

ne były stosowane w diagnostyce zakażeń wirusem biaczki bydłej (33) i wirusem choroby Aujeszkyego (23).

Piśmiennictwo

- Alvine J. C., Kemp D. J., Stark G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350, 1977.
- Angerer L. M., Angerer R. C.: Nucleic Acids Res. 9, 2819, 1981.
- Benton W. D., Davis R. W.: Science 196, 180, 1977.
- Brahic M., Haase A. T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 6125, 1978.
- Brigati D. J., Myerson D., Leary J. J., Spalholz B., Travis S. Z., Fong C. K. Y., Hsiung G. D., Ward D. C.: Virology, 126, 32, 1983.
- Britten R. J., Kohne D. E.: Science, 161, E29, 1968.
- Donaldson A. I., Gloster J., Harvey L. D. J., Deans D. H.: Vet. Rec. 10, 53, 1982.
- For J. L.: AM. Soc. Microbiol. News, 56 (11), 179, 1990.
- Gall J. G., Pardue M. L.: Methods Enzymol. 21, 470, 1971.
- Gillespie D., Spiegelman S.: J. Mol. Biol., 12, 829, 1965.
- Gitshier J., Wood W. I., Goralka T. M., Wion K. L., Chen E. Y., Eaton D. H., Vehar E. G. A., Capon D. J., Lawn R. M.: Nature 312, 326, 1984.
- Goodbourn S. E. Y., Higgs D. R., Clegg J. B., Weatherall D. J.: J. Mol. Biol. Med., 2, 123, 1984.
- Grunstein M., Hogness D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961, 1975.
- Haynes J., Weissmann C.: Nucl. Acids Res., 11, 687, 1983.
- Hitzeman R. A., Leung D. W., Perry L. J., Kohr W. J., Levine H. L., Goeddel D. R.: Science, 219, C20, 1983.
- Hodgkinson S., Sherrington R., Gurling H., Marchbanks R., Reeders S., Mallet J., McInnis M., Petursson H., Brynjolfsson J.: Nature, 325, 805, 1987.
- Hutchinson N. J., Langer-Safer P. R., Ward D. C., Hamkalo B. A.: J. Cell Biol. 95, 609, 1982.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L.: Nature, 314, 87, 1985.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Weatherall D. J., Ponder B. A. J.: Am. J. Hum. Genet.: 39, 11, 1986.
- Kaetzel D. M., Browne J. K., Wondisford F., Nett T. M., Thomason A. R., Nilson J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7280, 1985.
- Katafos F. C., Jones C. W., Efstratiadis A.: Nucl. Acids Res. 7, 1541, 1979.
- Kleid D. G., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D. M., B. H., Bachrach H. L.: Science, 214, 1125, 1981.
- Kochan G., Lipowski A., Pejsak Z., Szewczyk B.: Materiały IX Kongresu PTNW, Olsztyn 1992.
- Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4381, 1982.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Marmur J., Doty P.: J. Mol. Biol., 1, 169, 1962.
- Moore H-P. H., Walker M. D., Lee F., Kelly R. B.: Cell 35, 531, 1983.
- Mullis K. B., Faloona F. A.: Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 155, 335, 1987.
- Ogawa R., Yanagida N., Saeki S., Satto S., Ohkawa S., Gotoh H., Kodama K., Kamogawa K., Sawaguchi K., Iritani Y.: Vaccine, 3 (5), C85, 1990.
- Old L. J.: Science, 230, 630, 1985.
- Ostrowski W. S.: Problemy Biotechnologii, Wszechnica Polskiej Akademii Nauk, Wrocław 1988.
- Reeders S. T., Breuning M. H., Davies K. E., Nicholls R. D., Jarman A. P., Higgs D. R., Pearson P. R., Weatherall D. J.: Nature, 317, 542, 1985.
- Reichert M., Grundboeck-Juško J.: Acta Biochim. Polon., 38 (1), 111, 1991.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.: Science, 230, 1350, 1985.
- Scolnick E. M., McLean A. A., West D. J., McAleer W. J., Miller W. J., Buynak E. B.: J. Am. Med. Assoc. 251, 2812, 1984.
- Showalter D. B., Sommer S. S.: Anal. Biochem., 177, 90, 1989.
- Smith G. P.: Science, 191, 528, 1976.
- Smith G. P., Summers M. D., Fraser M. J.: Molec. Cell. Biol. 3, 2156, 1983.
- Southern E.: J. Mol. Biol.: 98, 193, 1975.
- Warren T. G., Shields D.: Cell, 39, 547, 1984.
- Williams D. A., Orkin S. A., Mulligan R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2566, 1985.
- Young J. F., Hockmeyer W. T., Gross M., Ballou W. R., Wirtz R. A., Trosper J. H., Beaudoin R. L., Hollingdale M. R., Miller L. H., Diggs C. L., Rosenberg M.: Science, 228, 958, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Jadwiga Grundboeck, ul. Kościuszki 19/3, 24-100 Puławy

