

# Virus de la leucosis bovina: detección posnatal de la infección congénita en terneros Holstein

Marina Maurente Berón<sup>1</sup>, Amanda Nery Andrade de Moura<sup>2</sup>, Guilherme Pereira da Silva Figueiredo<sup>2</sup>, Sofia Fernández-Ciganda<sup>1</sup>, Martín Fraga<sup>1</sup>, Federico Giannitti<sup>1</sup>, Alejo Menchaca<sup>1</sup>, Caroline da Silva Silveira<sup>1</sup>

Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación 1- Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay. Email: mmaurente@inia.org.uy/ cdasilvas@inia.org.uy

2- Departamento de Anatomía, Patología e Clínicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de terneros infectados congénitamente por el virus de la leucosis bovina (VLB). Se colectaron muestras de sangre y suero de 75 terneros/as al nacer, previo al consumo de calostro. Se realizó recuento de linfocitos, y detección y cuantificación de VLB por qPCR en sangre. En aquellos terneros positivos por qPCR se realizó ELISA anti-VLB en suero. Además, se evaluó retrospectivamente el registro de resultados hematológicos, serológicos y moleculares para VLB de las madres de los terneros que resultaron positivos a VLB. Se obtuvo por qPCR una frecuencia de 8% (6/75) de terneros positivos con carga proviral entre  $1,31 \times 10^4$  y  $1,03 \times 10^5$  copias provirales/ml de sangre. Se detectaron anticuerpos anti-VLB en 1/6 (16,6%) terneros, indicando una respuesta inmunitaria humoral fetal a la exposición intrauterina al VLB. Con respecto a las madres de los seis terneros positivos, cuatro presentaron diagnóstico previo de seropositividad contra el VLB y tres de ellas fueron qPCR positivas con cargas provirales elevadas. Concluimos que el VLB se transmitió congénitamente con una frecuencia relativamente baja. Sin embargo, con cargas provirales moderadas, lo que no minimiza el posible riesgo que esta categoría puede representar en la transmisión precoz del virus.

## SUMMARY

The objective of this study was to determine the frequency of calves congenitally infected with bovine leukemia virus (BLV). Blood and serum samples were collected from 75 calves at birth prior to colostrum consumption. Blood samples were processed for lymphocyte count, and detection and quantification of BLV by qPCR. qPCR positive calves were also analyzed for anti-VLB serum antibodies by ELISA. In addition, the health record of the dams that delivered VLB-positive calves were screened retrospectively for results of lymphocyte counts, BLV ELI-

SA and qPCR. A frequency of 8% (6/75) of positive calves with a proviral load between  $1,31 \times 10^4$  and  $1,03 \times 10^5$  copies/ml of blood was obtained by qPCR. Anti-BLV antibodies were also detected in 1/6 (16.6%) calves, suggesting a fetal humoral immune response to intrauterine BLV exposure. Of the six positive mothers, four had a previous diagnosis of seropositivity against BLV, three of which were qPCR positive with high proviral loads. We conclude that BLV was congenitally transmitted with a relatively low frequency. However, moderate proviral loads, which does not minimize the possible risk that this category may represent in early transmission of the virus.

## INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina (LEB), causada por el virus de la leucosis bovina (VLB), es una enfermedad infectocontagiosa, linfoproliferativa y crónica con distribución mundial y altas tasas de prevalencia (Polat et al., 2017) an oncogenic member of the Deltaretrovirus genus, is closely related to human T-cell leukemia virus (HTLV-I and II). Afecta principalmente al ganado lechero generando pérdidas debido a impactos negativos en la salud, producción animal y también al comercio exterior (Kuczewski et al., 2021; OIE, 2018).

La transmisión del VLB ocurre principalmente por el intercambio de linfocitos infectados entre un bovino positivo y otro susceptible, lo que puede suceder de forma horizontal por contacto directo, vía iatrogénica y dípteros hematófagos, y/o vertical ya sea congénita (*in útero*) o postnatal (calostro y leche) (Kuczewski et al., 2021).

