

JAN RUŁKA, JACEK WÓJCIK*, EWA BUZAŁA

Test immunoperoksydazowy w diagnostyce zakażeń wirusem białaczki bydła

Pracownia Patologii Komórkowej i *Zakład Chorób Zwierząt Mięsożernych i Futerkowych
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Peroxidase Linked Assay (PLA) in the diagnosis of bovine leukosis

The usefulness of an immunoperoxidase test in the detection of bovine leukemia virus (BLV) was demonstrated. Positive results of the PLA test were observed in cell cultures permanently infected with BLV (FLK, HKR and a 50% mixture of FLK and non-infected cells). A brown-red colour of the antibody-antigen immunological complex of the cytoplasm of BLV infected cells confirms positive results of the PLA test after anti-BLV serum addition. The nucleus of these cells was not stained. Unstained cells showing indistinct morphological structure confirm negative results of the PLA test. All FLK and HKR cells in the PLA test showed positive reaction but in the case a 50% mixture of uninfected and infected cells, only 30% of the cell population were positive. The results of the PLA test with BLV infected cells were consistent with a syncytial test. In the case of cells transfected with the DNA of env gene of BLV the results of the PLA test positive, whereas a syncytial assay was negative.

Diagnostyka enzoptycznej białaczki bydła wykonywana jest zarówno przy użyciu metod serologicznych – ID (6, 7, 11, 13), ELISA (3, 16, 20, 21), RIA (2, 5, 11), metody wirusologicznej – test syncytialny (4, 8, 9, 14, 17), a ostatnio przy zastosowaniu metod biologii molekularnej – PCR (15, 19). Diagnostyka wirusologiczna zakażeń wirusem BLV (Bovine Leukemia Virus) przy pomocy testu syncytialnego mimo swoich zalet jest pracochłonna i wymaga tygodnia czasu na uzyskanie wyniku (9). Nowoczesne metody laboratoryjne (PCR) oraz hybrydyzacja wirusowego DNA z sondami molekularnymi są niewątpliwie najczulszymi metodami diagnostycznymi, jednakże są one bardzo kosztowne i wymagają specjalnego wyposażenia aparaturowego w laboratorium.

Celem usprawnienia diagnostyki wirusologicznej enzoptycznej białaczki bydła, postanowiono wykorzystać test immunoperoksydazowy PLA (Peroxidase Linked Assay), przydatny w diagnostyce wirusologicznej klasycznego pomoru świń (10, 12) oraz w zakażeniach herpes wirusem kotów (22), do wykrywania obecności wirusa BLV w hodowli komórek zakażonych lub wirusowego białka strukturalnego w komórkach rekombinowanych.

Materiał i metody

Hodowla komórek. Linia ciągła komórek nerki płodu owcy – HKNO. Stanowiła ona komórki płodu owcy wolne od zakażenia wirusem BLV.

Komórki HKR. Komórki nerki płodu owcy kokulturowane limfocytami B krwi krowy białaczkowej. Jednowarstwową hodowlę komórek linii HKNO i HKR uzyskiwano wg ogólnie znanej metody trypsynizacji. Obie linie komórek namnażano w płynie wzrostowym DMEM – Dulbecco Modified Eagle'a Medium (SIGMA), zawierającym 10% inaktywowa-

nej surowicy cielęcia bezsiarowego oraz 200 mM L-glutaminy i antybiotyki (100 mg streptomycyny i 100 U penicyliny w ml). Pasaże komórek wykonywano co 6-7 dni.

Komórki klonu AG. Komórki fibroblastów myszy transfekowane materiałem genetycznym wirusa BLV zawierającym DNA genu env. Pasaże tych komórek wykonywano również co 6-7 dni, przy czym namnażano je w płynie wzrostowym DMEM zawierającym 6% surowicy cielęcej, L-glutaminę i antybiotyki (j.w.).

Komórki FLK. Komórki nerki płodu owcy zakażone permanentnie wirusem białaczki bydła (BLV). Namnażano je w płynie RPMI 1640 (GIBCO) z dodatkiem 6% inaktywowanej surowicy cielęcej oraz L-glutaminy i antybiotyków (j.w.). Pasaż komórek wykonywano co 7 dni.

