

6. Board R. G., Ayres J. C.: Appl. Microbiol. 13, 385, 1965.
7. Board R. G.: J. Appl. Bact. 28, 437, 1965.
8. Board R. G.: J. Appl. Bact. 29, 319, 1966.
9. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 44, 1323, 1965.
10. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 45, 276, 1966.
11. Brown W. E., Baker R. C., Naylor H. B.: Poult. Sci. 45, 284, 1966.
12. Ellemann G.: Nord. VetMed. 11, 341, 1959.
13. Fromm D.: Poult. Sci. 42, 1271, 1963.
14. Garibaldi J. A., Stokes J. L.: Fd Res. 23, 283, 1958.
15. Gillespie J. M., Scot W. J.: Aust. J. Appl. Sci. 1, 514, 1950.
16. Harry E. G.: Br. Poult. Sci. 4, 63, 1970.
17. Hinton M.: Epidem. Infect. 100, 247, 1988.
18. Hopper S. A., Mawer S.: Vet. Rec. 123, 351, 1988.
19. Lancaster J. E., Crab W. E.: Brit. Vet. J. 109, 139, 1953.
20. Lifshitz A., Baker R. C., Naylor H. B.: J. Fd Sci. 29, 94, 1964.
21. Mac Laury D. W., Moran A. B.: Agric. Expt. St. Bull. 657, 3, 1959.
22. Mellor D. B.: A study of Salmonella derby contamination of shell eggs. Praca dokt., Purdue University, Lafayette Ind., 1965, s. 66.
23. Mishu B., Griffin P., Tauxe R. V., Cameron P. N., Hutcheson R., Schaffner W.: Ann. Inter. Med. 115, 190, 1991.
24. North M. O.: Commercial Chicken Production Manual – AVI Publ. Co. In., Westport Connecticut 1978.
25. O'Brien J. D. P.: Vet. Rec. 122, 214, 1988.
26. Perales J., Audicana A.: Int. J. Fd Microbiol. 8, 175, 1989.
27. Radkowski M.: Medycyna Wet. 46, 331, 1990.
28. Reid W. M., Macy T. A., Boyd F. M., Kleckner A. M., Schmittle C.: Poult. Sci. 40, 1497, 1961.
29. Rizk S. S., Ayers J. C., Kraft A. A.: Poult. Sci. 45, 825, 1966.
30. Rosser F. T.: Can. J. Res. 20 D, 291, 1942.
31. Rowe B.: Proc. Xth WAVFH Symposium, Stockholm 1989, s. 326.
32. Sauter E. A., Peterson C. F.: Poult. Sci. 53, 2159, 1974.
33. Schalm O. W.: J. Inf. Dis. 61, 208, 1937.
34. Schmidt W. J.: J. Orn. Lpz. 102, 456, 1961.
35. Schoorl P., Mos G.: Pluimveeonderzoek. Comm. no 155. Cent. Inst. Poult. Res., Beckbergen the Netherlands 1968.
36. Simkiss K.: Egg Quality. A Study of the Hens Egg. Oliver and Boyd, Edinburg 1968.
37. Snoeynbos G. H., Smyser C. F., Roedel van H.: Avian Dis. 13, 688, 1969.
38. Spark N. H. C., Board R. G.: Aust. Vet. J. 62, 168, 1985.
39. St. Louis M. E., Morse D. L., Potter E., De Melfi T. M., Guzewich R. V., Blake P. A.: J. Am. Med. Ass. 259, 2103, 1988.
40. Stokes J. I., Osborne W. W., Bayne H. G.: Fd Res. 21, 510, 1956.
41. Stover D. E.: Fd Res. 21, 510, 1956.
42. Tyler C., Standen N.: Br. Poult. Sci. 10, 359, 1969.
43. Vadehra D. V., Baker R. C., Naylor H. B.: J. Fd Sci. 35, 5, 1970 a.
44. Walden C. C., Allen I. V. F., Trussel P. C.: Poult. Sci. 35, 1190, 1956.
45. Watanabe S., Hashimoto K., Kume T., Murata M., Sakazaki K.: Bull. Natl. Inst. Animal Hlth Tokyo 34, 47, 1959.
46. Wedral G. M., Vadehra D. V., Baker R. C.: J. Fd Sci. 36, 520, 1971.
47. Williams J. E., Dillard L. H., Hall G. O.: Avian Dis. 12, 445, 1968.
48. Wright G. W., Frank J. F.: Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 20, 453, 1956.

