

Zastosowanie techniki PCR i analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (PCR/RFLP) do różnicowania szczepów herpeswirusa bydlęcego typu 1 (BHV-1)

ANDRZEJ SALWA, ADAM BURKIEWICZ, KRZYSZTOF ANUSZ*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

*Katedra Chorób Zakaźnych, Mikrobiologii i Parazytologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Salwa A., Burkiewicz A., Anusz K.

Application of PCR and restriction fragments length polymorphisms (PCR/RFLP) for differentiating bovine herpes virus type 1 (BHV-1)

Summary

The aim of the study was to assess genetic variations amongst BHV-1 strains by using PCR and RFLP. In this study BHV-1 strains were isolated from infected cattle from herds in the central east-coast region of Poland. After amplifying particular regions of viral genes encoding glycoproteins B, C and D, PCR products were isolated from gel and digested with restriction endonuclease CviJI. Then, digestion products were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis using 20% gel cast. A difference in restriction patterns was observed following RFLP analysis of the amplification product of the gD gene. BHV-1 strains isolated from cows and bull with infectious pustular vulvovaginitis had identical patterns as reference strain IPV-468. In contrast, those strains and strains isolated from calves with conjunctivitis had different restriction patterns. No variation in restriction patterns was noted amongst strains in which regions of genes gB and gC were amplified. The results of this experiment showed that PCR/RFLP technique may be useful for differentiating BHV-1 strains.

Keywords: cattle, PCR, RFLP.

Zakażenie bydła herpeswirusem bydlęcym typu 1 (BHV-1) może powodować różne formy kliniczne choroby (5, 23). Ten zróżnicowany przebieg zjawisk patogennych jest następstwem szczególnej zmienności genotypu oraz tropizmu wirusa do komórek różnych narządów zwierzęcia. Zastosowanie metody analizy restrykcyjnej DNA stało się podstawą do różnicowania szczepów BHV-1 wyizolowanych od bydła z różnych przypadków chorobowych (9, 16, 22). Rozróżniamy 3 podtypy BHV-1, w obrębie których istnieją warianty genotypowe: BHV-1.1 – podtyp określany jako „IBR podobny”, odpowiedzialny za wywoływanie postaci oddechowej (zakaźne zapalenie nosa i tchawicy), BHV-1.2 – „IPV podobny” wywołujący postać płciową (otręt) oraz BHV-1.3 wyosobniony od cieląt chorych z objawami zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (*encephalomyelitis*). Obecnie zaproponowano, aby podtyp BHV-1.3 wyodrębnić jako nowy gatunek herpeswirusa bydlęcego typu 5 (BHV-5) (22). Opracowanie metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragment length

polymorphism – RFLP) wraz z wykorzystaniem techniki PCR znalazło szerokie zastosowanie w diagnostyce chorób związanych z mutacjami w genie oraz w badaniach epidemiologicznych i epizootologicznych (2, 3, 11, 15, 20, 21, 26). Metoda ta stała się pomocna w ustaleniu źródła drobnoustrojów, w badaniach nad wzajemnymi związkami między nimi, sklasyfikowanymi w tej samej jednostce taksonomicznej oraz umożliwiała obserwacje zmian genetycznych podczas ich krążenia w populacji ludzi i zwierząt.

Niniejsza praca stanowi kolejny etap badań nad charakterystyką szczepów BHV-1 izolowanych od chorego bydła z terenów środkowo-wschodniego Wybrzeża (18). Celem badań było określenie zmienności genotypowej szczepów BHV-1 przy wykorzystaniu techniki PCR w połączeniu z analizą restrykcyjną produktów amplifikacji fragmentów DNA.

Materiał i metody

Szczepy wirusów. Do badań wybrano 6 szczepów BHV-1 wyosobnionych z klinicznych przypadków otrętu u krów i

buhajów oraz od cieląt z zapaleniem spojówek i rogówki pochodzących z obór, w których wcześniej prowadzono badania (tab. 1). Użyto również dwa szczepy standardowe BHV-1: IPV-468, IBR-Cooper. Szczepy wirusa namnażano i oczyszczano metodą plakowania na hodowli komórkowej (HKJC) w płynie Eagle'a z dodatkiem 2% surowicy cielęcej.

