

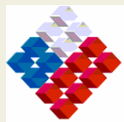


UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

# Utilización de la prueba ELISA y PCR anidado para la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de sangre y leche



Marcela Elisa Recabal Torres  
2005



GOBIERNO DE CHILE  
Instituto de Investigaciones  
Agropecuarias



GOBIERNO DE CHILE  
Fundación para la Innovación  
Agraria

# INTRODUCCION

## Reseña Histórica :

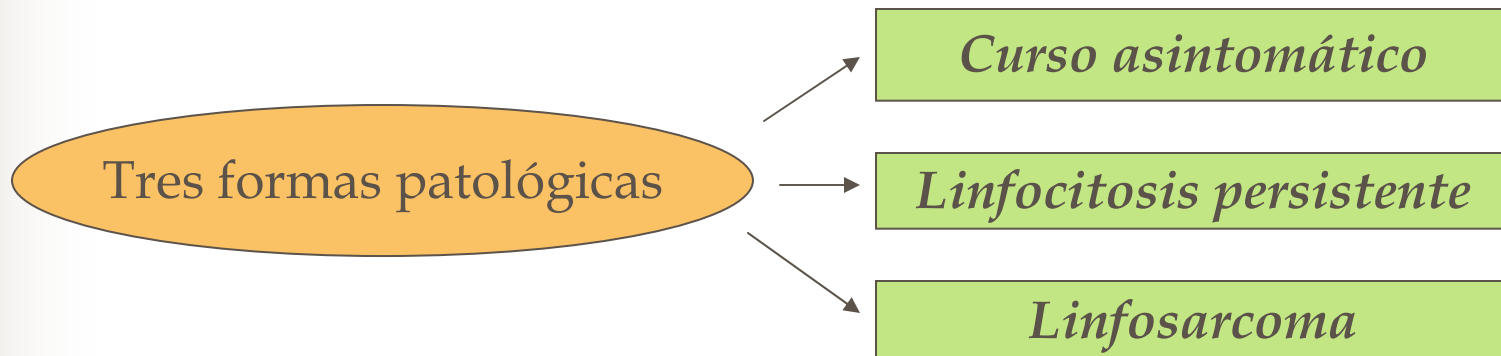
- ✓ Descrita por 1ª vez en Alemania (1871).
- ✓ Chile: 1ª referencia bibliográfica descrita por Schultz (1962), en provincias de Talca y Bio-Bio.

***“ INTRODUCCIÓN DE ANIMALES  
EUROPEOS INFECTADOS A PAISES LIBRES  
DE LA ENFERMEDAD”***



## *Leucosis enzoótica bovina :*

- ✓ **Animales mayores a 2 años de edad**
- ✓ **Prevalencia:** *varía de un país a otro*
- ✓ **Chile:**
  - *I- III Región 5.5%*
  - *IV – X Región 19.7%*
  - *XI- XII Región son negativas (SAG, 1994)*
- ✓ **Transmisión:** *horizontal, congénita, insectos*



## El virus de la leucosis bovina (VLB) :

✓ Virus ARN

**FAMILIA:** *Retroviridae*

**SUBFAMILIA:** *Oncornavirinae*

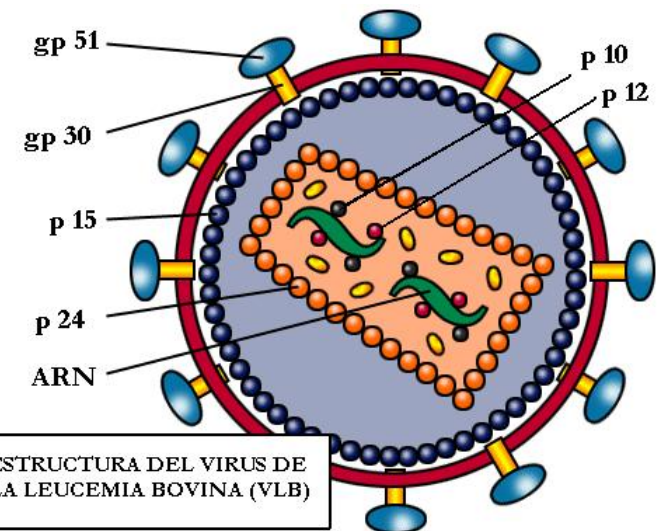
**GENERO:** *Deltaretrovirus*

✓ Regiones genómicas:

- **GAG:** proteínas estructuras internas
- **POL:** transcriptasa reversa, proteasa
- **ENV:** proteínas de la envoltura

### 3 SUBTIPOS:

- *Belga (Rice y col., 1984)*
- *Japonesa (Sagata y col., 1985)*
- *Australiana (Coulston y col., 1990)*

