

# Charakterystyka mutantów genetycznych wirusa enzoptycznej białaczki bydła i ich znaczenie w diagnostyce serologicznej

LEOKADIA BICKA, MARZENA ROLA, BOŻENNA KOZACZYŃSKA,  
JAN STEC, JACEK KUŹMAK

Zakład Biochemii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Bicka L., Rola M., Kozaczyńska B., Stec J., Kuźmak J.

## Characteristics of genetic mutants of bovine leukaemia virus and their role in serodiagnosing BLV infections

### Summary

Genetic variations of the Deltaretrovirus genus appear to be minimal compared to lentiviruses. Nevertheless, some recent data has strengthened the hypothesis that infected cattle can carry BLV variants that have escaped antibody detection. The aim of the present study was to determine the nature of BLV genetic variability and its implications on the effectiveness of serodiagnosing BLV infections using the ELISA. Proviral DNA of BLV was analyzed from 116 seronegative cows selected out of 201 dairy cattle from nine herds. A 286 bp fragment of BLV provirus, including 3' end of env gene encoding for F, G, H epitope of gp51 glycoprotein, was amplified from 18 samples and analyzed by single-strand conformation polymorphism. SSCP analysis of all isolates identified three migration profiles with distinct conformation polymorphism that corresponded with sequence-determined genetic diversity. Sequence analysis of ten isolates indicated that nucleotide changes were located predominantly within the sequence encoding epitopes and led to amino acid substitutions. The following amino acid changes were found: Ala→Thr at position 48 for epitope G, in all ten isolates, Ala/Lys→Pro/Glu at positions 73/74 for epitope GG, in four isolates and Ser→Ala at position 58 for epitope H, in one isolate. No amino acid changes for epitope F were found. The results established that genetic variants of BLV with certain amino acid substitutions within gp51 epitopes may exist and that SSCP analysis can be useful to determine the genetic variability of BLV without the need for sequencing.

**Keywords:** bovine leukemia, genetic variants, SSCP

Czynnikiem etiologicznym enzoptycznej białaczki bydła jest wirus Bovine Leukemia Virus (BLV), należący do rodziny *Retroviridae* i tworzący wspólnie z wirusami białaczki limfocytarnej ludzi i małp (HTLV-1, HTLV-2, STLV) odrębny rodzaj *Deltaretrovirus* (1). Retrowirusy, podobnie jak inne wirusy, wykorzystują szereg mechanizmów warunkujących przetrwanie w komórce gospodarza i wymknięcie się spod kontroli układu immunologicznego. Zmienność genomu retrowirusów, szczególnie genu env kodującego białka otoczki wirusa, jest tu jednym z najczęściej wykorzystywanych mechanizmów. Częste mutacje genu env lentivirusów np. HIV u ludzi czy FIV u kotów (13, 14), prowadzą do powstawania nowych zmutowanych form tzw. quasispecies, istotnie różniących się od pierwotnego wirusa. To z kolei, na drodze tzw. dryftu antygenowego, prowadzi do powstawania wariantów antygenowych, indukujących syntezę przeciwciał o innym powinowactwie, co eliminuje możliwość ich neu-

tralizującego działania i umożliwia wymknięcie się wirusa spod kontroli układu immunologicznego.

W przeciwieństwie do lentiwirusów stopień zmienności genetycznej wirusów grupy HTLV/BLV jest niewielki (2, 5, 10, 12, 15). Jednak, pomimo istnienia nieznacznej zmienności sekwencji genu env bliższa analiza mutacji wykazała, że dotyczą one wybranych fragmentów sekwencji, kodujących epitopy antygenowe warunkujące właściwości immunogenne glikoproteidu otoczki gp51. Znanych jest osiem epitopów, przy czym trzy z nich, F, G i H, determinują syntezę przeciwciał neutralizujących, wykrywanych przy użyciu powszechnie stosowanych testów AGID i ELISA (3). Znany jest fakt występowania zakażonych zwierząt charakteryzujących się brakiem przeciwciał przy równoczesnej obecności prowirusowego DNA-BLV, co sugerować może istnienie mutantów genetycznych BLV o zmniejszonej immunogenności (7, 11). Występowanie tego zjawiska może mieć krytyczne znaczenie dla czu-

łości testów serologicznych, zwłaszcza niektórych testów ELISA, wykrywających jedynie przeciwciała skierowane przeciw określonymu epitopowi.

