Artykuł przeglądowy *Review*

Możliwości wykorzystania metod biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń Serpulina hyodysenteriae

ZYGMUNT PEJSAK, JOANNA KRÓL

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

Pejsak Z., Król J.

Application of molecular biology methods for the diagnosis of Serpulina hyodysenteriae infections

Summary

Serpulina hyodysentariae, a Gram-negative anaerobic spirochete, is causative agent of swine dysentery. The disease may affect pigs of all ages and occurs throughout most pig-producing areas of the world. Serpulina hyodysenteriae is not easily differentiated from other spirochetes found in the porcine intestine, including S. innocens, S. pilosicoli and other weakly β-haemolytic Serpulina strains. For idetification and differentiation of S. hyodysenteriae different biochemical and serological tests have been proposed, such as API ZYM test, microtitration agglutination, reverse passive latex agglutination test (RPLA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as well as monoclonal antibodies specific for S. hyodysentariae. The work presents some molecular biology techniques – multilocus enzyme electrophoresis – MEE, restiction endonuclease analysis – REA, ribotyping, hybridization, PCR. This techniques in recent years have proven to be sensitive, specific, rapid and powerful methods for detecting a broad range of infectious agents which can be present in extremely small amounts. These techniques are used also for detection of S. hyodysentariae.

Keywords: Serpulina hyodysenteriae, detection, molecular biology techniques.

Rodzaj *Serpulina* (S.) wraz z rodzajami *Borrelia*, *Brachyspira*, *Cristispira*, *Leptonema*, *Leptospira*, *Spirochaeta* i *Treponema* należy do rzędu *Spirochaetales* (4). Dotychczas wyodrębniono trzy gatunki należące do tego rodzaju: *S. hyodysenteriae* (B78 – szczep referencyjny), *S. innocens* (szczep referencyjny – B256) i *S. pilosicoli* (szczep referencyjny P43/6/78) (17). Ostatnio, na podstawie badań fenotypowych i genetycznych zaproponowano utworzenie nowych gatunków krętków słabo hemolizujących: *Serpulina intermedius* – produkującego indol i *S. murdochii* – nie wykazującego aktywności α-galaktozydazy (32, 33, 45). *Serpulina innocens* powszechnie uznawana jest za niepatogenny krętek występujący endemicznie w większości stad świńskich. Niektórzy badacze uważają, iż *S. innocens* może mieć wpływ na rozwój dyzenterii u świń (43). *S. pilosicoli* jest niedawno zidentyfikowanym krętkiem odpowiedzialnym za występowanie spirochetozy (IS– intestinal spirochaetosis) (49). Choroba ta występuje głównie u prosiąt w okresie poodsadzeniowym, chociaż zanotowano przypadki IS u warchlaków i tuczników (48). Oprócz tego *S. pilosicoli* izolowano od ludzi, ptaków, psów, małp i wielu innych gatunków zwierząt (19). Niewątpliwie jednak największe znaczenie ekonomiczne posiada *Serpulina hyodysenteriae* – czynnik etiologiczny dyzenterii (SD – swine dysentery). Choroba ta powoduje zahamowanie przyrostów masy ciała świń, pogorszenie wykorzystania paszy i padnięcia zwierząt sięgające od kilku do 30-50% w zależności od ich wieku i warunków środowiskowych, w których przebywają. Istotne są również koszty poniesione na leczenie i profilaktykę. W wielu regionach dyzenteria po kolibakteriozie, jest najczęściej diagnozowaną chorobą układu pokarmowego świń (26). Są jednak kraje (np. USA, Dania, Szwecja), w których po wprowadzeniu do praktycznego wykorzystania nowych systemów produkcji problem dyzenterii świń został wyraźnie ograniczony. Pomimo stosowania rozmaitych programów zwalczania i zapobiegania, zasięg i częstotliwość występowania tej choroby w naszym kraju raczej się zwiększa, a nie ogranicza. Wynika to między innymi z komasacji i intensyfikacji produkcji trzody chlewnej. Istotnym problemem jest brak nowych leków przeciw dyzenterii przy narastającej oporności krętków na chemioterapeutyki od lat stosowane w zwalczaniu SD zakażeń (38). Zjawisko takie obserwuje się w wielu krajach świata. Powyższe uzasadnia potrzebę kontynuacji badań ukie-

runkowanych na poznanie właściwości biochemicznych i genetycznych *S. hyodysenteriae*. Celem tych prac jest opracowanie pewnych i szybkich metod diagnostycznych oraz uzyskanie skutecznej szczepionki przeciw dyzenterii.

Niniejsza publikacja przedstawia niektóre wyniki wykonanych w okresie ostatnich kilku lat badań z przedstawionego w tytule zakresu.

