

JAN RUŁKA, PIOTR KUBIŚ, WITOLD DEREŃ*, EWA BUZAŁA

Diagnostyka molekularna enzootycznej białaczki bydła w badaniach własnych

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
*Rejonowy Zakład Weterynarii, ul. Gdańska 1, 48-100 Głubczyce

Rułka J., Kubiś P., Dereń W., Buzała E.
Molecular diagnosis of bovine leucosis

Summary

The total usefulness of the nested PCR method in the detection of infections of cattle with BLV has been confirmed. The efficiency of DNA amplification of BLV with the PCR method was studied in 162 cows from 2 farms. These investigations were conducted by the classic (standard) PCR method with ZM2/ZM3 exterior primers and by the nested PCR method with ZM4/ZM5 interior primers. The DNA product amplification of the first primers was 340 pb, while second primers – 218 pb. The control of genetic material of BLV showed 58 (58.5%) positive results by the standard PCR and 87 (87.8%) positive results by the nested PCR, in 99 cows of the L farm with 54 of ELISA positive results. A number of positive results with standard PCR was 33 (52.3%) and 60 (95.2%) with nested PCR method in the P farm, where the serological control showed 100% ELISA positive results. It should be stressed that among 45 of ELISA negative results, 9 (20%) positive results with standard PCR and 32 (71.1%) with nested PCR method were demonstrated. These results have underlined the high usefulness of nested PCR method and of using the whole blood of infected cows in the control of BLV infection.

Aktualnym i ważnym problemem epizootycznym zwierząt jest enzootyczna białaczka bydła. Z reguły stwierdza się ją u krów wysokomlecznych na terenach uprzemysłowionych. Wysoki wskaźnik zapadalności na białaczkę notuje się w wielu rejonach świata: Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Europie Środkowej, Izraelu, Afryce Północnej, Australii. Zakaźny charakter choroby wykazało wielu autorów (m.in. 10, 26, 39).

Przełomowym momentem w diagnostyce białaczki bydła stały się ogólnoświatowe osiągnięcia biologii molekularnej. Największym sukcesem było opracowanie przez Mullisa metody PCR – Polymerase Chain Reaction (27), której prostota i wysoka czułość, zdecydowały o jej szerokim spektrum zastosowań. Jako metoda diagnostyczna szybko znalazła zastosowanie w wykrywaniu wielu chorób wirusowych (1, 4, 16, 24) i bakteryjnych (5, 11, 17). Użyteczną metodą w diagnostyce chorób zakaźnych ludzi i zwierząt okazała się metoda PCR *in situ*. Umożliwia ona wykrywanie określonych sekwencji kwasów nukleinowych bezpośrednio w preparatach histologicznych, chromosomach lub w komórkach hodowli jednowarstwowej (8, 13, 15, 18, 40).

Wysocę swoistą metodą w wykrywaniu zakażeń wirusowych jest tzw. immunoblot. Elektroforetyczny rozdział białek wirusowych pozwala na precyzyjną ich izolację, a system immunoenzymatyczny na czułą detekcję. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w wykrywaniu antygenów rotawirusów (35), retrowirusów (30), czy RSV (37).

Efektywność diagnostyczną technik biologii molekularnej wykazano również w odniesieniu do wirusa enzootycznej białaczki bydła (2, 6, 7, 9, 14, 19, 25, 28, 29, 32). Podobne badania przeprowadzono również i w Polsce (21–23, 33, 34).

Celem pracy było określenie przydatności metod standard i nested PCR do wykrywania obecności wirusa BLV w pełnej krwi bydła z gospodarstw zapowietrzonych enzootyczną białaczką w porównaniu do testów serologicznych ID i ELISA.

Materiał i metody

Próbki krwi. Krew do badań na obecność DNA wirusa BLV, pobierano do próbki zawierającej 5% EDTA w PBS, zaś do badania serologicznego przygotowano ją w sposób ogólnie znany. Ogółem do badania użyto 162 próby krwi krów pochodzących z dwu gospodarstw uspołecznionych (L i P) zapowietrzonych wirusem enzootycznej białaczki bydła.

