

JACEK KUŹMAK, JADWIGA GRUNDBOECK, BOŻENA KOZACZYŃSKA

Wykrywanie prowirusowego DNA wirusa białaczki bydła metodą polymerase chain reaction (PCR)

Zakład Biochemii, Instytut Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Detection of the bovine leukaemia proviral DNA in cattle by the polymerase chain reaction (PCR)

Using the PCR method the proviral sequence of the bovine leukaemia virus was detected in the peripheral blood leukocytes of cattle from an infected herd. BLV antibodies were determined by the ELISA and AGID tests. PCR amplification was performed with one set of 20-mer oligonucleotide primers that should produce a 364 bp fragment of BLV-DNA located in the gag gene region. The reaction products were analyzed in 1.4% agarose, blotted to Hybond-N filter by the Southern method and probed with an 8.3 kb Sac I fragment of BLV, labelled with digoxigenin-dVTP. In 23 animals examined by PCR the presence of proviral DNA was found in all serologically positive animals and also in three serologically negative animals. BLV-DNA was not detected in only one seropositive individual. The presented findings indicate that the determination of the proviral DNA of BLV using the PCR method is more sensitive than serological tests and it should be beneficial for the diagnosis of cattle infection with BLV.

Enzootyczna białaczka bydła jest zakaźną chorobą bydła, której czynnikiem etiologicznym jest wirus (Bovine Leukemia Virus-BLV) (25). W cyklu rozwojowym wirusa jego materiał genetyczny zostaje zintegrowany z genomem komórki w formie tzw. prowirusa. Zawiera on pełną informację genetyczną BLV przepisaną za pomocą enzymu, odwrotnej transkryptazy, z wirusowego RNA na DNA. W zakażonych limfocytach prowirusowy DNA zostaje zintegrowany z genomem komórki w niewielkiej liczbie kopii, przy czym liczba zakażonych limfocytów nie przekracza 10% (18). *In vivo* u zakażonych zwierząt nie obserwuje się wirerii, ponieważ transkrypcja białek wirusowych jest blokowana i BLV pozostaje w stanie latencji (7). Jednak, pomimo braku wykrywalnej replikacji wirusa, u zakażonych zwierząt pojawiają się przeciwciała dla antygenów wirusa, które nie eliminują go jednak i zwierzę pozostaje zakażone na całe życie. Dlatego diagnostyka białaczki bydła opiera się na wykrywaniu swoistych dla antygenów wirusowych przeciwciał. Brak odpowiedzi serologicznej nie jest jednak równoznaczny z brakiem zakażenia, którego miernikiem jest obecność prowirusowego DNA zintegrowanego z genomem komórki.

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój diagnostyki chorób zakaźnych opartej o wykorzystywanie metod biologii molekularnej. Jedną z najnowocześniejszych technik, znaną od 1985 roku, jest metoda PCR (Polymerase Chain Reaction) (31), tłumaczona na język polski jako enzymatyczna amplifikacja DNA lub synteza łańcuchowa fragmentów DNA przy użyciu specyficznych primerów. W metodzie tej para oligonukleotydów spełniających rolę primerów, komplementarna do sekwencji ograniczających z końców 5' i 3' amplifikowany region, jest wykorzystywana do zainicjowania syntezy DNA *in vitro*. W następstwie cyklicznej denaturacji, hybrydyzacji primerów i syntezy

komplementarnego do matrycy DNA, przy użyciu enzymu Taq polimerazy, następuje bardzo wydajna (10^5 – 10^6) amplifikacja danego fragmentu DNA.

Jako metoda diagnostyczna PCR znalazła zastosowanie w diagnostyce licznych zakażeń wirusowych (1, 5, 15, 24) i bakteryjnych (6, 12, 16).

W prezentowanej pracy opisano wykorzystanie tej metody do wykrywania prowirusowego DNA wirusa BLV w limfocytach krwi obwodowej zakażonego bydła.

