

Zastosowanie zmodyfikowanego testu nested – PCR w rozpoznawaniu rozrostowej enteropatii świń*)

ZYGMUNT PEJSAK, JACEK ŻMUDZKI, ARUNAS STANKEVICIUS*

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Department of Virology, Lithuanian Veterinary Institute, 4230 Kalsiadorys, Institutio 2, Litwa

Pejsak Z., Żmudzki J., Stankevicus A.

Detection of *Lawsonia intracellularis* by one tube nested – PCR

Summary

Swine proliferative enteropathy (PE) is caused by an obligate intracellular bacterium *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*). PE is a serious enteric disease of weaned pigs resulting in growth rate losses, increasing number of death cases and costs of veterinary treatment. The aim of this study was, to develop and evaluate one tube nested – PCR technique for simple and fast *L. intracellularis* DNA detection in feces.

Total DNA was extracted from feces which were taken directly from rectum of weaned piglets and fatteners with diarrhoea using the Genomic DNA Prep Plus® kit (Heliclonus, A&A Biotechnology). Five micro liters of DNA were amplified by two methods (standard and modified in closed one tube). For each method were used two sets of PCR primers, which consisted of 20 – base pair (bp) oligonucleotides corresponding to 319 bp and 270 bp regions of p78 *L. intracellularis* sequence.

The standard method consisting of 2 steps was performed in two separate reaction tubes: first step PCR and second step nested – PCR. In single – tube method both steps were done in one closed tube. In this method all used reagents for first step PCR were deposited in tube bottom, while reagents for nested – PCR were immobilized in a tube cap by carbohydrate trehalose. After first step PCR was completed the tube was vortexed, centrifuged and the nested – PCR was performed.

This procedure was evaluated for examination 491 positive and negative fecal samples taken from different pig farms. Both techniques gave the same results with positive and negative samples. It was concluded that the closed, one tube nested – PCR method was very sensitive and less prone to give false positive results, compared to standard nested – PCR, carried out in separate reaction tubes.

The investigation showed that modified closed one tube nested – PCR method is a useful tool for rapid diagnosis of PE in pig population and could be performed for monitoring of *L. intracellularis* infections.

Keywords: Porcine enteropathy, *Lawsonia intracellularis*, feces, nested – PCR.

Rozrostowa enteropatia świń (Proliferative Enteropathy – PE) określana wcześniej jako rozrostowe zapalenie jelit lub adenomatoza świń, powoduje znaczne straty ekonomiczne związane przede wszystkim z zahamowaniem przyrostów masy ciała i zwiększonym zużyciem paszy przez warchlaki i tuczniki (7, 26-28, 33). Obserwacje terenowe wskazują, że szczególnie często klasyczne, kliniczne przypadki PE obserwuje się w chlewniach o stosunkowo dobrym poziomie higieny, a także tam gdzie wartość genetyczna zwierząt jest wysoka (28).

Czynnikiem etiologicznym PE są namnażające się w komórkach enterocytów Gram-ujemne drobnoustroje *Lawsonia intracellularis*. Przez wiele lat drobnoustroje te określano jako organizmy podobne do bakterii *Campylobacter* (campylobacter – like organisms – CLOs) lub jako organizmy wewnątrzkomórkowe (intracellular organisms – IOs). Pod koniec lat osiemdziesiątych ustalono, że mikroorganizmy te różnią się an-

tygenowo od bakterii *Campylobacter* (21) i posiadają charakterystyczny profil DNA (6, 20). Pierwszymi, którzy udokumentowali udział IOs w etiologii PE oraz potrafili je namnożyć byli Lawson i wsp. (13), stąd utworzona została przez McOrista i wsp. (16) uprzednio podana nazwa nowo odkrytych bakterii.