Możliwość szerokiej analizy mutacji daje metoda SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism). Metoda ta polega na badaniu polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA i opiera się na różnicy w migracji w żelu niedenaturującym pojedynczych nici DNA wynikającej ze zmian ładunku elektrycznego i kształtu badanych fragmentów DNA. Ułatwia to szybką identyfikację zmian genotypów (rodzaj skryningu genetycznego). SSCP z powodzeniem stosowano do szybkiej identyfikacji mutacji w genomie takich reowirusów, jak: HIV-1 czy SIV (4, 8).

Celem pracy było zastosowanie metody SSCP do analizy mutantów genetycznych BLV oraz określenie związku tych mutacji z brakiem odpowiedzi serologicznej na antygen gp51 u bydła naturalnie zakażonego.

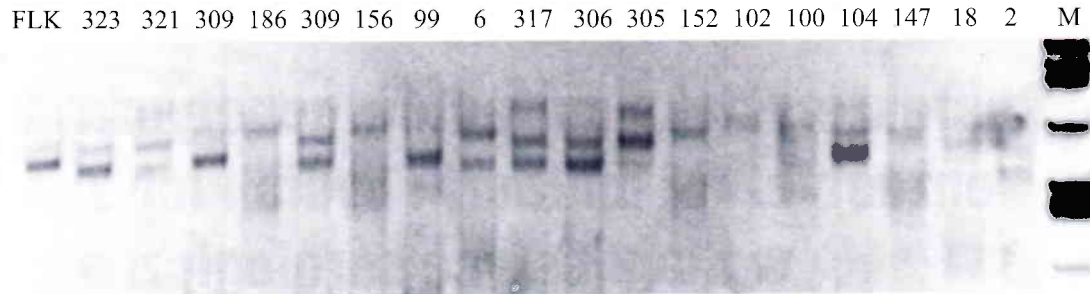
### Materiał i metody

**Zwierzęta.** Do badań użyto 201 krów, rasy holsztyńsko-fryzyskiej, w wieku od 2 do 10 lat, pochodzących z różnych stad. W celu zoptymalizowania możliwości wykrycia zwierząt zakażonych BLV wybrano te stada, w których uprzednio stwierdzano zakażenia tym wirusem.

**Badania serologiczne.** Surowicę krwi uzyskano przez wirowanie próbek krwi przy  $1500 \times g$  przez 15 min. Oznaczanie przeciwciał dla BLV przeprowadzono testem ELISA produkcji firmy Synbiotics i Institute Pourquier (Francja), zgodnie z zaleceniem producenta.

**Preparatyka DNA.** Próbkę krwi z antykoagulantem (EDTA-Na) wirowano przy  $1500 \times g$  przez 15 min., zbierano kożuszek leukocytów i po hemolizie erytrocytów komórki płukano w PBS i zawieszano w koncentracji  $2 \times 10^6$ . Genomowy DNA otrzymano z leukocytów krwi przy użyciu zestawu Blood DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Gdańsk). Jako kontrolę dodatnią wykorzystano DNA uzyskany z komórek linii FLK-BLV. Koncentrację DNA określano spektrofotometrycznie przy 260 nm i przygotowano próbki tak, aby każda z nich zawierała 1  $\mu g$ .

**Metoda PCR.** Do amplifikacji fragmentu prowirusowego DNA kodującego epitopy białka gp51 zastosowano metodę nested PCR wykorzystując następujące oligonukleotydy: E4 5'-CCTGGC GTTTGCTGAAAGCCTT-3' i SS1 5'-AAACCGGCGCCGCCCTTGTGGG-3', jako primery zewnętrzne oraz SS2 5'-CGACGGTCCCGAAGACGCC-3' i SS3 5'-AA CAACAACCTC TGGGAAGG-3', jako primery wewnętrzne. Amplifikowany fragment miał długość 286 pz i zawierał sekwencje kodujące epitopy F, G i H. Reakcja amplifikacji prowadzona była przez 40 cykli



