

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239791**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430863**

(51) Int.Cl.
G01N 33/569 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **12.08.2019**

(54) **Test paskowy do wykrywania enzoptycznej białaczki bydła i sposób wykrywania enzoptycznej białaczki bydła z wykorzystaniem tego testu paskowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.02.2021 BUP 04/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
10.01.2022 WUP 02/22

(73) Uprawniony z patentu:

**BIOSCIENTIA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Poznań, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA
HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MIROŚŁAWA SKUPIŃSKA, Poznań, PL
AGNIESZKA BELTER, Poznań, PL
ANDRZEJ RPAK, Brzeg, PL
JUSTYNA KUTKOWSKA, Brzozowiec, PL
MAŁGORZATA GRUDZIEŃ, Wrocław, PL
MARCIN CZERWIŃSKI, Wrocław, PL
EWA JAŚKIEWICZ, Wrocław, PL
RADOSŁAW KACZMAREK, Wrocław, PL
AGATA ZERKA, Wrocław, PL
KATARZYNA SZYMCZAK-KULUS, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mirosława Ważyńska

PL 239791 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest test paskowy do wykrywania enzootycznej białaczki bydła poprzez oznaczenie przeciwciał anti-BLV w próbce mleka krowiego. Wynalazek dotyczy także sposobu wykrywania enzootycznej białaczki bydła z wykorzystaniem tego testu paskowego.

Testy paskowe są od wielu lat z powodzeniem wykorzystywane zarówno w diagnostyce medycznej jak i weterynaryjnej, a także w rolnictwie, przemyśle spożywczym i ochronie środowiska. Charakteryzują się one prostotą wykonania, dużą czułością i niską ceną. W medycynie weterynaryjnej stosuje się testy zarówno do badań zwierząt gospodarskich (krów, drobiu, owiec, świń) jak i zwierząt domowych, głównie psów i kotów. Stosowane są testy wykrywające bakterie, wirusy, choroby alergiczne, ale także badające np. zdolność do rozrodu.

Enzootyczna białaczka bydła (EBL) jest chorobą zakaźną bydła wywołaną przez retrowirusa typu C, BLV (ang. Bovine Leukemia Virus), i polegającą na rozroście komórek układu limfatycznego. Choroba charakteryzuje się długim okresem inkubacji (do 7 lat) i w większości przypadków (ok. 60%) przebiega bezobjawowo, ale nie jest to związane z latencją wirusa, ponieważ jak wykazano, niektóre komórki ekspresowały wirusa (Powers i wsp., 1992). U części dorosłego bydła (10–30%) dochodzi do tworzenia się torbieli limfatycznych, u 1–10% powstają mięsaki limfatyczne na różnych narządach wewnętrznych z wyraźnym wzrostem liczby limfocytów B w okolicach mięsaka. Najczęściej występującymi objawami jest utrata wagi, obniżenie mleczności, zaburzenia trawienia, powiększenie węzłów chłonnych, porażenie tylnych części ciała (Polat i wsp., 2017).

Enzootyczna białaczka bydła jest jedną z przyczyn znaczących strat finansowych w stadach mlecznych. Badania mówią o spadku mleczności krów zainfekowanych BLV od 2,5 do 2,7% i spadku o 7% liczby poczęć (Ott i wsp., 2003).

Ponieważ choroba przez początkowy, długi okres przebiega bezobjawowo, jedynym skutecznym sposobem zapobiegania rozprzestrzenianiu się infekcji jest częsta diagnostyka serologiczna i eliminowanie zakażonych zwierząt. Badania serologiczne przeprowadza się u zwierząt powyżej 6. miesiąca, gdy zanikają już przeciwciała matczyne. Sam wirus może być wykryty przy użyciu mikroskopu elektronowego w izolowanych limfocytach obwodowych, a wirusowe DNA można oznaczyć sposobem PCR. Najczęściej w diagnostyce białaczki bydła stosowane są sposoby immunologiczne: test immunodyfuzji w żelu (AGID), test immunoenzymatyczny (ELISA) oraz oznaczenia radioimmunologiczne. W sposobach tych wykrywa się przeciwciała przeciwko antygenowym białkom gp51 i p24. W literaturze można znaleźć wiele sprzecznych informacji dotyczących przydatności obu antygenów w diagnostyce. Wydaje się jednak, że przeciwciała przeciwko gp51 pojawiają się szybciej w surowicy, ich miano jest wyższe i występują w pozytywnych próbkach w zdecydowanej większej ilości (Choi i wsp., 2002, Bicka i wsp., 2001).