Adres autora: dr hab. Mieczysław Radkowski, ul. Osińskiego 19 m. 14, 10-010 Olsztyn

GRAŻYNA PAPROCKA, GRAŻYNA PŁUCIENNICZAK*, ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK*, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

Określenie sekwencji kodującej region VP1 wirusa pryszczycy typu O

Zakład Pryszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

*Zakład Badawczo Wdrożeniowy Inżynierii Genetycznej, ul. POW 57, 98-200 Sieradz

Summary

Determination of the VP1 coding sequence of foot-and-mouth disease virus (FMDV) type O

A Polish strain of foot-and-mouth disease virus type O from the laboratory virus collection was used. The virus was propagated in BHK-21 monolayer cells. Total RNA was extracted by the Chomczyński and Sacchi method. A synthesis of cDNA was performed with AMV-reverse transcriptase. The first and second cDNA strands were used as a template for the amplification by PCR of the 672 bp of the VP1 coding sequence. The amplified fragment of cDNA was cloned in the phagemid pBS (+). The first DNA strand expressed in the phage M13K07 was sequenced according to the Sanger method. The nucleotide sequences were compared to the earlier data published. Genetic similarities to the Brazilian strain of FMDV O1 Campos 58 were found.

wirusa wchodzi cztery strukturalne polipeptydy z których VP1 jest głównym białkiem immunogennym. Antygenowa zmienność wirusa jest rezultatem zmian w strukturze tego białka. W obrębie 7 serotypów wirusa wyróżnia się szereg podtypów. Od 1987 r. molekularna epizootologia pryszczycy opiera się głównie na porównywaniu różnic genetycznych między izolatami wirusa. Większość danych uzyskano metodą sekwencjonowania DNA. W licznych publikacjach przedstawiono strukturę genetyczną serotypów wirusa pryszczycy, typu O (3, 5, 11, 13, 15, 16), typu A (3, 4, 5, 7, 14, 20, 21, 23), typu C (12, 17, 18, 19, 25), typu SAT1 (9), typu SAT2 (27), typu SAT3 (12), typu Asial (1, 2, 26).

Celem pracy było ustalenie sekwencji nukleotydów fragmentu cDNA wirusa pryszczycy typu O. Do powielenia metodą PCR wybrano region kodujący białko VP1, zawarty między 22 a 694 parą zasad.

Materiał i metody

Wirus. Do badań używano wirusa pryszczycy typu O pochodzącego z kolekcji Zakładu Pryszczycy. Wirus namnażano w hodowli komórek linii BHK-21.

Ekstrakcja RNA. Izolację RNA wykonano w oparciu o metodę Chomczyńskiego (8). Do 200 µl zawiesiny wirusa dodawano

Wirus pryszczycy należący do grupy *Picornae* posiada jednoniciowy RNA o długości 8000 nukleotydów. W skład kapsydu

kolejno: 250 µl roztworu D (tioocjanian guanidyny, cytrynian sodu, sarcosyl, mercaptoetanol), 50 µl octanu sodu, 0,5 ml fenolu i 100 µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (49:1). Całość inkubowano w łaźni lodowej 15 min. i wirowano przez 15 min. przy 13 000 obr./min. Fazę wodną w ilości 500 µl przenoszono do nowej probówki, dodawano równą objętość izopropanolu i pozostawiano w temperaturze -20°C przez 1 godz., następnie wirowano przez 20 min. przy 13 000 obr./min. Osad rozpuszczano w 300 µl roztworu D, dodawano równą objętość izopropanolu i ponownie pozostawiano w -20°C przez 1 godz. Po odwirowaniu osad przemywano etanolem i suszono.

Primery. Jako primerów używano dwóch oligonukleotydów wykonanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Rejon amplifikowany obejmował 672 pary zasad sekwencji kodującej białko VP1. Pozycje i sekwencje primerów były następujące: primer FM1: 22/-5'-GCGGATCCTGTACCACCACC-3'/-43, primer FM2 673/-5'-GAAGGGCCAGGGTTGGACTC-3'/-694.