Materiał i metody

Preparatyka leukocytów. Do izolacji leukocytów krew pobierano z żyły skórnej brzucha w ilości 40 ml z dodatkiem wersenianu. Krew wirowano 30 min. przy 2500 obr/min., zbierano kożuszek leukocytów i hemolizowano erytrocyty szokiem osmotycznym. Leukocyty były płukane 2 razy w PBS i zawieszane w 5 ml buforu TNE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Krew do badań pobrano od 23 krów ze stada, w którym stwierdzono wysoki procent zwierząt serologicznie dodatnich i od 5 krów ze stada, w którym od kilku lat nie stwierdzano zwierząt z wynikami dodatnimi.

Preparatyka DNA. Zawiesinę leukocytów inkubowano przez noc z 0,1% SDS i 200 µg/ml proteinazy K (Boehringer). Następnie próby ekstrahowano dwa razy mieszaniną fenol-chloroform 1:1 oraz samym chloroformem i precipitowano zimnym etanolem w obecności 0,1 objętości 5M NaCl. Po odwirowaniu i wysuszeniu osad DNA zawieszano w buforze TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Zawartość DNA określano spektrofotometrycznie. W ten sam sposób preparowano DNA z komórek linii ciągłej FLK, peramentnie zakażonej wirusem BLV, używanej jako kontrola dodatnia reakcji.

Oligonukleotydy. Jako primerów użyto dwóch oligonukleotydów (20 mer) zsyntetyzowanych przy użyciu 381 A DNA Synthesizer Automatic (Applied Biosystem). Sekwencje oligonukleotydów oparto na sekwencji prowirusowego DNA podanej przez Sagatę i wsp. (32). Ich pozycje i sekwencje były następujące: primer JG1 1420-/5'-GCTGACAACCTTCCCGACGG-3'/ — 1440, primer JG2 1764-/5'-CCATTGGAAACGAGACTGTC-3'/ — 1784. Region amplifikowany zlokalizowany był w obrębie genu gag i obejmował fragment 364 par zasad (pz).

Amplifikacja DNA. Do reakcji użyto po 5 µl 10 mM roztworu każdego z trojfosforanów dezoksyrybonukleotydów (Boehringer), 5 µl 10 mM roztworu każdego z primerów, 5 µl 10 × buforu dla Taq polimerazy (0,67 M Tris-HCl pH 8,8, 0,67 M MgCl₂, 0,166 M (NH₄)₂SO₄) oraz 1 µg DNA, otrzymanego według metodyki podanej poprzednio. Mieszaninę uzupełniano wodą do 50 µl i inkubowano 5 min. w 95°C. Po przeniesieniu do lodu dodawano 2,5 jednostki Taq polimerazy (Fermentas) i na mieszaninę nawarstwiano 50 µl oleju mineralnego (Sigma). Próby inkubowano 1,5 min. w 68°C, a następnie 2 min. w 72°C. Każdy następny cykl obejmował: denaturację — 1 min. 95°C, hybrydyzację — 1,5 min. 68°C, elongację — 2 min. 72°C. Łącznie wykonywano 25 cykli, przy czym elongacja w ostatnim cyklu trwała 7 min.

Analiza produktów amplifikacji. Po amplifikacji pobierano 5 µl z mieszaniny reakcyjnej i nanczono na 1,4% żel agarozowy, a następnie rozkładano elektroforetycznie przez 1,5 godz., prowadząc elektroforezę przy 70 V w buforze boranowym (50 mM Tris base, 50 mM H₂BO₃, 1 mM EDTA). Jako markera użyto DNA faga lambda trawionego Eco RI/Hind III (Sigma). Po elektroforezie żel barwiono 3 min. w buforze boranowym z 0,5 µg/ml bromku etydyny i fotografowano w świetle lampy UV/UVTM-19 Transilluminator (Hofer).