Izolacja DNA wirusowego. Izolację DNA z badanych szczepów herpeswirusa wykonywano przy zastosowaniu minikolumn (prod. A & A Biotechnology, Gdynia) wg protokołu Genomic DNA Prep Plus (6). Następnie ilość i czystość wyizolowanego DNA określano spektrofotometrycznie przy długości fali 260/280 nm. Wyizolowane ogólne DNA w ilości nie mniejszej niż 1 µg przeznaczano do reakcji PCR.

Amplifikacja DNA. Do amplifikacji wybrano określone odcinki 3 genów BHV-1: gB, gC i gD z wykorzystaniem trzech par starterów (tab. 2). Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed Biotechnologies, Inc. (USA) na podstawie danych z piśmiennictwa (1, 23, 25) (tab. 2). Reakcja PCR była przeprowadzona w termocyklerze prod. Perkin-Elmer 2400 (USA) w objętości 20 µl. Przed amplifikacją optymalizowano warunki wykonania reakcji PCR pod kątem doboru właściwej temperatury przyłączania starterów (24). Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla amplifikowanych fragmentów genów z określonymi starterami wyglądał następująco: gen gB – wstępna denaturacja (94°C/4 min), po czym 35 cykli obejmujących denaturację (93°C/30 sek.), przyłączanie starterów (55°C/30 sek.), wydłużanie (72°C/30 sek.), końcowe wydłużanie (72°C/10 min.); gen gC – wstępna denaturacja (97°C/1 min), następnie 36 cykli obejmujących denaturację (97°C/1 min.), przyłączanie starterów (73°C/30 sek.), wydłużanie (72°C/30 sek.), końcowe wydłużanie (72°C/10 min.); gen gD – wstępna denaturacja (92°C/4 min), po czym 35 cykli, denaturacja (91°C/1 min.), przyłączanie starterów (60°C/1 min.), wydłużanie (72°C/1 min.) i końcowe wydłużanie (72°C/6 min.). Produkty reakcji PCR wykrywano za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Jako wzorca masy molekularnej DNA używano MI (puC19/MSpl) (prod. DNA Gdańsk).

Analiza restrykcyjna. Wyizolowane produkty PCR z żelu agarozowego przy użyciu zestawu DNA Gel-Out (prof. A & A Biotechnology, Gdynia), trawiono endonukleazą restrykcyjną CviJI. Potrawione produkty reakcji wraz z 0,25% roztworem błękitu bromofenolowego наносzono na 20% żel akrylamidowy i prowadzono elektroforezę przez 4 godz. w buforze TAE o pH 8.1. Wielkość uzyskanych fragmen-

Tab. 1. Zestawienie szczepów BHV-1 wykorzystanych w badaniach

Oznaczenie szczepów BHV-1	Rodzaj zwierzęcia	Miejsce izolacji	Typ i wariant szczepu
Gd/633/KK	krowa	przedsionek pochwy	BHV-1.2a
Gd/40/DP	krowa	przedsionek pochwy	BHV-1.2a
Gd/161/S	krowa	przedsionek pochwy	BHV-1.2a
Gd/107/DP	cielę	oko	BHV-1.2c
Gd/905/DP	cielę	oko	BHV-1.2c
Gd/479/M	buhaj	napletek prącia	BHV-1.2a
IPV-468 (szczep standardowy)	bydło	przedsionek pochwy	BHV-1.2a
IBR-Cooper (szczep standardowy)	bydło	tchawica	BHY-1.1

Tab. 2. Zestawienie oligonukleotydowych starterów reakcji PCR oraz regiony genów wykorzystane w badaniach

Nazwa genu	Oznaczenie startera	Sekwencja nukleotydów w starterze	Pozycja w genie	Wielkość produktu PCR
gB	P1	5'-CACGGACCTGGTGGACAAGAAG-3'	624-645	467 pz
	P2	5'-CTACCGTCACGTCTGTGTACG-3'	1070-1091	
gC	P1	5'-GCGGGGGCTCGCCGAGGA-3'	224-246	653 pz
	P2	5'-GGGAGCGCACGGTCAGGGGC-3'	857-877	
gD	P1	5'-GCTGTGGGAAGCGGTTCG-3'	351-368	468 pz
	P2	5'-GTCGACTATGGCCTTGTGTGC-3'	817-796	