Serpulina hyodysenteriae jest Gram(–), łatwo ulegającym wysrebrzeniu i zabarwieniu barwnikiem Victoria Blue, beztlenowym krętkiem. Jego wielkość określa się na 6-25 μm długości i 270-370 nm średnicy. Bakteria ta zbudowana jest z pojedynczej komórki helikalnie skręconej o jednym lub więcej skrętach. Strukturę komórki tworzy ściana komórkowa i leżący pod nią falisty lub spiralnie skręcony cylinder protoplazmatyczny spleciony 7 do 9 włóknami osiowymi, które wychodzą z obu biegunów i układają się liniowo według wzoru 7-14-7 lub 9--18-9 (w części środkowej włókna nakładają się). Cały mikroorganizm otoczony jest luźną błoną zewnętrzną. *Serpulina hyodysenteriae* rośnie na podłożu z dodatkiem krwi. Dzięki zdolności do wytwarzania cytolizyn o działaniu hemolitycznym wykazuje silną aktywność β-hemolityczną. Większość szczepów produkuje indol, wytwarza β-glukozydazę, natomiast nie wytwarza α-galaktozydazy. Szczepy *S. hyodysenteriae* nie hydrolizują hippuranu (9, 17, 26).

Tab. 1. Właściwości biochemiczne szczepów *Serpulina*

Grupa	Hemoliza	Indol	hippuran	α-gal	α-glu	β-glu
I	silna	+	–	–	+	+
II	słaba	+	–	–	+	+
IIIa	słaba	–	–	–	–	+
IIIb	słaba	–	–	+	–	+
IIIc	słaba	–	–	+	+	+
IV	słaba	–	+	+	–	–

Objaśnienia: α-gal – α-galaktozydaza, α-glu – α-glukozydaza, β-glu – β-glukozydaza.

Tab. 2. Oznaczenie pozycji nukleotydów we fragmencie U2-U5 genu kodującego 16S rRNA szczepów *Serpulina* wykorzystywanych do identyfikacji poszczególnych grup krętków; wyróżniono nukleotydy użyteczne w klasyfikacji

Grupa	Pozycja nukleotydu w stałej sekwencji			
	564	603	621	814
I	C	A	A	T
II	C	A	A	T
IIIa	C	G	A	T
IIIb	C	G	G	C
IIIc	C	G	G	T
IV	T	G	A	T

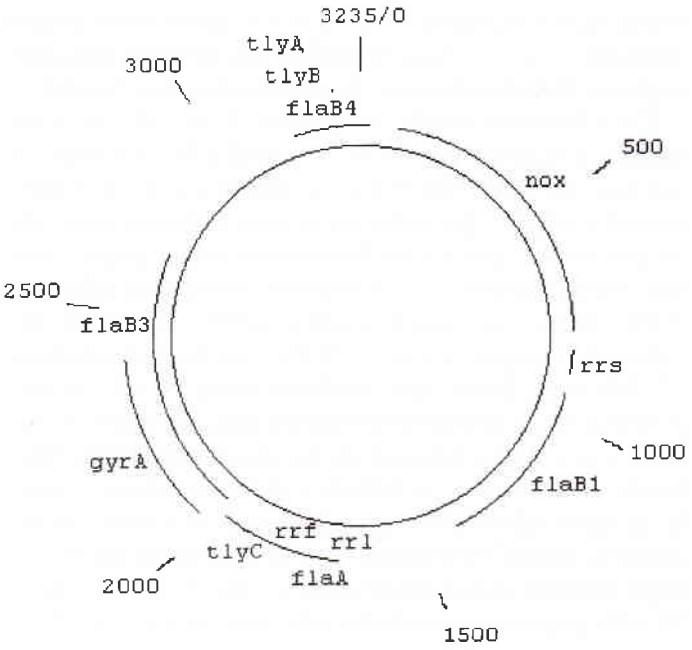
Na podstawie właściwości biochemicznych i analizy sekwencji DNA genu kodującego małą podjednostkę rybosomu (16SrRNA) gatunki należące do *Serpulina* podzielono na sześć grup (I, II, IIIa, b, c, IV), zawierających przynajmniej 12 serotypów. Szczepy *S. hyodysenteriae* zaliczono do grupy I (15, 16, 20, 28, 39) (tab. 1). Klasyfikując *Serpulina* spp. Fellström i wsp. (14) analizowali fragment U2 do U5 genu dla 16SrRNA zawierający ewolucyjnie zmienne regiony V6, V7 i V8 zdefiniowane przez Graya i wsp. (18). W zsekwencjonowanym fragmencie o długości 532pz. znaleziono cztery nukleotydy – w pozycjach 564, 603, 621, 814, charakterystyczne dla poszczególnych grup krętków (tab. 2). Jednocześnie stwierdzono, że na podstawie powyższej analizy sekwencji nukleotydów 16SrDNA nie można odróżnić grupy I od II (tab. 2).

