozwala na szybkie i dokładne ustalenie źródła pochodzenia izolowanego szczepu, a przez to na podjęcie skuteczniejszych działań profilaktycznych.

Podsumowując, przeprowadzone badania własne pozwoliły na opracowanie schematu diagnostycznego, który umożliwia w sposób kompleksowy rozpoznawanie drobnoustrojów należących do rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów. Dokładna identyfikacja gatunkowa bakterii z tej grupy może się przyczynić do lepszego poznania i zrozumienia zagadnień dotyczących występowania oraz znaczenia epidemiologicznego pałeczek *Pasteurellaceae* u zwierząt towarzyszących.

6. WNIOSKI

1. Wśród drobnoustrojów z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u małych zwierząt dominują Bisgaard Taxon 16 i *Pasteurella canis* (u psów) oraz *Pasteurella multocida* (u kotów).

2. Z uwagi na dużą zmienność właściwości biochemicznych oraz zróżnicowanie genotypowe przedstawicieli omawianej grupy bakterii stosowane dotychczas metody identyfikacji fenotypowej oraz za pomocą analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA są nie zawsze skuteczne.

3. Przedstawiony w niniejszej pracy schemat identyfikacji pałeczek *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów, stanowiący kombinację metod biochemicznych oraz reakcji PCR ze starterami gatunkowo swoistymi, ma dużą wartość diagnostyczną i może być z powodzeniem zastosowany w rutynowej pracowni mikrobiologicznej.

4. Izolowane od kotów szczepy *Pasteurella dagmatis* stanowią pod względem genetycznym zwartą grupę, wyraźnie różniącą się od szczepów tej bakterii pochodzących od psów. Do ustalenia jej pozycji taksonomicznej niezbędne są jednak dalsze badania fenotypowe i genotypowe.

7. PIŚMIENNICTWO

- Akahane T., Nagata M., Matsumoto T., Murayama T., Isaka A., Kameda T., Fujita M., Oana K., Kawakami Y., 2011. A case of wound dual infection with *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella canis* resulting from a dog bite – limitations of Vitek-2 system in exact identification of *Pasteurella* species. Eur. J. Med. Res., 16, 531–536.
- Albert T.J., Stevens D.L., 2010. The first case of *Pasteurella canis* bacteremia: a cirrhotic patient with an open leg wound. Infection, 38, 483–485.
- Allison K., Clarridge III J.E., 2005. Long-term respiratory tract infection with canine-associated *Pasteurella dagmatis* and *Neisseria canis* in a patient with chronic bronchiectasis. J. Clin. Microbiol., 43, 4272–4274.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., 215, 403–410.
- Arashima Y., Kumasaka K., Okuyama K., Tsuchiya T., Kawano K., Koizumi F., Sano K., Kaya H., 1992. [The first report of human chronic sinusitis by *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* in Japan] (Artykuł w języku japońskim). Kansenshogaku Zasshi, 66, 232–235.
- Ashley B.D., Noone M., Dwarakanath A.D., Malnick H., 2004. Fatal *Pasteurella dagmatis* peritonitis and septicaemia in a patient with cirrhosis: a case report and review of the literature. J. Clin. Pathol., 57, 210–212.
- Avril J.-L., Donnio P.-Y., Pouedras P., 1990. Selective medium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders. J. Clin. Microbiol., 28, 1438–1440.
- Baldrias L., Frost A.J., O'Boyle D., 1988. The isolation of *Pasteurella*-like organisms from the tonsillar region of dogs and cats. J. Small Anim. Pract., 29, 63–68.
- Biberstein E.L., Jang S. S., Kass P. H., Hirsh D.C., 1991. Distribution of indole-producing urease-negative pasteurellas in animals. J. Vet. Diagn. Invest., 3, 319–323.
- Bisgaard M., Houghton S.B., Mutters R., Stenzel A., 1991. Reclassification of German, British and Dutch isolates so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. Vet. Microbiol., 26, 115–124.
- Bisgaard M., 1993. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. Zbl. Bakt., 279, 7–26.
- Bisgaard M., Mutters R., 1986. Characterization of some previously unclassified *Pasteurella* spp. obtained from the oral cavity of dogs and cats and description of a new species tentatively classified with the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981 and provisionally called Taxon 16. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., 94B, 177–184.
- Bisping W., Amtsberg G., 1988. Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg.
- Blackall P.J., Pahoff J.L., Bowles R., 1997. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. Vet. Microbiol., 57, 355–360.

- Boot R., Van den Brink M., Handgraaf P., Timmermans R., 2004. The use of the API 20NE bacteria classification procedure to identify *Pasteurellaceae* strains in rodents and rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 31, 177–183.
- Burdge D.R., Scheifele D., Speert D.P., 1985. Serious *Pasteurella multocida* infections from lion and tiger bites. *J. Am. Med. Assoc.*, 253, 3296–3297.
- Capitini C.M., Herrero I.A., Patel R., Ishitani M.B., 2002. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin. Infect. Dis.*, 34, E74–E76.
- Cattoir V., Lemenand O., Avril J.-L., Gaillot O., 2006. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296, 531–540.
- Chen H.I., Hulten K., Clarridge III J.E., 2002. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3438–3441.
- Christensen H., Angen Ø., Olsen J.E., Bisgaard M., 2004a. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology*, 150, 1757–1767.
- Christensen H., Bisgaard M., Angen Ø., Frederiksen W., Olsen J.E., 2005. Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants including isolates from large-cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 259–270.
- Christensen H., Kuhnert P., Olsen J.E., Bisgaard M., 2004b. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1601–1609.
- Christensen H., Kuhnert P., Busse H.-J., Frederiksen W.C., Bisgaard M., 2007. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 166–178.
- Clarridge III J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17, 840–862.
- Cooke F.J., Kodjo A., Clutterbuck E.J., Bamford K.B., 2004. A case of *Pasteurella multocida* peritoneal dialysis-associated peritonitis and review of the literature. *Int. J. Inf. Dis.*, 8, 171–174.
- Corney B.G., Diallo I.S., Wright L.L., Hewitson G.R., De Jong A.J., Burrell P.C., Duffy P.F., Stephens C.P., Rodwell B.J., Boyle D.B., Blackall P.J., 2007. *Pasteurella multocida* detection by 5' *Taq* nuclease assay: A new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J. Microbiol. Methods*, 69, 376–380.
- Curtis P.E., Ollerhead G.E., 1982. *Pasteurella multocida* infection of cats on poultry farms. *Vet. Rec.*, 110, 13–14.
- Davies R.L., 2004. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology*, 150, 4199–4210.
- Dewhirst F.E., Paster B.J., Olsen I., Fraser G.J., 1992. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. *J. Bact.*, 174, 2002–2013.
- Dole V.S., Banu L.A., Fister R.D., Nicklas W., Henderson K.S., 2010. Assessment of *rpoB* and 16S rRNA genes as targets for PCR-based identification of *Pasteurella pneumotropica*. *Comp. Med.*, 60, 427–435.

