

Metoda PCR w diagnostyce wirusowego zapalenia tętnic koni^{*)}

STANISŁAW WINIARCZYK, ŁUKASZ ADASZEK,
PRZEMYSŁAW ZIĘBA, ZBIGNIEW GRĄDZKI

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Winiarczyk S., Adaszek Ł., Zięba P., Grądzi Z.
PCR method in diagnosing EAV

Summary

Equine viral arteritis is a disease requiring mandatory registration (list B OIE). In recent years the RT-PCR method has been recognized as an alternative technique for virological examination when detecting EAV in carrier stallion semen. Virological examinations reveal the biological activity of the virus whereas the PCR technique detects nucleic acid. Therefore EAV can be detected by virological examination if the viruses are intact. The PCR method, on the other hand, is able to show the existence of non viable or even damaged viral particles. There is no possibility of defining the infectivity of the virus on the basis of the PCR results. The latest modification of the method is so called real time PCR.

Keywords: arteritis, horses

Wirusowe zapalenie tętnic koni jest chorobą podlegającą obowiązkowi rejestracji (lista B OIE), rozpowszechnioną na całym świecie (20). Objawy kliniczne, takie jak: wyciek surowiczy z oka, przekrwienie błon śluzowych worka spojówkowego, obrzęk moszny u ogierów, obrzęk wymienia u klaczy, obrzęk kończyn miednicznych, pokrzywka, ronienia, nasuwają podejrzenie wirusowego zapalenia tętnic (3, 7, 21). Ostateczne rozpoznanie opiera się na badaniu wirusologicznym lub serologicznym. Testem zalecanym przez OIE i obowiązującym w obrocie międzynarodowym końmi jest odczyn seroneutralizacji wykonywany w obecności dopełniacza (20). W dobie wolnego rynku i światowego handlu końmi, zwierzęta te są przemieszczane nie tylko pomiędzy różnymi państwami, ale również kontynentami. Intensywny obrót tymi zwierzętami, jak również wrażliwymi na tę chorobę mułami, osłami i zebami stwarza dogodne warunki do szerzenia się wirusa zapalenia tętnic koni. Wszystkie racjonalne metody przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się tej chorobie zmierzają do ochrony wolnych stad koni przed zawleczeniem wirusa EA oraz eliminacji z hodowli i obrotu zwierząt zakażonych. Sprawa o szczególnym znaczeniu jest identyfikacja bezobjawowych ogierów nosicieli, które są siewcami wirusa i głównym źródłem zakażenia. Aktualnie nie ma szybkiego i rutynowo stosowanego testu serologicznego

umożliwiającego wykrywanie nosicieli wśród ogierów. Badanie wirusologiczne mające na celu izolację wirusa z nasienia jest procedurą długotrwałą, wymagającą kilku tygodni. Z uwagi na mniejszą wrażliwość na zakażenie pewnych linii komórkowych używanych do izolacji EAV, wyniki tego badania mogą wypadać fałszywie negatywnie (11). W tym kontekście nie dziwi notowany ostatnio w Europie wzrost odsetka koni reagujących dodatnio w teście seroneutralizacji (SN). Stąd istnieje ciągła potrzeba doskonalenia metod diagnostyki wirusowego zapalenia tętnic koni. Detekcja materiału genetycznego wirusa EA w nasieniu techniką RT-PCR została uznana ostatnio za alternatywną metodę diagnostyczną. Pomimo jej wysokiej czułości, swoistości i szybkości wykonania (24-48 godz.), nie jest ona jeszcze powszechnie stosowana ze względu na trudności w eliminacji wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych.

Metoda ta jako test diagnostyczny do wykrywania materiału genetycznego wirusa zapalenia tętnic została po raz pierwszy opracowana i opisana przez Chirnside i Spaan w 1990 r. (4). Autorzy ci poddali amplifikacji trzy rejony wirusowego RNA, a mianowicie sekwencję liderową, fragment genu polimerazy i genu nukleokapsydu. Swoistość reakcji sprawdzana była metodą Southern blot z następującą po niej hybrydyzacją do klonów cDNA komplementarnych do amplifikowanych regionów. We wszystkich przypadkach produkty amplifikacji były swoiste dla wirusowego

^{*)} Publikacja opracowana w ramach projektu 6P06K 01421.