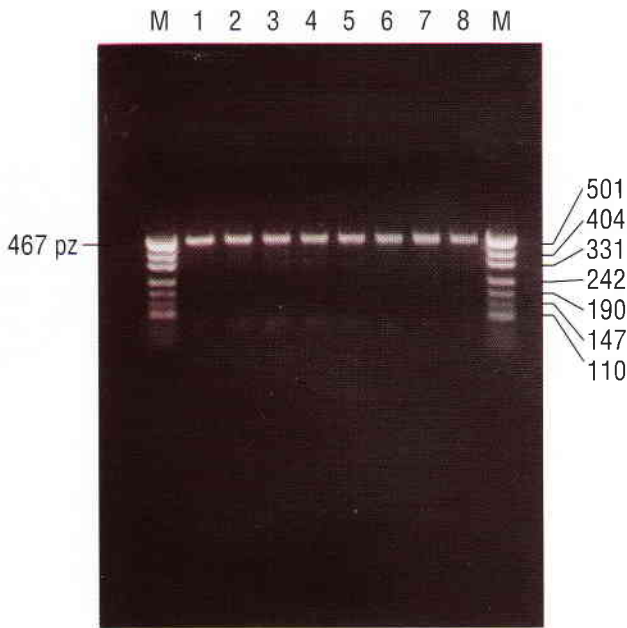
Objaśnienie: pz – par zasad.

tów DNA porównywano do wzorca masy molekularnej. Po elektroforezie zarówno żel agarozowy jak i poliakrylamidowy fotografowano w świetle lampy UV (transiluminator, prod. Fotodyne, USA).

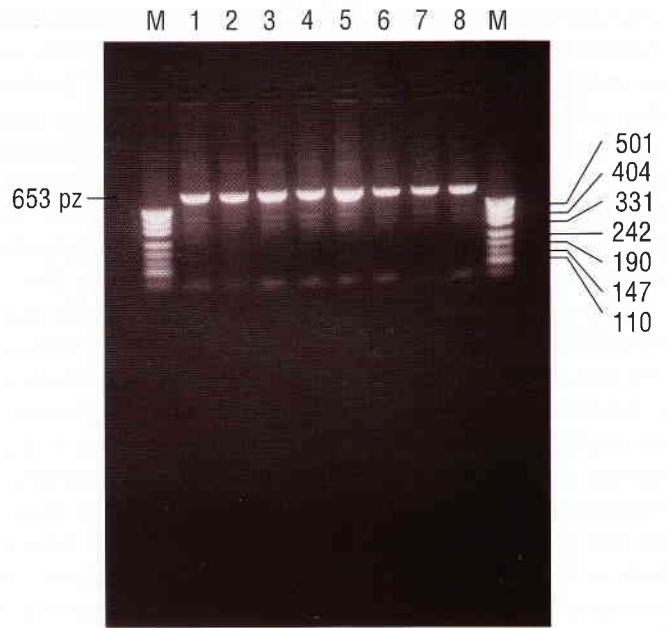
Wyniki i omówienie

Reakcja PCR pozwoliła na zamplifikowanie określonych regionów genów: gB, gC i gD ośmiu szczepów BHV-1, których produkty w postaci prążków w żelu agarozowym przedstawiono na ryc. 1, 3 i 5. Produkty te miały wielkości: gen gB ~ 460 pz, gC ~ 650 pz, gD ~ 470 pz. Uzyskanie tej wielkości produktów reakcji zwiększyło prawdopodobieństwo znalezienia w amplifikowanej cząsteczce DNA większej ilości miejsc specyficznych dla enzymu CviJI. Endonukleaza restrykcyjna CviJI jest tzw. enzymem częstotnym, rozpoznającym i przecinającym łańcuch kwasu nukleinowego w obrębie sekwencji nukleotydów 5'...RG ↓ CY...3' (10, 19).

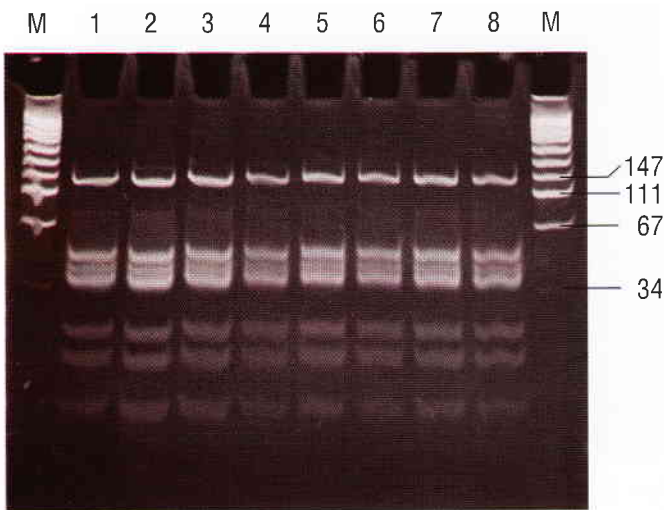
Wyniki analizy restrykcyjnej produktów PCR uzyskanych po zamplifikowaniu określonych odcinków genów badanych szczepów BHV-1 przedstawiono w