Ryc. 1. Analiza SSCP fragmentu 286 pz. Ścieżki zawierają kolejno: DNA z komórek FLK, analizowane próby oraz marker masy molekularnej-Ladder 100 bp (Fermentas)

w następującym profilu temperatury:  $94^{\circ}C$  przez 45 s,  $68^{\circ}C$  przez 1 min.,  $72^{\circ}C$  przez 1 min. 30 s oraz  $72^{\circ}C$  przez 10 min. Składnikami mieszaniny reakcyjnej były: 1  $\mu g$  genomowego DNA, 0,2 mM dNTPs, 25 pmol każdego z primerów, 2,5 jed. Taq polimerazy (Finzymes),  $10 \times$  stężony bufor. W reakcji PCR użyto polimerazy Hot Start (Promega). Reakcje prowadzono w termocyklerze firmy Biometria i Perkin-Elmer. Produkty amplifikacji analizowano elektroforetycznie na 1,4% żelu agarozowym w obecności markera masy molekularnej (100 bp Ladder, Fermentas).

**Sekwencjonowanie DNA.** Produkty amplifikacji oczyszczano z żelu przy użyciu zestawu Blue Gene Machine System (Kucharczyk). Sekwencjonowanie przeprowadzono w IBB w Warszawie przy użyciu Automatic DNA sequencer (Applied Biosystem). Do analizy sekwencji wykorzystano program MegAlign-DNASTar i znane sekwencje klonu belgijskiego BLV LB285 (GenBank Acc. Nr M35240), klonu FLK-BLV (M35242) i klonu australijskiego BLV A1.

**Metoda SSCP.** 10  $\mu l$  reakcji nested PCR rozcieńczano 1 : 2 z buforem denaturującym (95% formamidu, 0,05% błękitu bromofenylowego, 0,05% ksyklencyanolu), denaturowano przez ogrzewanie w temp.  $95^{\circ}C$  przez 5 min. i poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu na 8% żelu poliakrylamidowym zawierającym 8% glicerolu. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (53 mM Tris-HCl, 53 mM kwasu borowego, 1,5 mM EDTA<sub>2</sub>Na) przez 6 godz. w temp.  $6^{\circ}C$ , wykorzystując Protean II Apparatus (BioRad). Po rozdzielaniu żel barwiono w roztworze bromku etydyny w buforze TBE (0,5  $\mu g/ml$ ) i analizowano profile migracyjne DNA, wykorzystując Gel-Doc (BioRad).

### Wyniki i dyskusja

Punktem wyjścia dla omawianych badań nad analizą mutacji w genie env, kodującym epitopy antygenowe białka gp51 BLV i ich związkiem z brakiem odpowiedzi serologicznej na to białko były badania serologiczne testem ELISA, potwierdzające występowanie swoistych przeciwciał u 85 krów i ich brak u 116. W kolejnym etapie badania metodą PCR poddano 116 próbek DNA od serologicznie ujemnych zwierząt, wykazując obecność fragmentu 286 pz u 18 z nich. Produkt tej amplifikacji poddano następnie analizie metodą SSCP, wykazując różnice profili migracyjnych, reprezentujących poszczególne klony prowirusa, w odniesieniu do próbki wzorcowej tj. DNA izolowanego z komórek linii FLK. Charakterystyczny był fakt, że

FLK - BLV	CGACGGTCCCAGAACGCCACCAACCGATCATCAGATGGGTAAGTCTCACTCTCACTCTCCTCGCTCTCTGTGCGGCCATCCAGACTTGGAGATGCTCCC
B 320 B1	.....T.....A.....
B 323 B2	.....C.T.....A.....
B 156 A1	.....T.....T.....A..T.....
B 186 A1	.....T.....T.....A..T.....
B 147 A2	.....T.....T.....A..T.....
B 152 A2	.....T.....T.....A..T.....
B 002 C	.....T.....A.....
B 6 C	.....T.....A.....
B 18 C	.....T.....A.....
B 204 C	.....T.....A.....