Patent PL214884 opisuje test ELISA do wykrywania białaczki enzootycznej u bydła, charakteryzujący się tym, że zawiera wysokooczyszczony antygen gp51 BLV uzyskany z medium hodowlanego znad komórek FLK-BLV pozbawionego całkowicie surowicy bydlęcej. Taki sposób otrzymywania antygeny gp51 zapewnia jego pełną glikozylację, co wpływa na jego reaktywność i zapewnia wysoką czułość testu.

Natomiast patent PL217257 ujawnia sposób wykrywania enzootycznej białaczki bydła i zestaw do wykrywania metodą ELISA, charakteryzujący się tym, że w próbce pobranej od badanego zwierzęcia, zwłaszcza surowicy lub mleku, wykrywa się obecność przeciwciał przeciwko antygenowym białkom wirusa BLV, zwłaszcza antygenom gp51 lub p24.

W literaturze nie-patentowej opisano paskowy test immunochromatograficzny z wykorzystaniem antygeny gp51 znakowanego koloidalnym złotem oraz monoklonalnego przeciwciała immobilizowanego na membranie testowej. Test oparty jest na konkurencyjnym wiązaniu się antygeny gp51 z przeciwciałami bydlęcymi obecnymi w surowicy bydlęcej i przeciwciałami monoklonalnymi na membranie. Czułość tego testu jest niska 1 : 10 w porównaniu z surowicą referencyjną E05 (Kim i współpr., 2016).

Zgłoszenie chińskie CN101303351 opisuje test paskowy do wykrywania enzootycznej białaczki bydła w surowicy krwi z wykorzystaniem białka gp51 i immunochromatografii opartej na koloidalnym złocie, przy czym antygen p51 ekspresowany jest w systemie bakteryjnym, nie jest więc glikoproteiną.

Celem wynalazku było zatem opracowanie prostego i szybkiego testu, który mógłby być wykonywany w warunkach terenowych nawet przez niewykwalifikowane osoby, np. hodowców.

Przedmiotem wynalazku jest test paskowy do wykrywania enzootycznej białaczki bydła poprzez oznaczenie przeciwciał anti-BLV w próbce charakteryzujący się tym, że zawiera glikozylowany antygen gp51 immobilizowany na membranie nitrocelulozowej oraz białka A, G, A/G znakowane barwnymi

nanocząsteczkami, a także bibułę szklaną umieszczoną na początku paska testowego, do filtrowania próbki, przy czym analizowaną próbką jest mleko krowie.

Korzystnie bibułę szklaną stanowi Whatman GF, MF1, AH934 lub Fusion 5 nasyczone roztworem 20 mM Tris pH 7,5 z dodatkiem 0,2 % kazeiny i 0,1% Tween 20.

Test paskowy według wynalazku, charakteryzuje się tym, że zawiera antygen gp51 otrzymywany w systemie bakulowirusowym.

Test paskowy według wynalazku, charakteryzuje się tym, że antygen gp51 otrzymywany jest w komórkach FLK-BLV.

Korzystnie barwne nanocząsteczki stanowi koloidalne złoto o średnicy 20–50 nm, nanocząsteczki węgla o średnicy 10–20 nm lub barwne nanocząsteczki polistyrenowe o średnicy 50–200 nm.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania enzootycznej białaczki bydła z wykorzystaniem testu paskowego według wynalazku, obejmujący następujące etapy:

- próbkę mleka rozcieńcza się trzykrotnie 20 mm buforem Tris-HCl pH 7,5 zawierającym 0,3 % kazeinę i 0,15% Tween 20;
- próbkę mleka wkrapla się do okienka na kasetce testowej i inkubuje przez 10 minut;
- odczytuje się wynik testu w okienku testowym, przy czym jedna kreska lub plamka oznacza wynik negatywny, a dwie kreski lub plamki oznaczają wynik pozytywny.