Test syncytialny. Test ten stosowano jako kontrolny test wirusologiczny do wykrywania obecności wirusa BLV w badanych komórkach. Wykonywano go zgodnie z instrukcją (8).

Test immunoperoksydazowy (PLA). Przeprowadzono go wg metodyki opracowanej przez Holm-Jensen (10).

Bufory i odczynniki:

– bufor do płukania komórek, rozcieńczeń konjugatu lub surowicy swojej.

Stosowano Dulbecco's Phosphated Buffered Saline (SIGMA) – 9,55 g; Tween 80 – 5,0 ml; H₂O red. ad 1000 ml (PBST). pH – 7,6

– bufor do utrwalania: 40% aceton w PBST (nie zawierający jonów Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺). pH 7,2

– bufor octanowy

A. CH₃COOH • 3H₂O – 0,143 ml; H₂O red. ad 50 ml

B. CH₃COONa • 3 H₂O – 0,68 g; H₂O red. ad 100 ml

Bezpośrednio przed użyciem bufor A mieszano z buforem B. pH – 5,0.

Substrat (SIGMA). 3-amino-9-ethylcarbazon – 2 mg rozpuszczono bezpośrednio przed użyciem w 0,3 ml N-N-dimethylformamide, następnie mieszano z 5 ml 0,05 M buforu octanowego o pH 5,0. Przed użyciem dodano 40 µl 30% nadtlenu wodoru.

Swoista owcza surowica odpornościowa anty BLV rozcieńczona 1:20 lub 1:50 w buforze PBST.

Konjugat. Znakowana peroksydazą chrzanową surowica królicza przeciwko IgG owcy (SIGMA), rozcieńczona 1:100 w buforze PBST.

Przygotowanie hodowli komórek do testu PLA. Do badań użyto zarówno komórek FLK, HKR, klonu AG, natywnych komórek HKNO, jak i mieszaniny 50% komórek FLK i HKNO. Powyższe zawiesiny komórek o koncentracji 5 × 10⁴ w płynie wzrostowym i o żywotności nie mniejszej niż 95%, rozlewano w ilości 150 µl do baseników mikropłytki o płaskim dnie (NUNCCLON). Po 24-36 godzinach inkubacji w temp. 37°C w atmosferze 5% CO₂ zlewano płyn nad komórkami po czym utrwalano je zimnym 40% acetonem w PBST przez około 15 minut. Po utrwaleniu komórki suszono 2-3 godziny w temp. pokojowej i bezpośrednio wykonywano test immunoperoksydazowy lub zamrażano je w temp. -20°C do czasu wykonania odczynu.

Wykonanie testu PLA. Reakcję przeprowadzano wg schematu:

– płukanie komórek buforem PBST – 15 min.

– nakładanie surowicy odpornościowej w rozcieńczeniu 1:20

- inkubacja w temp. 37°C przez 45 min.
- płukanie 3 × 5 min. buforem PBST
- dodanie konjugatu
- inkubacja w temp. 37°C przez 45 min.
- płukanie 3 × 5 min. buforem PBST
- dodanie substratu
- inkubacja w temp. 37°C przez 30 min.

Po pojawieniu się wyraźnego brązowo-czerwonego zabarwienia cytoplazmy komórek w basenikach z surowicą referencyjną, reakcję zatrzymywano przez trzykrotne przepłukiwanie mikropłytki buforem PBST i ponowne nalanie 150 µl tego buforu do baseników.

