

JAN STEC, JADWIGA GRUNDBOECK-JUŠKO, MARIAN GRUNDBOECK

Oznaczanie przeciwciał dla wirusa enzoptycznej białaczki bydła metodą ELISA

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

Enzoptyczna białaczka bydła (EBB) jest ważną chorobą dorosłego bydła, w której swoisty wirus przy współdziałaniu czynników towarzyszących doprowadza do proliferacji nowotworowej komórek układu limfocytów, przy czym najczęściej dochodzi do przewlekłej limfocytozy (6). Serologiczna diagnostyka EBB polega na wykrywaniu w surowicy krwi specyficznych przeciwciał przeciwirusowych za pomocą różnych metod, co uważa się w tym przypadku za równoznaczne z obecnością wirusa (7). W badaniach masowych powszechnie stosuje się test immunodiffuzji w żelu agarowym. Jednakże w przypadkach, kiedy występuje bardzo niski poziom przeciwciał metoda immunodiffuzji jest za mało czuła do ich wykrycia. W takiej sytuacji zakażenie wirusem EBB można wykryć tylko bardzo czułymi metodami diagnostycznymi: radioimmunologiczną — RIA lub immunoenzymatyczną — ELISA (7, 10, 11). Ze względu na wysoką czułość, specyficzność i łatwość wykonania bardzo przydatną w diagnostyce EBB okazała się metoda ELISA, zwłaszcza w przypadkach, kiedy dokładna diagnoza jest bardzo ważna np. dla selekcji bydła do hodowli zarodkowej, potrzeb importu i eksportu zwierząt, lub jako metoda odwoławcza w przypadkach spornych.

Zasady metody ELISA oraz jej wykorzystanie w diagnostyce wirusologicznej były publikowane w piśmiennictwie (2, 4, 10, 16). W niniejszej pracy przedstawiono metodę ELISA stosowaną w Instytucie Weterynarii w Puławach dla potrzeb serologicznej diagnostyki EBB i porównano ją z testem immunodiffuzji w żelu agarowym (agar gel immunodiffusion = AGID) stosowanym powszechnie w badaniach przy zwalczaniu białaczki bydła w kraju (8).

Materiał i metody

1. Produkcja antygeny

Antygen otrzymywano przy użyciu linii komórkowej FLK-BLV, która powstała na drodze zakażenia wirusem EBB komórek embrjonalnych nerki jagnięcia (17). Hodowlę prowadzono używając płynu RPMI 1640 (Flow Laboratories Ltd, Anglia) z dodatkiem 5—10% cielejcej surowicy płodowej. Zebrany płyn klarowano przy $2000 \times g$, 15 min. w temp. $4^{\circ}C$, a sedimentację wirusa przeprowadzano w ultrawirówce przy $90\,000 \times g$, 2 godz. w $4^{\circ}C$. Uzyskany osad zawieszano w 6 ml 0,01 M buforu fosforanowego o pH 7,2 zawierającego 0,15 M chlorku sodu (PBS). Zawiesinę wirusa nakładano na 5 ml warstwę 20% sacharozy w PBS i wirovano przy $100\,000 \times g$, 2 godz. w $4^{\circ}C$. Oczyszczony osad wirusa zawieszano w 1 ml PBS tak, aby jego końcowe stężenie względem płynu z hodowli było $500 \times$ większe. Do czasu użycia preparat antygeny przechowywano w temperaturze poniżej $-20^{\circ}C$.

