

MICHAŁ REICHERT, JADWIGA GRUNDBOECK, JAN RULKA, BOŻENA KOZACZYŃSKA, JAN STEC

Badanie sondą molekularną na tle wyników testów serologicznych w diagnostyce enzootycznej białaczki bydła (ebb)

Zakład Biochemii i Pracownia Patologii Komórkowej, Instytut Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Evaluating enzootic bovine leukaemia virus infection by means of a molecular probe compared with the results of serological tests

The present studies were aimed at determining the relation between the findings obtained by means of serological tests and the specific molecular probe. Serological tests were performed according to the methods recommended by the Polish Ministry of Agriculture; ELISA was run with „Bioveta” and „Rhône Merieux” kits and the AGID test was performed with EBL antigen made in our laboratory. The molecular probe was prepared from the previously cloned provirus DNA of EBL virus.

The EBL provirus was detected in 28 samples taken from 44 randomly selected cows in three herds on which a leukaemia eradication programme was in process. Three sera out of 28 positive reacting animals were negative in AGID test and only one serum in ELISA. The results indicate that the use of a specific molecular probe has some advantages in the diagnosis of latent virus infections. Besides, it can be applied in the studies on the pathogenesis of enzootic bovine leukaemia.

Wywoływana przez retrovirus typu C enzootyczna białaczka bydła stanowi ważny problem epizootyczny ze względu na znaczne rozprzestrzenienie, sięgające w zachodnich województwach niekiedy 30% pogłowia (8). Akcja zwalczania białaczki w kraju opiera się na diagnostyce serologicznej (testy ID i ELISA). Testem referencyjnym jest test immunodufuzji w żelu agarozowym (5). Enzootyczna białaczka bydła cechuje się stanem przewlekłej limfocytozy związanej z latentnym przebiegiem infekcji. Uważa się, że wirus może być obecny we krwi jedynie w początkowym okresie choroby (2, 11). Ten stan rzeczy powoduje, że metody diagnostyki serologicznej są metodami z wyboru. Jednakże zdarzają się przypadki wyjątkowo niskiego miana przeciwciał związane z działaniem czynników immunosupresyjnych bądź też stanem fizjologicznym zwierzęcia, które mogą być przyczyną ujemnych wyników testów serologicznych u zwierząt zakażonych. Ma to oczywiście olbrzymie znaczenie, zwłaszcza w końcowym etapie uwalniania obory od białaczki. Wyjściem w takiej sytuacji jest zastosowanie metody wirusologicznej, jednakże ze względu na typowy dla tej jednostki chorobowej stan latencji jest to bardzo trudne.

Istnienie w limfocytach zintegrowanego z genomem prowirusowego DNA umożliwia zastosowanie specyficznej sondy molekularnej i wykrycie w ten sposób zwierząt zakażonych.

Celem pracy było określenie korelacji pomiędzy wynikami testów serologicznych a rezultatami hybrydyzacji specyficznej dla ebb sondy molekularnej. Ma to duże znaczenie w diagnostyce choroby, a ponadto może pomóc w wyjaśnieniu

mechanizmu patogenezy białaczki w stadach uznanych serologicznie za wolne od zakażenia wirusem ebb.

Materiał i metody

Badaniami objęto 44 krowy w wieku 3 – 8 lat pochodzące z trzech obór objętych akcją uwalniania od białaczki.

Materiałem do badań były próbki krwi pobrane z żyły jarzmowej i zabezpieczone przed krzepnięciem wersenem II. Izolacji krwinek białych dokonywano metodą szoku osmotycznego wg Weinholda (4), a następnie płukano je kilkakrotnie buforem PBS i zawieszano w buforze TEN (Tris-Cl -10mM, EDTA-1mM, NaCl-100mM). Zawiesinę limfocytów poddawano następnie trawieniu pronazą o stęż. 200 µg/ml w obecności 0,5% SDS. Lizat komórkowy ekstrahowano mieszaniną fenolu z chloroformem i poddawano precypitacji etanolem. Sprecypitowany DNA rozpuszczano następnie w buforze TE (Tris-Cl -10mM, EDTA-1mM) i używano do badania na obecność sekwencji prowirusowych wirusa ebb przy użyciu specyficznej sondy molekularnej.

Sonda molekularna. W celu uzyskania materiału na sondę sklonowano prowirusowy DNA, pochodzący z limfocytów krowy białaczkowej. Genomowy DNA poddano trawieniu endonukleazą restrykcyjną Sac I, a następnie ligacji z DNA wektora, którym był λ gt Wes λ B. Produkt ligacji poddano następnie pakowaniu przy użyciu ekstraktów bakteryjnych BHB 2688 i BHB 2690 (10). W rezultacie uzyskano bibliotekę genów liczącą ok. 6×10^7 rekombinantów, wśród których znajdował się jeden klon fagowy zawierający genom prowirusa ebb. Po namnożeniu bakteriofagów danego klonu uzyskano DNA prowirusa ebb, którego użyto do sporządzenia sondy molekularnej.

