

COMUNICACION PRELIMINAR

DETECCION DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA

Gustavo Montes O. (MV, MS), Gladys Villouta C. (MV), Patricio Berríos E.
(MV, MS, Ph.D.), María O. Celedón V. (MV), Mario Cornejo O.

DETECTION OF THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Bovine leukemia virus (BLV) was detected in cattle by the syncytia infectivity assay (SIA), using blood lymphocytes and fetal lamb kidney (FLK) cells as indicator system. The cells with 4 or more nucleus were counted as syncytial cells. The syncytia inducing activity of BLV was inhibited by BLV precipitating antibody positive sera, but it was not inhibited by BLV negative serum. The presence of BLV antigens in the syncytia was determined by indirect immunofluorescent test, using BLV – reference serum obtained from two cows with BLV – precipitating antibody and comercial serum. The results indicate that the syncytias observed using FLK are specific for BLV.

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa en cuya etiología participa el virus de la leucosis bovina (VLB), un retrovirus oncogénico tipo ARN, exógeno para la especie (Ferrer, 1980) que infecta a los linfocitos B y se encuentra relacionado con los virus HTLV 1 y II humanos (Oroszlan y Cols., 1982).

En Chile, los primeros antecedentes clínicos de la LEB datan de la década de los sesenta (Schulz y Cols., 1962); posteriormente, se realizaron estudios orientados a diagnosticar la infección con el VLB empleando claves hematológicas (Cripe y Cols., 1971; Rudolph y Cols., 1972) o bien estudios serológicos por inmunodifusión (Villouta y Cols., 1984b) con reactivos comerciales extranjeros; sin embargo, a la fecha no ha sido demostrada la presencia del virus.

La validez de un método de diagnóstico serológico se establece demostrando que una reacción positiva equivale a la presencia del VLB en el animal (Burny y Cols., 1978). En este sentido son varias las técnicas que se han desarrollado con el objeto de detectar directamente el VLB (Ferrer y Diglio, 1976; Bouillant y Cols., 1981; Esteban y Cols., 1985). De éstas, la inducción de sincicios ha

resultado ser un sistema más sensible que la microscopía electrónica, y permite detectar al VLB en fluidos y linfocitos (Ferrer y Cols., 1977).

Los cultivos celulares donde el VLB es capaz de inducir policariocitosis (sincicios) son de variado origen (Itóhara y Takatori, 1982). Las células transformadas (Van der Maaten y Miller, 1980) que se utilizan en la actualidad en algunos países no son de fácil obtención, por lo que cada nación debe tender a adaptar el tipo de metodologías requeridas, de acuerdo a su realidad. En base a lo anterior es que en este trabajo se planteó confirmar la presencia del VLB en animales serológicamente positivos a la infección, a través de la prueba de inducción de sincicios en cultivos primarios de riñón fetal ovino (RFO).

Para ello, se obtuvo linfocitos sanguíneos de dos bovinos Holstein-Friesian positivos y dos negativos a la infección con el VLB, diagnosticada por inmunodifusión (ID)¹. Estos animales pertenecían a un predio de la Región Metropolitana donde por más de 10 años se ha estudiado la infección con el VLB. Las vacas eran negativas a la infección con los virus rinotraqueítis infecciosa bovina y parainfluenza-3, de acuerdo a las técnicas diagnósticas descritas por Berríos y Cols. (1985a,b).

Los linfocitos de estos animales se obtuvieron y aislaron de acuerdo a lo descrito por Villouta y Cols. (1984a). Estos se inocularon y cocultivaron con monoestratos celulares de RFO entre el segundo y cuarto pasaje, según la metodología descrita por Van der Maaten y Cols. (1974); Diglio

Departamento de Patología Animal y Medicina Preventiva Animal.

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15.

Santiago, Chile.

Trabajo financiado por Proyecto A-2424-8722, DTI. Universidad de Chile. Parte de este trabajo corresponde a la tesis de grado para optar al título de Médico Veterinario.

¹ IFFA-MERIEUX, Lyon, Francia.

y Ferrer (1976) e Itohara y Takatori (1982). Las pruebas se realizaron en duplicado en tubos Leighton, con cubreobjetos (22 x 10,5 mm), los cuales al cabo del 7^o día de cultivo fueron retirados, secados y fijados con metanol para ser teñidos con Giemsa, según lo detallado por Ferrer y Cols. (1977).