Istotnym problemem w diagnostyce PE jest fakt, że namnażające się wewnątrzkomórkowo w cytoplazmie enterocytów gospodarza mikroorganizmy nie mają zdolności wzrostu na znanych pożywkach bakteryjnych (13). W warunkach *in vitro* namnażają się tylko w hodowli komórek nabłonka jelit cienkich szczura (linia komórkowa IEC – 18) (2, 9, 12, 13, 17-19, 23, 24, 29, 30, 32). Do wzrostu wymienionej hodowli komórkowej wymagają atmosfery z ograniczoną ilością tlenu (9, 12, 13, 32).

W 1993 r. po raz pierwszy zastosowano w diagnostyce zakażeń *L. intracellularis* technikę PCR (10). Wykorzystano do tego celu zestaw starterów zewnętrznych oraz wewnętrznych (nested) (tab. 1). Zaprezentowana procedura postępowania w zakresie wspomnianej metody jest wykorzystywana do chwili obecnej.

*) Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego nr 5 PO6K 010 18 finansowanego przez KBN.

Tab. 1. Sekwencje oligonukleotydowych starterów reakcji PCR wykorzystywane w badaniach

Nazwa startera		Kierunek 5' → 3'	Sekwencja syntetycznych nukleotydów 5' → 3'
Ajon	zewewnętrzne	→	TATGGCTGTCAAACACTCCG
Bjon			TGAAGGTATTGGTATTCTCC
Cjon	wewnętrzne	→	TTACAGGTGAAGTTATTGGG
Djon			CTTTCTCATGTCCCATAAGC

Umożliwia ona wykrycie 10^3 bakterii *L. intracellularis* w jednym gramie kału (4, 10, 15). Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie tej techniki, jest jej podatność na pojawienie się wyników fałszywie dodatnich co związane jest z dwuetapowością testu i możliwością zanieczyszczenia zawartości próbek w trakcie obróbki na poszczególnych etapach jego wykonywania.

Celem pracy była modyfikacja techniki PCR, do diagnostyki PE, poprzez przeprowadzenie dwóch etapów PCR – amplifikacja DNA przy użyciu starterów zewnętrznych i reamplifikacja produktu pierwszej reakcji z wykorzystaniem starterów wewnętrznych (nested) w jednej, zamkniętej podczas całego procesu próbówce.

Material i metody

Próbki do badań. Materiał pobierano bezpośrednio z prostnicy od zwierząt chorujących z klinicznymi objawami PE. Zwracano szczególną uwagę aby pobrane próbki nie zawierały zanieczyszczeń organicznych. Materiał transportowano w stanie schłodzonym, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C . W badaniach wykorzystano 491 próbek kału pobranych z gospodarstw.

Przygotowanie materiału biologicznego. W celu oczyszczenia kału z zanieczyszczeń organicznych i mechanicznych odważano 100 mg kału zawieszając go w 900 μl wody. Zawartość próbki intensywnie wytrząsano, a następnie poddawano sedymentacji. Tak przygotowaną jednorodną zawiesinę kału w ilości 100 μl przenoszono do 1,5 ml próbówki.

Ekstrakcja DNA z próbek kału. Całkowite DNA ekstrahowano przy użyciu zestawu Genomic DNA Prep Plus® (Heliconius, A&A Biotechnology, Gdynia) według zaleceń producenta. Do 100 μl zawiesiny kału, znajdującej się w 1,5 ml próbówce, dodawano kolejno: 100 μl roztworu elucyjnego RE (10 mM Tris.HCl, pH 8,5), 50 μl buforu lizującego (LT) oraz 20 μl roztworu Proteinazy K. Zawartość próbki intensywnie wytrząsano i inkubowano w temperaturze 50°C przez 60 minut. Następnie do próbek dodawano 150 μl buforu LT, wytrząsano 20 sekund i wirowano przez 3 min. w temperaturze pokojowej, przez $13\,000 \times g$. Zebrany supernatant наносono na minikolumnę i wirowano przez 1 min. w temperaturze pokojowej przy $13\,000 \times g$. Po wyjęciu minikolumny z próbówki i przeniesieniu jej do kolejnej próbówki dodawano 500 μl roztworu płuczącego z dodatkiem 96% alkoholu etylowego. Próbki ponownie wirowano przez 1 min. w temperaturze pokojowej przy $13\,000 \times g$. Następnie minikolumnę umieszczono w kolejnej próbówce 1,5 ml, dodawano do kolumny 300 μl

