

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP	9
1.	Występowanie i epidemiologia	9
2.	Klasyfikacja wirusów	13
3.	Budowa i podobieństwo genetyczne wirusów z rodzaju <i>Lagovirus</i>	14
4.	Metody diagnostyczne	20
II.	CEL I UZASADNIENIE PRACY	25
III.	MATERIAŁY I METODY	27
1.	Materiał do badań	27
1.1.	Szczepy wirusów RHD i EBHS	27
1.2.	Próbki biologiczne	27
1.3.	Zakażenie doświadczalne	28
2.	Przygotowanie materiału do badań	28
2.1.	Zagęszczanie i oczyszczanie szczepu KGM/88	29
3.	Wykrywanie antygeny wirusowego	29
3.1.	Odczyn hemaglutynacji	29
3.2.	Test ELISA	29
4.	Analiza białek wirusowych	30
4.1.	Rozdział białek metodą SDS-PAGE	30
4.2.	Detekcja białek metodą Western blot	30
5.	Wykrywanie materiału genetycznego wirusów	31
5.1.	Izolacja wirusowego RNA	31
5.2.	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	31
5.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR i N-PCR)	32
5.4.	Badanie czułości RT-PCR	34
5.5.	Różnicowanie wirusów przy zastosowaniu RT-PCR	34
5.6.	Metoda wiązanie wirusa przez przeciwciała-RT-PCR (IC-RT-PCR)	35
5.6.1.	Wiązanie wirusa przez przeciwciała	35
5.6.2.	Odwrotna transkrypcja (RT)	36
5.6.3.	Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	36
5.7.	Hybrydyzacja metodą Southerna	36
5.7.1.	Przygotowanie sond molekularnych	36
5.7.2.	Hybrydyzacja	37

6.	Sekwencjonowanie	38
6.1.	Analiza sekwencji	40
7.	Analiza restrykcyjna	41
8.	Analiza elektroforetyczna	43
IV.	WYNIKI	44
1.	Wynik zakażenia doświadczalnego	44
2.	Wyniki badania w odczynie HA i teście ELISA	44
2.1.	Próbki pochodzące od zajęcy	44
2.2.	Próbki pochodzące od królików	45
3.	Analiza białek wirusowych	46
4.	Wykrywanie materiału genetycznego wirusów	50
4.1.	Ocena czułości RT-PCR	50
4.2.	Próbki pochodzące od zajęcy	51
4.3.	Próbki pochodzące od królików	55
4.4.	Różnicowanie wirusów przy zastosowaniu RT-PCR oraz hybrydyzacji metodą Southerna	57
4.5.	IC-RT-PCR	59
5.	Analiza sekwencji	62
5.1.	Szczepy wirusa EBHS	62
5.2.	Szczepy wirusa RHD	77
6.	Analiza restrykcyjna	87
6.1.	Szczepy wirusa EBHS	87
6.2.	Szczepy wirusa RHD	93
6.3.	Różnicowanie wirusów poprzez analizę restrykcyjną	97
V.	OMÓWIENIE WYNIKÓW	99
1.	Wykrywanie antygeny wirusowego i analiza białek wirusowych	99
2.	Wykrywanie materiału genetycznego wirusów	101
3.	Analiza sekwencji	103
4.	Analiza restrykcyjna	110
VI.	WNIOSKI	113
VII.	STRESZCZENIE	114
VIII.	SUMMARY	116
IX.	PIŚMINNICTWO	118