FENOTYPOWA CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW *PASTEURELLA MULTOCIDA* WYIZOLOWANYCH OD ŻUBRÓW W POLSCE

Agnieszka Kędrak-Jabłońska[1], Sylwia Budniak[1], Artur Jabłoński[2], Anna Szczawińska[1], Monika Reksa[1], Marek Krupa[1], Michał Krzysiak[3], Krzysztof Szulowski[1]

[1]Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy
[2]Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy
[3]Białowieski Park Narodowy, Białowieża

Wstęp

W fenotypowej charakterystyce izolatów *Pasteurella multocida* stwierdza się znaczne różnice w morfologii kolonii, aktywności biochemicznej, strukturze antygenowej i patogenności. Drobnoustrój ten może być pierwotnym lub wtórnym czynnikiem w procesach chorobowych występujących u domowych oraz dzikich ssaków i ptaków. Może również występować jako komensal w okolicy nosowo-gardłowej klinicznie zdrowych zwierząt.

Materiał i metody

Do badań użyto jedenaście izolatów *P. multocida*, które wyosobniono z narządów wewnętrznych padłych oraz eliminowanych żubrów. Dziewięć z nich wyizolowano od zwierząt z hodowli wolnej z Puszczy Białowieskiej oraz po jednym z Leśnictwa Rosochate w Bieszczadach i ze Smardzewic. Właściwości fizjologiczne i biochemiczne badano testem API 20E firmy bioMérieux oraz metodami tradycyjnymi według ogólnie przyjętych zasad. Przeprowadzono również test multiplex PCR (OIE Terrestrial Manual 2012) pozwalający na równoczesną identyfikację gatunku oraz określenie typów otoczkowych A, B, D lub F. Badanie oporności szczepów P. multocida na antybiotyki i sulfonamidy wykonano przy użyciu metody minimalnych stężeń hamujących (MIC) oraz płytki POL050 (TREK D. S.). Ocenę wyników MIC przeprowadzono na podstawie kryteriów klinicznych CLSI dla amoksycyliny z kwasem klawulanowym, ceftiofuru, doksycykliny, enrofloksacyny, florfenikolu, spektynomycyny, tetracykliny, tulatromycyny, sulfametoksazolu potencjowanego trimetoprimem, a także kryteriów epidemiologicznych EUCAST dla gentamycyny, penicyliny i ampicyliny.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań, zgodnie z kryteriami Mutttersa i wsp. oraz Biggarda i wsp., wszystkie badane izolaty zostały zakwalifikowane do podgatunku *P.multocida* subsp. *multocida* (tab.1 i 2). W reakcji multiplex PCR w przypadku wszystkich szczepów stwierdzono obecność fragmentu o wielkości 460 pz swoistego dla gatunku *P. multocida* oraz fragmentu 1044 pz świadczącego o obecności otoczki typu A (ryc.1, tab.3). Wszystkie badane izolaty okazały się wrażliwe na użyte substancje antybakteryjne z wyjątkiem penicyliny (tab.4). Jeden z jedenastu izolatów miał wyższą wartość MIC – 1 µg/mL dla tego antybiotyku. Pozwala to zakwalifikować go jako tzw. szczep nie-dziki ('none-wild') na podstawie epidemiologicznych kryteriów MIC, co jest jednoznaczne ze wzrostem oporności.

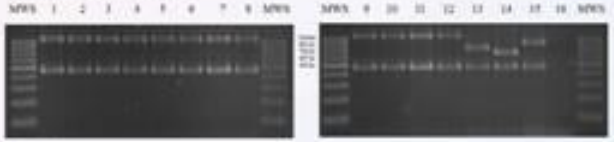
Tab. 1. Określanie właściwości biochemicznych przy użyciu testu API 20E (bioMérieux)

Cechy		Liczba szczepów *P. multocida* reagujących dodatnio		
		subsp. *multocida*	subsp. *multocida* (zachowanie -)	subsp. *multocida* (beta galaktozydaza+)
Wytwarzanie:				
beta-galaktozydazy	ONPG	8	0	3
dihydrolazy argininy	ADH	8	0	0
dekarboksylazy lizyny	LDC	8	0	0
dekarboksylazy ornityny	ODC	8	1	2
H_2S	H_2S	8	0	0
ureazy	URE	8	0	0
deaminazy tryptofanu	TDA	8	0	0
indolu	IND	8	1	2
acetoiny	VP	8	0	0
żelatynazy	GEL	8	0	0
oksydazy cytochromowej	OX	8	1	2
Rozkład cytrynianu	CIT	9	0	0
Fermentacja:				
glukozy	GLU	8	1	2
mannitolu	MAN	8	1	2
inozytolu	INO	8	0	0
sorbitolu	SOR	8	1	2
ramnozy	RHA	8	0	0
sacharozy	SAC	8	0	2
melibiozy	MEL	8	0	0
amygdaliny	AMY	8	0	0
arabinozy	ARA	8	0	0
Redukcja NO_3 do NO_2		8	1	2
Liczba izolatów		8	1	2

Tab. 2. Określanie właściwości fizjologicznych i biochemicznych

Cechy	Liczba izolatów *P. multocida* reagujących dodatnio		
	subsp. *multocida*	subsp. *multocida* (zachowanie -)	subsp. *multocida* (beta galaktozydaza+)
Ruch	0	0	0
Wynik na podłożu MacConkeya	0	0	0
Wytrzymałość katalazy	0	1	2
Fermentacja:			
dulcytolu	0	0	0
trehalozy	7	0	2
kwitny	0	1	2
maltozy	0	0	0
Liczba szczepów	8	1	2

Ryc. 1. Reakcja multiplex PCR



Objaśnienia:
MWS – standard masy molekularnej; tor/dki: 1 – 11 badani izolaty, 12 – P1059 (otoczka typu A) , 13 – M1404 (otoczka typu B), 14 – Kuba 4 (otoczka typu D), 15 – P4218 (otoczka typu F), 16 - kontrola ujemna reakcji PCR (H2O)

Tab. 3. Charakterystyka starterów użytych do reakcji multiplex PCR

Multiplex PCR	Starter	Sekwencja (5' – 3')	Wielkość produktu
Serogrupa A	CAPA FWD	TGC CAA AAT CGC AGT GAG	1044 pz
	CAPA REV	TTG CCA TCA TTG TCA GTG	
Serogrupa B	CAPB FWD	CAT TTA TCC AAG CTC CAC C	760 pz
	CAPB REV	GCC CGA GAG TTT CAA TCC	
Serogrupa D	CAPD FWD	TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC	657 pz
	CAPD REV	CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	
Serogrupa F	CAPF FWD	AAT CGG AGA ACG CAG AAA TCA G	891 pz
	CAPF REV	TTC GGC CGT CAA TTA CTC TG	
Identyfikacja gatunku	KMT1?	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	460 pz
	KMT1SP4	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	

Tab. 4. Określanie oporności na antybiotyki i sulfonamidy