La presencia del VLB en los linfocitos se evidenció por la capacidad del virus de inducir sincicios en los cultivos de RFO inoculados con linfocitos de las vacas positivas a la infección (Figura 1, b-c). Se consideró como sincicio toda célula que presentara cuatro o más núcleos. Se observó, además, que la capacidad de inducir sincicios estaba relacionada con la concentración de linfocitos inoculados y con el pasaje del cultivo inoculado. No se observó sincicio en los cultivos de RFO inoculados con linfocitos de las vacas negativas a la infección con el VLB.

La especificidad de la inducción de sincicios por el VLB se estableció por la prueba de inhibición de sincicios (Ferrer y Cols., 1977), en la cual los linfocitos infectados con el VLB fueron incubados con sueros anti VLB obtenidos de las vacas infectadas y suero positivo de referencia de reactivos comerciales¹, los cuales fueron filtrados e inactivados (56°C), previo a su inoculación al monoestrato. Los sueros de las vacas negativas no inhibieron la capacidad de inducir sincicios de los linfocitos de las vacas infectadas.

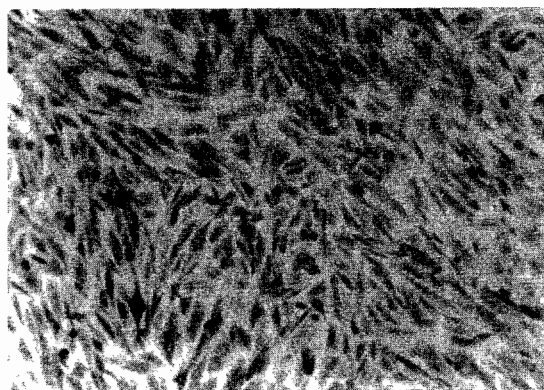
Se realizó además la prueba de inmunofluorescencia indirecta, utilizando cubreobjetos de cultivos inoculados con linfocitos infectados o no con el VLB. Estos cubreobjetos se fijaron con acetona y se incubaron con sueros positivos y negativos, y un conjugado anti IgG bovino unido a fluoresceína² (Ferrer y Cols., 1975). Se visualizó fluorescencia sólo en los cultivos inoculados con linfocitos de la vaca que poseían sincicios y que se habían incubado con sueros de las vacas infectadas o con suero positivo de referencia¹.

En base a los resultados obtenidos se demuestra la presencia del VLB en el país, encontrándose en etapa de desarrollo la estandarización de la técnica de inducción de sincicios.

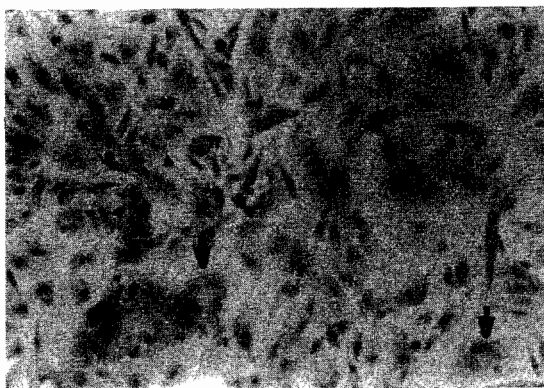
AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Srta. Paula Segovia C. la valiosa colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo.

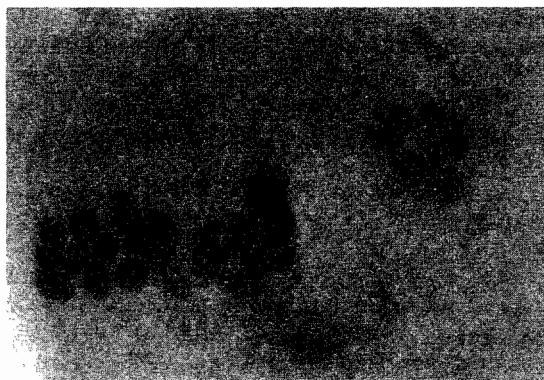
² Sigma Chemical Co. Ltd. St. Louis, USA.



a)



b)



c)

Figura 1

- a) Cultivo de RFO inoculado con linfocitos de vaca, LEB (-). x 40.
- b) Sincicios típicos inducidos por linfocitos de vaca, LEB (+). x 40.
- c) Dos sincicios con un número de núcleos diferentes, cultivo inoculado con linfocitos de vaca LEB (+). x 400.