Do zalet opracowanego testu według wynalazku należą:

- użycie do oznaczeń próbki mleka (eliminacja etapu pobierania krwi i oddzielania surowicy);
- zapobieganie rozprzestrzenianiu się zakażeń;
- minimalizacja strat ekonomicznych;
- monitorowanie czystości mleka w odniesieniu do zakażenia wirusem BLV.

Użycie mleka do testu paskowego utrudnia wykonanie testu paskowego z powodu obecności dużej ilości tłuszczu. Problem ten rozwiązano przez rozcieńczenie mleka roztworem zawierającym detergenty oraz dzięki użyciu na pasku testowym bibuły szklanych filtrujących tłuszcz.

Ponadto, istotne jest, że nawet po 12 miesiącach test zachowuje około 83% swojej pierwotnej aktywności, co tylko nieznacznie wpływa na jego czułość. Początkowa czułość wynosi 1 : 1000, końcowa 1 : 800, przy czym wymagana czułość dla takiego testu wynosi 1 : 250.

Test charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością i daje dobrą zgodność wyników z komercyjnymi testami ELISA.

	Test ELISA	
	pozytywne N=31	negatywny N=58
pozytywne	28	2
negatywny	3	56
Test paskowy		

Czułość 90,3 %

Specyficzność 96,5%

Test daje negatywny wynik z surowicami pozytywnymi pod kątem innych wirusów bydłych: BIV, BVD i BVH.

Przedmiot wynalazku pokazano na rysunku, który przedstawia zdjęcie opracowanego testu paskowego i jego wyniki z surowicą standardową anty BLV E05 rozcieńczoną w normalnym mleku.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania, które jednak nie mają ograniczać zakresu tego wynalazku, a raczej go zilustrować w celu łatwiejszego zrozumienia.

Przykłady

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie antygeny gp51 w systemie bakulowirusowym

Komórki Sf9 Mimic (Life Technologies, USA) zakażono bakulowirusem z wklonowanym genem kodującym białko gp51. Miano wirusa określono sposobem seryjnych rozcieńczeń. Ekspresję konstruktów bakulowirusowych prowadzono w objętości 1000 ml w medium bez surowicy (CCM3, Becton-Dickinson

lub ESF921, Expression Systems). Po 48 godzinach od zakażenia bakulowirusem komórki odwirowywano, a medium po hodowli dializowano przez kilkadziesiąt godzin wobec buforu fosforanowego. Preparat наносono na złożę NiNTA-agarozu i eluowano związane białko skokowym gradientem imidazolu. Analizę zebranych frakcji wykonano sposobami dot-blottingu z przeciwciałem 9E10. Frakcje o największym stężeniu gp51 łączono (frakcje po elucji 50, 100 i 200 mM imidazolem) i dializowano wobec buforu TBS. Otrzymane preparaty następnie zagęszczono za pomocą kartridży Amicon (Merck Millipore, Niemcy). Stopień oczyszczenia preparatów zbadano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i barwienia CBB. Preparaty po elucji 100 i 200 mM imidazolem charakteryzowały się największym stopniem oczyszczenia.

P r z y k ł a d 2. Otrzymywanie białka A/G znakowanego koloidalnym złotem

Do 10 ml 0,1% roztworu koloidalnego złota o średnicy cząstek około 40 nm, zawierającego 10 mM bufor boranowy pH 8,0 dodano 100 µg białka A/G i mieszano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1 ml roztworu zawierającego 1% kazeinę i 0,1 % Tween 20 w 20 mM buforze boranowym o pH 8,0. Roztwór odwirowano przy 20 000 x g przez 15 min, przemyto i zawieszono w 2 ml 0,2% kazeiny z 0,05% Tween 20 w 20 mm buforze boranowym o pH 8,0.

