

LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad del ganado bovino causada por el virus de la leucemia bovina (VLE), miembro de la familia Retroviridae. El ganado puede infectarse a cualquier edad, incluida la fase embrionaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero un porcentaje del ganado mayor de 3 años (~30%) desarrolla una linfocitosis persistente, y un grupo menor, desarrolla linfosarcomas (tumores) en varios órganos internos. También se ha registrado la infección natural en búfalos acuáticos y capibaras. Los síntomas clínicos, cuando se presentan, dependen de los órganos afectados. El ganado bovino con linfosarcomas puede morir súbitamente o a las pocas semanas o meses después de la aparición de los signos clínicos dependiendo de la ubicación y cantidad de los tumores y de las características de crecimiento de los mismos.

Identificación del agente: Los virus se pueden detectar en el sobrenadante del cultivo mediante el cultivo in vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los animales infectados, o mediante pruebas de detección del antígeno, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por microscopía electrónica. También se puede detectar el ADN del provirus en PBMC o en los tumores de animales infectados mediante la PCR.

Pruebas serológicas: Los métodos de detección de los anticuerpos más utilizados son la inmunodifusión en gel de agar (AGID), en la que se utilizan sueros, o el enzoinmunoanálisis (ELISA), en el que se utilizan sueros o muestras de leche. En muchos países, estas pruebas constituyen la base de políticas acertadas para la erradicación de la enfermedad. También pueden utilizarse otras pruebas como el radioinmunoanálisis. Se comercializan varios kits de las pruebas AGID y ELISA.

Requisitos para las vacunas: No existen vacunas contra el VLE.

A. INTRODUCCIÓN

Los linfosarcomas del ganado bovino pueden tener varias causas, pero la única causa conocida es el retrovirus de la leucemia bovina (VLE), que origina la leucosis bovina enzoótica (LBE). El término "leucosis bovina esporádica" (LBES) se reserva normalmente para los animales jóvenes (terneros), así como para los linfomas de tipo cutáneo y tímico, que se definen de acuerdo con la edad del animal afectado y por la distribución de los tumores. Se desconoce la causa de la LBES. También puede haber trastornos linfosarcomatosos que no correspondan a las categorías de la LBES ni la LBE, como el caso del linfoma multicéntrico de adultos, de aparición esporádica y de etiología desconocida. Solamente deben denominarse "leucosis" o "leucosis enzoótica bovina" los linfomas causados por la infección con el VLE (Gillet *et al.*, 2007).

Aunque los animales pueden resultar infectados por el VLE a cualquier edad, los tumores (linfosarcomas) se observan típicamente en los animales de más de 3 años. Normalmente las infecciones son subclínicas; solamente el 30–70% del ganado infectado desarrolla una linfocitosis persistente, y el 0,1–10% de los animales infectados desarrolla tumores. Los signos clínicos dependen del lugar en que aparecen los tumores y pueden incluir desarreglos digestivos, falta de apetito, pérdida de peso, debilidad o decaimiento general y, a veces, signos neurológicos. Los ganglios linfáticos superficiales pueden estar claramente aumentados de tamaño y palparse bajo la piel y mediante un examen rectal. A la necropsia, los ganglios linfáticos y gran variedad de tejidos están infiltrados por células neoplásicas. Los órganos implicados con más frecuencia son el abomaso, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, el omaso, los pulmones y el útero. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizás también el desarrollo del propio tumor.

Cada vez hay más datos que respaldan el papel del virus como causa de disfunciones inmunológicas o del aumento del desvieje. En dos estudios a gran escala se ha estudiado la disminución media de la producción de leche por vaca en manadas positivas al VLE en comparación con manadas negativas, y se ha observado que los porcentajes son del 2,5% y del 2,7%, respectivamente (Emanuelsson *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 2003). Estos hallazgos se han vuelto a confirmar en estudios recientes (Nekouei *et al.*, 2016; Norby *et al.*, 2016). Además, se ha observado una tasa de concepción un 7% inferior en las vacas positivas al VLE que en las negativas. Asimismo, también se ha observado un aumento de las tasas de desvieje y una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, como las mastitis, diarrea y neumonía en manadas positivas al VLE (Emanuelsson *et al.*, 1992). También se ha descrito una reducción de la inmunidad protectora tras la vacunación de ganado bovino infectado por el VLE (Frie *et al.*, 2016; Puentes *et al.*, 2016). Por tanto, a pesar de que no hay signos clínicos evidentes durante el largo periodo de infección subclínica, las pérdidas económicas causadas por las infecciones persistentes por el VLE parecen ser importantes.

El virus puede detectarse mediante el cultivo *in vitro* de los linfocitos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El virus está en las PBMC y en células tumorales como provirus integrado en el ADN de las células infectadas. También se encuentra en la fracción celular de varios líquidos del cuerpo (exudado nasal y bronquial, saliva y leche). El contagio natural tiene lugar por la transferencia de células infectadas, por ejemplo durante el parto. También se produce el contagio artificial, por ejemplo, por agujas, equipo quirúrgico, guantes usados en exámenes rectales, etc. contaminados con sangre. El contagio horizontal en ausencia de estos factores suele ser bajo (Monti *et al.*, 2005). En las regiones con muchos insectos hematófagos, especialmente tábanos, estos pueden transmitir el virus de forma mecánica. Los antígenos víricos y el ADN del provirus se pueden identificar en semen, leche y calostro de animales infectados (Dus Santos *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 1983). Sin embargo, no se ha demostrado claramente la transmisión natural por estas secreciones.

