

Diagnostyka zakażeń drobiu wirusem białaczki mieloblastycznej (ALV-J)

JAN RUŁKA, EWA BUZAŁA, PIOTR KUBIŚ, WOJCIECH KOZDRUŃ*, MARIA SZCZOTKA, ELŻBIETA SALAMONOWICZ*, WITOLD DEREŃ**

Pracownia Patologii Komórkowej i *Pracownia Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
**Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Wrocławska 170, 45-836 Opole

Rułka J., Buzała E., Kubiś P., Kozdruń W., Szczotka M., Salamonowicz E., Dereń W.
Diagnosis of poultry infection with myeloid leukemia virus (ALV-J)

Summary

The ELISA and PCR methods were applied for the diagnosis of ALV-J infection of young chickens and adult hens in flocks from different regions of Poland. The ELISA examination was carried out on 980 of the sera of chicks at the age of 7-11 weeks and on 156 sera of Ros 308-race hens aged 8-15 months. Generally positive serological results were indicated in 21 (2.1%) of the chicks and 41 (26.3%) of the adult birds. Detailed serological examinations in one of the flocks revealed 38.4% positive results in the ELISA and 26.9% in the PCR. The length of DNA env gene bands was 545 pb and they were typical for the ALV-J virus.

Keywords: avian leukosis, ALV-J, diagnosis, ELISA, PCR

Wirus białaczki drobiu – ALV (avian leukosis virus) i wirus retikuloendoteliozy – REV (reticuloendotheliosis virus) wywołujące proces nowotworowy, są u drobiu jednymi z najbardziej rozpowszechnionych czynników zakaźnych z rodziny *Oncomaviridae*. Jedną z form białaczek drobiu jest postać mieloblastyczna wywołana przez typ C onkogennego RNA wirusa ALV podtypu J. W latach 1997-1998 choroba ta była jednym z większych problemów epizootycznych hodowli kur w Anglii. Fadly i Smith (3) podają, że wirus ALV-J wywołuje nie tylko zmiany nowotworowe, padnięcia, obniżenie produktywności u kur ras mięsnych, ale również powoduje tworzenie guzów i zmian anatomopatologicznych u ras nieśnych. W ciągu kilku lat wirus spowodował duże straty w wielkotowarowych gospodarstwach hodowlanych i zarodowych ras mięsnych. Straty ekonomiczne wynikające z tytułu samych padnięć drobiu wynosiły od 2% do 25% pogłowia. W wielu gospodarstwach straty w odchowie ptaków były na tyle duże, że nie były one w stanie zaopatrzyć hodowców w odpowiednią ilość piskląt do hodowli.

W Polsce, podobnie jak i w innych krajach, choroba dotyczyła głównie stad rodzicielskich kierunku mięsnego (11, 12). Skala zjawiska była tak duża, że 90%-100% jaj lub kur zakażonych wirusem ALV-J wykazywało obecność swoistego antygeny gs lub przeciwciał odpornościowych w surowicy krwi (5). Pierwsze chore osobniki pojawiały się między 8. a 16. tygodniem życia, przy czym największą śmiertelność notowano u drobiu dorosłego. Wirus białaczki mieloblastycznej drobiu, wyizolowany po raz pierwszy w koń-

cu lat osiemdziesiątych przez Payne'a i wsp. (6), wykazuje wysoki tropizm do komórek szpiku kostnego. Badaniami histopatologicznymi stwierdzono rozrost nowotworowy w wielu narządach z dominacją nacieków komórek mielocytarnych (11).

Celem badań było określenie występowania swoistych przeciwciał dla wirusa białaczki mieloblastycznej (ALV-J) testem ELISA u drobiu w stadach hodowlanych pochodzących z różnych rejonów kraju, w odniesieniu do kontroli zakażeń techniką łańcuchowej reakcji PCR.

Materiał i metody

Badaniami objęto ogółem 1176 sztuk drobiu pochodzącego z 52 stad reprodukcyjnych rasy Ros 308 z różnych rejonów kraju. Spośród wybranej liczby 980 sztuk stanowił drób młody w wieku 7-11 tygodni, a 196 – kury dorosłe. Celem określenia obecności swoistych przeciwciał dla wirusa białaczki mieloblastycznej ALV-J w żółtku do badań użyto 43 jaj kur wymienionej rasy z fermy P, w której 38,5% sztuk reagowało dodatnio w teście ELISA.