Tab. 2. Warunki przeprowadzenia konwencjonalnej reakcji nested – PCR

PCR	wprowadzenie 5 μl ds. DNA do PCR	
	95°C 5 min.	35 cykli
	94°C 40 sek.	
	55°C 40 sek.	
	72°C 40 sek.	
72°C 7 min.		
nested – PCR	wprowadzenie 2 μl produktu PCR	
	95°C 5 min.	35 cykli
	94°C 40 sek.	
	55°C 40 sek.	
	72°C 40 sek.	
72°C 7 min.		

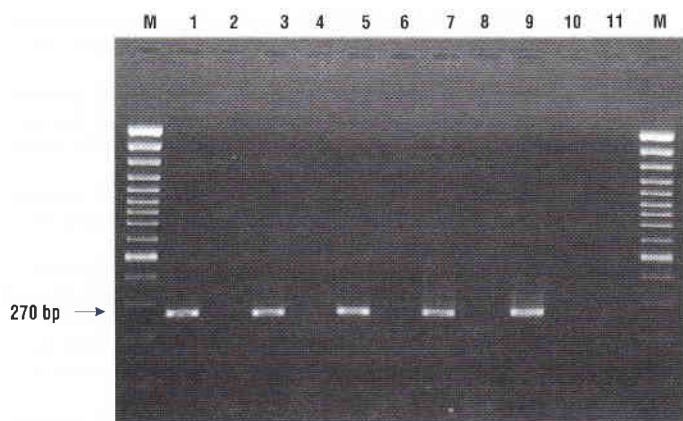
Tab. 3. Warunki przeprowadzenia jednoprobówkowej reakcji nested – PCR

Nested – PCR	95°C 5 min.	35 cykli
	94°C 40 sek.	
	55°C 40 sek.	
	72°C 40 sek.	
	72°C 7 min.	
	Wytrząsanie i wirowanie próbek	
	95°C 5 min.	35 cykli
	94°C 40 sek.	
	55°C 40 sek.	
	72°C 40 sek.	
72°C 7 min.		

roztworu płuczącego i wirowano jak poprzednio. Osuszoną minikolumnę przenoszono do nowej 1,5 ml próbówki, a do złoża krzemionkowego znajdującego się na dnie kolumny dodawano 100 μl roztworu RE uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C . Próbkę inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej i wirowano 1 min. przy $13\,000 \times g$. Ostatnią czynnością było usunięcie minikolumny. Oczyszczony, znajdujący się w próbówce DNA przetrzymywano do czasu dalszych analiz w 4°C .

Startery PCR. W badaniach wykorzystano dwa zestawy starterów określanych odpowiednio Ajon i Bjon oraz Cjon i Djon (6). Sekwencja starterów (tab. 1) zgodna była z sekwencją DNA kodującego białko p78 organizmu wewnątrzkomórkowego potocznie nazwanego Ileal Symbiont Intracellularis (ISI), podaną przez Gebharta i wsp. (5) i odpowiadała pozycji nukleotydów 5-24 oraz 304-323.

Amplifikację wykonywano w dwóch niezależnych reakcjach nested – PCR: metodą konwencjonalną dwuetapową oraz zmodyfikowaną jednoprobówkową.



Ryc. 1. Produkty jednoprobówkowego nested – PCR. M-100 bp standard masy molekularnej (Fermentas); Ścieżki 1-8 przedstawiają wyniki enzymatycznej amplifikacji DNA ekstrahowanego z próbek kału od warchlaków i tuczników z objawami klinicznymi biegunki; 9 – (+) kontrola dodatnia; 10 – (-) kontrola ujemna; 11 – kontrola mieszaniny reakcyjnej PCR.