Ekstrakcja DNA. DNA izolowano z 0,6 ml pełnej krwi stosując zestaw Blood DNA Prep Plus, firmy A&A Biotechnology Gdańsk, ściśle wg załączonej instrukcji producenta.

Reakcja PCR (Polymerase Chain Reaction). Primery wybrano z sekwencji DNA genu env wirusa BLV (38). Jako starterów (primerów) zewnętrznych użyto oligonukleotydy ZM2/5787 5'-CTC TGA TEG CTA AGG GCA GAC ACG CG-3' 5812/ i ZM3 /5473 5'-CTT CCC CTC CCT GGG CTC CCG AA-3' 5495/, zaś starterami wewnętrznymi były oligonukleotydy ZM4 /5538 5'-CTC GCC CTC

CCG GAC GCC CA-3' 5557/ i ZM5 /5733 5'-GCT AGG CCT AAG GTC AGG GCC GC-3' 5755/. Reakcję ze starterami zewnętrznymi prowadzono w objętości 50 μ l, w której znajdowało się 10 μ l DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM każdego z dezoksynukleotydów (dNTP), 1,5 U polimerazy PrimeZyme, 0,2 μ M każdego z primerów. Amplifikację DNA prowadzono w termocyklerze Personal Cycler (Biometra) wg następującego profilu czasowo-temperaturowego: 2 min. 94°C denaturacja wstępna, 30 s. 93°C denaturacja, 1 min. 70°C przyłączanie starterów i elongacja (35 cykli). Końcowe wydłużenie nici DNA trwało 5 min. w 72°C. 2 μ l produktu reakcji ze starterami zewnętrznymi ZM2/ZM3 reamplifikowano ze starterami wewnętrznymi ZM4/ZM5, stosując 1 U polimierazy Prime Zyme i następujący profil czasowo-temperaturowy: 2 min. 94°C denaturacja wstępna, 30 s. 93°C denaturacja, 1 min. 65°C przyłączanie starterów i elongacja (30 cykli), 5 min. 72°C końcowe wydłużenie DNA. Produkty amplifikacji poddawano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym w 0,5 \times TBE.

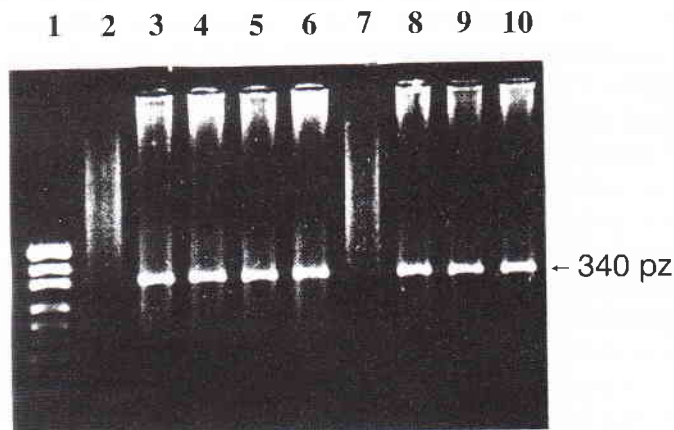
Testy serologiczne. Oznaczanie swoistych dla BLV przeciwciał w surowicy krwi badanych zwierząt określano odczynem immunodiffuzji w żelu – ID (12) i testem ELISA (Bioveta Ivanowice, CR). Technikę wykonania odczynów przeprowadzono wg instrukcji producenta. W przypadku testu ELISA odczyt wyników prowadzono przy użyciu czytnika Dynatech HR 5000 (długość fali 490 nm). Za dodatnie przyjmowano surowice, dla których wartość liczbowa ekstynkcji wynosiła $\geq 0,100$.