	G	H	H		
FLK-BLV	TGTCCTAGGAAACCAACAATGGATGACA	GCA	TATAACCAAGAGGCAAAATTT	TCCATCTCCA	TGACCAAACTACTAGAGGCTCATAATCAGTCACCTTT
B 320 B1	.....T.....	A.....T.....	.....	.....G.....	.....A.....
B 323 B2	.....T.....	A.....	.....G.....	.....	.....A..G.....
B 156 A1	.....G..T.....	A.....	.....	.....	.....A.....
B 186 A1	.....G..T.....	A.....	.....	.....	.....A.....
B 147 A2	.....G..T.....	A.....	.....	.....	.....A.....
B 152 A2	.....G..T.....	A.....	.....	.....	.....A.....
B 002 C	.....T.....	A.....	.....	.....	.....A.....
B 6 C	.....T.....	A.....	.....	.....T.....	.....A.....
B 18 C	.....T..G.....	A.....G.....	.....	.....	.....A.....
B 204 C	.....T.....	A.....	.....	.....	.....C..C..A.....

	G G	F
FLK -BLV	CTGTGCCAAGTCTCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCA	CAAGGGCGGCGCCGGT
B 320 B1	.....C..G.....T.....T.....T.....	.....
B 323 B2	.....C..G.....T.....T.....T.....	.....
B 156 A1	.....C..GA.....T.....T..C.....T.....	.....
B 186 A1	.....C..GA.....T.....T..C.....T.....	.....
B 147 A2	.....C..GA.....T.....T..C.....T.....	.....
B 152 A2	.....C..GA.....T.....T..C.....T.....	.....
B 002 C	.....C..G.....T.....T.....T.....	.....
B 6 C	.....C..G.....T.....T.....T.....	.....
B 18 C	.....C..G.....C..T.....T.....T.....	.....
B 204 C	.....C..G.....T.....T.....T.....	.....

Ryc. 2. Porównanie sekwencji fragmentu genu env 10 klonów BLV z sekwencją BLV z komórek FLK

pomimo istniejących różnic możliwe było zgrupowanie identycznych profili w czterech grupach A1, A2, B i C. Grupę A1 tworzyły klony 156, 186 i 102, grupę A2 klony 147 i 152, a grupę B klony 321, 323, 317, 309, 306. Do grupy C zakwalifikowano klony 204, 2, 6, 18, 99 reprezentujące profile znacząco różniące się pomiędzy sobą. Klony 305, 104 i 317 wykazały profile podobne do profilu charakterystycznego dla DNA z komórek FLK (ryc. 1).

W celu określenia, czy istnieje związek pomiędzy profilami migracyjnymi a zmianami w sekwencji genu env, produkty amplifikacji 10 klonów prowirusa, reprezentujące profile grup A1, A2, B i C poddano sekwencjonowaniu. Na ryc. 2 zestawiono te sekwencje porównane z sekwencją genu env, uzyskaną z komórek FLK. Generalnie w zależności od klonu różnice sekwencji wynosiły od 3,5% do 5,2%. Było charakterystyczne, że oprócz dziesięciu mutacji punktowych występujących w sposób przypadkowy w pięciu klonach, wszystkie pozostałe zlokalizowane były w ściśle określonych miejscach. Pośród nich w 5 przypadkach mutacja polegała na zmianie C→T (pozycje 4868, 4947, 5065, 5075, 5090), w trzech przypadkach na zmianie G→A (pozycje 4906, 4962, 5024), po jednym przypadku na zmianie G→C (5037) i zmianie A→G (5042). Warty podkreślenia jest fakt, że niektóre z tych zmian dotyczyły epitopów białka gp51. We wszyst-

kich analizowanych klonach całkowitej zmianie uległ epitop G (4962-4965), w którym nastąpiła zamiana kodonu GCA→ACA i w efekcie zamiana aminokwasu alaniny→treoninę. W epitopie GG (5036-5039) zmiana kodonów GCCAAG→CCCGAG spowodowała zmianę aminokwasów alaniny→prolinę i lizyny→kwas glutaminowy. Stosunkowo niewielkie zmiany dotyczyły epitopu H (4992-4995). Jedynie w przypadku klonu 323 mutacja w kodonie TCC→GCC spowodowała zmianę aminokwasu seryny→alaninę. Nie zanotowano żadnych zmian w drugim epitopie H oraz epitopie F, zlokalizowanym w pozycji 5103-510.