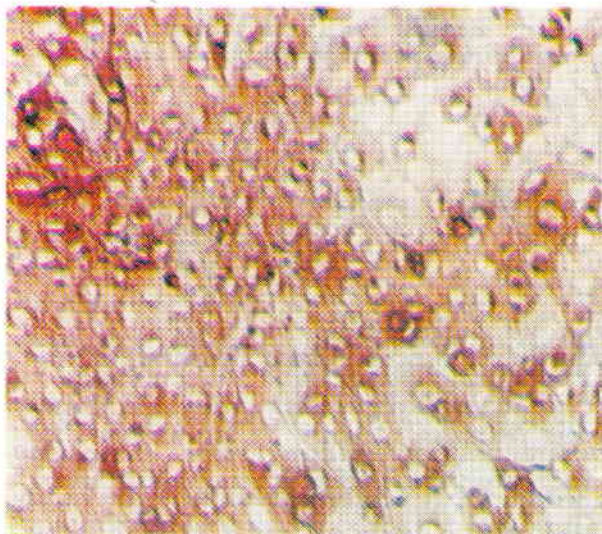
Wyniki i omówienie

Uzyskane rezultaty ilustrują tab. 1 oraz ryc. 1, 2 i 3. Wyniki testu immunoperoksydazowego – PLA odczytywano przy użyciu mikroskopu odwróconego Telaval 3 (Carl Zeiss Jena). Badania podstawowe nad przydatnością tego testu do diagnostyki zakażenia hodowli komórek wirusem białaczki bydła przeprowadzono na komórkach FLK. Dodatnim wynikiem testu immunoperoksydazowego było wystąpienie brązowo-czerwonego zabarwienia cytoplazmy komórek w tych basenikach, do których dodano odpornościową surowicę anty BLV. Wymienione zabarwienie wskazuje na obecność immunologicznych kompleksów antygen-przeciwciało w cytoplazmie komórek zakażonych wirusem BLV. Jądro komórkowe pozostaje tu nie zabarwione. Wynik ujemny testu PLA notowano w przypadku gdy do komórek FLK dodawano surowicę owczą nie zawierającą przeciwciał anty BLV. Komórki linii ciągłej FLK zakażone stale wirusem BLV, prawie w 100% wykazywały dodatni wynik testu przez co otrzymany obraz komórek był jednorodny i mało czytelny (ryc. 1).

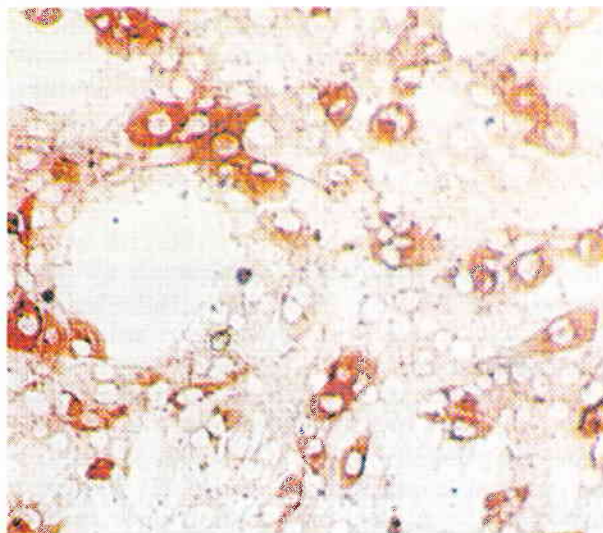
W związku z powyższym postanowiono poprawić czytelność odczytu testem PLA poprzez przygotowanie mieszaniny komórek zakażonych wirusem białaczki – FLK i komórek natywnych – HKNO. W badaniach tych użyto 50% zawiesiny komórek zakażonych i komórek natywnych. W tym przypadku około 30% komórek barwi się wyraźnie na kolor brązowo-czerwony, podczas gdy pozostałe komórki są słabo widoczne i o zatartej strukturze morfologicznej (ryc. 2). Jak wykazano wprowadzenie komórek natywnych do zawiesiny komórek zakażonych wirusem BLV pozwoliło uzyskać lepszą czytelność testu PLA i dokładność jego wyniku.

Intensywność zabarwienia komórek zakażonych w teście PLA jest bezpośrednim wskaźnikiem obecności w nich wirusa BLV, jednakże w dużym stopniu zależy ona od ilości przeciwciał odpornościowych w surowicy referencyjnej lub badanej. W efekcie rozcieńczenie surowicy referencyjnej winno być tak dobrane by komórki zakażone wirusem były wybarwione na kolor brązowo-czerwony i pozostawały wyraźnie odgraniczone od innych komórek (ryc. 3).

