

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN UN CAMPO DE RECRÍA DE GANADO  
LECHERO EN EL SUR DEL URUGUAY**

**Por**

**Agustina ALGORTA TURINI  
Juan Pedro ALVAREZ ALBANELL  
María Laureana DE BRUN MÉNDEZ**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias. Orientación: Producción Animal y Medicina Veterinaria.

MODALIDAD: Ensayo Experimental.

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

**Tesis de grado aprobada por:**

**Presidente de mesa:**

---

Dra. Ana Meikle

**Segundo miembro:**

---

Dr. Rodrigo Puentes

**Tercer miembro**

---

Dr. José Piaggio

**Fecha:**

23/09/2014

**Autores:**

---

Agustina Algorta

---

Juan Pedro Alvarez

---

Laureana De Brun

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro tutor Dr. Rodrigo Puentes por apoyarnos en este trabajo, por confiar en nosotros, dedicarnos su tiempo, su trabajo, sus conocimientos y por ayudarnos en nuestra formación profesional.

Al campo de recría por darnos la posibilidad de realizar este trabajo y su interés en el mismo.

Al veterinario y al personal del establecimiento, por su disponibilidad y ayuda durante las prácticas de este ensayo.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PLANISA por financiar este proyecto.

Al Institut Pasteur de Montevideo, Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria y al Área de Inmunología de Facultad de Veterinaria por la infraestructura y materiales proporcionados para la realización del trabajo.

Al Dr. José Piaggio por su aporte en el análisis estadístico.

Al personal de biblioteca de facultad por su dedicación en la búsqueda de material.

A nuestras familias, amigos y compañeros de estudio que nos acompañaron durante todos estos años de esfuerzo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	2
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>LISTA DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	5
<b>1. RESUMEN</b> .....	6
<b>2. SUMMARY</b> .....	7
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
<b>4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE</b> .....	9
<b>4.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD</b> .....	11
4.2.1. SITUACIÓN EN LA REGIÓN.....	11
4.2.2. SITUACIÓN EN EL URUGUAY.....	12
<b>4.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD</b> .....	13
<b>4.4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b> .....	15
<b>4.5. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR</b> .....	18
<b>4.6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD</b> .....	19
<b>4.7. TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD</b> .....	21
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>7. OBJETIVOS</b> .....	23
7.1. Objetivo General.....	23
7.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
8.1. Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas. ....	24
8.2. Obtención de muestras .....	25
8.3. Detección de anticuerpos anti gp51 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) .....	25
8.4. Elaboración de registros.....	26
8.5. Análisis estadístico. ....	26
<b>9. RESULTADOS</b> .....	27
<b>10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	31
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35

## **LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

Página

### **Figuras**

Figura 1. Esquema de una partícula del VLB.....	10
Figura 2. Prevalencia serológica del VLB por productor (n= 29) al inicio y final del estudio.....	27
Figura 3. Incidencia de seropositivos al VLB por sangrías .....	28

### **Tablas**

Tabla 1. Medidas de manejo y sanidad aplicadas en el establecimiento.....	25
Tabla 2. Tabla descriptiva del peso vivo de los animales al ingreso (Set-2011) y a los 12 meses (Set-2012) y ganancia de peso entre ambos períodos.....	28
Tabla 3. Tasa de concepción según el período reproductivo.....	29
Tabla 4. Porcentaje de animales seronegativos y seropositivos al VLB en cada período reproductivo según diagnóstico de gestación.....	29
Tabla 5. Porcentaje de animales seropositivos por grado de positividad al VLB en cada período reproductivo según diagnóstico de gestación.....	30
Tabla 6. Porcentaje de animales preñados o vacíos según estado serológico.....	30