Metoda konwencjonalna. Amplifikację matrycowego DNA, uzyskanego w rezultacie opisanej uprzednio ekstrakcji, przeprowadzano w dwóch etapach. W pierwszym amplifikowano DNA używając starterów zewnętrznych, w drugim etapie (nested – PCR) wykonywano reamplifikację produktu pierwszej reakcji, używając starterów położonych wewnątrz (nested), w stosunku do zastosowanych w pierwszym etapie. Obie reakcje przeprowadzano w próbkach o pojemności 0,5 ml używając termocyklera PTC – 100 (Polygen). Do reakcji użyto mieszaniny zawierającej: 5 μ l buforu PCR (10 \times skoncentrowany), 5 μ l $MgCl_2$ (koncentracja 25 mM), 4 μ l 10 mM roztworu każdego z trójfosforanów dezoksyrybonukleozydów, 2 μ l starterów (koncentracja 20 pmoli), 0,2 μ l termostabilnej polimerazy DNA Taq (5U/ μ l, Fermentas, Litwa) i 5 μ l DNA otrzymanego po wykonanej ekstrakcji (I etap) lub 2 μ l produktu pierwszego PCR (II etap – nested PCR). Po uzupełnieniu wodą objętość mieszaniny wynosiła 50 μ l. Szczegóły czasu trwania i temperatury poszczególnych cykli przedstawiono w tab. 2.

Metoda zmodyfikowana. Do wieczek próbek o pojemności 0,2 ml wprowadzano 8,25 μ l roztworu zawierającego 5 μ l 22% trehalozy (Sigma), 20 pmoli każdego ze starterów wewnętrznych, 1 μ l mieszaniny 10 mM trójfosforanów dezoksyrybonukleozydów oraz 1,25 U termostabilnej polimerazy DNA Taq. Probówki pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny do wyschnięcia zawartości wieczek. Do próbek zawierających w wieczkach wymienione reagenty wprowadzono: 3 μ l DNA, 5 μ l 10 \times buforu dla polimerazy Taq, 2 μ l mieszaniny 10 mM trójfosforanów dezoksyrybonukleozydów, 5 pmoli każdego ze starterów zewnętrznych (tab. 1), 12 μ l 25 mM roztworu wodnego $MgCl_2$, 1 μ l 10% wodnego roztworu Triton X – 100 (Sigma), 2,5 U polimerazy Taq oraz 26 μ l wody. Mieszaninę przykrywano warstwą oleju mineralnego i poddawano amplifikacji używając termocyklera PTC – 100. Szczegóły czasu trwania i temperatury poszczególnych cykli przedstawiono w tab. 3. Po zakończeniu pierwszego etapu amplifikacji próbki kilkakrotnie obracano w celu rekonstrukcji wysuszonej zawartości wieczek i jej wymieszania z mieszaniną reakcyjną, po czym krótko wirowano (10 sekund) i podawano ponownej amplifikacji.

Analiza uzyskanych produktów amplifikacji. Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdzielania elektroforetycznego z 10 μ l mieszaniny poreakcyjnej w 1,5% żelu agarozowym w buforze TAE przy stałym napięciu 120 Volt. Żel barwiono w bromku etydyny i fotografowano przy użyciu zestawu BioPhotonics oraz Mighty Bright (Hofer Scientific Ins.). Wynik PCR uznawano za dodatni, jeżeli w żelu, w świetle trasiluminatora, widoczny był prążek DNA o spodziewanej dla danej pary starterów wielkości 319 par zasad (pz) w PCR ze starterami zewnętrznymi i 270 pz w PCR ze starterami wewnętrznymi ryc. 1.