STANISŁAW WINIARCZYK

artykuł przeglądowy

Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce weterynaryjnej

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wykrycie enzymów restrykcyjnych i technik pozwalających na rekombinację, a także na łączenie cząsteczek DNA pochodzących z różnych organizmów z DNA plazmidów, bądź wirusów stanowiących wektory do wprowadzenia obcego DNA do komórek biorców, można uznać za początek powstania tzw. inżynierii genetycznej. Jest ona jednak konsekwencją epokowego odkrycia roli DNA jako substancji dziedzicznej i faktu posługiwania się przez wszystkie organizmy jednym i tym samym kodem genetycznym przy biosyntezie białek. Dzięki swym właściwościom restryktazy stały się narzędziami inżynierii genetycznej, umożliwiając dokonywanie rekombinacji (łączenia) cząsteczek DNA różnego pochodzenia w układach pozakomórkowych — *in vitro*. Restryktazy (enzymy przecinające cząsteczkę kwasu nukleinowego w obrębie rozpoznawanej sekwencji) rozpoznają z reguły jedną, ściśle określoną sekwencję nukleotydów i trawią wiązanie fosfodwuestrów w każdej z nici DNA. Duża liczba enzymów restrykcyjnych przecina dwa komplementarne łańcuchy podwójnej spirali DNA z pozostawieniem krótkich odcinków pojedynczych nici (tzw. lepkie końce). Fragmenty DNA, nawet różnego pochodzenia, lecz strawione tym samym enzymem lub różnymi enzymami rozpoznającymi tę samą sekwencję cięcia kwasu nukleinowego, mogą ponownie łączyć się ze sobą w dowolnej kombinacji na zasadzie komplementarności owych końców. Możliwość łączenia frag-

mentów DNA do wektora — cząsteczek DNA posiadających zdolność autonomicznego powielania się — stworzyło szansę klonowania molekularnego. Plazmidy, czy bakteriofagi (wektory) mają na ogół tylko jedno miejsce podatne na trawienie danym enzymem restrykcyjnym, co umożliwia podstawienie w to miejsce obcego fragmentu DNA pociętego najczęściej tą samą restryktazą. W wyniku wprowadzenia takich zrekombinowanych cząsteczek kwasu nukleinowego do odpowiednich bakterii i ich namnożenia dochodzi do amplifikacji (wielokrotnego powielania się) poszczególnych sekwencji wraz z całym wektorem, do których zostały wbudowane. Zbiór klonów (grupa komórek bakteryjnych pochodząca od jednej komórki bakteryjnej) zawierających plazmidy lub fagi zrekombinowane losowo z fragmentami badanego DNA, które łącznie reprezentują całkowity genom, określamy mianem biblioteki lub banku genów. Sklonowane rekombinanty można następnie izolować z komórek bakteryjnych oraz „wycinać” z nich wcześniej użytą restryktazą badane fragmenty. W ten sposób otrzymujemy geny, ich fragmenty lub sekwencje o nieznanych dotychczas właściwościach, w ilościach umożliwiających dokonywanie z nimi wszelkich manipulacji biochemicznych i genetycznych.

Wraz z opracowaniem technik rekombinacji i klonowania DNA pojawiła się sprawa praktycznego zastosowania inżynierii genetycznej w różnych dziedzinach

nauk biologicznych i przemyśle wykorzystującym biotechnologię. Jednym z głównych nurtów badań z tego zakresu w obrębie medycyny weterynaryjnej jest wykorzystanie sond molekularnych do rozpoznawania chorób zakaźnych zwierząt. W tym celu wykorzystywane są głównie metody hybrydyzacji kwasów nukleinowych, klonowania molekularnego, trawienie restryktazami kwasów nukleinowych w specyficznych miejscach i amplifikacja DNA w reakcji PCR (Polymerase chain reaction). Ogromny postęp, który doprowadził ostatnio do zwiększenia czułości i skrócenia czasu wykonywania hybrydyzacji, wprowadzenia nieradioaktywnego znakowania kwasów nukleinowych oraz odkrycie reakcji PCR sprawiło, iż stały się one atrakcyjnym uzupełnieniem klasycznych metod diagnostycznych takich jak, hodowla z fenotypową charakterystyką zarazka, czy bezpośrednie wykrywanie jego antygenów przy pomocy metod serologicznych (odczynów immunofluorescencyjnych, immunoenzymatycznych, radioimmunologicznych, testu ELISA opartych na przeciwciałach poliklonalnych, jak również monoklonalnych) (35, 41, 46).

Mechanizm hybrydyzacji kwasów nukleinowych i przygotowanie sond molekularnych

Tradycyjny i rutynowo wykonywany sposób identyfikacji specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych oparty jest na metodzie hybrydyzacji. Istotą procesu hybrydyzacyjnego jest wzajemne oddziaływanie pomiędzy cząsteczką sondy i cząsteczką badanego kwasu nukleinowego, które doprowadza do utworzenia hybrydy (duplex). Należy podkreślić, iż sonda, jak również badany kwas nukleinowy, muszą występować w postaci jednoniciowych (zdenaturowanych) łańcuchów polinukleotydowych. U podstawy mechanizmu procesu hybrydyzacyjnego leży zjawisko denaturacji dwuniciowych kwasów nukleinowych pod wpływem temperatury lub zasad i ich renaturacji po obniżeniu temperatury lub zneutralizowaniu użytych zasad. Łączenie się dwóch pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych jest bardzo specyficzne i zachodzi według reguły komplementarności zasad purynowych i pirymidynowych, zgodnie z którą adenina łączy się z tymidyną, a guanina z cytozyną. Oczywiście, hybrydyzacja jednoniciowego RNA lub DNA, uzyskanego po klonowaniu w odpowiednich wektorach, nie musi być poprzedzona denaturacją.