Reakcja odwrotnej transkrypcji. Reakcję wykonano przy użyciu AMV odwrotnej transkryptazy (Boehringer). Matrycę stanowiło 5 µl roztworu RNA otrzymanego w sposób opisany powyżej. Reakcja przebiegała 60 min. w temperaturze 42°C. Do syntezy dwuniciowego cDNA używano DNA polimerazy *E. coli*. Inkubacja trwała 60 min. w temperaturze 12°C, 60 min. w 22°C i 10 min. w 65°C.

Amplifikacja cDNA. Amplifikację cDNA wykonano w aparacie Perkin 480. Do reakcji używano 1 µg dwuniciowego lub jednoniciowego cDNA, 3 µl 10 mM trójfosforanów dezoksyrybonukleotydów (Boehringer), po 20 ng primerów FM1 i FM2, 5 µl buforu dla Taq polimerazy oraz 2,5 jedn. Taq polimerazy (Boehringer). Końcowa objętość mieszaniny wynosiła 50 µl. Na mieszaninę nawarstwiano kroplę oleju mineralnego. Przeprowadzono 30 cykli: 1 min. 96°C – denaturacja, 1 min. 56°C wiązanie primerów, 2 min. 72°C – wydłużanie łańcucha cDNA. W ostatnim cyklu elongacja trwała 5 minut.

Analiza produktów amplifikacji. Analizę produktów PCR prowadzono wykonując ich elektroforezę w 6% żelu poliakrylamidowym w aparacie firmy Biotest. Jako markera długości fragmentów DNA używano wzorca DNA z pUC19, który jest mieszaniną fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia plazmidu nukleazami restrykcyjnymi HaeIII i Taq. Po elektroforezie żel barwiono w wodnym roztworze bromku etydyny i fotografowano w świetle UV na transiluminatorze.

Ligacja wektora z fragmentem cDNA. Powielony metodą PCR fragment cDNA o długości 672 pz poddano działaniu polimerazy Klenow, trawiono enzymem restrykcyjnym BamHI a następnie klonowano w plazmidzie pBS/+/- uprzednio trawionym enzymami restrykcyjnymi BamHI i SmaI (Amersham). Mieszaninę ligacyjną o składzie: 2 µl 10x buforu dla T4DNA ligazy, 1 j. T4DNA ligazy (Boehringer), 1 µl 5mM ATP, 0,1 µg wektora DNA fagemid pBS/+/-, 5 µl fragmentu cDNA inkubowano przez noc w temperaturze 16°C.

Transformacja bakterii zrekombinowanym plazmidem. Mieszaninę ligacyjną transformowano kompetentne komórki *E. coli* MV1193. Do selekcji bakterii używano agarowego podłoża z ampicyliną, induktorem promotora lac/IPTG/ oraz chromoforowym substratem β-galaktocydazy – x-Gal. Wybierano białe kolonie z których izolowano plazmidy metodą alkaliczną (6). Plazmidy rozdzielano na 0,7% żelu agarozowym w buforze TAE. Wybierano plazmidy większe od plazmidu pBS/+/- i poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi BamHI/EcoRI (Amersham). W celu sprawdzenia czy plazmidy zawierają fragment cDNA wirusa pryszczycy wykonywano elektroforezę na 6% żelu poliakrylamidowym w obecności wzorcowego DNA.

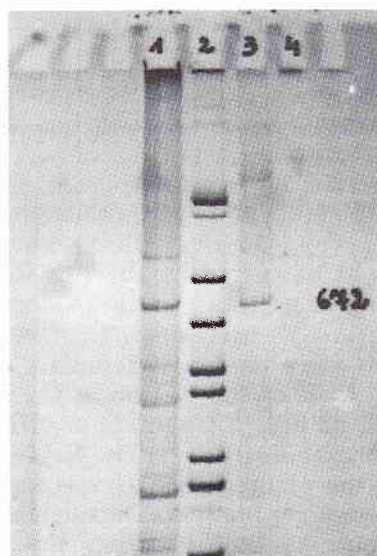
Sekwencjonowanie zasad fragmentu DNA. W celu uzyskania jednoniciowego DNA używano faga M23KO7 oraz kolonie bakterii *E. coli* MV1193 zawierające plazmid z fragmentem

cDNA wirusa pryszczycy. Jednoniciowy DNA otrzymano wg metody opisanej przez Sambrook i wsp. (22). Sekwencjonowanie wykonano metodą Sangera (24). Sekwencję odczytywano po wywołaniu filmów rentgenowskich uprzednio eksponowanych z żelami sekwencyjnymi.