Aunque se pueden infectar varias especies animales por inoculación con el virus, la infección natural solo tiene lugar en el ganado bovino (*Bos taurus* y *Bos indicus*), en búfalos y en capibaras. Las ovejas son muy susceptibles a la inoculación experimental y a menudo desarrollan tumores a una edad más temprana que en el ganado bovino. También puede detectarse una respuesta de anticuerpos persistentes después de una inoculación experimental en ciervos, conejos, ratas, cobayas, gatos, perros, ovejas, monos rhesus, chimpancés, antílopes, cerdos, cabras y búfalos.

Probablemente el VLE estuvo presente en Europa durante el siglo XIX, desde donde se extendió al continente americano en la primera mitad del siglo XX. Puede haber regresado a Europa y haberse introducido por primera vez en otros países con la importación de ganado norteamericano (Johnson & Kaneene, 1992). A pesar de que el VLE está presente en todo el mundo, varios países, sobre todo de Europa occidental, han sido reconocidos como oficialmente libres de infección por el VLE debido a que cuentan con programas de vigilancia continua.

Se han realizado diversos estudios para determinar si el VLE causa enfermedades en los humanos, sobre todo por el consumo de leche de vacas infectadas (Burmeister *et al.*, 2007; Perzova *et al.*, 2000). Se ha especulado acerca de la participación del VLE en el cáncer de mama humano (Buehring *et al.*, 2015), pero estos hallazgos no han sido confirmados por otros investigadores (Gillet & Willems, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Así pues, dado que no existen datos concluyentes en relación a una transmisión zoonótica, actualmente por lo general se considera que el VLE no es peligroso para el ser humano.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la leucosis enzoótica bovina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	-	+	-	+	-	n/a
PCR	+	++	+	++	+	n/a

1 A combination of agent identification methods applied on the same clinical sample is recommended.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
ELISA	+++	+++	+++	+++	+++	n/a

Clave: +++= método recomendado, validado para el propósito indicado; ++=método adecuado, pero puede precisarse validación; +=puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan en gran medida su aplicación; -=no adecuado para este fin; n/a= no aplicable.
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Identificación del agente

El VLE es un retrovirus exógeno y pertenece al género *Deltaretrovirus*, dentro de la subfamilia Ortoretrovirinae y la familia Retroviridae. Está relacionado desde el punto de vista estructural y funcional con los virus de los primates tipos 1,2 y 3 que infectan a los linfocitos T (VLTS-1, -2, -3) y los virus de los humanos tipos 1 y 2 que infectan a los linfocitos T (HTLV-1 y -2). Las principales células diana del VLE son los linfocitos B (Beyer *et al.*, 2002; Gillet *et al.*, 2007). Las partículas víricas constan de dos ARN monocatenarios de sentido positivo que codifican la nucleoproteína p12, la proteína p24 de la cápsida, la glucoproteína transmembrana gp30, la glicoproteína de la envoltura gp51, y varias enzimas, entre las que se incluye la transcriptasa inversa. El ADN del provirus, que se genera tras la transcripción inversa del genoma vírico, se integra al azar en el ADN de la célula hospedadora, donde persiste sin una producción constante de progenie vírica. Cuando las células infectadas se cultivan *in vitro*, generalmente mediante el co-cultivo de PBMC con células indicadoras, se produce virus infeccioso, lo que sucede más rápidamente si se estimulan las células con mitógenos.

1.1. Aislamiento del virus

Las PBMC se aíslan en un gradiente de densidad a base de ficoll/metrizoato sódico, partiendo de 1,5 ml de sangre periférica tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Después se cultivan con 2×10^6 células de pulmón fetal bovino (FBL) y se cultivan durante 3–4 días en 40 ml de medio mínimo esencial (MEM) que contenga un 20% de suero fetal bovino. El virus hace que aparezcan sincitios en la monocapa de las células FBL. Se pueden preparar cultivos de corta duración, cultivando PBMC en ausencia de células FBL en placas de 24 pocillos durante 3 días (Miller *et al.*, 1985). Los antígenos p24 y gp51 pueden detectarse a continuación en el sobrenadante de los cultivos mediante el radioinmunoanálisis (RIA), el enzimoimmunoanálisis (ELISA), la inmunotransferencia o mediante la inmunodifusión en gel de agar (AGID), y la presencia de partículas de VLE o provirus VLE se puede demostrar mediante la microscopía electrónica y por la PCR, respectivamente.

1.2. Detección de ácidos nucleicos mediante PCR

Varios autores han descrito la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el provirus del VLE (Fechner *et al.*, 1996; Rola-Luszczak *et al.*, 2013). Con distintos grados de éxito se han utilizado cebadores concebidos para combinarse con las regiones *gag*, *pol* y *env* del genoma. Hasta ahora, la PCR en tiempo real es el método más sensible y rápido. El método descrito se basa en PCR convencionales basadas en secuencias de cebador del gen *env*, que codifica la gp51 y un método en tiempo real basado en la detección del gen *pol*. Esta técnica solo se lleva a cabo en aquellos laboratorios que dispongan de instalaciones para virología molecular, y deben tenerse en cuenta las precauciones normales y los procedimientos de control necesarios para asegurar la validez de los resultados de la prueba (véase el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

La PCR se utiliza principalmente como ayuda a la serología para la confirmación de los resultados. La detección del VLE en animales determinados mediante PCR puede ser útil en las siguientes circunstancias:

- i) Terneros jóvenes con anticuerpos del calostro,
- ii) Casos de tumor, para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso,

- iii) Tejido tumoral de casos sospechosos recogidos en mataderos,
- iv) Nuevas infecciones, antes del desarrollo de anticuerpos contra el VLE,
- v) Casos de resultados débilmente positivos o dudosos en el ELISA,
- vi) Análisis sistemático de ganado en centros de análisis de la descendencia (antes de la introducción en centros de inseminación artificial)
- vii) Ganado utilizado en la producción de vacunas, para comprobar que están exentos de VLE.

