

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina

Diagnostic tests to bovine leukemia virus

Marcelo Fernandes Camargos,* Antônio Claret de Oliveira Júnior,** Juliano Cezar Minardi da Cruz,**
Leandro Moreira Lessa,** Maurílio Andrade Rocha,** Daniel Stancek,** Aiesca Oliveira Pellegrin,**
Jenner Karlisson Pimenta Reis,**** Rômulo Cerqueira Leite**

Resumo

A reação em cadeia da polimerase (PCR), uma nested-PCR (nPCR) um teste imunoenzimático (ELISA) e a imunodifusão em gel de agar (IDGA) foram utilizados para identificar bovinos Pantaneiros naturalmente infectados pelo vírus da leucemia bovina (BLV), e os resultados dos quatro testes comparados. A concordância entre os testes foi de 86,2%, 70,0% e 62,5%, respectivamente para ELISA/IDGA, IDGA/PCR e ELISA/PCR. A nPCR amplificou DNA proviral de 12 amostras negativas à PCR e de quatro bovinos com resultados negativos em testes sorológicos; entretanto, não amplificou o DNA proviral de quatro amostras de bovinos soropositivos.

Palavras-chave: Vírus da leucemia bovina, PCR, nPCR, IDGA, ELISA.

Abstract

A polymerase chain reaction (PCR), a nested-PCR (nPCR), an immunoassay test (ELISA) and agar gel immunodiffusion (AGID) were used to identify Pantaneiro cattle naturally infected by bovine leukemia virus (BLV) and the results were compared. The concordance between tests were 86.2%, 70.0% and 62.5% for ELISA and AGID, AGID and PCR, ELISA and PCR, respectively. Nested-PCR amplified proviral DNA from 12 samples negative by PCR and from four bovines with negative results in serologic tests, while could not amplify proviral DNA from four samples from serum positive bovines.

Keywords: Bovine leukemia virus, PCR, nPCR, AGID, ELISA.

O vírus da leucemia bovina (BLV) é o agente etiológico da leucose enzootica bovina (LEB), uma enfermidade que ocorre primariamente em bovinos e apresenta distribuição mundial, causando diminuição na eficiência produtiva e reprodutiva e morte de animais, devido ao desenvolvimento de linfossarcomas (Da et al., 1993, D'Angelino et al., 1998). Este trabalho teve como objetivo detectar bovinos Pantaneiros infectados com o BLV utilizando a IDGA, ELISA, PCR e nPCR e comparar os resultados encontrados. Foram coletadas amostras de sangue em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), de bovinos do ecótipo Pantaneiro que não apresentavam sinais clínicos da LEB, originados da sub-região da Nhecolândia, pantanal sul-mato-grossense. Cento e nove amostras tiveram seus resultados comparados pelas técnicas de IDGA e ELISA, 40 pela IDGA e PCR, 24 pelo ELISA e PCR e 27 amostras foram testadas pela nPCR. A detecção de anticorpos para o BLV foi realizada pelas técnicas de IDGA (Miller e Van der Maaten 1977) e ELISA (VMRD, EUA). Células mononucleares do sangue circulante (PBMC) foram obtidas

utilizando-se o Ficoll-Hypaque (GIBCO-BRL). O GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) foi utilizado na extração de DNA. Os primers utilizados na PCR (BLV1 5128-gggccatggtcacatatgattg e BLV2 5627-cgttgcccttgagaaacattgaac) e na nPCR (IF 5258-cctgcatctcaacaatgtca e IR 5502-gctggagatggtttgtatatac), amplificam uma região conservada do gene *env* do BLV que codifica para a glicoproteína gp51. Os números acima correspondem aos descritos no trabalho de Sagata et al. (1985). Das 109 amostras de soro utilizadas na IDGA e ELISA, 15 apresentaram resultados discordantes, sendo negativas à IDGA e positivas ao ELISA, o que pode ser devido à maior sensibilidade do ELISA (Simard et al. 2000). A PCR não amplificou DNA proviral em amostras de 12 bovinos soropositivos, o que pode ter sido causado por flutuações no número de linfócitos infectados e/ou cópias do provírus (Reichel et al., 1998; Gutierrez et al., 2001; Rola e Kuzmak, 2002), localização dos linfócitos infectados (Klintevall et al. 1994) e variação no provírus (Marsolais et al., 1994; Fechner et al., 1997). A