Wyniki i omówienie

Metoda PCR umożliwia amplifikację stosunkowo małej ilości RNA, również bez konieczności adaptowania wirusa do hodowli komórek. Materiałem do badań w przypadku wystąpienia choroby może być nabłonek z pęcherzy pryszczycowych na języku lub też innych miejsc zmienionych chorobowo (rąbce, strzyki, wargi), próbki płynu przetykowo gardłowego, śliny, wymaz z gardła. W prezentowanej pracy używano wirusa pryszczycy typu O pochodzącego z kolekcji Zakładu Pryszczycy.

Analiza produktów amplifikacji prowadzona przy zastosowaniu elektroforezy w 6% żelu poliakrylamidowym wykazała istnienie prążka położonego w obszarze odpowiadającym 672 pz markera (ryc. 1). Dotyczy to cDNA jednoniciowego jak i dwuniciowego. Kontrolę negatywną stanowiła nie zakażona hodowla komórek BHK-21, nie powstały wykrywalne zastosowanymi metodami analizy produkty. Fragment 672 pz sklonowano w fagemidzie pBS/+/. Fagemidy ze wstawionym fragmentem cDNA posłużyły do izolowania jednoniciowego DNA przy użyciu faga M13KO7. Jednoniciowy DNA używano do oznaczenia sekwencji nukleotydów metodą Sangera (24). Otrzymaną sekwencję porównano z wcześniej opublikowanymi (3, 5, 11). Porównanie to wykazało podobieństwo badanego serotypu do O1 Campos (Brazylia) 58. Różnice dotyczą 10 pojedynczych nukleotydów zaznaczonych na sekwencji, co spowodowało zmianę 4 aminokwasów. 5 zmian występuje w rejonie najbardziej zmiennym między 390 a 430 parą zasad. Ten rejon białka VP1 od 130 do 155 aminokwasu tworzy pętlę wystającą na zewnątrz kapsydu. Tutaj znajduje się także sekwencja aminokwasów RGD (ArgGlyAsp) odpowiedzialna za rozpoznawanie przez wirus pryszczycy receptorów na powierzchni komórek (10).



Ryc. 1. Elektroforeza produktów amplifikacji cDNA w 6% żelu poliakrylamidowym. Ścieżki 1, 3 – cDNA jednoniciowy i dwuniciowy, widoczne prążki odpowiadające 672 pz, ścieżka 2 – marker, fragmenty DNA mają następujące długości (pz): 1444, 736, 587, 476, 434, 298, 267, 174. Ścieżka 4 – kontrola ujemna, nie zakażona linia komórkowa BHK-21

Wykrycie źródła pochodzenia infekcji jest niezbędnym elementem kontroli pryszczycy. Dynamiczny rozwój diagnostyki w ostatnich latach opartej o wykorzystanie metod biologii molekularnej otwiera nowe możliwości identyfikacji zarazka.