Genetyka i biologia molekularna *Serpulina* spp. w tym *S. hyodysenteriae* jest wciąż mało poznana. Brak jest danych nt. wymiany materiału genetycznego pomiędzy komórkami krętków. Dopiero niedawno na drodze homologicznej rekombinacji z wykorzystaniem wprowadzonego przez elektroporację materiału genetycznego udało się uzyskać mutanty nie wytwarzające hemolizyny o masie molekularnej 26,9 kdal (TlyA). Gen dla tej hemolizyny (tlyA) występuje w pojedynczej kopii i jest obecny we wszystkich enteropatogennych szczepach *S. hyodysenteriae*, wskazując na jego istotne znaczenie w procesie infekcji. Inaktywacja genu tlyA powoduje drastyczne obniżenie zjadliwości szczepu, co przemawia za słusznością wcześniej przedstawionej hipotezy (23). Huurne i wsp. (24) podjęli próbę wykorzystania mutanta delecyjnego *S. hyodysenteriae* B204 nie wytwarzającego hemolizyny A jako antygenu do produkcji szczepionki przeciwko dyzenterii świń. Wyniki przeprowadzonych przez wspomnianych autorów doświadczeń wskazują, iż wcześniejsza kolonizacja jelit przez mutanta tlyA⁻ indukuje częściową ochronę przed zakażeniem zjadliwym szczepem *S. hyodysenteriae* B204. U uodpornionych świń nie tylko objawy kliniczne i zmiany chorobowe były mniejsze, ale także okres siewstwa był znacznie krótszy niż u zwierząt kontrolnych. Późniejsze badania wykazały, że hemolizyna TlyA o masie 26,9 kdal nie jest jedyną cytolizyną produkowaną przez *S. hyodysenteriae*. Bak-

terie te wytwarzają przynajmniej dwie inne hemolizyny TlyB i TlyC o masie cząsteczkowej odpowiednio 93,9 kdal oraz 30,8 kdal, które kodowane są przez geny tlyB i tlyC (25). Analiza sekwencji genów wykazała brak homologii między TlyA i TlyC a innymi znanymi białkami hemolitycznymi. Sekwencja aminokwasów hemolizyny TlyB jest homologiczna do białek Clp, które stanowią rodzinę białek pełniących funkcje wenątrzkomórkowych regulatorów proteolizy lub molekularnych chaperonów (25, 44).

Badania Zuernera i Stantona (50) wykazały, że genom *S. hyodysenteriae* jest kolistą cząsteczką wielkości 3,2 Mpz. Jest to wielkość zbliżona do genomów wielu innych wolno żyjących bakterii. W porównaniu z chromosomami innych spirochet *Serpulina hyodysenteriae* ma średni rozmiar, np. *B. burgdorferi* i *T. pallidum* mają genom wielkości ok. 1 Mpz, podczas gdy *L. interrogans* 4,75 Mpz do 5 Mpz. Genom *S. hyodysenteriae* ma niską zawartość par G+C (26-28%), dlatego też szereg enzymów restrykcyjnych nie trawi DNA tego krętka. Na podstawie wyników badań z użyciem elektroforezy pulsowej (PFGE) określono położenie niektórych genów na chromosomie, w tym genów dla rRNA, genów hemolizyn (tlyA, tlyB i tlyC), genu oksydazy NADH (nox), genów flagelli (fla) oraz genu gyrazy. Okazało się, że *S. hyodysenteriae* posiada tylko po jednej kopii genów dla rRNA (rrs kodujący podjednostkę 16S, rrl dla podjednostki 23S i rrf dla 5S rRNA). Nietypowe jest ułożenie tych genów na chromosomie – geny rrf i rrl są położone w odległości ok. 860 kpz od genu rrs (ryc. 1). U większości bakterii geny te występują w wielu kopiach i są zorganizowane w operon rrn (rrs-rrl-rrf) (29). Dotychczas nie wykazano obecności pozachromosomalnego DNA w referencyjnym szczepie *S. hyodysenteriae* B78^T. Niektóre szczepy *Serpulina innocens* i *S. hyodysenteriae* obok chromosomalnego DNA zawierają także pozachromosomalne cząsteczki DNA w postaci plazmidów. Wyodrębniono trzy grupy plazmidów – o masie cząsteczkowej 66,7 Mdal, 4,7 Mdal oraz 2,7 Mdal. Do tej pory nie udało się jednak określić ich funkcji (3).

Konwencjonalna diagnostyka zakażeń *Serpulina hyodysenteriae* opiera się na potwierdzeniu obecności krętków poprzez ich izolację z materiału biologicznego i hodowlę na podłożu sztucznym, bądź też w mniejszym stopniu na wykrywaniu przeciwciał skierowanych przeciwko temu krętkowi. Wykorzystuje się także test enteropatogenności na myszach lub świniach. Hodowla na podłożach sztucznych z krwią oraz ocena wzorca i intensywności hemolizy może sprawiać wiele trudności, ponieważ często jej charakterystyka jest bardzo zbliżona do tej jaką dają słabo β-hemolityczne szczepy (weakly β-haemolytic intestinal spirochetes – WBHIS), w tym niepatogenna *S. innocens*. Ostatnie badania wskazują, że sama hemoliza jest zawodnym wskaźnikiem patogenności, gdyż od tuczników z biegunką o charakterze typowym dla dyzenterii izolować można zarówno słabo hemolizujące enteropatogenne