Wyniki i omówienie

Efektywność amplifikacji DNA wirusa białaczki metodą PCR w pełnej krwi bydłowej badano ogółem na 162 krowach mlecznych rasy ncb. Badania te prowadzono przy pomocy klasycznej metody PCR (standard) z użyciem zewnętrznych primerów ZM2/ZM3 oraz przy użyciu metody nested PCR z wykorzystaniem primerów wewnętrznych ZM4/ZM5. Produktem amplifikacji pierwszej pary primerów był prążek DNA wielkości 340 pz, zaś drugiej pary prążek 218 pz. Jak stwierdzono spośród 99 krów gospodarstwa L (tab. 1), wykazujących w 54 przypadkach dodatni wynik kon-

trolu serologicznej testem ELISA, 58 (58,5%) krów wykazywało dodatni wynik PCR przy zastosowaniu primerów ZM2/ZM3 i 87 (87,8%) przy użyciu primerów wewnętrznych ZM4/ZM5.

Przeprowadzone badania wykazały również wysoki procent dodatnich wyników PCR spośród krów wykazujących ujemne rezultaty w testach serologicznych. Ogółem wśród 45 ujemnych wyników ELISA, stwierdzono 9 (20%) rezultatów dodatnich metodą standard PCR i 32 (71,1%) wyniki dodatnie w metodzie nested PCR. Na szczególną uwagę zasługuje 6 ujemnych wyników standard PCR i ELISA, które w metodzie nested PCR wykazywały wynik dodatni. W efekcie kontrola serologiczna testem ELISA bydła zakażonego w gospodarstwie L wykazała 54,4% wyników dodatnich, podczas gdy procent dodatnich wyników kontroli materiału genetycznego wirusa BLV metodą standard PCR wynosił 58,6, a przy użyciu metody nested PCR – 87,8.



Ryc. 1. Elektroforeza produktów reakcji standard PCR na 1,5% żelu agarozowym: 1 – wzorzec masowy DNA – pUC19/ /MspI; 2, 7 – ujemny wynik reakcji PCR prób pełnej krwi bydła wykazującego ujemny rezultat kontroli serologicznej testem ELISA; 3-6, 8-10 – dodatni wynik PCR próbek krwi bydła wykazującego dodatni rezultat ELISA

Tab. 1. Wyniki detekcji prowirusa BLV techniką PCR i nested PCR w DNA izolowanym z pełnej krwi bydła (gosp. L)

Liczba prób	Kontrola serologiczna			Wyniki reakcji PCR			
	ID	ELISA	liczba wyników zgodnych	standard – zew. primery ZM2/ZM3	zgodnych z ELISA +	nested – wew. primery ZM4/ZM5	zgodnych z ELISA +
Dodatnich	51	54	51	58	43	87	54
Ujemnych	48	45	45	41		12	
Liczba krów badanych ogółem	99	99		99		99	

Tab. 2. Wyniki detekcji prowirusa BLV techniką PCR i nested PCR w DNA izolowanym z pełnej krwi bydła (gosp. P)

Liczba prób	Kontrola serologiczna			Wyniki reakcji PCR			
	ID	ELISA	liczba wyników zgodnych	standard – zew. primery ZM2/ZM3	zgodny z ELISA +	nested – wew. primery ZM4/ZM5	zgodny z ELISA +
Dodatnich	52	63	52	33	33	60	60
Ujemnych	11	0	11	30		3	
Liczba krów badanych ogółem	63	63		63		63	

Równie ciekawe wyniki wykrywalności zakażeń bydła wirusem enzootycznej białaczki, przy użyciu metody PCR, wykazano w gospodarstwie P (tab. 2). Kontrola serologiczna zwierząt wykazujących 100% dodatnich wyników ELISA, nie została w pełni potwierdzona detekcją DNA wirusa BLV. Ogółem stwierdzono 33 (52,3%) dodatnie rezultaty w metodzie standard i 60 (95,2%) w nested PCR. Jak wykazano tylko 3 ujemne rezultaty badania metodą nested PCR były niezgodne z wynikami badania serologicznego. Wysoki procent dodatnich wyników metody nested PCR, potwierdza szczególną jej przydatność w kontroli zakażeń bydła wirusem białaczki. Dodatni wynik obu metod reakcji PCR, przy ujemnym rezultacie ELISA, wskazywać może na stan wczesnego rozwoju zakażenia wirusem białaczki przy braku wykrywalnej odpowiedzi serologicznej.

