

# Desarrollo de un inmunoensayo para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucemia bovina y su utilización en el análisis evolutivo de la infección

Andrés Addiego<sup>1,2</sup>, Federico Carrión<sup>1</sup>, Natalia Olivero<sup>1</sup>, Marcelo Pla<sup>3</sup>, Franklin Riet<sup>4</sup>, Sergio Bianchi<sup>4,5</sup>, Otto Pritsch<sup>4,2,\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunovirología, Instituto Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay. \* Autor de correspondencia: pritsch@pasteur.edu.uy. <sup>2</sup> Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2125, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup> Programa de Investigación en Producción de Leche, INIA, La Estanzuela. <sup>4</sup> Plataforma Salud Animal, INIA, La Estanzuela. <sup>5</sup> Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. Italia s/n, Montevideo, Uruguay.

## Resumen

Se presenta el desarrollo de un inmunoensayo indirecto para el diagnóstico de la infección por el Virus de la Leucemia Bovina utilizando la glicoproteína Env recombinante purificada. Los resultados muestran que es comparable a un kit comercial de referencia, con alta sensibilidad y especificidad, tanto en muestras de suero como de leche. Asimismo, se presentan resultados de dicho test en el análisis de la evolución de la infección en bovinos de un tambo modelo, comprobándose un aumento de la prevalencia a medida que los animales envejecen y están en producción. Este nuevo inmunoensayo desarrollado a nivel nacional demuestra ser una herramienta diagnóstica eficaz, simple y económica, y puede ser utilizado en programas de control y/o erradicación de la infección por el Virus de la Leucemia Bovina.

## Summary

We present the development of a new indirect immunoassay for the diagnosis of Bovine Leukemia Virus infection, using a purified recombinant viral envelope glycoprotein. The results reveal that this assay is comparable to a commercial reference kit, showing high sensitivity and specificity, both in serum and milk samples. In addition, results of the application of this test in the analysis of the evolution of the infection in cattle from a model dairy farm are presented,

showing an increase of the prevalence in older and in-production animals. This new national immunoassay is an efficient, simple and inexpensive diagnostic tool, which can be used in a strategy of control and/or eradication of Bovine Leukemia Virus infection.

## Introducción

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa que afecta al ganado bovino causada por un retrovirus oncogénico, el Virus de la Leucemia Bovina (VLB) (Gillet, 2007). La presentación clínica varía desde una infección subclínica al desarrollo de tumores. La LBE presenta elevada prevalencia en Sudamérica, Estados Unidos y Canadá, y aunque en Uruguay no tenemos datos publicados concluyentes también se presume alta. Países de la Unión Europea y Oceanía han llevado a cabo programas de erradicación exitosos. La infección por VLB provoca mayor susceptibilidad a enfermedades, afecta la producción de leche, la longevidad del bovino y su capacidad reproductiva (EFSA, 2015). El diagnóstico de la infección se hace fundamentalmente por técnica de ELISA buscando la identificación de anticuerpos específicos sobretodo contra la proteína viral gp51 (proteína de la envoltura), tanto en suero como en leche (OIE, 2012). La mayoría de los test utilizan partículas virales con bajo grado de pureza y caracterización comprometiendo la potencia diagnóstica. Existen múltiples kits de ELISA comerciales (Kuczewski, 2018), siendo algunos de ellos utilizados en nuestro país,

pero los costos son altos y no todos son aptos para el diagnóstico en leche.

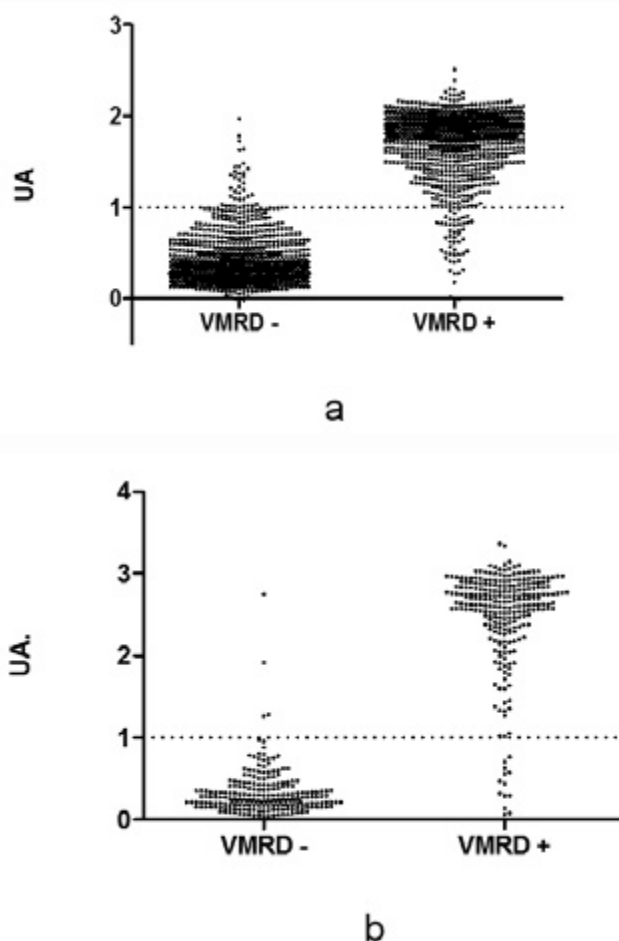
## Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo utilizando 1781 sueros de vacas adultas en producción provenientes de 7 tambos. Del tambo INIA-La Estanzuela se obtuvieron 479 muestras pareadas de leche y suero de vacas adultas en producción, y muestras séricas de 66 animales en tres tiempos distintos (la primera, en el momento del muestreo de los 1781 animales). Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción de la vena coccígea, sin anticoagulante y durante el manejo de los animales con otros fines. El ectodominio de la proteína Env (gp51) se expresó en células S2 de *Drosophila melanogaster*, y se purificó a partir del sobrenadante del cultivo utilizando columnas de afinidad. Se sensibilizaron microplacas de ELISA con la proteína recombinante gp51 a 2,5 µg/ml. Las muestras de suero se utilizaron a una dilución 1/50. En el caso del ELISA para muestras de leche las muestras se utilizaron sin diluir. Como ensayo estándar, utilizamos un kit de ELISA comercial validado (VMRD, WA, EE.UU.), el cual detecta anticuerpos contra la proteína gp51 en suero. En cada placa se agregaron un control de referencia positivo y uno negativo. Para el análisis estadístico se consideraron datos de absorbancia normalizados. La especificidad, sensibilidad e intervalos de confianza (IC 95%), así como el valor de corte se calcularon mediante la construcción de curvas ROC, tomando como referencia el resultado positivo o negativo obtenido para el kit VMRD. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 5.