Specyficzność produktów amplifikacji potwierdzono me-

dotąd hybrydyzacji z sondą molekularną. W tym celu amplifikowany DNA przencszono z żelu na filtr nylonowy (Hybond-N) (Amersham) według metody Southerna i hybrydyzowano z sondą molekularną. Był nią plazmidowy DNA (pBLV) zawierający fragment SacI-SacI (8,3 kb) prowirusowego DNA otrzymany od dr R. Kettmanna (Faculty of Agronomy, Gembloux, Belgia), znakowany digoxigeniną. Prehybryzację, hybryzację, znakowanie sondy oraz immunoenzymatyczne wykrywanie produktów hybrydyzacji wykonano zestawem firmy Boehringer (DNA labeling and detection kit nonradioactive), zgodnie z zaleceniami producenta.

Oznaczanie przeciwciał. Analizę obecności swoich przeciwciał w surowicy krwi przeprowadzono testem immunodyfuzji w żelu (AGID) (13) i testem immunoenzymatycznym ELISA (Bioveta Nitra).

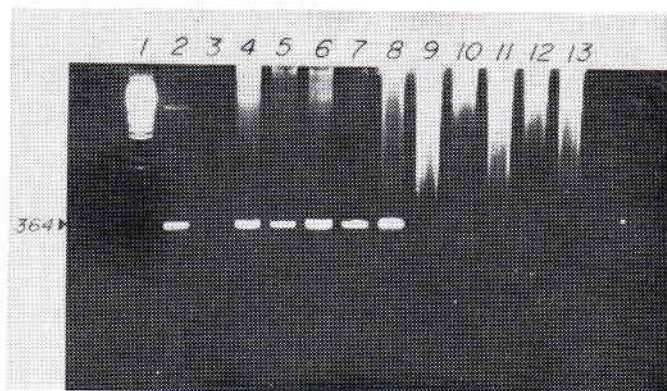
Wyniki i omówienie

W omawianej pracy przedstawiono zastosowanie metody PCR do wykrywania prowirusowego DNA wirusa białaczki bydła. Wybór jej podyktowany był licznymi zaletami, w porównaniu do klasycznie używanych metod hybrydyzacji DNA, takimi, jak: wyższa czułość, mniejsza czasochłonność, możliwość zbadania dużej liczby prób w krótkim czasie oraz brak konieczności stosowania izotopów. Walory te, szczególnie w odniesieniu do wykrywania zakażeń wirusem HIV, były podkreślane przez licznych autorów (14, 28). Dotychczas DNA-BLV wykrywany był klasyczną metodą hybrydyzacji wg Southerna z zastosowaniem sondy molekularnej znakowanej p³². Stosując to postępowanie Kettmann i wsp. (19) i Onuma i wsp. (29) wykazali obecność DNA-BLV w komórkach nowotworowych z węzłów chłonnych krów białaczkowych, a Cockerell i wsp. (8) oraz Gaudi i wsp. (11) jego obecność w limfocytach krwi bydła zakażonego.

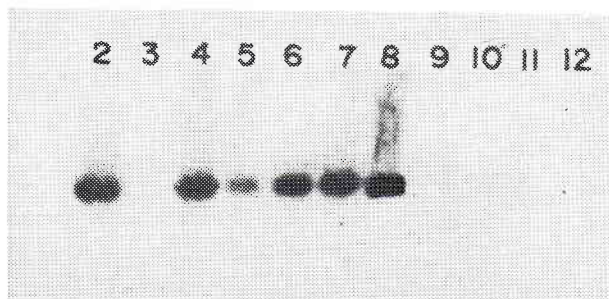
Technika PCR traktowana jako metoda skreeningowa wymaga optymalizacji i ścisłego określenia parametrów. Jako generalne kryterium jej użycia do oznaczania DNA-BLV przyjęto fakt, że BLV jest retrowirusem egzogennym dla bydła. Bowiem stosując jako sondę DNA komplementarny dla BLV, nie wykrywa się sekwencji homologicznych u bydła nie zakażonego (17).

