



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**“ESTANDARIZACIÓN Y VALORACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR
PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA
BOVINA (vLEB).”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

RICARDO FAVILA DE ALBA

ASESORA: DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO

COASESOR: MVZ. R. JAVIER HERNÁNDEZ BALDERAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉX. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	PÁG.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
• Etiología	3
• Signos clínicos y lesiones	5
• Transmisión	6
• Diagnóstico	8
OBJETIVOS	12
• Generales	12
• Particulares	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una enfermedad transmisible de gran importancia sanitaria y socioeconómica ya que las repercusiones en el comercio internacional de bovinos y sus productos de origen animal son considerables. Es importante contar con pruebas de diagnóstico específicas y sensibles para su diagnóstico. El propósito de este trabajo es estandarizar y valorar una técnica de transcripción inversa y de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección del virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB). Se tomaron muestras de sangre de una vaca con manifestaciones clínicas de LEB, linfocitosis persistente y prueba de ELISA indirecta positiva a vLEB procedente del Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca. Se procedió a estandarizar la RT-PCR utilizando RNA total e iniciadores publicados y empleados para la detección del vLEB en suero. Se probaron las condiciones descritas en la literatura y la de dos proveedores de los reactivos utilizados y se determinó la temperatura de desnaturalización (T_m), la concentración óptima de $MgCl_2$ y de iniciadores. Una vez estandarizada, se tomaron muestras de sangre de 40 vacas seleccionadas al azar, para realizar la RT-PCR estandarizada y la prueba de ELISA indirecta para vLEB. No se obtuvo ADNc de la reacción de RT utilizando las condiciones publicadas pero sí con las condiciones recomendadas por ambos proveedores. La T_m , la concentración óptima de $MgCl_2$ y de iniciadores fue de 60.5 °C, 1.5 mM y 20 pM, respectivamente. Por prueba de ELISA, 27/40 (67.5%) de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra la gp51 del vLEB mientras que 21/40 (55%) fueron positivos a la presencia de ARN viral por RT-PCR. En cuadro de contingencia de 2X2 se detectaron 21 vacas positivas y 13 negativas a ambas pruebas y 6 positivas a ELISA pero negativas a prueba de RT-PCR. No se observaron animales negativos a ELISA y positivos a RT-PCR. La prueba de ELISA y RT-PCR presenta una alta relación ($\chi^2 < 0.001$ y coeficiente de Cramer = 0.77). Los 6 casos sin concordancia diagnóstica, posiblemente corresponden a falsos positivos debido a una reacción cruzada de la prueba de ELISA con proteínas similares a la gp51 presentes en el suero, y no a una baja eficiencia en la detección de ARN viral por la RT-PCR. Los resultados demuestran que la prueba de ELISA y RT-PCR son comparables en el diagnóstico de la enfermedad.

INTRODUCCION

El bovino forma parte del grupo de animales pertenecientes a la familia de los rumiantes, los que poseen entre sus características, el convertir materiales que no pueden ser aprovechados por el hombre en productos de elevada calidad nutritiva. Entre los bovinos la vaca especializada en producción láctea, es muy eficiente en convertir la celulosa en una fuente de energía y destinar ésta a la producción de leche (Ávila, 2006). La leche es uno de los alimentos más completos para el ser humano dada las características de sus nutrimentos, en donde destacan las proteínas que contienen una gran cantidad de aminoácidos esenciales (Sagarpa, 2000).

El ganado especializado en producción de leche se concentra en las principales cuencas lecheras del país, que son: Comarca Lagunera (Coahuila y Durango), Los Altos de Jalisco, Delicias y Cuahutemoc (Chihuahua), Veracruz, Guanajuato, Zumpango y Jilotepec (Estado de México), Tizayuca (Hidalgo), Aguascalientes, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala, San Luis Potosí, Colón y Villa del Márquez (Querétaro) y Mexicali (Baja California)(Ávila, 2006). Dichas entidades aportaron el 76% de la producción nacional de 2006, con 7,740 millones de litros, del total de la producción nacional que comprendió a 10,029 millones de litros (Villamar, 2005).

Actualmente el ganado bovino productor de leche está expuesto a un gran número de enfermedades metabólicas, reproductivas e infecciosas agudizándose más en el sistema de producción intensivo (Ross, 2003). Dentro de las enfermedades infecciosas, se ha dado una gran importancia a las enfermedades bacterianas debido a que se considera que las enfermedades virales están controladas por la vacunación. Este concepto no es del todo acertado en el caso de la leucosis enzoótica bovina (LEB) (Mateos 2005). La LEB pertenece a la lista B de la oficina internacional de epizootias (OIE) la cual está constituida por enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y sanitario con considerables repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2004). De hecho, el mayor impacto económico de la infección por el virus de la LEB (vLEB), es su interferencia en el movimiento internacional del ganado y semen más que a la enfermedad clínica en sí misma (Yeon Choi *et al.*, 2002)

La LEB está distribuida a nivel mundial y la prevalencia presenta una marcada diferencia regional. Es común en el norte y sur de América, Australia y algunas regiones de África. En años recientes, la LEB ha sido erradicada en Europa occidental pero en

varias aéreas de Europa oriental sigue siendo bastante común (Andrews, 2004). En la República Mexicana, la población de ganado en producción en 1999 era de 30, 177,000 cabezas, de las cuales 1, 864,000 se destinaba a la producción de leche y 28, 313, 000 a la producción de carne. En virtud a este censo poblacional, es muy probable que se cuenta con una alta población susceptible a LEB en nuestros centros de producción. La presentación clínica de la LEB es fatal y se caracteriza por la proliferación de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, lo que provoca diversos cuadros clínicos (Hernández *et al.*, 2006b).

Etiología

La LEB es causada por un oncovirus exógeno, de tipo ARN, del género *Deltaretrovirus* de la familia *Retroviridae*, por lo que comparte características con otros virus leucémicos de diferentes especies (Van Regenmortel *et al.*, 2000). La familia *Retroviridae* se denomina así por que los virus que la integran codifican la enzima transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés) la cual es una polimerasa que utiliza el ARN viral para sintetizar ADN complementario de cadena sencilla, que a su vez, es replicado para formar ADN de cadena doble. La RT también es capaz de degradar el ARN vírico original. Este mecanismo permite a los retrovirus convertir el ARN de banda sencilla lineal en ADN doble circular, para después integrarlo en el ADN cromosómico de la célula hospedadora. El estado integrado del ADN del virus se denomina provirus, y puede mantenerse de una manera latente asociado al material genético de la célula hospedadora y multiplicarse cada vez que ésta se divide (Klintevall *et al.*, 1994).

El diámetro del vLEB envuelto, es de 90 a 120 nm el cual contiene un nucleoide central de 60 a 90 nm. La densidad es 1.16 a 1.17 g/ml, y el coeficiente de sedimentación del ARN viral es 60 a 70 S. Los viriones, esquematizados en la Figura 1, poseen RT, maduran por gemación (Pawling, 2002). Las proteínas codificadas por el gen *gag*, forman la estructura del virión (cápside) y desempeñan un papel importante en las etapas iniciales del ciclo de infección. Son designadas por su peso molecular como p24, p15, p12 y p10. De ellas, p24 es el mayor componente de la cápside y tiene varios sitios antigénicos. Las proteínas de la envoltura, codificadas por el gen *env*, son reconocidas por el receptor celular y son responsables del tropismo celular, interferencia viral y fusión celular. Derivan de un precursor común que es modificado por glicosilación y

proteolisis, produciendo dos proteínas asociadas: gp51 de superficie y gp30 de transmembrana. La p24 y la gp51 del vLEB son importantes inmunógenos y los anticuerpos contra ellas pueden ser detectados en la mayoría de los animales infectados. La gp51 es un potente antígeno, responsable de la principal respuesta humoral del hospedero, puesto que los anticuerpos contra gp51 generan títulos más altos que aquellos dirigidos contra la proteína p24 (González *et al.*, 2001). Estas dos proteínas constituyen la base para la detección mediante pruebas serológicas (Felmer *et al.*, 2006). El gen *pol* codifica para la RT de 80 kDa. La RT se activa preferentemente en presencia de Mg^{2+} (Gillet *et al.*, 2007). Es probable que el virus no permanezca viable fuera del hospedador, en el medio ambiente durante mucho tiempo. Se inactiva rápidamente al exponerse a la luz ultravioleta, al calentarse a 56°C por 30 minutos y a la pasteurización. El virus sin embargo puede permanecer viable en muestras de sangre guardadas a 4° C por lo menos durante dos semanas (Andrews, 2004).

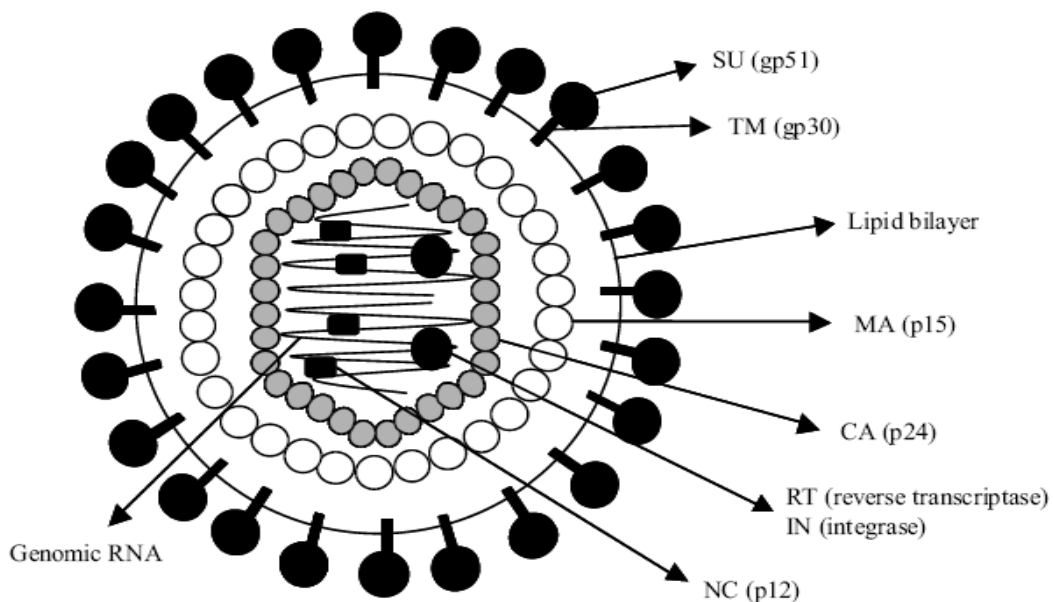


Figura 1. Representación esquemática de la partícula viral del vLEB. Dos copias de ARN genómico de cadena sencilla están empacadas en una partícula viral. Las proteínas forman una cápside, CA (p24), que contiene el ARN viral en interacción con la nucleocápside, NC (p21). Las dos enzimas que se requieren para la transcripción e integración del genoma viral (RT e IN), respectivamente, también están contenidas dentro de la cápside. La proteína de matriz, MA (p15) interconecta la cápside y la envoltura externa que está formada por una bicapa lipídica de origen celular en la cual están insertada un complejo de proteínas virales (gp51 SU y gp30 TM) (Gillet *et al.*, 2007).