- Donnio P.-Y., Lerestif-Gautier A.-L., Avril J.L., 2004. Characterization of *Pasteurella* spp. strains isolated from human infections. *J. Comp. Path.*, 130, 137–142.
- Dousse F., Thomann A., Brodard I., Korczak B.M., Schlatter I., Kuhnert P., Miserez R., Frey J., 2008. Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 716–724.
- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult D., 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3623–3630.
- Dziva F., Muhairwa A.P., Bisgaard M., Christensen H., 2008. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 128, 1–22.
- Elliott D.R., Wilson M., Buckley C.M.F., Spratt D.A., 2005. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 5470–5476.
- Fajfar-Whetstone C.J.T., Coleman L., Biggs D.R., Fox B.C., 1995. *Pasteurella multocida* septicemia and subsequent *Pasteurella dagmatis* septicemia in a diabetic patient. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 202–204.
- Fegan N., Blackall P.J., Pahoff J.L., 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet. Microbiol.*, 47, 281–286.
- Forsblom B., Sarkiala-Kessel E., Kanervo A., Väisänen M.-L., Helander M., Jousimies-Somer H., 2002. Characterisation of aerobic gram-negative bacteria from subgingival sites of dogs – potential bite wound pathogens. *J. Med. Microbiol.*, 51, 207–220.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Jr, 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 166–170.
- Frazer J., Rogers K.B., 1972. The isolation of an X-dependent strain of *Haemophilus* from otitis media identified as *H. haemoglobinophilus (canis)*. *J. Clin. Path.*, 25, 179–180.
- Frebourg N.B., Berthelot G., Hocq R., Chibani A., Lemeland J.-F., 2002. Septicemia due to *Pasteurella pneumotropica*: 16S rRNA sequencing for diagnosis confirmation. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 687–689.
- Fredricks D.N., Relman D.A., 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9, 18–33.
- Freshwater A., 2008. Why your housecat's trite little bite could cause you quite a fright: a study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida*. *Zoonoses Public Health*, 55, 507–513.
- Ganiere J.P., Escande F., Andre G., Larrat M., 1993. Characterization of *Pasteurella* from gingival scrapings of dogs and cats. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 77–85.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn, T., 2005. Order XIV. Pasteurellales *ord. nov.*, [in:] Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria., Springer Science+Business Media Inc., New York., 850–912
- Gautier A.-L., Dubois D., Escande F., Avril J.-L., Trieu-Cuot P., Gaillot O., 2005. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 2307–2314.
- Greene C.E. (ed.), 1984. *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

- Guillard T., Duval V., Jobart R., Brasme L., David C., de Champs C., Begin M., Dehoux E., 2009. Dog bite wound infection by *Pasteurella dagmatis* misidentified as *Pasteurella pneumotropica* by automated system Vitek 2. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.*, 65, 347–348.
- Hamilton-Miller J.M.T., 1993. A possible pitfall in the identification of *Pasteurella* spp. with the API system. *J. Med. Microbiol.*, 39, 78–79.
- Hayashimoto N., Takakura A., Itoh T., 2005. Genetic diversity on 16S rDNA sequence and phylogenetic tree analysis in *Pasteurella pneumotropica* strains isolated from laboratory animals. *Curr. Microbiol.*, 51, 239–243.
- Heddleston K.L., 1976. Physiologic characteristics of 1,268 cultures of *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.*, 37, 745–747.
- Hellmann E., Schmid H., Marx M., 1987. Differenzierung und ätiologische Bedeutung von *Pasteurella*-Stämmen aus entzündlichen Prozessen der Kopfschleimhäute von Hunden und Katzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 100, 328–331.
- Holst E., Roloff J., Larsson L., Nielsen J.P., 1992. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2984–2987.
- Hotchkiss E.J., Hodgson J.C., Lainson F.A., Zadoks R.N., 2011. Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association. *BMC Microbiology*, 11, 115.
- Hunt M.L., Adler B., Townsend K.M., 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 72, 3–25.
- Hunt Gerardo S., Citron D.M., Claros M.C., Fernandez H.T., Goldstein E.J.C., 2001. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* and *P. multocida* subsp. *septica* differentiation by PCR fingerprinting and α -glucosidase activity. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 2558–2564.
- Inzana T.J., Johnson J.L., Shell L., Møller K., Kilian M., 1992. Isolation and characterization of a newly identified *Haemophilus* species from cats: *Haemophilus felis*. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2108–2112.
- Jones N., Khoosal M., Numazaki K., Chiba S., Ueno H., Fleisher G.R., 1999. Infected dog and cat bites. *N. Eng. J. Med.*, 340, 1841–1842.
- Kilian M., Frederiksen W., 1981. Ecology of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*, [in:] Kilian M., Frederiksen W., Biberstein E.L. (ed.), *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, Academic Press, London., 11–38.
- Korbel R., Gerlach H., Bisgaard M., Hafey H.M., 1992. Further investigations on *Pasteurella multocida* infections in feral birds. *J. Vet. Med. B*, 39, 10–18.
- Korczak B., Christensen H., Emler S., Frey J., Kuhnert P., 2004. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1393–1399.
- Król J., Florek M., Staroniewicz Z., Sordyl B., 2004. Ocena porównawcza mikroflory tlenowej gardła u psów zdrowych oraz z objawami pharyngitis. *Medycyna Wet.*, 60, 271–273.
- Król J., Florek M., Staroniewicz Z., 2005. Charakterystyka bakterii Gram-ujemnych izolowanych z błony śluzowej gardła psów. *Medycyna Wet.*, 60, 86–87.
- Król J., Bania J., Bucka A., Staroniewicz Z., 2008. Właściwości fenotypowe oraz identyfikacja genotypowa szczepów *Pasteurella multocida* izolowanych od psów i kotów. *Materiały XIII Kongresu PTNW, Olsztyn*, 426–427.
- Kuhnert P., Boerlin P., Emler S., Krawinkler M., Frey J., 2000. Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int. J. Med. Microbiol.*, 290, 599–604.