1.2.1. Sensibilidad y fiabilidad del método

i) *Sensibilidad analítica*

Aunque la prueba de la PCR tiene una sensibilidad teórica de una molécula problema, en la práctica la sensibilidad analítica podría ser de alrededor de 5–10 moléculas de ADN provírico.

ii) *Falsos positivos*

La elevada sensibilidad de la PCR anidada puede causar problemas de falsos positivos debido a la contaminación entre las muestras (Belak & Ballagi-Pordany, 1993). Para reducir este problema, se adoptan durante el protocolo varios procedimientos especiales, como la utilización de cabinas de flujo laminar, empleo de locales separados para las distintas fases del proceso, guantes nuevos en cada caso, utilización de tubos con apertura especial para cada prueba y controles negativos (como blancos de agua).

iii) *Falsos negativos*

Debe advertirse que solo una pequeña proporción de las PBMC puede resultar infectada, lo que limita la sensibilidad de la prueba. La presencia de sustancias inhibitoras en algunas muestras puede originar falsos negativos. Para detectar esto, en cada prueba se utiliza por lo menos un control positivo. Además, a cada muestra se le pueden añadir controles internos (réplicas). La réplica es una molécula problema modificada que se amplifica con los mismos cebadores que la molécula problema real, pero que genera un producto de la PCR con diferente tamaño, y que puede visualizarse mediante la electroforesis en gel de agarosa. La réplica se añade a una concentración baja que favorece una amplificación de la molécula problema real (Ballagi-Pordany & Belak, (1996). No obstante, es posible que la réplica compita con la verdadera molécula problema. Por tanto, puede ser necesario analizar cada muestra con y sin réplica.

1.2.2. Preparación de la muestra

Las PBMC se separan de las muestras de sangre con EDTA utilizando una método de centrifugación por gradiente de densidades. Como alternativa, se puede utilizar la capa leucocitaria o incluso sangre completa, por ejemplo cuando las muestras se han congelado.

Los tumores y otros tejidos deben homogeneizarse hasta formar una suspensión al 10%.

1.2.3. Extracción del ADN

La purificación del ADN total es un prerrequisito para alcanzar una sensibilidad óptima. Se han comercializado varios métodos de purificación, que son adecuados para esta prueba.

Se deben adoptar precauciones especiales en todos los pasos para minimizar el riesgo de contaminación (Belak & Ballagi-Pordany, 1993).

1.2.4. Procedimiento de la PCR anidada

Se han publicado varios protocolos de la PCR para la detección de secuencias del provirus del VLE; como ejemplo, se describe en detalle una prueba desarrollada por Fechner *et al.*, 1996. La región del VLE usada como diana es el gen *env*, que codifica la proteína gp51. La secuencia utilizada para el diseño de los cebadores está disponible en el banco de datos GenBank, con número de acceso K02120.

1.2.4.2. Método desarrollado por Fechner *et al.* (1996)

i) Diseño y secuencias de los cebadores

Oligo	Secuencia de Env(5'–3')	Posición
BLV-env-1	TCT-GTG-CCA-AGT-CTC-CCA-GAT-A	5032–5053
BLV-env-2	AAC-AAC-AAC-CTC-TGG-GAA-GGG	5629–5608
BLV-env-3	CCC-ACA-AGG-GCG-GCG-CCG-GTT-T	5099–5121
BLV-env-4	GCG-AGG-CCG-GGT-CCA-GAG-CTG-G	5542–5521

El tamaño del producto de la PCR BLV-env-1/BLV-env-2 es de 598 pb. El tamaño del producto de la PCR BLV-env-3/BLV-env-4 es de 444 pb.

ii) Mezclas de reacción

Las soluciones de reacción se mezclan (excepto la muestra de ADN) antes de añadirlas a tubos de reacción independientes. Debe añadirse un control positivo (agua bidestilada) por cada cinco muestras. Los volúmenes totales de las mezclas se calculan multiplicando los volúmenes indicados por el número total de muestras, incluidos los controles, más uno.

La primera PCR se puede realizar empleando un volumen de reacción de 50 µl. Para una reacción, la prueba se optimiza a 5 µl de tampón de PCR (10x), 20 µl de ADN (~1 µg de ADN), 1,25 µl de cada uno de los cebadores específicos de env, es decir, BLV-env-1 y BLV-env-2 (20 pmol/µl), 0,15 dNTP (cada una a una concentración de 25 mM), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl de Polimerasa Taq (1,25 U), y 19,1 µl de agua destilada. La reacción sigue el siguiente perfil de temperatura: desnaturalización de 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 60 segundos a 72°C; seguido de 4 minutos a 72°C.