Signos clínicos y lesiones

Antes de revisar las manifestaciones clínicas observados en las vacas adultas infectadas con tumores clínicos o linfoma, se deben subrayar dos hechos. Menos del 5% de las vacas positivas a vLEB desarrollan tumores o enfermedad asociada con linfoma. La mayoría de las vacas infectadas con LEB son asintomáticas, e inmunocompetentes como sus compañeras de rebaño seronegativas. El otro consiste en que debido a que las vacas con linfoma desarrollan varias presentaciones clínicas derivadas de la alteración del órgano blanco afectado, se requiere en la mayoría de los casos una cuidadosa diferenciación de otras enfermedades. Por tal motivo, el linfoma puede mimetizar un gran número de enfermedades inflamatorias o debilitantes de las vacas. Los signos clínicos rara vez se manifiestan antes de los 2 años de edad y son más frecuentes en las vacas cuya edad está comprendida entre 3 y 6 años. A pesar de que el linfoma en la forma adulta de la enfermedad puede producir tumores en diversos órganos y en nodos linfáticos en ganado vacuno de 6 meses de edad, es más probable que los tumores observados en vacas de menos de 2 años de edad no estén relacionados con la infección por vLEB (Rebhun, 1999). De este modo, los tumores linfocíticos se clasifican por la edad de aparición, la localización anatómica, el patrón de distribución en la población y la relación etiológica con LEB. El linfoma enzoótico es la forma multicéntrica de la enfermedad que se presenta de forma típica en bóvidos adultos de más de 3 años. No más de un 5% de los animales infectados presentan anualmente linfomas clínicamente aparentes (Khars, 2001). Los casos típicos al inicio presentan un aumento de volumen de los nodos linfáticos superficiales (linfadenopatía superficial) en el momento del reconocimiento clínico y presentan una gran variedad de signos clínicos que varían de acuerdo con la localización de las masas tumorales y de la función vital inicialmente afectada (Rebhun, 1999). Los más notables pueden ser los nodos linfáticos prefemorales, supramamarios, preescapulares o en maxilares. No siempre los síntomas corresponden con las lesiones (Khars, 2001). La mayoría de las vacas con linfoma manifiestan signos inespecíficos de pérdida de peso, apetito disminuido y producción disminuida (Rebhun, 1999). En ocasiones, los primeros síntomas observados son cojera, andar anormal o parálisis. La linfocitosis persistente, cifra anormalmente elevada de linfocitos encontrada en por lo menos dos muestras de sangre en un intervalo de 3 meses, se observa con frecuencia en rebaños con LEB (Kahrs, 2001). Sin embargo, el ganado puede ser infectado con LEB y desarrollar tumores sin la presencia de

linfocitosis (Van Der Maaten *et al.*, 1990). Los hallazgos morfológicos de linfoma adulto incluyen agrandamiento de nodos linfáticos y masas tumorales discretas o difusas, las cuales corresponden a infiltración de linfocitos neoplásicos en diferentes órganos. El hígado, bazo, riñones, intestinos, abomaso, columna vertebral, tejido retrobulbar, útero, corazón y tracto urinario son comúnmente afectados. Los pulmones raramente están involucrados (Andrews, 2004; Khars, 2001; Gillet *et al.*, 2007)

Transmisión

La transmisión de la enfermedad (Figura 2) se lleva a cabo mediante la transferencia de células infectadas de animales portadores y/o enfermos hacia animales sanos, ya sea de manera vertical u horizontal por medio de sangre, exudados vaginales, iatrogénicamente y por insectos hematófagos que sirven como vehículos y vectores (Motton *et al.*, 2003). Una cantidad tan pequeña como 0.1 µl de sangre entera de una vaca infectada puede ser contagiosa si se aplica intradérmica al ganado (Andrews, 2004). Se han encontrado leucocitos infectados con vLEB en la leche y en el calostro, pero al parecer las madres infectadas no son el medio de transmisión más importante, posiblemente por interferencia por parte de los anticuerpos neutralizantes presentes en el calostro (Kahrs, 2001). Aunque se han identificado antígenos virales y DNA proviral en el semen, la leche y el calostro; la transmisión natural a través de estas secreciones no se ha demostrado (Dus Santos, 2007). Numerosas investigaciones previas sugieren que el semen de toros infectados por LEB no es infeccioso para las vacas receptoras (Yeon Choi *et al.*, 2002). Se reporta que la vía transplacentaria puede ser responsable de aproximadamente el 5 % de terneros infectados nacidos de madres portadoras (González *et al.*, 2001). Sin embargo, se describe que el porcentaje de transmisión vertical oscila entre el 3-16% (Pawling, 2002). No todas las vacas infectadas producen fetos infectados e individualmente vacas infectadas pueden dar a luz becerros infectados o no infectados. La transmisión vertical del genoma del virus vía gametos no ocurre (Andrews, 2004).

La presencia simultánea de anticuerpos y de vLEB sugiere una protección parcial a la infección (si es que hay protección). Por otra parte, los anticuerpos calostrales transferidos a terneros receptores aparentemente confieren un cierto grado de resistencia a la infección (Khars, 2001). Aparentemente en el ganado lechero, la prevalencia de la infección se incrementa con la edad y el contacto con ganado adulto

infectado parece ser el factor de mayor influencia. La tasa de infección es mayor en ganado lechero que en ganado de carne (Dargatz *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001) Esta mayor incidencia puede ser mas por las oportunidades de exposición que por una susceptibilidad específica de razas (Khars, 2001)

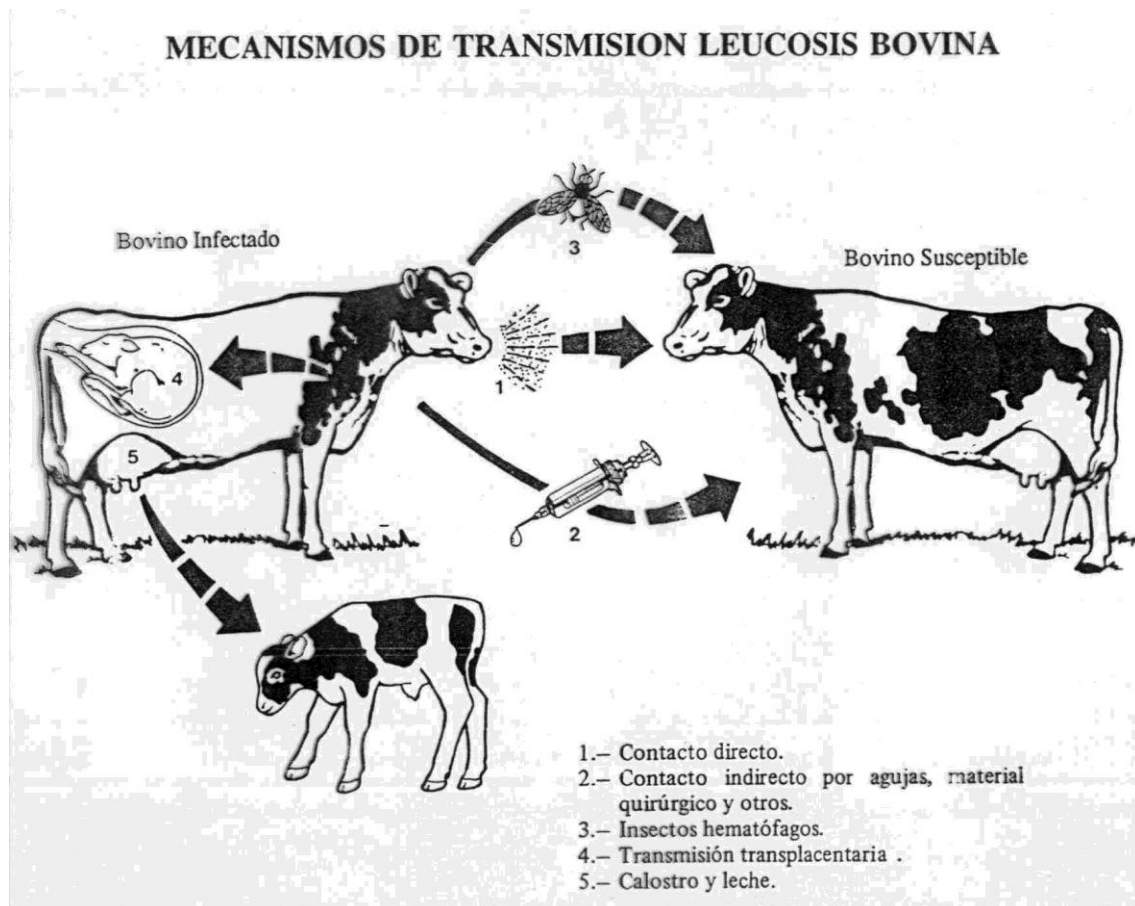


Figura 2. Mecanismos de transmisión de la LEB (Castelli, 1999)

El periodo de incubación es de por lo menos 2 semanas antes de que aparezca una infección manifiesta, esto es, anticuerpos demostrables. En algunos casos este periodo puede ser de varios meses. El vLEB infecta a los linfocitos y mantiene su presencia a lo largo de su maduración (Hernández *et al.*, 2006a). De este modo, establece una infección persistente en la subpoblación de linfocitos-B mediante la integración de su ADN (proviral) al ADN de la célula hospedadora. Se ha reportado que los sitios de integración son al azar y que las células infectadas llegan a contener de 1 a 4 copias del provirus (Andrews, 2004; Eaves *et al.*, 1994; Kuzmak *et al.*, 1999). También posee la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T y monocitos (Felmer *et al.*,

2006; Klintevall *et al.*, 1997). La manifestación de enfermedad linfoproliferativa, probablemente se deba a la participación de factores genéticos, inmunológicos o ambientales (Hernández *et al.*, 2006a).