- Kuhnert P., Capaul S.E., Nicolet J., Frey J., 1996. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1174–1176.
- Kuhnert P., Korczak B.M., 2006. Prediction of whole genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family *Pasteurellaceae* by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology*, 152, 2537–2548.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5, 150–163.
- Lindberg J., Frederiksen W., Gahrn-Hansen B., Bruun B., 1998. Problems of identification in clinical microbiology exemplified by pig bite wound infections. *Zbl. Bakt.*, 288, 491–499.
- Loubinoux J., Lozniewski A., Lion C., Garin D., Weber M., Le Faou A.E., 1999. Value of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2488–2492.
- Maclachlan G.K., Hopkins G.F., 1978. Early death in pups due to *Haemophilus haemoglobinophilus (canis)* infection. *Vet. Rec.*, 103, 409–410.
- Mifflin J.K., Blackall P.J., 2001. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 216–221.
- Mignard S., Flandrois J.P., 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J. Microbiol. Meth.*, 67, 574–581.
- Mohan K., Kelly P.J., Hill F.W.G., Muvavarirwa P., Pawandiwa A., 1997. Phenotype and serotype of *Pasteurella multocida* isolates from diseases of dogs and cats in Zimbabwe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 29–34.
- Mollet C., Drancourt M., Raoult D., 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.*, 26, 1005–1011.
- Muhairwa A.P., Christensen J.P., Bisgaard M., 2001a. Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. *Vet. Microbiol.*, 78, 119–137.
- Muhairwa A.P., Mtambo M.M.A., Christensen J.P., Bisgaard M., 2001b. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Vet. Microbiol.*, 78, 139–153.
- Mühldorfer K., Schwarz S., Fickel J., Wibbelt G., Speck S., 2011. Genetic diversity of *Pasteurella* species isolated from European vespertilionid bats. *Vet. Microbiol.*, 149, 163–171.
- Mutters R., Ihm P., Pohl S., Frederiksen W., Mannheim W., 1985. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 309–322.
- Namioka S., 1978. *Pasteurella multocida* – biochemical characteristics and serotypes. [in:] Bergan T., Norris J.R. (ed.), *Methods in microbiology*, Vol. 10, Academic Press, London., 271–292
- Nozu R., Goto K., Ohashi H., Takakura A., Itoh T., 1999. Evaluation of PCR as a means of identification of *Pasteurella pneumotropica*. *Exp. Anim.* 48, 51–54.
- Petersen K.D., Christensen J.P., Bisgaard M., 1998. Phenotypic and genotypic diversity of organisms previously classified as maltose positive *Pasteurella multocida*. *Zbl. Bakt.*, 288, 1–12.

- Petersen K.D., Christensen J.P., Bisgaard M., Olsen J.E., 2001. Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology*, 147, 2739–2748.
- Piechulla K., Mutters R., Burbach S., Klussmeier R., Pohl S., Mannheim W., 1986. Deoxyribonucleic acid relationships of *Histophilus ovis*/*Haemophilus somnus*”, *Haemophilus haemoglobinophilus*, and *Actinobacillus seminis*”. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36, 1–7.
- Pors S.E., Hansen M.S., Christensen H., Jensen H.E., Petersen A., Bisgaard M., 2011. Genetic diversity and associated pathology of *Pasteurella multocida* isolated from porcine pneumonia. *Vet. Microbiol.*, 150, 354–361.
- Poyart C., Quesne G., Boumaila C., Trieu-Cuot P., 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 4296–4301.
- Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P., Trieu-Cuot P., 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 41–47.
- Rocke T.E., Smith S.R., Miyamoto A., Shaddock D.J., 2002. A serotype-specific Polymerase Chain Reaction for identification of *Pasteurella multocida* serotype 1. *Avian Dis.*, 46, 370–377.
- Rogers B.T., Anderson J.C., Palmer C.A., Henderson W.G., 1973. Septicaemia due to *Pasteurella pneumotropica*. *J. Clin. Path.*, 26, 396–398.
- Rosenbach K.A., Poblete J., Larkin J., 2001. Prosthetic valve endocarditis caused by *Pasteurella dagmatis*. *South Med J*, 94, 1033–1035.
- Sasaki H., Kawamoto E., Ueshiba H., Amao H., Sawada T., 2006. Phylogenetic relationship of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory rodents based on 16S rDNA sequence. *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 639–641.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E., 2001. *Muller & Kirk’s small animal dermatology*. Wyd. 6. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Sellyei B., Wehmann E., Makrai L., Magyar T., 2010. Characterisation of *Pasteurella dagmatis*-like isolates recovered from the feline oral cavity. *Vet. Microbiol.*, 145, 279–285.
- Snipes K.P., Carpenter T.E., Corn L.J., Kasten R.W., Hirsch D.C., Hird D.W., McCapes R.H., 1988. *Pasteurella multocida* in wild mammals and birds in California: prevalence and virulence for turkeys. *Avian Dis.*, 32, 9–15.
- Songer J.G., Post K.W., 2005. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. Elsevier Saunders, St. Louis.
- Sorbello A.F., O'Donnell J., Kaiser-Smith J., Fitzharris J., Shinkarow J., Doneson S., 1994. Infective endocarditis due to *Pasteurella dagmatis*: case report and review. *Clin. Infect. Dis.*, 18, 336–338.
- Stackebrandt E., Goebel B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846–849.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Roselló-Mora R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1043–1047.
- Svoboda K.H., Pohl S., Mannheim W., 1981. Untersuchungen zur Phylogenie von *Pasteurella multocida*: DNS-Basensequenz-Verwandtschaften zwischen Vertretern der Serogruppen

- A bis E, sowie Abtrennung der Biovarietät 6 (sog. Dog-type-Stämme). Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, 248, 494–501.
- Talan D.A., Citron D.M., Abrahamian F.M., Moran G.J., Goldstein E.J.C., 1999. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. N. Eng. J. Med., 340, 85–92.
- Taplitz R.A., 2004. Managing bite wounds: currently recommended antibiotics for treatment and prophylaxis. Postgrad. Med., 116, 49–59.
- Townsend K.M., Frost A.J., Lee C.W., Papadimitriou J.M., Dawkins H.J.S., 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J. Clin. Microbiol., 38, 1096–1100.
- Townsend K.M., Hanh T.X., O'Boyle D., Wilkie I., Phan T.T., Wijewardana T.G., Trung N.T., Frost A.J., 2000. PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam. Vet. Microbiol., 72, 69–78.
- Van Sambeek F., McMurray B.L., Page R.K., 1995. Incidence of *Pasteurella multocida* in poultry house cats used for rodent control programs. Avian Dis., 39, 145–146.
- Wallet F., Touré F., Devalckenaere A., Pagniez D., Courcol R.J., 2000. Molecular identification of *Pasteurella dagmatis* peritonitis in a patient undergoing peritoneal dialysis. J. Clin. Microbiol., 38, 4681–4682.
- Wang G.C.Y., Wang Y., 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol., 63, 4645–4650.
- Weber D.J., Wolfson J.S., Swartz M.N., Hooper D.C., 1984. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore), 63, 133–154.

Wykaz publikacji wykorzystanych w monografii

- Król J., Bania J., Florek M., Pliszczak-Król A., Staroniewicz Z., 2011. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant *Pasteurellaceae* isolated from cats and dogs in Poland. J. Vet. Diagn. Invest., 23 (5), 532–537.
- Król J., Bania J., Podkowik M., Florek M., Pliszczak-Król A., Staroniewicz Z., 2011. Genetic diversity of *Pasteurella dagmatis* as assessed by analysis of the 16S rRNA and rpoB gene sequences. Curr. Microbiol., 63 (1), 87–93.

