

33. Morisse J. P., Picualt J. P., Boilletot E., Morin M.: *Revue Med. vet.* 141, 463, 1990.
34. Nianxing D.: *Dt. tierärztl. Wschr.* 97, 105, 1990.
35. Niedźwiadek S.: *Materiały Informacyjne. OBR PL „Las” Konstancin-Jeziorna* 2, 1, 1994.
36. Okerman L., Devriese L. A., Gevaert D., Uyttebroek E., Haesebrouck F.: *Lab. Anim.* 24, 341, 1990.
37. Pandey V. S.: *Br. vet. J.* 45, 54, 1989.
38. Połozowski A.: *Kokcydioza królików i jej zapobieganie. Praca dokt. AR Wrocław* 1989.
39. Schlüter H., Schirmer H., Böhme R.: *Mh. Vet.-Med.* 45, 286, 1990.
40. Sinovics G.: *Riv. Conigliicoltura* 29, 28, 1992.
41. Sołtysiak Z., Michalski Z.: *Medycyna Wet.* 45, 521, 1989.
42. Steffen J.: *Medycyna Wet.* 27, 65, 1971.
43. Strager D. S., Sell S., Leibowitz J. L.: *Am. J. Path.* 120, 170, 1985.
44. Suckow M. A., Chrisp C. E., Faged N. T.: *Lab. Anim. Sci* 41, 151, 1991.
45. Wani G. A., Wani S. A., Bacch A. S., Sudhan N. A.: *J. Vet. Parasit.* 3, 76, 1989.
46. Wawrzkiwicz J., Majer-Dziedzic B.: *Medycyna Wet.* 48, 269, 1992.
47. Williams C. K., Moore R. J., Robbins S. J.: *Aust. J. Zool.* 38, 697, 1990.
48. Williams C. K., Moore R. J., Sobey W. R., Conolly D.: *Aust. J. Zool.* 39, 307, 1991.
49. Xu Z. J., Chen W. X.: *Vet. Res. Commun.* 13, 205, 1989.
50. Xu F. N., Shen W. P., Liu S. J.: *Anim. Husbandry Vet. Med.* 17, 153, 1985.
51. Xu F. N., Shen W. P., Xi Q. K. Y.: *Anim. Husbandry Vet. Med.* 17, 244, 1985.
52. Ziomko J., Cencek T., Kuczyńska E.: *Medycyna Wet.* 46, 1982, 1990.

Adres autora: prof. dr hab. Jan Zwierchowski, ul. Braci Gierymskich 19, 51-636 Wrocław

ZYGMUNT PEJSAK, TOMASZ STADEJEK, ANDRZEJ LIPOWSKI,
IWONA MARKOWSKA-DANIEL, KAZIMIERZ TARASIUK

artykuł przeglądowy

Zastosowanie metod biologii molekularnej w diagnostyce weterynaryjnej*)

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

Nauki biologiczne zostały w ostatnim dziesięcioleciu zdominowane badaniami i osiągnięciami z zakresu biologii molekularnej. Ta gałąź nauki zrewolucjonizowała podejście do rozwiązywania wielu niezbadanych dotychczas zagadnień, otworzyła nowe perspektywy w zakresie poznawania i kierowania procesami biologicznymi oraz stała się, dla wielu badaczy, narzędziem w pracach o różnorodnej tematyce w tym w diagnostyce weterynaryjnej.

Spośród wielu definicji pojęcia biologia molekularna trafna wydaje się ta, która mówi, że jest to dziedzina nauki, która łącząc idee i metody wielu dyscyplin przyrodniczych bada elementarne procesy reakcji biologicznych na poziomie molekularnym w celu ustalenia ogólnego planu, do którego można by było sprowadzić wszystkie makroskopowe przemiany życiowe (9). Mówiąc o dyscyplinach naukowych tworzących biologię molekularną warto zacytować znaną anegdotę związaną z Francisem Crickiem, który na pytanie urzędu podatkowego, co należy rozumieć pod pojęciem „biologii molekularnej” wyjaśnił, że jest to mieszanina genetyki, biochemii, biofizyki i krystalografii.

Do lat sześćdziesiątych naszego stulecia biologia molekularna święciła wielkie triumfy i rozwiązała kilka najbardziej podstawowych problemów biologii. Zaliczyć do nich należy przede wszystkim odkrycie

roli DNA w kodowaniu informacji genetycznych organizmów, a następnie odczytanie kodu DNA i wykazanie jego właściwości.