La enfermedad puede presentarse en 3 formas: a) Portadores asintomáticos los cuáles corresponden al 65-70% del ganado infectado. La importancia de estos radica en que actúan como portadores y transmisores del virus, b) Linfocitosis persistente (LP) en alrededor del 20-30% de los animales los cuales permanecen clínicamente sanos; y c) Linfoma, la cual representa a la forma clínica de la enfermedad. Se observa en 1-5 % de las vacas y se desarrolla después de meses o años de incubación. Esta fase es reconocida como la fase fatal de la enfermedad (Radostits, 2002).

Cabe señalar, que casi todo el hato desarrolla anticuerpos detectables (Andrews, 2004) y que en hatos con alta prevalencia de anticuerpos a menudo se observa disminución de la eficiencia de producción, aumento de las tasas de sacrificio y mayor incidencia de linfoma clínico que en hatos no infectados (Khars, 2001). Debido a que el vLEB afecta principalmente a los linfocitos, se ha sugerido que el virus puede disminuir la capacidad de respuesta inmune y por tanto, la infección puede ser inmunosupresiva (Doménech *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la infección generalmente es persistente e inaparente y está acompañada de anticuerpos en suero cuya presencia se considera evidencia de la infección. Adicionalmente, ya que los linfocitos son las células hospedadoras del vLEB, se señala que se requiere de transferencia de linfocitos para la transmisión de animal a animal (Kahrs, 2001).

Diagnóstico

Los rebaños infectados con LEB tienen una persistencia de anticuerpos que varía del 15 al 90% y pueden tener muchos enfermos con linfoma clínico o enfermos aislados o no presentar enfermedad clínica. Con excepción de los casos atípicos, los tumores externos y el aumento de volumen de los nódulos linfáticos detectados por palpación rectal, son las claves del diagnóstico clínico del linfoma. Algunos casos, con tumores en útero se descubren por primera vez en el reconocimiento de gestación de rutina. Muchos enfermos son descubiertos en el matadero a donde son enviados los animales por resultar “poco productivos”. El diagnóstico de linfoma de los adultos está subordinado a la confirmación histológica de las masas tumorales. Histológicamente hay proliferación

e infiltración masiva de linfocitos neoplásicos en zonas que por regla general están relativamente libres de linfocitos. La naturaleza linfoide de la enfermedad correlaciona fuertemente con el hallazgo de LP, aunque con frecuencia no se presente en los casos comprobados histopatológicamente. Por tal motivo, la ausencia de LP no excluye la existencia de infección viral (Kahrs, 2001).

Aislamiento viral y serología

El vLEB puede ser demostrado en linfocitos de bóvidos infectados mediante la prueba de producción de sincitios, por microscopía electrónica y por procedimientos serológicos. Su replicación puede lograrse en algunos cultivos celulares primarios de origen bovino y ovino, en los que la formación de sincitios constituye el principal cambio citopatológico. El diagnóstico incluye la confirmación clínica y patológica de linfomas malignos y la determinación de la presencia de la infección por LEB (Kahrs, 2001). Sin embargo, el aislamiento viral no es utilizado habitualmente por la baja expresión genética viral y dificultades en la propagación del virus (Kuckleburg *et al.*, 2003).

Las pruebas serológicas utilizadas para la identificación de ganado infectado por LEB detectan anticuerpos de manera rápida y económica y los resultados son fáciles de interpretar (Kuckleburg *et al.*, 2003). En la década de los 70's se adaptaron para la investigación de anticuerpos a LEB, las pruebas de seroneutralización, fijación del complemento, prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo e inmunodifusión en agar (éstas últimas RIA y AGID, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Kahrs, 2001). La prueba de AGID ha sido la más utilizada por la mayoría de los laboratorios empleando al antígeno gp51 (Yeon Choi *et al.*, 2002). Algunos laboratorios incorporan simultáneamente en AGID a los antígenos p24 y gp52. Todas las pruebas de AGID descubren los anticuerpos séricos específicos frente al vLEB (Rebhun, 1999). Una reacción positiva en AGID indica que el animal está infectado de forma persistente por el vLEB. Sin embargo, esto no significa que el animal elimine de forma activa el virus o que padezca la enfermedad clínica (Kahrs, 2001). La sensibilidad de la AGID es limitada y en ocasiones se han reportado casos en que animales infectados no producen una respuesta serológica detectable por esta prueba (Eaves *et al.*, 1994). La prueba de fijación del complemento, usando antígenos virales de una línea celular infectada con

LEB, ha sido usada pero parece ser menos sensible que la prueba de AGID que detecta anticuerpos para el antígeno gp51 (Andrews, 2004).

Las pruebas de RIA y de ELISA se consideran más sensibles que la AGID. El RIA puede detectar la infección a las 2 semanas y se puede utilizar para la detección de anticuerpos frente a vLEB en leche y sangre de vacas periparturientas. El principal inconveniente del RIA son las grandes exigencias técnicas y de material. Por otro lado, la prueba de ELISA es sumamente sensible y probablemente iguala la especificidad de la AGID (Rebhun, 1999). La prueba de ELISA puede ser utilizada tanto con muestras de leche, tejido, fluidos así como muestras de suero (Andrews, 2004).

El *Manual de la OIE sobre animales terrestres*, que detalla las técnicas del laboratorio para LEB (OIE 2004) indica la preferencia por los métodos serológicos indirectos e incluso han remplazado al criterio de diagnóstico de linfocitosis persistente. Actualmente las técnicas más usadas son AGID y ELISA (Klintevall *et al.*, 1994). Sin embargo, con frecuencia el uso general de estos métodos es engañoso, puesto que individuos infectados por vLEB pueden ser negativos serológicamente debido a que el tiempo mínimo de infección para el desarrollo de anticuerpos es de hasta 14 semanas. Durante este tiempo el animal puede presentar viremia, e infectar a otros animales (Klintevall *et al.*, 1994; Kuckleburg *et al.*, 2003). Otra desventaja de los métodos serológicos radica en la incapacidad para discriminar anticuerpos pasivos maternos de una infección activa, los que pueden persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal (Felmer *et al.*, 2006). De hecho, un resultado seropositivo no implica necesariamente enfermedad clínica, actividad viral o incluso que el animal está infectado (Yeon Choi *et al.*, 2002).

RT-PCR Y PCR

Por lo anterior, el estado del vLEB en los animales debe ser determinado por pruebas que permitan la detección directa de la presencia del virus (Klintevall *et al.*, 1994). Las pruebas de detección directa, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permiten el diagnóstico confiable durante las etapas iniciales de la enfermedad y se pueden aplicar a la detección del virus en animales menores de 6 meses, evitando así reacciones falsas positivas causadas por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro (Fechner *et al.*, 1996). Durante la replicación del retrovirus, la banda

viral genómica de ARN es transcrita a una doble banda de moléculas ADN, el cual se integra como un provirus en el ADN de la célula hospedadora. Para dicho efecto, la PCR ha demostrado su eficiencia en la detección de ADN proviral a partir de linfocitos aislados (Klintevall *et al.*, 1994), así como en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral (González *et al.*, 2001). Por tal motivo es considerada una prueba sensible y específica para el diagnóstico directo de infección del vLEB que a diferencia de los métodos de diagnóstico convencionales, indica la presencia de vLEB en terneras recién nacidas (Klintevall *et al.*, 1994). Aunque con algunas discrepancias, diversos autores han demostrado una menor sensibilidad de AGID respecto de las pruebas diagnósticas de ELISA y PCR (Felmer *et al.*, 2006). Mientras que las pruebas serológicas detectan la presencia de anticuerpos, la PCR es utilizada para amplificar ADN proviral, lo cual permite la detección de trazas de material viral (Yeon Choi *et al.*, 2002). La amplificación del ADN proviral es considerada una fuerte herramienta para el diagnóstico de LEB (Klintevall *et al.*, 1994). La PCR ha sido utilizado anteriormente para la detección proviral de vLEB por diversos autores (Eaves *et al.*, 1994; Fechner *et al.*, 1996; Felmer *et al.*, 2006; González *et al.*, 2001; Klintevall *et al.*, 1994; Kuckleburg *et al.*, 2003; Kuzmak *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 1993; Trono *et al.*, 2001; Yeon choi *et al.*, 2002). También se han desarrollado métodos para la detección de ARN viral en suero mediante el uso de una reacción de transcripción reversa, seguida de amplificación del ADN complementario (RT-PCR) (Poon *et al.*, 1993).

En nuestro país, un estudio preliminar realizado en la cuenca de Tizayuca reveló que el 29% de las vacas procedentes de hatos con alta prevalencia de LEB presentaron linfocitosis persistente, mientras que el 55% de estas vacas fueron positivas por prueba de ELISA. Adicionalmente, se encontró que la LEB tiene mayor frecuencia en vacas de tercer parto, de las cuales el sitio con mayor frecuencia de tumores fue el útero, debido a la palpación periódica por el reproductor (Hernández *et al.*, 2006a). Lo anterior indica que existe gran diferencia entre las pruebas empleadas rutinariamente para el diagnóstico de LEB, en los hatos lecheros por lo que es necesario implementar métodos diagnósticos más sensibles como la RT-PCR, ya que la presencia de LEB tiene repercusiones económicas importantes al afectar el aparato reproductivo y otros sistemas de las vacas lecheras.

OBJETIVOS

GENERAL

Estandarizar y valorar la técnica de Transcripción Reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB) en sangre.

PARTICULARES

- Determinar las condiciones óptimas para la reacción de la transcripción reversa (RT).
- Determinar la T_m óptima para la reacción de PCR.
- Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ para la PCR.
- Determinar la concentración óptima de iniciadores para la PCR.
- Valorar la prueba de RT-PCR estandarizada, en forma comparativa con la prueba de ELISA.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño experimental

El estudio se realizó en laboratorio de virología de la FES-C. Se emplearon muestras de vacas del CAIT, se trabajó con un hato con alta prevalencia de LEB, del cuál se seleccionó una vaca con manifestaciones clínicas, linfocitosis persistente y prueba de ELISA positiva a LEB para proceder a la estandarización de la PCR a partir de muestras de sangre completa para la detección de vLEB. Posteriormente, se tomaron muestras de suero y de sangre completa de 40 vacas seleccionadas al azar, de un hato de 250, para realizar la prueba de ELISA y la PCR previamente estandarizada.