RNA. Nie odnotowano wyników fałszywie pozytywnych. Czulość tego pierwszego testu wahała się na poziomie 60 PFU (Plaque forming unit) wirusa zawartych w 100 μ l zawiesiny. Były to jednak badania pilotażowe, w których testowano zaledwie kilka szczepów wzorcowych i 6 próbek nasienia pochodzącego z tego samego regionu geograficznego.

Belak i wsp. (2) zwiększyli czulość tej metody poprzez zastosowanie drugiej reakcji PCR, tzw. nested PCR i ocenili jej przydatność w diagnostyce EAV testując 77 próbek nasienia i wycinków narządów poronionych płodów pochodzących z różnych regionów geograficznych świata. Opracowany przez nich test umożliwił wykrywanie mniej niż 1 PFU wirusa w plazmie nasienia koni. Zastosowane startery, które były komplementarne do sekwencji genu nukleoproteiny, okazały się wysoce swoiste. Na 77 testowanych próbek nasienia i tkanek z poronionych płodów, w 75 przypadkach wyniki metody nested PCR były zgodne z wynikami badania wirusologicznego. W pozostałych dwu przypadkach, w których nie stwierdzono materiału genetycznego wirusa EA, ponowne badanie wirusologiczne dało również wynik ujemny. Tak więc w tych badaniach zgodność metody nested PCR i badania wirusologicznego była całkowita. Warty podkreślenia był fakt ujemnych wyników badania wirusologicznego, jak i metody PCR nasienia seropozytywnych, szczepionych przeciwko *arteritis* ogierów.

Porównując badanie wirusologiczne i łańcuchową reakcję polimerazową w diagnostyce wirusowego zapalenia tętnic koni należy mieć na uwadze fakt, że pierwsza z nich wykrywa aktywność biologiczną wirusa wyrażającą się zdolnością do zakażenia komórek układu detekcyjnego, druga natomiast wykrywa kwas nukleinowy, który jest jednym z elementów struktury wirionu. Dlatego wykrycie wirusa EA przy pomocy badania wirusologicznego jest możliwe wówczas, gdy jego cząsteczki występują w badanym materiale patologicznym w stanie nienaruszonym. Natomiast metodą PCR można wykrywać oprócz tego defektywne, nieaktywne biologicznie wiriony lub zdegradowane elementy wirusa, w których zachował się amplifikowany fragment. Istota działania metody PCR nie daje podstawy do określenia infekcyjności wirusa. Systematyczna kontrola obecności wirusa w organizmie naturalnie zakażonych ogierów do 6 tygodnia po kastracji oraz eksperymentalnie zakażonych wałachów przez okres 21 tygodni wykazała, że jeszcze pewien czas po tym, jak wyniki badania wirusologicznego były ujemne, metoda PCR wciąż wykazywała obecność wirusowego RNA (2). Wyniki te mogą potwierdzać naturę możliwości diagnostycznych obu testów. Niemniej jednak, jeżeli przyjmiemy założenie o nie występowaniu RNA w tkankach i płynach ustrojowych w formie wolnej, to również możliwa jest taka interpretacja wyników przytoczonych badań, na podstawie której możemy przypuszczać, że wirusy wykrywane w końcowej fazie tego doświadczenia miały zacho-

waną zakaźność, lecz czulość zastosowanego układu detekcyjnego była zbyt niska. W tym kontekście nasuwa się pytanie dotyczące samej natury nosicielstwa wirusa EA u ogierów, a mianowicie, czy istnieje możliwość ciągłego wydalania ze spermą niezakaźnych wirionów, których kwas nukleinowy daje się wykryć metodą PCR.