SPIS FOTOGRAFII

- Fot. 1. Kolonie *Pasteurella dagmatis* na podłożu agarowym z krwią (typ S – gładki)
- Fot. 2. Kolonie *Pasteurella multocida* na podłożu agarowym z krwią (typ M – śluzowy)
- Fot. 3. Wynik dodatni próby na indol w bulionie tryptofanowym
- Fot. 4. Wynik ujemny oraz dodatni próby na ureazę w podłożu Christensena
- Fot. 5. Wynik ujemny oraz dodatni próby na dekarboksylazę ornitynową
- Fot. 6. Wynik ujemny oraz dodatni rozkładu węglowodanów (w podłożu CTA)
- Fot. 7. Wynik ujemny oraz dodatni próby na α -glukozydazę

LIST OF PHOTOGRAPHS

- Phot. 1. Colonies of *Pasteurella dagmatis* on blood agar (smooth or S-type)
- Phot. 2. Colonies of *Pasteurella multocida* on blood agar (mucoid or M-type)

- Phot. 3. A positive idole test in tryptophan broth
 Phot. 4. Negative and positive urease tests in Christensen medium
 Phot. 5. Negative and positive ornithine decarboxylase tests
 Phot. 6. Negative and positive carbohydrate fermentation tests (in CTA medium)
 Phot. 7. Negative and positive α -glucosidase tests

SPIS RYCIN

- Ryc. 1. Elektroforegram produktów PCR otrzymanych w wyniku amplifikacji DNA badanych bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* przy użyciu odpowiednich starterów gatunkowo swoistych
 Ryc. 2. Elektroforegram produktów PCR otrzymanych w wyniku amplifikacji DNA Bisgaard Taxon 16 oraz *Pasteurella stomatis* przy użyciu odpowiednich starterów gatunkowo swoistych
 Ryc. 3. Elektroforegram produktów trawienia fragmentu genu 16S rRNA (wielkości 505 p.z.) szczepów *Pasteurella multocida*
 Ryc. 4. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Pasteurella sensu stricto* skonstruowane na podstawie porównania sekwencji genu 16S rRNA (fragmenty wielkości 1308 p.z.) 36 szczepów bakterii
 Ryc. 5. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Pasteurella sensu stricto* skonstruowane na podstawie porównania sekwencji genu rpoB (fragmenty wielkości 501 p.z.) 28 szczepów bakterii
 Ryc. 6. Elektroforegram produktów trawienia fragmentu genu 16S rRNA (wielkości 476 p.z.) szczepów *Pasteurella dagmatis* izolowanych od różnych gatunków zwierząt

LIST OF ILLUSTRATIONS

- Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNA of various *Pasteurellaceae* strains using appropriate species-specific primers
 Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the DNA of Bisgaard Taxon 16 and *Pasteurella stomatis* using appropriate species-specific primers
 Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of digestion products of a 505-bp fragment of the *Pasteurella multocida* 16S rRNA gene
 Fig. 4. Phylogenetic tree of the genus *Pasteurella sensu stricto* based on the comparison of 36 sequences of the 16S rRNA gene (1308 bp fragments)
 Fig. 5. Phylogenetic tree of the genus *Pasteurella sensu stricto* based on the comparison of 28 rpoB sequences (501 bp fragments)
 Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of digestion products of a 476-bp fragment of the *P. dagmatis* 16S rRNA gene (strains isolated from different hosts)

SPIS TABEL

- Tabela 1. Bakterie z rodziny *Pasteurellaceae* występujące u psów i zwierząt kotowatych
 Tabela 2. Właściwości biochemiczne bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* występujących u psów i kotów
 Tabela 3. Startery PCR zaprojektowane do identyfikacji *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. pneumotropica*, *H. haemoglobinophilus* oraz Bisgaard Taxon 16

- Tabela 4. Startery PCR do amplifikacji genów 16S rRNA oraz rpoB *Pasteurella dagmatis*
- Tabela 5. Sekwencje nukleotydowe szczepów *Pasteurella sp.* oraz Bisgaard taxon 46 (uzyskane z GenBanku) wykorzystane do analiz filogenetycznych
- Tabela 6. Identyfikacja fenotypowa szczepów bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotowatych
- Tabela 7. Właściwości fenotypowe bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotowatych
- Tabela 8. Identyfikacja bakterii z rodziny *Pasteurellaceae*, izolowanych od psów i kotowatych, za pomocą sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA
- Tabela 9. Bakterie z rodziny *Pasteurellaceae* wyizolowane od psów i kotów zdrowych oraz wykazujących objawy zakażeń
- Tabela 10. Porównanie sekwencji nukleotydów w obrębie fragmentu 973.–1013. p.z. genu 16S rRNA *Pasteurella multocida subsp. multocida* oraz *P. multocida subsp. septica*
- Tabela 11. Właściwości biochemiczne przydatne do różnicowania szczepów *Pasteurella multocida subsp. multocida* oraz *P. multocida subsp. septica*, izolowanych od psów i kotowatych
- Tabela 12. Proponowany schemat identyfikacji bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* izolowanych od psów i kotów
- Tabela 13. Rozmieszczenie miejsc polimorficznych w obrębie sekwencji genu 16S rRNA u szczepów *Pasteurella dagmatis* pochodzących od różnych gatunków gospodarzy

LIST OF TABLES

- Table 1. Bacteria belonging to the family *Pasteurellaceae* occurring in dogs and felids
- Table 2. Biochemical properties of bacteria from the family *Pasteurellaceae* occurring in dogs and cats
- Table 3. PCR primers designed for detection of *P. multocida*, *P. canis*, *P. stomatis*, *P. dagmatis*, *P. pneumotropica*, *H. haemoglobinophilus* and Bisgaard Taxon 16
- Table 4. PCR primers for amplification of the 16S rRNA and rpoB genes of *Pasteurella dagmatis*
- Table 5. Nucleotide sequences of *Pasteurella sp.* and Bisgaard taxon 46 strains (obtained from GenBank) used for phylogenetic studies
- Table 6. Phenotypic identification of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids
- Table 7. Phenotypic characteristics of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids
- Table 8. Identification of *Pasteurellaceae* strains isolated from dogs and felids by partial sequencing of the 16S rRNA gene
- Table 9. *Pasteurellaceae* strains isolated from both healthy and infected dogs and felids
- Table 10. Comparison of nucleotide sequences in a 973.–1013. bp-fragment of the 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida subsp. multocida* and *P. multocida subsp. septica*
- Table 11. Differential characteristics for *Pasteurella multocida subsp. multocida* and *P. multocida subsp. septica* strains isolated from dogs and felids
- Table 12. Flow chart proposed for the identification of *Pasteurellaceae* encountered in cats and dogs
- Table 13. Distribution of polymorphic nucleotide sites among 16S rRNA sequences of *Pasteurella dagmatis* of different host origin