Estudios epidemiológicos reportan que la transmisión vertical del VLB es frecuente, con 10,8% de terneros que pueden nacer infectados y 7,7% que pueden infectarse en el canal del parto (Mekata et al., 2015) 129 calves born to BLV-infected cows in a herd in Japan were tested for infection immediately after birth and again at one month of age using nested PCR. Twenty-four calves (18.6 per cent. Los terneros positivos en la primera semana de vida son

importantes diseminadores precoces del VLB debido que la carga proviral aumenta durante el primer año de vida (Gutiérrez et al., 2014). En Uruguay un estudio realizado en 30 tambos comerciales reportó una prevalencia de 9% de terneros neonatos ya calostrados, positivos al virus con cargas provirales relativamente altas y distribuidos en 47% de los predios estudiados (Silveira et al., 2022).

Conocer las vías de transmisión de la LEB en Uruguay es el primer paso para el desarrollo de alternativas de control, factibles y efectivas para el país. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de terneros infectados congénitamente por el VLB en condiciones naturales en un establecimiento lechero de Uruguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de sangre entera y suero, colectadas en el año 2021 de 75 terneros/as inmediatamente luego de nacer, previo a la ingestión de calostro. Los terneros pertenecían a un establecimiento lechero del departamento de Colonia, Uruguay, que contaba con ~500 bovinos y tenía una seroprevalencia de VLB de 82% en vacas en ordeño. A partir de las muestras de sangre se realizó recuento de linfocitos en un analizador hematológico veterinario automatizado (Mindray BC 5000) y extracción de ADN total mediante kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit), seguida de una qPCR dúplex direccionada al gen *pol* del VLB (Rola-Łuszczak et al., 2013) a more sensitive real-time polymerase chain reaction was required and developed to detect proviral Bovine leukaemia virus (BLV y al gen de  $\beta$ -actina (control interno) para la detección y cuantificación absoluta de la carga

proviral (Wernike et al., 2011) a major pathogen of cattle, are the detection of outbreaks and vaccination with glycoprotein E (gE).

A los terneros que resultaron positivos al VLB por qPCR se realizó ELISA indirecto (CelQuest BLV Suero, ATGen) para la detección de anticuerpos séricos anti-gp51 del VLB. Se revisaron retrospectivamente los registros de los resultados hematológicos, serológicos (ELISA) y moleculares (qPCR) de LEB de muestras que habían sido colectadas respectivamente en noviembre de 2019 y 2020 de las vacas y vaquillonas madres de los terneros que resultaron positivos. Se realizó un análisis descriptivo de los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó una frecuencia de 8% (6/75) de terneros que nacieron positivos al VLB por qPCR. Este resultado es concordante con lo ya descrito, y refuerza que la transmisión vertical congénita puede representar una importante ruta para la propagación precoz del virus en rodeos lecheros (Mekata et al., 2015).

De los seis terneros positivos, en cinco fue posible cuantificar la carga proviral, que estuvo entre  $1,31 \times 10^4$  y  $1,03 \times 10^5$  copias provirales/ml de sangre. En un ternero no fue posible la cuantificación por presentar carga por debajo del límite de confianza de la técnica. Según estudios previos, neonatos infectados con VLB presentan una carga proviral baja; sin embargo, esta puede aumentar más de 10 veces en solamente 30 días (Gutiérrez et al., 2011). La presencia de animales positivos al nacer con cargas provirales que pueden aumentar progresivamente

**Tabla 1:** Diagnóstico de LEB en madres y terneros recién nacidos en un establecimiento lechero en Uruguay.

ID madre	4698	19036	19054	137131	141621	153103
Edad al muestreo (años)	4,5	1,7	1,6	6,7	5,7	4,6
Diagnóstico de LEB (madres)						
ELISA	+	-	-	+	+	+
qPCR	+	-	-	-	+	+
Carga proviral (copias/ml de sangre)	$2,30 \times 10^6$	NA	NA	NA	$6,96 \times 10^4$	$1,11 \times 10^5$
N° de linfocitos ( $\times 10^6/L$ de sangre)	14,9*	6,13*	7,1*	4,27	3,17	5,5
Sexo del ternero	M	M	M	H	H	M
Diagnóstico de LEB (terneros)						
ELISA	+	-	-	-	-	-
qPCR	+	+	+	+	+	+
Carga proviral (copias/ml de sangre)	$4,29 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$	$1,03 \times 10^5$	$2,77 \times 10^4$	$1,31 \times 10^4$	NC
N° de linfocitos ( $\times 10^6/L$ de sangre)	1,94	3,12	2,96	2,95	2,91	2,87

