

Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria

Rama, G.^{1,2}; Meikle A.²; Puentes, R.³; Moratorio G.¹; Nicolini, P.²; Pessina P.²; Furtado A.³; Pritsch, O.⁴

RESUMEN

En este trabajo se compara la sensibilidad y especificidad de las metodologías de inmuno-difusión en gel agar (IDGA), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tradicional en el diagnóstico de Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), en 65 vacas Holando. Además, se reporta el porcentaje de animales positivos que presentan linfocitosis y cambios en la fórmula leucocitaria y que pertenecen a dos tambos de los cuales sólo uno presenta registros sanitarios diarios. Los cálculos de sensibilidad y especificidad se realizaron considerando al ELISA y a la PCR como métodos de referencia. En el primer caso, los resultados son: 72 % y 100 % para IDGA, 94 % y 77 % para PCR. Por otra parte, al tomar PCR como método de referencia, el resultado fue: 45 % y 100 % para IDGA, 61 % y 97 % para ELISA, respectivamente. El análisis comparativo de los métodos mostró que la PCR presentó mayor sensibilidad, seguido por el ELISA y la IDGA. Al evaluar la linfocitosis se demostró que el promedio de linfocitos aumentó significativamente en los animales infectados con el virus de la leucosis bovina (VLB), no pudiendo descartarse que la presencia de enfermedades concurrentes también afecte de forma relevante el número total de leucocitos.

Palabras clave: Leucosis Enzoótica Bovina, IDGA, ELISA, PCR, linfocitosis.

SUMMARY

Sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion (AGID) test, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and traditional polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of Enzootic Bovine Leukosis (EBL) were studied in 65 Holstein cows. Besides, we report the percentage of positive animals that present lymphocytosis and changes in the leukocyte formula in two farms, from which only one of them has sanitary records. For the analysis of sensitivity and specificity, ELISA and PCR were considered as the reference methods. In the first case results were: 72 % and 100 % for AGID and 94 % and 77 % for PCR, respectively. When PCR was used as the reference method the results were: 45 % and 100 % for AGID and 61 % and 97 % for ELISA, respectively. The comparative analysis of these methods showed that PCR is more sensitive, followed by ELISA and AGID. Average lymphocytes counts are significantly increased in animals infected with the Bovine Leukosis Virus (BLV), but the total number of lymphocytes is also affected by concurrent diseases.

Key words: Enzootic Bovine Leukosis, AGID, ELISA, PCR, lymphocytosis

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa, crónica, producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que infecta preferencialmente a los linfocitos B, causando una transformación maligna que puede concluir en una leucemia crónica o en la aparición de linfosarcoma (Ferrer, 1980). Afecta a los bovinos en general, pero las producciones intensivas como los tambos son las más afectadas (de la Sota, 2004). La LEB tiene un impacto significativo en la producción, desde el punto de vista sanitario y económico,

debido a la mortalidad causada directamente por la patología tumoral, por la alteración directa del sistema inmune del ganado infectado (que produce el aumento concomitante de otras enfermedades infecciosas) y por las restricciones que son impuestas a la exportación de ganado en pie, semen y/o embriones infectados (Trainin y col., 2005). Asimismo, pueden detectarse rastros de linfocitos infectados con VLB (ADN proviral) en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer y col., 2006), por lo que las restricciones podrían potencialmente extenderse también a la exportación de estos productos.

En un trabajo realizado en 1996 en el Noreste del Uruguay, donde se muestrearon 30 predios y se analizaron 400 animales por la técnica de ELISA, la prevalencia de LEB fue de 20 %, presentando el 77 % de los predios, algún caso positivo al virus (Mederos e Irigoyen, 1998). En un plan piloto de monitoreo de salud animal realizado en 1998 por la Facultad de Veterinaria se determinó un 46,6 % de seroprevalencia en 53 establecimientos muestreados en el departamento de Florida (Gil, A) (1998)⁵. En el año 2003, la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77 %,

¹Unidad Biofísica de Proteínas, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

²Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Las Plazas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.: 26223106, Correo electrónico: gramamar@hotmail.com

³Área Inmunología, Instituto de Patobiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

⁴Departamento Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

⁵Comunicación personal.

Recibido: 15/3/10 Aprobado: 20/8/10

72 % y 57 %, respectivamente (Zaffaroni y col., 2007). Se sugirió que la falta de programas de control de esta enfermedad, así como la exigencia de libre de Leucosis Bovina para la exportación animal, llevó a un aumento de su prevalencia en nuestro país (Acta 84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, CONAHSA, 2005)⁶.

La transmisión del VLB puede ser horizontal o vertical. La transmisión horizontal es considerada la más importante y generalmente ocurre por malas prácticas iatrogénicas, por contacto con sangre, mucosas, remanentes de tejidos infectados y por insectos hematófagos (Mammerickx y col., 1987; de la Sota, 2004). La transmisión vertical ocurre hasta en un 15 % de los casos y tiene lugar cuando un animal infectado lo transmite a la progenie por vía transplacentaria o vía digestiva a través del calostro (Martín y col., 2000).

