

# Metoda dot-blot w diagnostyce gąbczastej encefalopatii bydła<sup>\*)</sup>

MIROSLAW P. POLAK, WOJCIECH ROZEK, JAN F. ŻMUDZIŃSKI

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

Polak M. P., Rozek W., Żmudziński J. F.

## Dot-blot for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy

### Summary

The article presents the practical use of dot-blot for the diagnosis of BSE. This method enables obtaining test results in a short period. The practical implementation of this method for the diagnosis of BSE is reinforced by the simple test procedure, low equipment requirements and low volume of waste produced. All samples from twenty eight confirmed Polish cases of BSE had values above negative control samples. Only one positive sample had an optical density close to negative samples. This sample came from an atypical case of BSE, which in active monitoring with the rapid test had values slightly above the cut off. All remaining samples from positive cases had values above the mean for negative samples plus two standard deviations.

**Keywords:** BSE, dot-blot

Pasażowalne gąbczaste encefalopatie (Transmissible Spongiform Encephalopathies – TSEs), do których należy gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) tworzą grupę chorób neurodegeneracyjnych ludzi i zwierząt, objawiających się klinicznie zaburzeniami ze strony układu nerwowego (8). Ze względu na prawdopodobny udział białka prionowego w etiologii TSEs, choroby te określa się także jako choroby prionowe (1, 2). Post-translacyjna modyfikacja trzeciorzędowej struktury białka PrP<sup>C</sup>, prowadzi do powstania formy patologicznej PrP<sup>Sc</sup>. Jest ona uznawana za czynnik etiologiczny tych chorób i charakteryzuje się m.in. opornością na proteolizę. Ta cecha białka PrP<sup>Sc</sup> została wykorzystana przy opracowywaniu testów diagnostycznych do badań monitoringowych w kierunku BSE (3, 6). Białko PrP<sup>Sc</sup> powszechnie uznaje się za specyficzny marker chorób prionowych, a jego wykrycie, możliwe kilka miesięcy przed wystąpieniem objawów nerwowych, jest jednoznaczne z postawieniem podejrzenia BSE (dodatni wynik w badaniu monitoringowym wymaga potwierdzenia w badaniu odwoławczym). Aktualnie dostępne zestawy diagnostyczne pozwalają wyłącznie na badanie pośmiertne (7). Wiąże się to z lokalizacją patologicznego białka prionowego, ograniczoną w ponad 90% do ośrodkowego układu nerwowego.

Obecnie w krajach Wspólnoty Europejskiej dostępnych jest jedenaście tzw. szybkich testów do badań monitoringowych w kierunku BSE. Większość z tych testów oparta jest na formacie ELISA, który umożliwia uproszczenie i skrócenie czasu badania. Przeciwciała dostępne w tych zestawach wiążą się niespecyficznym z epitopami zarówno na białku PrP<sup>C</sup>, jak i PrP<sup>res</sup> (forma PrP<sup>Sc</sup> po proteolizie).

Ten brak specyficzności wiązania wymusza wprowadzenie etapu proteolizy, który umożliwia pełne strawienie formy PrP<sup>C</sup> w badanej próbce. Dzięki temu, jeżeli uzyskuje

się sygnał dodatni w badaniu, pochodzi on od białka patologicznego. Wśród dostępnych aktualnie 11 zestawów diagnostycznych tylko w dwóch nie wykorzystuje się etapu proteolizy do usunięcia białka PrP<sup>C</sup> z badanego homogenatu.

Dobry test diagnostyczny powinien charakteryzować się wysoką czułością oraz specyficzną diagnostyczną, prostotą wykonania, możliwością automatyzacji, co pozwala na znaczne skrócenie czasu badania i wykonywanie masowych badań monitoringowych. Metoda dot-blot wydaje się odpowiednia do badań w kierunku BSE z powodu prostoty wykonania, niskich wymagań sprzętowych, krótkiego czasu badania oraz małej ilości powstających odpadów biologicznych. Uzyskanie czułości testu dot-blot opracowanego w Zakładzie Wirusologii PIWet.-PIB porównywalnej z jednym z dopuszczonych do badań zestawów diagnostycznych skłoniło nas do podjęcia badań krajowych przypadków BSE z wykorzystaniem tej techniki.

Celem badań było określenie przydatności metody dot-blot w diagnostyce krajowych przypadków gąbczastej encefalopatii bydła.