Wykrywanie sekwencji wirusowych w limfocytach. DNA limfocytów bydła podejrzanego o zakażenie wirusem ebb poddawano trawieniu enzymem Sac I, a następnie rozdzielaniu elektroforetycznemu w 0,8% żelu agarozowym przez 3 godz. przy napięciu 2-3 V na cm. Po zakończeniu elektroforezy rozdzielony DNA denaturowano przez 1 godz. w buforze D (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) po czym neutralizowano w buforze N (0,5M Tris-Cl, 1,5M NaOH pH-7,5). DNA przenoszono z kolei na filtr nitrocelulozowy metodą Southerna (12) i poddawano prehybrydyzacji i hybrydyzacji wg metody opisanej w Instrukcji nr 54 (5). Jako sondę stosowano SacI-SacI fragment prowirusowego DNA oznakowany fosforem radioaktywnym metodą „random priming” (3).

Testy serologiczne. Stosowano test immunodufuzji w żelu agarozowym (AGID) w oparciu o antygen wyprodukowany w Instytucie Weterynarii (5) oraz dodatkowo test ELISA przy użyciu zestawów prod. czeskiej (Bioveta, Ivanovice) i francuskiej (Rhône-Merieux).

Wyniki i omówienie

Badanie testem AGID 44 krow z 3 obór ujawniło obecność zakażenia u 33 zwierząt. Równoległe badania przeprowadzone testem ELISA wykazały obecność przeciwciał u 35 zwierząt. Wynik ten świadczy o większej czułości testu

Tab. 1. Korelacja wyników kontroli serologicznej bydła białaczkowego w odniesieniu do badań sondą molekularną

Gospodarstwo	Liczba zwierząt	Dodatni wynik testu		Obecność prowirusa w badaniu sondą
		AGID	ELISA	
A	17	11	11	9
B	16	12	13	10
C	11	10	11	9
Ogółem	44	33	35	28

immunoenzymatycznego w porównaniu z testem AGID, jakkolwiek własne obserwacje wskazują, że zestawy diagnostyczne pochodzące od różnych producentów różnią się czułością dość znacznie (6).

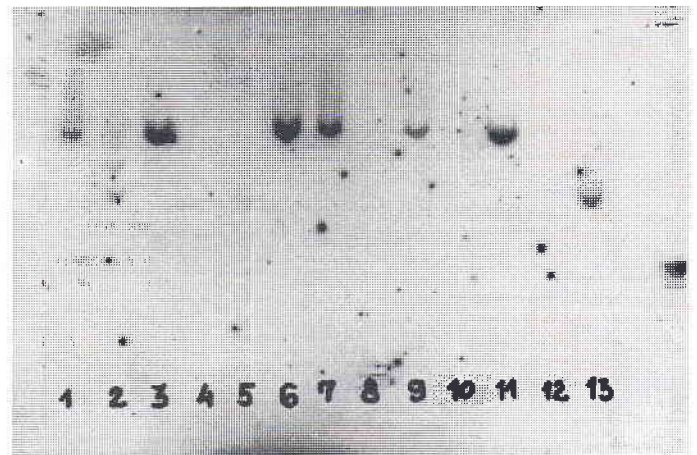
Badanie sondą molekularną DNA pochodzącego z leukocytów wymienionych krów wykazało obecność prowirusa u 28 zwierząt. Trzy spośród nich były ujemne w teście AGID, zaś jedna sztuka również w teście ELISA. Ujemny wynik badania sondą u 5 serologicznie dodatnich zwierząt można tłumaczyć obecnością zbyt małej ilości limfocytów zainfekowanych prowirusem, co może być związane z niezbyt odległym okresem zakażenia.

Obecność prowirusa manifestowała się pojawieniem się prążka na kliszy rentgenowskiej w obszarze odpowiadającym ok. 8 tys. par zasad (ryc. 1), jak to określono na podstawie porównania ze wzorcem (Δ trawione Hind III). Wyjątkowo u jednej sztuki serologicznie dodatniej stwierdzono obecność 4 prążków w obszarze odpowiadającym od 4,5 – 8 tys. par zasad (ryc. 1). Obecność dodatkowych 3 prążków mogła być związana z mutacjami w obrębie genomu prowirusa ebb wyrażonymi m.in. pojawieniem się dodatkowych miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez endonukleazę SacI.