La PCR anidada se puede realizar empleando un volumen de reacción de 50 µl. Para una reacción, la prueba se optimiza a 3 µl de tampón de la primera PCR, 5 µl de tampón para PCR (10x), 1,25 µl de cada uno de los cebadores específicos de env, es decir, BLV-env-3 y BLV-env-4 (20 pmol/µl), 0,15 dNTP (cada una a una concentración de 25 mM), 0,25 µl de Polimerasa Taq (1,25 U), y 36,1 µl de agua destilada. La reacción sigue el siguiente perfil de temperatura: desnaturalización de 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 60 segundos a 72°C; seguido de 4 minutos a 72°C.

iii) Procedimiento de laboratorio

Se mezclan los reactivos de la PCR para la PCR primera o anidada y se emplean guantes o abridores de tubos distintos para cada tubo al añadir las muestras de ADN. Se colocan las muestras sobre hielo. Se calienta el termobloque a 94°C. Se colocan las muestras en el termobloque y se empiezan los programas de la PCR según corresponda.

iv) Electroforesis en gel de agarosa

Se cargan unos 10 µl de los productos de la PCR anidada con 20 µl de tampón de carga en un gel de agarosa al 2% que contenga bromuro de etidio al 0,01% (o, como alternativa, cepas más seguras para la visualización de los productos de la PCR). Se lleva a cabo la electroforesis con 90 mA durante 2 horas empleando tampón Tris/borato/EDTA (TBE) 0,5x. Para controlar el tamaño de los productos de la amplificación, se recomienda utilizar un patrón de 100 pb. El análisis de los productos de la PCR se lleva a cabo mediante luz UV.

v) Interpretación de los resultados

- Resultados positivos:** Las muestras positivas deben tener productos de la PCR del tamaño esperado (444 pb), similares al control positivo.
- Resultados negativos:** Las muestras negativas no deben tener productos de la PCR del tamaño esperado (444 pb).
- Resultados dudosos:** La prueba debe repetirse si el control positivo permanece negativo o si los controles negativos con agua resultan positivos.

vi) Pruebas confirmativas

Para confirmar la identificación, los productos de la PCR pueden secuenciarse, hibridarse a una sonda o analizarse mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Fechner *et al.*, 1997).

1.2.5. PCR en tiempo real

Se han publicado varios protocolos de PCR en tiempo real para la detección de secuencias de provirus VLE: el método de Rola-Łuszczak *et al.* (2013) se describe en detalle aquí a modo de ejemplo. La región del VLE utilizada como objetivo es el gen *pol*. La secuencia utilizada para diseñar los cebadores está disponible en GenBank con el número de acceso K02120.

1.2.5.1. Método desarrollado por Rola-Łuszczak *et al.* (2013)

i) Diseño y secuencias del cebador

Oligo	Secuencia de <i>Pol</i> (5'–3')	Posición
MRBLVL	CCT-CAA-TTC-CCT-TTA-AAC-TA	2321-2340
MRBLVR	GTA-CCG-GGA-AGA-CTG-GAT-TA	2421-2440
Sonda MRBLV	6FAM GAA-CGC-CTC-CAG-GCC-CTT-CA BHQ1	2341-2360

Tamaño del producto de la PCR: 120 pb

ii) Mezclas de reacción

Las soluciones de reacción se mezclan (excepto la muestra de ADN) antes de agregarse a los tubos de reacción específicos. Se debe agregar un control negativo (H₂O doblemente destilada) por cada cinco muestras y un control positivo. Los volúmenes totales de mezclas se calculan multiplicando los volúmenes indicados por el número total de muestras, incluidos los controles, más uno.

La mezcla de reacción para cada prueba de PCR contiene 12,5 µl de mezcla primaria de PCR 2x, 0,4 u µM de cada uno de los cebadores y 0,2 µM de la sonda específica del VLE y 500 ng del ADN genómico extraído, usando un volumen de reacción final de 25 µl. La amplificación se realizó según las siguientes condiciones: incubación inicial y activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos, desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, hibridación a 60°C durante 60 segundos a través de 50 ciclos.

iii) Procedimiento de laboratorio

Se mezclan los reactivos de la PCR y se utilizan guantes o abridores de tubo independientes para cada tubo al agregar las muestras de ADN. Las muestras se ponen en hielo. Después se sitúan en el termobloque y se analizan con los parámetros apropiados.

iv) Interpretación de los resultados

- a) Son positivas las muestras con Ct inferior o igual a 40,95.
- b) Son positivas las muestras sin valor Ct o con un valor Ct superior a 40,96.
- c) El ensayo debe repetirse si el control positivo se ha mantenido negativo o si los controles de agua negativos dan un resultado positivo. Las muestras en el límite de corte (es decir, Ct = 40) deben volver a analizarse y confirmarse.

v) Prueba de confirmación

Para confirmar la identificación, pueden secuenciarse los productos de la PCR.

2. Pruebas serológicas

La infección del ganado por el virus dura toda la vida y origina una respuesta persistente de anticuerpos, los cuales se detectan por primera vez a las 3–16 semanas post-infección. Los anticuerpos derivados de la madre pueden tardar de 6 a 7 meses en desaparecer. No hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa. Sin embargo, la infección

activa se puede confirmar mediante la detección del provirus del VLE mediante la PCR. Los anticuerpos pasivos tienden a proteger a los terneros contra la infección. Durante el período periparto, las vacas pueden tener anticuerpos séricos que son indetectables mediante la AGID debido al paso de los anticuerpos desde el sistema circulatorio de la vaca al calostro. Por tanto, cuando se utiliza la prueba AGID, un resultado negativo de la prueba con suero tomado en ese momento (2–6 semanas antes del parto y 1–2 semanas después del parto) no es concluyente y la prueba debe repetirse. No obstante, la prueba AGID se puede realizar en esta fase con el calostro inicial.

Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra la gp51 y la p24 del virus. La mayor parte de las pruebas rutinarias AGID y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana. Se han descrito métodos para realizar estas pruebas (Dimmock *et al.*, 1987; Comisión Europea, 2009). Los ELISA son normalmente más sensibles que las AGID.

Existen sueros liofilizados e irradiados para utilizarlos en ELISA como sueros de referencia de la OIE, que son débilmente positivos y negativos, y están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE en Alemania (véase la Tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*). La calibración de estos sueros se basa en el suero de referencia acreditado de la OIE, llamado “E05”, que ha sido validado frente al anterior de suero de referencia E4 mediante diferentes AGID y de ELISA.

2.1. Enzimoimmunoanálisis

Se puede utilizar un ELISA indirecto o un ELISA de bloqueo. Las pruebas basadas en estos principios están comercializadas; se pueden necesitar kits diferentes para las muestras de suero que para las de leche. Algunos ELISA son lo suficientemente sensibles como para utilizarse con muestras puestas en común. Los ELISA se realizan en microplacas de fase sólida. El antígeno del VLE se utiliza para recubrir las placas, bien directamente o por medio de un anticuerpo policlonal o monoclonal (MAb) de captura. El antígeno se prepara a partir del sobrenadante del cultivo de líneas celulares infectadas persistentemente con VLE. Las células de riñón de cordero fetal (FLK) son las más frecuentemente utilizadas en las pruebas comercializadas (Van der Maaten & Miller, 1976). Desde 2004, se dispone de una nueva línea celular que produce VLE, la PO714, que está libre de otras infecciones víricas y contiene un provirus del subgrupo belga (Beier *et al.*, 2004). El antígeno se utiliza a una dilución predeterminada (por ejemplo, 1/10) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). En forma de kit, las placas se adquieren a veces antigenizadas. Se pueden añadir algunos conservantes a las muestras de leche para evitar que se agrien. Normalmente, las muestras con conservante no se deterioran de modo significativo si se conservan hasta 6 semanas a 4°C.

2.1.1. Enzimoimmunoanálisis de bloqueo – ELISA para suero

El siguiente método es adecuado para la detección de anticuerpos en muestras individuales o combinadas de suero.

2.1.1.1. Procedimiento analítico

i) Recubrimiento de la placa

Todos los pocillos se recubren con anticuerpos contra el VLE prediluido en tampón de recubrimiento (100 µl/pocillo); la placa se cierra y se incuba durante 18 horas a 4°C. Se realiza un ciclo de lavado (lavado estándar), que consiste en tres lavados llenando los pocillos hasta arriba y dejando cada vez el tampón durante 3 minutos; después se seca la placa. Se añade el antígeno del VLE prediluido en tampón de lavado (100 µl/pocillo); se cierra la placa y se incuba durante 2 horas a 37°C. Se realiza un ciclo estándar de lavado.

ii) Preparación y adición de muestras y controles

Los controles de suero positivo y negativo se prediluyen en tampón de lavado (1/2) y se añade la solución a cuatro pocillos por cada control (100 µl/pocillo). Para analizar muestras combinadas se pueden agrupar 80 sueros diluidos (1/2) con el tampón de lavado y añadir la solución a dos pocillos (100 µl/pocillo) por cada muestra. Las muestras aisladas deben diluirse a 1/100 con tampón de lavado y añadir la solución a dos pocillos (100 µl/pocillo) por cada muestra. Después de sembrar las muestras, se cierra la placa y se incuba durante 18 horas a 4°C. Se realiza un breve lavado llenando los pocillos y vaciándolos inmediatamente.

iii) Preparación y adición de conjugados y substrato

A todos los pocillos se añade (100 µl/pocillo) el anticuerpo biotinilado prediluido (se prediluye con tampón de lavado + suero fetal bovino al 10%). Se cierra la placa y se incuba en un agitador durante 1 hora a 37°C. Se realiza un lavado estándar como se

describió anteriormente. Se prediluye avidina conjugada con peroxidasa en el tampón de lavado y se añade a todos los pocillos (100 µl/pocillo). Se cierra la placa y se incuba en un agitador durante 30 minutos a 37°C. Se realiza un lavado estándar. Se añade a todos los pocillos 100 µl del sustrato ortofenilén diamina y se cierra la placa dejándola en la oscuridad durante 9 minutos. La reacción se detiene añadiendo ácido sulfúrico 0,5 M (100 µl/pocillo).

2.1.1.2. Lectura e interpretación de los resultados

Se ajusta el lector de placas con un blanco y se lee la absorbancia a 490 nm. Para los lectores de doble longitud de onda, se utiliza un filtro de referencia de entre 620 nm y 650 nm. Los resultados se leen en un plazo de 60 minutos tras la adición de la solución de parada.

La absorbancia del control negativo debe estar próxima a $1,1 \pm 0,4$. Si la absorbancia es menor de 0,7 el tiempo para el desarrollo del color en el paso (iii) antes descrito debe aumentarse (véase la preparación y adición de conjugados y sustrato). Por el contrario, si la absorbancia es superior a 1,5, el tiempo debe acortarse. La absorbancia del control positivo debe ser menor que la absorbancia del control negativo $\times 0,25$.