W prezentowanych badaniach technika SSCP została zastosowana do wykazania genetycznej zmienności pośród populacji prowirusowego DNA wirusa BLV wykrywanego u naturalnie zakażonego bydła. Genetyczna zmienność w odniesieniu do techniki SSCP określa zmianę profilu migracyjnego pojedynczych nici DNA, obserwowaną w badanych próbkach w porównaniu do profilu przyjętego za wzorec. Dla diagnostyki zakażeń BLV krytyczny jest związek zmienności genetycznej z powstawaniem mutantów „wymykających” się spod kontroli immunologicznej organizmu. Ponieważ decydującą rolę w tym procesie odgrywają swoiste przeciwciała skierowane przeciw antygenowi gp51 w analizowanych badaniach skoncentrowano się na analizie zmienności sekwencji w obrębie epitopów

geny env kodujących antygeny powierzchniowe (gp51). Do badań tych wybrano zwierzęta z potwierdzoną obecnością prowirusowego DNA, lecz pozbawione obecności swoistych przeciwciał, co do których istniało podejrzenie wystąpienia mutacji unieczyniających poszczególne epitopy, zlokalizowane w końcu NH<sub>2</sub> białka gp51. Dowiodła tego analiza sekwencji dziesięciu wybranych klonów, w których większość mutacji nie miała charakteru przypadkowego, ale dotyczyła głównie epitopu G. Związane to było z zamianą alaniny na treoninę w pozycji 48 oraz alaniny na prolinę w pozycji 73, a dodatkowo w przypadku 4 izolatów, 156, 186, 147 i 152, z zamianą lizyny na kwas glutaminowy w pozycji 74. Dodatkowo izolat 323 posiadał zmienioną serynę na alaninę w pozycji 58 i, jak potwierdzili to Mamoun i wsp. (9), ta zamiana polarnego aminokwasu na aminokwas hydrofobowy powoduje obniżenie immunoreaktywności, co równoznaczne jest ze zredukowaniem immunogennej aktywności epitopu H. Dlatego na podstawie przeprowadzonych badań 9 z analizowanych klonów ocenić można jako F<sup>+</sup>G<sup>-</sup>H<sup>+</sup>, a klon 323 jako F<sup>+</sup>G<sup>-</sup>H<sup>+/-</sup>. Wyniki te potwierdzają, że pojedyncze mutacje genu env mogą indukować powstawanie wariantów antygenowych BLV i w istotny sposób komplikować diagnostykę serologiczną. Potwierdziły to ostatnio przeprowadzone badania w Niemczech, wskazujące na możliwość izolacji mutantów genetycznych prowirusa BLV od bydła z ujemną reakcją serologiczną (6). Występowanie takich wariantów ma również inny aspekt. Ponieważ epitopy F, G, H zlokalizowane są na końcu NH<sub>2</sub> białka, prawdopodobnie reprezentują domenę białkową wchodzącą w interakcje z receptorami komórkowymi. Pociąga to za sobą zmienioną infekcyjność takich wariantów wirusa lub ich zmienione powinowactwo do komórek.

Jest charakterystyczne, że osobniki u których zanotowano występowanie takich mutacji zlokalizowane były głównie w stadach o niskim odsetku zakażonych zwierząt. Ponieważ u osobników takich wykrycie zakażenia nie jest możliwe przy użyciu rutynowych metod serologicznych, zastosowanie metody SSCP pozwala na szybką analizę występowania mutantów BLV oraz pozwala ocenić skalę zakażeń przez nie wywołanych. Wykazana w omawianych badaniach zgodność profilu migracyjnego odpowiadająca mutacjom dotyczącym poszczególnych epitopów wskazywać może na możliwość szerokiego wykorzystania techniki SSCP do identyfikacji wariantów genetycznych BLV.