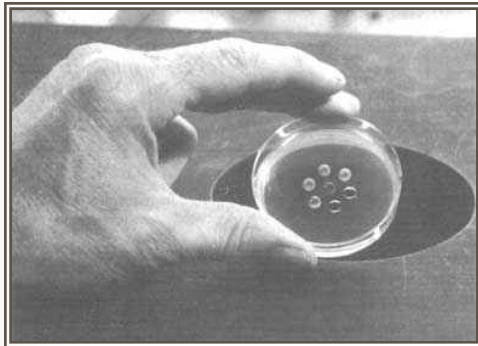




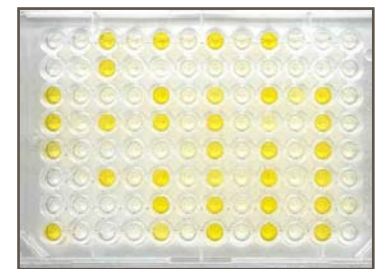
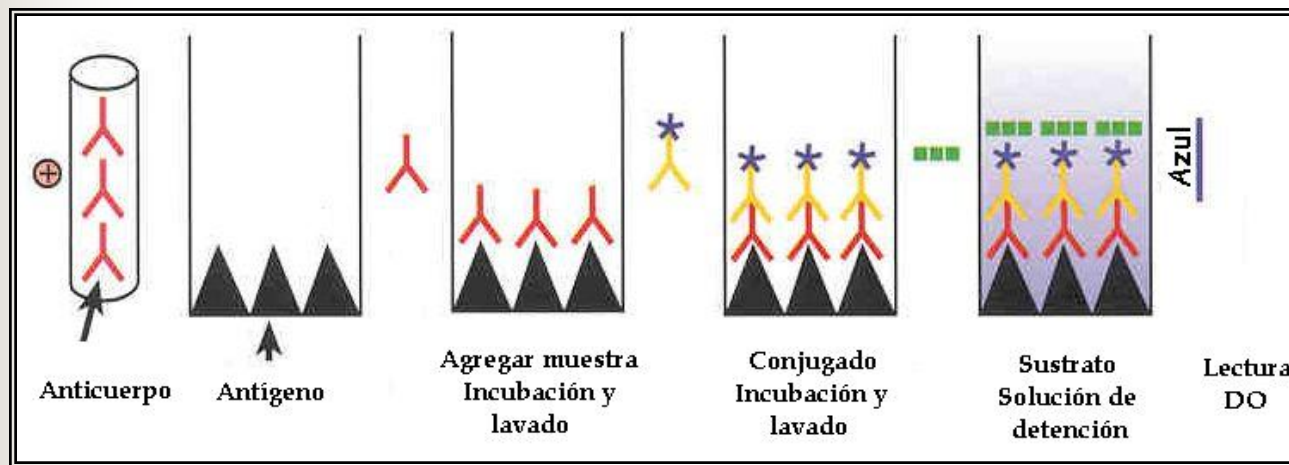
## **Métodos Diagnósticos:**

- ✓ **Diversos métodos directos e indirectos han sido empleados para la detección del VLB, tales como:** Seroneutralización (SN), Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión en gel de agarosa (AGID), Enzimoinmunoensayo (ELISA), Reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (*Kettman y col, 1981; Ballagi-Pordány y col, 1992; Brener y col, 1994; Klintevall, 1995*).
- ✓ **La prueba AGID ha sido reconocida por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y aceptada por la mayoría de los Gobiernos como prueba oficial para el diagnóstico de VLB** (*OIE, 2000*).

## Métodos indirectos :



- AGID es un método que se basa en la detección de anticuerpos contra proteínas de la estructura viral.



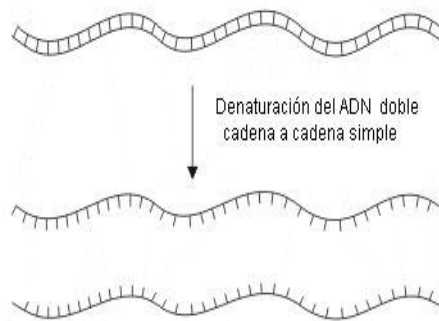
- ELISA es una técnica inmunoenzimática que basa en la utilización de un antígeno y ha sido desarrollado para la detección y cuantificación de anticuerpos.

## Método directo :

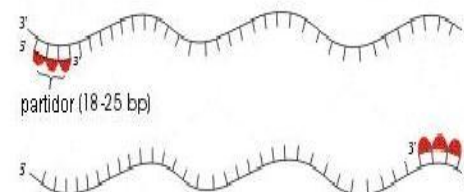
- PCR (Reacción de la polimerasa en cadena) es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas a partir de una muestra de ADN.