Badany DNA lub RNA (target) jest denaturowany i immobilizowany (unieruchamiany) na filtrach nylonowych lub nitrocelulozowych, a następnie identyfikowany za pomocą znakowanej radioaktywnie lub nieradioaktywnie sondy molekularnej (probe). Mianem sondy, w sensie chemicznym lub biologicznym, określa się cząsteczkę, która ma silne powinowactwo wyłącznie do ściśle określonej cząsteczki badanej i posiada markery umożliwiające wykrywanie jej po zakończonej reakcji. Oddziaływania pomiędzy antygenem i przeciwciałem, lektyną i cukrem, komplementarnymi cząsteczkami kwasów nukleinowych są przykładami silnych i specyficznych reakcji sonda — badana cząsteczka (probe-target). W hybrydyzacji molekularnej stosowane są krótkie (20—150 par zasad) lub długie (100—10 000 par zasad) polinukleotydy komplementarne do unikalnej sekwencji badanej cząsteczki kwasu nukleinowego. Sondami stosowanymi w diagnostyce chorób zakaźnych mogą być syntetyczne oligonukleotydy, geny lub ich fragmenty, które kodują syntezę metabolitów warunkujących patogenność organizmu: toksyny (17), hemolizyny (76);

markery oporności na antybiotyki, sekwencje powtarzające się w genomie (8). Sondę stanowić może cały genom bakteryjny (38) lub losowo wybrane fragmenty z biblioteki genomowej DNA, często o nieznanej funkcji, których sekwencja charakteryzuje się unikalnością dla danej grupy, gatunku czy rodzaju. W ostatnich latach coraz częściej stosowanymi sondami w diagnostyce bakteriologicznej są odcinki DNA komplementarne do unikatowych sekwencji rybosomowego RNA (rRNA) (74). Sonda, która zwykle występuje w nadmiarze, łączy się z badanym kwasem nukleinowym nawet wówczas, gdy występuje on w próbce jako pojedyncza cząsteczka. Odpowiednio przygotowana sonda oligonukleotydowa (złożona z 20—50 par zasad), zastosowana w warunkach optymalnych, rozpoznaje sekwencje różniące się zaledwie kilkoma nukleotydami i tworzy trwałe połączenia tzw. duplekty tylko i wyłącznie z interesującą nas cząsteczką, pomijając pozostałe molekuly obecne w badanej próbce. Czułość metody jest w dużym stopniu uwarunkowana sposobem znakowania. Długie polinukleotydy DNA, znakowane metodą „nick-translation” (100—1000 znakowanych nukleotydów) wykrywają 10^4 — 10^5 cząsteczek badanych sekwencji, natomiast zdolność wykrywania krótkich polinukleotydów, znakowanych na końcach za pomocą reakcji kinazowej (pojedynczy nukleotyd znakowany na końcu 5'), obniża się do 10^6 — 10^7 cząsteczek badanego kwasu nukleinowego. W zależności od założonego celu i rodzaju kwasu nukleinowego (DNA lub RNA) wykonuje się różne warianty techniczne hybrydyzacji molekularnej (23). Ogólny schemat postępowania jest zasadniczo podobny i obejmuje następujące fazy: immobilizacja zdenaturowanego badanego kwasu nukleinowego na membranie lub innym stałym nośniku, zablokowanie pozostałych miejsc niespecyficznego wiązania DNA lub RNA, hybrydyzacja, to jest inkubacja tak przygotowanego filtru w roztworze znakowanej i zdenaturowanej sondy, wymycie nie związanej sondy i wykrywanie utworzonych hybrydów metodami, które określone są naturą znacznika wprowadzonego do sondy (np. autoradiografia, reakcje typu ELISA z substratem enzymu) (33, 58).

Hybrydyzacja punktowa (Dot blot hybridisation)

Jest to najprostsza metoda, w której nakrapia się na membranę natywną lub oczyszczoną mieszaninę kwasów nukleinowych DNA lub RNA i immobilizuje przez zapiekanie (2h/80°C) lub naświetlanie promieniami UV. Hybrydyzacja punktowa pozwala na jednoczesne wykrywanie i identyfikację wielu próbek na tej samej membranie oraz półilościową ocenę ich stężenia. W miejscach izolowanych kwasów nukleinowych można wprowadzić komórki hodowli tkankowych lub komórki bakteryjne. Pociąga to za sobą konieczność lizowania komórek immobilizowanych w celu odsłonięcia ich kwasów nukleinowych. Wszystkie operacje, łącznie z denaturacją przeprowadza się na filtrze (33, 58). Ta technika jest szeroko stosowana w wielu różnych badaniach stanowiąc jeden z etapów realizacyjnych danego projektu. W celu zilustrowania jej przydatności w diagnostyce chorób zakaźnych można wymienić zastosowanie w wykrywaniu wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza — IBDV (29), wirusa biegunki wirusowej bydła — BVDV (9, 10, 52), wirusa pomoru świń (60), riketsji *Eperythrozoon suis* (42, 43), rotawirusów (31, 54, 55), *Campylobacter* spp. (22), *Anaplasma marginale* (1, 25), *Mycobacterium paratuberculosis* (3), arbowirusa EHDV

(70), *Leptospira interrogans* (50), *Escherichia coli* (18, 57, 71, 72), koronawirusów bydłych (65), parwowirusów świń (45), orbivirusów (64), wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit u świń TGEV (4), *Mycoplasma iowae* (75), *Mycoplasma hyopneumoniae* (2), *Babesia cabali* (47), *Babesia equi* (48), *Salmonella* spp. (49), *Treponema hyodysenteriae* (14). Sondy tu wymienione zostały wyselekcjonowane z bibliotek genomowych tych drobnoustrojów lub stanowiły je całe genomy znakowane fosforem radioaktywnym ^{32}P , biotyną lub digoksygeniną według metody „nick-tranlation” lub „random primer” i wykrywały od 20 pg do 10 ng kwasów nukleinowych.

