

Diagnostyka molekularna wirusa białaczki bydła (BLV)

PIOTR KUBIŚ, JAN RULKA

Pracownia Patologii Komórkowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kubiś P., Rulka J.

Molecular diagnosis of bovine leukosis (BLV)

Summary

The aim of this experiment was diagnosing bovine leukosis in cattle using nested-PCR in comparison to the results obtained by serological methods (ID, ELISA). As shown, the positive results of ID, ELISA and nested-PCR in the 110 cows examined were 52 (45.5%), 77 (70 %) and 82 (74.5%), respectively. It is interesting to note that 5 cows out of 24 with positive results in nested-PCR did not reveal the presence of antibodies against BLV. This can be explained either by the very short period of BLV infection before collecting the samples for examination, the presence of BLV outside the blood-circulation system, fallibility of the PCR or the presence of different variants of BLV.

Keywords: bovine leukosis, diagnostic, nested-PCR

Wirus enzootycznej białaczki bydła – BLV (bovine leukemia virus) jest blisko spokrewniony z wirusami HTLV-1 i HTLV-2 i wraz z nimi tworzy podrodzinę *Oncornavirinae* grupę HTLV;BLV (13, 18, 20, 21). Komórkami docelowymi wirusa BLV są głównie limfocyty subpopulacji typu B, chociaż zakażeniu ulegają również monocyty, limfocyty T, a także komórki śródbłonna naczyń krwionośnych i nabłonkowe komórki gruczołu mlekowego. U większości zakażonych zwierząt powstaje trwała odpowiedź serologiczna, a choroba przez długi czas przebiega bezobjawowo (9, 15, 16).

Genom wirusa BLV, podobnie jak i innych retrowirusów, stanowią dwie identyczne cząsteczki RNA zawierające kodujące sekwencje genu gag, pro, pol, i env oraz sekwencje nie kodujące tworzące długie flankujące powtórzenia tzw. LTR (long terminal repeats). Poza genami strukturalnymi wirus białaczki bydła posiada region X zlokalizowany między genem env a 3' LTR, kodujący białka Tax, Rex, RIII i GIV (4, 6, 19).

Wykrywanie infekcji wirusowych w ostatnich latach zrewolucjonizowały metody biologii molekularnej. Pierwszą z nich jest hybrydyzacja DNA, zasadą której jest specyficzne łączenie znakowanych cząstek kwasów nukleinowych (sondy molekularne), z immobilizowaną na nylonie lub nitrocelulozie badaną sekwencją DNA (7, 8). Drugą metodą, używaną do powielania *in vitro* fragmentów DNA lub cDNA, uzyskanego w wyniku odwrotnej transkrypcji RNA, jest reakcja łańcuchowej polimerazy – PCR (polymerase chain reaction). Znanych jest wiele wariantów reakcji, jednakże w celach diagnostycznych stosowane są dwie jej wersje: pojedynczy PCR, przy której produkt amplifikacji

jest rezultatem amplifikowania oczyszczonego DNA i użyciu jednej pary starterów oraz tzw. podwójny PCR (nested-PCR) gdzie produkt pierwszej amplifikacji jest powielany dodatkowo przy użyciu wewnętrznej pary starterów (1, 2, 5, 13, 17, 18). Produkty reakcji PCR można wykryć: a. metodą elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym, b. hybrydyzacją z sondą molekularną znakowaną izotopem (³²P, ³³P, ³⁵S, ³H) lub znacznikiem typu haptenu (biotyna, dwunitrofenol, 5-bromo-2'-dezoksyurydyna, acetylo-aminofluoren, grupy siarczanowe SO₃ czy digoksygenina) oraz c. reakcją PCR-ELISA, PCR-ELA, DIAPOS – Detection of Immobilized, Amplified Products in a One-Phase System (10, 11, 12).

Celem pracy było porównanie wyników testów serologicznych i metody nested – PCR w diagnostyce enzootycznej białaczki bydła.

Material i metody

Zwierzęta. Do badań użyto 110 prób pełnej krwi i surowic krów mlecznych w wieku od 3 do 8 lat, pochodzących z gospodarstwa GS zapowietrzonego wirusem białaczki bydła. W zależności od czasu pozyskania prób do badań zwierzęta podzielono na 6 grup doświadczalnych (od A do F).

Badanie serologiczne. Przeciwciała anti-BLV wykrywano przy użyciu odczynu immunodyfuzji – ID (PIWet. Puławy) oraz testu ELISA – SERELISA BLVAb Mono-Blocking (Synbiotics Co. France), ściśle wg załączonej instrukcji producenta. Odczyt wyników prowadzono na spektrofotometrze Stat Fax 2100 przy długości fali 490 nm. Mianem dodatnim surowicy była ujemna wartość najwyższego jej rozcieńczenia, w którym wartość liczbowo absorpcji wynosiła $\geq 0,100$.