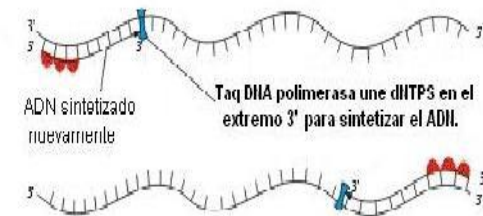
### Denaturación (95°C):



### Alineamiento (54- 63°C):



### Extensión (72°C):



**PCR anidado**



# OBJETIVOS

## ■ OBJETIVO GENERAL

Comparar los resultados obtenidos mediante tres técnicas (AGID, ELISA, PCR) en el diagnóstico del VLB en un rebaño lechero de la IX Región con presencia de la enfermedad.



## ■ **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Establecer el nivel de concordancia de distintas pruebas de diagnóstico de VLB con respecto a la prueba oficial de diagnóstico (AGID) .
2. Determinar los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba ELISA indirecto en muestras de suero y leche y compararlos con la prueba AGID.
3. Determinar los valores de sensibilidad y especificidad del método PCR anidado en muestras de sangre y leche y compararlos con AGID.
4. Tipificar mediante PCR-RFLP cepas de VLB provenientes del rebaño en estudio.

# MATERIALES Y MÉTODOS

Laboratorio de Biotecnología Animal  
Centro de Investigación INIA-Carillanca

## MATERIALES

- Muestras biológicas: *suero, sangre y leche*
- Materiales de laboratorio:
  - *Material rutinario*
  - *Equipos*

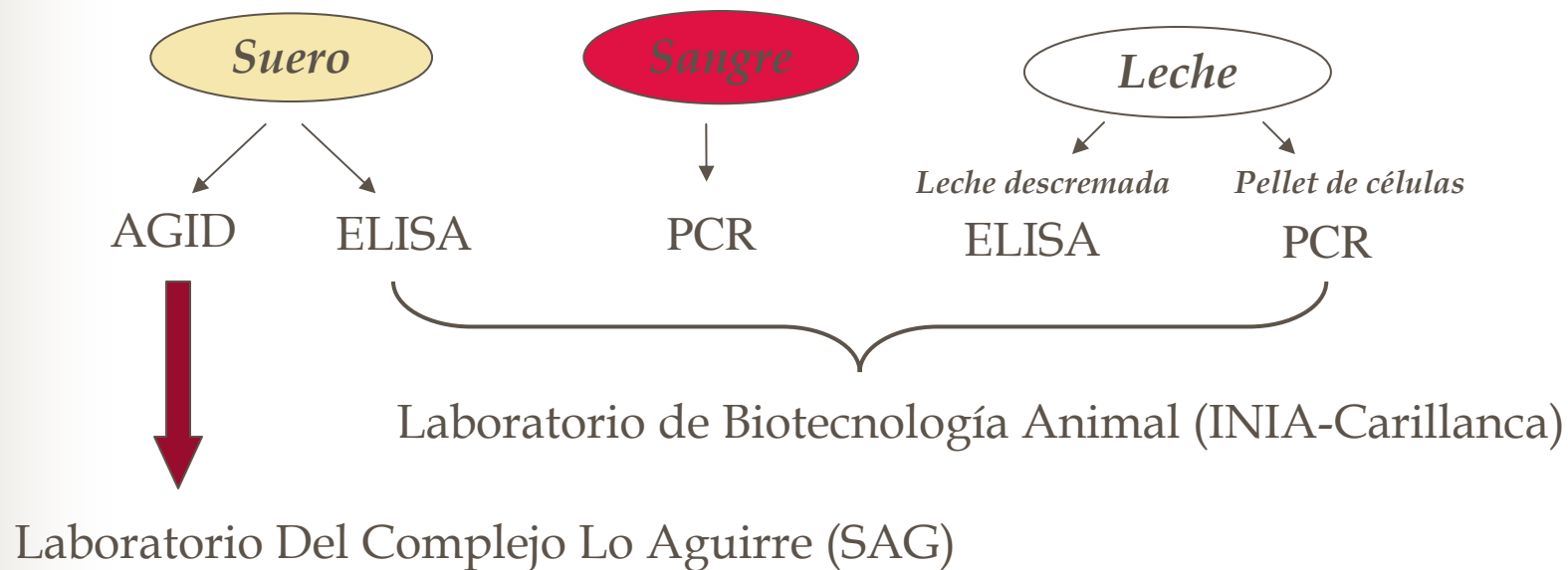
EQUIPOS	
<i>PCR y Análisis Molecular</i>	<i>ELISA</i>
1. Termociclador	1. Sistema de lavado de placas
2. Cámara de electroforesis	2. Espectrofotómetro
3. Fuente de Poder	3. Sistema computacional
4. Equipo de digitalización fotográfica <ul style="list-style-type: none"><li>a. Transiluminador</li><li>b. Cámara digital</li><li>c. Computador</li></ul>	