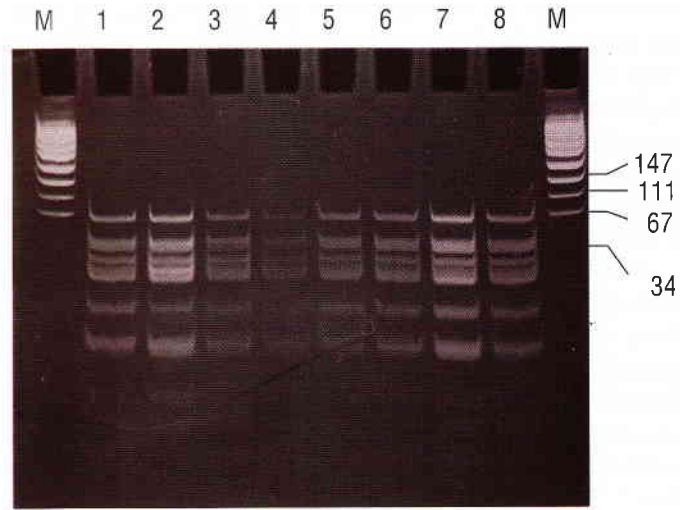
Ryc. 1. Elektroforetyczny rozdział produktów PCR amplifikowanego fragmentu genu gB szczepów BHV-1. Ścieżki przedstawiają: 1 – IPY-468; 2 – Gd/633/KK; 3 – IBR-Cooper; 4 – Gd/40/DP; 5 – Gd/161/S; 6 – Gd/107/DP; 7 – Gd/905/DP; 8 – Gd/479/M. M – marker masy molekularnej.



Ryc. 3 Elektroforetyczny rozdział produktów PCR amplifikowanego fragmentu genu gC szczepów BHV-1. Objasnienia jak na ryc. 1.



Ryc. 2. Wzory restrykcyjne produktów PCR fragmentu genu B szczepów BHV-1 po trawieniu enzymem CviJI. Objasnienia jak na ryc. 1.



Ryc. 4. Wzory restrykcyjne produktów PCR fragmentu genu C szczepów BHV-1 po trawieniu enzymem CviJI. Objasnienia jak na ryc. 1.

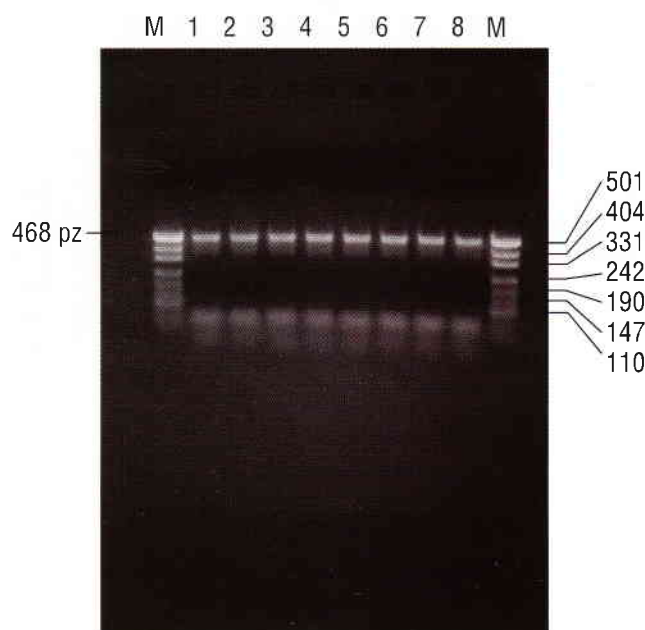
postaci wzorów restrykcyjnych na ryc. 2, 4 i 6. Wielkość fragmentów oraz stopień ich migracji podczas elektroforezy był porównywany do map restrykcyjnych opracowanych przy pomocy programu komputerowego PCRGEM w oparciu o sekwencje nukleotydów genów BHV-1 dostępne w banku genów w National Center for Biotechnology Information (USA). Z przedstawionego na ryc. 2 rozdziału elektroforetycznego ilustrującego rezultat cięcia produktu PCR, gdzie amplifikowanym fragmentem był region DNA kodujący białko B wynika, że wszystkie szczepy miały identyczne wzory restrykcyjne. Otrzymano siedem prążków o długości: ~130, 45, 40, 35, 25, 20, 15 pz. Podobne wyniki analizy restrykcyjnej stwierdzono w przypadku trawienia produktów PCR reprezentujących fragment genu