## **1. RESUMEN**

La Leucosis bovina enzoótica (LBE) es una de las principales virosis que afecta al ganado lechero en Uruguay y la mayoría de los animales infectados (alrededor del 60%) son asintomáticos. Las principales pérdidas están relacionadas con la exportación de ganado en pie y también se han descrito pérdidas reproductivas causadas por este virus. Sin embargo hasta el día de hoy se discute el real impacto de la infección en animales asintomáticos. El confinamiento de vaquillonas en sistemas de recría es muy utilizado en nuestro país, pudiendo ser una fuente importante de propagación de la enfermedad, ya que la principal vía de contagio es la horizontal (principalmente iatrogénica). El objetivo de este trabajo fue determinar la transmisión horizontal y el impacto de la infección con el virus de la Leucosis bovina (VLB) sobre la ganancia de peso y determinados parámetros reproductivos en un grupo de animales confinados en un sistema de recría de ganado lechero. Se muestreó un total de 389 animales y se utilizó la técnica de ELISA para evaluar la seroconversión de los animales infectados. También se registró la manifestación de celo, número de servicios requeridos por animal, tasa de concepción y porcentaje de animales preñados por inseminación artificial y por toro en dos períodos reproductivos (Junio-Julio y Noviembre-Diciembre). La prevalencia de anticuerpos contra VLB al ingreso de los animales al establecimiento fue de 45%. La tasa de seroconversión durante 12 meses fue de 39,8% con un intervalo de confianza entre 30,5 % y 49%. La seroprevalencia luego de 18 meses fue 82%. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de concepción entre animales seronegativos y seropositivos durante el período reproductivo Noviembre-Diciembre pero no en el período reproductivo Junio-Julio. Por otro lado se encontró una tendencia a estar vacía (no gestada) si la vaquillona era positiva al VLB ( $p=0.092$ ). En conclusión, se pudo determinar que hubo transmisión horizontal en el establecimiento a pesar de las medidas higiénico-sanitarias implementadas actualmente y además, el virus incidió en la performance reproductiva del rodeo, al menos en un período reproductivo en este establecimiento.

## **2. SUMMARY**

Enzootic bovine leukosis (EBL) is a major viral disease affecting dairy cattle in Uruguay and most of the infected animals (about 60%) are asymptomatic. The main losses are related to the live cattle export and described reproductive losses caused by this virus. However, the real impact of infection in asymptomatic animals is still discussed. Confinement-reared heifers is widely used in our country, which can be an important source to spread the disease, since the main route of infection is the horizontal (mostly iatrogenic). The aim of this study was to determine the horizontal transmission and the impact of infection with bovine leukosis virus (BLV) on weight gain and some reproductive parameters in a group of heifers in a system of dairy cattle rearing. A total of 389 animals were sampled, and ELISA was used to assess infected animals seroconversion. We also recorded estrus manifestation; number of services required per animal; conception rate and percentage of animals pregnant by artificial insemination and bull in two reproductive periods (June-July and November-December). The prevalence of antibodies against BLV at the animal admission animal to the establishment was 45%. The transmission rate for 12 months was 39.8% with a confidence interval between 30.5% and 49%. Seroprevalence after 18 months was 82%. Significant differences were found in conception rate between seropositive and seronegative animals during the breeding season from November to December but not in the reproductive period from June to July. On the other hand a tendency to be empty (not concocted) if the heifer was positive VLB ( $p = 0.092$ ) was found. In conclusion, it was determined that horizontal transmission occurs in spite of the application of sanitary measures in the establishment, and the virus also affected the reproductive performance of the group, at least in a reproductive period in this facility.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad causada por un Retrovirus (VLB) que tiene gran importancia a nivel mundial debido a su amplia distribución y a su incidencia, especialmente en los sistemas de producción lechera (Lüchter, 2004). Es una enfermedad que se transmite principalmente de forma horizontal (vectores mecánicos, iatrogenia) y puede llegar a infectar en forma inaparente a un elevado porcentaje de los animales del establecimiento (60%) o puede evolucionar a una linfocitosis persistente (30–35%) y finalmente al desarrollo tumoral (linfosarcomas), que suele manifestarse entre los 5 y los 8 años en un bajo porcentaje de la población (5–10%) (OIE, 2012). El incremento de animales positivos en nuestro país ha ido en aumento en las últimas décadas debido a restricciones de los mercados internacionales para la compra de animales en pie (MERCOSUR, 1996).