Una muestra es positiva cuando la absorbancia de cada uno de los dos pocillos problema es igual o menor que la absorbancia media de los cuatro pocillos negativos $\times 0,5$.

Una muestra es negativa cuando la absorbancia de cada uno de los dos pocillos problema es igual o mayor que la absorbancia media de los cuatro pocillos negativos $\times 0,65$.

Para muestras que dan valores comprendidos entre la absorbancia del control negativo $\times 0,50$ y la absorbancia del control negativo $\times 0,65$ se recomienda volver a analizar al animal tomando una muestra un mes más tarde.

2.1.1.3. Sensibilidad del enzoinmunoanálisis

Se puede determinar la sensibilidad de los ELISA para muestras mezcladas de leche utilizando sueros de débilmente positivos y de referencia de la OIE. Las pruebas deben dar un resultado positivo con los sueros de referencia de la OIE E05 cuando se diluyen en leche negativa a una dilución de 250 veces el número de leches individuales de la mezcla de muestras (Directiva 88/406 de la Unión Europea). Por ejemplo, para mezclas de 60 leches, E05 se debe diluir $1/250 \times 60 = 1/15000$. En el caso de muestras de leche individual, el suero de referencia de la OIE E05 positivo diluido a $1/250$ en leche negativa, debe ser positivo.

Cuando se analizan muestras de mezclas de sueros, el suero de referencia de la OIE E05 debe dar un resultado positivo a una dilución diez veces el número de animales de los que se han extraído las muestras de la mezcla. Por ejemplo, para una mezcla de 50 muestras individuales, el suero de referencia de la OIE diluido a $1/500$ en suero negativo debería dar un resultado positivo. En las pruebas en que las muestras de suero se analizan individualmente, el suero de referencia de la OIE E05 diluido a $1/10$ debe dar positivo.

En el caso de ciertos kits de ELISA, no se recomienda utilizar el resultado positivo como único factor determinante de presencia de enfermedad en un animal, sino que se recomienda una verificación mediante un método secundario.

2.1.2. Enzoinmunoanálisis indirecto –ELISA para leche

El siguiente método es adecuado para la detección de anticuerpos en muestras mezcladas de leche.

2.1.2.1. Controles

En cada prueba deben incluirse controles de leche y de diluyente fuertemente positivos, débilmente positivos y negativos. Debe prepararse un control fuertemente positivo diluyendo el suero de referencia de la OIE E05 a $1/25$ en leche negativa, y un control débilmente positivo diluyendo, en leche negativa, el suero de referencia de la OIE E05 25 veces el número de muestras de leche individuales que contenga la mezcla problema. La leche utilizada para diluir los controles de suero de referencia de la OIE debe ser desnatada, no pasteurizada y conservada.

2.1.2.2. Ejemplo de procedimiento analítico

- i) Las muestras de leche deben guardarse sin perturbar en una nevera hasta que se haya formado una capa cremosa definitiva (24–48 horas), o bien centrifugarse a 2000 rpm durante 10 minutos, y retirar la capa de crema antes del análisis.
- ii) Se pre-recubren las columnas de la placa, de forma alterna, con antígeno contra el VLE y un antígeno control negativo. Se añaden 100 µl de la muestra problema a 100 µl de tampón de lavado en la placa para crear una dilución 1/2, añadiéndola a dos pocillos de antígeno control y dos pocillos de antígeno del VLE.
- iii) La placa se cierra y se mezcla sobre un agitador.
- iv) La placa se incuba 14 a 18 horas a 2–8°C.
- v) Se añaden 300 µl por pocillo de diluyente de lavado y se desechan, y después se añaden 200 µl de diluyente de lavado por pocillo, se agitan durante 10 segundos y se desechan. Por último, se añaden 300 µl de diluyente de lavado, se dejan empapar durante 3 minutos y se desechan.
- vi) Se añaden 200 µl de conjugado purificado por afinidad de anticuerpo anti IgG bovina con peroxidasa de rábano en diluyente de lavado, y la placa se incuba durante 90 minutos a temperatura ambiente.
- vii) La placa se lava añadiendo 300 µl de diluyente de lavado por pocillo; a continuación, se desecha y se añaden 300 µl más de diluyente de lavado. Estos se dejan empapar durante 3 minutos y se desechan. Se repiten los pasos vi y vii.
- viii) Se añaden 200 µl del sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) y la placa se incuba 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. La reacción puede detenerse añadiendo 50 µl de solución de parada.

2.1.2.3. Lectura e interpretación de los resultados

Se hace un blanco en el lector de placas con aire, y la absorbancia se lee a 405 nm. Todos los pocillos de la microplaca deben leerse en un plazo de 2 horas tras añadir la solución de parada. Las lecturas de la absorbancia de los pocillos que contienen antígeno negativo se restan a las lecturas de los pocillos que contienen el antígeno positivo. Debe calcularse la media de dos valores de absorbancia neta para cada muestra problema. Lo mismo se aplica a los controles débilmente positivos en forma de réplica. Las réplicas deben presentar unas absorbancias que no disten más de 0,1 entre ellas.

Para que la prueba se considere válida, la media de la absorbancia neta de los controles débilmente positivos (WP) debe ser de 0,2-0,6 unidades de absorbancia. La absorbancia neta del control fuertemente positivo debe ser >1,0 unidades de absorbancia. La absorbancia neta del control negativo y del control del diluyente debe ser inferior al límite inferior del intervalo inconcluyente.