Wyniki i omówienie

Obecność materiału genetycznego *L. intracellularis* wykazano zarówno metodą konwencjonalną dwuetapową, jak i zmodyfikowaną jednoprobówkową. Spośród 491 badanych próbek kału 126 było dodatnich, w pozostałych 365 próbkach nie stwierdzono obecności materiału genetycznego dla *L. intracellularis*. We wszystkich przypadkach dodatnich wyniki PCR konwencjonalnego były zgodne z rezultatami zmodyfikowanego PCR.

Brak zdolności namnażania się *L. intracellularis* na znanych podłożach bakteryjnych, w sposób zasadniczy utrudnia diagnostykę laboratoryjną podejrzanych o zakażenie tym drobnoustrojem świń oraz ocenę statusu zdrowotnego stad. W większości laboratoriów rozpoznawanie zakażeń *L. intracellularis* oparte jest na badaniu histopatologicznym skrawków materiału biologicznego pobranego od zwierząt padłych (25). Tylko barwienie srebrem pozwala na wykrycie bakterii w świetle mikroskopu (35). Również barwienie zeskrobin błony śluzowej zmodyfikowaną metodą Ziehl-Neelsena daje szanse potwierdzenia postawionego na podstawie badań klinicznych i sekcyjnych podejrzenia (14). Obecność *L. intracellularis* może być też wykazana za pomocą immunofluorescencji pośredniej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych (22). Wymienione techniki wykorzystywane są stosunkowo rzadko i mogą być zastosowane wyłącznie do materiału biologicznego uzyskanego od zwierząt pośmiertnie.

Technika PCR jest więc obecnie jedyną, jaką można użyć w przyżyciowym rozpoznawaniu PE. Po raz pierwszy zastosowali ją w wykrywaniu wymienionego drobnoustroju Jones i wsp. (10). Wykorzystując opisane startery (tab. 1) autorzy ci wykazali, że metoda ta daje wyniki porównywalne z tymi, jakie otrzymywano w badaniach histologicznych skrawków jelita biodrowego, barwionych srebrem. Wykazano równocześnie, że technika PCR jest czulsza od techniki hybrydyzacyjnej w odmianie dot-blot (11). Dowiedziano też, że czułość metody nested – PCR jest 100-krotnie wyższa od techniki PCR z wykorzystaniem jednej pary starterów (1). Przydatność PCR do wykrywania stad zakażonych *L. intracellularis* opisali również Holyoake i wsp. (8) oraz Duinhof i wsp. (3). Opracowano już technikę M – PCR (multiplex PCR) umożliwiającą prowadzenie równoczesnych badań w kierunku wykrywania drobnoustrojów będących przyczyną enteropatii krwotocznych u

świń to jest: *L. intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* i *Salmonella cholerae suis* (4).

Zastosowana modyfikacja została po raz pierwszy opisana przez Wolffa i wsp. (34) w odniesieniu do wykrywania i różnicowania pestiwirusów z wykorzystaniem techniki Taq Man. W Polsce jako pierwsi modyfikację tę opisali Stadejek i Pejsak (31), prowadząc badania dotyczące diagnostyki różnicowej pestiwirusowych zakażeń świń techniką PCR.

Brak jest w piśmiennictwie danych odnośnie do opisanego w niniejszej publikacji jednoprobówkowego – nested PCR, zastosowanego w diagnostyce zakażeń *L. intracellularis*. Przedstawiona reakcja, w odmianie jednoprobówkowej umożliwia wykrycie materiału genetycznego *L. intracellularis* na podstawie prążków DNA, których wielkość ustalano w świetle transiluminatora. Uzyskiwane produkty miały wielkość 270 pz. Porównanie wielkości prążków otrzymanych metodą konwencjonalną i zmodyfikowaną dowiodło przydatności obu metod w rozpoznawaniu PE. Zmodyfikowana metoda jest pewniejsza (ze względu na mniejsze możliwości zanieczyszczenia próbki), a tym samym bardziej przydatna w rutynowej diagnostyce molekularnej zakażeń *L. intracellularis*. Przeprowadzenie dwóch etapów nested – PCR skraca jednocześnie do około 6-8 godzin całą procedurę diagnostyczną.