→ *Reactivos y Soluciones*

<b>REACTIVOS Y SOLUCIONES</b>		
<b><i>PCR anidado</i></b>	<b><i>ELISA indirecto</i></b>	<b><i>Digestión con Ez de Restricción</i></b>
• Extracción de ADN	Placas recubiertas Ag BLV-gp51	Tampón de restricción 10x
• Reacción PCR	Antígeno control + y -	Enzimas de restricción:
- Tampón 10X	Conjugado liof.con IgG bovina	<b><i>Bam H I, Pvu II, Bcl I</i></b>
- MgCl <sub>2</sub>	Tampón de dilución	Agua destilada
- dNTP	Solución sustrato	
- Taq ADN polimerasa	Solución de detención	
- Partidores externos e internos: FE 5'- TCT GTG CCA AGT CTC CCA GAT A-3' RE 5'- AAC AAC AAC CTC TGG GGA GGG T-3' FI 5'- CCC ACA AGG GCG GCG CCG GTT T-3' RI 5'- GCG AGG CCG GGT CCA GAG CTG G-3'		
• Electroforesis		

## METODOLOGIA

- Obtención de muestras biológicas:



# Metodología para diagnóstico de VLB mediante PCR



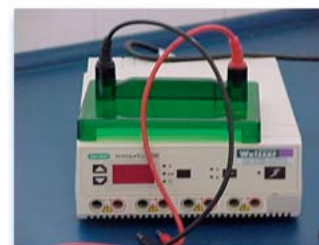
*Muestreo de animales*



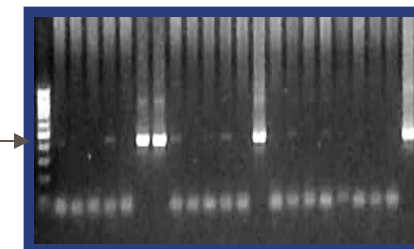
*Extracción de ADN*



*Reaccion PCR*

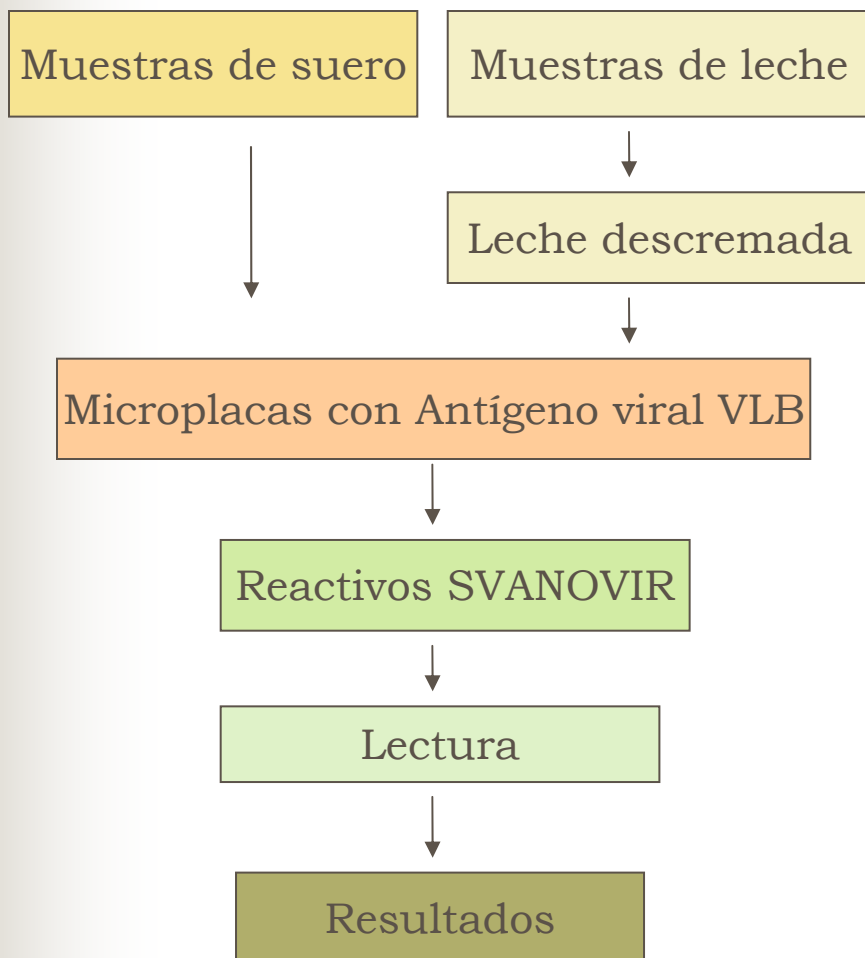


*Electroforesis*



*Diagnóstico VLB*

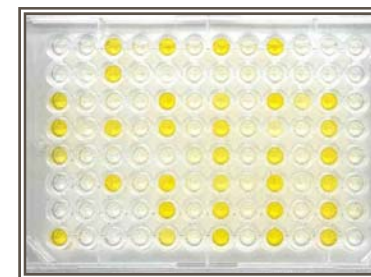
# Metodología para diagnóstico de VLB mediante ELISA



*Muestreo de animales*



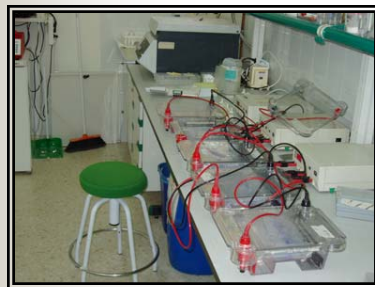
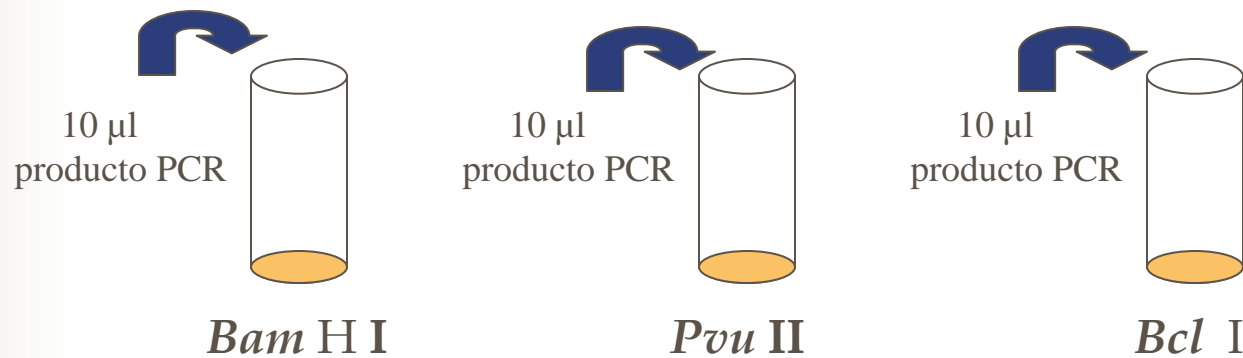
*Equipo de ELISA*