En los bovinos pueden distinguirse tres fases luego de la infección con VLB: a) una fase inaparente, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y por la producción de anticuerpos (Ac) específicos contra antígenos virales, principalmente contra la glicoproteína (gp) 51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989); b) Linfocitosis Persistente (LP), desarrollada por un 30 al 70 % de los animales infectados con edades entre 3 y 6 años, que desde el punto de vista clínico demuestran estar sanos (Beier, 2008); c) enfermedad tumoral propiamente dicha (leucemia / linfoma / linfosarcoma), presente en un 0,1 al 10 % de los animales infectados y que es la forma irremediablemente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988).

Los animales que presentan linfoma pueden ser detectados mediante diagnóstico clínico, pero aquellos infectados asintomáticos y/o con LP requieren de pruebas de laboratorio para detectar la infección por el VLB. La detección serológica de Ac principalmente contra la gp51 de la envoltura viral, mediante las técnicas de inmunodifusión en gel agar (IDGA) o por el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) constituyen los métodos más comúnmente usados para la identificación de animales infectados (Martín y col., 2000; González y col., 2001).

Estas técnicas son reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) (Beier, 2008) y aceptadas por la mayoría de las autoridades gubernamentales, incluido nuestro país, como pruebas oficiales para el diagnóstico del VLB. Por otra parte, se ha descrito el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método diagnóstico directo, que detecta secuencias del gen *env* codificante de la gp51 del VLB (Ballagi-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006). Esta metodología también es aceptada actualmente por la OIE como prueba de diagnóstico del VLB, aunque como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas mencionadas (Beier, 2008).

Para el control de esta enfermedad es muy importante la unificación de criterios sobre el método de diagnóstico a utilizar (Acta 84, CONAHSA, 2005), por lo que se debe conocer la sensibilidad (S) y especificidad (E) de los diversos métodos validados y disponibles. Guarino y col. (1989) compararon los diagnósticos por IDGA, ELISA indirecto y ELISA por competición y determinaron un 10 % más de animales positivos mediante las dos técnicas de ELISA utilizadas que por la IDGA. Si bien la IDGA, el ELISA y la PCR se encuentran disponibles en nuestro país, ya sea como método de aplicación oficial en el diagnóstico del VLB (IDGA) o en investigación (ELISA y PCR), no hay reportes en Uruguay de estudios comparativos de estas tres herramientas diagnósticas en un mismo trabajo.

Las alteraciones hemáticas fueron consideradas indicativas de la fase pretumoral y constituyeron la base del diagnóstico en los planes de control y erradicación de la LEB, durante muchos años. Sin embargo, con el desarrollo e introducción de la IDGA, se pudieron evidenciar importantes limitaciones de S y E de los parámetros hematológicos, perdiéndose el interés por los mismos como herramienta de diagnóstico, epidemiología y control, ya que se demostró que del conjunto de animales que presentaban leucocitosis, la mayor proporción eran VLB positivos por ELISA (Sienra y col., 1998). Además, se determinó que los animales seropositivos tienen mayor promedio de leucocitos y linfocitos circulantes que los

seronegativos, mientras que no encontraron diferencias significativas promedio con respecto a los neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Por otro lado, Collazo y col. (2002) mostraron que la frecuencia de muestras con recuento de leucocitos totales aumentado es significativamente mayor en vacas seropositivas con respecto a sus congéneres seronegativos.

No se han hallado reportes respecto al porcentaje de animales positivos para VLB con linfocitosis y/o recuento celular de la línea blanca en animales clínicamente sanos según registros sanitarios.

Los objetivos de este trabajo fueron comparar la S y E de las metodologías de IDGA, ELISA y PCR tradicional usadas para el diagnóstico de la LEB, así como establecer el porcentaje de animales positivos, clínicamente sanos y con registros sanitarios diarios, que presentan linfocitosis y cambios en la fórmula leucocitaria. Si bien existen estudios comparativos de estas metodologías a nivel internacional, este trabajo pretende profundizar sobre las técnicas que se encuentran disponibles en Uruguay y que son utilizadas para diagnóstico e investigación, como herramientas potenciales a ser utilizadas en futuros programas de erradicación de la leucosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El protocolo experimental fue realizado de acuerdo a las pautas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 115 animales de raza Holando: 76 vacas de 3 a 7 años de edad, pertenecientes a un tambo localizado en el Departamento de Paysandú (Tambo I) y 39 vacas de 3 años, de un tambo del Departamento de Flores (Tambo II). Para la obtención del ADN y del suero se extrajeron 6 ml de sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con y sin anticoagulante (K₂ EDTA), respectivamente. Para el posterior análisis de los sueros por IDGA y ELISA las muestras se centrifugaron antes de las 48 h durante 10 min a 2000 rpm y luego se almacena-

⁶www.mgap.gub.uy/dgsg/CONAHSA/ACTAS/Acta%2084.pdf

ron a -20 °C hasta su procesamiento. Para el recuento celular y la extracción de ADN, las muestras se almacenaron a 4 °C por 24 hs hasta que se procesaron. Para el análisis comparativo de las diferentes técnicas de diagnóstico, se consideraron 65 muestras (sueros/ADN) del Tambo I. Para el recuento celular (leucocitos/mm³) se utilizaron las 115 muestras pertenecientes a los dos tambos. Para el diagnóstico de la fórmula leucocitaria se seleccionaron 76 muestras de acuerdo al resultado obtenido por el ELISA: 19 positivas y 18 negativas del Tambo I y 19 positivas y 20 negativas del Tambo II. El Tambo I contaba con la información de registros sanitarios diarios, lo que permitió clasificar a los animales en sanos y enfermos, mientras que en el Tambo II no existía esta información, por lo que se asumió la presencia de animales sanos y enfermos.

Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

La técnica fue realizada utilizando un *kit* comercial, gentilmente cedido por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata (FCV-UNLP) – Argentina (aprobado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria, SENASA, Argentina, Exp. 41.285/87). Las muestras fueron procesadas siguiendo las indicaciones del fabricante (FCV-UNLP-Argentina). Se utilizó una solución de agar al 1% en *buffer* Tris-HCl con 8.5% de NaCl pH 8, se sembraron 35 ul de cada muestra y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda hasta su lectura final a las 72hs. Se utilizó un control positivo, incluido en el *kit*, por cada dos muestras problema. Esta técnica esta incluida en el manual de test diagnósticos de animales terrestres (Beier, 2008).

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Se utilizó un *kit* comercial que detecta Ac contra el VLB en suero bovino con 98% de S y 100% de E (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA., aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA-). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se utilizaron 50 ul de suero diluido 1:25. La lectura se realizó a 620 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc.,

USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, y se estableció la línea de corte para cada placa a partir del promedio de las lecturas de las densidades ópticas (D.O) de estos sueros controles.

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

EL ADN genómico se aisló mediante digestión con proteinasa K y precipitación con solución de NaCl, según el protocolo modificado de Miller, Dykes y Polesky (1988). Se realizó una PCR anidada para amplificar una región altamente conservada del gen *env* que codifica para la gp51 de la envoltura viral del VLB. Para la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores: 5'-ATG CCY AAA GAA CGA CGG-3' (sentido) y 5'-CGA CGG GAC TAG GTC TGA CCC -3' (antisentido). El programa de termociclado utilizado fue: 2 min a 95 °C, y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 58 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C, y se obtuvo un producto de amplificación correspondiente a un fragmento de 903 pares de bases (pb) (Moratorio, G) (2009)⁷. A partir de 5 ul del producto de esta primera amplificación se realizó una segunda ronda de PCR (amplificación anidada), utilizando los cebadores 5'-CTT TGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3' (sentido) y 5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3' (antisentido). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 95 °C y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 min a 57 °C y 1 min a 72 °C. El tamaño del fragmento obtenido fue de 440 pb (Ballagi-Pordani y col., 1992). En ambas reacciones se trabajó con un volumen final de 50 ul compuesto por: 100 ng de ADN genómico (primera ronda) o 5 ul del primer producto de amplificación (segunda ronda), 1x *buffer* (20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl), 200 nM de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA). Los ciclados se realizaron en un termociclador Multigene (Corbett, modelo CG1-96) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (Syngene, Synoptics, Ltd.) luego de su electroforesis en gel de agarosa al 2 % y posterior tinción con bromuro de etidio (EtBr). Los pro-

ductos fueron comparados con aquellos visualizados al utilizar el 100 bp DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) como marcador de peso molecular. En todos los ensayos se utilizó como control positivo ADN de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con el VLB (Van der Maaten y Millar, 1975). Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb del gen GAPDH para cada muestra (Tiscornia y col., 2004). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico.

Cálculos de sensibilidad y especificidad

Para comparar los tres métodos utilizados se calcularon los siguientes parámetros: $S = (VP / (VP + FN)) * 100$ y $E = (VN / (VN + FP)) * 100$, donde VP: Verdadero Positivo, VN: Verdadero Negativo, FP: Falso Positivo y FN: Falso Negativo (Crowther, 2009).

Recuento Leucocitario Total (RLT) y Diferencial (RLD)

El RLT (leucocitos/mm³) se realizó en las 115 muestras pertenecientes a los dos Tambos, utilizando una cámara de Neubauer, coloreando con el reactivo de Turk (0.5 ml de Ácido acético y dos gotas de azul de metileno en 100 ml de agua destilada) y por observación mediante microscopía óptica (Nikon, modelo Alphaphoto YS2). En el Tambo I solo se consideraron los animales clínicamente sanos (n=67), es decir, sin registro de enfermedades desde un mes antes hasta un mes después del muestreo. Los animales enfermos que se excluyeron fueron 5 VLB positivos y 4 VLB negativos por ELISA.