Toma de muestras

Se realizó por punción aséptica de la vena caudal mediana la obtención de sangre con tubos Vacutainer (Becton and Dickinson, Argentina) con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante para la obtención de suero. Las muestras se refrigeraron a 4° C y se procesaron en el laboratorio de Patología Molecular Veterinaria (L-6) y el laboratorio de Virología Molecular Unidad de Investigación (L-504) de la FES-Cuautitlán, UNAM.

Hematología

Para la determinación de linfocitosis persistente se realizó conteo total de leucocitos empleando la cámara de Neubauer y conteo diferencial en frotis de sangre teñidos con tinción de Wright para calcular el número absoluto de linfocitos siguiendo metodología rutinaria (Buendía *et al.*, 2007).

Serología

Con los sueros obtenidos, se realizó la técnica de ELISA indirecta en microplaca de 96 pozos para la detección del antígeno gp51 del vLEB, siguiendo las indicaciones del fabricante (VMRD, Pullman, WA, USA), las muestras a evaluar se diluyeron a 1:25 con la solución amortiguadora de dilución. Para la lectura y registro de la prueba el lector de ELISA (MR 600 Microplate Reader Dynatech) se calibró a una longitud de onda de 620-650 nm para determinar la densidad óptica (DO) en las distintas diluciones.

Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

A las muestras de sangre completa se les realizó conteo total de leucocitos y se ajustó la cantidad a 1.5×10^7 , para la separación del paquete de PBMC (por sus siglas en inglés) mediante un gradiente de sedimentación, utilizando Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) en las proporciones adecuadas (Gorodezky *et al.*, 2008). La sangre entera se diluyó 1:2 con solución amortiguadora Alsever pH 7.2 (g/L: dextrosa 20.5, citrato de sodio 8.0, ácido cítrico 0.55, cloruro de sodio, 4.22) de la siguiente manera: en tubos de 1.5ml, se depositaron 750 μ l de sangre entera y 750 μ l de solución Alsever. De esta mezcla, se tomaron 500 μ l los cuales se depositaron cuidadosamente sobre 500 μ l de Histopaque-1077, previamente temperado, en un tubo Eppendorf de 1.5ml. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 400 x g durante 30 minutos para la separación de PBMC las cuales permanecen en la interfase del plasma y el Histopaque-1077 (Figura 3). Las PBMC se separaron cuidadosamente y se lavaron dos veces con 500 μ l de solución de Alsever a 400 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y la pastilla de PBMC se dejó secar durante 5 min boca abajo en la campana de extracción sobre una gasa estéril.

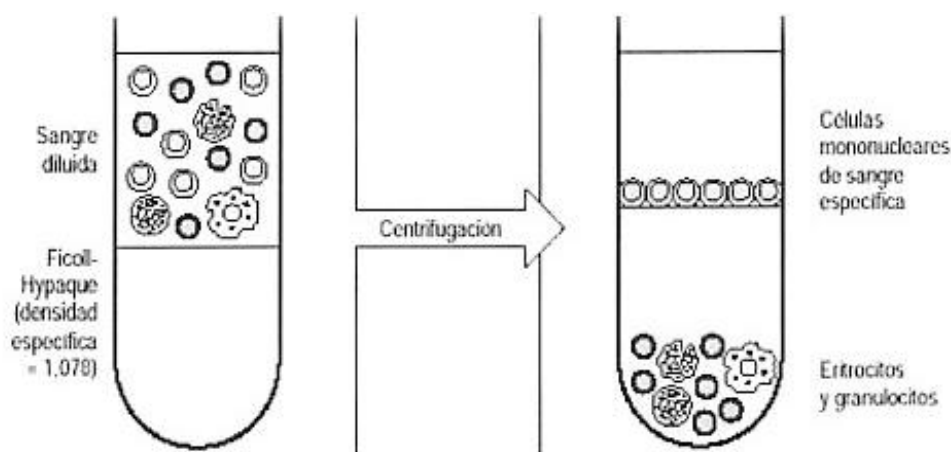


Figura 3. Separación de células mononucleares de sangre periférica por diferencia de densidades.

Extracción de ARN

Posteriormente se realizó la extracción de ARN utilizando un kit comercial con sistema de extracción presurizado (QuickGene-Mini80, Fujifilm LifeScience, Tokyo, Japan) siguiendo las indicaciones del proveedor. Brevemente, en un microtubo de centrifuga

de 1.5mL se colocaron las PBMC y se agregaron 5.2µl de mercaptoetanol y 520 de buffer de Lisis (LRB), se agitó en vortex por 30seg y se centrifugó para recuperar el lisado de las paredes del tubo. Posteriormente se añadió 250µl de etanol >99% y se agitó por vortex durante 5 minutos a máxima velocidad y se centrifugó para recuperar el lisado de las paredes del tubo. El lisado se transfirió al cartucho y por presurización se realizaron tres lavados con 750µl del buffer de lavado (WRB). Finalmente se cambio la columna al paso de elución y se obtuvieron 50µl con el buffer de elución (ERB). El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). El ARN se separó por electroforesis y se visualizó en gel de agarosa al 1.5%.

Transcripción reversa (RT)

La cantidad de ARN se ajustó a una concentración de entre 0.1-0.5 µg. Se utilizaron dos sistemas para la reacción de transcripción reversa (RT); el sistema Superscript II (Invitrogen, California, USA) y el sistema ImPromII (Promega, San Diego, CA). En ambos sistemas se trabajó siguiendo las condiciones descritas por Poon et al (1993) y las condiciones descritas por los fabricantes con ligeras modificaciones. El sistema Superscript II se realizó en un volumen final de 20 µl. En microtubos de 0.2 ml, se mezclaron 0.5 µg de ARN con 2.5 µM de iniciador Oligo(dt)15 (Promega Corp., Madison WI., USA), se ajustó con agua de grado biología molecular (gbm) a un volumen de 11 µl y se incubó a 70° C durante 10 minutos y posteriormente a 4° C por lo menos durante 5 minutos en el termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Posteriormente, se agregó la muestra de RT compuesta por buffer 1X (Tris-HCl 250mM, KCl 375mM, MgCl₂15mM), ditioneitol DTT 0.01M, de cada dNTPs 0.2 µM, se ajustó a un volumen de 8 µl con agua gbm, se homogeneizó perfectamente, se incubó a 37° C en el termociclador para agregar 1 U de la enzima RT-Superscript II cuando se registró la temperatura 37° C (en lugar de 42° C) y finalmente se incubó la mezcla durante 1 hora.

En el sistema ImPromII la RT también fue realizada en reacciones de 20 µl de la siguiente manera: Se mezclaron 0.5 µg de ARN total con iniciador Oligo DT 2.5 µM (Promega Corp., Madison WI., USA) ajustando con gbm a un volumen de 10 µl e incubando a 70° C durante 10 minutos seguido por una incubación inmediata a 4° C por lo menos durante 5 minutos en el termociclador. Posteriormente, se agregó la mezcla de RT compuesta por buffer 1x, MgCl₂ 3mM, de cada dNTP 0.2mM, se ajustó el volumen

con agua gbm a 9µl, se homogenizó perfectamente, se incubó a 37° C en el termociclador para agregar 1 U de la enzima RT-ImPromII cuando se registró la temperatura 37° C y finalmente la mezcla fue incubada durante 1 hora.

Amplificación de ADNc por PCR

Para la PCR se utilizaron los siguientes iniciadores: 2778, 5'- CTA CCT TGC CAG ATC TCA TC -3', 2796 (sentido) y 2979, 5'- GCT TGT CGA AGC TCT GCA ATG C -3', 2958 (antisentido) descritos por Poon, *et al* (1993) que amplifican un producto de 202 pb de una región altamente conservada del gen *Pol*. Inicialmente, se trabajó siguiendo las condiciones descritas por Poon *et al.* (1993). Posteriormente se programó en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) un gradiente de temperatura considerando una temperatura de 54.5° C +/- 10° C para determinar la T_m , óptima. (Tabla 1) y se realizó la PCR a un volumen de 25µl conteniendo: 4 µl de ADNc, 20 pM de cada uno de los iniciadores Pol2 sense y Pol2 antisense, amortiguador de reacción de PCR 1X [KCl 500 mM, Tris - HCl 100mM (pH 9.0), y 1 % Triton X-100], 0.2 µM de cada dNTPs, MgCl₂ 1.5 mM, 1.25 unidades de Taq polimerasa (GoTaq, Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 25 µl. La composición de la mezcla de PCR se muestra en la Tabla 2. Con la temperatura de alineación seleccionada se realizó una curva de concentración de MgCl₂ (1.5, 2.0, 3 mM) y de iniciadores (10, 20, 30, 40, 50 pM). Las condiciones finales programadas en el termociclador se muestran en la Tabla 3. De manera alterna, en PCR selectas y con el fin de corroborar el estado del ADNc, se utilizó una PCR para la amplificación de Hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT) utilizando los siguientes iniciadores: 5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3' (sentido) y 5'-CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3' los cuales amplifican un producto de 229 pb. La composición de la mezcla de PCR y las condiciones de amplificación para la HPRT se muestran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 1. Gradiente programado por el termociclador (54.5 ° C +/- 10 ° C)

○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
44.5	44.8	45.9*	47.7	49.9*	52.5*	55.3*	58.0*	60.5*	62.6	64.2	65.1*

* Temperaturas probadas en la PCR

Tabla 2. Composición de la mezcla de PCR para vLEB.