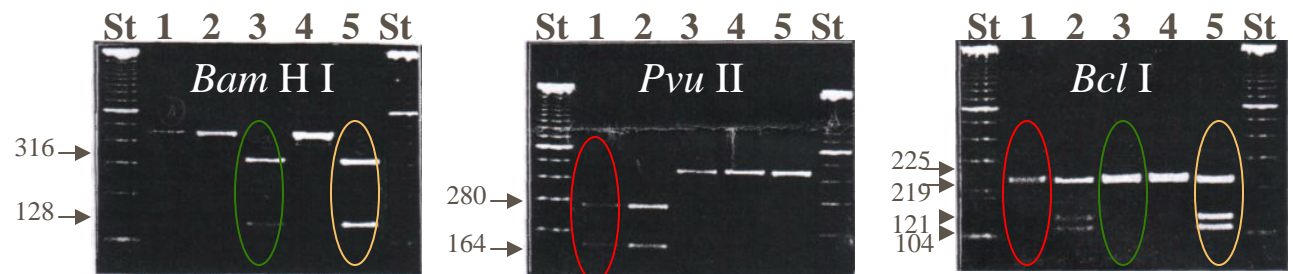
*Lectura de placa*

## Análisis PCR-RFLP

- 9 muestras positivas al VLB → PCR

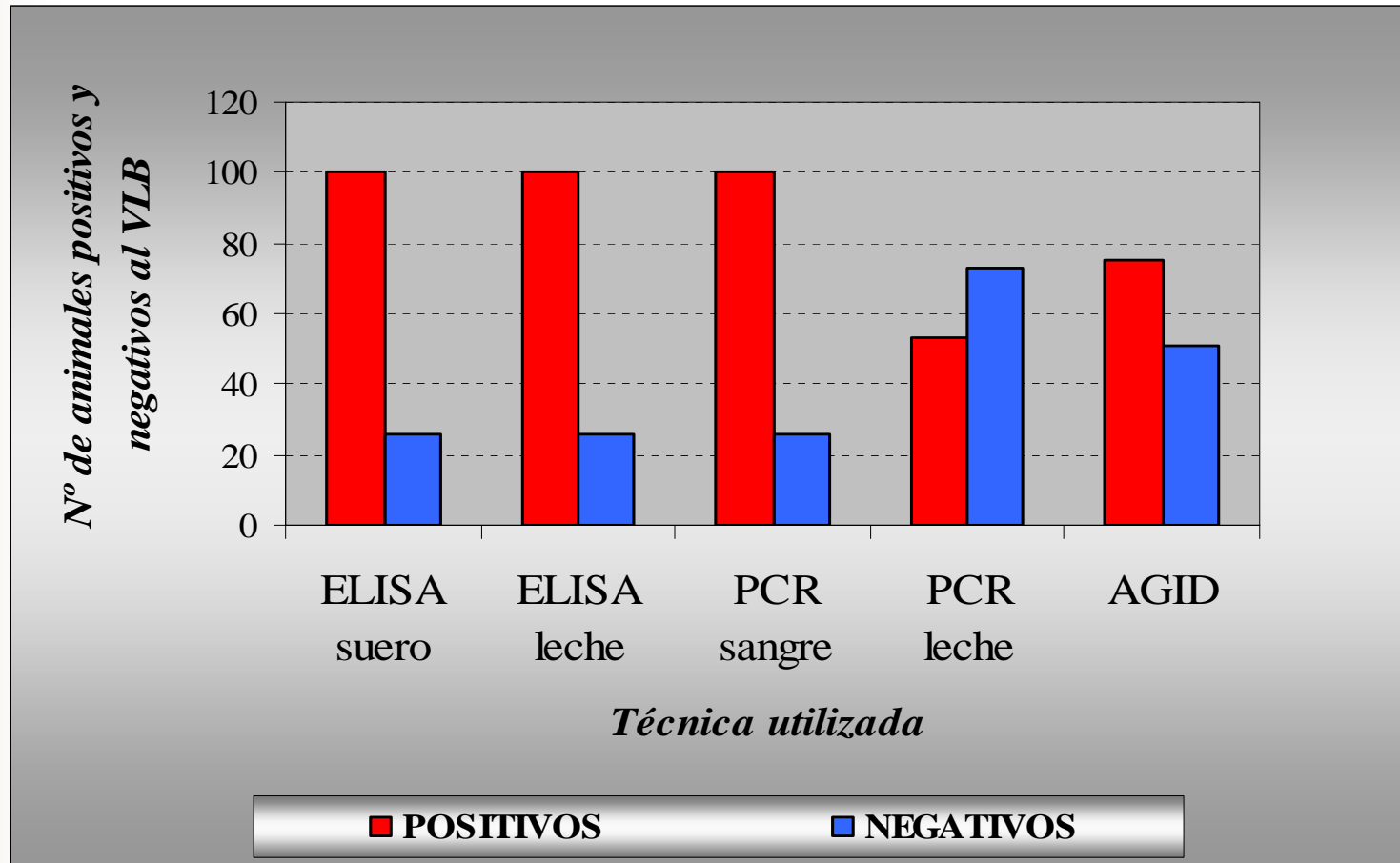


ELECTROFORESIS



**BELGA:** *Bam* H I - / *Pvu* II + / *Bcl* I +  
**JAPONES:** *Bam* H I + / *Pvu* II - / *Bcl* I +  
**AUSTRALIANO:** *Bam* H I + / *Pvu* II - / *Bcl* I +

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Número de animales positivos y negativos identificados con cada una de las pruebas ELISA suero, ELISA leche, PCR en sangre, PCR en leche y AGID.

PRUEBA ALTERNATIVA <b>ELISA</b> suero/leche	PRUEBA DE REFERENCIA <b>AGID</b>			Total
		+	-	
+	75	25	100	
-	0	26	26	
Total	75	51	126	

*Martin y col., 2001. Comparative study of PCR as direct assay and ELISA And AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus*

- Todos los animales positivos a AGID fueron positivos a ELISA (suero y leche).
- 25 animales positivos a ELISA resultaron negativos a AGID.

<i>PRUEBA ALTERNATIVA PCR sangre</i>	<i>PRUEBA DE REFERENCIA AGID</i>			<b>Total</b>
		<b>+</b>	<b>-</b>	
<b>+</b>	72	28	<b>100</b>	
<b>-</b>	3	23	<b>26</b>	
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>51</b>	<b>126</b>	

- Tres animales positivos a AGID fueron negativos a PCR en leucocitos de sangre.
- 28 de las 100 muestras positivas a PCR en sangre fueron negativas a AGID.