Ryc. 1. Mapa genetyczna *S. hyodysenteriae* szczep B78. Jako punkt „0" przyjęto miejsce rozpoznawane przez restryktazę NotI. Na schemacie zaznaczono kolejne segmenty genomu krętka o wielkości 500 kpz oraz wskazano położenie niektórych genów: tly – geny hemolizyn, fla – geny flagelli, nox – gen oxydazy NADH, gyr – gen gyrazy

krętki, jak i silnie β-hemolizujące niepatogenne spirochety. Czułość metody hodowli bezpośredniej zależy od ilości organizmów obecnych w próbce, a to z kolei zmienia się w zależności od stadium choroby (11). Istotny jest fakt, że *S. hyodysenteriae* bardzo szybko ginie w podwyższonej temperaturze, np. w 37°C już po 24 godzinach (9). Dokładniejsze odróżnienie niepatogennej *S. innocens* od *S. hyodysenteriae* umożliwiają testy określające właściwości biochemiczne badanego organizmu (np. API ZYM Test). Niektórzy badacze do charakterystyki *S. hyodysenteriae* preferują metody immunologiczne wykrywające antygeny i przeciwciała przeciwko *S. hyodysenteriae*: ELISA, RPLA (reverse passive latex agglutination test), czy też mikroaglutynację płytkową (10).

Wyniki tych odczynów mogą być fałszywie dodatnie lub ujemne poprzez silne reakcje krzyżowe będące wynikiem podobieństwa antygenowego *S. hyodysenteriae* i innych krętków jelitowych. Dlatego też wymaga się użycia wysoce swoistych przeciwciał i antygenów. Wielu badaczy podjęło próbę uzyskania przeciwciał monoklonalnych (MAb) swoistych dla *S. hyodysenteriae*. Analiza otrzymanych MAb wykazała istnienie klonu reagującego swoiście z białkiem membranowym 30 kdal w 15 badanych szczepach *S. hyodysenteriae* należących do różnych serotypów. Reakcji takiej nie obserwowano w przypadku innych krętków jelitowych (31, 35). Przeciwciała monoklonalne specyficzne dla gatunku *Serpulina hyodysenteriae* wykorzystuje się do detekcji antygenów krętka w hy-

brydyzacji kolonijnej (colony blot) i hybrydyzacji typu Western (1, 2, 10). Należy podkreślić, że testy immunologiczne są czasochłonne, pracochłonne i kosztowne.

Do charakterystyki szczepów *S. hyodysenteriae* można wykorzystać również technikę MEE (multilocus enzyme electrophoresis). Lymbery i wsp. (37) opracowali system typowania szczepów *S. hyodysenteriae* na podstawie profilu etektroforetycznego pięciu białek enzymatycznych: izomerazy fosforanu glukozy (GPI), fosforylazy nukleozydowej (NP), L-leucylo-glicylo-glicynopeptydazy (PEP), fosfoglukomutazy (PGM) oraz dysmutazy nadtlenkowej (SOD). Postępowanie takie umożliwiło rozróżnienie izolatów wcześniej zakwalifikowanych do tej samej serogrupy. Niekiedy stwierdzano, że izolaty z różnych serogrup miały te same allele dla wszystkich pięciu badanych enzymów, czego rezultatem było uzyskiwanie identycznego profilu elektroforetycznego dla tych szczepów. W celu poprawy swoistości odczynu zwiększono liczbę analizowanych białek enzymatycznych. Lee i wsp. (34) zaproponowali określanie profilu elektroforetycznego aż piętnastu enzymów komórkowych. Oprócz uprzednio wymienionych, analizie poddawano fosfatazę kwaśną (ACP), fosfatazę alkaliczną (ALP), dehydrogenazę alkoholową (ADH), kinazę adenylową (AK), esterazę (EST), heksokinazę (HK), izomerazę fosforanu mannozy (MPI). Wyniki MEE porównywano z rezultatami analizy restrykcyjnej (REA) oraz serologicznego typowania badanych szczepów i wykazano, że jest to wysoce czuła i specyficzna metoda typowania blisko spokrewnionych izolatów (34).

W ostatnich latach coraz częściej stosuje się techniki diagnostyczne wykorzystujące w ocenie właściwości biologicznych bakterii analizę kwasów nukleinowych. Zaliczyć tu możemy analizę restrykcyjną szczepów (REA – restriction endonuclease analysis), analizę profilu plazmidowego (plasmid profile analysis), rybotypowanie, losową amplifikację polimorficznych sekwencji DNA (RAPD– random amplification of polymorphic DNA), hybrydyzację z użyciem specyficznych sond molekularnych oraz reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) – która wydaje się być metodą najbardziej obiecującą.