REACTIVO	VOLUMEN en μ l
Amortiguador de reacción PCR (5X)	5.0
MgCl ₂ (25mM)	1.5
DNTP's (10 mM c/u)	0.5
Iniciador sentido, (50 pM)	0.25
Iniciador antisentido (50 pM)	0.25
Taq polimerasa 5U/ μ l	0.15
cADN (templado)	4.0
Agua g.b.m	Se ajusta al volumen total
VOLUMEN TOTAL	25

Tabla 3. Condiciones de amplificación para el vLEB

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS	REACCION
94	5	1	Pre-desnaturalización
94	1	35	Desnaturalización
60.5	1	35	Alineación
72	2	35	Extensión
Repetir desde el paso 2			
72	5	1	Extensión final
4			Conservación

Tabla 4. Composición de la mezcla de PCR para HPRT

REACTIVO	VOLUMEN en μ l
Amortiguador de reacción PCR (10X)	2
MgCl ₂ (25mM)	1.04
DNTP's (10 mM c/u)	0.4
Iniciador sentido, (10 pM)	1
Iniciador antisentido (10 pM)	1
Taq polimerasa 5U/ μ l	0.5
cADN (templado)	2.0
Agua g.b.m	Se ajusta al volumen total
VOLUMEN TOTAL	20

Tabla 5. Condiciones de amplificación para la HPRT

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS	REACCION
94	5 min	1	Pre-desnaturalización
94	30 seg	35	Desnaturalización
50	30 seg	35	Alineación
72	30 seg	35	Extensión
Repetir desde el paso 2			
72	10 min	1	Extensión final
4			Conservación

Visualización en Gel de Agarosa

La visualización del ARN total, el ADNc y los productos de la PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. El gel preparó con 1.5g de agarosa (Promega Corp., Madison WI., USA) en 100 ml de amortiguador TBE 1X (Promega Corp., Madison WI., USA) La mezcla se colocó en horno de microondas en potencia alta, en ciclos de 30 segundos, sin alcanzar ebullición hasta la disolución. Acto seguido, se agregó bromuro de etidio (5µg/ml). La cámara horizontal de electroforesis (Owl separation systems, Inc. Portsmouth, NH, USA) se cargó como sigue: se tomaron de 2 µl del material biológico y se agregaron 3µl del amortiguador de carga (Loading buffer, Promega Corp., Madison WI., USA) y la mezcla total se depositó en los pozos seleccionados del gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril consistentemente se cargaron 5µl de marcador de peso molecular (PCR Markers y/o 1Kb marker, Promega Corp., Madison WI., USA) el cual se diluyó de la manera descrita. Posteriormente, se realizó electroforesis a 90 volts por una hora y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Apollo, Instrumentation, Calif, USA). Los resultados de la electroforesis se documentaron usando el programa Doc-It Software (UVP, Cambridge UK) utilizando una cámara digital (Olympus camera, Tokyo, Japan).

Análisis de resultados

Los valores obtenidos de las pruebas de RT-PCR y ELISA se agruparon en un cuadro de contingencia de 2X2 para realizar la prueba χ^2 y se determinó la concordancia entre las pruebas mediante el coeficiente de Cramer.

RESULTADOS

Se obtuvo exitosamente ARN total visible de las PBMC (Figura 4), en un rango de 10-88 µg/ml. El ARN total se ajustó a un rango de 0.1-0.5 µg/µl y se utilizó en la RT. Se obtuvo ADNc en los dos sistemas de enzimas utilizados pero sólo bajo las condiciones descritas por sus respectivos fabricantes.

En la PCR, se amplificaron productos de 202 pb siguiendo las condiciones descritas por Poon et al., (1993) pero las bandas no presentaron una buena definición (Figura 5) y en intentos posteriores no se tuvo éxito bajo dichas condiciones. El ADNc utilizado en los ensayos fallidos amplificó productos de 229 pb de HPRT (Figura 6). Posteriormente, se determinó la integridad de los iniciadores para la PCR de vLEB por espectrofotometría. Se detectó una nula concentración de iniciadores. Con iniciadores nuevos se realizó el gradiente con las temperaturas seleccionadas mismo que reveló bandas de 202 pb correspondientes a la secuencia del vLEB en los carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, cada uno de estos con su control negativo y que corresponden a las T°s de 49.9, 52.5, 55.3, 58, 60.5, 65.1 respectivamente (Figura 7). No hubo amplificación a 45.9° C. Con base al gradiente, se seleccionó la temperatura de 60.5° C para la PCR. Posteriormente, con base a los resultados de la curva de concentración de MgCl₂ (Figura 8) se determinó que la concentración adecuada fue de 1.5 mM. El gradiente de iniciadores (rango 10-50) indicó que la concentración óptima para obtener productos de 202 bp fue de 20 pM. Los resultados de los amplificadores de las vacas porisitas a RT-PCR se muestran en la Figura 9.

Los resultados de la prueba de ELISA y RT-PCR realizado en las 40 vacas seleccionadas se presentan en la Figura 10 y 11, respectivamente. Se encontró que el 67.5%(27/40) de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra la gp51 mientras que sólo el 55%(21/40) fueron positivos a la presencia del vLEB. En la tabla de contingencia de 2X2 (Tabla 6) se demostraron que de los animales seropositivos en la técnica de PCR 21 (55.5%) (grupo +/+), 13 (30.5%) resultó negativo a ambas pruebas (grupo-/-) y se tuvo un grupo que resultó +/- a ELISA y PCR respectivamente. La prueba de ELISA y RT-PCR presenta una alta relación ($\chi^2 < 0.001$ y coeficiente de Cramer = 0.77).

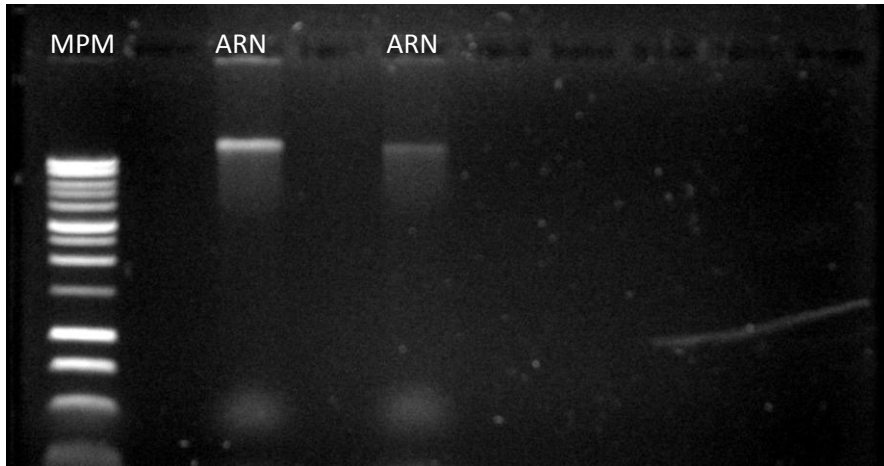


Figura 4. Bandas de ARN. Se muestran dos bandas de ARN después del método de extracción.

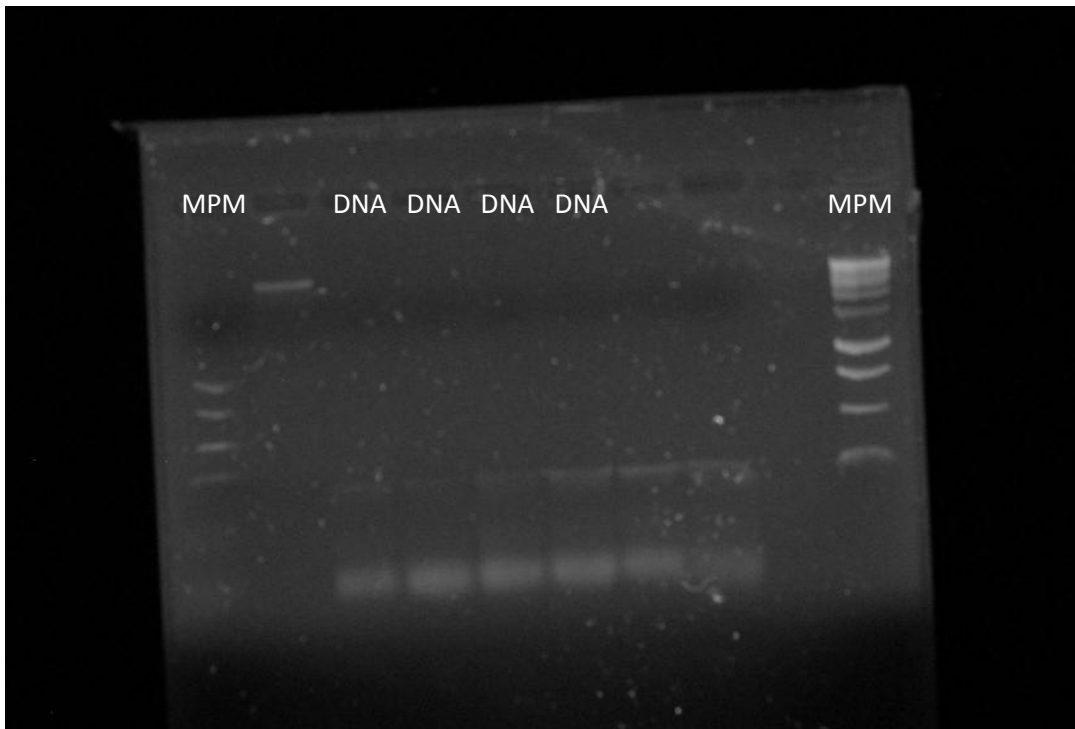


Figura 5. Resultado de la primera amplificación bajo las condiciones de Poon et al., 1993.

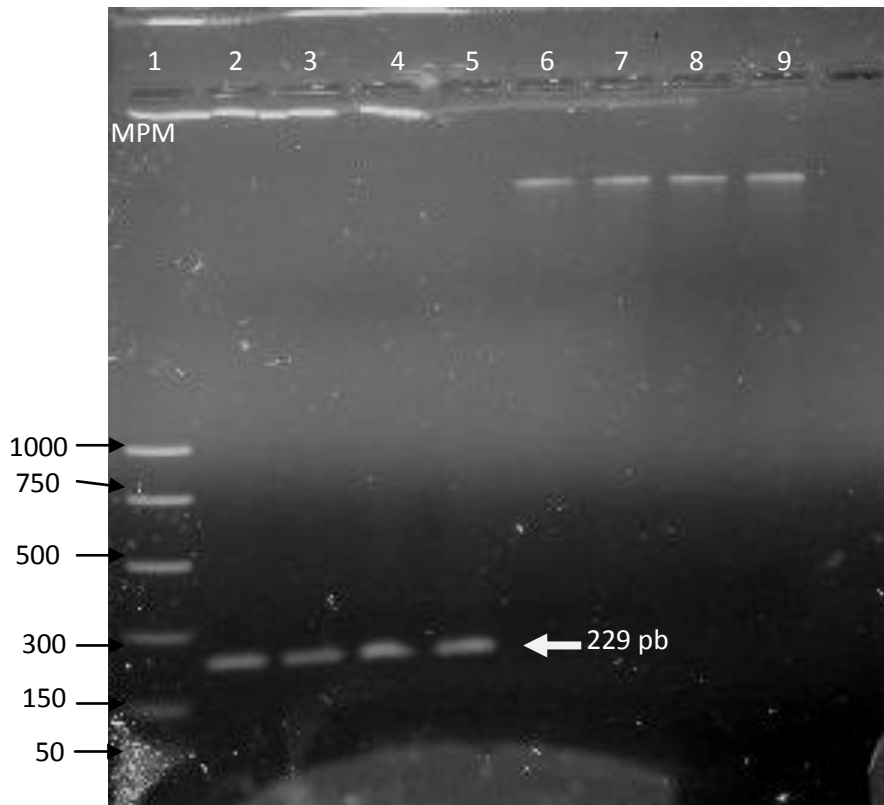


Figura 6. Productos amplificados en la HPRT. En el primer carril se muestra la marcador de peso molecular; del carril 2-5 se muestran los amplificados del HPRT de 229pb; del carril 6-9 se muestran las ADNc utilizados para la HPRT.