W grupie 3 zwierząt ujemnych serologicznie w teście AGID badanie sondą molekularną wykazało u jednej sztuki obecność prążka, który lokalizował się w obszarze odpowiadającym ok. 5 tys. par zasad (ryc. 1). Taki obraz otrzymany w autoradiografii odzwierciedla najprawdopodobniej istnienie wirusa delecyjnego, co znalazło również swój wyraz w ujemnym wyniku badania serologicznego.

W pozostałych dwóch przypadkach hybrydyzacja z sondą molekularną zachodziła w obszarze odpowiadającym ok. 8 tys. par zasad. Trudne jest określenie przyczyny ujemnych wyników badania serologicznego. Jedną z nich może być zaważona ciąża. Jak wiadomo w końcowym okresie ciąży, w którym dochodzi do znacznego rozwoju gruczołu mlekowego, obserwuje się często znaczny spadek miana przeciwciał w surowicy krwi obwodowej. Niestety, brak jest danych dotyczących stanu fizjologicznego omawianych krów.

Nie można też całkowicie wykluczyć, iż brak przeciwciał był spowodowany wczesnym stadium infekcji. Pomimo wielu wyników doświadczeń na bydło i owcach, wskazujących, że odpowiedź serologiczna może się pojawić już po upływie 1-3 tygodni po zakażeniu (4, 9, 11), znane są również prace (1), w których autorzy wykazali, że w warunkach naturalnych prowirusowy DNA nie był wykrywalny nawet do 1 roku po



Ryc. 1. Autoradiografia próbek DNA z limfocytów bydłych trawionych SacI, rozdzielanych elektroforetycznie i przenoszonych na filtr nitrocelulozowy po hybrydyzacji sondą BLV znakowaną ^{32}P . Ścieżki 1, 3, 6, 7, 9, 11 – obecny prowirus ebb, ścieżka 2 – mutant ebb, ścieżka 13 – wirus delecyjny

ekspozycji na zakażenie. Wykazano również wiele przypadków ujemnych wyników testu serologicznego przy jednoczesnej obecności infekcyjnego wirusa w limfocytach (7).

Otrzymane wyniki odzwierciedlają złożony problem patogeny białaczki, a zwłaszcza współzależność pomiędzy systemem immunologicznym zakażonego zwierzęcia a wirusem. Z tego też względu uzyskane wyniki, poza wartością diagnostyczną, mogą być wykorzystane w lepszym poznaniu patogeny enzoptycznej białaczki bydła. Wydaje się również, że badanie sondą molekularną może być stosowane jako czuła metoda odwoławcza w sytuacjach wątpliwego wyniku testu serologicznego lub dla potwierdzenia pojedynczych przypadków dodatniego wyniku badania serologicznego w oborach uznanych już za wolne od zakażenia ebb.

Piśmiennictwo

1. Burny A., Bruck C., Cleuter Y., Couez D., Deschamps J., Ghysdael J., Gregoire D., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D.: Bovine leukemia virus: a new mode of leukemogenesis, w: *Advances in Viral Oncology*, red. Klein G., 35, Raven Press, New York, 1985.
2. Callahan R., Leber M.M., Todaro G.J., Graves D.C., Ferrer J.F.: *Science* 192, 1005, 1976.
3. Feinberg A.P., Vogelstein B.: *Analyt. Biochem.* 132, 266, 1983.
4. Grundboeck M., Buzala E., Szczotka M., Rutka J.: *Pol. Arch. vet.* 31, 1, 1991.
5. Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: *Instrukcja nr 54 Min. Rol. nr 54*, 1983.
6. Grundboeck-Juško J., Stec J., Kozaczyńska B.: *Bull. vet. Inst. Puławy.*, 30-31, 26, 1987-1988.
7. Kaaden O.R., Lange S., Romanowski W., Marre H., Pfeilsticker J., Roselius R.: *Zentbl. Vet Med.* 29, 269, 1982.
8. Kolacz J.: *Zycie wet.* 67, 97, 1992.
9. Mammerickx M., Portetelle D., Burny A., Leunen M.: *Zentbl. Vet Med.* B. 27, 291, 1980.
10. Maniatis S., Fritsch E.F., Sambrook J.: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
11. Miller J.M., Schmerr M.J.F., Van Der Maaten M.J.: *Am. J. vet. Res.* 42, 5, 1981.
12. Southern D.: *J. Mol. Biol.* 98, 503, 1975.
13. Weinhold E.: *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 21, 406, 1965.

Adres autora: dr Michał Reichert, ul. Kościuszki 19/7, 24-100 Puławy