REFERENCIAS

- BERRIOS, P.; M. CELEDON, F. CORTES, M. LUENGO. Aislamiento del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina en un brote de abortos en la zona sur, Chile. Arch. Med. Vet. 17: 49-52, 1985a.
- BERRIOS, P.; M. CELEDON, M. DUCHENS, L. LORCA. Aislamiento del virus parainfluenza-3 de bovinos con sintomatología respiratoria. Monogr. Med. Vet. 61: 61-62, 1985b.
- BOUILLANT, A.; G. RUCKERBAUER, M. EAGLESOME, B. SAMAGH, E. SINGH, W. HARE, G. RAJOALL. Attempts to isolate bovine leukemia and bovine syncytial viruses from blood, uterine flush fluid, unfertilized ova and embryos from infected donor cattle. Ann. Rech. Vét. 12: 385-395, 1981.
- BURNY, A.; F. BEX, H. CHANTRENNE, Y. CLEUTER, D. DEKEGEL, J. GHYSDAEF, R. KETTMENN, M. LECIERCQ, J. LEUNEN, M. MAMMERICK, D. PORTETELLE. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. Adv. Cancer Res. 28: 251-259, 1978.
- CRIFE, W.; W. RUDOLPH, D. HIRD, K. RUSCH, T. LETONJA, A. SOFFIA. Estudio hematológico de la leucosis enzoótica bovina (leucemia linfática) en lecherías de la provincia de Santiago. Arch. Med. Vet. 3: 40-46, 1971.
- DIGLIO, C.; J. FERRER. Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus. Cancer Res. 36: 1056-1067, 1976.
- ESTEBAN, E.; R. THORN, J. FERRER. An amplified immuno-peroxidase assay to detect bovine leukemia virus expression: Development and comparison with other assays. Cancer Res. 45: 3231-3235, 1985.
- FERRER, J.; D. BHATT, D. ABT, R. MARSHAM, V. BALIGA. Serological diagnosis of infection with the putative bovine leukemia virus. Cornell Vet. 65: 527-542, 1975.
- FERRER, J.; C. DIGLIO. Development of an *in vitro* infectivity assay for the C-type bovine leukemia virus. Cancer Res. 36: 1068-1073, 1976.
- FERRER, J.; C. PIPER, V. BALIGA. Diagnosis of BLV infection in cattle of various ages. In: Bovine Leukosis: Various methods of molecular virology. Burny Ed. N.Y. 323-336, 1977.
- FERRER, J. Bovine lymphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24: 1-68, 1980.
- ITOHARA, S.; I. TAKATORI. Syncytia infectivity assay of bovine leukemia virus. Nat. Inst. Anim. Health Q. 22: 147-153, 1982.
- OROSZLAN, S.; M. SARNGADHARAN, T. COPELAND, V. KALYANARAMAN, R. GILDEN, R. GALLO. Primary structure analysis of the major internal protein P₂₄ of human type C-cell leukemia virus. Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 1201-1295, 1982.
- RUDOLPH, W.; W. CRIFE, D. HIRD, K. RUSCH, A. SOFFIA, G. VILLOUTA. Bovine leukosis: A comparative study of three haematological diagnostic keys in Chilean cattle. Br. Vet. J. 128: 506-511, 1972.
- SCHULZ, L.; R. OJEDA, R. GRUEBLER. La leucosis de los bovinos y su importancia en el país. Rev. Soc. Med. Vet. Chile. 12: 17-19, 1962.
- VAN DER MAATEN, M.; J. MILLER, A. BOOTHE. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with y lymphosarcoma. J. Nat. Cancer Inst. 52: 491-503, 1974.
- VAN DER MAATEN, M.J.; J. MILLER. Use of a continuous feline cell line for virologic and serologic investigations of bovine leukemia virus infections. Am. J. Vet. Res. 41: 1785-1788, 1980.
- VILLOUTA, G.; M.A. JARA, J. CORREA, M. LAGUNAS. Poblaciones linfocitarias en sangre periférica de bovinos normales y con leucosis linfática enzoótica. Zbl. Vet. Med. (B) 31: 241-247, 1984a.
- VILLOUTA, G.; W. RUDOLPH, J. CORREA, T. GONZALEZ, M. RODRIGUEZ, H. CONTRERAS. Diagnóstico de la infección a virus leucemia bovina por dos pruebas comerciales de inmunodifusión y su relación con linfocitosis persistente. Cienc. Invest. Agrar. 11: 223, 1984b).

Recibido en noviembre de 1987, aprobado en marzo de 1988.