Hybrydyzacja Southerna (Southern blot hybridisation)

Jest to hybrydyzacja DNA — DNA. Mieszaninę fragmentów DNA, otrzymaną np. po trawieniu enzymami restrykcyjnymi, rozdziela się w agarozie elektroforetycznej, denaturuje w żelu lugiem sodowym i przenosi na membranę wykorzystując siły ciśnienia kapilarnego. Należy wspomnieć, iż w toku elektroforezy fragmenty DNA zostają rozdzielone proporcjonalnie do ich długości, tzn. im krótsze łańcuchy, tym dłuższą drogę odbywają w żelu. Uzyskana replika na filtrze jest lustrzanym odbiciem ich ułożenia w żelu po zakończonej elektroforezie. W dalszych etapach umieszcza się filtr w roztworze z wyznakowaną, zdenaturowaną sondą DNA i po różnie długim czasie hybrydyzacji oraz wymyciu nadmiaru sondy wykrywa się powstałe hybrydy. W porównaniu do hybrydyzacji punktowej w metodzie Southerna uzyskuje się dodatkowe informacje o pozycji elektroforetycznej i długości odcinka DNA, w którym zlokalizowana jest szukana sekwencja. Hybrydyzacja wg Southerna jest cennym instrumentem analizy organizacji genomu w badaniach nad chorobami genetycznymi i produktami reakcji PCR (33, 58).

Wzór elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych (RFP-restriction fragment pattern) powstały po trawieniu DNA komórki, plazmidu lub zarazka, jak również jego analiza metodą Southern blot z użyciem odpowiedniej sondy, mogą służyć do identyfikacji i wykrywania polimorfizmu DNA drobnoustrojów (RFLP-restriction fragment length polymorphism). W wielu przypadkach są to cechy stałe, nie ulegające zmianie w trakcie pasażowania mikroorganizmu na podłożach sztucznych. RFP i RFLP zostały zastosowane między innymi w typowaniu *Pasteurella multocida* (34), *Leptospira interrogans* (76), *Campylobacter mucosalis* (37), *Treponema hyodysenteriae* (15), adenowirusa koni — EAV 1 (61), *Chlamydia psittaci* (53), wirusa choroby Aujeszkyego (12). Obydwie metody znajdują zastosowanie w dochodzeniu epizootycznym. Są one szczególnie cenne w sytuacji, gdy markery fenotypowe, jak np. struktura antygenowa, nie korelują z innymi cechami mikroorganizmu, objawami chorobowymi czy rozprzestrzenieniem geograficznym. Na ich podstawie można określać powiązania pomiędzy kolejnymi wybuchami choroby zakaźnej i dedukować o kierunku zmienności patogena. Analiza RFP wykazała, iż szczepy *Listeria monocytogenes*, należące do jednego typu serologicznego 4B, izolowane z jednej epidemii masowego zatrucia cechują się identycznym układem fragmentów restrykcyjnych. Natomiast różnią się one pod tym względem od szczepów odpowiedzialnych za inne zatrucia. Pomimo występującego zróżnicowania RFP, syntetyczny oligonukleotyd homologiczny do genu beta-hemolizyny hybrydyzował tylko do jednego fragmentu o długości 1 kb (68). Wykorzystując charaktery-

styczny wzór fragmentów restrykcyjnych wirusa EHV-1 po zastosowaniu restryktazy Bam H I, można łatwo rozróżnić go od genomu wirusa szczepionkowego Rac H na podstawie delekcji w obrębie powtórzonych odwróconych sekwencji. Homologiczna do tego fragmentu Bam H I sonda jednoznacznie wykrywa szybciej migrujące (mniejsze o 0,8 kb ze względu na delekcję) fragmenty szczepu Rac H. W ten sposób ustalono, że w przypadku ronień u kłaczy szczep szczepionkowy Rac H nie był z nimi związany w sposób przyczynowo-skutkowy (40).

Przynależność drobnoustroju do grup utworzonych na podstawie ich właściwości serologicznych i biochemicznych niekoniciecznie znajduje swe odzwierciedlenie w ich strukturze genetycznej. Wykazano np., że australijskie szczepy *Haemophilus paragallinarum*, reprezentowane przez wszystkie odmiany serologiczne i biotypy, nie różnią się zasadniczo wzorem fragmentów restrykcyjnych. Za to ich odpowiedniki fenotypowe, pochodzące spoza tego kontynentu są zdecydowanie różne w tym zakresie (6).

Hybrydyzacja według metody Northern (Northern blot)

Jest to hybrydyzacja RNA-DNA, wykonywana podobną techniką jak Southern blot z tym jednak, że frakcjonowanym kwasem nukleinowym jest RNA, a jego denaturację uzyskuje się innymi związkami chemicznymi np. formaldehydem. W stosunku do hybrydyzacji Southerna metoda Northern dostarcza dodatkowych informacji o występowaniu w badanych komórkach poszukiwanego rodzaju RNA. Innymi słowy dowiadujemy się o poziomie ekspresji poszukiwanego genu (33, 58).