Wykazano, że jedna z najprostszych metod biologii molekularnej jaką jest analiza restrykcyjna DNA jest bardziej efektywna w różnicowaniu szczepów w porównaniu z fagotypowaniem, serotypowaniem, czy też badaniem antybiotykooporności. Analizę restrykcyjną stosuje się do identyfikacji wielu patogennych mikroorganizmów, m.in. *Leptospira interrogans* (13), *Mycobacterium paratuberculosis* (6), *Borrelia burgdorferi* (36), *Neisseria meningitidis* (30), *Staphylococcus aureus* (5), *Staphylococcus epidermidis* (40), *Legionella pneumophila* (48). Analizę restrykcyjną próbowano zastosować także do identyfikacji *S. hyodysenteriae*. W pierwszym etapie sprawdzono zdolność różnego rodzaju enzymów restrykcyjnych do trawienia chromosomalnego DNA *S. hyodysenteriae*. Zastosowano enzymy rozpoznające sekwencje sześcionukleotydowe, tj. BglII, SmaI, BamHI, EcoRI, HindIII, PvuII, oraz czteronukleotydowe: HaeIII, MboI (Sau3a), RsaI, HhaI. Oprócz tego przetestowano restryktazę Asp700 rozpoznającą sekwencję 10 nukleotydów. Najlepsze wyniki – wyraźne prążki wielkości od 40 do ok. 0,5 kpz i poniżej – otrzymano w wyniku działania endonukleaz Asp700 i Sau3a. Obecność tak dużych fragmentów powstających po cięciu enzymem Sau3a rozpoznającym sekwencje czteronukleotydowe jest dość niespodziewana, ponieważ statystycznie powstające fragmenty powinny mieć wielkość kilkuset pz. Niestety, analiza restrykcyjna jest techniką niepraktyczną i zbyt skomplikowaną do rutynowego stosowania w diagnostyce. Ze względu na dużą liczbę fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia endonukleazami, po elektroforezie w żelu uzyskuje się trudny do interpretacji i porównań układ prążków (7, 42).

Znacznie kosztowniejszą, ale zarazem bardziej specyficzną i łatwiejszą do oceny metodą rozróżniania krętków jest połączenie REA i hybrydyzacji typu Southerna. Sondami molekularnymi używanymi w tej metodzie są regiony DNA charakterystyczne dla *S. hyodysenteriae*, np. 2,2 kpz fragment zawierający gen białka flagelli o masie molekularnej 43 kdal (sonda Fla), fragmenty DNA o wielkości 1,4 kpz zawierający gen hemolizyny (sonda Tly), czy też inne przypadkowo wyklonowane fragmenty DNA charakterystyczne dla tego gatunku (22).

Czułą i swoistą metodą umożliwiającą rozróżnienie szczepów *S. hyodysenteriae* jest hybrydyzacja Southerna. Przydatność tej techniki wynika z wysokiej homologii między DNA *S. hyodysenteriae* i DNA *S. innocens* (40% homologii). W związku z tym wielu badaczy zaczęło poszukiwać regionów DNA specyficznych dla *S. hyodysenteriae* mogących spełniać rolę sond molekularnych dla tego drobnoustroju. Sekwencje charakterystyczne tylko dla *S. hyodysenteriae* wyizolowano poprzez przeszukiwanie fragmentów DNA zawartych w bibliotece genomowej. Uzyskuje się to między innymi poprzez kolonijną lub punktową hybrydyzację sondy z chromosomalnego DNA różnych gatunków *Serpulina* i innych patogennych bakterii z klonami w bibliotece genomowej (colony, dot, slot, spot blotting). Klony, które hybrydyzują tylko z chromosomalnym DNA *S. hyodysenteriae* stanowią idealną sondę w diagnostyce zakażeń tym krętkiem (21, 42). Metodę tę wykorzystał m.in. Sotiropoulos i wsp. (41). Z biblioteki genomowej wybrali oni losowo cztery klony zawierające fragmenty DNA *S. hyodysenteriae* o wielkości 3,8; 5,3; 7,0 oraz 10,2 kpz. Klony te poddano hybrydyzacji z wyznakowanym chromosomalnym DNA *S. hyodysenteriae* szczep 5380, a następnie *S. innocens* B256. Do dalszej analizy wykorzystano zrekombinowany plazmid z insertem 10,2 kpz, który hybrydyzował silnie z DNA *S. hyodysenteriae*, natomiast słabo z DNA *S. innocens*. Klon ten poddano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi HindIII i EcoRI. Po-

wstałe podklony wyznakowano i poddano hybrydyzacji z DNA genomowym różnych szczepów enteropatogennych bakterii. Okazało się, że dwie sondy (fragmenty o wielkości 0,75 kpz i 1,1 kpz) nie reagowały w ogóle z DNA genomowym *S. innocens*, *Leptospira* spp., *Treponema succinifaciens*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* oraz innych gatunków bakterii należących do *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Campylobacter*, natomiast dawały pozytywną reakcję ze szczepami *S. hyodysenteriae* pochodzącymi z różnych regionów świata (USA, Meksyk, Polska, Jugosławia, Australia). Otrzymane sondy nie hybrydyzowały ze sobą. W warunkach wysokiej specyficzności czułość hybrydyzacji określono na 10^3–10^5 komórek lub 7,82 ng czystego DNA krętka (41, 42).

Wyniki doświadczeń wymienionych autorów wskazują, że użycie metody hybrydyzacji Southerna może mieć istotne znaczenie w badaniach epizootiologicznych i typowaniu szczepów *S. hyodysenteriae*. Umożliwia ona również identyfikację nowych szczepów powstałych w wyniku rearanżacji genomu, integracji bakteriofaga lub transpozonu w specyficznych regionach DNA. Hybrydyzacja może być także używana do wykrywania i śledzenia dróg szerzenia się patogennych szczepów *S. hyodysenteriae* w czasie epizootii. Proponowana metoda diagnostyczna jest szybsza i dokładniejsza od konwencjonalnych metod hodowlanych opartych o izolację, namnażanie i określanie właściwości szczepu *S. hyodysenteriae*.