Kolejnymi etapami wyznaczającymi postęp w rozwoju biologii molekularnej były odkrycia: Beadla – genetyka z Instytutu Technologicznego w Pasadena oraz Tatum – biochemika z Instytutu Rockefellera, którzy w 1940 r. dowiedli, że wszystkie reakcje biochemiczne są uwarunkowane genetycznie (z każdym enzymem koresponduje odpowiedni gen), Averyego i wsp., którzy w 1944 r., udowodnili, że kwas nukleinowy jest nośnikiem informacji genetycznej; Watsona (biochemik) i Cricka (genetyk), autorów modelu budowy przestrzennej DNA (podwójna spirala), badaczy francuskich – Jacoba i Manoda, odkrywców mRNA oraz twórców mechanizmu regulacji czynności genów (1960). Większość wymienionych, została wyróżniona nagrodami Nobla (8).

Ogromny postęp w zakresie biologii molekularnej odnotowano również w ostatnim dwudziestolecu. Do odkryć o szczególnie ważnym, praktycznym znaczeniu zaliczyć należy wyniki badań Kohlera i Milsteina, którzy w 1975 r. po raz pierwszy dokonali połączenia limfocytu, pochodzącego ze śledziony myszy, uczulonego erytrocytami barana, z komórką linii szpiczaka otrzymując hybrydę produkującą przeciwciała monoklonalne. Zaskakująco wielostronne zastosowania znalazł genialny pomysł Mullisa (1985) dotyczący możliwości powielania DNA metodą polimerazacji łańcuchowej – polymerase chain reaction,

*) Referat wygłoszony 8.06.1995 r. na Sesji Naukowej związanej z obchodami 50-lecia Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

PCR. Jednym z bardzo spektakularnych efektów zastosowań technik biologii molekularnej są opublikowane w 1994 r. wyniki prac Dijona i wsp. (1), którzy przedstawili kompletną sekwencję DNA XI chromosomu drożdży.

Aktualnie wyzwaniem dla biologów molekularnych jest analiza ogromnej ilości danych uzyskiwanych w trakcie sekwencjonowania kwasów nukleinowych różnych organizmów. Wskazując na ten problem, warto zwrócić uwagę na realizowany już, pod kierunkiem J. Watsona, temat badawczy „genom człowieka”. Podstawowym efektem tego projektu będzie być może poznanie molekularnych podstaw genetyki człowieka (13). Bez wątpliwości biologia molekularna jest narzędziem, które w niedalekiej przyszłości rzuci nowe światło na zagadnienie ewolucji organizmów żywych.

Techniki biologii molekularnej znajdują zastosowanie, praktycznie we wszystkich gałęziach nauki, w tym coraz częściej w naukach weterynaryjnych.

Celem niniejszego referatu jest przedstawienie w sposób syntetyczny i maksymalnie uproszczony możliwości i efektów wykorzystania technik biologii molekularnej w zwalczaniu wybranych chorób wirusowych i bakteryjnych zwierząt. Prezentowane metody badawcze są stosowane i rozwijane, w różnych zakładach Państwowego Instytutu Weterynaryjnego (PIWet) w Puławach.

W Zakładzie Chorób Świń prowadzone są badania z wykorzystaniem następujących technik biologii molekularnej:

1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE)
2. Produkcja przeciwciał monoklonalnych (MAb)
3. Łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR)
4. Analiza restrykcyjna genomu wirusowego (restriction fragment length pattern – RFLP) i genomu bakteryjnego (rRNA – ribotyping)
5. Sekwencjonowanie fragmentu genomu wirusa.

Metoda elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE) umożliwia rozdział mieszaniny białek lub kwasów nukleinowych na podstawie ich masy lub ładunku elektrycznego. Droga migracji białek w żelu, w polu elektrycznym, jest odwrotnie proporcjonalna do ich wielkości. Oznacza to, że droga białek o dużej masie jest krótka natomiast wydłuża się wraz ze zmniejszaniem się cząsteczki białka. Użytkany w trakcie rozdziału profil elektroforetyczny można przenieść na membranę nitrocelulozową lub nylonową. To z kolei umożliwia analizę poszczególnych frakcji białkowych przy pomocy przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych (western blot). Tego rodzaju procedura wykorzystywana jest m.in. do charakterystyki właściwości immunogennych bakterii z rodzaju *Actinobacillus pleuropneumoniae* (14) jak i klasyfikacji rotawirusów (17). To ostatnie zastosowanie elektroforezy możliwe jest dzięki unikalnemu dwuniciowemu genomowi RNA rotawirusów, który tworzy w żelu PAGE charakterystyczny