St-Laurent i wsp. (18) opracowali metodę RT-PCR dla czterech ramek odczytu, a mianowicie: ORF 1b, ORF3, ORF4 i ORF7. Czulość tego testu była najwyższa dla starterów komplementarnych do ramek 1. i 4. Przy ich pomocy można było uzyskać produkt amplifikacji już z 2 TCID₅₀ wirusa. Ten sam poziom czulości można było również osiągnąć ze starterami komplementarnymi do ramki 3., ale dopiero po hybrydyzacji wg Southerna do odpowiedniej sondy molekularnej. Najniższą czulością cechowała się reakcja RT-PCR ze starterami dla ORF7, czyli genu kodującego nukleoproteinę. W tym przypadku amplifikacja była możliwa tylko z zawiesin wirusa o mianie 10⁴ TCID₅₀. Czulość testu RT-PCR opracowanego dla nukleoproteidy była niższa podczas badania próbek nasienia w porównaniu z próbkami supernatantu z hodowli komórkowej wirusa EA. Wynikało to z hamowania aktywności polimerazy lub innych mechanizmów testu przez substancje zawarte w nasieniu. Autorzy tego opracowania nie uwzględnili sekwencji zawartych w obrębie otwartych ram odczytu 2., 5., i 6., ponieważ kodują one wirusowe białka błonowe GP2, GP5 i M, które podlegają ciągłej presji selekcyjnej układu odpornościowego (8). To z kolei warunkuje wyższy polimorfizm opisywanych elementów genomu wirusa. Umieszczenie starterów w tych regionach byłoby korzystne, ale tylko w przypadku badań epidemiologicznych mających na celu śledzenie dróg transmisji określonego szczepu o wyraźnie zaznaczonym polimorfizmie genetycznym. Dla diagnostyki, której podstawowym celem jest wykrycie wirusa niezależnie od jego wariantu genetycznego czy antygenowego, tylko wysoce konserwatywne rejony genomu wirusa mogą być brane pod uwagę w czasie opracowywania testu PCR.

Na podstawie analizy sekwencji nukleotydów produktu reakcji PCR za pomocą enzymów restrykcyjnych lub metodą sekwencjonowania można dokonać dodatkowo charakterystyki amplifikowanego regionu i wykorzystać do badań epidemiologicznych. Sekiguchi i wsp. (16) zastosowali metodę RT-PCR do identyfikacji wirusa EA i różnicowania poszczególnych szczepów na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu enzymami Xba I, Mva I, Mbo II, Alu I, Hha I, Ava II produktu amplifikacji genu ORF6 kodującego nieglikozylowane białko błonowe M. Próg czulości opracowanej reakcji RT-PCR odpowiadał 500 PFU, natomiast w drugiej reakcji PCR został obniżony do poziomu 0,5-5 PFU. Technika PCR wraz z analizą RFLP umożliwia wykrywanie i identyfikację niewielkich ilości wirusa EA w materiale patologicznym. Połączenie tych dwu metod jest

niezwykle przydatne do dokonania rozróżnienia pomiędzy wirusem szczepionkowym i szczepem terenowym w krajach, gdzie prowadzi się immunoprofilaktykę swoistą przy pomocy szczepionek zawierających zmodyfikowany szczep Bucyrus wirusa EA. Uważa się, że szczep szczepionkowy posiada unikatowe miejsce restrykcyjne dla enzymu Hha I w produkcji amplifikacji ORF6 ograniczonym starterami M6 i M8 (5). Sugeruje się również, że pewne rozróżnienie tego szczepu od szczepów terenowych wymagałoby jednak uwzględnienia dodatkowych miejsc restrykcyjnych występujących w innych otwartych ramach odczytu, takich jak 2., 4., i 5. oraz porównania ich aktywności antygenowej w odczynie seroneutralizacji.

Jednym z problemów, które rzutują na wiarygodność wyników łańcuchowej reakcji polimerazowej są różnice w komplementarności starterów do odpowiadających im miejsc hybrydyzacji. Sekiguchi i wsp. (16) obserwowali różnice, wyrażające się pojedynczymi podstawieniami nukleotydów, pomiędzy niektórymi badanymi szczepami i sekwencjami odpowiednich starterów. Okazało się jednak, że niepełna komplementarność wynikająca z braku parowania niektórych nukleotydów w 3'-końcowym fragmencie startera z matrycą RNA wirusa EA nie wywierała negatywnego skutku na przebieg amplifikacji ograniczonego nim fragmentu.