WŁAŚCIWOŚCI FENOTYPOWE ORAZ IDENTYFIKACJA GENOTYPOWA BAKTERII Z RODZINY PASTEURELLACEAE IZOLOWANYCH OD PSÓW I KOTÓW

Streszczenie

Bakterie należące do rodziny *Pasteurellaceae* są małymi Gram-ujemnymi pałeczkami lub ziarniakopalczkami, zasiedlającymi błony śluzowe, zwłaszcza układu oddechowego i rozrodczego, wielu gatunków zwierząt. Niektóre gatunki z tej grupy są znanymi patogenami pierwotnymi lub oportunistycznymi dla swoich gospodarzy, powodując znaczne straty ekonomiczne, szczególnie w hodowli bydła i drobiu. Przedstawiciele rodziny *Pasteurellaceae* występują także często u psów i kotów, wywołując różnorodne stany patologiczne u tych zwierząt. Ponadto, bakterie te mają dość duże znaczenie epidemiologiczne, gdyż mogą powodować infekcje u ludzi, zwłaszcza w wyniku zakażeń ran kąsanych lub transmisji drogą aerogenną. Dlatego też szybka i dokładna identyfikacja omawianych drobnoustrojów jest istotna zarówno z punktu widzenia bakteriologii weterynaryjnej, jak i medycznej.

Tradycyjna identyfikacja fenotypowa bakterii z rodziny *Pasteurellaceae* sprawia wciąż wiele trudności. Korzystną alternatywą są metody identyfikacji oparte na badaniach DNA bakterii, a zwłaszcza analiza sekwencyjna genu 16S rRNA lub genu *sodA*. Sekwencjonowanie DNA jest jednak techniką zbyt kosztowną i kłopotliwą w przypadku diagnostyki rutynowej. Bardziej przydatna do tego celu mogłaby być reakcja łańcuchowej polimerazy, lecz istniejące do tej pory metody PCR przeznaczone są głównie do wykrywania lub identyfikacji szczepów *Pasteurella multocida* występujących u zwierząt gospodarskich. Biorąc pod uwagę aspekt ekonomiczny diagnostyki bakteriologicznej oraz fakt, że jak dotąd nie ma kompleksowego systemu identyfikacji pałeczek z rodziny *Pasteurellaceae* u psów i kotów, opierając się na metodzie PCR, głównym celem podjętych badań było opracowanie testów PCR pozwalających na precyzyjne rozpoznawanie bakterii należących do poszczególnych gatunków omawianej rodziny. Ponadto, w przedstawionej pracy zbadano właściwości fenotypowe drobnoustrojów należących do *Pasteurellaceae* izolowanych od zwierząt towarzyszących, a także zaproponowano nową procedurę diagnostyczną, będącą kombinacją metod fenotypowych oraz genotypowych, umożliwiającą identyfikację omawianej grupy bakterii w trakcie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej.

Do badań wykorzystano 150 terenowych izolatów *Pasteurellaceae* izolowanych od 72 kotów, 64 psów, 2 lwów i 1 tygrysa. Wśród tych szczepów 83 było wyizolowanych z błony śluzowej jamy ustnej lub gardła zwierząt zdrowych, natomiast pozostałe 67 izolatów wyisobniono z materiału klinicznego (głównie z przypadków zapalenia jamy nosowej, jamy ustnej oraz gardła). Do hodowli drobnoustrojów użyto podłoża tryptozowo-sojowego z dodatkiem 5% krwi baraniej. Badane szczepy identyfikowane były za pomocą metod fenotypowych oraz analizy sekwencyjnej genu 16S rRNA. Startery do gatunkowo-swoistych reakcji PCR zosta-

ły zaprojektowane poprzez porównanie dostępnych w GenBanku sekwencji genów: *sodA* w przypadku *Pasteurella canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis* i *P. pneumotropica* oraz *kmt* dla *P. multocida*. Z kolei startery specyficzne dla *Haemophilus haemoglobinophilus* oraz Bisgaard Taxon 16, oskrzydlające fragmenty genu 16S rRNA, zostały opracowane na podstawie zarówno sekwencji dostępnych w GenBanku, jak i uzyskanych z izolatów własnych.

Zastosowane metody fenotypowe oraz porównanie sekwencji genu 16S rRNA za pomocą programu BLAST pozwoliły na identyfikację, odpowiednio, 73,3 i 83,5% analizowanych szczepów. Znacznie skuteczniejsza okazała się nowo opracowana metoda diagnostyczna, stanowiąca połączenie wstępnej identyfikacji fenotypowej i techniki PCR z wykorzystaniem starterów gatunkowo-swoistych, gdyż umożliwiła rozpoznanie wszystkich badanych izolatów. Spośród 150 szczepów *Pasteurellaceae* poddanych identyfikacji 68 (45,3%) należało do gatunku *P. multocida* (w tym 39 zaliczono do podgatunku *P. multocida* subsp. *multocida* oraz 29 do *P. multocida* subsp. *septica*), 34 (22,7%) do Bisgaard Taxon 16, 19 (12,7%) do *P. canis*, 16 (10,7%) do *P. dagmatis*, 7 (4,7%) do *H. haemoglobinophilus* oraz 6 (4%) do *P. stomatis*. Dodatkowo, w niniejszej pracy przedstawiono nową metodę identyfikacji obu stwierdzonych podgatunków *P. multocida* opierając się na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Stwierdzono, że stosowane dotychczas metody fenotypowe (badanie rozkładu sorbitolu oraz próba na α -glukozydazę) nie są skutecznym sposobem różnicowania tych podgatunków.

Przeprowadzona analiza sekwencyjna genu 16S rRNA u szczepów *P. dagmatis* izolowanych od kotów wykazała, że różnią się one dość istotnie (stopień podobieństwa wynosił 97%) od szczepów tego gatunku pochodzących od psów. Wykonane dodatkowo badania filogenetyczne porównujące sekwencje nukleotydów genu *rpoB* potwierdziły, że *P. dagmatis* jest gatunkiem genetycznie niejednorodnym. Obejmuje on dwie linie ewolucyjne, o randze co najmniej podgatunku, z których jedna występuje u psów, a druga u kotów. Obie te subpopulacje mogą być rozróżniane wyłącznie za pomocą metod genotypowych, a opracowana w tym celu technika PCR-RFLP może znaleźć praktyczne zastosowanie w badaniach epidemiologicznych, w przypadku zakażeń u człowieka powodowanych przez *P. dagmatis*.

Słowa kluczowe: koty, psy, diagnostyka bakteriologiczna, *Pasteurellaceae*, reakcja łańcuchowa polimerazy, 16S rRNA, *rpoB*

PHENOTYPIC PROPERTIES AND GENOTYPE-BASED IDENTIFICATION OF BACTERIA BELONGING TO *PASTEURELLACEAE* ISOLATED FROM DOGS AND CATS

S u m m a r y

Bacteria belonging to the family *Pasteurellaceae* are small Gram-negative bacilli or coccobacilli that inhabit the mucosal membranes, mainly of the respiratory and reproductive systems, in many animals. Some members of this group are known as primary or opportunistic pathogens of their hosts and may account for significant economic losses, especially in cattle and poultry farming. Several species of *Pasteurellaceae* are also encountered in dogs and cats and may be involved in a range of pathological conditions in these animals. In addition, these bacteria are also of epidemiological significance as they may cause human infections, particularly as a result of bite wounds or inhalation. Thus, a rapid and accurate identification of the microorganisms is important from both veterinary and medical points of view.