Hybrydyzacja in situ (Hybridisation in situ)

Hybrydyzacja *in situ* wykonywana jest na mrożonych lub parafinowych skrawkach tkanek lub komórek immobilizowanych na szkiełkach mikroskopowych. Po zakończonej hybrydyzacji i uwidocznieniu sygnału sondy preparaty ocenia się w mikroskopie świetlnym. Obecnie jest to szeroko stosowana metoda w diagnostyce wirusologicznej i badaniach cytologicznych. Ze względu na fakt, iż hybrydyzacja przeprowadzana jest na materiale z zachowaną strukturą tkankową możliwe jest precyzyjne określenie występowania specyficznych sekwencji w obrębie tych struktur, dokonanie oceny procentu komórek zakażonych wirusem, określenie liczby wirusowych kwasów nukleinowych obecnych w jednej komórce i ich identyfikacja (33, 58). Metoda została zastosowana do wykrywania zakaźnego zapalenia oskrzeli kur (13), wirusa wścieklizny (28), wirusa pseudowścieklizny (11), wirusa maedi-visna (56), wirusa choroby granicznej owiec (19), BVDV (30), parwowirusa u psów (66).

W wielu przypadkach liczba kopii interesujących nas kwasów nukleinowych w próbkach materiału patologicznego przeznaczonego do celów diagnostycznych jest zbyt niska w stosunku do czułości metody zakładającej wykorzystanie tych sond. Jedynym sposobem pokonania tej trudności jest zwiększenie liczby cząsteczek wykrywanej sekwencji kwasu nukleinowego do poziomu określonego czułością hybrydyzacji. Systemy powielania (amplification) mogą zwiększyć liczbę cząsteczek sondy lub badanego DNA albo RNA przez wielokrotność 10^6 lub nawet większą umożliwiając identyfikację 1—10 cząsteczek zawartych w próbce przy zastosowaniu nieradioaktywnych systemów detekcyjnych. Z uwagi na brak podobnych metod służących do zwielokrotniania

cząstek białkowych, hybrydyzacja amplifikowanego kwasu nukleinowego jest obecnie najczulszym sposobem wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych. Z opracowanych 5 metod amplifikacji kwasów nukleinowych, PCR jest najczęściej stosowaną techniką (5).

PCR — Polymerase chain reaction

Istotą reakcji PCR jest synteza wybranego odcinka DNA (100—5000 par zasad) w obecności mieszaniny czterech nukleotydów, polimerazy DNA i krótkich syntetycznych oligonukleotydów o wielkości 20—30 nukleotydów zwanych starterami (primers). Długość i sekwencja jest ściśle określona pozycją starterów, które są komplementarne do końców amplifikowanego regionu. Jeden z oligonukleotydów jest komplementarny do nici kodującej (+), drugi odpowiednio do nici niekodującej (-). Związanie primera z nicią (+) zdenaturowanego DNA, po którym następuje jego wydłużanie przez polimerazę DNA z wykorzystaniem trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów jako substratów, powoduje syntezę nowej nici (-) zawierającej sekwencję DNA komplementarną do drugiego startera. Następnie reakcja zachodzi z udziałem drugiego startera, powstaje więc nowa nić (+). Uzyskana w ten sposób dwukrotnie większa liczba cząstek DNA poddawana jest kolejnym, identycznym cyklom denaturacji, wiązania i wydłużania starterów. W każdym następnym cyklu ilość kopii wybranej sekwencji DNA ulega teoretycznie podwojeniu, a nowo zsintetyzowane nici służą jako matryca do syntezy następnych. Wprawdzie faktyczna synteza jest nieco niższa, zapewnia ona jednak po 20—35 cyklach uzyskanie wystarczającej ilości cząstek DNA do celów diagnostycznych. Specyficzność reakcji PCR zdeterminowana jest głównie poprzez startery kierujące syntezą PCR i zależy w dużym stopniu od występowania sekwencji podobnych w próbce badanego DNA, jak również temperatury wiązania starterów. Pojawienie się niespecyficznych produktów reakcji spowodowane hybrydyzacją starterów do sekwencji podobnych można zmniejszyć do minimum poprzez podniesienie temperatury wiązania starterów. Ostateczne potwierdzenie specyficzności i charakterystyka amplifikowanego produktu określana jest jego wielkością w elektroforezie na żelu agarozowym oraz hybrydyzacją ze znakowaną sondą po przeniesieniu go metodą Southerna na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy. W początkowym okresie autorzy systemu PCR używali fragmentu Klenowa polimerazy DNA I z *E. coli*. Ze względu na termolabilność tego enzymu i konieczność uzupełniania go po każdej kolejnej denaturacji został on zastąpiony Taq polimerazą wyizolowaną z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*, którą dodaje się jednorazowo na początku reakcji. Wprowadzenie Taq polimerazy spowodowało wzrost specyficzności reakcji, umożliwiło syntezę dłuższych, ponad 3000 par zasad fragmentów DNA (Klenow-łańcuchy nie dłuższe niż 250 par zasad) i bezpośrednie ich sekwencjonowanie, zmniejszyło ilość koniecznego DNA potrzebnego do badań. Poprzedzenie PCR jednym cyklem reakcji z RNA-zależną odwrotną transkryptazą umożliwiło amplifikację cząstek RNA. Odwrotna transkryptaza dobudowuje pierwszą nić DNA komplementarną do matrycy RNA (cDNA), a następnie Taq polimeraza syntetyzuje drugą i następną nici. Wprowadzenie sekwencji rozpoznawanych przez T7 RNA polimerazę do startera użytego w reakcji PCR czyni możliwą transkrypcję RNA na matrycy DNA uzyskanego po ampli-

fikacji, jak również sekwencjonowanie otrzymanego w ten sposób jednoniciowego transkryptu bez konieczności klonowania amplifikowanego produktu PCR. Kolejną bardzo ważną zaletą tego systemu PCR jest możliwość wykorzystania do badań preparatów DNA złej jakości, silnie zdegradowanych i zanieczyszczonych materiałów komórkowych (20, 24, 36, 59, 77).