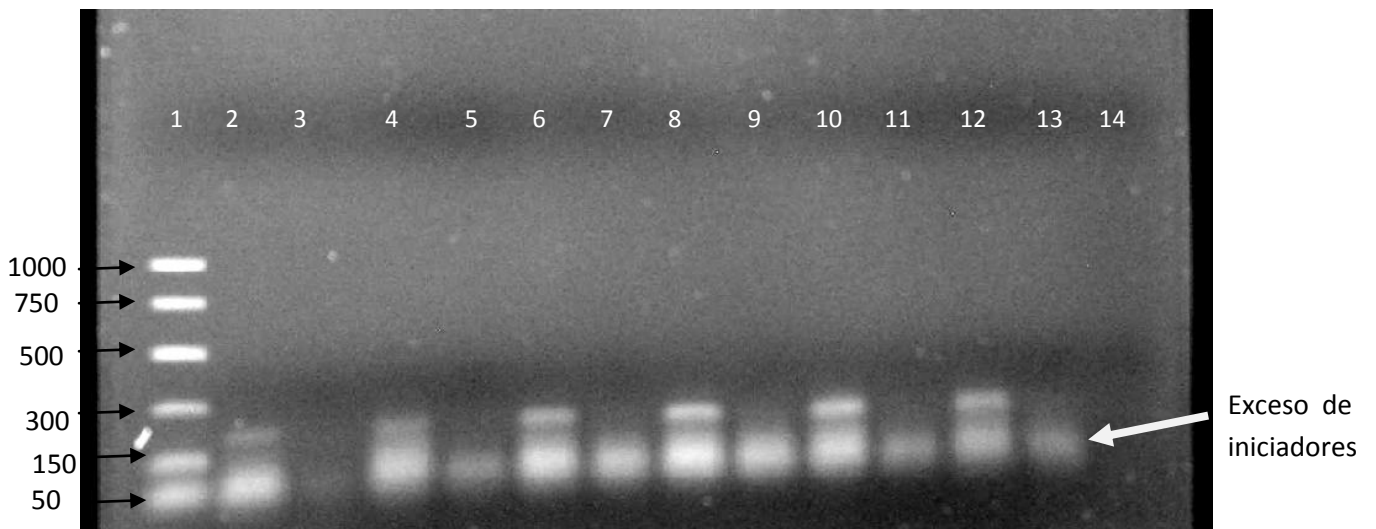


Figura 7. Productos amplificados en el gradiente de temperatura. En el primer carril el marcador de peso molecular; en los carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, amplificados de 202pb correspondientes al vLEB, cada uno de estos con su control negativo y que corresponden a las T^os de 49.9, 52.5, 55.3, 58, 60.5, 65.1 respectivamente.

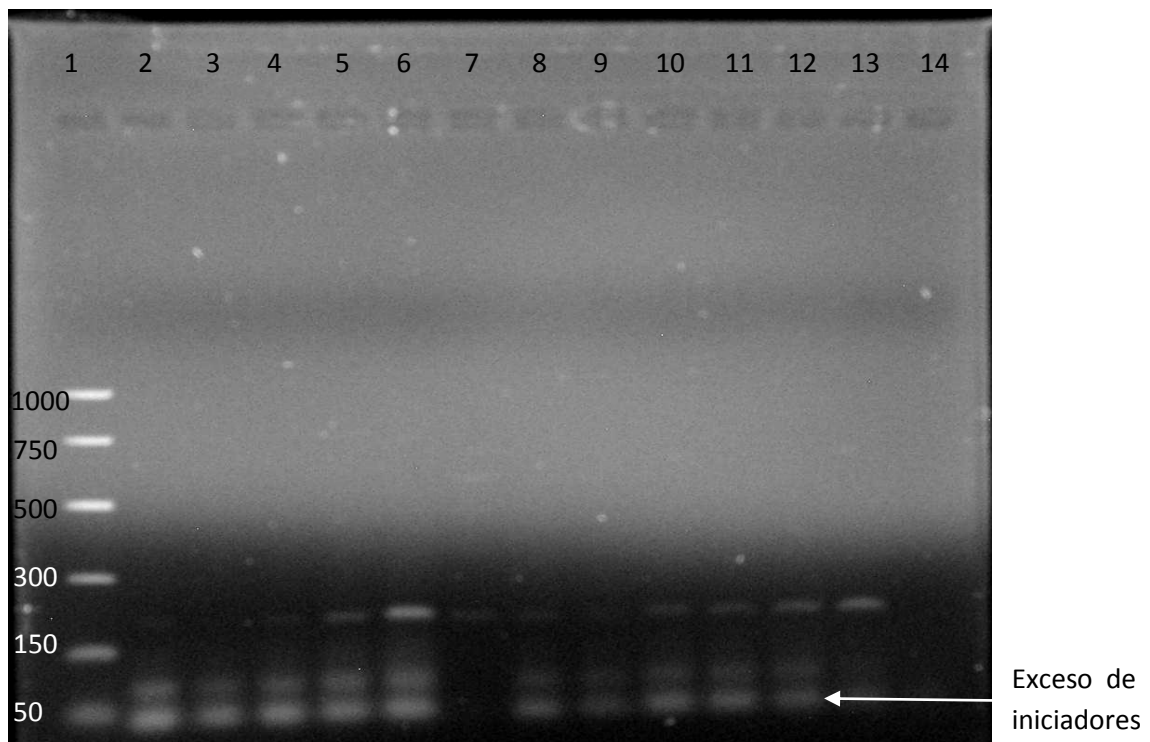


Figura 8. Productos amplificados en el gradiente de $MgCl_2$. Se presentan amplificados de 202pb correspondientes al vLEB; en el primer carril el marcador de peso molecular, del carril 2-7 la concentración de $MgCl_2$ es de 1.5 mM; del carril 8-13 la concentración de $MgCl_2$ fue de 2 mM

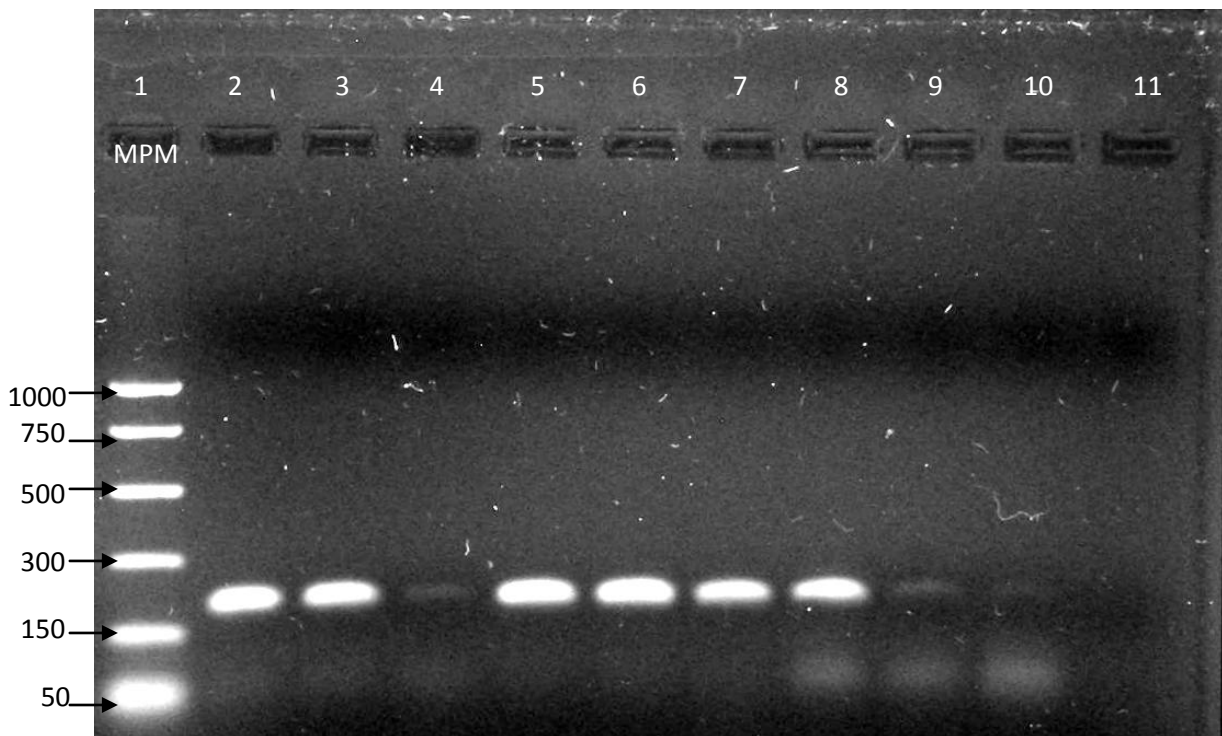


Figura 9. Productos amplificados en la RT-PCR. Se muestran algunos de los amplificados que dieron positivos a RT-PCR provenientes de las 40 vacas muestreadas. Se observan en los carriles 2, 3, 5, 6, 7 y 8 bandas correspondientes a 202pb del vLEB.