uporządkowany szereg 11 segmentów. Szereg ten jest niezmienny i powtarzalny dla poszczególnych szczepów rotawirusów. Metoda ta wykorzystywana jest jako test diagnostyczny dla wykazania obecności rotawirusów w kale prosiąt; może również stanowić podstawę do klasyfikacji tych drobnoustrojów (16).

Szczegółowe zasady produkcji MAbs przedstawiono w pracach własnych opublikowanych na łamach Medycyny Weterynaryjnej (5, 6). W ogromnym skrócie można powiedzieć, że producentem MAbs jest hybryda powstała w wyniku połączenia się komórek nowotworowych (myeloma) utrzymujących stałą i nieograniczoną zdolność do podziałów z uczulonym na określony antygen limfocytom B, wywodzącym się ze śledziony czyli splenocytom. Uczulony limfocyt jest partnerem wnoszącym do hybrydy komórkowej informację genetyczną niezbędną do wytwarzania przeciwciał o określonej swoistości oddziaływania z epitopem użytym w procesie immunizacji. Drugim partnerem fuzji jest komórka nowotworowa, nie wytwarzająca własnych immunoglobulin. W wyniku fuzji powstaje komórka – hybryda, która zawiera syngarion, czyli podwójny materiał genetyczny i utrzymuje nowotworową zdolność do podziałów i właściwość wytwarzania przeciwciał o określonej swoistości. Hybrydomy produkujące przeciwciała poddaje się procesowi klonowania, którego celem jest uzyskanie rosnącego klonu – kolonii, wywodzącej się z pojedynczej komórki hybrydoma, u której zdolność wytwarzania MAbs reagujących tylko z jednym rodzajem epitopu jest cechą stałą (7).

Przedmiotem naszego szczególnego zainteresowania jest wykorzystanie MAbs do diagnostyki pomoru klasycznego świń (CSF). Stosowane od wielu lat metody wykrywania zakażeń wirusem CSF (CSFV) okazywały się niekiedy zawodne z powodu znacznego pokrewieństwa antygenowego między CSFV a należącym do tego samego rodzaju *Pestivirus* – wirusem wirusowej biegunki bydła – BVDV (18). Precyzyjne różnicowanie wymienionych drobnoustrojów możliwe jest jedynie poprzez stosowanie MAbs skierowanych przeciw specyficznym epitopom wirusa. W badaniach własnych z 83 uzyskanych klonów komórek ocenie swoistości poddano zestaw 34 MAbs. Dziewięć spośród charakteryzowanych serologicznie MAbs reagowało z referencyjnym szczepem CSFV – Alfort-187 oraz ze wszystkimi terenowymi izolatami CSFV. Przeciwciała te nie tworzyły kompleksów immunologicznych z referencyjnym wirusem BVDV – szczep NADL-158. W związku z tym uznano je za swoiste dla CSFV. Dwa spośród tych przeciwciał, reagujące ze szczepem Alfort w najwyższych mianach, wykorzystano do immunoenzymatycznej (ELISA), serologicznej diagnostyki CSF, w odmianie trapping blocking. Pozostałe przeciwciała z hodowli komórek hybrydoma reagowały zarówno ze szczepami wirusa CSF jak i BVDV. Uznano je zatem jako swoiste dla rodzaju *Pestivirus*.

Polimeryzacja łańcuchowa (PCR) DNA, jest aktualnie najbardziej selektywną i czułą metodą wykrywania kwasów nukleinowych. Rozpoczynając od pojedynczej cząsteczki DNA można przy pomocy PCR w ciągu kilku godzin uzyskać miliardy jej wiernych kopii. Mechanizm PCR polega na enzymatycznym powielaniu fragmentu DNA ograniczonego przez dwa oligonukleotydowe startery. Komplementarnie wiążą się one (hybrydują) z odpowiednimi fragmentami pojedynczej nici DNA (target sequence) co umożliwia wydłużanie (elongacja) startera przez polimerazę, komplementarnie do sekwencji matrycy. Cykliczna, termiczna denaturacja podwójnej nici DNA, hybrydacja starterów do matrycy oraz ich wydłużanie przez polimerazę DNA daje w rezultacie amplifikację segmentu DNA zdefiniowanego przez końce 5' starterów. Ponieważ produkt wydłużenia każdego startera służy jako matryca w kolejnym cyklu, każdy cykl podwaja ilość fragmentów DNA zsintetyzowanych w poprzednim.