Już z pobieżnego przeglądu piśmiennictwa wynika, że niezwykła czułość, szybkość i prostota wykonania PCR stawia tę metodę w rzędzie najczęściej stosowanych technik biologii molekularnej w diagnostyce klinicznej. Obecnie można już niemal rutynowo wykrywać i różnicować tą metodą enterotoksyczne geny *E. coli* izolowane z przypadków biegunek (73). Ciężarne krowy, zakażone wirusem BVDV w okresie pierwszych 4 miesięcy ciąży rodzą pozornie zdrowe cielęta, u których pomimo wrodzonej infekcji nie stwierdza się specyficznych przeciwciał. Cielęta te, zwane immunotolerancyjnymi nosicielami wirusa BVDV, stanowią główne źródło siewstwa wirusa. Test immunoperoksydazowy lub immunofluorescencja nie są na tyle czułe, aby wykrywać zakażenia o bardzo małym stopniu nasilenia, szczególnie u sztuk posiadających przeciwciała matczyne. Metoda PCR w tym przypadku jest 10-krotnie bardziej czuła w porównaniu z izolacją wirusa (26, 27, 67). Amplifikacja kwasu nukleinowego i analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych produktu PCR jest jedną z części stosowanych kombinacji. Trawienie np. restryktazą Pvu II produktu PCR wirusa EHV powoduje powstanie fragmentów, których wzór elektroforetyczny umożliwia identyfikację i różnicowanie typów 1 i 4 herpeswirusa *rhinopneumonitis* (44). Przeniesienie produktów PCR po ich rozdziale elektroforetycznym na membranę wg metody Southern blot i hybrydyzacją do specyficznej sondy nie tylko jest potwierdzeniem specyficzności tych produktów, ale podnosi również czułość tego testu. Taka kombinacja została wykorzystana w wykrywaniu stanów latencji u świń po infekcji wirusem Aujeszkiego (39, 69). Podobną kombinację można zastosować w diagnostyce białaczki u bydła, gdy wyniki testów serologicznych wypadają słabo dodatnio lub wątpliwie (7). W tym przypadku przewaga PCR wynika nie tylko z faktu wyższej czułości metody, ale również możliwości wcześniejszego stwierdzenia stanu zakażenia. Wykrywaną bowiem cząsteczką jest DNA prowirusa, a nie przeciwciało będące pochodną stymulacji białka wirusowego. PCR wydaje się być atrakcyjną alternatywą dla tradycyjnych metod izolacji i identyfikacji wolno rosnących *Mycobacterium bovis* (16) i *Brucella abortus* (21). Jest to zdecydowanie szybsza procedura w porównaniu z tradycyjnym namnażaniem i identyfikacją tych zarazków, a także bardziej specyficzna od tuberkulinizacji, czy też odczynów serologicznych. Oprócz wymienionych przykładów w kontekście przydatności PCR w diagnostyce weterynaryjnej można jeszcze dodać doniesienia dotyczące bydłowego wirusa niedoboru immunologicznego — BIV (32), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (62), *Chlamydia psittaci* (51) i wirusa brodawczakowatości bydła (63). Należy sądzić, że w przyszłości metoda ta znajdzie szerokie, praktyczne zastosowanie w diagnostyce chorób zakaźnych, zwłaszcza tych, których wykrywanie jest pracochłonne i długotrwałe.

Piśmiennictwo

1. Aboytés-Torres R., Buening G. M.: Vet. Microbiol. 24, 391, 1990.
2. Ahrens P., Friis N. F.: Lett. Appl. Microbiol. 12, 249, 1991.
3. Ambrosio R. E., Harris Y., Huchzermeyer H. F. A. K.: Vet. Microbiol. 36, 37, 1991.
4. Benfield D. A., Jackwood D. J., Bae I., Saif L. J., Wesley R. D.: Arch. Virol. 116, 91, 1991.