Próbki krwi pobierano z żyły skrzydłowej, a surowice do badań przygotowywano w sposób ogólnie przyjęty. Przed wykonaniem kontroli serologicznej surowice inaktywowano 20 min. w temp. 56°C.

Metodyka uzyskiwania swoistych przeciwciał anty ALV-J z żółtka jaj. Po odcięciu skorupy jaja znad komory powietrznej pobierano jałową pipetą 1 ml żółtka, mieszano go z 1 ml PBS, po czym dodawano 2 ml chloroformu, starannie mieszano i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 1 godz. Następnie wirowano 1500 obr. przez 20 min.,

zbierano górną warstwę mieszaniny i inaktywowano w temp. 56°C przez 30 min. Tak przygotowana mieszanina żółtka jaja kurzego służyła za materiał wyjściowy do badań serologicznych.

Test ELISA. Kontrolę swoistych przeciwciał anti-ALV-J przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu ELISA firmy IDEXX seria 09268-405GW. Technikę wykonania odczynu oraz odczyt i obliczanie wyników wykonywano zgodnie z załączoną instrukcją.

Izolacja wirusowego DNA z próbek pełnej krwi. Do badania użyto 52 próbek pełnej krwi od kur z fermy P. Po odwirowaniu krwi przez 30 min. przy 3000 obr./min., pobierano 50 µl komórek z warstwy leukocytów, po czym postępowano wg protokołu izolacji DNA zestawu Blood Mini (A&A Biotechnology, Gdynia. Nr kat. 022 – 50).

PCR. Do badań użyto dwóch primerów genu env wirusa białaczki mieloblastycznej typu J, pochodzących z DNA konserwatywnej sekwencji gp85. Reakcję prowadzono w mieszaninie o końcowej objętości 25 µl składającej się z 10 mM Tris-HCl pH 8,8 przy 25°C, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 200 µM mieszaniny każdego z dNTP, 0,5 U DyNAzyme II DNA polimerazy (Finnzymes Oy), 0,2 µM primerów genu env: H5 (5'-gga tga ggt gac taa gaa ag-3') pozycja 5258-5277 i H7 (5'-cga acc aaa ggt aac aca cg-3') pozycja 5783-5802 oraz 3 µl izolowanego DNA. Profil temperaturowy amplifikacji był następujący: 93°C 1 min., 60°C 1 min. z obniżeniem temperatury o 1°C w każdym następnym cyklu (funkcja „touch down”, 72°C 1 min. 30 s. przez 13 cykli, a następnie 95°C 1 min., 48°C 1 min., 72°C 1 min. 30 s. przez 30 cykli, końcowe wydłużenie przez 7 min. 72°C i ochłodzenie do 4°C.

Elektroforezę produktów amplifikacji prowadzono przez 30 min. w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu prądu 100 V.

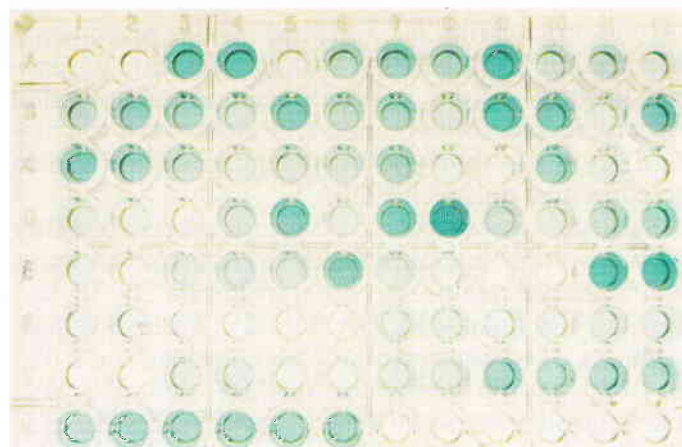
Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań ilustrują tab. 1 i 2 oraz ryc. 1 i 2. Przeprowadzone badania wykazały, że spośród 980 surowic drobiu młodego, pochodzącego z 52 stad z różnych rejonów kraju, 21 (2,1%) sztuk wykazywało dodatni wynik kontroli serologicznej w teście ELISA. Dodatnie wartości współczynnika OD (optical density) w grupie drobiu młodego od 7 do 11 tygodni wynosiły od 0,687 do 0,770, podczas gdy wartości ujemne wahały się od 0,010 do 0,599. W grupie 196 kur dorosłych dodatni wynik testu ELISA wykazywało 41 (20,9%) sztuk. Analogiczne wskaźniki dla drobiu dorosłego wynosiły: wartość współczynnika OD