gC (ryc. 4). Stwierdzono, że użyte do badań szczepy BHV-1 miały ten sam profil prążków w żelu. Długość powstałych fragmentów wynosiła: ~65, 60, 50, 45, 40, 30, 25, 20, 15, 10 pz. Z kolei analiza restrykcyjna szczepów BHV-1, u których zamplifikowano fragment genu gD wykazała trzy odmienne rozdziały elektroforetyczne (ryc. 6). W wyniku trawienia endonukleazą u wszystkich ośmiu analizowanych szczepów otrzymano pięć takich samych prążków o długości: ~80, 70, 55, 35, 25 pz. Zaobserwowane różnice dotyczyły fragmentów restrykcyjnych o długości: ~30 i ~20 pz. Ustalono, że szczepy wyizolowane od krów i buhaja (Gd-633/KK, Gd-40/DP, Gd-161/S, Gd-479/M) mają podobne wzory restrykcyjne do wzoru szczepu standardowego IPV-468. Natomiast we wzorze drugiego

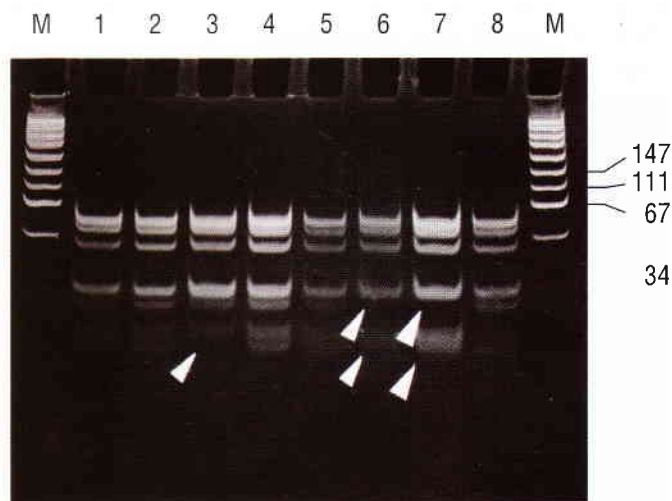
szczepu standardowego IBR-Cooper stwierdzono brak fragmentu DNA o długości ~20 pz. Z kolei wzory restrykcyjne szczepów Gd-107/DP i Gd-905/DP pochodzących od chorych cieląt nie różniły się między sobą lecz były odmienne od pozostałych wzorów szczepów izolowanych od krów oraz od drugiego szczepu standardowego IBR-Cooper. Wzory tych szczepów nie posiadały prążków o długości ~30 i 20 pz. Należy dodatkowo zaznaczyć, że użyte do badań szczepy BHV-1 odpowiedzialne za wywołanie otrętu należą do podtypu BHV-1, 2 wariant – c. Natomiast szczepy wyizolowane od cieląt z objawami zapalenia spojówek sklasyfikowano jako wariant – c (17, 18). Przeprowadzona analiza porównawcza danych w tab. 1 i ryc. 6 wykazała zależność między wariantem tego podtypu i rodzajem wzoru restrykcyjnego analizowanego regionu genu gD. Może to sugerować, iż stwierdzona zmienność w DNA BHV-1 determinująca przynależność do danego podtypu jest zlokalizowana w obrębie genu gD. Sekwencje analizowanych genów zawierają informację dla syntezy białek strukturalnych wchodzących w skład kapsydu i otoczki herpeswirusa. Białka oznaczane: gB(gI), gC(gIII), gD(gIV), spełniają podstawową funkcję w zapoczątkowaniu procesu zakażenia oraz stymulują układ immunologiczny organizmu zwierzęcia do produkcji przeciwciał (8, 22). Badania Chase i wsp. (7) oraz Hughes i wsp. (13) wykazały, że spośród wymienionych białek, glikoproteina gD wykazuje dominującą rolę w indukcji powstawania przeciwciał neutralizujących wirusa BHV-1. Jest ono odpowiednikiem glikoprotein gD herpeswirusa ludzkiego typu 1 (HSV-1) i gp50 wirusa choroby Aujeszkiego (22).