Piśmiennictwo

1. Ansell D. M., Samuel A. R., Carpenter W. C., Knowles N. J.: *Epidem. Inf.* 112, 213, 1994.
2. Ansell D. M., Samuel A. R., Knowles N. J.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Vienna, Austria, 19-22 September, 1994.
3. Armstrong R. M., Samuel A. R., Knowles N. J., Uluturk S.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Berne, Switzerland, Rome: FAO, 1992.
4. Armstrong R. M., Samuel A. R., Carpenter W. C., Rama Kant, Knowles N. J.: *Vet. Microbiol.* 39, 285, 1994.
5. Beck E., Strohmaier K.: *J. Virol.* 61, 1621, 1987.
6. Birnboim H. C., Doly J.: *Nucleic Acids Res.* 7, 1513, 1979.
7. Carrillo C., Dopazo J., Moya A., Gonzalez M., Martinez M. A., Saiz J. C., Sobrino F.: *Virus Res.* 15, 45, 1990.
8. Chomczyński P., Sacchi N.: *Analyt. Biochem.* 162, 156, 1987.
9. Dave P. S., Flanagan F. O., Madekurozwa R. L., Sorensen K. J., Anderson E. C., Foggin C. M., Ferris N. P., Knowles N. J.: *Vet. Rec.* 134, 230, 1994.
10. Fox G., Parry N. R., Barnett P. V., Mc Ginn B., Rowlands D. J., Brown F.: *J. gen. Virol.* 70, 625, 1989.
11. Knowles N. J., Marquardt O., Samuel A. R.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Prague, 1988.
12. Knowles N. J., Samuel A. R.: Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Lindholm, Denmark, Rome: FAO, 1990.
13. Krebs O., Berger H. G., Marquardt O.: *Arch. Virol.* 120, 135, 1991.
14. Marquardt O., Adam K. H.: *Virus Genes* 2, 283, 1988.
15. Marquardt O., Adam K. H.: *Vet. Microbiol.* 23, 175, 1990.
16. Marquardt O., Krebs O.: *Tierarztl. Umsch.* 47, 137, 1992.
17. Martinez M. A., Carrillo C., Plana J., Mascarella R., Bergada J., Palma E. L., Domingo E., Sobrino F.: *Gene* 62, 75, 1988.
18. Martinez M. A., Dopazo J., Hernandez J., Mateu M. G., Sobrino F., Domingo E., Knowles N. J.: *J. Virol.*, 66, 3557, 1992.
19. Piccone M. E., Kaplan G., Giavedoni L., Domingo E., Palma E. L.: *J. Virol.*, 62, 1469, 1988.
20. Robertson B. H., Grubman M. J., Weddell G. N., Moore D. M., Welsh J. D., Fischer T., Dowbenko D. J., Yansura D. G., Small G., Kleid D. G.: *J. Virol.* 54, 651, 1985.
21. Saitz J. C., Gonzales M. J., Borca M. V., Sobrino F., Moore D. M.: *J. Virol.* 65, 2518, 1991.
22. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour, NY, 1989.
23. Samuel A. R., Knowles N. J., Kitching R. P.: *Epidem. Inf.* 101, 577, 1988.
24. Sangar F., Coulson A. R.: *J. Mol. Biol.* 94, 441, 1975.
25. Sobrino F., Martinez M. A., Carrillo C., Beck E.: *Virus Res.* 14, 273, 1989.
26. Stram Y., Laor O., Molad T., Chai D., Moore D., Yadin H., Becker Y.: *Virus Genes* 8, 275, 1994.
27. Vosloo W., Knowles N. J., Thomson G. R.: *Epidem. Inf.* 109, 547, 1992.

Adres autora: dr Grażyna Paprocka, ul. Spacerowa 70/5, 98-220 Zduńska Wola

ANDRZEJ WANDURSKI

Szamocin

Choroba pęcherzykowa świń w fermie przemysłowej

Summary

Vesicular disease (SVD) of swine on an industrial farm

Six consecutive enzooties of SVD in the years of 1973/1978 were described. The first enzooty involved almost the total number of pigs on a farm (approximately 3500 animals). In 8.4 per cent the disease many abortions at different stages of pregnancy were noted. Out of 296 pigs with nervous symptoms of the disease, 122 animals were treated by sedative drugs and cardiatic ones. In the cured group of animals, 53.3 per cent recovered compared with only one pig with the symptoms of cahexia out of 174 control animals. In the recovered animals the titres of seroneutralizing antibodies ranged from 80 to 160 throughout the year. The same titres of antibodies were noted in piglets coming from convalescent sows. The convalescent pigs were resistant to natural and artificial infections with SVDV. The consecutive enzooties with SVDV were of mild course without nervous symptoms

of the disease and concerned 0.3-1.0 per cent of pigs; no animal died.

Choroba pęcherzykowa świń (swine vesicular disease – SVD) stanowiła w latach 70-tych poważne zagrożenie dla hodowli świń w Polsce, zwłaszcza w obiektach wielkostatnych (3, 4). Chorobę wywołuje wirus SVD z rodziny *Picornaviridae* wykazujący dużą oporność na czynniki środowiska zewnętrznego i większość środków dezynfekcyjnych. Wirus wywołuje zmiany na tarczy ryjowej, kończynach i niekiedy na wymieniu. W postaci nerwowej choroby występują nacieki okołonaczyniowe w mózgu, oponach mózgowych i rdzeniu kręgowym określane jako nieropne rozsiane limfocytarne zapalenie mózgu, opon mózgowych i rdzenia kręgowego (1, 2). Podobnie jak w przypadku innych chorób zakaźnych powodujących ograniczenia eksportu, przez wiele lat istniał administracyjny zakaz publikowania danych na ten temat. Mimo, że w ostatnich kilkunastu latach choroba pęcherzykowa świń straciła na znaczeniu, to jednak wydaje się celowe przedsta-