5. Birkenmeyer L. G., Mushahwar I. K.: J. Virol. Methods, 35, 117, 1991.
6. Blackall P. J., Eaves L. E., Morrow C. J.: Vet. Microbiol. 27, 39, 1991.
7. Brandon R. B., Nafif H., Daniel R. C., Latin M. F.: Res. Vet. Sci. 53, 69, 1991.
8. Bridgen A., Reid W.: Res. Vet. Sci. 50, 38, 1991.
9. Brock K. V., Potgieter L. N. D.: Vet. Microbiol. 24, 297, 1990.
10. Brock K. V.: Arch. Virol. Suppl. 3, 199, 1991.
11. Brown T. M., Osorio F. A., Rock D. L.: Vet. Microbiol. 24, 273, 1990.
12. Christensen L. S., Sorensen K. J.: Vet. Microbiol. 26, 1, 1991.
13. Collisson E. W., Li J., Sneed L. W., Peters M. L., Wang L.: Vet. Microbiol. 24, 361, 1990.
14. Combs B. G., Hampson D. J.: Res. Vet. Sci. 50, 286, 1991.
15. Combs B. G., Hampson D. J., Harders S. J.: Vet. Microbiol. 31, 273, 1992.
16. Cousins D. V., Wilton S. D., Francis B. R.: Vet. Microbiol. 27, 187, 1991.
17. Crauen R. C., Confer A. W., Gentry M. J.: Vet. Microbiol. 27, 63, 1991.
18. Cryan B.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9, 229, 1990.
19. Entrican G., Flack A., Hopkins J., MacLean M., Nettleton P.: Arch. Virol. Suppl. 3, 175, 1991.
20. Erlich H. A., Gelfand D., Sinsky J. J.: Science, 252, 1643, 1991.
21. Fekete A., Bantle J. A., Halling S. M.: J. Vet. Diagn. Invest. 4, 79, 1992.
22. Gebhart C. J., Murtaugh M. P., Lin G. F., Ward G. E.: Vet. Microbiol. 24, 387, 1990.
23. Gillespie D.: Vet. Microbiol. 24, 217, 1990.
24. Gingeras T. R., Richman D. D., Kwok D. Y., Guatelli J. C.: Vet. Microbiol. 24, 235, 1990.
25. Goff W. L., Stiller D., Roeder R. A., Johnson L. W., Falk D., Gorham J. R., McGuire T. C.: Vet. Microbiol. 24, 381, 1990.
26. Hertig C., Pauli R., Zanoni R., Peterhans E.: Vet. Microbiol. 26, 65, 1991.
27. Hooft van Iddekinge B. J. L., van Wamel J. L. B., van Gennip H. G. P., Moormann R. J. M.: Vet. Microbiol. 30, 21, 1992.
28. Jackson A. C.: Molecular and Cellular Probes, 6, 131, 1992.
29. Jackwood D. J.: Vet. Microbiol. 24, 353, 1990.
30. Jensen J., Aiken J., Schultz R. D.: Can. J. Vet. Res. 54, 256, 1990.
31. Johnson M. E., Paul P. S., Gorziglia M., Rosenbusch R.: Vet. Microbiol. 24, 307, 1990.
32. Kashauchi F., Lin Z. Q., Atkinson B., Wood C.: J. Virol. Meth. 31, 197, 1991.
33. Keller G. H., Manak M. M.: DNA probes, Stokton Press, 1989.
34. Kim C. J., Nagaraja K. V.: Am. J. Vet. Res. 51, 207, 1990.
35. Kulski J. K., Norvat M.: Arch. Virol. 33, 3, 1985.
36. Lew A. M., Brandon R. B., Panaccio M., Morrow C. J.: Immunology, 5, 3, 1992.
37. Lin G., Gebhart C. J., Murtaugh M. P.: Vet. Microbiol. 26, 279, 1991.
38. Love D., N., Bailey G. D., Bastin D.: Vet. Microbiol. 31, 287, 1992.
39. Maes R. K., Beisel C. E., Spatz S. J., Thacker B. J.: Vet. Microbiol. 24, 381, 1990.
40. Meyer H., Hubert P., Schwend C., Eichhorn W.: Vet. Microbiol. 30, 13, 1992.
41. Norvat M., Bingham R. W.: Arch. Virol. 97, 151, 1987.
42. Oberst R. D., Hall S. M., Jasso R. A., Arndt T., Wen L.: Am. J. Vet. Res. 51, 1760, 1990.
43. Oberst R. D., Hall S. M., Schoneweis D. A.: Vet. Microbiol. 24, 127, 1990.
44. O'Keefe J. S., Murray A., Wilks C. R., Moriarty K. M.: Res. Vet. Sci. 50, 349, 1991.
45. Oraveerakul K., Choi C. S., Molitar T. W.: J. of Vet. Diag. Invest. 3, 85, 1990.
46. Paul P. S.: Vet. Microbiol. 24, 209, 1990.
47. Posnett E. S., Ambrosio R. E.: Parasitology, 102, 357, 1991.
48. Posnett E. E., Fehrsen J., Waal D. T., Ambrosio R. E.: Vet. Parasitology, 39, 19, 1991.
49. Pumfrey L., Nelson C. E.: Poult. Sci. 70, 780, 1991.
50. Ramadas P., Marshall R. B.: Res. Vet. Sci. 50, 194, 1990.
51. Rasmussen S., Timms P.: FEMS Microbiol. Lett. 77, 169, 1991.
52. Ridpath J. F., Bolin S. R.: Molecular and Cellular Probes, 5, 291, 1991.
53. Rodolakis A., Souriau A.: Vet. Microbiol. 31, 263, 1992.
54. Rosen B. I., Saif L. J., Jackwood D. J., Gorziglia M.: Vet. Microbiol. 24, 327, 1990.
55. Rosen B. I., Saif L. J., Jackwood D. J., Gorziglia M.: J. Clin. Microbiol. 28, 528, 1990.
56. Roy D. J., Watt N. J., Jugman T., Houwers D. J., Sargan D. R., McConnell I.: J. Virol. Meth. 36, 1, 1992.
57. Samadpour M., Listen J., Ongert H. E., Tarr P.: Appl. Environ. Microbiol. 56, 1212, 1990.
58. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular cloning, Cold Spring Harbour, NY, 1989.
59. Schadendorf D., Czarnetzki B. M.: J. Invest. Dermatol. 97, 751, 1991.
60. Schelp C., Dahle J., Krietsch T., Kaaden O. R., Liess B.: Arch. Virol. Suppl. 3, 369, 1991.
61. Sheppard M., Drysdale S. M., Studdert M. J.: Vet. Microbiol. 31, 343, 1992.
62. Sirois M., Lemire E. G., Levesque R. C.: J. of Clin. Microbiol. 29, 1183, 1991.
63. Teifke J. P., Weiss E.: Berl. Munch. tierarztl. Wsch. 104, 185, 1991.
64. Venter E. H., Viljen G. J., Nel L. H., Huismans H., Dijk A. A.: J. Virol. Meth. 32, 171, 1991.
65. Verbeek A., Dea S., Tijssen P.: Molecular and Cellular Probes. 4, 107, 1990.
66. Waldvogel A. S., Hassam S., Weilenmann R., Tratschin J. D., Sierl G., Hanichen T., Briner J., Pospischil A.: J. Vet. Med. Small Anim. Clin. 66, 353, 1991.
67. Ward P., Misra V.: Am. J. Vet. Res. 52, 1231, 1991.
68. Wesley I. V., Wesley R. D., Heisick J., Harrell F., Wagner D.: Vet. Microbiol. 24, 341, 1990.
69. Wheeler J. G., Osorio F. A.: Am. J. Vet. Res. 52, 1799, 1991.
70. Wilson W. C., Fukusho A., Roy P.: Am. J. Vet. Res. 51, 355, 1990.
71. Woodward M. J., Kearsley R., Wray C., Roeder P. L.: Vet. Microbiol. 22, 377, 1990.
72. Woodward M. J., Wray C.: Vet. Microbiol. 24, 15, 1990.
73. Woodward M. J., Carroll P. J., Wray C.: Vet. Microbiol. 31, 251, 1992.
74. Zakrzewska-Czerwińska J., Mordarski M.: Post. Hig. 45, 157, 1991.
75. Zhao S., Yamamoto R.: J. of Vet. Diag. Invest. 3, 334, 1990.
76. Zuerner R. L., Bolin C. A.: Vet. Microbiol. 24, 355, 1990.
77. Xu L. Z., Larzul D.: Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 14, 239, 1991.