(74,5%). W innym badaniu spośród 279 prób krwi, stwierdzono 3 wyniki dodatnie w reakcji nested-PCR i 1 w teście ELISA, przy czym wyniki kontroli serologicznej nie korelowały z wynikiem badania DNA wirusa (dane nie publikowane). Przeprowadzone badania wykazały wyższą czułość reakcji nested-PCR w wykrywaniu zakażeń bydła wirusem białaczki niż diagnostyka serologiczna testem ELISA. Podobną korelację wyników stwierdzili Blankenstein i wsp. (3). Autorzy ci stosując primery LTR wirusa BLV stwierdzili wyższą czułość reakcji PCR (34 wyniki dodatnie), niż przy użyciu primerów genu env (30 wyników dodatnich). Równoległa kontrola serologiczna w/w 34 zwierząt dodatnich w PCR, wykazała tylko 21 dodatnich wyników w teście ELISA, zaś analiza restrykcyjna uzyskanych amplikonów PCR potwierdziła istnienie różnych wariantów DNA wirusa BLV. Podobne obserwacje odnotowali Marsolais i wsp. (12). W konkluzji wymienieni autorzy sugerują, że metoda PCR winna być stosowana do wykrywania zakażeń w gospodarstwach z małą ilością zwierząt zakażonych BLV, do wykrywania nowych epizotii lub w gospodarstwach wolnych od dłuższego czasu od zakażeń wirusem białaczki z pojedynczymi przypadkami guzowatej jej formy lub w dużych gospodarstwach reprodukcyjnych. Murtaugh i wsp. (14), dodatni wynik reakcji PCR stwierdzili u 13 krów spośród 18 wykazujących dodatni wynik kontroli serologicznej. Izolowane limfocyty od pozostałych 5 zwierząt, nie zawierały wirusa BLV w hodowli *in vitro* lub ekspresja jego była tak niska, że nie pozwalała na wykazanie obecności DNA metodą PCR. Autorzy sugerują obecność cząstek wirusa BLV w innych komórkach układu limfatycznego niż w limfocytach krwi obwodowej. Biorąc pod uwagę wysoką zmienność wirusów grupy retro, należy poszukiwać takich wskaźników zakażenia, które byłyby wspólne dla wszystkich zwierząt dotkniętych BLV. Badania Murtaugh'a i wsp. przeczą ewentualności występowania wielu serotypów wirusa BLV stosując primery trzech różnych genów wirusa BLV (gag-p24, env-gp51 i pol.), gdzie wyniki reakcji PCR z DNA limfocytów krwi obwodowej były identyczne. Mimo, że stosowany w badaniach szeroki wachlarz primerów różnych fragmentów DNA wirusa białaczki wskazuje na występowanie kilku mutantów wirusa BLV, to jednak na obecnym etapie badań, brak jest danych odnośnie ewentualnego występowania wariantu japońskiego, czy australijskiego (13), na terenie Polski.

Reasumując należy stwierdzić, że reakcja nested-PCR jest szybką i w pełni przydatną metodą do wykrywania zakażeń bydła wirusem białaczki enzoptycznej. Wykazano ponadto, że zarówno badanie serologiczne surowic, jak i DNA wirusa BLV stanowią uzupełniającą się całość kontroli zwierząt zakażonych. Stwierdzenie przez autorów zagranicznych występowania różnych wariantów wirusa BLV w populacji zwierząt zakażonych, nawet w tym samym gospodar-

stwie, rzuca nowe światło zarówno na patogenезę enzoptycznej białaczki bydła, jak i na jej diagnostykę serologiczną oraz wczesną diagnostykę przy użyciu metody PCR.

Piśmiennictwo

1. Agresti A., Ponti W., Rocchi M., Meneveri R., Marozzi A., Cavalleri D., Peri E., Poli G., Ginelli E.: Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 1993, 54, 373-378.
2. Ballagi-Pordany A., Klintevall K., Merza M., Klingeborn B., Belak S.: Direct detection of bovine leukemia virus infection: Practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. B.* 1992, 39, 69-77.
3. Blankenstein P., Fechner H. A., Beier D., Marquardt O., Eber D.: Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von BLV-Proviral praktikable Ergänzung der BLV-Diagnostik? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1998, 111, 180-186.
4. Eaves F., Molly J., Dimmock C., Eaves L.: A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 1994, 39, 313-321.
5. Fer H., Kurg A., Blankenstein P., Mewes G., Geue L., Albrecht C., Ebner D.: Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Berl. Mün. Tierärztl. Wschr.* 1996, 109, 446-450.
6. Fechner H., Kurg A., Geue L., Blankenstein P., Mewes G., Ebner D., Beier: Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med. B* 1996, 43, 621-630.
7. Gingers T., Richman D., Kwoh D., Guatelli J.: Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their application *Vet. Microbiol.* 1990, 24, 235-251.
8. Guesdon J.: Immunoenzymatic techniques applied to the specific detection of nucleic acids. *J. Immunol. Methods.* 1992, 150, 33-49.
9. Jacobs R., Song Z., Poon H., Henney J., Taylor A., Jefferson B., Verman W., Valli V.: Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can. J. Vet. Res.* 1992, 56, 339-348.
10. Kelly E., Jackson K., Marsolais G., Morrey J., Callan R.: Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 1993, 54, 205-209.
11. Klintevall K., Bellagi-Pordany A., Näslund K., Belak S.: Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 1994, 42, 191-204.
12. Marsolais G., Dubuc R., Bergeron J., Morrey J., Kelly E., Jackson M.: Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1994, 6, 298-301.
13. Molteni E., Agresti A., Meneveri R., Marozzi A., Malcovati M. et al.: Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). *J. Vet. Med.* 1996, 43, 201-211.
14. Murtaugh M., Lin G., Haggard D., Weber A., Meiske J.: Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 1991, 33, 73-85.
15. Naif H., Brandin R., Daniel R. M.: Bovine leukemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 117-129.
16. Naif H., Daniel R., Cogle W., Lavin M.: Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 675-679.
17. Piatak M., Saag M., Yang L., Clark S., Kappes J., Luk K., Hahn B., Show G., Lifson J.: High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993, 259, 1749-1753.
18. Rasmussen S., Rasmussen H., Larsen M., Hoff-Jørgensen R., Cano R.: Combined polymerase chain reaction-hybridization assay used to detect bovine leukemia virus and Salmonella. *Clin. Chem.* 1994, 40, 200-205.
19. Tajima S., Ikawa Y., Aida Y.: Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J. Virol.* 1998, 72, 7569-7576.