The conventional identification of *Pasteurellaceae* remains difficult for many laboratories. DNA-based methods, especially 16S rRNA or *sodA* genes sequence analysis, provide a useful alternative; however, sequencing methods are often too expensive and cumbersome for routine use. Polymerase chain reaction methods might be a valuable tool for this purpose; however, the already existing PCRs focus mainly on detection or identification of *Pasteurella multocida*, especially in farm animals. Considering the economic aspect of bacterial diagnostics and the fact that so far there is no comprehensive PCR-based approach to identifying *Pasteurellaceae* species encountered in dogs and cats, the present study aimed at developing PCR assays that would allow accurate recognition of clinically and epidemiologically relevant canine and feline isolates within this group of bacteria. In addition, the research presented here focused on determining phenotypic characteristics of *Pasteurellaceae* occurring in companion animals as well as on development of a new diagnostic procedure for these bacteria using a combination of both phenotype- and genotype-based methods.

A total of 150 field strains belonging to the family *Pasteurellaceae*, isolated from 72 cats, 64 dogs, 2 lions and one tiger, were investigated. Among these isolates, eighty-three originated from the mucosal membrane of the oral cavity or throat of healthy animals, and remaining were recovered from various cases of infection (particularly rhinitis, stomatitis and pharyngitis). Strains were grown on 5% sheep blood trypticase soy agar and subsequently identified phenotypically and by 16S rRNA gene sequence comparison. For *Pasteurella* species-specific PCRs, oligonucleotide primers designed by comparing available sequences of the *sodA* gene (for *Pasteurella canis*, *P. dagmatis*, *P. stomatis* and *P. pneumotropica*) or *kmt* gene (for *P. multocida*) were used. For species-specific detection of *Haemophilus haemoglobinophilus* and *Bis-*

gaard Taxon 16, primers constructed on the basis of 16SrRNA gene sequences available in GenBank and of those obtained from the authors' isolates, were employed.

Phenotypic methods and 16S rRNA gene sequence comparison (using the BLAST algorithm) allowed identification of 73.3 and 83.5%, respectively, of isolates analyzed. The newly developed diagnostic procedure, constituting a combination of a preliminary phenotypic identification and species-specific PCRs, has proved to be a much more effective method as all strains were correctly recognized using it. Among 150 strains of *Pasteurellaceae* tested, sixty-eight (45.3%) were assigned to *P. multocida* (including 39 of *P. multocida* subsp. *multocida* and 29 of *P. multocida* subsp. *septica*), 34 (22.7%) to Bisgaard Taxon 16, 19 (12.7%) to *P. canis*, 16 (10.7%) to *P. dagmatis*, 7 (4.7%) to *Haemophilus haemoglobinophilus* and 6 (4%) to *P. stomatis*. In addition, the present work describes a new method of identification of both subspecies of *P. multocida*, detected in dogs and cats, on the basis of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). It was noticed that phenotypic tests used to date for the differentiating of these subspecies (production of acid from sorbitol as well as α -glucosidase activity) were not reliable.

16S rRNA gene sequence analysis revealed that *P. dagmatis* strains isolated from cats differed substantially (the similarity level was only 97%) from those originated from dogs. Subsequent phylogenetic analysis, performed by comparison of nucleotide sequence of the *rpoB* gene, confirmed that *P. dagmatis* is a heterogeneous species. It includes two evolutionary lineages, at least at the subspecies rank, of which one has been found in dogs and another in cats. Both subpopulations can be only distinguished by genotypic methods, and a newly developed PCR-RFLP based diagnostic technique may find a practical application in epidemiologic investigations, in cases dealing with *P. dagmatis* infections in humans.

Key words: cats, dogs, bacteriological diagnostics, *Pasteurellaceae*, polymerase chain reaction, 16S rRNA, *rpoB*

ZAŁĄCZNIKI

ANNEXES

Lista szczepów terenowych badanych w niniejszej pracy

List of field isolates examined in the present work

Nr szczepu Strain number	Miejsce izolacji Isolation site
<i>Pasteurella multocida</i>	
6/3	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
9/3	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
10/2	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
13/6/3	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
20/6	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
22/1	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
23	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
25/1	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
27/3	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
80	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
82	kot, zapalenie jamy nosowej (<i>rhinitis</i>) – cat, inflammation of the nasal cavity (<i>rhinitis</i>)
93	pies, zapalenie dziąseł (<i>gingivitis</i>) – dog, <i>gingivitis</i>
96	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
111	pies, zapalenie ucha zewn. (<i>otitis externa</i>) – dog, inflammation of the external ear (<i>otitis externa</i>)
128	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
131	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
132	kot, zmiany zapalne na opuszkach łap – cat, inflammatory lesions on foot pads
134	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
143	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
147	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
154	kot, <i>otitis externa</i> – cat, <i>otitis externa</i>
155	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
158/1	kot, zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (<i>stomatitis</i>) – cat, inflammation of the oral mucosa (<i>stomatitis</i>)
160	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
165	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
167/1	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
169/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
170	kot, <i>empyema pleurae</i> – cat, <i>empyema pleurae</i>
172	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
183	kot, zapalenie spojówek (<i>conjunctivitis</i>) – cat, <i>conjunctivitis</i>
184	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
186	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
187	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
190	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
193	pies, <i>rhinitis</i> – dog, <i>rhinitis</i>

194	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
198	tygrys syberyjski, jama ustna – siberian tiger, oral cavity
199	kot zdrowy, jama ustna – healthy cat, oral cavity
200	kot, <i>stomatitis</i> – cat, <i>stomatitis</i>
201	kot zdrowy, jama ustna – healthy cat, oral cavity
202	kot zdrowy, jama ustna – healthy cat, oral cavity
204	kot, <i>otitis externa</i> – cat, <i>otitis externa</i>
206	kot, <i>otitis externa</i> – cat, <i>otitis externa</i>
208	kot, ropień skóry (<i>abscess</i>) – cat, <i>abscess</i>
210	kot, ropniak opłucnej (<i>empyema pleurae</i>) – cat, pleural empyema
215	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
216	kot <i>otitis externa</i> – cat, <i>otitis externa</i>
217/1	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
218	lew, jama ustna – lion, oral cavity
219/1	lew, jama ustna – lion, oral cavity
219/2	lew, jama ustna – lion, oral cavity
220	kot, przetoka zęba (<i>fistula dentis</i>) – cat, dental fistula
222	kot, <i>gingivitis</i> – cat, <i>gingivitis</i>
224	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
225	kot, <i>abscess</i> – cat, <i>abscess</i>
226	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
228	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
230	kot, <i>gingivitis</i> – cat, <i>gingivitis</i>
231	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
235	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
239/1	pies, <i>stomatitis</i> – dog, <i>stomatitis</i>
239/2	pies, <i>stomatitis</i> – dog, <i>stomatitis</i>
240	kot, <i>conjunctivitis</i> – cat, <i>conjunctivitis</i>
250/1	kot, zapalenie żołądźci prącia i napletka (<i>balanoposthitis</i>) – cat, inflammation of the glans penis and the foreskin (<i>balanoposthitis</i>)
251	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
254/2	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
255/1	kot, <i>pharyngitis</i> – cat, <i>pharyngitis</i>
257/1	kot, zapalenie błony śluzowej pochwy (<i>vaginitis</i>) – cat, inflammation of the vaginal mucosa (<i>vaginitis</i>)