Zbyt małe inokulum wirusa w tym przypadku, wymaga odpowiednio wydłużonego okresu latencji, celem replikacji stosownej jego dawki do aktywnej stymulacji układu immunologicznego. Zwracają na to uwagę badania Klintewalla i wsp. (20), w których autorzy podają, że minimalna dawka do efektywnego zakażenia zwierząt stanowi 100 limfocytów krwi.

Badania wielu autorów (m.in. 3, 9, 22, 25, 29, 31), wskazują wprawdzie na przydatność metody PCR w diagnostyce białaczki bydła, jednakże badania te dotyczyły próbek uzyskanych z koncentratu limfocytów krwi. Autorzy zwracają również uwagę na rozbieżności dodatnich wyników detekcji DNA wirusa BLV z wynikami kontroli serologicznej. Kuźmak i wsp. (22) stosując primery genu gag wirusa BLV donoszą, że amplifikacja DNA z leukocytów krwi 23 krów ze stada zakażonego, wykazywała obecność fragmentu 364 pz w 19 próbkach. Równoległe badanie surowic krwi tych zwierząt testem ID i ELISA, wykazało obecność przeciwciał w 17 próbach. DNA genu gag wirusa BLV stwierdzono u 16 zwierząt serologicznie dodatnich oraz u 3 sztuk ujemnych. U jednego z badanych zwierząt, mimo obecności przeciwciał swoistych, metodą PCR nie wykryto prowirusowego DNA. Z drugiej strony u



Ryc. 2. Elektroforeza produktów reakcji nested PCR na 1,5% żelu agarozowym: 1 – wzorzec masowy DNA – ϕ X174/Hinf I; 2, 3 – kontrola pozytywna/DNA izolowany z komórek hodowli FLK-BLV; 3, 5-10 – dodatni wynik PCR prób pełnej krwi bydła z dodatnim rezultatem ELISA; 4 – ujemny wynik PCR

innych 3 zwierząt, mimo obecności prowirusowego DNA, brak było w surowicy krwi wykrywalnych przeciwciał. Podobne zjawisko obserwowali Brandon i wsp. (3). Marsolais i wsp. (25) używając jednego z zestawów primerów, w 10 przypadkach wykazali dodatni wynik metody PCR spośród 20 krów z ujemnym rezultatem testu ELISA. Stosując zaś inny zestaw primerów, autorzy odnotowali 16 dodatnich wyników reakcji PCR, podczas gdy w przypadku zwierząt kontrolnych, pochodzących ze stad wolnych od zakażenia, nawet w przypadku reamplifikacji DNA wirusa BLV, uzyskane wyniki reakcji polimerazy były negatywne.

Prostym w interpretacji jest dodatni wynik reakcji PCR przy ujemnym rezultacie testu ELISA. Znacznie trudniej jest wytłumaczyć odmienną sytuację, kiedy notuje się ujemny wynik reakcji PCR, przy dodatnim rezultacie ELISA. Wprawdzie Murtaugh (28) sugeruje obecność DNA genomu wirusa BLV w innych ko-

mórkach organizmu niż w krążących limfocytach krwi zwierząt serologicznie ujemnych, to jednak trudno przyjąć hipotezę by limfocyty te w określonej sytuacji były w sposób wybiórczy wylapywane z krwi obwodowej przez komórki docelowe. Przeczą temu chociażby badania Klintewalla i wsp. (20), którzy ewidentnie wykazali obecność prowirusowego DNA-BLV metodą PCR, zarówno w wielu narządach wewnętrznych, jak i w limfocytach krwi obwodowej zwierząt zakażonych. Autorzy ci wykazali również brak pełnej zgodności dodatnich wyników reakcji PCR w zawieszynie komórek różnych narządów. Szczególnie interesujący jest dodatni wynik reakcji PCR u wszystkich 5 badanych zwierząt, w przypadku komórek macicy, śledziony i wątroby. Brak było natomiast zgodności wyników detekcji prowirusowego DNA-BLV w przypadku komórek szpiku, grasicy, węzłów chłonnych czy kępek Peyera.