Często stosowaną metodą rozróżniania i charakterystyki krętków jest badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA kodującego rybosomalne RNA (rybotypowanie). Genomowe DNA *S. hyodysenteriae* poddaje się trawieniu przez endonukleazy restrykcyjne np. BglII, Sau3A, SspI. Rozdzielone elektroforetycznie fragmenty restrykcyjne przenosi się na membranę nylonową i poddaje hybrydyzacji. Sondą molekularną jest wyznakowany rybosomalny RNA *S. hyodysenteriae*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że rybotypowanie może być z powodzeniem wykorzystywane do identyfikacji i rozróżniania szczepów *S. hyodysenteriae* (27, 46).

Amplifikacja specyficznych sekwencji w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) jest wysoce swoistą i czułą metodą wykrywania enteropatogennych bakterii bezpośrednio z kału, bez potrzeby ich izolacji i hodowli. Metoda ta jest z pewnością szybsza i dokładniejsza od beztlenowej hodowli na podłożu selekcyjnym, czy też hybrydyzacji. Wykrywanie obecności krętka w próbce z zastosowaniem PCR trwa kilka godzin. Technika ta może być stosowana przyżyciowo. Startery do PCR opracowano na podstawie analizy sekwencji genomowego DNA zawartych w klonach biblioteki genomowej *S. hyodysenteriae*. Matrycę do amplifikacji stanowi całkowite DNA ekstrahowane z próbek kału, wymazu z odbytu oraz zeskrobin z błony śluzowej okrężnicy pochodzących od zwierząt z klinicznymi objawami dyzenterii. Jednocześnie z badanymi próbami przeprowadza się reakcje kontrolne wykorzystując takie same próby pobrane od zwierząt zdrowych oraz oczyszczone genomowe DNA *S. hyodysenteriae*. Czułość reakcji PCR określana jest na 1--10 organizmów w 0,1 g kału co oznacza, że jest ona około tysiąc razy czulsza od hodowli na sztucznym podłożu selekcyjnym. Dowodzi to, że test diagnostyczny oparty na reakcji PCR pozwala na rozpoznanie czynnika etiologicznego choroby dużo wcześniej niż jest to możliwe tradycyjnymi metodami hodowlanymi (11). Odczyn opracowany przez Combsa i wsp. (8) pozwalał na wykrycie 10 ng czystego DNA *S. hyodysenteriae*. W optymalnych dla określonych starterów warunkach temperaturowych na 30 izolatów *S. hyodysenteriae,* które wykazywały silną β-hemolizę, wytwarzały indol i dawały charakterystyczny dla tego drobnoustroju wynik testu API-ZYM, każdorazowo wykazywano obecność zamplifikowanych specyficznych fragmentów DNA. W identycznych warunkach w żadnym z 30 izolatów słabo β-hemolizujących, z których tylko niektóre wytwarzały indol i dawały pozytywny wynik w teście API-ZYM nie stwierdzono obecności produktu amplifikacji. Wyniki PCR można dodatkowo potwierdzać hybrydyzacją z użyciem sondy wewnętrznej (8, 11).

Elder i wsp. (12) opracowali metodę M-PCR (multilocus – wielofragmentowy PCR) pozwalającą na określenie w jednej reakcji PCR obecności trzech czynników chorobowych: *S. hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* oraz salmonele (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. branderburg*, *S. cubana*). Startery do M-PCR przygotowano tak by były one komplementarne do precyzyjnie wytypowanych fragmentów DNA wymienionych drobnoustrojów zaś wielkość zamplifikowanych odcinków DNA była zróżnicowana (w przypadku *S. hyodysenteriae* – 1550 pz, *L. intracellularis* – 457 pz oraz salmonele – 319 pz). Czułość i swoistość przedstawionej techniki potwierdzono innymi metodami (hodowla i/lub histopatologicznie, hybrydyzacja). M-PCR pozwala na znaczną oszczędność czasu, pracy i kosztów wykonywanych badań.

Reasumując, kluczowym elementem w skutecznej terapii i kontroli zachorowań świń na dyzenterię jest szybka i dokładna identyfikacja czynnika patogennego oraz określenie jego antybiotykowrażliwości. Metody konwencjonalne – hodowla na podłożach selektywnych, testy biochemiczne, są zazwyczaj czasochłonne i często obarczone dużym błędem. Wyniki badań serologicznych mogą być fałszywie dodatnie lub ujemne ze względu na duże pokrewieństwo antygenowe jelitowych spirochet świń. W związku z tym w badaniach tych postuluje się użycie przeciwciał monoklonalnych swoistych dla określonych epitopów *S. hyodysenteriae*. Rozwój technik biologii molekularnej umożliwiających analizę kwasów nukleinowych pozwala na precyzyjne wykrycie oraz określenie właściwości molekularnych tego drobnoustroju. Biorąc

pod uwagę nakłady finansowe potrzebne na wyposażenie laboratorium w specjalistyczny sprzęt diagnostyczny oraz prostotę oznaczenia, aktualnie najbardziej przydatne w diagnostyce zakażeń świń *S. hyodysenteriae* wydają się metody PCR, M-PCR lub hybrydyzacja z użyciem znaczników nieizotopowych.