### Piśmiennictwo

1. Anon.: Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses 2000.
2. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuźmak J.: Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 2001, 114, 252-256.
3. Bruck C., Mathot S., Portetelle D., Berte C., Franssen J. D., Herion P., Burny A.: Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. Virology 1982, 122, 342-352.
4. Campbell B., Hirsch V.: Extensive envelope heterogeneity of simian immunodeficiency virus in tissues from infected macaques. J. Virol. 1994, 68, 3129-3137.
5. Coulston J., Naif R., Brandon S., Kumar S., Khan S., Daniel R., Lavin F.: Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukemia virus DNA: comparison with other isolates. J. Gen. Virol. 1990, 71, 1737-1746.
6. Fechner H., Blankenstein P., Looman A. C., Elwert J., Geue L., Albrecht C., Kurg A., Beier D., Marquardt O., Ebner D.: Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. Virology 1997, 237, 261-269.
7. Licursi M., Inoshima Y., Wu D., Yokoyama T., Gonzales E., Sentsui H.: Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. Virus Res. 2002, 86, 101-110.
8. Lin H., Siwak E., Lauder I., Hollinger F.: Single-strand conformational polymorphism study of human immunodeficiency virus type 1 RNA and DNA in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and their virologic cultures. J. Inf. Dis. 1995, 171, 1619-1622.
9. Mamoun R., Morisson M., Rebeyrotte N., Busetta B., Couez D., Kettmann R., Hospital M., Guillemain B.: Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. J. Virol. 1990, 64, 4180-4188.
10. Mansky L., Temin H.: Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. J. Virol. 1994, 68, 494-499.
11. Portetelle D., Couez D., Bruck C., Kettmann R., Mammerickx M., Van der Maaten M., Brasseur R., Burny A.: Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acids substitutions in the NH<sub>2</sub> part of the envelope glycoprotein gp51. Virology 1989, 169, 27-33.
12. Reichert M.: Characterization of the genetic variants of bovine leukemia provirus isolated in Poland. Ann. Univ. Maria Curie-Skłodowska, Sectio DD 2000, 55, 93-106.
13. Simmonds P., Balfe P., Ludlam C. A., Bishop J. O., Brown A. J. L.: Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of external glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 1990, 64, 5840-5850.
14. Sodora D. L., Shpaer E. G., Kitchell B. E., Dow S. W., Hoover E. A., Mullins J. I.: Identification of the feline immunodeficiency virus (FIV) and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. J. Virol. 1994, 68, 2230-2238.
15. Willems L., Thienpont E., Kerkhofs P., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R.: Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastain variability. J. Virol. 1993, 67, 1086-1089.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Kuźmak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: jkuźmak@piwet.pulawy.pl

### ROWAN T. G., SARASOLA P., SUNDERLAND S. J., GILES C. J., SMITH D. G.: Skuteczność danofloksacyny w leczeniu chorób układu oddechowego bydła europejskiego. (Efficacy of danofloxacin in the treatment of respiratory disease in European cattle). Vet. Rec. 154, 585-589, 2004 (19)

Zbadano skuteczność danofloksacyny w leczeniu chorób układu oddechowego cieląt w fermach bydła we Francji, Irlandii i Zjednoczonego Królestwa. Preparat w formie iniekcji zawierającej 180 mg substancji czynnej/ml zastosowano u cieląt w wieku od 1 tygodnia do 15 miesięcy w jednorazowej iniekcji podskórnej, w dawce 6 mg/kg. Jeżeli zaistniała konieczność, iniekcje powtórzone po 2 dniach. W grupie kontrolnej zastosowano tilmakozynę w dawce 10 mg/kg. Przed leczeniem z wymazów z jamy nosowej chorych zwierząt izolowano *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* i *Haemophilus somnus*. Objawy kliniczne ustępowały szybciej u 178 cieląt, które otrzymały dwukrotnie danofloksacynę niż u 90 cieląt leczonych tilmakozyną. W obydwu grupach wystąpiło statystycznie istotne obniżenie wewnętrznej temperatury ciała i nasilenia objawów choroby. Danofloksacyna zastosowana w stężeniu 180 mg/kg nie daje objawów niepożądanych, zaś jej skuteczność chorobach układu oddechowego jest taka sama jak tilmakozyny.