2. Preparacja koniugatu

Koniugat stosowany w metodzie ELISA składał się z immunoglobulin króliczych przeciw immunoglobulinom bydłecym, znakowanych fosfatą alkaliczną. Przeciwciała te otrzymywano z surowicy królika uodpornionego oczyszczoną frakcją immunoglobulin bydłecych, pochodzących od zwierząt białaczkowych. Oba rodzaje immunoglobulin wytrącano z surowicy metodą alkoholową (12) i oczyszczano na kolumnie z DEAE celulozą (14). Uzyskane preparaty immunoglobulinowe liofilizowano, oznaczano zawartość białka oraz kontrolowano ich czystość i aktywność immunologiczną za pomocą immunoelektroforezy w żelu agarowym (13). Do preparacji koniugatów brano tylko takie frakcje, które wykazywały pojedynczy łuk precipitacyjny charakterystyczny dla IgG_1 . Przeciwciała sprzęgano z fosfatą alkaliczną typu VII-S (Sigma, USA) metodą z aldehydem glutarowym (1). W skrócie stosowano następującą procedurę: zawieszinę fosfaty alkalicznej w ilości 1 mg i aktywności enzymatycznej około 1000 jednostek wirowano przy $10\,000 \times g$ przez 15 minut w $4^{\circ}C$. Uzyskany osad rozpuszczano w 1 ml PBS zawierającym 2 mg oczyszczonych przeciwciał i dializowano przez noc wobec PBS. Do dializatu dodawano tyle aldehydu glutarowego, aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,2%. Mieszaninę reakcyjną pozostawiano w temperaturze pokojowej na 2 godziny i ponownie dializowano przez noc wobec PBS. Następnego dnia przenoszono wąż dializacyjny do 0,05 M buforu Tris HCl o pH 8,0 zawierającym 1 mM chlorku magnezu i dializowano przez noc. Do otrzymanego koniugatu dodawano 1% albuminy ludzkiej oraz 0,02% azjuku sodowego i przechowywano go w $4^{\circ}C$.

3. Wykonanie testu

Oznaczanie przeciwciał wirusa EBB w surowicach bydłecych wykonywano pośrednią metodą ELISA (4) na polistyrenowych mikropłytkach testowych firmy Plastomed. Antygen do oplaszczania płytki rozcieńczano w PBS i do dołek наносzono po 0,1 ml. Przykryte płytki zawijano szczelnie w folię aluminiową i inkubowano 16 godzin w $4^{\circ}C$. Przed użyciem płytki opróżniano dołki i przemywano trzykrotnie po 0,2 ml 0,05% roztworem Tween 20 w wodzie destylowanej.

W teście jakościowego oznaczania przeciwciał do dołka odmierzano po 0,175 ml buforu ELISA i 0,025 ml badanej surowicy (rozcieńczenie 1:8) i każdą próbkę wykonywano w dwóch powtórzeniach. Przy określaniu miana przeciwciał surowicę rozcieńczano w poszczególnych etapach 1:8, 1:32, 1:128, 1:1048 itd. Podobnie rozcieńczano surowice standardowe dodatnie i ujemne. Oprócz surowic na każdej płytce wykonywano po kilka prób odczynnikowych odmierając do dołek po 0,1 ml buforu ELISA. Płytkę przykrywano i inkubowano w wilgotnej komorze 1 godzinę w $37^{\circ}C$. Po inkubacji dołki opróżniano i płukano trzykrotnie po 0,2 ml roztworu Tween 20. Następnie do dołek odmierzano po 0,1 ml optymalnego rozcieńczenia koniugatu, przykrywano płytkę i ponownie inkubowano w $37^{\circ}C$ przez 1 godzinę. Dołki opróżniano i płukano trzykrotnie po 0,2 ml roztworu Tween 20. W końcu do każdego dołka dodawano po 0,1 ml roztworu substratu i inkubowano płytkę w wilgotnej komorze o temp. pokojowej ($+15$ do $25^{\circ}C$) przez 1—2 godziny. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano dodaniem 0,05 ml 4 N NaOH.

Wyniki testu ELISA odczytywano na podstawie oceny wizualnej. Jako surowice dodatnie przyjmowano

takie, dla których intensywność żółtego zabarwienia była co najmniej taka sama, jak dla surowic standardowych dodatnich w rozcieńczeniu zgodnym z ich mianem. Jako surowice ujemne uznawano takie, gdy dołki w świetle przechodzącym były bezbarwne tj. takie same, jak dla surowicy standardowej ujemnej i próbek odczynnikowych.

4. Odczynniki do wykonania testu ELISA

1. Bufor do opłaszczania płytek; PBS handlowy (Bio-med Lublin).
2. Bufor do płukania: 0,05% Tween 20 w wodzie destylowanej lub w PBS.
3. Bufor ELISA: 0,01 M bufor fosforanowy o pH 7,2 zawierający 0,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, 4% surowicy końskiej.
4. Bufor substratowy: 1 M bufor dwuetanoloaminy o pH 9,8, 1 mM MgCl₂ zawierający 1 mg/ml p-nitrofenylofosforanu.
5. 4 N NaOH.