El RLD se realizó en 76 muestras seleccionadas de acuerdo al resultado del ELISA (19 positivas y 18 negativas del Tambo I; 19 positivas y 20 negativas del Tambo II), mediante la observación al microscopio óptico de frotis sanguíneos teñidos según el protocolo del *kit* Tinción-15 (Biopur, Rosario, Argentina). Los animales fueron clasificados en las siguientes categorías de acuerdo al número de linfocitos/mm³ de sangre: normal (<6500 linfocitos/mm³ para 3-6 años de edad y <5500 linfocitos/mm³ para >6 años); mo-

⁷Comunicación personal.

deradamente aumentado (6500-9000 linfocitos/mm³ para 3-6 años y 5500-7500 linfocitos/mm³ para >6 años) y patológicamente aumentado (>9000 linfocitos/mm³ para 3-6 años y >7500 linfocitos/mm³ para >6 años) (Tolle, 1965).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009). El recuento de leucocitos fue evaluado mediante un modelo que incluyó los efectos de grupo: positivo vs negativo por ELISA, Tambo analizado (I y II) y estado de salud (sano vs enfermo, para el Tambo I). La normalidad de la distribución de los valores de leucocitos y del porcentaje de linfocitos, monocitos y polimorfonucleados (PMN), fue evaluada mediante un test de normalidad. Debido a que la distribución de monocitos no fue normal, fue corregida aplicando el logaritmo. El nivel de significancia considerado fue $\alpha=0.05$

RESULTADOS

Estudio comparativo entre la IDGA el ELISA y la PCR

Los controles positivos fueron correctamente diagnosticados por las tres metodologías (Fig.1, datos no mostrados para IDGA y ELISA). En la Figura 2 se muestra el porcentaje de diagnósticos positivos y negativos para VLB obtenidos por cada una de las tres metodologías utilizadas. Para las 65 muestras procesadas, los resultados del diagnóstico fueron: 13 positivas y 52 negativas por IDGA; 18 positivas y 47 negativas por ELISA; 28 positivas y 37 negativas por PCR. Todos los diagnósticos positivos por IDGA también resultaron positivos por ELISA y PCR. Solo una muestra que se determinó como positiva por ELISA resultó ser negativa por PCR e IDGA. Esta muestra presentó una D.O. de 0.49 unidades de absorbancia y la línea de corte para esa placa de ELISA se estableció en 0.46 unidades de absorbancia. El ELISA diagnosticó un 6 % más de muestras positivas que la IDGA, correspondientes a 5 muestras mientras que la PCR detectó un 23 % y un 17 % más de positivos que la IDGA y el ELISA, respectivamente (Fig.2).

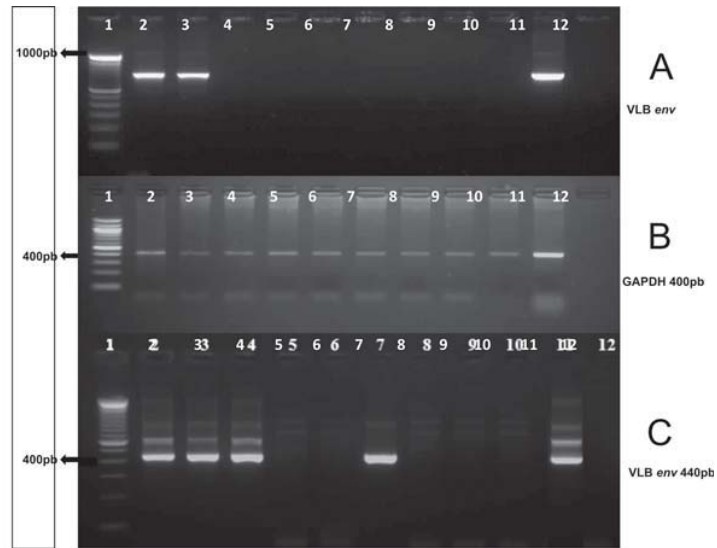


Figura 1. Foto de la primera y segunda amplificación por PCR con el control de GAPDH. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 al 10: muestras de ADN bovino para su diagnóstico. Carril 11: control positivo (FLK-VLB) . Carril 12: control negativo (agua destilada). En el gel A se observa el resultado de la primera amplificación. La banda de 900 pb en los carriles 2 y 3 diagnostica estas muestras como positivas. El gel B corresponde al control con el gen GAPDH y verifica la presencia de ADN en las 9 muestras y la ausencia en el control negativo con agua destilada en el carril 12. El gel C muestra la segunda amplificación de 440 pb que diagnostica a las muestras 2, 3, 4 y 7 como positivas y a las muestras 5, 6, 8, 9 y 10 como negativas.

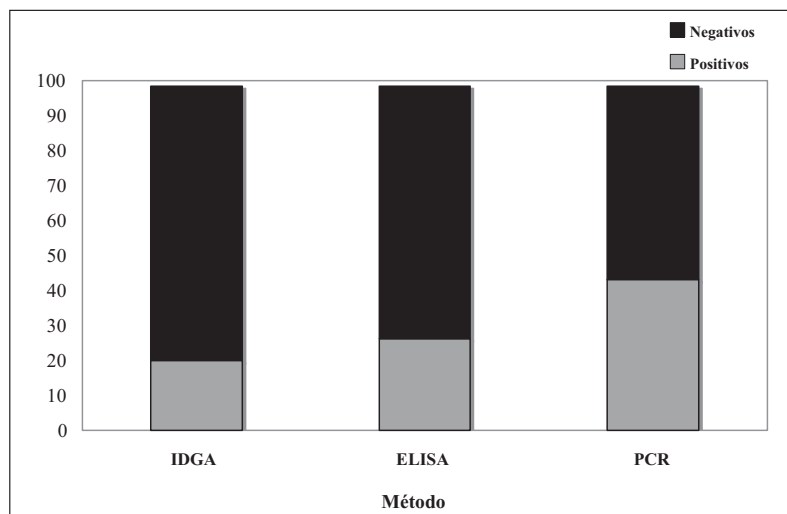


Figura 2. Porcentaje de animales positivos y negativos determinados por inmunodifusión en gel agar (IDGA), Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuadro 1. Porcentaje de Sensibilidad y Especificidad calculadas tomando a las técnicas de ELISA y PCR como métodos de referencia.