Proporción del tamizaje por ELISA

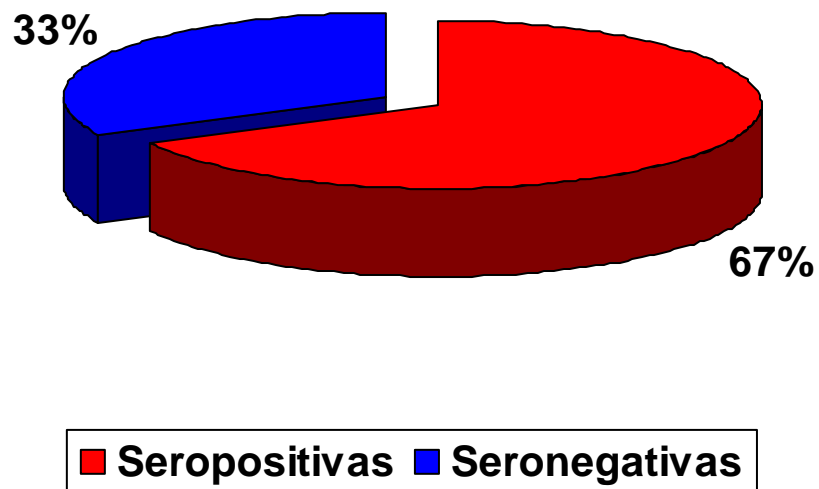


Figura 10. Porcentaje de animales seropositivos y seronegativos a la prueba de ELISA.

Resultados de la PCR

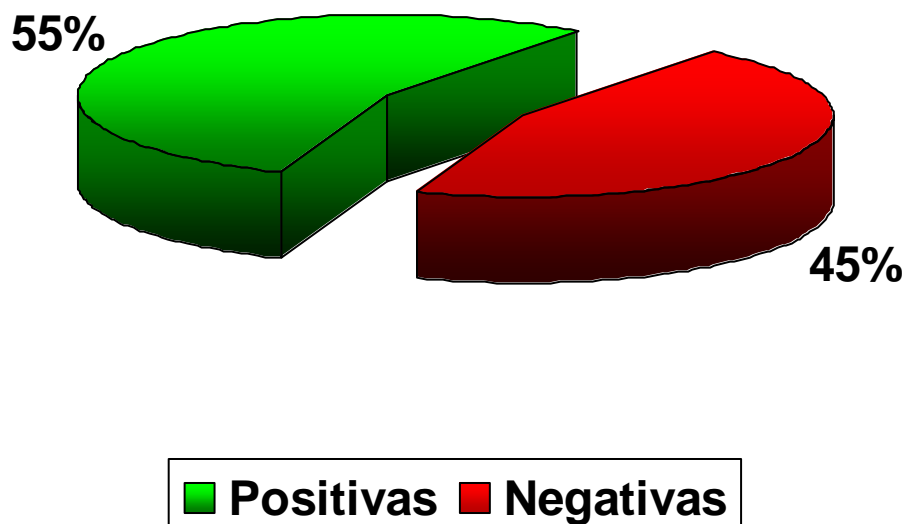


Figura 11. Porcentaje de animales positivos y negativos a PCR

Tabla 6. Cuadro de contingencia de 2X2 para los resultados obtenidos de la PCR y prueba de ELISA.

		PCR		
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	21	6	27
	Negativo	0	13	13
		21	19	= 40

DISCUSIÓN

Las técnicas moleculares para la amplificación de vLEB se consideran pruebas robustas para la determinación de presencia viral. El manual diagnóstico de la OIE recomienda detectar ADN proviral por métodos de PCR anidado para el diagnóstico de vLEB (OIE, 2004). La RT-PCR se ha propuesto como un método apropiado para la detección de ARN viral libre en suero (Poon *et al.*, 1993). En el presente estudio se estandarizó la técnica de RT-PCR como propuesta para la detección de viremia en los animales del CAIT y esta misma técnica puede ser aplicada para la detección de partículas virales en otros líquidos corporales como el semen y la leche.

El rendimiento estándar de extracción de ARN descrito por el fabricante es de 4.6 – 6.5 µg en una muestra de sangre (QuickGene RNA blood cell kit S, Fujifilm LifeScience, Tokyo, Japan) y en el presente trabajo se obtuvieron valores por encima de ese rango por lo que se puede concluir que el manejo y las condiciones de laboratorio fueron óptimas. Los resultados negativos de RT bajo las condiciones descritas por Poon *et al.* (1993) pueden estar asociadas a las diferencias entre los sistemas enzimáticos utilizados debido a la constante innovación de los mismos en busca de optimizar los protocolos para dicho fin. En 1993, Poon utilizó el sistema de RT de AMV y funcionó en dichas condiciones. En cambio las enzimas ImPromII y Superscript, aunque similares en la temperatura de incubación (42 °C), presentan ligeras diferencias en los pasos iniciales. Sin embargo, ambos sólo funcionaron al modificar la temperatura de incubación a 37 °C con base a protocolos previamente descritos de RT (Rodríguez, 2008). Posiblemente, el cambio de temperatura fue necesario porque se utilizó oligo-DT como iniciador, ya que cada unidad de la enzima SuperScript se define por la incorporación de 1 nM de dTTP en 10 minutos a 37 °C, utilizando oligo-DT como iniciador (Invitrogen, 2003). Así mismo, el protocolo de la enzima ImPromII también recomienda que la temperatura de transcripción inicial sea de 42 °C, pero indica que el rango de incubación es de 37-55 °C (Promega, 2006). La síntesis de ADNc puede realizarse con primer específico de gen (GSP) y los métodos de amplificación inespecíficos utilizan iniciadores aleatorios (random primers) y oligo-DT. El uso de oligo-DT es un método más específico para hibridar las terminaciones 3'- poliadeniladas que se encuentran en la mayoría de los ARNm eucarióticos y es más recomendado que los hexámeros aleatorios, ya que presentan una mayor consistencia en obtener productos de RT-PCR (Invitrogen, 2003b).

Por tal motivo, se optó por el uso de oligo-DT debido a que el ADNc obtenido será utilizado para aplicaciones posteriores.

Con respecto a la PCR, la amplificación del producto de HPRT resultó de gran utilidad para comprobar la integridad de los componentes utilizados en la PCR para vLEB. De este modo se corroboró que el ADNc era funcional y que el problema radicaba en la degradación de los iniciadores. Adicionalmente, se comprobó que puede ser utilizado en muestras provenientes de ganado bovino, ya que su uso ha sido descrito en muestras de murciélago, ovinos y caprinos (Rodríguez, 2008) y la revisión de la literatura no indica que haya sido utilizado en esta especie. A pesar de que existen gran cantidad de protocolos de PCR descritos en la literatura (Eaves *et al.*, 1994; Fechner *et al.*, 1996; Felmer *et al.*, 2006; González *et al.*, 2001; Klintevall *et al.*, 1994; Kuckleburg *et al.*, 2003; Kuzmak *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 1993; Trono *et al.*, 2001; Yeon choi *et al.*, 2002), se requiere la estandarización de las condiciones de amplificación en el termociclador disponible en cada laboratorio. Dentro de los factores principales en la estandarización de la PCR se encuentra la determinación de la temperatura de alineación. Para dicho fin, se considera la temperatura de desnaturalización (T_m) de los iniciadores. Esta se define como la temperatura en la cual la mitad del ADN se encuentra en su forma desnaturalizada (cadena sencilla) (Boehringer Mannheim, 1996) y la fórmula clásica con la que se calcula es: $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ (Ricaño, 2007). Por tal motivo, se realizó un gradiente con las temperaturas seleccionadas (Tabla 1) que incluyera las T_m descritas por Poon (1993), por el proveedor de los iniciadores (PROVEEDOR) y la calculada en el laboratorio las cuales fueron de 45, 54.5, y 62° C, respectivamente. Los resultados del gradiente indicaron que la temperatura empleada por Poon *et al.*(1993) no era la óptima ya que no amplificó producto de 202 pb a 45.9° C (Figura 7) y probablemente esa fue la razón por la que se observaron inconsistencias en la amplificación (Figura 5) e incluso la ausencia de amplificación en intentos posteriores. Asimismo, la temperatura óptima seleccionada se ubicó entre la del proveedor y la calculada. Una correcta concentración de magnesio es esencial para la amplificación de productos debido a que la enzima ADN polimerasa es dependiente de magnesio y determina la fidelidad de la misma (Cateses *et al.*, 1997). Sin embargo altas concentraciones de magnesio pueden ir en detrimento de la PCR debido a que los cationes divalentes libres estabilizan fuertemente las uniones de ADN de doble cadena lo cual interfiere con la hibridación de los iniciadores (Boehringer Mannheim, 1996;

Cateses *et al.*, 1997). Por tal motivo se debe determinar la concentración óptima de magnesio en cada protocolo de PCR. Con base al gradiente utilizado, la amplificación del producto exhibió una relación inversamente proporcional a la concentración de MgCl₂. Con respecto a la concentración de iniciadores, los geles realizados (Figura 5, 7 y 8) indicaron exceso de iniciadores en la parte inferior de los mismos por lo que se probaron diferentes concentraciones y se determinó que la concentración mínima fue de 20 pM puesto que a 10 pM no hubo amplificación.

La prueba de PCR aplicada a terneras, ha permitido detectar DNA proviral a partir de la segunda semana de haberse inoculado el virus y en general en forma más temprana que las pruebas serológicas como ELISA, Western Blot y AGID, pero el inconveniente es que no puede ser aplicada en muestras agrupadas. Sin embargo, resulta apropiada para el diagnóstico en terneros jóvenes que posean anticuerpos calostrales y es muy útil para la detección de la infección en animales seronegativos (González *et al.*, 2001; Kuckleburg *et al.*, 2003; Yeon Choi *et al.*, 2002; OIE 2004). La OIE reconoce la PCR anidada basada en secuencias de iniciadores del gen *env*, que codifica la gp51, como el método más recomendado para el diagnóstico, seguida por electroforesis y tinción (OIE 2004). Experimentalmente, el uso de la PCR ha detectado la infección por vLEB de 2-4 semanas antes que las pruebas serológicas. Aunque las pruebas de PCR no se han desarrollado para reemplazar las pruebas tradicionales de anticuerpos, pueden ser suplementos muy útiles para la detección temprana por LEB y para confirmar la infección por LEB de sangre y leche. Al comparar el valor diagnóstico de secuencias derivadas de las diversas regiones del genoma del vLEB, se encontró que el uso de iniciadores provenientes de la región *pol* del genoma viral dieron la mayor sensibilidad y detectaron un mayor número de ganado infectado por vLEB proveniente de diversas regiones geográficas utilizando protocolos de PCR anidado y de tiempo real (Kuckleburg *et al.*, 2003). De manera general y en comparación con la PCR tradicional, la PCR anidada incrementa la sensibilidad de la detección al diagnosticar una mayor proporción de casos (Kim y Chae, 2001; Kuckleburg, *et al.*, 2003) y requerir menor concentración de ADN. En ocasiones la detección puede alcanzar hasta el 100% de los casos (Kim y Chae, 2001).