Warunkiem skuteczności PCR jako metody diagnostycznej jest dobór odpowiedniej sekwencji primerów. Sekwencje te musi charakteryzować wysoka zachowawczość i unikalność, co przy metodzie PCR warunkuje z jednej strony zdolność hybrydyzacji primerów do matrycy, z drugiej — eliminuje występowanie nieswoistych hybrydyzacji primerów tzw. mispriming i w efekcie nieswoistą amplifikację. Jest interesujące, że wszyscy badacze stosujący metodę PCR do amplifikacji genu BLV (Wyatt i wsp. (34), Naif i wsp. (27), Brandon i wsp. (4), Ballagi-Pordany i wsp. (3)) wybierali sekwencje primerów z genu env, jakkolwiek badania porównawcze kilku różnych klonów BLV izolowanych w USA (Rice (31)), Japonii (Sagata (32)), Belgii (Dechamps (10)) i Australii (9)) wskazują na istnienie innych niż gen env fragmentów genu o niezmienniej sekwencji zlokalizowanych w sekwencjach regulatorowych tzw. Long Terminal Repeats (LTR) i w obrębie genu gag. Amplifikowany, w badaniach własnych, fragment zlokalizowany był w części genu gag, kodującej białko p24 i p12.

Na ryc. 1 przedstawiono elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji z użyciem różnego DNA. Charakterystyczny prążek odpowiadający fragmentowi 364 pb widoczny był w przypadku amplifikacji DNA izolowanego z leukocytów krwi krów zakażonych oraz



Ryc. 1. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji różnego DNA na 1,4% agarozie. Ścieżki: 1-marker, 2-pBLV, 3-brak DNA, 4-DNA z komórek FLK, 5-8 DNA z leukocytów krów zakażonych, 9-13 DNA z leukocytów krów nie zakażonych



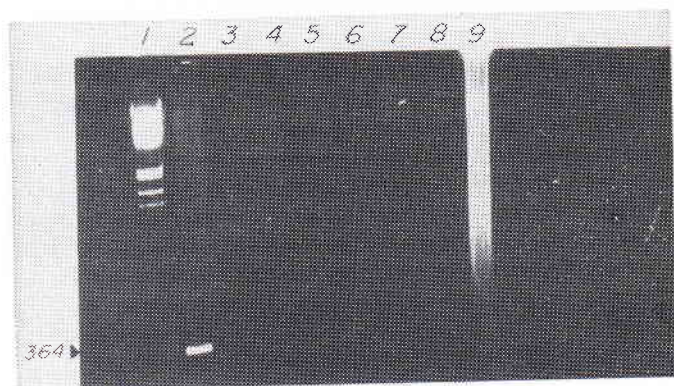
Ryc. 2. Immunoenzymatyczne wykrywanie produktów amplifikacji różnego DNA po hybrydyzacji z sondą molekularną. Oznaczenie ścieżek identyczne z ryc. 1

amplifikacji DNA izolowanego z komórek FLK i z plazmidu pBLV (dodatnia kontrola reakcji). Nie stwierdzono obecności fragmentu 364 pb przy amplifikacji DNA z leukocytów krwi krów niezakażonych, a także w próbie bez DNA.

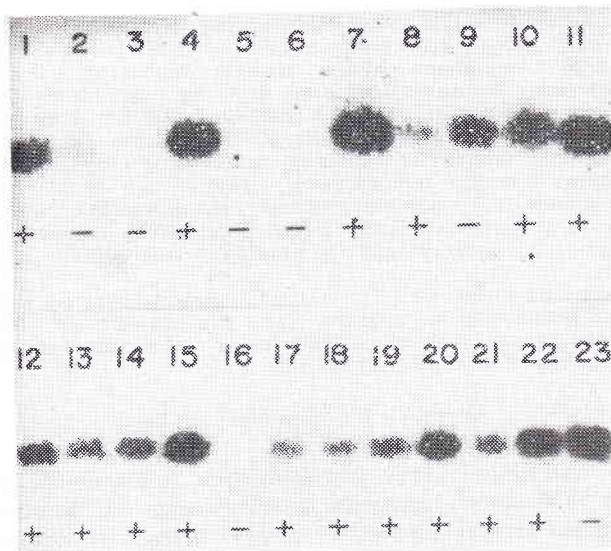
Specyficzność amplifikacji została potwierdzona przez hybrydyzację fragmentu 364 pb sondą molekularną (ryc. 2).