Tab. 1. Wyniki kontroli serologicznej przeciwciał anti ALV-J testem ELISA w stadach kur rasy Ros 308 z różnych rejonów kraju

Ferma	Liczba stad	Liczba ptaków badanych	Wiek	ELISA			
				Liczba wyników (+)	Wartość współczynnika OD	Liczba wyników (-)	Wartość współczynnika OD
A	5	92	Ptaki młode (7-11 tyg.)	2	0,687-0,688	90	0,063-0,500
B	5	88		0		88	0,023-0,449
C	4	92		3	0,699-0,734	89	0,030-0,523
D	4	92		0		92	0,010-0,484
E	4	57		0		57	0,040-0,580
F	1	30		0		30	0,128-0,467
G	4	92		0		92	0,052-0,490
H	4	92		0		92	0,028-0,593
I	4	92		2	0,734-0,770	90	0,012-0,461
J	4	92		1	0,650	91	0,032-0,582
K	4	92		1	0,743	91	0,051-0,494
L	2	22		2	0,641-0,660	20	0,031-0,599
M	2	47		10	0,683-0,734	37	0,027-0,473
Razem (%)	47	980		21 (2,1%)		959	
O	1	12	Ptaki dorosłe (8-15 mies.)	1	0,932	11	0,590
P	1	52		20	0,623-1,632	32	0,011-0,600
R	1	49		5	0,691-0,849	44	0,075-0,593
W	1	41		0		41	0,043-0,498
Z	1	42		15	0,618-1,310	27	0,035-0,577
Razem (%)	5	196		41 (20,9%)		160	
Ogółem	52	1176		62		1119	

dla surowic dodatnich wahała się od 0,618 do 1,632, zaś dla surowic ujemnych od 0,011 do 0,600. Istotne jest, że spośród 32 kur wykazujących ujemny wynik w teście ELISA, 10 sztuk dało pozytywny wynik w re-



Ryc. 1. Wyniki kontroli przeciwciał anti ALV-J testem ELISA w surowicach kur dorosłych: A1-2 – kontrola negatywna, A3-4 – kontrola pozytywna, A5-E8 – surowice kur z gospodarstwa P (badanie jednodółkowe), E9-H6 – surowice z gospodarstwa Z (badanie dwudółkowe), H7-8 – blank, H9-12 – baseniki puste

Tab. 2. Wyniki kontroli przeciwciał anti-ALV-J w surowicy krwi i żółtku jaja kur pochodzących z gospodarstwa P

Stado	Numer kury	ELISA* (wartość współczynnika OD)	PCR	Przedmiot badania	Numer jaja	ELISA* (wartość współczynnika OD)
Ferma P (zakażone wirusem ALV-J)	277	0,632		żółtka jaja	1	1,262
	278	0,743			2	0,672
	279	0,623			3	0,752
	280	1,066			4	0,037
	285	0,759			5	0,625
	286	0,689	+		6	0,707
	288	0,879			7	0,715
	290	0,687			8	0,646
	292	1,028			9	0,693
	293	0,871			10	0,618
	295	0,858				
	296	0,812				
	297	0,730				
	302	0,739	+			
	305	0,751				
	312	0,986				
	314	0,958	+			
315	1,635	+				
319	0,725					
325	0,978					
Liczba kur badanych ogółem	52		52**			
Liczba wyników ujemnych	32	0,021-0,538	38			