Piśmiennictwo

1. *Achacha M., Mittal K. R.*: Vet. Microbiol. 48, 73, 1996.
2. *Achacha M., Mittal K. R.*: Vet. Rec. 139, 539, 1996.
3. *Adachi Y., Hara M., Hirano K.*: Proc. 13 IPVS Congress, Bangkok, 1994, s. 147.
4. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9 Wyd., Willams & Wilkins, 1994.
5. *Carles-Nurit M. J., Christophle B., Broche S., Gouby A., Bouzies N., Ramuz M.*: J. Clin. Microbiol. 30, 2092, 1992.
6. *Collins D. M., Gabric D. M., DeLisle G. W.*: J. Clin. Microbiol. 28, 1591, 1990.
7. *Combs B., Hampson D. J., Mhoma J. R. L., Buddle J. R.*: Vet. Microbiol. 19, 351, 1989.
8. *Combs B. G., Atyeo R. F., Hampson D. J.*: Proc. 13 IPVS Congress, Bangkok, 1994, s. 148.
9. *Cygan Z. M.*: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Wyd. AR, Lublin, 1991.
10. *Egan I. T., Harris D. L., Joens L. A.*: Am. J. Vet. Res. 44, 1323, 1983.
11. *Elder R. O., Duhamel G. E., Schafer R. W., Mathiesen M. R., Ramathan M.*: J. Clin. Microbiol. 32, 1497, 1994.
12. *ElderR. O., Duhamel G. E., Mathiesen M. R., Erickson E. D., Gebhart C. J., Oberst R. D.*: J. Vet. Diagn. Invest, 9, 281, 1997.
13. *Ellis W. A., Montgomery J. M., Thiermann A. B.*: J. Clin. Microbiol. 29, 957, 1991.
14. *Fellström C., Pettersson B., Gunnarsson A., Uhlen M., Johannson K. E.*: Proc. 13 IPVS Congress, Bangkok, 1994, s. 146.
15. *Fellström C.*: Res. Vet. Sc. 59, 5, 1995.
16. *Fellström C., Gunnarsson A.*: Res. Vet. Sc. 59, 1, 1995.
17. *Fellström C.*: S.I.P.A.S. Satelite Symposium, Bologna, 1996, s. 1.
18. *Gray M. W., Sankoff D., Cedergren R. J.*: Nucleic Acid Res. 12, 5837, 1984.
19. *Hampson D. J.*: Vet. Rec. 11, 51, 1997.
20. *Hampson D. J., Mhoma J. R. L., Combs B., Buddle J. R.*: Epidemiol. Infection 102, 75, 1989.
21. *Harel J., Forget C.*: Mol. Cel. Probes 9, 111, 1995.
22. *ter Huurne A.A.H.M., van Houten M., Koopman M.B.H., van der Zeijst B.A.M., Gaastra W.*: J. Gen. Microbiol. 138, 1929, 1992.
23. *ter Huurne A.A.H.M., van Houten M., Muir S., Kusters J. G., van der Zejist B.A.M., Gaastra W.*: FEMS Microbiol. Lett. 92, 109, 1992.
24. *ter Huurne A.A.H.M., Hyatt d. R., Joens L., de Ree J. M.*: Proc. 13 IPVS Congress, Bangkok, 1994, s. 150.
25. *ter Huurne A.A.H.M., Muir S., van Houten M., van der Zeijst B.A.M., Gaastra W., Kusters J. G.*: Microb. Pathogenesis 16, 269, 1994.
26. *Janowski H., Szweda W., Janowski T. E.*: Szczegółowa patologia i terapia chorób świń, T. 2, Wyd. AR-T, Olsztyn, 1994.
27. *Jensen N. S., Casey T. A., Stanton T. B.*: FEMS Microbiol. Lett. 93, 235, 1992.
28. *Joens L. A., Marquez R. B.*: Infect. Immun. 54, 893, 1986.
29. *Krawiec S., Riley M.*: Microbiol. Rev. 54, 502, 1990.
30. *Kristiansen B. E., Bjorvatn B., Lund V., Lindqvist B., Holten E.*: J. Infect. Dis. 150, 672, 1984.
31. *Lee B. J. Hampson D. J.*: FEMS Microbiol. Lett. 136, 193, 1996.
32. *Lee B. J. Hampson D. J.*: J. Med. Microbiol. 40, 365, 1994.
33. *Lee J. I., Hampson D. J., Lymbery A. J., Harders S. J.*: Vet. Microbiol. 34, 273, 1993.
34. *Lee J. I., Hampson D. J., Combs B. G., Lymbery A. J.*: Vet. Microbiol. 34, 35, 1993.
35. *Lee B. J., Trott D. J., Hampson D. J.*: Proc. 14 IPVS Congress, Bologna, 1996, s. 290.
36. *LeFebvre R. B., Perng G. C., Johnson R. C.*: J. Clin. Microbiol. 27, 636, 1989.
37. *Lymbery A. J., Hampson D. J., Hopkins R. M., Combs B., Mhoma J. R. L.*: Vet. Microbiol. 22, 89, 1990.
38. *Pejsak Z., Kołodziejczyk P.*: Mag. Wet. 6 (supl.), 61, 1998.
39. *Pettersson B., Fellström C., Andersson A., Uhlen M., Gunnarsson A., Johansson K.-E.*: J. Bacteriol. 178, 4189, 1996.
40. *Renaud F., Freney J., Etienne J., Bes M., Brun Y., Barsotti O., Andre S., Fleurette J.*: J. Clin Microbiol. 26, 1729, 1988.
41. *Sotiropoulos C., Smith S. C., Coloe P. J.*: J. Clin. Microbiol. 31, 1746, 1993.
42. *Sotiropoulos C., Coloe P. J., Smith S. C.*: J. Clin. Microbiol. 32, 1397, 1994.
43. *Spearman J. G., Nayar G., Sheridan H.*: Can. Vet. J. 29, 747, 1988.
44. *Squires C., Squires C. L.*: J. Bacteriol. 174, 1081, 1992.
45. *Stanton T. B., Fournie-Amazouz E., Postic D., Trott D. J., Grimont P. A. D., Baranton G., Hampson D. J., Saint Girons I.*: Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 1007, 1997.
46. *Tarasiuk K., Mathiesen M. R., Pejsak Z., Duhamel G. E.*: Proc. 14 IPVS Congress, Bologna, 1996, s. 286.
47. *Tompkins L. S., Troup N. J., Woods T., Bibb W., McKinney R.M.*: J. Clin. Microbiol. 10, 1875, 1987.
48. *Trott D. J., Stanton T. A., Jensen N. S., Duhamel G. E., Johnson J. L., Hampson D. J.*: Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 206, 1996.
49. *Trott D. J., Stanton T. B., Jensen N. S., Hampson D. J.*: FEMS Microbiol. Lett. 142, 209, 1996.
50. *Zuerner R. L., Stanton T. B.*: J. Bacteriol. 176, 1087, 1994.