Badania porównawcze wykazały, że badanie wirusologiczne cechuje się mniejszą czułością wykrywania wirusa zapalenia tętnic koni w zestawieniu z metodami biologii molekularnej (19). Spośród 15 dodatkich próbek nasienia i wycinków z poronionych płodów tylko w 5 przypadkach udało się izolacja wirusa. Najwyższą czułością odznaczała się hybrydyzacja punktowa (dot blot hybridization) i przy jej pomocy można było zidentyfikować RNA wirusa EA w 19 próbkach badanego materiału. Metoda RT-PCR okazała się mniej czuła, bo swoiste produkty amplifikacji uwidaczniane w żelu agarozowym po barwieniu bromkiem etydydny uzyskano tylko w 12 z 19 dodatkich próbek w hybrydyzacji punktowej. Niemniej jednak po reamplifikacji produktów RT-PCR w drugiej reakcji PCR ze starterami wewnętrznymi czułość tej metody przewyższyła hybrydyzację. Dzięki zastosowaniu metody nested PCR wykryto materiał genetyczny wirusa EA w dodatkowych trzech próbach, które wypadły ujemnie w badaniu wirusologicznym i hybrydyzacji. Należy przy tym podkreślić, że wszystkie próbki dodatnie w badaniu wirusologicznym były również dodatnie w każdej z porównywanych technik biologii molekularnej. Uzyskanie prawidłowego wyniku w metodzie PCR w dużej mierze zależy od właściwie przeprowadzonej ekstrakcji kwasów nukleinowych zawartych w próbce materiału patologicznego. Chodzi o usunięcie wszystkich substancji, które mogą: blokować aktywność enzymów odwrotnej transkryptazy, Taq polimerazy, blokować wiązanie starterów do matrycy, wiązać którykolwiek z komponentów mieszaniny re-

akcyjnej lub w inny sposób negatywnie wpływać na przebieg reakcji. Substancje te dość często pod względem fizykochemicznym mogą zachowywać się podobnie jak kwasy nukleinowe podczas rutynowo przeprowadzanych ekstrakcji i przechodzić wraz z nimi do roztworu używanego do amplifikacji. Tym można np. tłumaczyć wyższą czułość hybrydyzacji punktowej nad reakcją RT-PCR w badaniach przeprowadzonych przez Strarick (19). Należy przypuszczać, że RNA wirusa EA wyekstrahowany z próbek nasienia zanieczyszczony był inhibitorami, które hamowały reakcję enzymatycznej amplifikacji. Z drugiej strony ilość tego kwasu była wystarczająca do tego, aby mógł on być wykryty za pomocą sondy molekularnej. Autor ten usprawnił swoją metodę ekstrakcji wprowadzając do niej dodatkowy etap poprzedzający właściwą ekstrakcję, który polegał na traktowaniu próbki odczynnikiem Chelex 100 i trawieniu proteinazą K. Zabiegi te usuwają poliwalentne kationy, które mogą zaburzać reakcje enzymatyczne. Równie skuteczne okazało się usuwanie inhibitorów reakcji PCR z badanych próbek poprzez stosowanie komercyjnego zestawu QIAampViral RNA Kit do oczyszczania kwasu rybonukleinowego.

Gilbert i wsp. (6) uzyskali pełną zgodność wyników badając 36 próbek nasienia ogierów w kierunku EAV metodą izolacji wirusa na komórkach RK-13 i techniką RT-PCR. Podobną zbieżność wyników zanotowano podczas monitorowania siewstwa wirusa ze spermą u czterech ogierów nosicieli. W każdym przypadku, gdy wirus zniknął z nasienia, obydwa testy wypadły ujemnie. Opisywana metoda PCR wykorzystująca startery komplementarne do genu polimerazy (ORF1b) cechowała się wysoką czułością. Za jej pomocą można było wykazać obecność wirusa EA w próbkach zawierających jego śladowe ilości. Biorąc pod uwagę konieczność rozcieńczenia nasienia co najmniej 10-krotnie przed inokulacją komórek RK-13, autorzy tej pracy przyjęli, że najmniejsza ilość wirusa wykrywanego w czasie ich badania wirusologicznego odpowiadała 2,5 PFU/ml. Natomiast w oparciu o test PCR można było wykrywać 0,25-2,5 PFU/ml.