5. Materiał badawczy

a) surowice standardowe bydłce:

- surowica dodatnia nr 2 wykazująca w badaniach przeprowadzonych przez dr J. M. Miller z Ames, Iowa, USA, miana 1:57 000 w metodzie radioimmunologicznej. Surowica ta pochodziła od krwi, u której klinicznie i serologicznie stwierdzono EBB, a na sekcji jej guzowatą postać.
 - surowica ujemna była zbiorową próbką surowic pobranych od krów ze stada całkowicie wolnego od EBB, co wykazano w badaniach klinicznych i serologicznych.
 - surowice dodatnie i ujemne z zestawu Enzygnost Rinderleukose firmy Behringwerke AG, RFN.
- b) 220 surowic bydłych wybranych losowo z gospodarstw hodowlanych,
 - c) 7 surowic bydłych z gospodarstwa o wysokim stopniu zakażenia białaczką,
 - d) 70 surowic owczych od zwierząt zakażonych doświadczalnie wirusem EBB oraz 10 od zwierząt kontrolnych.

Nadto od zwierząt wymienionych w punkcie c pobrano 7 próbek mleka.

Wyniki i omówienie

Antygen ELISA produkcji własnej, podobnie jak antygen handlowy z zestawu Enzygnost, wykazywały w teście immunodyszufji pojedyncze linie precypitacyjne z surowicami dodatnimi oraz brak precypitacji z surowicami ujemnymi. W teście ELISA surowice dodatnie dawały wyraźnie żółte zabarwienie dołków, podczas gdy dołki z surowicami ujemnymi pozostawały bezbarwne. W doświadczalnym zakażeniu cieląt wirusem EBB obserwowano przyrost miana swoistych przeciwciał oznaczonych testem ELISA. Po dwóch tygodniach od zakażenia cieląt miano przeciwciał w surowicy wynosiło 1:32, a po trzech miesiącach wzrosło do 1:512. Można więc uznać, że tak skontrolowany antygen nadaje się do wykrywania przeciwciał wirusa EBB w surowicy. W nielicznych jak dotąd pracach opisujących preparację antygeny wirusa EBB do testu ELISA kontrolę jego immunoaktywności wykonywano także testami AGID i ELISA (9, 11, 15).

W tab. 1 zestawiono wyniki uzyskane przy ustalaniu optymalnego rozcieńczenia antygeny i koniugaty. Najkorzystniejsze dla tej serii antygeny było rozcieńczenie 1:200, a dla koniugaty 1:1000. W takich rozcieńczeniach reagen-

Tab. 1. Określenie optymalnego stężenia antygeny i koniugaty dla oznaczenia przeciwciał w surowicach standardowych

Antygen	Surowica	Koniugat			
		1:250	1:500	1:1000	1:2000
1:50	dodatnia	##	##	##	##
	ujemna	+	±	±	-
1:100	dodatnia	##	##	##	##
	ujemna	+	±	±	-
1:200	dodatnia	##	##	##	##
	ujemna	+	±	-	-
1:400	dodatnia	##	##	+	+
	ujemna	+	±	-	-
1:800	dodatnia	##	##	+	-
	ujemna	±	-	-	-
1:1600	dodatnia	+	+	-	-
	ujemna	-	-	-	-

Tab. 2. Porównanie oznaczeń ELISA i AGID w 220 surowicach bydłych

ELISA	AGID	Liczba surowic
+	+	10
-	+	2
+	-	35
-	-	173
Wyniki zgodne		183 (83%)
Wyniki niezgodne		37 (17%)

tów uzyskano najsilniejsze natężenie żółtego zabarwienia dołków surowicy dodatnich, natomiast dołki z surowicą ujemną pozostawały bezbarwne. Na podstawie otrzymanych wyników można przyjąć, że dla rozcieńczeń antygeny 1:50, 1:100, 1:400, 1:800 i odpowiadającym im rozcieńczeniom koniugatu 1:500 1:2000 uzyskano by również zadowalające wyniki.