Interesujące wyniki badań nad zmiennością herpeswirusów przeżuwaczy przedstawiła Lyaku i wsp. (14). Przy użyciu podobnej techniki zróżnicowano cztery gatunki herpeswirusów (BHV-1, CapHV-1, CerHV-1, RanHV-1), które z trudem identyfikowano metodami serologicznymi. W wyniku zastosowania starterów 22-nukleotydowych o tej samej sekwencji oraz enzymów Ava I, BgII i SmaI, stwierdzono w amplifikowanym regionie genu gB specyficzne fragmenty DNA dla każdego z wyżej wymienionych herpeswirusów. Black i Eberle (4) wykryli u α -herpeswirusów izolowanych od człowieka i mały polimorfizm fragmentów restrykcyjnych w obrębie konserwatywnego regionu genu gB. Przykładem praktycznego zastosowania PCR/RFLP do analizy genomu parwowirusa w aspekcie uodporniania psów szczepionkami przeciwko parwowirowi są badania Hirasawy i wsp. (12). Wyniki otrzymane przez tych badaczy były pomocne w ustaleniu relacji między szczepami terenowymi a szczepami szczepionkowymi.

Reasumując należy stwierdzić, że przeprowadzona analiza restrykcyjna szczepów BHV-1 techniką PCR/RFLP wykazując zmienność w obrębie genu gD umożliwiła ich zróżnicowanie. Szczegółowe badania dotyczące analizy sekwencji nukleotydów w fragmencie genu gD, w którym wykryto polimorfizm miejsc restrykcyjnych są kontynuowane przy użyciu techniki sekwencjonowania DNA.



Ryc. 5. Elektroforetyczny rozdział produktów PCR amplifikowanego fragmentu genu gD szczepów BHV-1. Objasnienia jak na ryc. 1.



Ryc. 6. Wzory restrykcyjne produktów PCR fragmentu genu D szczepów BHV-1 po trawieniu enzymem CviJI. Objasnienia jak na ryc. 1.

Piśmiennictwo

1. Ashbaugh S. E., Thompson K. E., Belknap E. E., Schulthesis P. C., Chowdhury S., Collins J. K.: Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, 9, 387-394.
2. Augustynowicz E., Gzyl A., Lizerzanowska D.: Epidemiological studies of HCMV infection in children by restriction analysis of long-PCR products. *Acta Microbiol. Polonica.* 1999, 48, 341-348.
3. Belkum A.: DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 7, 174-184.
4. Elack L. H., Eberle R.: Detection and differentiation of primate α -herpesviruses by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997, 9, 225-231.
5. Euczek J., Leptula W.: Wirus IBR-IPV – charakterystyka i patogeniza zakażenia. *Medycyna Wet.* 1985, 39, 259-263.
6. Burkiewicz A.: Protokół produktu Genomic Prep. i GenOut, 1999, Gdynia.
7. Chase C. L., Letchworth G. J.: Bovine herpesvirus 1 gIV-expressing cells resist virus penetration. 1994, *J. Gen. Virol.* 75, 177-181.
8. Irunen Littel-van den Hurk S., Tekko S. K., Liang X., Eafiuik L. A.: Bovine herpesvirus-1 vaccines 1993, *Immunol. Cell Biology* 71, 405-420.
9. Engels M., Steck F., Wyler R.: Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. 1981, *Arch. Virol.* 67, 169-174.