Wnioski

1. Efektywność wykrywania materiału genetycznego *L. intracellularis* metodą nested – PCR w odmianie jednoprobówkowej jest analogiczna do uzyskiwanej za pomocą konwencjonalnej techniki PCR.

2. Zastosowanie jednoprobówkowego nested – PCR ogranicza możliwości zanieczyszczenia badanych próbek oraz czas wykonania testu. Z tych powodów metoda ta winna być zalecana w diagnostyce molekularnej zakażeń świń *L. intracellularis*.

Piśmiennictwo

1. Chang W. L., Wu C. F., Wu Y., Kao Y. M., Pan M. J.: Prevalence of Lawsonia intracellularis in swine herds in Taiwan. Vet. Rec. 1997, 141, 103-104.
2. Collins A. M., Swift I., Monkton R. P.: Replication of Australian porcine isolates of ileal symbiont intracellularis in tissue culture. Vet. Microbiol. 1996, 40, 249-255.
3. Duinhof T. F., de Jog M. F., Bakker J., van der Heijden H. M. J. F., de Ridder E.: Diagnosis of proliferative enteropathy with polymerase chain reaction in feces on Dutch pig farms. Proc. 15th Congress Intern. Pig Vet. Soc. Birmingham 1998, 3, 117.
4. Elder R. O., Duhamel G. E., Mathiesen M. R., Erickson E. D., Gebhart C. J., Oberst R. D.: Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of Lawsonia intracellularis, Serpulina hyodysenteriae, and salmonellae in porcine intestinal specimens. J. vet. Invest. 1997, 9, 281-286.
5. Gebhart C. J., Barnes S. M., McOrist S., Lin G. F., Lawson G. H. K.: Ileal Symbiont Intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to Desulphovibrio species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993, 43, 533-538.
6. Gebhart C. J., Lin G. F., McOrist S., Lawson G. H. K., Murtaugh M. P.: Cloned DNA probes specific for the intracellular Campylobacter-like organism of porcine proliferative enteritis. J. Clin. Microbiol. 1991, 29, 1011-1015.
7. Gogłowski R. P., Cook R. W., Batterham E. S.: Suboptimal growth associated with porcine intestinal adenomatosis in pigs in nutritional studies. Aust. vet. J. 1991, 12, 406-408.
8. Holyoake P. K., Jones G. F., Davies P. R., Foss D. L., Murtaugh M. P.: Application of a polymerase chain reaction assay for detection of proliferative enteritis-affected swine herds. J. vet. Diagn. Invest. 1996, 8, 181-185.
9. Joens L. A., Nibbelink S., Glock R. D.: Induction of gross and microscopic lesions of porcine proliferative enteritis by Lawsonia intracellularis. Am. J. Vet. Res. 1997, 58, 1125-1131.
10. Jones G. F., Ward G. E., Murtaugh M. P., Lin G., Gebhart C. J.: Enhanced detection of intracellularis organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 2611-2615.
11. Jones G. F., Ward G. E., Murtaugh M. P., Rose R., Gebhart C. J.: Relationship between ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis. Infect. Immun. 1993, 61, 5237-5244.
12. Lawson G. H. K., Mackie R. A. M., Smith D. G. E., McOrist S.: Infection of cultured rat enterocytes by ileal symbiont intracellularis depends on host cell function and actin polymerization. Vet. Microbiol. 1995, 45, 339-350.
13. Lawson G. H. K., McOrist S., Jasni S., Mackie R. A. M.: Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 1136-1142.
14. Love D. N., Love R. J., Edwards M. J.: Proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. Vet. Rec. 1977, 100, 65-68.
15. Mc Cormick B. M., Hasse D., Monkton R. P.: Detection of ileal symbiont intracellularis in porcine fecal samples by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 1995, 47, 387-393.