Ostatnio w diagnostyce wirusowego zapalenia tętnic koni zastosowano nowy wariant łańcuchowej reakcji polimerazacji, tzw. PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR, rt-PCR). Metoda ta, w przeciwieństwie do klasycznej reakcji PCR opracowanej w 1988 r. przez Saiki i Mullisa (12-15), pozwala nie tylko na jakościową, ale także na ilościową ocenę amplifikowanego fragmentu DNA. Jednym z jej twórców był Higuchi (9), który w 1992 r. zauważył, iż bromek etydydny dodany do mieszaniny reakcyjnej ulega interkalacji do nici DNA tworzącego się w czasie amplifikacji i pod wpływem światła UV wykazuje fluorescencję, której natężenie jest proporcjonalne do aktualnej ilości ampliconów. Ponadto wykazał on, że stopień nasilenia fluorescencji jest również związany z wyjściową ilością matrycowego DNA: im więcej wyjściowych kopii

matrycowego DNA, tym mniej cykli niezbędnych do wykrycia fluorescencji. Dalsze prace nad detekcją produktów PCR przy użyciu bromku etydyny doprowadziły do powstania w 1996 roku metody TaqMan (10), w której badacze firmy Perkin-Elmer połączyli kinetyczną metodę Higuchiego z sondami fluorescencyjnymi trawionymi przez egzonukleazę. Sondy te znakowane są na końcu 5' barwnikiem reporterowym (reporter), zaś na końcu 3' barwnikiem tłumiącym (quencher). W momencie przyłączenia starterów sonda hybryduje do amplifikowanego fragmentu i w czasie wydłużania nowo powstającego produktu jest degradowana przez Taq polimerazę, posiadającą aktywność egzonukleazy 5'-3'. Odłączenie barwnika reporterowego od tłumiącego prowadzi do wzrostu fluorescencji. Niewątpliwą zaletą tej metody jest wysoka swoistość, zaś wadą konieczność stosowania oddzielnych sond dla amplifikowanych fragmentów (17).

Balasuriya i wsp. (1) zastosowali metodę real-time TaqMan RT-PCR do wykrywania wirusa EA. Startery i sonda wykorzystane w tych badaniach były komplementarne dla wysoce konserwatywnego regionu ORF 7. Amplifikacji poddano 21 próbek płynu z hodowli wirusa EA, 18 próbek nasienia od zakażonych ogierów oraz 5 wymazów z nosa od doświadczalnie zakażonych koni. Wszystkie próbki, które były pozytywne w standardowym badaniu wirusologicznym, okazały się także dodatnie w teście real time TaqMan. Ilość produktu powstającego w czasie rzeczywistym określano w oparciu o pomiar fluorescencji barwnika reporterowego sondy, bez konieczności wykonywania rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji. Autorzy ci wykazali, że real time TaqMan RT-PCR jest prostą i szybką metodą wykrywania EAV w materiale biologicznym i w porównaniu z konwencjonalną metodą RT-PCR wydaje się mniej pracochłonna. Jest ona niezwykle użyteczna w badaniu dużej liczby próbek, a zwłaszcza tam, gdzie istnieje potrzeba określenia ilości wirusa EA.

Reasumując przytoczone dane należy podkreślić, że metoda PCR tak w wersji klasycznej, jak i w czasie rzeczywistym łączy w sobie szybkość z niezwykle czułością i swoistością uzyskiwanych wyników. Uważa się, że jest nie tylko uzupełnieniem urzędowo uznanego badania wirusologicznego, ale nawet stanowi dla niego alternatywę. Pomimo braku możliwości wykazania zakaźności wirusa metodą PCR może on dawać odpowiedź na pytanie, czy nasienie jest wolne od wirusa EA.