Najprostszym sposobem identyfikacji produktu PCR jest jego elektroforeza w żelu agarozowym i barwienie bromkiem etydyny. Innymi bardziej specyficznymi sposobami identyfikacji jest przeprowadzenie analizy restrykcyjnej, hybrydacja z sondą molekularną. W Zakładzie Chorób Świń PIWet, PCR wykorzystuje się do diagnostyki takich wirusowych chorób trzody chlewnej jak CSF, choroba Aujeszkiego (chA) i zakażenia rotawirusowe prosiąt (3, 4, 12).

W diagnostyce CSF do badań używa się materiał biologiczny (migdałki, nerki lub śledzionę) uzyskany od świń podejrzanych o zakażenie. W związku z tym, że pestiwirusy posiadają genom zbudowany z RNA, konieczne jest poprzedzenie reakcji PCR reakcją odwrotnej transkrypcji (Reverse Transcription – RT) czyli przepisanie informacji genetycznej z RNA na cDNA.

Jak wskazują na to dotychczasowe rezultaty stosowania omawianej techniki w diagnostyce CSF, metoda ta jest bardziej efektywna oraz zdecydowanie szybsza od dotychczas wykorzystywanych. Niejednokrotnie materiał biologiczny nie nadający się do izolacji wirusa lub immunofluorescencji (toksyczny, zbyt późno dostarczony, niewłaściwie pobrany) okazuje się przydatny do amplifikacji. W tym przypadku rozpoznanie może być postawione nawet wtedy, gdy w badanej próbce materiału biologicznego znajduje się tylko kilka cząstek wirusa, lub nawet nie ma go wcale, natomiast obecne są fragmenty jego kwasu nukleinowego.

Śród metod biologii molekularnej, określających właściwości genomu bakterii i wirusów szczególnie przydatna jest analiza fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi RFLP (14, 15). Chromosom bakteryjny jak i genom wirusowy zbudowane są z nici kwasów nukleinowych, w obrębie których można wyróżnić – wysoce stabilne

(konserwatywne), zmienne i hyperzmienne sekwencje nukleotydów. Presja selekcyjna doprowadza w niektórych przypadkach do reorganizacji i mutacji ujawniających się najczęściej w regionach zmiennych. Będąc rezultatem scharakteryzowanych zjawisk zmiany w sekwencjach nukleotydów, wpływają na obraz wzoru restrykcyjnego genomu badanych drobnoustrojów. Zmiany uwidocznć można, wykorzystując do tego celu właściwości enzymów restrykcyjnych. Odpowiednio dobrana restryktaza dzieli genom badanego drobnoustroju na ściśle określoną liczbę fragmentów. W zależności od użytego enzymu fragmenty kwasu nukleinowego mogą być większe (enzymy rzadko tnące) lub mniejsze (enzymy często tnące). Po rozdziale elektroforetycznym i zabarwieniu żelu bromkiem etydyny uzyskuje się mniej lub bardziej charakterystyczne elektroforegramy (układ prążków w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym). Warto nadmienić, że w przypadku dużego genomu bakteryjnego, dla właściwej analizy elektroforegramu konieczne jest zastosowanie elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (elektroforeza pulsowa). Ten typ elektroforezy umożliwia rozdział dużych (od 50 kb do 10 000 kb) fragmentów DNA. Na podstawie liczby i rozmieszczenia prążków elektroforetycznych (wzór restrykcyjny – restriction fragment pattern – RFP) można dokonać charakterystyki badanych drobnoustrojów. W zależności od rodzaju bakterii, można przy pomocy omawianej techniki, wyróżnić od jednego do kilkunastu wzorów elektroforetycznych.

Specyficzność wybranych fragmentów genomu ustalić można poprzez wykorzystanie sondy molekularnej, którą stanowi znakowany, określony fragment nici kwasu nukleinowego. Połączenie sondy możliwe jest tylko z komplementarnym fragmentem nici DNA. Umożliwia to wykrycie i identyfikację określonej sekwencji nukleotydów w obrębie analizowanych fragmentów restrykcyjnych (10). Uzyskane w ten sposób informacje mogą być wykorzystywane m.in. w molekularnych badaniach epidemiologicznych (15).