10. Fitzgerald M. C., Skowron F., Van Etten J. L., Smith L. M., Mead D. A.: Rapid shotgun cloning utilizing the two base recognition endonuclease Cvi-JI. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 3753-3762.
11. Haas L.: Molecular epidemiology of animal virus diseases. *J. Vet. Med. B.* 1997, 44, 257-272.
12. Hirasawa T., Yano K., Mikazuki K.: differentiation of wild and vaccine-type canine parvoviruses by PCR and restriction-enzyme analysis. *J. Vet. Med. B.* 1995, 42, 601-610.
13. Hughes G. L., Bałiuk L. A., Van Erumen Littel-van den Hurk S.: Functional and topographical analysis of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. 1988, 103, 47-60.
14. Lyaku J. K. S., Vilcek S., Nettleton F. F., Marsden H. S.: The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 135-142.
15. Kitenge F. S. E., Harris L. M., McKenna P. K., Wadowska E., Yason C. V.: Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am. J. Vet. Res.* 1994, 55, 1206-1212.
16. Misra V., Bałiuk L. A., Darcel C.: Analysis of bovine herpes virus - type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. 1983, 76, 341-354.
17. Fladzyk K., Salwa A., Kur J.: Opracowanie testu diagnostycznego opartego o technikę PCR do wykrywania herpeswirusa bydłowego typu 1 (BHV-1). *Mat. XXIII Zjazdu PTM. Łódź.* 1996, 318.
18. Salwa A.: Charakterystyka zakażeń herpeswirusem bydłym typu 1 (BHV-1) w stadach krów mlecznych z uwzględnieniem aspektów epizootologii molekularnej. Praca hab. Wydział Weterynaryjny, SGGW, Warszawa, 1997.
19. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Wyd. II. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
20. Schyns F., Earanowski E., Lemaire M., Thiry E.: A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.* 1999, 66, 187-195.
21. Stadejek T., Fejsak Z.: Wirus klasycznego pomoru świń: biologia i diagnostyka molekularna. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 702-706.
22. Tikoo S. K., Campos M., Bałiuk L. A.: Bovine herpesvirus (BHV-1): Biology, pathogenesis and control. *Advances virus Res.* 1995, 45, 191-223.
23. Vilcek S.: Detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *J. Virol. Meth.* 1993, 41, 245-248.
24. Wiedtrauk E. L., Farkas E. H.: *Molecular methods for virus detection.* 1995, Academic Press, INC San Diego.
25. Wiedmann M., Erandon K., Wagner F., Lučovi E. J., Batt C. A.: Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Meth.* 1993, 44, 129-140.
26. Zientara S., Sailleau C., Moulay S., Plateau E., Cruciari C.: Diagnosis and molecular epidemiology of the African horsesickness virus by the polymerase chain reaction and restriction patterns. 1993, 24, 385-395.

Adres autora: dr hab. Andrzej Salwa, ul. Chalubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk

VISSER J. J., VELLEMA P., VAN DOKKUM J. C., SHIMADA T.: Izolacja *Vibrio cholerae* od chorych zwierząt hodowlanych i wód powierzchniowych w Holandii. (Isolation of *Vibrio cholerae* from diseased animals and surface water in the Netherlands). *Vet. Rec.* 144, 451-452, 1999 (16)

Na podstawie obecności antygeny somatycznego O wyróżniono w obrębie gatunku *Vibrio cholerae* 155 grup serologicznych. Do grupy O1 należy *V. cholerae* powodujący cholere, do pozostałych (*V. cholerae* nie O1) przecinkowce odpowiedzialne za sporadyczne zapalenie żołądka i jelit, zakażenia pozajelitowe. Ostatnio stwierdzono, że *V. cholerae* O139 może też wywoływać u ludzi epidemię cholery. W okresie 10 lat *V. cholerae* nie O1 w 15 przypadkach powodował zachorowania u zwierząt gospodarskich na terenie Holandii. Wyizolowano go od kóz z zatruciem jelitowym, od buhaja z zapaleniem trawienia i zapaleniem jelit, jałowki z krwotocznym zapaleniem jelit i od cielęcia z biegunką. W 4 przypadkach wyisobniono go w prawie czystej hodowli z płuc, wątroby i trawienia poronionych płodów cielęcych. W 5 przypadkach wywoływał on nagłe padnięcia u jagniąt w wieku 2-4 dni, u których występowała ostra, wodnista biegunka. *V. cholerae* izolowano też z wód powierzchniowych w północnych prowincjach Holandii oraz z kału młodej foki z objawami biegunki.

G.