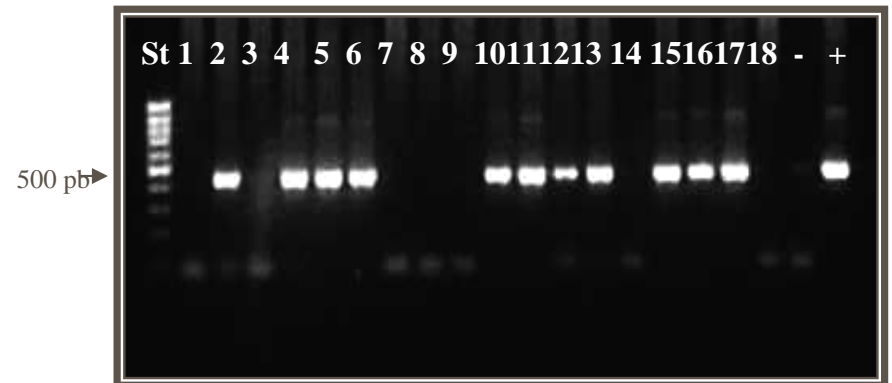
## Resultados Discordantes

(Jacobs y col, 1992; Martin y col, 2001; Rulka y col, 2001; Radotistis y col., 2002)

**3 Muestras**

**Pruebas serológicas (-) y PCR (+) :**

- Estadio temprano de infección
- Pequeño inóculo de VLB
- Período de latencia
- Coinfecciones con otros virus
- Inmunotolerante





## *Resultados Discordantes*

*(Klintevall, 1994; Fechner y col., 1997; Rułka y col., 2001)*

*3 Muestras  
Pruebas serológicas (+) y PCR (-):*

- Baja proporción de linfocitos infectados con VLB.
- VLB se encuentre presente en otras células que no sean las sanguíneas.
- Linfocitos B infectados pudieran encontrarse en otros órganos.
- Existencia de variaciones en la secuencia nucleotídica del VLB.

## *Análisis de Muestras de leche mediante la técnica PCR*

<i>PRUEBA ALTERNATIVA PCR leche</i>	<i>PRUEBA DE REFERENCIA AGID</i>		
		<b>+</b>	<b>-</b>
<b>+</b>	44	5	<b>49</b>
<b>-</b>	31	46	<b>77</b>
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>51</b>	<b>126</b>

- Martin y col. (2001) y Kuckleburg y col. (2003), quienes demostraron que los leucocitos sanguíneos fueron consistentemente más adecuados que los leucocitos de leche mediante la técnica PCR.
- Menor proporción de linfocitos B en leche que en sangre.
- Células somáticas y subpoblaciones de linfocitos varían durante lactancia.