Objaśnienia: * – do badań użyto komercyjnego zestawu ELISA firmy IDEXX; ** – spośród 52 próbek krwi stwierdzono 14 dodatnich wyników w reakcji PCR, z których 10 nie było zgodnych, a 4 zgodne z wynikami ELISA

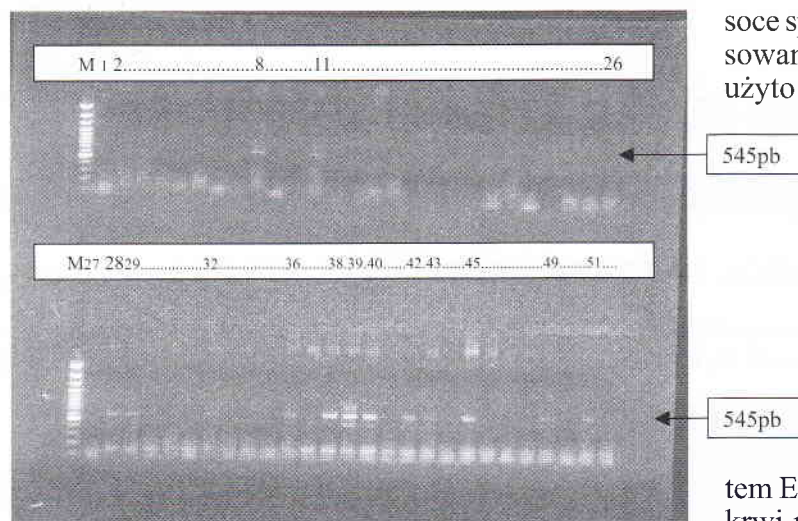
akcji PCR. Rozbieżność powyższych wyników kontroli należy upatrywać zarówno we wczesnej fazie zakażenia organizmu, jak i niskim mianie przeciwciał odpornościowych lub zbyt w długim okresie wirusowej latencji. Trudno jest na obecnym etapie badań stwierdzić, który z wymienionych elementów jest najbardziej możliwy. Wyjaśnienie tego problemu będzie przedmiotem dalszych analiz.

Szczegółowa kontrola serologiczna przeciwciał anti ALV-J w populacji kur z fermy (P) zakażonych wirusem białaczki mieloblastycznej wykazała 20 (38,4%) dodatnich wyników ELISA (tab. 2). Wartość współczynnika OD dla surowic dodatnich wynosiła od 0,623 do 1,635, zaś dla ujemnych – od 0,021 do 0,538. Wyniki kontroli przeciwciał dla wirusa ALV-J testem ELISA ilustruje ryc. 1. Spośród wymienionych 20 kur z dodatnim wynikiem ELISA tylko u 4 stwierdzono dodatni wynik badania metodą PCR. Otrzymane rezultaty wskazywać mogą m.in. na lokalizację wirusa ALV-J w innych miejscach organizmu niż obwodowy układ

krwi. Takie prawdopodobieństwo sugerują badania m.in. Klintevall i wsp. (4) w przypadku zakażenia bydła wirusem BLV. Najczęściej wirus białaczki bydła stwierdza się w wątrobie i śledzionie, podczas gdy u niektórych zwierząt brak jego obecności w szpiku kostnym, grasicy, nerkach, a nawet w węzłach chłonnych.

Badania Szeleszczuka (11) wykazały wysokie miana przeciwciał (1824) przeciwko antygenowi gp85 wirusa ALV-J u stosunkowo młodych ptaków. Jak podkreśla autor, około 50% kur stada rodzicielskiego wykazywało dodatni wynik kontroli serologicznej testem ELISA. Wysoki procent wyników dodatnich stwierdzono również przy wykrywaniu antygeny grupowo swoistego p27 u ptaków rodzicielskiego stada brojlerów w wieku 48 tygodni. Podobnie Minta i Śmietanka (5) wykazali wysoki procent (88%) wyników dodatnich w kontroli antygeny GS w albuminie jaj oraz 100% przeciwciał anti ALV-J w surowicy krwi. Wymienieni autorzy stwierdzili również, że stopień przenoszenia wirusa drogą transowarialną jest zróżnicowany i w zależności od stada wynosi od 6% do 31% погоłowia drobiu.