Considerando que se cumplen los criterios anteriores:

- i) Las muestras problema son positivas si su valor de absorbancia neta es superior o igual al del control WP.
- ii) Las muestras problema son inconcluyentes si su valor de absorbancia neta es un 75% o menos del valor de absorbancia neta del control WP.
es decir, si la absorbancia neta del control WP = 0,40
entonces el límite inferior del intervalo inconcluyente = $0,40 \times 0,750 = 0,30$
el intervalo inconcluyente de este ejemplo sería 0,30–0,39
y las muestras de $\geq 0,40$ se considerarían positivas.
- iii) Las muestras problema son negativas si su valor de absorbancia neta es inferior al límite inferior del intervalo "inconcluyente" (<0,30 en el ejemplo).

2.2. Inmunodifusión en gel de agar

La prueba AGID es específica, pero no muy sensible, para detectar anticuerpos en muestras de suero individuales. Sin embargo, no es adecuada para muestras de leche (excepto el primer calostro) debido a su escasa especificidad y sensibilidad. La prueba AGID es sencilla y fácil de realizar y ha sido muy

útil y eficiente como base para programas de erradicación. En los kits comerciales de AGID se incluyen sueros de referencia.

2.2.1. Gel de agar

Se prepara una solución de agar o agarosa al 0,8–1,2% en tampón Tris 0,2 M, pH 7,2, que contenga NaCl al 8,5%. Una manera de preparar el agar es disolver 24,23 g de Tris metilamina en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2 con HCl 2,5 M. Se disuelve cloruro sódico (85 g) en 250 ml de Tris/HCl y se lleva a 1 litro. Se añade la agarosa (8 g) y la mezcla se calienta en una olla a presión o en un autoclave a 4,55 kg/cm² durante 10 minutos. La mezcla se reparte en alícuotas de 15 ml que pueden mantenerse a 4°C durante aproximadamente 6 semanas.

2.2.2. Antígeno

El antígeno debe contener la glicoproteína gp51 específica del VLE. El antígeno se prepara en un sistema adecuado de cultivo celular, por ejemplo en monocapas de células de riñón de cordero fetal (FLK) persistentemente infectadas. Las células utilizadas para producir el antígeno del VLE deben estar libres del virus no citopático de la diarrea vírica bovina y de retrovirus bovinos, así como de virus semejantes al de la inmunodeficiencia bovina (lentivirus) y de virus bovinos sincitiales (espumavirus). Después de 3–4 días de cultivo a 37°C, el medio de crecimiento se reemplaza con medio de mantenimiento. Se recogen las células 7 días después, utilizando una solución estándar de tripsina/verseno y la suspensión celular obtenida se centrifuga a 500 g durante 10 minutos. A continuación, las células se resuspenden en medio de crecimiento; un 30% de las células se devuelve al recipiente de cultivo y el resto se desecha. Se recoge todo el sobrenadante y se concentra 50–100 veces por el método del que se disponga, bien sea por concentración del material en tubos visking inmersos en polietilenglicol o por precipitación con sulfato amónico seguida de ultrafiltración, o mediante precipitación con polietilenglicol y posterior desalinización y separación por tamaño en una columna de poliacrilamida. El antígeno contiene fundamentalmente gp51, pero también puede contener p24.

El antígeno se puede estandarizar para la glicoproteína gp51 por titulación contra el suero de referencia de la OIE E05, del siguiente modo: Se preparan diluciones a la mitad de la preparación de antígeno. La dilución mayor que, analizada contra el suero de referencia de la OIE E05 sin diluir, origina una línea de precipitación equidistante entre el antígeno y el suero, contiene una unidad. En la prueba se utilizan dos unidades de antígeno.

2.2.3. Suero control positivo

El suero control positivo deriva de un animal infectado de forma natural o experimental (vacas u ovejas). La línea de precipitación formada debe estar bien definida y ser equidistante entre los pocillos del antígeno y del suero control. Se debe incluir en la prueba una dilución suero control positivo que origine un resultado débilmente positivo, como indicador de la sensibilidad de la prueba.

2.2.4. Suero control negativo

Se utiliza suero de animales no infectados (ganado vacuno u ovejas).

2.2.5. Sueros problema

Son adecuados sueros de cualquier especie animal.

2.2.6. Procedimiento analítico

- i) El agar se licua calentándolo en un baño de agua hirviendo y se vierte en placas de Petri (15 ml por placa de Petri de 8,5 cm de diámetro). Las placas se dejan enfriar a 4°C alrededor de 1 hora antes de excavar en el agar los pocillos. Se utiliza un molde que origina una disposición hexagonal de seis pocillos alrededor de un pocillo central. Se pueden utilizar pocillos de varias dimensiones; un patrón adecuado es el de pocillos de 6,5 mm de diámetro con 3 mm de separación entre los pocillos. Para obtener mejores resultados, las placas deben usarse el mismo día que se preparan y excavan.
- ii) El antígeno se coloca en el pocillo central de la disposición hexagonal y los sueros problema en los pocillos exteriores, alternados con suero control positivo. Debe prepararse también un sistema control por placa con suero control positivo, suero control débilmente positivo y suero control negativo en lugar de los sueros problema.