## Análisis comparativo de la técnica ELISA realizada en muestras de suero y leche

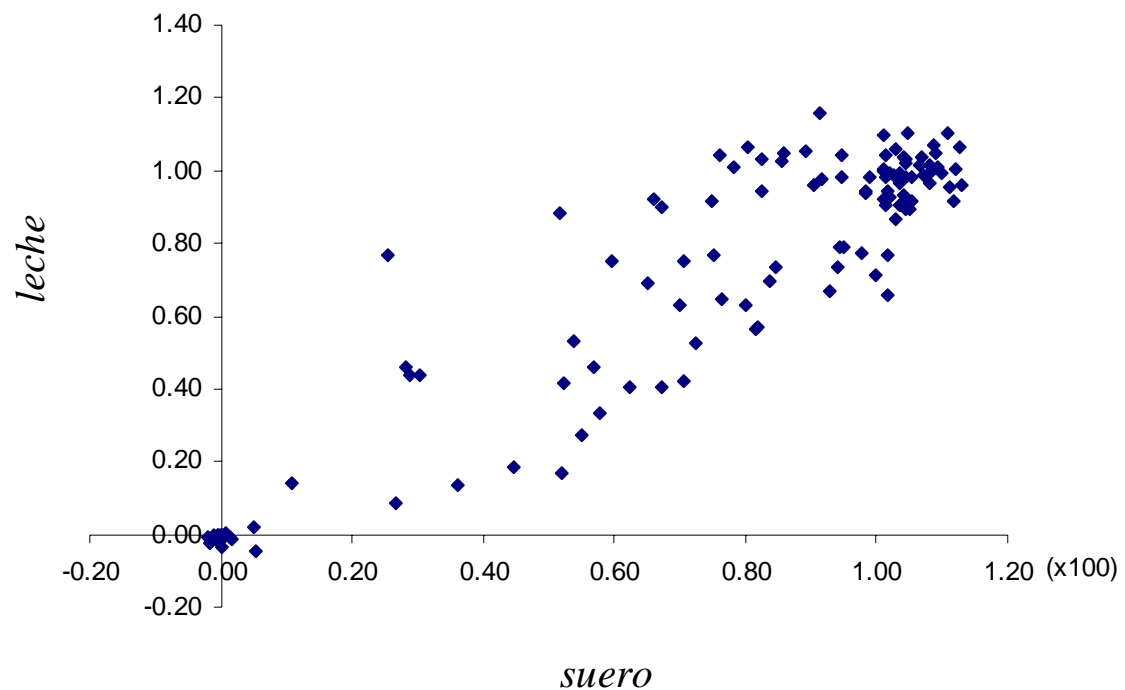


Gráfico de dispersión de valores de positividad (x100) obtenidos luego del análisis ELISA de muestras pareadas de suero y leche.

## *Sensibilidad y especificidad de ELISA y PCR con respecto a AGID*

PRUEBA REFERENCIA	PRUEBA ALTERNATIVA	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %
<b>AGID</b>	ELISA suero	<b>100</b>	51
	ELISA leche	<b>100</b>	51
	PCR sangre	<b>96</b>	45
	PCR leche	58	90

- La sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA en suero y leche fue de 100 y 51%, respectivamente.
- La sensibilidad y especificidad de PCR en muestras sangre alcanzó valores de 96 y 45%, respectivamente.

## PCR en sangre como método de referencia

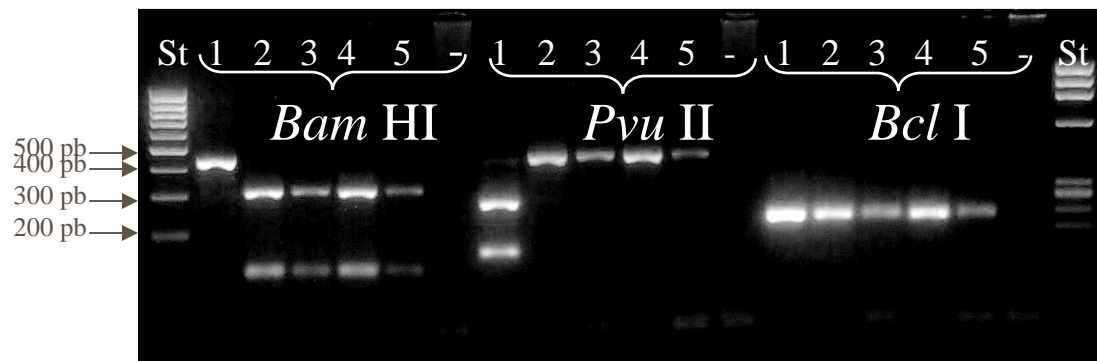
*Calculo de sensibilidad, especificidad y concordancia (valor kappa)*

PRUEBA DE REFERENCIA	PRUEBA ALTERNATIVA	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	VALOR k %	INTERPRETACION LANDIS (1977)
PCR sangre	ELISA suero	97	88	<b>85</b>	<b>Perfecta</b>
	ELISA leche	97	88	<b>85</b>	<b>Perfecta</b>
	AGID	72	88	45	Moderada
	PCR leche	51	92	26	Regular

Valores de sensibilidad, especificidad y valor *kappa* (k) calculados con un nivel de confianza del 95%

## Análisis molecular de las cepas del rebaño estudiado

- De las 9 muestras se determinó la presencia de 2 de las 3 cepas existentes en el mundo.
- 6 Subtipo Belga
- 3 Subtipo Australiana
- No se encontró un patrón de restricción correspondiente al subtipo Japonés.





## CONCLUSIONES

- La técnica ELISA (leche y suero) y PCR en sangre detectaron un mayor porcentaje de individuos positivos. Esto confirma que estas técnicas permiten detectar un mayor número de animales infectados por el VLB que AGID.
- La sensibilidad de ELISA (leche y suero) y PCR en sangre con respecto a AGID fue de 100% y 96% respectivamente, lo cual debería hacer reconsiderar la utilización de AGID como prueba de referencia oficial en Chile.
- Se determinó mediante PCR-RFLP, la presencia de 2 de las 3 cepas existentes en el rebaño analizado, lo cual indica que en algún momento fueron introducidos a este rebaño animales con una cepa diferente a la ya existente.



**Muuuchas  
Gracias !!!**



## AGRADECIMIENTOS

- *FIA (Fondo de Innovación Agraria)*
- *INIA Carillanca*
- *Ricardo Felmer*
- *Javier Zuñiga*
- *Horacio Floody*
- *Braulio Soto*
- *Universidad Católica de Temuco*