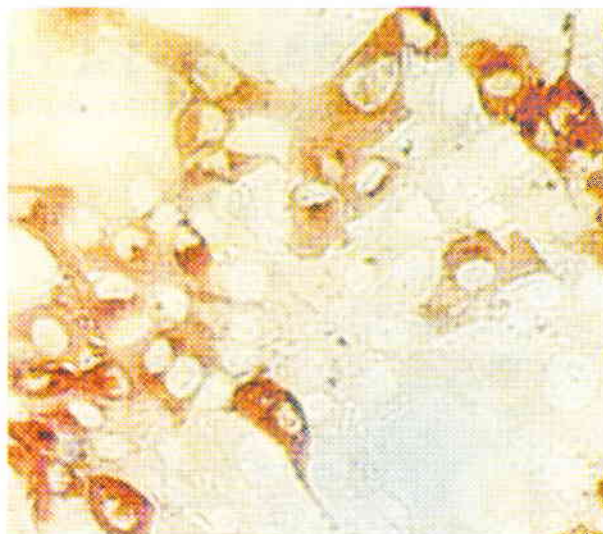
Przydatność testu immunoperoksydazowego do wykrywania wirusa BLV w komórkach postanowiono przebadać również na innych liniach komórkowych. Do badań tych użyto hodowli komórek nerki płodu owcy kokulturowanych limfocytami B krowy białaczkowej (komórki HKR), komórki fibroblastów myszy transfekowane DNA genu env wirusa białaczki (Klon AG), komórki nerki płodu owcy wolne od zakażenia wirusem BLV (HKNO) oraz mieszaniny 50% komórek FLK i HKNO. Wyniki testu PLA porównano z wynikami testu syncytialnego. Uzyskane rezultaty przedstawia tab. 1. Jak wykazano wyniki testu PLA były zgodne z wirusologicznym testem syncytialnym we wszystkich przypadkach badanych linii komórkowych z



Ryc. 1. Dodatni wynik testu PLA w hodowli komórek FLK (pow. 240x)



Ryc. 2. Dodatni wynik testu PLA w hodowli komórek FLK+HKNO (pow. 240x)



Ryc. 3. Dodatni wynik testu PLA w hodowli komórek FLK+HKNO (pow. 480x)

Tab. 1. Porównanie wyników testu immunoperoksydazowego PLA i testu syncytialnego w diagnostyce zakażenia hodowli komórek wirusem BLV

Komórki	Test diagnostyczny	
	PLA	syncytialny
FLK	+++	+++
HKR	+++	+++
AG	+	-
HKNO	-	-
FLK + HKNO	+++	+++

Objaśnienia: FLK – hodowla komórek nerki płodu owcy zakażona permanentnie wirusem BLV, HKR – hodowla komórek nerki płodu owcy kokulturowana limfocytami B krwi białaczkowej, AG – hodowla komórek fibroblastów myszy transfekowana DNA genu env wirusa białaczki bydła, HKNO – hodowla komórek nerki owcy wolna od zakażenia wirusem BLV.

wyjątkiem komórek klonu AG. W przypadku komórek AG wynik testu PLA był dodatni, podczas gdy test syncytialny dał wynik negatywny. Dodatni wynik testu immunoperoksydazowego w komórkach klonu AG potwierdza obecność w nich strukturalnych białek gp51 kodowanych przez gen env wirusa białaczki, podczas gdy ujemny wynik testu syncytialnego świadczy o braku jego cząstek zakaźnych.

Należy stwierdzić, że przydatność testu PLA jest szczególnie istotna przy wykrywaniu zakażeń latentnych wirusami nie cytotatycznymi. Wskazują na to prace Holm-Jensen (10), Hyera i wsp. (12) oraz Pejsaka (18), jak i badania własne. Badania wymienionych autorów i Wójcika (22) wskazują również na przydatność testu PLA w diagnostyce serologicznej klasycznego pomoru świń lub zakażeń herpes wirusem FHV-1 u kotów. Jak podkreśla Wójcik (22) wyniki kontroli serologicznej zakażeń herpes wirusem kotów przy pomocy testu IMPA (wariant testu PLA) były porównywalne z wynikami testu klasycznej seroneutralizacji. Rezultaty te świadczą nie tylko o swoistości odczynu lecz i o jego wysokiej czułości.