16. McOrist S., Gebhart C. J., Boid R., Barnes S. M.: Characterization of Lawsonia intracellularis gen. nov., sp. nov., the obligate intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. Int. J. Syst. Bact. 1995, 45, 820-825.
17. McOrist S., Gebhart C. J.: In vitro testing of antimicrobial agents for proliferative enteropathy. Swine Health. 1995, 3, 146-149.
18. McOrist S., Jasni S., Mackie R. A. M., Berschneider H. M., Rowland A. C., Lawson G. H. K.: Entry of bacterium ileal symbiont intracellularis into cultured enterocytes and its subsequent release. Res. vet. Sci. 1995, 59, 255-260.
19. McOrist S., Jasni S., Mackie R. A. M., Macintyre N., Neef N., Lawson G. H. K.: Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. Infect. Immun. 1993, 61, 4286-4292.
20. McOrist S., Lawson G. H. K., Roy D. J., Boid R.: DNA analysis of intracellular Campylobacter – like organism associated with the porcine proliferative enteropathies: novel organism proposed. FEMS Microbiol. Lett. 1990, 69, 189-194.
21. McOrist S., Lawson G. H. K.: Proliferative enteropathies: Campylobacter species in the feces of normal and contact pigs. Vet. Rec. 1989, 124, 41.
22. McOrist S., Lawson G. H. K.: Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic pigs. Res. vet. Sci. 1989, 46, 27-33.
23. McOrist S., Mackie R. A. M., Lawson G. H. K., Smith D. G. E.: In-vitro interactions of Lawsonia intracellularis with cultured enterocytes. Vet. Microbiol. 1997, 54, 385-392.
24. McOrist S., Mackie R. A. M., Lawson G. H. K.: Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 1314-1317.
25. Pejsak Z., Kneblewski P., Pawłowski R., Koziński J.: Przypadki rozrostowego zapalenia jelit w krajowych fermach trzody chlewnej. Medycyna Wet. 1997, 53, 30-32.
26. Roberts L., Rowland A. C., Lawson G. H. K.: Experimental reproduction of porcine intestinal adenomatosis and necrotic enteritis. Vet. Rec. 1977, 100, 12-13.
27. Rowland A. C., Lawson G. H. K.: Intestinal adenomatosis in the pig: immunofluorescent and electron microscopic studies. Res. vet. Sci. 1974, 17, 323-330.
28. Rowland A. C., Lawson G. H. K.: Porcine Proliferative Enteropathies. W: Leman A. D., Straw B. E., Mengeling W. L., D'Allaire S., Taylor D., wyd.: Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, 1992, s. 560-569.
29. Schauer D. B., Mccathey S. N., Daft B. M., Jha S. S., Tatterson L. E., Taylor N. S., Fox J. G.: Proliferative enterocolitis associated with dual infection with enteropathogenic Escherichia coli and Lawsonia intracellularis in rabbits. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1700-1703.
30. Smith S. H., McOrist S.: Development of persistent intestinal infection and excretion of Lawsonia intracellularis by piglets. Res. vet. Sci. 1997, 62, 6-10.
31. Stadejek T., Pejsak Z.: Diagnostyka pestiwirusowych zakażeń świń zmodyfikowanym testem RT-nested PCR. Medycyna Wet. 2000, 56, 121.
32. Stills H. R.: Isolation of an intracellular bacterium from hamsters (Mesocricetus auratus) with proliferative ileitis and reproduction of the disease with pure culture. Infect. Immun. 1991, 59, 3227-3236.
33. Ward G. E., Winkelman N. L.: Diagnosing, treating, and controlling proliferative enteritis in swine. Vet. Med. 1990, 85, 312-318.
34. Wolff C., Hornschemer D., Wolff D., Kleesiek K.: Single-tube nested PCR with room temperature stable reagents. PCR Methods Appl. 1995, 4, 376-379.
35. Young B. J.: A reliable method for demonstrating spirochetes in tissue sections. J. Med. Lab. Technol. 1969, 26, 248-252.