Pismienictwo

1. Balasuriya U., Leutenegger C., Topol J., McCollum W., Timoney P., MacLachlan N.: Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Meth.* 2002, 101, 21-28.
2. Belak S., Ballagi-Pordany A., Timoney P., McCollum W., Little T., Hyllseth B., Klingeborn B.: Evaluation of nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. *Proc. 7th Int. Conf. Equine Inf. Dis.* Tokyo 1994, s. 33-38.
3. Chirnside E. D.: Equine arteritis an overview. *Br. Vet. J.* 1992, 148, 181-197.
4. Chirnside E. D., Spaan W.: Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods.* 1990, 30, 133-140.

5. Chirnside E. D., Wearing C., Binns M., Mumford J.: Comparison of M and N gene sequences distinguishes variation amongst equine arteritis virus isolates. *J. Gen. Virol.* 1994, 75, 1491-1497.
6. Gilbert S., Timoney P., McCollum W., Deregt D.: Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2181-2183.
7. Glaser A. L., Chirnside E. D., Horzinek M. C., de Vries A. A. F.: Equine arteritis virus. *Theriogenology* 1997, 47, 1275-1295.
8. Hedges J., Balasuriya U., Timoney P., McCollum W., MacLachlan N.: Genetic variation in open reading frame 2 of field isolates and laboratory strains of equine arteritis virus. *Virus Res.* 1996, 42, 41-52.
9. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P., Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992, 10, 13-17.
10. Holland P., Abramson R., Watson R., Gelfand D.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 7276-7280.
11. Huntington P. J., Forman A. J., Ellis P. M.: The occurrence of equine arteritis virus in Australia. *Austr. Vet. J.* 1990, 67, 432-443.
12. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986, 51 Pt 1, 263-273.
13. Mullis K.: Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 1990, 48, 579-582.
14. Saiki R., Bugawan T., Horn G., Mullis K., Erlich H.: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986, 324, 163-166.
15. Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239, 487-491.
16. Sekiguchi K., Sugita S., Fukunaga Y., Kondo T., Wada R., Kamada M., Yamaguchi S.: Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch. Virol.* 1995, 140, 1483-1491.
17. Słomski R.: Przykłady analiz DNA. Wyd. AR, Poznań 2004.
18. St-Laurent G., Morin G., Archambault D.: Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 658-665.
19. Strarick E.: Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridization and nested PCR. *Acta Virol.* 1998, 42, 333-339.
20. Timoney P. J.: Manual of standards for diagnostic tests & vaccines: Equine viral arteritis. O.I.E Paris 1996, rozdz. 3.4.10.
21. Timoney P. J., Klingeborn B., Lucas M. H.: A perspective on equine viral arteritis (infectious arteritis of horses). *Rev. Sci. Tech. Off. Inf. Epiz.* 1996, 15, 1203-1208.

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Winiarczyk, ul. Popieluski 26, 20-052 Lublin; e-mail: stwiniar@hortus.ar.lublin.pl

SANSOM J., FEATHERSTONE H., BARNETT K. C.: Keratomykoza u sześciu koni w Zjednoczonym Królestwie. (Keratomycosis in six horses in the United Kingdom). *Vet. Rec.* 156, 13-17, 2005 (1)

Spośród 6 koni, u których zdiagnozowano grzybicze zapalenie rogówki w 2 przypadkach przebiegało ono jako owrzodzenie rogówki, w 4 przypadkach wystąpił obrzęk i owrzodzenie rogówki. U wszystkich zwierząt zastosowano sterydy lub niesterydowe leki przeciwzapalne. Z wymazów z worka spojówkowego 2 koni uzyskano słaby wzrost koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych gronkowców, od 1 konia wzrost *Bacillus* sp. Materiał pochodzący z oczu 4 koni posiano na podłoże Sabourauda i w 3 przypadkach uzyskano wzrost grzybów. Tylko w jednym przypadku zidentyfikowano *Aspergillus flavus*. W biopatach głębokich warstw rogówki pobranych od 3 koni w 2 przypadkach występowały elementy grzybicze. Występowały one też w rozmazach zeszkrobiny rogówki 2 innych koni. Badaniem cytologicznym nitki grzybni stwierdzono u 5 koni. W leczeniu stosowano klotrimazol w formie 1% roztworu, a dodatkowo u części koni zastosowano ofloksacynę i ketorolak lub chloramfenikol w kroplach, octan prednizolonu i deksametazon.