## Materiał i metody

W badaniach wykorzystano próbki pnia mózgu z 28 potwierdzonych przypadków BSE w Polsce oraz cztery próbki z przypadków ujemnych badanych w kierunku BSE. Homogenizację 0,5-0,75 g pnia mózgu wykonywano w homogenizatorze (Omni) przez 1 minutę przy 20 000 obrotów na minutę. Trawienie z użyciem proteiny K w stężeniu 1 mg/ml (Prionics) wykonywano w suchym bloku grzejnym w temp. 48°C przez 40 min. Po dodaniu inhibitorów proteaz wykonywano wirowanie homogenatów przez 5 min. przy przeciążeniu 5000 × g. Uzyskany supernatant rozcieńczano 1 : 10 w buforze TBS (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH = 7,4). Do badań metodą dot-blot wykorzystano płytki 96-dołkowe z membraną PVDF, umieszczoną na dnie dołków (MultiScreen IP, Millipore) oraz aparat MultiScreen Vacuum Manifold firmy Millipore z pompą próżniową. Przed na-

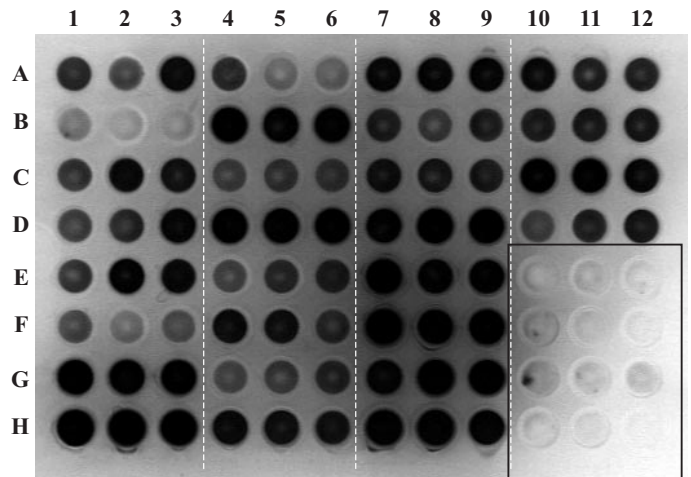
<sup>\*)</sup> Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego PCZ-014-26 finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

niesieniem badanych homogenatów, membranę PVDF zwilżano 70% etanolem. Analizowane próbki nanoszono w trzech powtórzeniach do dołków płytki 96-dołkowej. Po 30 minutowej inkubacji w temp. pokojowej usuwano homogenat z dołków, a następnie membranę płukano roztworem TBST (TBS z dodatkiem 0,05% Tween 20). W kolejnym etapie nanoszono 3M roztwór izotiocyanianu guanidyny i prowadzono 10-minutową inkubację w temp. pokojowej. Po dwóch płukaniach, membranę blokowano 5% roztworem albuminy bydlęcej (Sigma) w TBST przez 30 minut. Pierwsze przeciwciało 6H4 (Prionics), stosowano w rozcieńczeniu 1 : 5000 w TBST przez 60 minut. Po trzech płukaniach dodawano przeciwciało skoniugowane z alkaliczną fosfatazą (Prionics), także w rozcieńczeniu 1 : 5000 w TBST. Inkubację prowadzono przez 30 minut, a następnie wykonywano pięć płukań. Detekcję sygnału reakcji wykonano z wykorzystaniem chemiluminescencji. Jako substrat stosowano CDP-Star (Sigma). Sygnał reakcji PrP<sup>Pres</sup> z przeciwciałem 6H4 na membranie w postaci zaczernienia kliszy rtg uzyskiwano po ekspozycji w zakresie od 10 sekund do 5 minut. Po wywołaniu reakcji i wysuszeniu kliszy, prowadzono analizę komputerową obrazu, z wykorzystaniem programu One D-scan wersja 1,31 (Scanalytics). Wartości gęstości optycznej (OD) badanych próbek obliczono dla trzech powtórzeń. Wartość średnia dla próbek ujemnych ( $\bar{x}$ ) powiększona o jedno lub dwa odchylenia standardowe (SD) stanowiła próg odcięcia dla analizowanych próbek dodatnich.