En el presente estudio, los resultados de las pruebas de ELISA y de PCR realizadas en 40 vacas mostraron que hubo 6 casos en los que no hubo concordancia entre las pruebas. En general, la sensibilidad de la prueba de ELISA es muy alta y puede

presentar reacciones cruzadas con proteínas con alto grado de similitud que pudieran estar presentes en el suero. Lo anterior, puede conducir a determinar una proporción de falsos positivos (Nagy 2003; Nagy 2007; VMRD 2009). De este modo es muy probable que los casos referidos sean falsos positivos por ELISA. Lo anterior puede determinarse realizando muestreos posteriores o por Western blot, que presenta mayor especificidad que ELISA en la inmunodetección de enfermedades retrovirales (Hardy, 1991). Por otro lado, si los casos en cuestión fueran falsos negativos por PCR, existe la posibilidad de que el vLEB no se encontrara circulando en la sangre debido a que en ocasiones se presenta de manera intermitente en líquidos corporales (Dus Santos *et al.*, 2007; Yeon Choi *et al.*, 2002), o que se encontrara en cantidades mínimas que el protocolo de PCR utilizado no fuese capaz de detectar. Esto último es menos probable, debido a que se ha demostrado que el protocolo de PCR detecta cantidades mínimas residuales de ARN viral en suero (Gillet *et al.*, 2007; González *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 1993; Yeon Choi *et al.*, 2002). De este modo, los datos sugieren que estos casos sean negativos verdaderos y para corroborarlo sería conveniente realizar un protocolo de PCR anidado que confirme la ausencia de vLEB. El análisis estadístico revela que la prueba de ELISA y RT-PCR son comparables en el diagnóstico de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

- Las condiciones óptimas para la RT y la PCR deben establecerse con base a los parámetros críticos de cada reacción (T de RT, Tm, MgCl, e iniciadores) debido a que lo descrito en la literatura puede diferir de las condiciones y equipo disponible en cada laboratorio.
- La técnica RT-PCR estandarizada fue capaz de detectar al vLEB en sangre de animales procedentes de un hato con alta prevalencia de LEB.
- Existe una considerable concordancia diagnóstica entre la RT-PCR y la prueba de ELISA.
- La presencia de 6/40 casos en los que las pruebas no coincidieron sugiere la presencia de falsos positivos por ELISA o falsos negativos por RT-PCR por lo que es conveniente realizar muestreos seriados y/o PCR anidada y Western blot para confirmar el diagnóstico.
- Para incrementar la sensibilidad de la detección del vLEB sería recomendable implementar la técnica en la forma de PCR anidada.
- La RT-PCR es una opción altamente específica para confirmar el estado de la infección por el vLEB.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Andrews AH. 2004. Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle. 2° edi. Blackwell Scince.
2. Antaramian A, González A, Ahumada M, Ricaño I. 2007. Manual del Curso Teórico-Práctico de RT-PCR y PCR en Tiempo Real. Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM Octubre del 2007.
3. Ávila TS, Gutiérrez CAJ. 2006. Producción de Leche con Ganado Bovino. FMVZ. UNAM. Disponible en: <http://www.ammveb.net/BIBLIOTECA/libros/PLGB/inicio.htm>
4. Boehringer Mannheim. 1996. Chapter 3- Nucleic Acid Hybridization – General Aspects, Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual. Second edition. Germany pp 28.
5. Buendia JA, Castañeda AG, García CLA, Mondragón G, Rangel RI, Valdivia AG. 2007. Manual de prácticas de laboratorio clínico. 1er edic. FESC. UNAM.
6. Castelli M, Mangold A, Maciel M, Abdala A. 1999. LEUCOSIS BOVINA. Diagnóstico, transmisión, control y prevención. Infortambo, Nro 128, Septiembre, Pág. 68.
7. Cateses LI, Matías – Guiu X. 1997. Técnicas moleculares para la obtención de ADN y reacción en cadena de la polimerasa. Vol.30, No 2
8. Dargatz DA, Johnson R, Wells SJ, Koprak CA. 1998. Descriptive epidemiology of bovine leukosis virus in U.S. beef and dairy Cattle. Proc. U.S. Anim. Health Assoc. 102:120-123.
9. Doménech A, Viana M, Gomez-Lucia E. 1999. Nuevas aportaciones al conocimiento de la patogenia por el virus de la leucosis enzoótica bovina. (BLV). Vet Med; 16 (1): 10-20 p.
10. Dus Santos MJ, Trono K, Lager I, Wigdorovitz A. 2007. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. Vet Microbiol. 119; 10–18
11. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. J Vet Microbiol; 39: 313-321
12. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beir D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine

- leukemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med B*. 43: 621-630 p.
13. Felmer R, Zuñiga J, Recabal M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.*, Vol. XXXVIII N° 2, pp. 137-141
 14. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A, 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* 16 March; 4:18
 15. González ET, Oliva GA, Valera A, BonzoE, Licursi M, Etcheverrigaray ME. 2001. Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación de Técnicas de Diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *ANALECTA VETERINARIA*; 21, 2: 12-20.
 16. Gorodezky LC, Vázquez AA, Pérez VMF, García SD, Rodríguez UD, Lligüín LIG, Vega RM. 2008. Manual de procedimientos serológicos y celulares de inmunogenética, Departamento de inmunología e inmunogenética del InDRE, Secretaría de Salud.
 17. Hardy WD. 1991. General Principles of Retrovirus Immunodetection Tests. *J. Am.Vet.Med. Assoc.* 199(10):1282-1286.
 18. Hernández BJ, López PR, Zavaleta HJN, Fausto RE, García OC. 2006a. Leucosis enzoótica bovina: diagnóstico de laboratorio y su repercusión reproductiva en vacas Holstein–Friesian. Memorias del 30 ° Congreso Nacional de Buiatría, organizado por la AMMVEB del 10 al 12 de Agosto de 2006 en Acapulco Guerrero, México.
 19. Hernández BRJ, Mar CR, Zavaleta HJN, Barrientos PR, Leyva GVH, Fausto RE. 2006b. Leucosis Enzoótica Bovina. *Revista de Ciencia, Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria. AGROPECUS. FESC. UNAM. México.* 1(5): 14-35.
 20. Invitrogen 2003a. SuperScript™ II Reverse Transcriptase. Invitrogen Corporation, California, USA
 21. Invitrogen 2003b. SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR Invitrogen Corporation, California, USA.
 22. Kahrs RF. 2001. *Viral Diseases of Cattle*. Iowa State University Press. 2a. Edition.

23. Kim J, Chae C. 2001. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *J Virological Meth* 92:105-111.
24. Klintevall K, Ballagi-PordS A, Näslund K, Belák S. 1994. Bovine leukaemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 42: 191-204.
25. Klintevall K, Fuxler L, Fossum C. 1997. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection on calves. *Comp Immun Microbiol* 2, no 2: 119-130
26. Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SAE, Dammen MA, Christopher-Hennings J. 2003. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest*; 15:72–76
27. Kuzmak J, Kozaczynska B, Bicka L. 1999. Diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection en newborn calves by use of PCR. *Bull Vet Inst Pulway* 43: 125.
28. Motton DD, Buehring GC. 2003. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *Journal Dairy Science* 86:2826-2838.
29. Mateos, PA. 2005. Nueva lista de enfermedades de la OIE y Sistema Internacional de Notificación de Enfermedades. Memorias de las 1as Jornadas Bovinas. Noviembre 24 y 25; México, D.F. DUADDEC. FMVZ. UNAM. 129-133.
30. Nagy, DW. 2007. Timing of seroconversion and acquisition of positive polymerase chain reaction assay results in calves experimentally infected with bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 68(1):72-75.
31. Nagy, DW. 2003. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 222(7):983-985.
32. Nuñez OL, Bouda J. 2007. Patología Clínica Veterinaria. FMVZ. UNAM.
33. OIE 2004. *Manual de la OIE sobre animales terrestres*. Capítulo 2.3.4. – Leucosis bovina enzoótica.
http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.04_Leucosis_bovina.pdf
34. Pawling BR. Revisión bibliográfica, de la red y recopilación de imágenes en video de la enfermedad “Leucosis Enzoótica Bovina”. Tesis de Licenciatura. 2002 UNAM, FESC.

35. Poon H, Jiménez E, Jacobs RM, Song Z, Jefferson B. Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993 41:101-112.
36. Promega™. 2006. Improm-II Reverse Transcriptase. Promega Corporation. WI USA.
37. Radostits, OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. *Medicina Veterinaria. Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol. I. 9ª ed.* Ed. McGraw Hill.
38. Rebhun WC. 1999. *Enfermedades del ganado vacuno lechero. 1ª edición.* Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp 626-635.
39. Ricaño I, Antaramian A, González A, Ahumada M. 2007. *Manual del Curso Teórico-Práctico de RT-PCR y PCR en Tiempo Real.* Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM Octubre del 2007.
40. Rodríguez VR. 2008. *Efecto del virus de artritis encefalitis caprina (AEC) sobre células epiteliales del prepucio caprino in Vitro.* Tesis de Maestría. UNAM FESC.
41. Ross, RF. 2003. *Producción Pecuaria en Confinamiento y la Salud de los Animales, el Consumidor y el Ambiente. Resúmenes del Simposio Internacional “Fronteras de la Medicina Veterinaria”.* FMVZ. UNAM. Impartido en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del 14 al 16 de Agosto de 2003; pp 44–59.
42. SAGARPA Centro de Estadística Agropecuario (CEA). 1990-2000. *Situación Actual y Perspectiva de la Producción de Leche de Ganado Bovino.* <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitelech99.pdf>
43. Trono GK, Pérez-Filgueira DM, Duffy S, Borca VM, Carrillo C. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different methods. *Vet Microbiol* 83:235-248.
44. Van Der Maaten MJ, Miller JM. 1990. Bovine leukosis virus. In *Infectious Diseases of Ruminants*, edited by Z Dinter, B Morein. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers; pp. 419-429.
45. Van Regenmortel V, Fauquet CM, Carstens E, Estes M, Pringle C, Wickner R. 2000. *Virus taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses.* Academic Press, E.U.A pp 369-380.

46. Villamar ÁL, Olivera CE. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación General de Ganadería SAGARPA. México.

<http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/pecuarios/lechebovino/situacion/descripcion.pdf>

47. VMRD 2009. BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIBODY TEST KIT Assay instructions for catalog numbers.

48. Yeon Choi K, Don Monke, Stott JL. 2002. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. J Vet Diagn Invest 2002 14:403–406.