NA: no aplica por ser qPCR negativos; M: macho; H: hembra; NC: no cuantificable; \*: linfocitosis.

te podría contribuir a las altas prevalencias e incidencias que ascienden a 45% y 39% respectivamente, en vaquillonas Holstein de Uruguay (Puentes et al., 2016). La LEB es una barrera importante en Uruguay para la exportación de vaquillonas Holstein, dado que los animales positivos son rechazados por los mercados. Generando un doble perjuicio ya que los productores se ven obligados a retener los animales positivos. Esta situación hace aún más relevante la realización de estudios acerca del rol de los terneros en la propagación temprana de la enfermedad.

El porcentaje de seropositividad por ELISA entre los terneros positivos por qPCR fue de 16,6% (1/6). Como la toma de las muestras ocurrió previo a la ingestión del calostro, esto indica una respuesta inmunológica humoral fetal a la exposición al VLB en el útero. Sin embargo, la mayoría de los terneros infectados fueron seronegativos al nacer. Esto ha sido discutido por otros autores, quienes resaltaron la necesidad de realizar estudios más amplios en torno de la inmunidad fetal contra patógenos (Sajiki et al., 2017).

La evaluación retrospectiva de los resultados de las seis madres reveló que cuatro eran seropositivas y tres de ellas eran además qPCR positivas con cargas provirales elevadas (Tabla 1). Esto último resulta interesante, y confirma la fuerte correlación descripta entre nacimientos de terneros infectados naturalmente y madres con carga proviral alta (Mekata et al., 2015). Además, tres madres presentaban linfocitosis, siendo una de ellas positivas por ELISA y qPCR (Tabla 1).

En conclusión, el VLB se transmitió congénitamente con una frecuencia relativamente baja. Sin embargo, no minimiza el posible riesgo que estos animales pueden representar en la transmisión precoz del virus, ya que desde su nacimiento presentan cargas provirales moderadas. La detección temprana de terneros infectados debería ser considerada en futuros planes de control de esta enfermedad en Uruguay. Esta estrategia podría ser una herramienta de utilidad donde permitirá 1) criar solamente terneras negativas como “un rodeo limpio” con la intención de lograr una reposición con vaquillonas negativas y 2) reducir al menos en parte, las altas tasas de incidencia de la LEB en establecimientos lecheros.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GUTIÉRREZ, G. *et al.* Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 82, 2014.

GUTIÉRREZ, G. *et al.* Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 3–4, p. 255–263, 2011.

KUCZEWSKI, A. *et al.* Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6358–6375, 2021.

MEKATA, H. *et al.* Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. **Veterinary Record**, v. 176, n. 10, p. 254, 2015.

OIE. Leucosis Bovina Enzoótica. In: MANUAL TERRESTRES DE LA OIE. 2018. p. Capítulo 3.4.9.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017.

PUNTES, R. *et al.* Horizontal Transmission Dynamics of Bovine Leukemia Virus (Blv) and Negative Effect on Reproductive Performance in Naturally Infected Holstein Heifers. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 3, p. 294–309, 2016.

ROLA-LUSZCZAK, M. *et al.* 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. **Journal of Virological Methods**, v. 189, p. 258–264, 2013.

SAJIKI, Y. *et al.* Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. **The journal of veterinary Medical Science**, v. 79, n. 12, p. 2036–2039, 2017.

SILVEIRA, C. S. *et al.* Detecção e quantificação do vírus da leucose bovina em terneiros neonatos de estabelecimentos leiteiros do Uruguai. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 82–83, 2022.

WERNIKE, K. *et al.* Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. **Journal of Virological Methods**, v. 174, n. 1–2, p. 77–84, 2011.