Reasumując można stwierdzić, że uzyskane wyniki są zgodne z danymi piśmiennictwa i świadczą o przydatności szczególnie metody nested PCR w wykrywaniu zakażeń bydła wirusem enzootycznej białaczki. Procent wykrywalności w gospodarstwie L wynosił 87,8, a w gospodarstwie P – 95,2. Zaprezentowane wyniki badań własnych jednoznacznie wskazują na możliwość wykorzystania pełnej krwi obwodowej zwierząt zakażonych do testu PCR w diagnostyce enzootycznej białaczki bydła.

Piśmiennictwo

- Allard A., Girones K., Into P., Wadel G.: Clin. Microbiol. 28, 2659, 1990.
- Ballagi-Prodany A., Klintewall K., Merza M., Klingeborn K., Belak S.: J. Vet. Med. B, 39, 69, 1992.
- Brandon R., Naif H.: Res. Vet. Sci. 50, 39, 1991.
- Brock K. V.: Arch. Virol. Suppl. 3, 1, 199, 1991.
- Burstain J., Grimprel E., Leukehart S., Norgarii M., Radolf J.: J. Clin. Microbiol. 29, 62, 1991.
- Bünger V., Khalaf H., Rimpler M.: Dt. tierärztl. Wschr. 103, 489, 1966.
- Cockerell G. L., Rovnak J.: Leukemia Res. 12, 465, 1988.
- Collison E. W., Li J., Sneed L. W., Peters M. L., Wang L.: Vet. Microbiol. 34, 261, 1990.

- Eaves F. W., Molloy J. B., Dimmock C. K., Eaves L. E.: Vet. Microbiol. 39, 313, 1994.
- Ferrer J. F., Abt D. A., Bhatt D. M., Marshak R. R.: Cancer Res. 34, 893, 1974.
- Goodman J., Jurkovich P., Kramber J., Johnson R.: Infect. Immunol. 59, 269, 1991.
- Grundboeck M., Grundboeck J.: Instrukcja Min. Roln, Nr 54, 1983.
- Jackson A. C.: Molecular and Cellular Probes, Stokton Press 6, 131, 1992.
- Jacobs R. M., Song Z., Poon H., Hecney J. L., Taylor J. A., Jefferson B., Varman W., Välli V. E. O.: Can. J. Vet. Res. 56, 339, 1992.
- Jensen J., Aiken J., Schultz R. D.: Can. J. Vet. Res. 54, 256, 1990.
- Kato N., Yokosuka O., Omata M., Hosoda K., Ohto M.: J. Clin. Invest. 86, 1764, 1990.
- Kato N., Ou C., Kato H., Bartley S., Brown V., Dowell K., Ueno K.: J. Clin. Microbiol. 29, 33, 1991.
- Keller G. H., Manak M. M.: DNA Probes, Stokton Press, New York, 1989.
- Kelly E. J., Jackson M. K., Marsolais G., Morrey J. D., Callan R. J.: Am. J. vet. Res. 54, 205, 1993.
- Klintewall K., Ballagi-Prodany A., Naslund K., Belak S.: Vet. Microbiol. 42, 191, 1994.
- Kubiš P., Rulka J., Kur J., Dąbrowski S.: Bull. Vet. Inst. Pulawy 40, 85, 1996.
- Kuźmak J., Bicka L., Grundboeck-Juško J., Buzala E., Kozaczyńska B.: Medycyna Wet. 49, 471, 1993.
- Kuźmak J., Grundboeck J., Kozaczyńska B.: Medycyna Wet. 49, 312, 1993.
- Maes R., Beisel C., Spatz S., Thacker B.: Vet. Microbiol. 24, 281, 1990.
- Marsolais G., Dubuc R., Bergeron J., Morrey J. D., Kelly E. J., Jackson M. K.: J. Vet. Diagn. Invest. 6, 297, 1994.
- Miller J. M., Miller L. D., Olson C., Gillette K. G.: J. Nat. Cancer Inst. 43, 1297, 1969.
- Mullis K. B., Faloona F. A.: Methods Enzymol. 155, 335, 1987.
- Murtaugh M. P., Lin G. F., Haggard D. L., Weber A. F., Meiske J. C.: J. Virol. Methods 33, 73, 1991.
- Naif H. M., Brandon R. B., Daniel R. C. W., Lavin M. F.: Vet. Microbiol. 25, 117, 1990.
- O'Shannessay D., Voorstad P., Quarles R.: Anal. Biochem. 163, 204, 1987.
- Poon H., Jimenez E., Jacobs R. M., Song Z., Jefferson B.: J. Virol. Methods 41, 101, 1993.
- Rasmussen S., Rasmussen H. B., Larsen M. R., Hoff-Jorgensen R., Cano R. J.: Clin. Chem. 40/2, 200, 1994.
- Reichert M., Grundboeck-Juško J., Rulka J., Stec J., Kozaczyńska W.: Bull. Vet. Inst. Pulawy 38, 52, 1994.
- Reichert M., Grundboeck J., Rulka J., Kozaczyńska B., Stec J.: Medycyna Wet. 50, 263, 1994.
- Reynolds D., Hughes J.: J. Infect. Dis. 152, 647, 1985.
- Rice N., Stephens R., Gilden R.: Virology 142, 357, 1985.
- Routhedge E., Willcocks M., Morgan L., Samson A.: J. gen. Virol. 68, 1209, 1987.
- Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku J., Ohishi K., Ogawa Y., Ikawa Y.: Proc. natl Acad. Sci. USA, 82, 677, 1985.
- Van der Maaten, Miller J. M.: Bibl. Hematol. 43, 360, 1976.
- Xie B., Oyamada T., Yoshikawa H., Oyamada T., Yoshikawa T.: J. comp. Path. 116, 87, 1997.