Liczba szczepów ogółem: 68

Total number of strains: 68

Bisgaard Taxon 16

78	pies, <i>rhinitis</i> – dog, <i>rhinitis</i>
85/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
89/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
90/1	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
98	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
99	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
100/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat

109/3	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
127	kot zdrowy, jama ustna – healthy cat, oral cavity
130	pies, <i>vaginitis</i> – dog, <i>vaginitis</i>
135/4	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
142	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
146	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
156	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
162/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
166	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
168/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
174	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
175	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
195	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
209	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
212	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
229	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
232	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
5/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
7/3	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
238	pies, zapalenie błony śluzowej krtani (<i>laryngitis</i>) – dog, inflammation of the laryngeal mucosa (<i>laryngitis</i>)
241	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
242	pies zdrowy, jama ustna – healthy dog, oral cavity
245	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
248/2	kot, <i>gingivitis</i> – cat, <i>gingivitis</i>
253	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
25/3	kot zdrowy, jama ustna – healthy cat, oral cavity
258/2	kot, <i>gingivitis</i> – cat, <i>gingivitis</i>

Liczba szczepów ogółem: 34

Total number of strains: 34

Pasteurella canis

87/2	pies, <i>otitis externa</i> – dog, <i>otitis externa</i>
88/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
108/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
139	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
157	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
162/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
164/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
168/5	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
171	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
181	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
192	pies, <i>otitis externa</i> – dog, <i>otitis externa</i>
211/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
221	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
233	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat

308	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
249/2	pies, <i>pharyngitis</i> – dog, <i>pharyngitis</i>
252	pies, <i>laryngitis</i> – dog, <i>laryngitis</i>
507	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
501	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat

Liczba szczepów ogółem: 19

Total number of strains: 19

Pasteurella dagmatis

6/4	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
13/5	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
15/1	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
95	kot, <i>stomatitis</i> – cat, <i>stomatitis</i>
100/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
123/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
149/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
167/2	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
182/1	kot, <i>conjunctivitis</i> – cat, <i>conjunctivitis</i>
185/2	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
197	tygrys syberyjski, jama ustna – siberian tiger, oral cavity
223/2	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
243	kot, <i>stomatitis</i> – cat, <i>stomatitis</i>
246	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
247	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
505	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat

Liczba szczepów ogółem: 16

Total number of strains: 16

Haemophilus haemoglobinophilus

161/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
173	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
176	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
177	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
205	pies, <i>vaginitis</i> – dog, <i>vaginitis</i>
211/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
213	pies, <i>vaginitis</i> – dog, <i>vaginitis</i>

Liczba szczepów ogółem: 7

Total number of strains: 7

Pasteurella stomatis

88/1	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
158/2	kot, <i>stomatitis</i> – cat, <i>stomatitis</i>
169/2	pies zdrowy, gardło – healthy dog, throat
203	kot, <i>rhinitis</i> – cat, <i>rhinitis</i>
244	kot zdrowy, gardło – healthy cat, throat
248/3	kot, <i>gingivitis</i> – cat, <i>gingivitis</i>

Liczba szczepów ogółem: 6

Total number of strains: 6

Sekwencje genów 16S rRNA oraz *rpoB* otrzymane ze szczepów *Pasteurella dagmatis* badanych w niniejszej pracy i przekazane do GenBanku

16S rRNA- and *rpoB* gene sequences obtained from *Pasteurella dagmatis* strains analyzed in the present work that have been deposited in the GenBank database

1. Fragment genu 16S rRNA szczepu 197 izolowanego od tygrysa (nr w GenBanku: **HQ538835**)
A fragment of the 16SrRNA gene from the strain 197 isolated from a tiger (GenBank accession number **HQ538835**)

```

1   catgcaagtc gaacggtagc aggaagaaag cttgctttct ttgctgacga gtggcggacg
61  ggtgagtaat gcttgggaat ctggcctatg gaggggggata actgcccggaa actgcagcta
121 ataccgcgta atctctgagg agcaaagggt gggacccttag ggccacctgc cataagatga
181 gcccaagtgg gattaggtag ttggtggggg aaaggcctac caagccgacg atctctagct
241 ggtctgagag gatgaccagc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg
301 cagcagtggg gaatattgcy caatgggggg aaccctgacg cagccatgcc gcgtgaatga
361 agaaggcctt cgggttgtaa agttctttcg gtaatgagga aggggtgtta ttgaatagat
421 agcatcattg acgttaatta cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt
481 aatacggagg gtgcgagcgt taatcggaat aactgggcgt aaagggcacg cagggcgact
541 tttaaagtga atgtgaaatc cctgggctta acctaggaac tgcatttcag actgggagtc
601 tagagtactt tagggagggg tagaattcca cgtgtagcgg tgaaatcgct agagatgtgg
661 aggaataaccg aaggcgaagg cagccccttg ggaatgtact gacgctcatg tgcgaaagcg
721 tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgct gtaaacgctg tcgatttggg
781 gattgggctt taagcttggg gcccgaaagc aacgtgataa atcgaccgcc tggggagtag
841 ggcgcgaagg ttaaaactca aatgaattga cggggggccc cacaagcggt gggagcatgtg
901 gtttaattcg atgcaacgcy aagaacctta cctactcttg acatcctaag aagaactcar
961 agatgagttt gtgccttcgg gaacttagag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt
1021 gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttatccttt gttgccagcy
1081 attaggtcgg gaactcaaag gagactgcca gtgacaaact ggaggaaggt ggggatgacg
1141 tcaagtcatc atggccctta cragtagggc tacacacgty ctacaatggt gcatacagag
1201 ggcggcgaga cggcgacgty gagcgaatct cagaaagtgc atctaagtcc ggattggagt
1261 ctgcaactcy actccatgaa gtcggaatcy ctagtaatcy caaatcagaa tgttgcggtg
1321 aatacgttcc cgggcctt