W przypadku blisko spokrewnionych bakterii celowe jest użycie sond komplementarnych do sekwencji genów kodujących rRNA. W związku z tym, że geny rRNA okazały się bardzo konserwatywne w czasie ewolucji i są obecne w komórkach wszystkich bakterii, reagują one z uniwersalną sondą uzyskaną z rRNA *Escherichia coli*. Geny kodujące rRNA obecne są w chromosomie bakteryjnym tylko w kilku lub kilkunastu kopiach. Z tego powodu hybrydacja z sondą przygotowaną na bazie rRNA uwidacznia te fragmenty chromosomu, które zawierają sekwencje genów rRNA. Uzyskany w tym przypadku wzór elektroforetyczny składa się co najwyżej z kilku do kilkunastu prążków, co umożliwia łatwą i wystarczająco dokładną charakterystykę szczepu. Typowanie tym sposobem blisko spokrewnionych bakterii określa się mianem ribotyping (14).

Przedstawioną w ogromnym skrócie technikę badawczą (RFLP) wykorzystuje się w Zakładzie Chorób Świń PIWet w epidemiologii molekularnej zakażeń świń bakteriami z rodzaju *Actinobacillus pleuropneumonie* (App).

Przy pomocy elektroforezy pulsowej przeprowadzono m.in. analizę genetyczną 13 szczepów referencyjnych App oraz wybranych izolatów terenowych App należących do serotypu 9, pochodzących z Polski, Szwajcarii, Francji, Republiki Czeskiej i Australii. Stwierdzono, że poszczególne szczepy referencyjne App posiadają różny, specyficzny dla siebie wzór restrykcyjny. Analiza szczepów terenowych wykazała, że wszystkie izolaty serotypu 9, wyisobnione w kraju mają podobny profil elektroforetyczny. Dla przykładu elektroforegram szczepu australijskiego (serotyp 9) różnił się w sposób istotny od europejskiego szczepu referencyjnego serotyp 9, jak również szczepów polskich (14).

Przy pomocy metody ribotyping w grupie szczepów referencyjnych stwierdzono 8 wzorów genów kodujących rRNA. Analiza szczepów terenowych App, należących do serotypu 9 wykazała, że wszystkie polskie szczepy, niezależnie od miejsca izolacji, mają ten sam model rybosomowego DNA, różny od wzoru rybosomowego DNA izolatów czeskich, francuskich i szwajcarskich. Uzyskane dane mają duże praktyczne znaczenie epidemiologiczne.

Zastosowanie analizy restrykcyjnej z wykorzystaniem hybrydyzacji molekularnej w odniesieniu do 17 krajowych izolatów wirusa choroby Aujeszkego (ADV) pozwoliło m.in. na wykazanie, że wszystkie badane szczepy terenowe ADV należą do typu I *Herpesvirus suis* 1 (w Europie zachodniej dominuje typ II). Wśród badanych szczepów, wyizolowanych od świń i w jednym przypadku od lisa, znajdują się rekombinanty ze szczepionkowym, atenuowanym wirusem ADV – szczepem TK900, od lat stosowanym w Polsce w zwalczaniu chA. Wyizolowane w dwu innych przypadkach od lisów hodowlanych i od psa szczepy ADV są identyczne z uzyskanymi od świń, co wskazuje, że do zakażenia zwierząt mięsożernych doszło wskutek skarmiania mięsa pochodzącego od zainfekowanych świń (2, 3, 4).

Sekwencjonowanie DNA polega na precyzyjnym określeniu kolejności nukleotydów w analizowanym fragmencie DNA. Metoda ta pozwala na wykrycie mutacji punktowych genu (zmiana jednego nukleotydu). Mutacja jednego nukleotydu może w sposób istotny zmienić właściwości białka syntetyzowanego na podstawie informacji zawartych w genie. Określenie sekwencji nukleotydów w analizowanym fragmencie DNA daje zatem możliwość identyfikacji motywów nukleotydowych charakterystycznych dla danego rodzaju, serotypu lub szczepu wirusa. Porównanie sekwencji nukleotydowych jednego lub więcej fragmentów genomu izolatów terenowych danego wirusa pozwala na określenie ich pokre-

wieństwa, pochodzenia lub potencjalnych właściwości biologicznych np. zjadliwości, atenuacji czy immunogenności.