Wstępne wyniki kontroli surowic testem ELISA potwierdzono badaniem przeciwciał swoistych w żółtku jaj pochodzących ze stada P. Ogółem, spośród 43 jaj badanych 10 (23%) wykazywało dodatni wynik ELISA, przy czym wartość współczynnika OD w tym przypadku wahała się od 0,618 do 1,262 (tab. 2). Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie transowarialnej drogi rozprzestrzeniania się choroby. Badania innych autorów (1, 7, 13) wykazały, że droga ta jest najbardziej efektywną drogą zakażenia drobiu i szerzenia się wirusa między pokoleniami. Payne i wsp. (7, 8) stwierdzili ponadto, że pisklęta 1-dniowe ras nieśnych po dootrzewnym zakażeniu wirusem ALV-J zawsze wytwarzają przeciwciała neutralizujące, podczas gdy u piskląt ras mięsnych prawie zawsze rozwija się wiremia. Cecha ta, jak się wydaje, jest szczególnie istotna zarówno z punktu widzenia samej patogenezы wirusa, jak i epizootologii zakażeń dużych stad drobiu. Badania tropizmu szczepu HPRS-103, prototypu wirusa ALV-J wykazały, że w przeciwieństwie do szczepów podgrupy A wykazuje on szczególne powinowactwo do komórek szeregu mielocytarnego. W mniejszym stopniu atakuje on komórki torby Fabrycjusza i indukuje powstanie formy mieloidealnej, a nie postaci limfoidalnej (1).



Ryc. 2. Elektroforegram reakcji PCR z próbkami DNA izolowanymi z leukocytów krwi kur dorosłych. M – marker; 1, 27 – wynik ujemny, 2-26 i 28-52 – próbki DNA ptaków badanych

Kontrola materiału genetycznego wirusa białaczki mieloblastycznej w fermie P przy pomocy reakcji PCR wykazała 14 wyników dodatnich przy użyciu sekwencji nukleotydów dwóch primerów (H5 i H7) genu env wirusa ALV-J. Wielkość otrzymanego prążka DNA wynosiła 545 pz i była ona typowa dla tego wariantu wirusa białaczki drobiu. Wyrazistość poszczególnych prążków amplikonu nie była jednakowa i zależała od próbki badanego DNA. Ogółem, spośród 52 próbek DNA pełnej krwi kur dorosłych stwierdzono tylko 4 wyniki zgodne (286, 302, 314 i 315) z wynikami testu ELISA (ryc. 2). W efekcie prążki amplikonów DNA reakcji PCR były wyraźnie zaznaczone tylko u tych ptaków, u których stwierdzono wysokie wartości OD w teście ELISA (314 i 315).

Przeprowadzone badania stanowią potwierdzenie rezultatów uzyskanych przez innych autorów (2, 9, 10). Smith i wsp. (9) stosując podobną metodykę reakcji PCR wykazali obecność identycznych prążków DNA w próbkach krwi, skrawkach grzebienia, skórze palców nóg kurcząt zakażonych doświadczalnie oraz w monocytach krwi obwodowej kurcząt brojlerów w warunkach zakażenia naturalnego. W doświadczalnym zakażeniu 16 kurcząt 79-dniowych rasy nieśnej linii Brl szczepem HPRS-103 w fazie embrionalnej, obecność wirusowego DNA metodą PCR wykazano u 5 sztuk zarówno w surowicy, w pełnej krwi, jak i brodawkach piór. W zakażeniu kontaktowym wykazano ujemny wynik reakcji PCR, podczas gdy badaniem serologicznym dodatni wynik kontroli stwierdzono tylko u jednego z kurcząt 45-dniowych i u 5/5 kurcząt 79-dniowych. Kontrola kurcząt rasy mięsnej linii 21 metodą PCR wykazała identyczny wynik po zakażeniu doświadczalnym, podczas gdy po zakażeniu kontaktowym liczba wyników dodatnich wynosiła: u kurcząt 16-dniowych 1/5 i 4/5 u kurcząt 31-, 45- i 79-dniowych. W innym badaniu autor podkreśla, że stosując test PCR na bazie primerów DNA genu env wirusa białaczki ALV-J, uzyskuje się szybką, czułą i wy-