Przykład 3. Otrzymywanie białka A znakowanego nanocząsteczkami węgla

Do 10 ml 0,2% roztworu nanocząsteczek węgla (nanocząsteczki węgla Special Black 4 i Printex30 firmy Orion lub Carbon black 510 i 610 firmy Dimacolor o średnicy około 20 nm) w 5 mM buforze boranowym o pH 8,0 dodano 50 µg białka A i mieszano przez 18 godz. w temperaturze 4°C. Następnie dodano 1 ml roztworu zawierającego 1% kazeinę i 0,1% Tween 20 w 20 mM buforze boranowym o pH 8,0. Roztwór odwirowano przy 20 000 x g przez 15 min, przemyto i zawieszono w 2 ml 0,2% kazeiny z 0,05% Tween20 w 20 mm buforze boranowym o pH 8,0.

P r z y k ł a d 4. Otrzymywanie paska testowego

Znakowane białko A/G naniesiono na bibułę z włókien szklanych GFDX Glass Fiber Conjugate Pads firmy Millipore. Na membranę nitrocelulozową HF120 lub HF135 firmy Millipore naniesiono, w postaci linii lub plamki, roztwór antygeny gp51 (linia testowa) i immunoglobuliny bydlęce (linia kontrolna). Bibułę z barwnym koniugatem naklejono na początku bibuły nitrocelulozowej, z kolei bibułę szklaną do nanoszenia próbki naklejono na koniugat. Na końcu bibuły nitrocelulozowej umieszczono zwykłą bibułę celulozową. Pasek testowy umieszczono w specjalnej plastikowej kasetce.

P r z y k ł a d 5. Wykonanie testu paskowego

Próbkę mleka rozcieńczono trzykrotnie 20 mM buforem Tris-HCl pH 7,5 zawierającym 0,3% kazeinę i 0,15% Tween 20. 200 µl próbki wkroplono do okienka na kasetce testowej i odczekano 10 minut. Pojawienie się w okienku testowym jednej kreski lub plamki wskazuje na wynik negatywny, natomiast pojawienie się dwóch kreszek lub plamek wskazuje na wynik dodatni.

Opracowane testy powinny stać się cennym narzędziem diagnostycznym do monitorowania stanu zdrowia bydła bezpośrednio w terenie i mogą się one przyczynić do polepszenia efektywności gospodarki reprodukcyjnej krów. Test może zostać wykorzystany również do monitorowania czystości mleka i mięsa.

Zastrzeżenia patentowe

1. Test paskowy do wykrywania enzootycznej białaczki bydła poprzez oznaczenie przeciwciał anty-BLV w próbce **znamienny tym**, że zawiera glikozylowany antygen gp51 immobilizowany na membranie nitrocelulozowej oraz białka A, G, A/G znakowane barwnymi nanocząsteczkami, a także bibułę szklaną, umieszczoną na początku paska testowego, do filtrowania próbki, przy czym analizowaną próbką jest mleko krowie.
2. Test paskowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że bibułę szklaną stanowi Whatman GF, MF1, AH934 lub Fusion 5 nasycone roztworem 20 mM Tris pH 7,5 z dodatkiem 0,2 % kazeiny i 0,1% Tween 20.
3. Test paskowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera antygen gp51 otrzymywany w systemie bakulowirusowym.

4. Test paskowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że antygen gp51 otrzymywany jest w komórkach FLK-BLV.
5. Test paskowy według zastrz. 1, **znamienny tym**, że barwne nanocząsteczki stanowi koloidalne złoto o średnicy 20–50 nm, nanocząsteczki węgla o średnicy 10–20 nm lub barwne nanocząsteczki polistyrenowe o średnicy 50–200 nm.
6. Sposób wykrywania enzoptycznej białaczki bydła z wykorzystaniem testu paskowego, jak określono w zastrz. 1–5, obejmujący następujące etapy:
 - a. próbkę mleka rozcieńcza się trzykrotnie 20 mm buforem Tris-HCl pH 7,5 zawierającym 0,3 % kazeinę i 0,15% Tween 20;
 - b. próbkę mleka wkrapla się do okienka na kasetce testowej i inkubuje przez 10 minut;
 - c. odczytuje się wynik testu w okienku testowym, przy czym jedna kreska lub plamka oznacza wynik negatywny a dwie kreski lub plamki oznaczają wynik pozytywny.

Rysunek

Rys.