La importancia de este trabajo se basa en la posible capacidad de propagación del virus que presentan los campos de recría como sistemas productivos. Los campos de recría son una forma de organización de la producción lechera, que brinda la posibilidad de aumentar el rodeo en ordeño y derivar las categorías no lactantes a otras superficies. Esta modalidad de trabajo surge en el Uruguay en 1980, como respuesta a la falta de escala en tambos de menor tamaño (Costa y col., 2010). Los campos de recría abarcan el período entre el desleche y el primer parto, comprendiendo la etapa de desarrollo de la futura productora. Particularmente, en el campo de recría que se realizó la investigación de esta tesis, ingresan aproximadamente 1500 animales cada año, pertenecientes a 180 pequeños y medianos productores de la zona, llegando un total de 3500 vaquillonas en el predio. Estos animales entran con aproximadamente 8 meses, se crían juntos, se inseminan y vuelven a su productor original, para la producción lechera. No existe restricción a la entrada de los animales, en lo que tiene que ver con la LBE. Siendo la principal vía de transmisión la iatrogénica, la propagación de esta enfermedad entre los productores de la zona, debe ser considerada.

Por estos motivos, el objetivo de este trabajo fue realizar el seguimiento serológico de un lote de animales que ingresaron al campo de recría durante toda su estadía, hasta su regreso al predio de origen, para determinar la prevalencia y transmisión de la enfermedad en este tipo de producción ya que no existen estudios previos en el país. Por otro lado, se evaluó si la presencia del virus afecta negativamente la performance reproductiva de los animales positivos, siendo un punto aun discutido en la actualidad (Vanleeuwen y col., 2010).



## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

La Leucosis Bovina Enzoótica es una enfermedad crónica, infectocontagiosa producida por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB). El VLB es un retrovirus exógeno que pertenece al género *Deltaretrovirus*, dentro de la subfamilia *Orthoretrovirinae* y la familia *Retroviridae*, al cual también pertenecen el virus T-linfotrópico humano tipo I (HTLV-I) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV). Es un virus ARN que afecta células de la línea linfóide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie. El virus también persiste en células como los monocitos y macrófagos.

El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARN de polaridad positiva unidos por su extremo 5' e integrado por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*, los cuales son necesarios para su síntesis (OIE, 2012). El gen *gag* codifica la producción de la proteína p24 de la cápside, siendo esta, el blanco de los anticuerpos generados por el hospedador. También codifica la proteína p15 de la matriz, que interactúa con la bicapa lipídica de la membrana viral, y la proteína p12 de la nucleocápside. Los genes *pol* codifican la transcriptasa reversa, una ADN polimerasa, ARN dependiente. Por último, el gen *env* codifica las glicoproteínas de envoltura, la gp51 de superficie y la gp30 transmembrana. Gp51 induce una expresión masiva de anticuerpos específicos en animales infectados (Gillet y col., 2007). La mayor parte de las pruebas serológicas rutinarias, detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que es de aparición temprana (OIE, 2012).

El ADN proviral, generado por transcripción reversa, se integra aleatoriamente en el ADN nuclear de la célula huésped donde se mantiene latente sin llegar a producir partículas virales *in vivo* (Ressang y col., 1974).

El virus es muy poco resistente a las influencias exteriores, por lo que tiene escasa viabilidad, de menos de cuatro horas, fuera del animal. Los rayos ultravioletas, la congelación-descongelación repetida y la pasteurización inactivan el virus, al igual que los desinfectantes utilizados habitualmente (Orloff y col., 1993).