```

2. Fragment genu 16S rRNA szczepu 247 izolowanego od kota (nr w GenBanku: **HQ538836**)
A fragment of the 16SrRNA gene from the strain 247 isolated from a cat (GenBank accession number **HQ538836**)

```

1   catgcaagtc gaacggtagc aggaagaaag cttgctttct ttgctgacga gtggcggacg
61  ggtgagtaat gcttgggaat ctggcctatg gaggggggata actgcccggaa actgcagcta
121 ataccgcgta ttatcgtaag atgaaagggt gggaccattt ggccacctgc cataagatga
181 gcccaagtgg gattaggtag ttggtggggg aaaggcctac caagccgacg atctctagct
241 ggtctgagag gatgaccagc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg
301 cagcagtggg gaatattgcy caatgggggg aaccctgacg cagccatgcc gcgtgaatga
361 agaaggcctt cgggttgtaa agttctttcg gtaatgagga agggatatta tttaatagat
421 agtatcattg acgttaatta cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt
481 aatacggagg gtgcaacgcy taatcggaat aactgggcgt aaagggcacg cagggcgact
541 tttaaagtga atgtgaaatc cctgggctta acctaggaac tgcatttcag actgggagtc
601 tagagtactt tagggagggg tagaattcca cgtgtagcgg tgaaatcgct agagatgtgg
661 aggaataaccg aaggcgaagg cagccccttg ggaatgtact gacgctcatg tgcgaaagcg
721 tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgct gtaaacgctg tcgatttggg
781 gattgggctt taagcttggg gcccgaaagc aacgtgataa atcagaccgc tggggagtag
841 ggcgcgaagg ttaaaactca aatgaattga cggggggccc cacaagcggt gggagcatgtg
901 gtttaattcg atgcaacgcy aagaacctta cctactcttg acatcctaag aagaactcar
961 agatgagttt gtgccttcgg gaacttagag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt
1021 gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttatccttt gttgccagcy
1081 attcggctcgg gaactcaaag gagactgcca gtgacaaact ggaggaaggt ggggatgacg
1141 tcaagtcatc atggccctta cgagtagggc tacacacgty ctacaatggt gcatacagag
1201 ggcggcgaga cggcgacgty gagcgaatct cagaaagtgc atctaagtcc ggattggagt
1261 ctgcaactcy actccatgaa gtcggaatcy ctagtaatcy caaatcagaa tgttgcggtg
1321 aatacgttcc cgggcctt

```

3. Fragment genu 16S rRNA szczepu 243 izolowanego od kota (nr w GenBanku: **HQ538837**)
A fragment of the 16SrRNA gene from the strain 243 isolated from a cat (GenBank accession number **HQ538837**)

```

1   catgcaagtc gaacggtagc aggaagaaag cttgctttct ttgctgacga gtggcgagc
61  ggtgagtaat gcttgggaat ctggcttatg gagggggata actgcgggaa actgcagcta
121 ataccgcgta ttatcgtaaag atgaaaaggtt gggaccattt ggccacctgc cataagatga
181 gcccaagtgg gattaggtag ttggtggggt aaaggcctac caagccgacg atctctagct
241 ggtctgagag gatgaccagc cacactggga ctgagacacg gccccagactc ctacgggagg
301 cagcagtggg gaatattgcg caatgggggg aaccctgacg cagccatgcc gcgtgaatga
361 agaaggcctt cgggttghtaa agttctttcg gtaatgagga agggatatta tttaatagat
421 agtatcattg acgttaatta cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgctgt
481 aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat aactgggcgt aaagggcacg cagcggcagt
541 tttaaagtga atgtgaaatc cctgggctta acctaggaac tgcaattcag actggggagt
601 tagagtactt tagggagggg tagaattcca cgtgtagcgg tgaatcgctg agagatgtgg
661 aggaataacc aagggcaagg cagccccttg ggaatgtact gacgctcatg tgcgaaagcg
721 tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtcccagct gtaaaccgctg tcgatttggg
781 gattgggctt taagcttggg gcccgaaact aacgtgataa atcgaccgcc tggggagtac
841 gcccgaagg ttaaaactca aatgaattga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg
901 gtttaattcg atgcaacgcg aagaacctta cctactcttg acatcctaag aagaactcar
961 agatgagttt gtgccttcgg gaacttagag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt
1021 gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc cttatccttt gttgccagcg
1081 attcggtcgg gaactcaaag gagactgcca gtgacaaact ggaggaaggt ggggatgacg
1141 tcaagtcate atggcccctta cgagtagggc tacacacgtg ctacaatggt gcataacagag
1201 ggcggcgaga cggcgacggt gagcgaatct cagaaaagtc atctaagtcc ggattggagt
1261 ctgcaactcg actccatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg caaatcagaa tgttgcgggt
1321 aatacgttcc cgggcctt

```

4. Fragment genu *rpoB* szczepu 247 izolowanego od kota (nr w GenBanku: **HQ538838**)
A fragment of the *rpoB* gene from the strain 247 isolated from a cat (GenBank accession number **HQ538838**)

```

1   atggatcaaa acaaccggtt atcagaagtc acgcacaaac gtcgtatttc tgcattaggt
61  ccgggtgggt tgactcgtga acgtgcaggc ttcgaggttc gagacgttca cgctactcac
121 tacggtcgtg tbtgtccaat cgaaacccca gaggggtccaa acatcggttt gatccaactca
181 cttttctggtt acgcacgtac taacgactac ggtttcttag aaacgcataa ccgtaaagta
241 gtaaacggtc aagtgactga agaaattgaa tattttatctg cgattgaaga aggtaaatat
301 gtgatcgcac aggcgaactc aaatcttgat gaagagttac gctttactga tgcgttctga
361 acttgtcgtg gtgaacacgg tgaatctggt ttatatcgtc cagatgaaat ccactatag
421 gacgtttcaa ctcaacaagt tgtatctggt cgggctgcgt taattccggt ccttgagcac
481 gacgatgcga accgtgcggt g

```

5. Fragment genu *rpoB* szczepu 197 izolowanego od tygrysa (nr w GenBanku: **HQ538839**)
A fragment of the *rpoB* gene from the strain 197 isolated from a tiger (GenBank accession number **HQ538839**)

```

1   atggatcaaa acaaccggtt atcagaggtc acgcacaaac gtcgtatttc tgcattaggt
61  ccgggtgggt taaccctgta acgtgcgggc ttcgaggttc gagacgttca cgcaactcac
121 tatggtcgtg tatgtccaat cgaaacccca gaggggtccaa acatcggttt gatccaactca
181 cttttctggtt acgcgcgcac taatgattac ggtttcttag aaacgcataa tcgtaaagta
241 gtaaacggtc aagtgactga agaaattgaa tatttctctg cgattgaaga aggtaaatat
301 gttatcgcac aggcgaactc caatctcgac gaagagttac gctttactga tgcattcgtc
361 acttgtcgtg gtgaacacgg tgaatctggt ttatatcgtc cagatgaaat ccactatag
421 gacgtttcaa ctcaacaagt ggtatctggt cgggctgcgt taattccggt ccttgagcac
481 gacgatgcga accgtgcggt g

```