| Referencia | | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|------------|-------|------------------|-------------------|
| ELISA | IDGA | 72 | 100 |
| | PCR | 94 | 77 |
| PCR | IDGA | 45 | 100 |
| | ELISA | 61 | 97 |

En el Cuadro 1 se muestran los valores de S y E para los métodos comparados, tomando al ELISA y a la PCR como métodos de referencia.

La seroprevalencia determinada por ELISA fue de 23,6 % en el Tambo I y 48,7% en el Tambo II.

Recuento Leucocitario Total y Diferencial

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de animales positivos y negativos al VLB por ELISA y que presentaron niveles

normales, moderadamente aumentados o patológicamente aumentados de linfocitos (Tolle, 1965). Se observa que el 92 % de los animales VLB negativos presentó valores normales de linfocitos, mientras que el 66 % de los positivos presentó niveles patológicamente aumentados.

El Cuadro 2 resume los resultados del recuento celular promedio de los animales positivos y negativos al VLB en los dos tambos analizados (considerando solo los animales sanos para el Tambo I). Al comparar animales negativos al VLB en-

tre tambos, se observa que en el Tambo I estos presentaron un número de leucocitos significativamente menor ($P=0.004$) que los negativos al VLB del Tambo II. Sin embargo, al considerar la totalidad de los animales negativos al VLB del Tambo I (sanos + enfermos), el promedio de leucocitos no resultó diferente entre los tambos ($6067/\text{mm}^3 \pm 640$ vs $7312/\text{mm}^3 \pm 541$, $P=0.16$). La diferencia observada en el número de leucocitos para los animales negativos de ambos tambos afectó al número promedio de linfocitos y de PMN, pero no afectó los porcentajes promedio de estos tipos celulares. En el caso de los monocitos, si bien no existieron diferencias en su número, se observó que el porcentaje resultó mayor en los animales negativos a VLB del Tambo I que en los del Tambo II ($P=0.004$). Al considerar animales positivos a VLB entre tambos, no se observaron diferencias respecto al número de leucocitos ni de los distintos tipos celulares de la fórmula leucocitaria. Sin embargo, si hubo diferencias entre los porcentajes de linfocitos y monocitos ($P=0.027$ y $P=0.026$, respectivamente).

Por otra parte, los animales positivos a VLB presentaron un número de leucocitos y linfocitos significativamente mayor que los VLB negativos en ambos tambos ($P<0.01$ en todos los casos). En el Tambo I, no se observaron diferencias entre animales negativos y positivos al VLB respecto al número de PMN. Sin embargo, en el Tambo II éstos resultaron mayores, en número y porcentaje, en los animales negativos ($P=0.01$). No se observaron diferencias en el número de monocitos, ni en relación al resultado del ELISA ni entre los tambos.

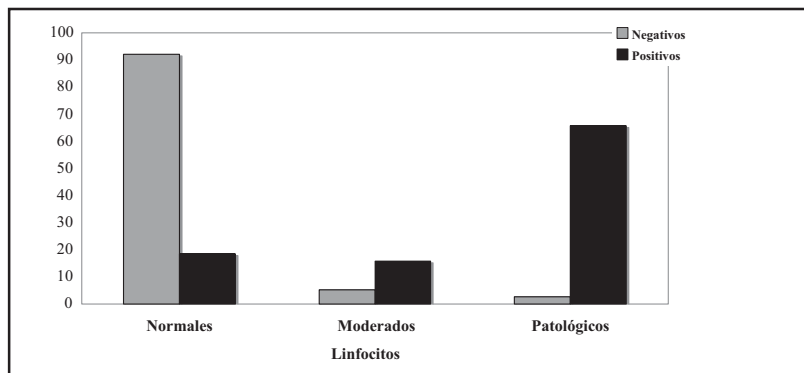


Figura 3. Porcentaje de animales positivos y negativos por ELISA con niveles normales, moderadamente aumentados y patológicamente aumentados de linfocitos.