soce specyficzną metodę diagnostyczną. W efekcie stosowano trzy warianty metody PCR. W jednej z nich użyto pary primerów H5 i H2 wykrywającej amplikon DNA dla prototypu HPRS-103 wirusa ALV, zaś w drugiej – primerów H5 i H7 pozwalających na wykrywanie wariantów wirusa podgrupy J. Trzecią parę stanowiły primery H5 i AD1 pozwalające na wykrywanie wszystkich innych wariantów wirusa białaczki drobiu należących do podgrupy A-E.

Reasumując należy stwierdzić, że przeprowadzone badania wykazały obecność swoistych przeciwciał dla wirusa białaczki mieloblastycznej (ALV-J) w próbkach surowic testem ELISA oraz obecność wirusowego DNA w pełnej krwi przy użyciu reakcji PCR. Jak wykazano, z epizootycznego punktu widzenia choroba w mniejszym stopniu dotyczy stad młodych, a rozwija się głównie wśród ptaków dorosłych. Stosując test PCR na bazie dwóch primerów DNA genu env (H5 i H7) wirusa ALV-J uzyskuje się szybką, czułą i wysoce specyficzną metodę diagnostyczną. W świetle omawianego problemu, patogeneza i profilaktyka chorób nowotworowych drobiu w Polsce wymaga nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej i nowych rozwiązań ich różnicowania. Przedstawiony problem jest nie tylko ważnym zagadnieniem naukowym, ale stanowić może istotne zagadnienie natury epizootycznej i gospodarczej.

Piśmiennictwo

1. Arshad S., Howes K., Barron G., Smith J., Russel P., Payne L.: Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leucosis virus and a derivative acutely transforming virus. *Vet. Pathol.* 1997, 34, 127-137.
2. Bai J., Howe K., Payne L., Skinner M.: Sequence of host range determinants in the env gene of a full-length, infectious virus proviral clone of exogenous avian leucosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *J. Gen. Virol.* 1995, 76, 181-187.
3. Fady A., Smith E.: Isolation and some characteristics of a subgroup-J-like avian leucosis virus association with myeloid leucosis in meat-type chickens in the United States. *Avian Dis.* 1999, 43, 391-400.
4. Klintevall K., Ballagi-Pordany A., Naslund 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.
5. Minta Z., Śmietanka K.: Current status of avian leucosis virus infection in Poland. *Proc. XII Internat. Congress WVPA, Cairo, Egypt 17-21 September 2001*, s. 309.
6. Payne L., Brown S., Bumstead N., Howes M.: A novel subgroup of exogenous avian leucosis virus in chicken. *J. Gen. Virol.* 1991, 72, 801-807.
7. Payne L., Gillespie A., Howes K.: Myeloid leukaemogenesis and transmission of the HPRS-103 strain avian leukosis virus. *Leukemia* 1992, 6, 1167-1176.
8. Payne L., Gillespie A., Howes K.: Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leucosis induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Avian Dis.* 1993, 37, 438-450.
9. Smith E., Williams S., Fady A.: Detection of avian leucosis virus subgroup J using polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 1998, 42, 375-380.
10. Smith L., Brown S., Howes K., McLeod S., Arshad S., Barron G., Venugopal K., McKay J., Payne L.: Development and application of polymerase chain reaction (PCR) test for the detection of subgroup J avian leucosis virus. *Virus Res.* 1998, 54, 87-98.
11. Szeleszczuk P.: Białaczka podtypu J – problem wymagający pilnego rozwiązania. *Magazyn Drob.* 1998, 11, 20-25.
12. Szeleszczuk P.: Problemy w praktycznej diagnostyce białaczek ptasich. *Magazyn Wet. Supl. Drób* 1999, 2, 6-11.
13. Russell P., Shmad K., Howes K., Payne L.: Some chickens which are viremic with subgroup J avian leucosis virus have antibody-forming cells but no circulating antibody. *Res. Vet. Sci.* 1997, 63, 81-83.