- iii) Las placas se mantienen a temperatura ambiente (20–27°C) en una cámara húmeda cerrada y se observan a las 24, 48 y 72 horas.
- iv) *Interpretación de los resultados:* Un suero problema es positivo si forma una línea de precipitación específica con el antígeno y una línea de identidad con la del suero control. Un suero problema es negativo si no forma una línea específica con el antígeno y no curva la línea del suero control. Pueden aparecer líneas inespecíficas que no confluyan con las líneas formadas por el control positivo o no las desvíen. Un suero problema es débilmente positivo si curva la línea del suero control hacia el pocillo del antígeno, sin formar una línea visible de precipitación con el antígeno. La reacción es dudosa si no puede interpretarse como positiva ni como negativa. La prueba no tiene validez si los controles no dan los resultados esperados. Los sueros que originan resultados dudosos o débilmente positivos pueden concentrarse y volverse a analizar.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Pese a los avances en la investigación con vacunas experimentales, no existen todavía vacunas comercializadas para el control de la LBE.

BIBLIOGRAFÍA

BALLAGI-PORDANY A. & BELAK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 159–164.

BEIER D., RIEBE R., BLANKENSTEIN P., STARICK E., BONDZIO A. & MARQUARDT O. (2004). Establishment of a new bovine leucosis virus producing cell line. *J. Virol. Methods*, **121**, 239–246.

BELAK S. & BALLAGI-PORDANY A. (1993). Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes*, **7**, 241–248.

BEYER J., KÖLLNER B., TEIFKE J.P., STARICK E., BEIER D., REIMANN I., GRUNWALD U. & ZILLER M. (2002). Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *J. Vet. Med. [B]*, **49**, 270–277.

BUEHRING G.C., SHEN H.M., JENSEN H.M., JIN D.L., HUDES M. & BLOCK G. (2015). Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. *PLoS One*, **10**, e0134304.

BURMEISTER T., SCHWARTZ S., HUMMEL M., HOELZER D. & THIEL E. (2007). No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses I adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology*, **4**, 11.

DIMMOCK C.K., RODWELL B.J. & CHUNG Y.S. (1987). *Enzootic bovine leucosis. Pathology, Virology and Serology. Australian standard diagnostic techniques for animal disease. No. 49.* Australian Agricultural Council.

DUS SANTOS M.J., TRONO K., LAGER I. & WIGDOROVITZ A. (2007). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet. Microbiol* **119**, 10–18

EMANUELSSON U., SCHERLING K. & PETERSSON H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **12**, 121–131.

EUROPEAN COMMISSION (2009). Commission Decision of 15 December 2009 amending Annex D to Council Directive 64/432/EEC as regards the diagnostic tests for enzootic bovine leucosis (2009/976/EU): *Official Journal of the European Union L* **336**, 36-41.

FECHNER H., BLANKENSTEIN P., LOOMAN A.C., ELWERT J., GEUE L., ALBRECHT C., KURG A., BEIER 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.

FECHNER H., KURG A., GEUE L., BLANKENSTEIN P., MEWES G., EBNER D. & BEIER D. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, **43**, 621–630.

- FRIE M.C., SPORER K.R., WALLACE J.C., MAES R.K., SORDILLO L.M., BARTLETT P.C. & COUSSENS P.M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **182**, 125–135.
- GILLET N., FLORINS A., BOXUS M., BURTEAU C., NIGRO A., VANDERMEERS F., BALON H., BOUZAR A.-B., DEFOICHE J., BURNY A., REICHERT M., KETTMANN R. & WILLEMS L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, **4**, 18.
- GILLET N.A. & WILLEMS L. (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*, **13**, 75.
- JOHNSON R. & KANEENE J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.*, **62**, 287–312.
- MILLER L.D., MILLER J.M., VAN DER MAATEN M.J. & SCHMERR M.J.F. (1985). Blood from bovine leukaemia virus-infected cattle: antigen production correlated with infectivity. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 808–810.
- MONTI G.E., SCHRIJVER R. & BEIER D. (2005). Genetic diversity and spread of bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Arch. Virol.*, **150**, 443–458.
- NEKOUËI O., VAN LEEUWEN J., STRYHN H., KELTON D. & KEEFE G. (2016). Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, **133**, 1–9.
- NORB Y B., BARTLETT P.C., BYREM T.M. & ERSKINE R.J. (2016). Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **99**, 2043–2052.
- OTT S.L., JOHNSON R. & WELLS S.J. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 249–262.
- PERZOVA R.N., LOGHRAN T.P., DUBE S., FERRER J., ESTEBAN E. & POIESZ B.J. (2000). Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br. J. Haematol.*, **109**, 64–70.
- PUNTES R., DE BRUN L., ALGORTA A., DA SILVA V., MANSILLA F., SACCO G., LLAMBÍ S. & CAPOZZO A.V. (2016). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet. Res.*, **12**, 119.
- ROLA-ŁUSZCZAK M., FINNEGAN C., OLECH M., CHOUDHURY B. & KUŹMAK J. (2013). Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J. Virol. Methods*, **189**, 258–264.
- ROMERO C.H., CRUZ G.B. & ROWE C.A. (Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop. Anim. Health Prod*
- VAN DER MAATEN M.J. & MILLER J.M. (1976). Replication of bovine leukaemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.*, **43**, 360–362.
- ZHANG R., JIANG J., SUN W., ZHANG J., HUANG K., GU X., YANG Y., XU X., SHI Y. & WANG C. (2016). Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Res.*, **18**, 101. No abstract available.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Leucosis bovina enzoótica (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la Leucosis bovina enzoótica.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.