HENDERSON J. P., BALL H. J.: Zapalenie wielostawowe u krów mlecznych w Północnej Irlandii wywołane zakażeniem *Mycoplasma bovis*. (Polyarthritis due to *Mycoplasma bovis* infection in adult dairy cattle in Northern Ireland). *Vet. Rec.* 145, 374-376, 1999 (13)

Mycoplasma bovis, którą izolowano po raz pierwszy w USA z mleka kozy z zapaleniem wymienia obecnie występuje powszechnie. U dorosłych kóz wywołuje ona najczęściej zapalenie gruczołu mlekowego, którego częstym powikłaniem jest zapalenie stawów. Na dwóch fermach bydła mlecznego (ferma A 113 krów rasy fryzjsko-holsztyńskiej, ferma B 65 krów tej samej rasy) wystąpiły obrzęki stawów i kulawizna. Chore zwierzęta odseparowano od reszty stada. U 4 z 6 krów w stadzie A wystąpiło ostre zapalenie stawów kończyn przednich i tylnych, a u części chorych zwierząt umiarkowana gorączka (do 40°C). W stadzie B chorowało około 30% zwierząt. Nie uzyskano poprawy po stosowaniu linkomycyny, amoksyliny i oksytetracykliny stosowanej w iniekcjach domięśniowych. Efekty zanotowano po iniekcjach tylozyny. Z mazi stawowej chorych krów wyizolowano *M. bovis*. We wczesnym stadium choroby zarazek ten występował w niewielkich ilościach w mleku zbiorczym, a także w mleku krów z kulawizną przy braku jakichkolwiek objawów zapalenia gruczołu mlekowego.

G.

VATN S., ULVUND M. J. Wzdęcie trawienia, wybroczyny i owrzodzenia u młodych jagniąt w Norwegii. (Abomasal bloat, haemorrhage and ulcers in young Norwegian lambs). *Vet. Rec.* 146, 35-39, 1999 (2)

Syndrom wzdęcia trawienia, który występuje głównie u jagniąt w wieku 3-4 tyg. prześlędzono u 88 chorych zwierząt. Kontrolę stanowiło 85 zdrowych jagniąt w tym samym wieku. Głównym objawem klinicznym było wzdęcie i kolka. W oparciu o charakter zmian pośmiertnych podzielono zwierzęta na 3 grupy. Do grupy 1 zaliczono 28 jagniąt z wzdęciem trawienia, do grupy II 29 jagniąt z silnie uszkodzoną śluzówką tego narządu zaś do grupy III 25 jagniąt z różnymi zmianami chorobowymi, które występowały równocześnie z wzdęciem. U zwierząt z grupy I było silnie obniżone pH trawienia (2,7 ± 0,19) w odniesieniu do grupy II (4,1 ± 0,32) i grupy III (3,7 ± 0,39) oraz do kontroli (3,3 ± 0,13). pH zwłaszcza wahało się od 3,5 do 7,4 i nie wykazywało zróżnicowania pomiędzy grupami. U jagniąt z wrzodami trawienia było więcej trichofitobezoarów niżeli u jagniąt bez wrzodów i w grupie kontrolnej. Ponadto u jagniąt z grupy I wartość hematokrytu, liczba krwinek białych i czerwonych były podwyższone zaś średnia objętość krwinek i średni poziom hemoglobiny były obniżone w porównaniu do kontroli.

G.

SMYTH J. A., FITZPATRICK D. A., ELLIS W. A.: Syndrom martwego/słabego cielęcia: badanie cieląt zakażonych przez leptospiry. (Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*). *Vet. Rec.* 145, 539-542, 1999 (19)

Syndrom słabego cielęcia opisano po raz pierwszy w 1986 r. w Północnej Irlandii. Charakteryzuje się on urodzeniem w terminie cieląt nie zdolnych do oddychania względnie nie oddychających przez 10 min. Bardziej adekwatna jest nazwa syndrom martwego/słabego cielęcia. U cieląt martwo urodzonych w terminie względnie padłych po urodzeniu wystąpiła infekcja wywołana przez leptospiry. Badaniem objęto 356 cieląt w okresie październik 1989-marzec 1992 stosując test immunofluorescencji z mrożonymi skrawkami płuc, nerek, wątroby, nadnerczy oraz łożyska. Cielęta pochodzące od matek, których łożysko zawierało antygeny leptospirowe miały o 6-10 kg mniejszą masę aniżeli cielęta pochodzące od matek niezakażonych. Cielęta od matek zainfekowanych leptospirami częściej były zakażone przez *Actinomyces pyogenes* lub *Bacillus sp.* Nadnercza, płuca i łożysko mogą być wykorzystane jako materiał do wykrywania obecności antygeny leptospir. W przypadku 8,9% cieląt badanych stwierdzano obecność antygeny leptospir wyłącznie w łożysku.

G.