Ocenę czułości metody PCR przy amplifikacji różnych ilości matrycy DNA przedstawiono na ryc. 3. Badania te wykazały, że po barwieniu bromkiem etydyny możliwe jest wykrycie sekwencji BLV w 1 ng genomowego DNA, podczas gdy przy użyciu sondy molekularnej możliwe jest wykrycie BLV w 1 pg DNA (ryc. 4). Jest to ilość DNA znajdująca się średnio w jednym limfocycie. Z obserwacji Kettmanna i wsp. (18) wynika, że w limfocytach krów białaczkowych BLV pozostaje zintegrowany w niewielkiej liczbie kopii, 1—4 na diploidalny gen. Otrzymane rezultaty potwierdzają obserwacje Naifa i wsp. (27), że metodą PCR i hybrydyzacją produktów amplifikacji z sondą molekularną można wykryć co najmniej cztery kopie prowirusowego DNA-BLV. Te możliwości metody PCR potwierdzone zostały przez Leiba i wsp. (23), którzy wykazali obecność pojedynczych kopii DNA wirusa HSV w komórkach zakażonych myszy, przez Arrigo i wsp. (2) oraz przez Kwok i wsp. (20), którzy otrzymali podobne rezultaty w badaniach ilościowych RNA i DNA retrowirusów ludzkich.

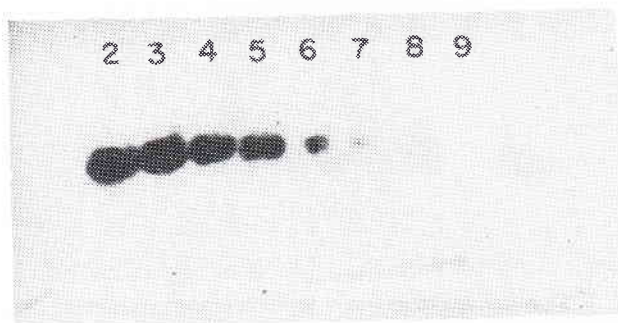
Amplifikacja DNA z leukocytów krwi 23 krów ze stada zakażonego wykazała obecność fragmentu 364 pb w 19 próbach DNA (ryc. 5). Równoległe badanie surowicy krwi tych samych zwierząt testami AGID i ELISA



Ryc. 3. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji z użyciem różnych ilości DNA. Ścieżki: 1-marker, 2-1 μ g DNA, 3-100 ng, 4-10 ng, 5-1 ng, 6-100 pg, 7-10 pg, 8-1 pg, 9-10 μ g DNA izolowanego z komórek FLK, 9-10 μ g DNA izolowanego z leukocytów krwi BLV (—)



Ryc. 5. Immunoenzymatyczne wykrywanie produktów amplifikacji DNA z leukocytów krwi 23 krów. (+), (—) — wyniki serologicznie dodatnie i ujemne



Ryc. 4. Immunoenzymatyczne wykrywanie produktów amplifikacji różnych ilości DNA po hybrydyzacji z sondą molekularną. Oznaczenie ścieżek identyczne z ryc. 3

wykazało obecność przeciwciał w 17 próbach. DNA-BLV stwierdzono u 16 serologicznie dodatnich zwierząt, a także u trzech serologicznie ujemnych. U jednego zwierzęcia, mimo obecności swoistych przeciwciał, metodą PCR nie wykryto prowirusowego DNA.