Proces określenia sekwencji nukleotydowej DNA składa się z trzech etapów: 1) syntezy fragmentów DNA komplementarnych do sekwencjonowanej nici DNA, 2) rozdziału uzyskanych fragmentów DNA w żelu poliakrylamidowym, 3) identyfikacji nukleotydów na końcach wszystkich fragmentów. Aktualnie, sekwencjonowanie DNA prowadzi się zwykle z wykorzystaniem metody Sangera (12). W metodzie tej fragmenty DNA są syntetyzowane przez polimerazę DNA, która dobudowuje nukleotydy do oligonukleotydowego startera, komplementarnie do matrycy DNA. Sekwencja startera jest precyzyjnie określona, w związku z czym wiąże się on z matrycą w ściśle określonym miejscu, skąd rozpoczyna się synteza komplementarnych nici. Synteza prowadzona jest w czterech probówkach, z których każda zawiera cztery różne deoksynukleotydy (dNTP) oraz jeden z czterech dwudeoksynukleotydów (ddNTP). Analogi te mają strukturę chemiczną zmodyfikowaną w sposób uniemożliwiający dalsze wydłużanie syntetyzowanego łańcucha DNA przez polimerazę DNA. Ponieważ synteza rozpoczyna się od wspólnego startera, użycie właściwych proporcji dNTP i ddNTP umożliwia uzyskanie fragmentów DNA o jednakowych końcach 5', różniących się długością o jeden nukleotyd. Produkty syntezy prowadzonej z użyciem danego ddNTP są zakończone tym analogiem. Obserwacji, w wyniku rozdziału dokonuje się dzięki użyciu radioizotopu. Po przyłożeniu do żelu poliakrylamidowego błony fotograficznej dochodzi do jej naświetlenia w miejscach radioaktywnych prążków DNA. Ponieważ reakcje prowadzone są z użyciem czterech ddNTP, w czterech probówkach, dla oznaczenia sekwencji każdej pojedynczej nici DNA, w żelu rozdzielane są oddzielnie produkty każdej z tych reakcji. Po autoradiografii i wywołaniu błony fotograficznej dla jednej nici DNA otrzymuje się cztery ścieżki prążków. Określenie sekwencji nukleotydów we fragmencie DNA wykonuje się określając kolejność prążków we wszystkich ścieżkach (11).

Sekwencjonowanie DNA, wykorzystuje się w Zakładzie Chorób Świń do badań epizootologicznych nad CSFV, prace te prowadzone są wspólnie z National Veterinary Services Laboratory w Ames, Iowa, USA. Do badań wykorzystano dotychczas 29 izolatów CSFV z Europy, Azji i Ameryki. Matrycę do sekwencjonowania uzyskiwano przez amplifikację fragmentu z końca 5' badanych szczepów. Analizę fragmentów prowadzono automatycznie z wykorzystaniem systemu nieradioaktywnego znakowania fragmentów. Dzięki zastosowaniu czterech różnych barwników fluorescencyjnych reakcję przeprowadzano w jednej probówce. Również rozdział produktu reakcji wykonywano na jednej ścieżce. Kolejność nukleotydów w żelu odczytywano i wprowadzano

do pamięci komputera przy pomocy laserowego skanera. Analiza uzyskanych sekwencji pozwoliła na oznaczenie specyficznych motywów nukleotydowych charakterystycznych dla geograficznych grup wirusa.

Porównanie sekwencji 29 badanych szczepów umożliwiło wyodrębnienie podgrup CSFV, charakterystycznych dla poszczególnych regionów (kontynentów) geograficznych (Ameryka, Azja, Europa). Na podstawie analizy ocenianego fragmentu wykazano również, że wszystkie szczepy wirusa pomoru należą do jednego genotypu.

Przedstawione wyniki zastosowań metod biologii molekularnej mają bardzo duże znaczenie poznawcze. Są one równocześnie istotne z punktu widzenia diagnostyki i epidemiologii weterynaryjnej. Nie ma wątpliwości, że z każdym rokiem praktyczna wartość scharakteryzowanych metod będzie coraz większa, podobnie jak oczywistym jest, że przedstawione techniki muszą być doskonałe.