Cuadro 2. Promedio (Células/ $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) de Leucocitos totales, Linfocitos, Polimorfonucleados (PMN) y Monocitos en vacas positivas (P) y negativas (N) por ELISA, para cada tambo. Entre paréntesis se muestran los valores en porcentaje.

| ELISA | Tambo 1 | | Tambo 2 | |
|------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | N | P | N | P |
| Leucocitos | 4807 ± 647^a | 8014 ± 647^{bc} | 7312 ± 541^b | 9252 ± 556^c |
| Linfocitos | 2299 ± 549^a (48% ^a) | 5197 ± 549^c (61% ^b) | 3710 ± 460^b (51% ^a) | 6564 ± 472^c (70% ^c) |
| PMN | 2370 ± 313^a (48% ^a) | 2583 ± 313^a (36% ^b) | 3515 ± 262^b (47% ^a) | 2584 ± 259^a (28% ^b) |
| Monocitos | 137 ± 50^{ab} (3.1% ^a) | 233 ± 73^a (2.6% ^a) | 86 ± 42^b (1.1% ^b) | 103 ± 43^{ab} (1.1% ^b) |

Las letras distintas en la misma fila y misma variable (número/porcentaje) difieren $P<0.05$.

DISCUSIÓN

Los métodos diagnósticos usados de rutina para el diagnóstico de LEB en Uruguay incluyen IDGA y ELISA preponderantemente, los cuales están diseñados para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra el VLB. Asimismo, han sido descritos métodos moleculares que mediante amplificación por PCR de secuencias virales específicas buscan detectar la presencia del ADN proviral insertado en los linfocitos infectados. Estos últimos métodos no son utilizados de rutina en nuestro país.

En este trabajo, nos propusimos comparar las técnicas de IDGA, ELISA y PCR como herramientas diagnósticas de la LEB disponibles en nuestro país.

Los resultados obtenidos muestran que el método diagnóstico más sensible fue la PCR, siendo IDGA la que detectó menor número de animales positivos. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2001; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007). Si bien la S de la IDGA y del ELISA fue menor que la de la PCR, la E de ambos métodos fue mayor.

El hecho de que la PCR tradicional detecte animales que presentan ADN proviral y que sean serológicamente negativos, puede deberse a la presencia de animales inmunotolerantes a VLB (Fechner y col., 1997; Monti y col., 2005). Paralelamente, la PCR permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica, animales cursando un período prolongado de latencia o animales con una baja carga de exposición del virus, así como la detección del virus en terneros infectados que recibieron calostro de madres seropositivas (Kaaden y col., 1982).

Por otro lado, Fechner y col (1997) proponen que ciertas variantes en la secuencia del VLB podrían ser menos inmunogénicas que otras generando, por lo tanto, resultados serológicos negativos en animales infectados. Sin embargo, otros estudios no logran determinar una correlación entre el genotipo del VLB y el estado serológico de los animales infectados, y proponen que las diferentes respuestas antivirales podrían estar relacionadas con el estado de la infección y otros factores del hospedador (Licursi y col., 2002). En particular, la expresión del gen

BoLA DRB3.2 ha sido asociada a la susceptibilidad o resistencia del hospedador al aumento de la carga viral (Juliarena y col., 2008).

En otros trabajos se reportaron casos de muestras seropositivas en las que no se pudo amplificar el ADN del virus (Del Fava y Pituco, 2004; Monti y col., 2005). Esto se puede explicar por la existencia de fluctuaciones en el número de linfocitos infectados, por la ubicación de los mismos en el hospedador o porque existan variaciones genéticas en el virus que afecten el reconocimiento del ADN proviral por los cebadores usados en la PCR (Camargos y col., 2005). No obstante, sería conveniente repetir la muestra discordante determinada como positiva por ELISA (con baja D.O.) y negativa tanto por PCR como por IDGA.

Si bien la PCR es más sensible, la IDGA y el ELISA son los métodos recomendados por la OIE y los más utilizados en los planes internacionales de erradicación de la enfermedad. Asimismo, la aplicación de la PCR requiere de un laboratorio que cuente con la infraestructura necesaria para el manejo de técnicas de virología molecular, donde se pueda tener las precauciones adecuadas, y a través de los procedimientos de control, validar la calidad de los resultados (Beier, 2008). Asimismo, la mayor susceptibilidad a la contaminación de la PCR, hace que el conocimiento y la experiencia del operario sean factores de mayor importancia que en las demás técnicas.

El uso de la PCR sería adecuado como método diagnóstico complementario en aquellos animales que sean negativos al VLB por IDGA y positivos o levemente positivos (baja D.O.) por ELISA, en los cuales se quiera confirmar la presencia del ADN proviral en el genoma de los linfocitos del huésped. En este sentido, el diagnóstico por PCR puede constituir un gran aporte en los programas de erradicación, especialmente en aquellos rodeos con una baja prevalencia de animales infectados, ya que se pueden detectar infecciones recientes, entre 2-4 semanas más temprano que mediante la IDGA (Naif y col., 1992; Kelly y col., 1993; González y col., 2001).

Respecto al recuento celular, un mayor porcentaje de animales positivos al VLB presentó niveles patológicamente aumen-

tados de linfocitos, lo que explica que el promedio de leucocitos en estos animales fuera mayor en comparación a los negativos. Si bien la diferencia entre los animales positivos y negativos con niveles patológicamente aumentados de linfocitos (66 % vs 3 %, respectivamente) es marcada, existen trabajos donde se reporta una variabilidad de 30% a 70% de animales infectados que presentan linfocitosis persistente (Felmer y col., 2006). Para determinar el establecimiento de linfocitosis persistente, se debería evaluar más de una muestra por animal, obtenidas con un intervalo de semanas o meses, ya que se considera que el nivel de linfocitos debe mantenerse aumentado durante un mínimo de tres meses (Chamizo, 2005).