Otrzymane wyniki wykazały, że u trzech zwierząt mimo obecności prowirusa brak było wykrywalnych przeciwciał w surowicy krwi. Podobne zjawisko obserwowali Brandon i wsp. (4), którzy stwierdzili obecność DNA-BLV w limfocytach czterech z sześciu zakażonych owiec już po tygodniu od momentu zakażenia limfocytami krwi białaczkowej, podczas gdy serokonwersja z wyniku ujemnego na dodatni wystąpiła dopiero 33 dnia po zakażeniu. Interesujący jest jeden przypadek występowania u badanych zwierząt przeciwciał, mimo braku wykrywalnego prowirusowego DNA. Wynikać to może z faktu niewielkiej liczby kopii DNA-BLV dostępnej w metodzie PCR, względnie z obecności delcyjnego prowirusa, zawierającego delecję w amplifikowanym obszarze. Przykład takiego DNA-BLV, z rozległą delecją fragmentu genu env, opisany był przez Ogawę i wsp. (28). Prezentowana praca dotyczy nowego zagadnienia w diagnostyce białaczki bydła, jakim jest wykrywanie i identyfikowanie prowirusowego DNA. Określenie jego obecności w limfocytach krwi metodą PCR w połączeniu z zastosowaniem sondy molekularnej jest bardziej czułe od rutynowo stosowanych metod serologicznych. Biorąc pod uwagę fakt, że prowirus zintegrowany jest w niewielkiej liczbie kopii jedynie u około 10% limfocytów krwi obwodowej zakażonych zwierząt oraz fakt złożoności i wysokiego stopnia trudności w posługiwaniu się metoda-

mi biologii molekularnej, wykorzystanie PCR wydaje się być postępowaniem z wyboru przy identyfikowaniu zakażonych zwierząt na podstawie wykrywania prowirusowego DNA. Decyduje o tym wysoka czułość metody i krótki czas badania. Praktycznie od momentu dostarczenia krwi, przy posiadaniu zorganizowanego warsztatu laboratoryjnego, w ciągu 2—3 dni można otrzymać wynik badania. Możliwe jest to przy wykorzystaniu tzw. termocyklerów, umożliwiających automatyzację procesu PCR oraz wykorzystania sond „zimnych”.

Ta kategoria sond molekularnych, jakkolwiek mniej czułych od sond znakowanych izotopem, znalazła szczególne zastosowanie w metodzie PCR, gdzie wykrywany materiał jest wielokrotnie amplifikowany. Zaletami tego systemu jest wyeliminowanie izotopu, długi okres przydatności sondy do badań oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania tej samej sondy. Kombinacja tych dwóch metod, PCR i hybrydyzacji produktów amplifikacji sondami zimnymi znalazła zastosowanie przy wykrywaniu wirusa zakaźnego zapalenia wątroby (HBV), wirusa HIV i wirusa papilomatozy (HPV) (22). Ze względu jednak na dostępność tych metod oraz ich cenę, stanowiącą prawie 10-krotność wartości badania surowicy krwi testem ELISA, zastąpienie metod serologicznych nie może być brane pod uwagę. Nie bez znaczenia jest również, przy wysokiej czułości metody, możliwość występowania reakcji nieswoistych. Liczni autorzy proponują i opisują całe schematy postępowania i prowadzenia badań w laboratorium mające na celu wyeliminowanie występowania reakcji nieswoistych (2, 21).

Niemniej jednak metoda PCR powinna znaleźć zastosowanie w szczególnych przypadkach, kiedy wymagane jest wczesne wykrycie wirusa, względnie jako metoda uzupełniająca lub potwierdzająca badanie serologiczne.

Piśmiennictwo

- Allard A., Girones K., Juto P., Wadell G.: *J. Clin. Microbiology* 28, 3659, 1991.
- Arigo S., Wettsman S., Rosenblatt J., Chen J.: *J. Virol.* 63, 875, 1989.
- Ballagi-Pordanu A., Kintervall K., Merza M., Klingeborn B., Beňak S.: *J. Vet. Med. B.* 39, 69, 1982.
- Brandon R., Ngif H.: *Res. Vet. Sci.* 50, 59, 1981.
- Brock K. V.: *Arch. Virol. Suppl.* 3, 1—3, 199, 1991.