Przeprowadzone badania własne potwierdzają przydatność testu immunoperoksydazowego również w diagnostyce zakażeń wirusem BLV. Odczyn ten z powodzeniem może być wykorzystany do wykrywania zarówno strukturalnych białek wirusowych w komórkach rekombinowanych jak i do oceny stanu zakażenia komórek FLK używanych do produkcji antygeny do serologicznej diagnostyki białaczki bydła.

Reasumując należy stwierdzić, że test immunoperoksydazowy PLA jest stosunkowo prostym, swoistym i czułym testem wirusologicznym do wykrywania zakażenia hodowli komórek wirusem BLV.

Piśmiennictwo

1. Ban J., Zajac V., Altaner C., Černý L.: Zntbl. Vet. Med. 29, 591, 1982.
2. Bex F., Bruck C., Mammerickx M., Portetelle D., Ghysdel J., Cleuter Y., Leclercq M., Dekegel D., Burny A.: Cancer Res. 39, 1118, 1979.
3. Engval E., Perlman P.: I. Immun. 109, 129, 1972.
4. Ferrer J. F., Diglio C. A.: Cancer Res. 36, 1068, 1976.
5. Graves D. C., Mc Qude M., Weibel K.: Am. J. Vet. Res. 43, 960, 1982.
6. Gupta P., Ferrer J. F.: Annls Réch. Vét. 9, 683, 1978.
7. Grundboeck M., Grundboeck-Juško J.: Medycyna Wet. 38, 19, 1982.
8. Grundboeck M., Buzala E.: Instrukcja wykrywania enzootycznej białaczki bydła (ebb) testem syncytialnym. Wyd. I. Wet., Puławy 1990.
9. Grundboeck M., Kuźmak J.: Medycyna Wet. 50, 205, 1994.
10. Holm-Jensen M.: Acta vet. scand. 22, 85, 1981.
11. Hoff-Jørgensen R.: CEC Sci. Workshop Bovine Leucosis. Luxemburg 1980, s. 55.
12. Hyera J., Dahle J., Liess B., Möening V., Frey H.: Dt. tierärztl. Wschr. 94, 541, 1987.
13. Klimentowski S.: Medycyna Wet. 42, 342, 1986.
14. Klimentowski S., Paweśka J., Kuryszko J.: Medycyna Wet. 45, 470, 1989.
15. Kuźmak J., Grundboeck J., Kozaczyńska B.: Medycyna Wet. 50, 263, 1993.
16. Manz D., Weigand D., Behrens F., Ziegelmair R.: Zntbl. Vet. Med. 28, 280, 1981.
17. Otachel-Hawranek J.: Medycyna Wet. 49, 315, 1993.
18. Pejsak Z.: Medycyna Wet. 49, 265, 1993.
19. Reichert M., Grundboeck J., Rułka J., Kozaczyńska B., Stec J.: Medycyna Wet. 50, 263, 1993.
20. Ressang A. A., Gielkens A. L., Quak J., Mastenbroek N., Tuppert C., De Castro A.: Annls Réch. Vét. 9, 663, 1978.
21. Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: Medycyna Wet. 41, 117, 1985.
22. Wójcik J.: Medycyna Wet. (w druku)

Adres autora: dr Jan Rułka, ul. Lubelska 17/6, 24-100 Puławy

CENTRAL SOYA ŁOBEZ Sp. z o.o. w Łobzie, członek międzynarodowego koncernu CENTRAL SOYA

ZATRUDNI LEKARZA WETERYNARII

Wymagania:

- wiek do 35 lat,
- znajomość języka angielskiego lub niemieckiego.

Oferty prosimy składać na adres:
Central Soya Łobez Sp. z o.o., ul. Drawska 6, 73-300 Łobez
w terminie 14 dni od daty ukazania się ogłoszenia.

Informacji udziela kierownik Działu Administracyjnego tel. (0923) 740-11 do 14