La cantidad de linfocitos resultó menor en los animales negativos al VLB del Tambo I que los negativos del Tambo II. Teniendo en cuenta que, al considerar solo los animales sanos en el Tambo I, el número promedio de leucocitos fue significativamente inferior que en el Tambo II (donde no se pudo determinar el estado sanitario de los animales), es de relevancia la determinación de la fórmula leucocitaria (porcentaje). Es decir, cuando para el Tambo I se incluyeron los animales enfermos, no se observaron cambios significativos en los porcentajes promedio del RLD, pero sí en el número promedio de células/mm³ de sangre. Por lo tanto, es importante que en el hemograma cada tipo celular esté explícito tanto en número de células/mm³ como por el porcentaje que representa en la fórmula leucocitaria. Para la determinación de efectos de la LEB sobre el recuento celular, se debe considerar la presencia de enfermedades concurrentes (muy frecuentes en vacas lecheras en producción).

Por otra parte, la edad del animal también afecta el recuento celular, siendo en general mayor el número de linfocitos en terneros (Tolle, 1965). Por lo tanto, el hecho de que en el Tambo II los animales sean más jóvenes, también podría estar influyendo en que presenten mayor porcentaje de linfocitos comparado con los del Tambo I. Asimismo, la prevalencia de LEB en el Tambo II es mayor, lo que hace pensar que en este rodeo la carga viral también sería mayor.

Este trabajo muestra una importante prevalencia de la LEB (27,8 % en el Tambo I

y 48,7% en el Tambo II) incluso en animales jóvenes (Tambo II). La falta de un plan de manejo sanitario adecuado para la erradicación de la enfermedad (Acta 84, COHNAS) y la aplicación del programa de vacunación contra la fiebre aftosa en el 2001 se han propuesto como razones que podrían explicar el aumento de la prevalencia de LEB en Uruguay en la última década (Zaffaroni y col., 2007).

Los programas de erradicación de la leucosis bovina implican separar los animales positivos de los negativos, por lo cual es imprescindible contar con metodologías diagnósticas de alta sensibilidad. La comparación de métodos diagnósticos de LEB realizada en este trabajo, demuestra que los animales con resultados positivos obtenidos por IDGA y ELISA se clasifican en el grupo de animales infectados. En cambio, un cierto porcentaje de los animales con resultados negativos

usando estas metodologías, en realidad son positivos al utilizar la PCR como método diagnóstico. Por lo tanto, debido a la mayor sensibilidad demostrada, se debería utilizar la PCR como técnica confirmatoria de segunda línea para asegurar la negatividad de un rodeo.

El impacto y distribución de la enfermedad a nivel nacional y regional es indiscutible, así como también, las dificultades inherentes a su control y/o erradicación, por lo tanto, el aumento de la investigación científica interinstitucional en este tema y la transferencia tecnológica al sector productivo aportan importantes insumos para la solución de este complejo problema de sanidad animal.

CONCLUSIONES

La comparación de los diferentes métodos diagnósticos actualmente disponibles en Uruguay demostró que la técnica de

PCR presentó una mayor sensibilidad, seguido por el ELISA y por la IDGA.

El número promedio de linfocitos aumentó significativamente en los animales que presentan el VLB, aunque no puede descartarse que la presencia de enfermedades concurrentes afecte de forma relevante el número total de estos.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata, Argentina por la gentil donación del Kit de IDGA con el que se analizaron las muestras.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto FPTA – INIA N° 174; y LIA-CNRS-France.

A la Dra. Lourdes Adrien por su colaboración en la toma de muestras.

Referencias Bibliográficas

Ballagi-Pordany, A.; Klintevall, K.; Merza, M.; Klingeborn, B.; Belak, S. (1992). Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. (B)*. 39: 69-77.

Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2a. ed. Paris, Ed. OIE, pp. 723-738.

Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portetelle, D.; Van den Broeke, A.; Willems, L.; Thomas, R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32: 149-170.

Camargos, M.F.; Junior, C.A.O.; da Cruz, C.J.M.; Lessa, L.M.; Rocha, M.A.; Stancek, D.; Pellegrin, A.O.; Reis, J.K.P.; Leite, R.C. (2005). Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina. *Comunicação científica. R. Bras. Ci. Vet.* 12(1)(3): 149-150.

Camargos, M.F.; Feliziani, F.; De Giuseppe, A.; Lessa, L.M.; Reis, J.K.P.; Leite R.C. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinaria*. 102: 169-173.

Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET. VI (7)*: 2-25. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html>.

Collazo, L.; Sienna, R.; Irabuena, O.; Guarino, H.; Navarro, M.; Lavarello, L. (2002). Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzootica en Ganado lechero. *Jorn. Urug. Buiatría XXX. Paysandú, Uruguay*. p. 322-325.