* Laboratório Regional de Apoio Animal – MG. Av. Rômulo Joviano, s/n. Caixa Postal 50. Pedro Leopoldo, MG.
CEP 33600-000. mcamargo@cyberpl.com.br

** Escola de Veterinária da UFMG.

*** EMBRAPA Pantanal.

**** Colégio Técnico da UFMG.

PCR amplificou DNA proviral de três bovinos soronegativos à IDGA. A coleta de sangue de animais com infecção recente (Kuckleburg et al., 2003) ou no período de periparto (Ebertus et al., 1987) e a presença de genótipos associados à falha na resposta imune humoral (Fechner et al., 1997) podem explicar essa falha. Entretanto, Licursi et al. (2002) não observaram relação entre a resposta imune antiviral e a heterogeneidade do BLV. Apesar da pequena variação genética observada no gene *env* do BLV (Mamoun et al., 1990), inclusive em três amostras brasileiras (Camargos et al. 2002), é possível que variações no provírus causem falhas no anelamento. Para confirmar essas hipóteses seriam necessários estudos avaliando a variação genética no gene *env* dessas amostras, avaliação contínua dos animais e a colheita de células sanguíneas a partir de outras amostras, como por exemplo punção de linfonodos e baço. A nPCR amplificou DNA proviral de 12 amostras negativas à PCR e de quatro bovinos com resultados negativos em testes sorológicos.

Referências

- CAMARGOS, M. F.; STANCEK, D.; ROCHA, M. A.; LESSA, L. M.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. Partial sequencing of *env* gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B.*, v. 49, p. 325-331, 2002.
- DA, Y.; SHANKS, R. D.; STEWART, J. A. et al. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *PNAS USA*, v. 90, p. 6538-6541, 1993.
- D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *J. Dairy Res.*, v. 65, p. 693-695, 1998.
- EBERTUS, R.; STARIK, E.; WITTMANN, W. Untersuchungen über Titerbewegungen von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus im Blutserum und im Eutersekret bei Kühen und Färsen im perinatales Zeitraum. *Arch. Exper. Vet. Med.*, v. 41, p. 732-737, 1987.
- FECHNER, H.; BLANKENSTEIN, P.; LOOMAN, A. C. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, v. 237, p. 261-269, 1997.
- GUTIERREZ, S. E.; DOLCINI, G. L.; ARROYO, G. H. et al. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 1571-1577, 2001.
- KUCKLEBURG, C. J.; CHASE, C. C.; NELSON, E. A. et al. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 15, p. 72-76, 2003.
- KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; NÄSLUND, K. et al. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microb.*, v. 42, p. 191-204, 1994.
- LICURSI, M.; INOSHIMA, Y.; WU, D. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res.*, v. 86, p. 101-110, 2002.
- MAMOUN, R. Z.; MORISSON, M.; REBEYROTTE, N. et al. Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* v. 64, p. 4180-4188, 1990.
- MARSOLAIS, G.; DUBUC, R.; BERGERON, J. et al. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 6, p. 297-301, 1994.
- MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, v. 13, p. 1369-1375, 1977.
- REICHEL, M. P.; THAM, K. M.; BARNES, S. et al. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. *N. Z. Vet. J.*, v. 46, p. 140-146, 1998.
- ROLA, M.; KUZMAK, J. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol. Meth.*, v. 99, p. 33-40, 2002.
- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *PNAS USA*, v. 82, p. 677-681, 1985.
- SIMARD, C.; RICHARDSON, S.; DIXON, P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.*, v. 64, p. 101-106, 2000.