## Resultados y Discusión

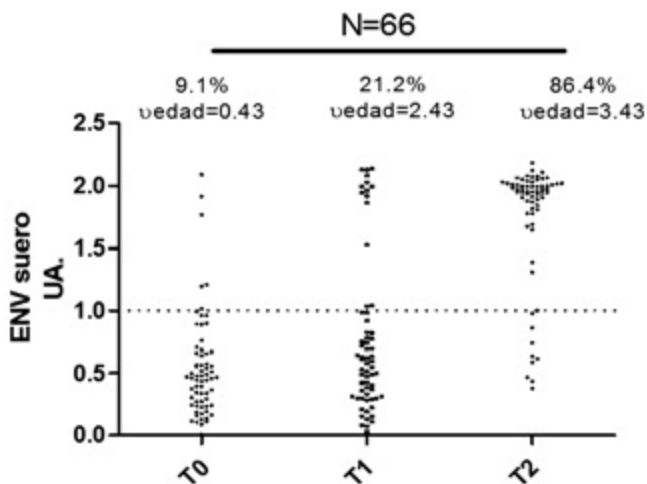
Del total de 1781 sueros testados utilizando el kit comercial de referencia, 901 (50,6%) resultaron positivos y 880 (49,4%) fueron negativos. Luego de definido un punto de corte para nuestro ensayo, los resultados obtenidos con el mismo fueron: 886 (49,7%) animales positivos y 895 (50,3%) negativos, con una sensibilidad de 94,2% y especificidad de 95,8%. La prevalencia global es congruente con resul-

tados y estimaciones previas. En la figura 1a se representa la concordancia de resultados entre ambos métodos considerando los animales individualmente (Índice kappa > 0,9). En muestras de leche, se analizaron 479 sueros bovinos con el kit comercial resultando en 261 (54,5%) animales positivos y 218 (45,5%) negativos. Definiendo un punto de corte para nuestro ensayo, los resultados obtenidos con el mismo en las 479 muestras de leche pareadas fueron: 252 (52,6%) animales positivos y 227 (47,4%) negativos, con una sensibilidad de 95% y una especificidad de 98,2%. En la figura 1b se representa la concordancia de resultados entre ambos métodos considerando los animales individualmente (Índice kappa > 0,9). El ELISA anti-gp51 desarrollado en nuestro laboratorio se comporta de forma comparable al kit comercial.



**Figura 1.** Concordancia de resultados entre métodos de animales individuales. En ordenadas se muestran los resultados de nuestro ELISA normalizados (mayores a 1 son positivos y menores a 1 negativos). a) Resultados de los 1781 sueros analizados por ambos métodos. b) Resultados de las 479 muestras pareadas: en suero para VMRD, en leche para nuestro test. UA: Unidades Arbitrarias.

Para tener una aproximación al comportamiento de la infección por VLB en el correr del tiempo, se evaluaron 66 animales en 3 momentos: T0) animales en etapa de pre-producción; T1) T0 más dos años; y T2) T0 más tres años. En T1 y T2 los animales se encontraban en producción. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos utilizando nuestro ELISA en suero para cada uno de los animales en los tres tiempos. El aumento en la prevalencia de la infección (9,1% en T0, 21,2% en T1 y 86,4% en T2) era esperable, ya que la misma aumenta en forma directa con la edad de los animales y con el comienzo del ciclo productivo del bovino.



**Figura 2.** Resultados globales de la población de 66 bovinos en tres tiempos distintos. En ordenadas se representa el resultado del ELISA anti-gp51 normalizada por el punto de corte. Para cada momento evaluado se muestra la edad media en años de los bovinos y el porcentaje de animales positivos. UA: Unidades Arbitrarias.

## Bibliografía

- Gillet N, Florins A, Boxus M, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4:18.
- EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J*. 2015;13(July):63.
- OIE. OIE - Leucosis bovina enzoótica. 2012:792-804.
- Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, Kelton DF, Hutchins WA, van der Meer FJUM. 2018. Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies. *J Dairy Sci*. 2018;101(3):2433-2437.

## Conclusiones

Hemos desarrollado un test diagnóstico para la infección por VLB con resultados comparables a un kit comercial de referencia, tanto en muestras séricas como de leche. Utilizando nuestro ELISA en el seguimiento de un grupo de animales, revelamos un aumento en la prevalencia de la infección en el correr del tiempo y a medida que los animales ingresan en la etapa de producción.