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

HARRUS S., WANER T., KEYSARY A., AROCH I., VOET H., BARK H.: Badanie funkcji śledziony w monocytarnej erlichiozie psów. (Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrichiosis). Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 15-27, 1998 (1)

Monocytarna erlichioza psów (CME) jest chorobą wywołana przez *Ehrlichia canis*, którą przenoszą kleszcze. Celem wyjaśnienia roli śledziony w patogenezie CME, przeprowadzono badania na splenektomizowanych psach z ostrą fazą choroby. Psy zdrowe i psy splenektomizowane, nie zawierające w surowicy przeciwciał dla *E. canis* zakażono 5 ml heparynizowanej krwi pochodzącej od psa zarażonego *E. canis* szczep 611. Serokonwersja w teście immunofluorescencji wystąpiła u wszystkich psów w okresie 10-17 dni po zarażeniu. Nie występowały różnice pomiędzy psami splenektomizowanymi i nie splenektomizowanymi w czasie pojawienia się przeciwciał w klasie IgG. Natomiast wykorzystanie pokarmu, wartość hematokrytu, poziom hemoglobiny, liczba płytek krwi w ostrej fazie choroby była niższa w grupie psów nie poddanych splenektomii. Usunięcie śledziony pociągało za sobą eliminację makrofagów śledzionowych, redukcję składników dopełniacza i opsonin, powodując tym samym osłabienie procesu fagocytozy. Śledziona jako główny producent przeciwciał oraz źródło makrofagów wpływa na patogenezę i przebieg zakażenia *E. canis* u psów.

G.

ALDRIDGE B. M., MC GUIRK S. M., LUNN D. P.: Wpływ siary na immunoglobulino-pozytywne komórki u cieląt. (Effect of colostral ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves). Vet. Immunol. Immunopathol. 62, 51-64, 1998 (1)

Siara krów zawiera wiele składników takich jak immunoglobuliny, cytokiny (IL-2, TNF, IL-1, IL-6), laktoferyna, leukocyty, które mogą interferować z odpornością czynną cieląt. W celu określenia wpływu siary na subpopulacje limfocytów B cielęta w wieku 6 godzin otrzymały dwa razy dziennie siarę (grupa A), preparat zastępczy siary (grupa B), siarę zamrożoną (-700°C) lub napromieniowaną (2000 radów) (grupa D). Grupę kontrolną (grupa C) stanowiły cielęta (3 noworodki, 2 przedwcześnie urodzone) nie karmione siarą. Wszystkie zwierzęta poddano ubojowi w okresie 6 godzin po urodzeniu. Krezkowe i regionalne węzły chłonne badano immunocytochemicznie na obecność komórek produkujących IgA, IgG_1, IgG_2 i IgM. W grupie B i C komórki IgG_1 i IgG_2 pozytywne występowały pojedynczo lub w skupiskach w części korowej węzłów chłonnych, okolicy przykorowej oraz na przejściu kory w rdzeń. Nie stwierdzono ich natomiast w węzłach chłonnych cieląt z grupy A i D. Liczba komórek produkujących immunoglobuliny klasy IgM i IgA była identyczna w badanych węzłach chłonnych we wszystkich grupach.

G.