6. Burstain J., Grimpel E., Lukehart S., Norgaril M., Radolf J.: J. Clin. Microbiol. 29, 62, 1991.
7. Callahan R., Leibner M., Todaro G., Graves D., Ferrer J.: Science 192, 1065, 1976.
8. Cockerell G., Kornak J.: Leukemia Res. 12, 465, 1983.
9. Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S., Khan S., Daniel R., Lavin M.: J. Gen. Virol. 71, 1737, 1990.
10. Dechamps J., Kettmann R., Burny A.: J. Virology 49, 605, 1981.
11. Gaudi S., Pouti W., Agresti A., Malcovatti M., Bonizzi L., Poli G., Amato A., Ginelli E.: Molecular and Cellular Procs 4, 163, 1990.
12. Goodman J., Jurkovich P., Kramber J., Johnson R.: Infect. Immun. 59, 269, 1991.
13. Grundboeck J., Grundboeck M.: Instrukcja Min. Rol. Nr 54, 1983.
14. Hart C., Spira T., Moore J., Sninsky J., Schochetman G., Lifston A., Galphin J., Ou C.: Lancet 11, 596, 1983.
15. Kato N., Yokosuka O., Omata M., Hosoda K., Ohto M.: J. Clin. Invest. 53, 1764, 1990.
16. Kato N., Ou C., Kato H., Bartley S., Brown V., Dowell V., Ueno K.: J. Clin. Microbiol. 29, 33, 1991.
17. Kettmann R., Portetelle D., Mammerickx M., Cleuter Y., Dekegel D., Galoux M., Ghysdael J., Burny A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1014, 1976.
18. Kettmann R., Cleuter Y., Mammerickx M., Bernsrdi G., Burny A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 577, 1980.
19. Kettmann R., Marbaix P., Cleuter Y., Portetelle D., Mammerickx M., Burny A.: Leukemia Res. 4, 509, 1980.
20. Kwok S., Mack D., Mullis K., Poiesz B., Ehrlich G., Blair D., Friedman-Kien A., Sninsky J.: J. Virol. 61, 1690, 1987.
21. Kwok S., Higuchi R.: Nature 339, 237, 1989.
22. Laizul D.: Biofutur 2, 44, 1989.
23. Leib D., Coen D., Bogard C., Hicks K., Yager D., Knipe D., Tyler K.: J. Virol. 63, 759, 1989.
24. Maes R., Beisel C., Spitz S., Thacker B.: Vet. Microbiol. 24, 281, 1989.
25. Miller J., Miller L., Olson C., Gillette K.: Natn. Cancer Inst. 53, 1297, 1969.
26. Murakawa G., Zaria J., Spallone P., Stephens D., Kaplan B., Wallace R., Fossi J.: DNA 7, 237, 1983.
27. Naif H., Brandon R., Daniel R., Lavin M.: Vet. Microbiol. 25, 117, 1990.
28. Ogawa Y., Sagata N., Tsuzuki J., Koyama H., Onuma M., Izawa H.: Microb. Immunol. 31, 1009, 1987.
29. Onuma M., Sagata N., Okada K., Ogawa Y., Ikawa Y., Oshima K.: Microb. Immunol. 33, 213, 1982.
30. Oitmann M., Inocenti P., Thenadey M., Micoud M., Pelloguin F., Scignenrin J.: J. Virol. Methods 31, 273, 1991.
31. Rice N., Stephens R., Gliden R.: Virology, 142, 357, 1985.
32. Sagata N., Yasunaga T., Ogawa Y., Tsuzuki J., Ikawa Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2741, 1984.
33. Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H.: Science 239, 487, 1988.
24. Wyatt C., Wingett D., White J., Buck Ch., Knowles D., Reeves R., Magnuson N.: J. Virology 63, 4498, 1983.