Ustalając optymalne robocze rozcieńczenie antygeny kontrolowano jednocześnie surowice standardowe własne i handlowe. Dodatnia surowica Behring dawała miano zgodne z deklaracją firmową tj. 1:512, natomiast dla surowicy własnej nr 2 uzyskano miano 1:31 000. Świadczy to o wysokiej czułości metody ELISA, gdy porównamy ją z testem AGID, w którym dla surowicy nr 2 uzyskiwano miano 1:128. Przykład ten potwierdza spotykaną w literaturze opinię, że metoda ELISA jest czulsza od AGID około 100—1000-krotnie (3, 10). Dzięki tak wysokiej czułości nadaje się ona do bardzo wczesnego wykrywania przeciwciał nawet 12 tygodni wcześniej niż test AGID (3).

Wyniki badania metodami ELISA i AGID 220 surowic bydłych z terenu województwa Ł zestawiono w tab. 2. Ogółem uzyskano 183 wyniki zgodne, z czego 10 surowic było dodatnich, a 173 ujemne. Wyniki niezgodne stanowiły 17% próbek, z czego tylko dwie surowice ujemne w metodzie ELISA były dodatnie w teście AGID. Natomiast 35 surowic ujemnych w AGID okazało się dodatnimi w bardzo czulej metodzie ELISA. Fakt ten ma duże znaczenie praktyczne. Po pierwsze rzeczywista ilość wyników niezgodnych jest z pewnością niewielka i nie przekracza kilku procent badanych surowic. Po drugie stwierdzenie w sta-

Tab. 3. Porównanie oznaczeń ELISA i AGID w 84 surowicach owczych

ELISA	AGID	Liczba surowic
+	+	49
-	+	1
+	-	23
-	-	11
Wyniki zgodne		60 (71%)
Wyniki niezgodne		24 (29%)

Tab. 4. Oznaczanie przeciwciał dla wirusa EBB w surowicy, mleku i serwatce bydła

surowica	ELISA - miano		AGID		
	mleko	serwatka	surowica	mleko	serwatka
256	128	128	+	+	-
1024	64	64	+	-	-
256	128	128	+	-	-
64	8	8	+	-	-
16	2	2	-	-	-
32	2	2	+	-	-
16	2	2	-	-	-

dzie liczącym 220 krów 45 zwierząt zamiast 10 reagujących dodatnio umożliwia wcześniejszą ich izolację. Spotykane w piśmiennictwie porównania wyników badania surowic bydłych AGID i ELISA określają zgodność metod na około 95% (11, 15).

W tab. 3 przedstawiono wyniki badania surowic owiec doświadczalnie zakażonych wirusem EBB. Uzyskano 71% wyników zgodnych, z czego 49 surowic było dodatnich, a 11 ujemnych. Natomiast 23 surowice ujemne w teście AGID okazały się dodatnie w bardzo czułej metodzie ELISA.

Metodę ELISA zastosowano do badania próbek surowicy, mleka i serwatki pochodzących od krów ze stada o wysokim stopniu zakażenia białaczką. Wyniki badania zastosowano w tab. 4. We wszystkich surowicach stwierdzono obecność specyficznych przeciwciał w zakresie miana 1:32 do 1:1024. Również we wszystkich próbkach mleka i serwatki stwierdzono specyficzne przeciwciała, lecz o znacznie niższych mianach 1:2 do 1:128. W teście AGID tylko jedna próbka mleka była dodatnia, natomiast pozostałe próbki mleka i serwatki były ujemne. Przykład ten jest kolejnym dowodem potwierdzającym dużą przydatność metody ELISA w diagnostyce serologicznej EBB. Metoda ta ze względu na wysoką czułość i specyficzność uważana jest, obok metody radioimmunologicznej, jako metoda odwoławcza w przypadkach spornych (3, 9, 11, 15).

Opracowanie metody ELISA w oparciu o własne preparaty diagnostyczne: antygen, surowice standardowe, przeciwydłące gammaglobuliny znakowane enzymem, było bardzo ważnym zadaniem w programie zwalczania EBB. Zachętą do stosowania tej metody są korzyści praktyczne w diagnostyce serologicznej, a więc wysoka czułość, powtarzalność i zadowalająca swoistość.