Crowther, J.R. (2009). The ELISA Handbook. 2nd ed.. Humana Press. pp 568.

de la Sota, M.D. (2004). Manual de procedimiento Leucosis Bovina Enzootica, Dirección Nacional de Luchas Sanitarias, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. 9:1-27. <http://kogi.udea.edu.co/talleres/Medicina/.../leucosis%20senasa.pdf>.

Del Fava, C.; Pituco, E.M. (2004). Infecção pelo Virus da Leucemia

Bovina (BLV) no Brasil. *Divulgação Técnica. Biológico, San Pablo*, 66(1)(2):1-8.

Fechner, H.; Kurg, A.; Geue, L.; Blankenstein, P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J. Vet. Med.* 43: 621-630.

Fechner, H.; Blankenstein, P.; Looman, A.C.; Elwert, J.; Geue, L.; Albrecht, C.; Kurg, A.; Beber, D.; Marquardt, O.; Ebner, D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*. 237: 261-269.

Felmer, R.; Zúñiga, J.; Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38 (2):137-141.

Ferrer, J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sc. Comp. Med.* 24:1-68.

González, E.T.; Oliva, G.A.; Valera, A.; Bonzo, E.; Licursi, M.; Etcheverrigaray, M.E. (2001). Leucosis Enzootica Bovina:

- Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Revista Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.
- Guarino, H.; Saizar, J.; Sienna, R.** (1989). Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzootica. *Jorn. Urug. Buiatría XVII*. Paysandú, Uruguay. 4:1-7.
- Juliarena, M.A.; Poli, M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutierrez, S.; Dolcini, G.; Rodríguez, E.M.; Mariño, B.; Rodríguez-Dubra, C.; Esteban, E.N.** (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 39: 432-438.
- Kaaden, O.R.; Lange, S.; Romanowski, W.; Marré, H.; Pfeilsticker, J.; Roselius, R.** (1982). Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zentralbl. Veterinarmed.* 29(4): 269-274.
- Kelly, E.J.; Jackson, M.K.; Marsolais, G.; Morrey, J.D.; Callan, R.J.** (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 54(2):205-209.
- Mammerickx, M.; Portetelle, D.; de Clercq, K.; Burny, A.** (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res.* 11: 353-358.
- Martín, D.; Arjona, A.; Viana, M.; Soto, I.; Barquero, N.; Gómez-Lucía, E.** (2000). Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzootica. *Med Vet.* 17:133-141.
- Martín, D.; Arjona, A.; Soto, I.; Barquero, N.; Viana, M.; Gómez-Lucía, E.** (2001). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J. Vet. Méd.* 48: 97-106.
- Mederos, A.; Irigoyen, D.** (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. *Jorn. Urug. Buiatría XXVI*. Paysandú, Uruguay. p. 19-20.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 12: 319-325.
- Monti, G.E.; Frankena, K.; Ángel, K.; Ángel, B.; Buist, W.; Tarabla, H.D.; M De Jong, M.C.** (2005). Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 451-457.
- Moratorio, G.; Obal, G.; Dubra, A.; Correa, A.; Bianchi, S.; Buschiazzo, A.; Cristina, J.; Pritsch, O.** (2010). Phylogenetic analysis of Bovine Leukemia Viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch. Virol.* 2010.
- Naif, H.M.; Daniel, R.C.; Cogle, W.G.; Lavin, M.F.** (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 30(3): 675-679.
- Licursi, M.; Inoshima, Y.; Wu, D.; Yokoyama, T.; González, E.T.; Sentsui, H.** (2003). Provirus variants of bovine leukemia virus innaturally infected cattle from Argentina and Japan. *Veterinary Microbiology*. 96: 17-23.
- Portetelle, D.; Couez, D.; Bruck, C.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Van Der Maaten, M.; Brasseur, R.; Burny, A.** (1989). Antigenic variants of bovine leukaemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH₂ part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology*. 1: 27-33.
- Sienna, R.; Nuñez, A.; González, A.; Ceretta, M.E.; Guarino, H.; Morón, C.** (1998). Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzootica en ganado Lechero. *Jorn. Urug. Buiatría XXVI*, Paysandú, Uruguay. p. 23-25.
- Tiscornia, A.C.; Cayota, A.; Landoni, A.I.; Brito, C.; Oppezzo, P.; Vuillier, F.; Robillo, C.; Digiero, G.; Gabús, R.; Pritsch, O.** (2004). Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. 18(1): 48-56.
- Tolle, A.** (1965). Zur Beurteilung quantitativer hematologischer Befunde im Rahmen der Leukose - Diagnostik beim Rind. *Zbl. Vet. Med.* 12 : 281.
- Trainin, Z.; Brenner, J.** (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel journal of veterinary medicine*. 60(4): 94-105.
- Trono, K.G.; Pérez-Filguiera, D.M.; Duffy, S.; Borca, M.V.; Carrillo, C.** (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 83: 235-248.
- Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M.** (1975). Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.* 43: 360-362.
- Zaffaroni, R.; Piaggio, J.; Nuñez, A.; de Freitas, J.; Suanes, A.; Cernicchiaro, N.; Gil, A.** (2007). Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. *V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay*. p. 150-151.