Na zakończenie należy podkreślić, że osiągnięcie przedstawionych wyników było możliwe dzięki współpracy Zakładu Chorób Świń z innymi zakładami PIWet, a także z uznanymi placówkami naukowymi w kraju i zagranicą. Wśród nich wymienić należy: Pracownię Biochemii Wirusów Uniwersytetu Gdańskiego, Katedrę Epizootologii Wydziału Weterynaryjnego w Lublinie, National Animal Disease Center

i National Veterinary Services Laboratory w USA, Tierärztliche Hochschule w Hannoverze oraz z Institute for Animal Science and Health w Holandii.

Piśmiennictwo

1. Dujon B.: Nature, 369, 371, 1994.
2. Christensen L. S., Medveczky I., Strandgaard B., Pejsak Z.: Arch. Virol. 124, 225, 1992.
3. Kochan G., Lipowski A., Szewczyk B., Pejsak Z.: Proc. IPVS Congress, The Hague, 1992, s. 87.
4. Lipowski A., Kochan G., Pejsak Z., Szewczyk B.: Medycyna Wet. 50, 14, 1994.
5. Markowska I., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 50, 159, 1994.
6. Markowska I., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 50, 207, 1994.
7. Markowska I., Pejsak Z.: Immunologia Polska, 2, 81, 1994.
8. Morange M.: Biofutur, 142, 15, 1995.
9. Parthier B., Wollgiehn R.: Von der Zelle zum Molekül. Ed. Portig K. G., Leipzig 1971.
10. Reichert M., Grundboeck J.: Medycyna Wet. 49, 256, 1993.
11. Stadejek T., Pejsak Z.: Biotechnologia, 21, 63, 1993.
12. Stadejek T., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 50, 122, 1994.
13. Twarowski T.: Biotechnologia, 12, 10, 1991.
14. Tarasiuk K., Pejsak Z.: Proc. 7th European Congress on Biotechnology, Nice, 1995, s. 39.
15. Tarasiuk K., Truszczyński M.: Medycyna Wet. w druku.
16. Winiarczyk S.: Medycyna Wet. 49, 260, 1993.
17. Winiarczyk S., Grądzki Z., Markowska I., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 50, 605, 1994.
18. Żmudziński J., Pejsak Z.: Medycyna Wet. 48, 342, 1992.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

JANUSZ DANEK, EUGENIUSZ WIŚNIEWSKI

artykuł przeglądowy

Pasożyty narządów płciowych ogiera

Zakład Chorób Koni Bydgoskiego Oddziału Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Przyczyną patologicznych zmian w obrębie narządów płciowych ogiera obok bakterii, wirusów i grzybów mogą być też pasożyty. Najczęściej atakują one napletek, prącie i skórę moszny, ale opisane zostały również przypadki obecności pasożytów w tkankach okołojądrowych, w jądrach, najądrach, powrózkach nasiennych i w dodatkowych gruczołach płciowych ogiera.

Niniejsza praca omawia inwazje pasożytnicze poszczególnych odcinków, zewnętrznych i wewnętrznych, narządów płciowych ogiera.

Inwazje pasożytnicze skóry moszny

Przyczyną powierzchownych zapaleń skóry moszny wraz z depigmentacją mogą być mikrofilarie niciani *Onchocerca cervicalis*. Onchocerkozą jest schorzeniem pasożytniczym koni przede wszystkim

powyżej 4 roku życia, wywoływanym przez nicianie należące do rodziny *Filariidae* (1, 9, 14, 24). Choroba ta rozpowszechniona jest w Europie i w Ameryce Północnej (21), występuje także w Polsce (18). Dojrzałe osobniki, umiejscawiają się w więzadle karkowym i w ścięgnach dolnych części kończyn (gdzie są przyczyną rozrostu łącznotkankowego), a larwy (mikrofilarie) w skórze prawie wszystkich okolic ciała, przy czym najczęściej występują w okolicy kłębu, mostka, oczu, ale przede wszystkim na bokach ciała i wzdłuż środkowej linii brzucha (szczególnie w okolicy pępkowej) (22). Niekiedy mikrofilarie występować mogą w gałkach ocznych, np. w rogówce, ciałku rzęskowym i innych częściach oka. U młodych, dwuletnich koni obserwowano zmiany tylko w okolicy głowy i grzywy (1). U samców larwy inwazyjne wędrują do powierzchownych warstw skóry moszny gdzie się usadawiają. Dochodzi tu do za-