Adres autora: doc. dr hab. Jan Rulka, ul. Lubelska 17/6, 24-100 Pulawy

TAYLOR L. F., JANZEN E. D., VAN DONKERS-GOED J.: Straty w okresie 2 lat spowodowane zakażeniem płodów wirusem biegunki bydła w stadzie krów i cieląt produkcji mięsnej w Saskatchewan. (Losses over a 2-year period associated with fetal infection with the bovine viral diarrhoea virus in a beef cow-calf herd in Saskatchewan). Can. Vet. J. 38, 23-28, 1997 (9)

W stadzie liczącym 650 krów w Saskatchewan w 1992 r. wystąpiły masowe padania odsadzonych cieląt. Sekcja wykazała zmiany typowe dla zakażenia wirusem BVDV. Celem ustalenia strat spowodowanych przez ten wirus podjęto próbę izolacji wirusa z krwi wszystkich krów i cieląt w stadzie. Wirus BVDV izolowano wyłącznie od cieląt. Ronienia, obniżenie procentu zacielenych krów, opóźnienie terminu wycielenia były następstwem zakażenia wirusem BVDV. Największe straty wśród cieląt notowano w potomstwie matek w wieku 3 lat tj. w potomstwie pochodzącym z drugiego wycielenia.

G.

BROOKS H. W., WHITE D. G., WAG STAFF A. J., MICHELL A. R.: Ocena przydatności doustnego płynu nawadniającego z glutaminą w leczeniu biegunki cieląt na modelu biegunki wywołanej zakażeniem *Escherichia coli*. (Evaluation of a glutamine-containing oral rehydration solution for the treatment of calf diarrhoea using an *Escherichia coli* model). Vet. J. 153, 163-170, 1997 (2)

Wysoco kaloryczny płyn nawadniający (ORS) z dodatkiem glutamianu skuteczniej koryguje ubytki plazmy krwi i płynów poza komórkowych, a także całkowity ubytek krwi w porównaniu do płynów o dużej zawartości glukozy ale nie zawierających glutamianu. Świadczą o tym efekty uzyskane u cieląt z biegunką indukowaną zakażeniem eksperymentalnych *Escherichia coli*, serotyp O9:K30:K99. Płyn ORS korygował w sposób istotny objętość plazmy krwi w ciągu 48 godz., a także wpływał pozytywnie na poziom glukozy we krwi i zapobiegał obniżeniu masy ciała u cieląt z biegunką.

G.