Wprowadzenie metody ELISA w szerszym zakresie będzie możliwe wtedy, kiedy laboratoria diagnostyczne będą zaopatrywane w gotowe zestawy. Przygotowanie odpowiedniego antygeny i koniugatu może stwarzać trudności w laboratoriach, które nie dysponują doświadczeniem i sprzętem niezbędnym w badaniach biochemicznych lub immunochemicznych.

Piśmiennictwo

1. Avrameas S.: *Immunochemistry* 6, 43, 1969.
2. Bartoszcze M., Roszkowski J.: *Post. Mikrobiol.* 18, 261, 1979.
3. Behrens F., Ziegelmeier R., Toth T., Keyserlingk M., Forschner E.: *Tierarztl. Wschr.* 92, 429, 1979.
4. Engvall E., Pearlman P.: *Immunochemistry* 8, 871, 1971.
5. Giellens A. L. J., Ressang A. A., Ijzerman J., Quak J.: *Vet. Quart.* 3, 34, 1981.
6. Grundboeck M.: *Rozpoznawanie i zwalczanie enzoootycznej białaczki bydła. PWRiL* 1980, s. 12.
7. Grundboeck M.: *Medycyna Wet.* 23, 527, 1977.
8. Grundboeck-Juško J., Grundboeck M.: *Instrukcja Min. Rol.* Nr 54, 1983.
9. Hoff-Jørgensen R.: *CEC Scientific Workshop on Bovine Leukosis*, Luxemburg 1980, s. 55.
10. Jankowski M.: *Post. Mikrobiol.* 21, 85, 1982.
11. Kajikawa O., Koyama H., Sasaki T., Yoshikawa T., Saita H.: *Jap. J. Vet. Sci.* 45, 347, 1983.
12. Nichol J. C., Deutsch H. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 70, 80, 1948.
13. Scheidegger J. J.: *Int. Arch. Aller. Appl. Immunol.* 7, 103, 1955.
14. Stanworth D. R.: *Nature* 188, 156, 1960.
15. Todd D., Adair B. M.: *Vet. Rec.* 107, 124, 1980.
16. Voller A., Barlett A., Bidwell D. E.: *J. Clin. Pathology* 31, 507, 1978.
17. Van Der Maaten M. J., Miller J. M., Boothe A. D.: *J. Nat. Cancer Inst.* 52, 491, 1974.

Adres autora: dr Jan Stec, ul. 22 lipca 33/5, 24-100 Puławy

Стец Я., Грундбек-Юсько Я., Грундбек М. — Определение антител против вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота тестом ELISA

В описанном тесте применяли реагенты, изготовленные в Отделе биохимии Ветеринарного Института в Пулавах. Антиген вируса из клеточной линии FLK-BLV и очищали техникой ультрацентрифугирования. Кроличьи иммуноглобулины против IgG крупного рогатого скота конъюгировали со щелочной фосфатазой при помощи глутарового альдегида. Вступительные определения антител в сыроворотках крупного рогатого скота и овец, а также в молоке коров, свидетельствуют о большой чувствительности и удовлетворительной специфичности теста. По сравнению с тестом иммунодиффузии тест ELISA является около 100 раз более чувствительным, а в лейкозном стаде констатировали большее число положительно реагирующих животных. При использовании теста ELISA показалось возможным определение антител в молоке коров, хотя большинство проб реагировало отрицательно в иммунодиффузии.

Stec J., Grundboeck-Juško J., Grundboeck M. — Detection of antibodies to bovine leukemia virus (BLV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The described method has been performed using the diagnostic reagents prepared at the Veterinary Institute in Puławy. The BLV antigen was obtained from FLK-BLV cell line and then purified by ultracentrifuge technique. Rabbit anti-bovine IgG were conjugated to alkaline phosphatase with glutaraldehyde. Preliminary examination of bovine and sheep sera, as well as cow milk indicated to good sensitivity and satisfactory specificity of the method. The assay was compared with agar-gel immunodiffusion (AGID) and it was shown, that ELISA was approximately 100 fold more sensitive. In the herd affected with leukemia, a higher number of positive animals has been found using ELISA. It was also possible to find BLV antibodies in cow milk, even in some samples showing negative reaction in AGID test.