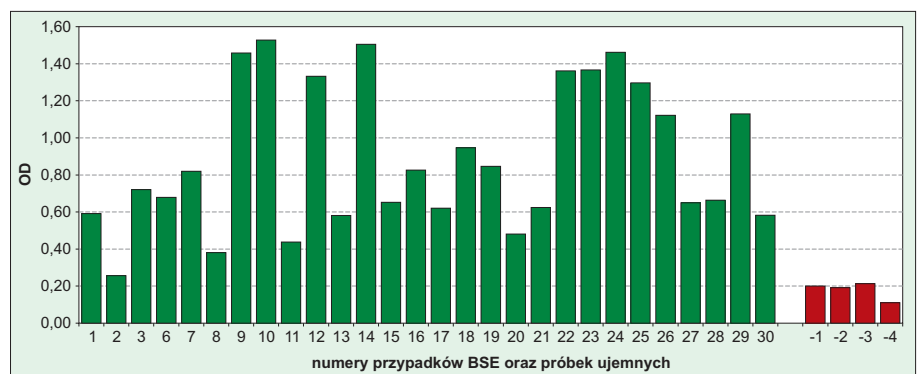
### Wyniki i omówienie

Wszystkie próbki z potwierdzonych przypadków BSE uzyskały wyższe wartości gęstości optycznej (zakres od 0,26 do 1,53) w stosunku do próbek ujemnych (zakres od 0,11 do 0,21) (ryc. 1, 2). Próg odcięcia dla próbek dodatnich wynosił od 0,23 (wartość średnia dla próbek ujemnych + 1 SD) do 0,27 (wartość średnia dla próbek ujemnych + 2 SD). Odnosząc te wartości do uzyskanych wyników, próbka nr 2 uzyskała najniższą wartość OD = 0,26. Pozostałe próbki uzyskały wartości powyżej wyższego progu odcięcia 0,27 i zostały jednoznacznie zakwalifikowane jako dodatnie.

Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie możliwości użycia metody dot-blot do diagnozowania BSE w pogłowie bydła. Wszystkie próbki z dodatnich przypadków choroby uzyskały wyższe wartości gęstości optycznej w stosunku do najwyższej wartości dla próbek ujemnych. Jednakże przyjmując wartość progu odcięcia na poziomie sumy średniej wartości dla próbek ujemnych powiększoną o dwa odchylenia standardowe, próbka nr 2 dała wynik ujemny. Zwiększenie czułości badania można by uzyskać poprzez kilkakrotne nanoszenie tej samej próbki na membranę. Próbka z drugiego przypadku BSE zdiagnozowana wstępnie szybkim testem uzyskała wartości nieznacznie przewyższające wartość progową testu (4). Badanie odwoławcze metodą immunoblot wymagało także dłuższej ekspozycji membrany na kliszy, co związane było z niską zawartością białka PrP<sup>Pres</sup> w badanej próbce. Dalsze analizy tego przypadku na poziomie molekularnym wykazały, że profil glikozylacji białka PrP opornego na proteolizę różni się od typowego profilu dla BSE (5). Przypadek ten określony wstępnie jako atypowy, poddawany jest dalszym analizom z użyciem panelu przeciwciał monoklonalnych. Jak wynika z uzyskanych wyników, również w teście dot-blot wartości uzyska-



**Ryc. 1. Wynik badania w kierunku BSE metodą dot-blot. Kolumny 1-3: próbki z przypadków BSE nr 1 (A1-A3); nr 2 (B1-B3); nr 3 (C1-C3); nr 6 (D1-D3); nr 7 (E1-E3); nr 8 (F1-F3); nr 9 (G1-G3) oraz nr 10 (H1-H3); kolumny 4-6: próbki z przypadków BSE nr 11-18; kolumny 7-9: próbki z przypadków BSE nr 19-26; kolumny 10-12: próbki z przypadków BSE nr 27-30 (wiersze od A do D); cztery próbki ujemne (od E10-E12 do H10-H12)**



**Ryc. 2. Wynik badania w kierunku BSE metodą dot-blot (wartości gęstości optycznej badanych próbek w ujęciu graficznym)**

ne dla tego przypadku są niższe od wartości dla pozostałych przypadków.

W badaniach własnych, potwierdzono nie tylko wysoką czułość oraz specyficzną diagnostyczną metodą dot-blot, ale również: krótki czas badania (4 godziny), prostotę wykonania oznaczenia, niskie wymagania sprzętowe oraz małą ilość powstających odpadów.

### Piśmiennictwo

1. Prusiner S. B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982, 216, 136-144.
2. Prusiner S. B.: Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 13363-13383.
3. Polak M. P., Larska M., Żmudziński J. F.: Nowe szybkie testy do diagnostyki post mortem BSE. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 876-878.
4. Polak M. P., Rożek W., Rola J., Larska M., Żmudziński J. F., Kozaczyński W., Reichert M., Wijaszka T., Ankiewicz K., Piróg-Komorowska A., Roels S.: Pierwsze przypadki BSE w Polsce. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 852-856.
5. Polak M. P., Rożek W., Rola J., Żmudziński J. F.: Prion protein glycoforms from BSE cases in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pul.* 2004, 48, 201-205.
6. Polak M. P., Żmudziński J. F.: Najnowsze informacje nt. laboratoryjnej diagnostyki gąbczastych encefalopatii (transmissible spongiform encephalopathies – TSE) *Medycyna Wet.* 2000, 56, 211-213.
7. Soto C.: Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes. *Nature Rev.* 2004, 2, 809-819.
8. Wiessmann C.: The state of the prion. *Nature Rev.* 2004, 2, 1-11.

Adres autora: dr Mirosław Polak, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ppolak@piwet.pulawy.pl