Adres autora: dr Jacek Kuźmak, ul. Kościuszki 12/4, 24-100 Puławy

JOANNA OTACHEL-HAWRANEK

Przydatność odczynu syncyotialnego do wczesnej diagnostyki zakażeń wirusem białaczki bydła (BLV) u cieląt

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Januszewicka 48, 59-983 Wrocław

Summary

Usefulness of the Syncytial Test for the Diagnosis of Enzootic Bovine Leukaemia in Calves up to One Month of Age

The studies were carried out on 70 calves coming from two farms in the Wrocław district. The calves from cows with positive serological titers (assessed by AGID) against bovine leukaemia virus (BLV). In the farms under study the last case of nodular leukaemia was observed 7 years before and the results of haematological examinations were within the normal range. Out of 7 calves aged 6 months with the presence of specific antibodies against BLV only in two cases the syncytial test appeared to be positive in previous examinations, i.e. in calves aged 1 month. Besides, the findings of serological examinations performed on calves at the age of six months indicated that the percentage of calves infected with BLV in the prenatal period was slight. Calves from cows with seropositive results can in the majority of cases avoid infection with BLV in the postnatal period by their isolation; the contacts of calves with their mothers ought to be possible only during feeding them with colostrum.

Badania wielu autorów (2, 4, 9) wykazały, że ok. 3 do 25% przypadków białaczki u bydła jest wynikiem prenatalnego zakażenia. Mechanizm, który prowadzi do transmisji wirusa BL matki na płód nie jest jeszcze dokładnie poznany. Zależy on od wielu czynników, na które składają się m.in. skłonności genetyczne, obecność trwałej limfocytozy (persistent lymphocytosis, PL) w matczynej krwi, etap rozwoju systemu immunologicznego płodu, czy też w przypadku urodzonych już cieląt — poziom przeciwciał swoistych w sianie ich matek. Żaden z tych czynników nie jest jednak dokładnie zdefiniowany, a uzyskane wyniki prac wielu autorów są często sprzeczne (cyt. 2).

Biorąc pod uwagę fakt, że większość cieląt pojonych siarą krów zakażonych wirusem BL posiada przeciwciała przeciw BLV, które nabywają biernie z siarą, pierwsze badanie serologiczne świadczące o zakażeniu wirusem BL może być wykonane dopiero u 6-mies. cieląt, po zaniknięciu matczynej przeciwciał. Natomiast metody diagnostyczne wykrywające obecność antygenu wirusowego w limfocytach krwi obwodowej umożliwiają rozpoznanie zakażeń wirusem BL już u nowo narodzonych cieląt i są niezależne od obecności swoistych przeciwciał w surowicy krwi badanych zwierząt. Z danych literatury krajowej i zagranicznej (cyt. 2, 6) wynika, że test syncyotialny jako metoda diagnostyczna zakażeń wirusem BL u bydła stosowany był głównie w odniesieniu do zwierząt doświadczalnie zakażonych lub wykazujących trwałą limfocytozę (PL).

Celem badań było określenie skuteczności testu syncyotialnego w wykrywaniu wczesnych zakażeń wirusem BL u cieląt przebywających w warunkach hodowli wielokostadnej charakteryzującej się m.in. różnym stopniem nasilenia szerzenia się BLV.

Materiał i metody

Badanie wykonano na 70 cielętach w wieku 1 mies. Cielęta pochodziły z gospodarstw BS (40 szt.) i L (30 szt.), zlokalizowanych na terenie woj. wrocławskiego. Do badań wybrano cielęta pochodzące od krów, u których w ostatnim badaniu serologicznym w kierunku BLV (odczyn immunodiffuzji w żelu agarowym, ID) uzyskano wynik dodatni. Cielęta przebywały w oddzielnym pomieszczeniu, tylko na czas pojenia siarą doprowadzano je do krów. W gosp. L ostatni przypadek formy guzowatej BL obserwowano przez 7 laty, a w gosp. BS jeszcze wcześniej.

U cieląt wykonano badania hematologiczne, serologiczne i wirusologiczne. Badanie hematologiczne wykonano u 1-mies. cieląt, zgodnie z instrukcją Nr 47 Min. Roln. Dep. Wet. Obecność swoistych przeciwciał przeciw wirusowi BL