Adres autora: dr Stanisław Winiarczyk, ul. Radości 1/48, 20-530 Lublin

CUTLIP R. C., LEHMKHUL H. D., SACKS J. M., WEAVER A. I.: Częstość występowania przeciwciał dla wirusa zapalenia stawów-zapalenia mózgu kóz u kóz w USA. (Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States). J. Am. Vet. Med. Ass. 200, 802—805, 1992 (6)

Przebadano surowice kóz ze 196 stad z terenu 28 stanów na obecność swoistych przeciwciał dla wirusa zapalenia stawów — zapalenia mózgu kóz (CAE). Spośród 3790 zwierząt badanych aż 1175 (31%) reagowało dodatnio w odczynie precipitacji dyfuzyjnej w żelu. Spośród 196 stad badanych — w każdym z 143 (73%) przynajmniej jedno zwierzę reagowało dodatnio z antygenem CAE. Większy odsetek kóz reagujących pozytywnie występował w stadach zamieszczonych w stanch uytuowanych nad Pacyfikiem i w północnej części USA. Liczba zwierząt reagujących dodatnio wzrastała u kóz do wieku 3 lat, była najwyższa w małych stadach, a najniższa wśród kóz rasy angora.

G.

DAVIDSON A. P., FELDMAN E. C., NELSON R. W.: Leczenie ropomacicza u kota prostaglandyną F₂ alfa: opis 21 przypadków. (1982—1990). (Treatment of pyometra in cats using prostaglandin F₂ alpha: 21 cases (1982—1990)). J. Am. Vet. Med. Ass. 200, 825—828, 1992 (6)

W leczeniu ropomacicza u kotek, u których szyjka maciczna jest otwarta zastosowano prostaglandynę F₂ alfa w dawce 0,1 lub 0,25 mg/kg masy ciała przez okres 3 lub 5 dni. Po zastosowaniu prostaglandyny wystąpiły następujące reakcje uboczne: wzmoczone ślinienie, biegunka, nudności, brak trzymania moczu, lordoza po 30 sekundach po iniekcji prostaglandyny i utrzymywały się przez 60 minut. U wszystkich 21 leczonych kocię wystąpiła poprawa klinicznego stanu zdrowia. Tylko u jednej kotki powtórzone leczenie po okresie miesiąca. U 95% leczonych kotek powróciła ruja i 82% (17 sztuk) po zapłodnieniu wydało zdrowe potomstwo.

G.

niczno stanu zdrowia. Tylko u jednej kotki powtórzone leczenie po okresie miesiąca. U 95% leczonych kotek powróciła ruja i 82% (17 sztuk) po zapłodnieniu wydało zdrowe potomstwo.

TURK J., FALES W., MILLER M., PACE L., FISCHER J., JOHANSON G., KREEGER J., FURNQUIST S., PITTMAN L., ROTTINGHAUS A., GOSSER H.: Zakażenie jelitowe Clostridium perfringens związane z parwowirusą jelit u psów: opis 74 przypadków. (1987—1990). (Intestinal Clostridium perfringens infection in dogs with intestinal parvovirus: 74 cases (1987—1990)). J. Am. Vet. Med. Ass. 200, 991—994, 1992 (7)

Zakażenie parwowirusowe potwierdzono odczynem immunofluorescencji lub izolacją wirusa. Z wycinków jelit cienkich 1100 psów poddanych eutanazji w okresie lipiec 1987 — 31 grudzień 1990 Clostridium perfringens C wyosobniono od 74 (69%) ze 108 psów zakażonych parwowirusem. Bakterie stwierdzano w preparatach histologicznych jelit cienkich wykazujących ogniskową lub rozlaną martwicę powierzchniowej warstwy kosmków jelitowych. Zmiany o takim charakterze występowały u 93% psów, u których występowało zakażenie wywołane przez parwowirus i C. perfringens C. Izolacja C. perfringens z jelita czczego psów z biegunką na tle zakażenia parwowirusowego wskazuje na namnożenie klostridium w tym odcinku jelita. Martwica powierzchniowej warstwy komórek nabłonka stwarza dogodnie miejsce do namnożenia beztlenowca. W odcinku uległym martwicy następuje zaburzenie wytwarzanie IgA, co powoduje obniżenie odporności miejscowej predysponując do namnażania bakterii.

G.