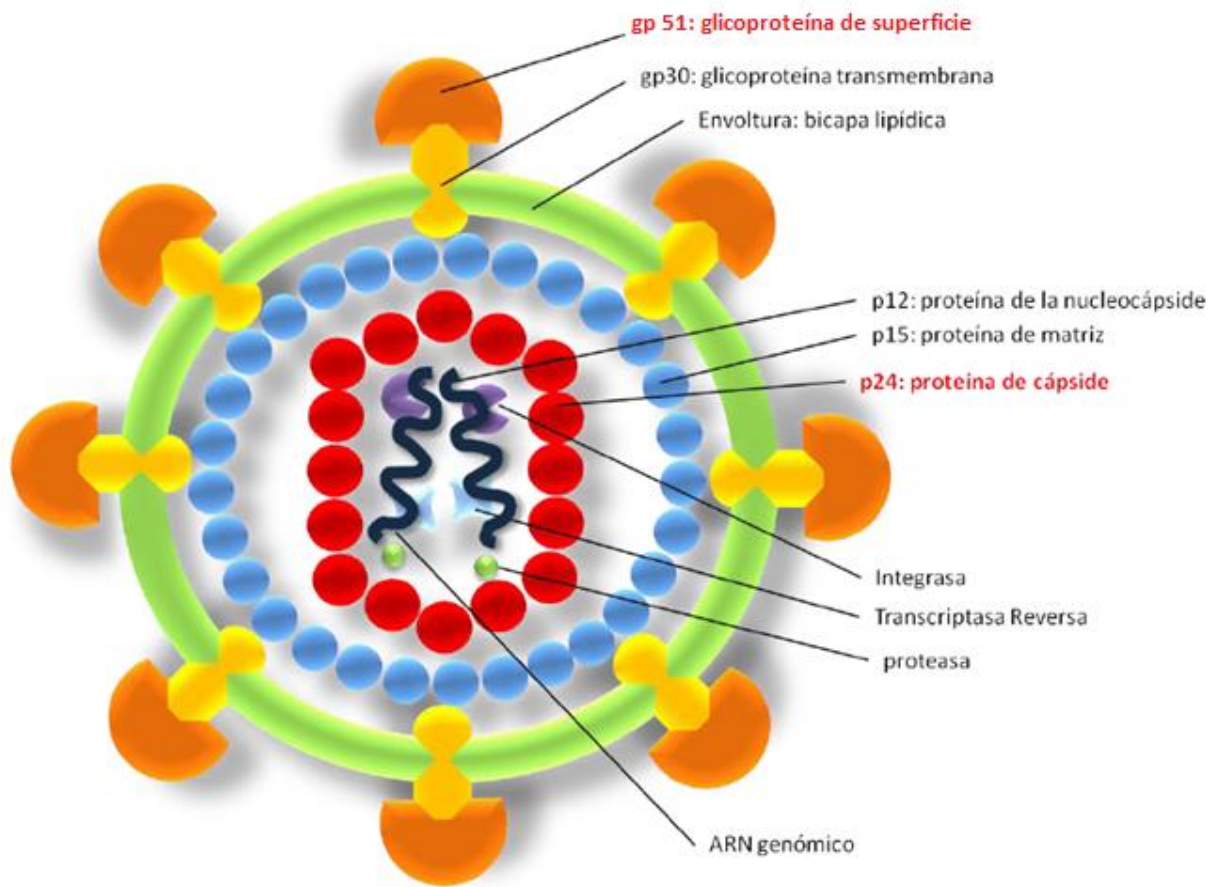


Figura 1. Esquema de una partícula del VLB. Adaptado de Science, 1988, 240 1427-1434. Extraído de Gutiérrez, G.; 2010.

## 4.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

### 4.2.1. SITUACIÓN EN LA REGIÓN

Es de gran importancia a nivel mundial debido a su amplia distribución y a su incidencia, especialmente en los sistemas de producción lechera (Lüchter, 2004).

La principal característica epidemiológica del virus es su amplia distribución geográfica ya que la infección ocurre a nivel mundial con marcada variación de prevalencia. Estas observaciones sugieren que las prácticas de manejo que difieren sustancialmente entre ganado lechero y el de carne son factores significantes para la transmisión del virus. Su introducción en América del sur posiblemente haya ocurrido mediante la importación de bovinos infectados provenientes de Europa y de los Estados Unidos (Carvalho y col., 1998).

En América del sur se han reportado niveles de prevalencia predial que rondan entre un 35-45% en Colombia, Venezuela y Chile (Marín y col., 1978; Islas y Inchaustieta, 1990; Alfonso y col., 1998), mientras que en Brasil alcanzó niveles de hasta un 70,4% (Abreu y col., 1990; Melo, 1992; Del Fava y Pituco, 2004).

En el año 2001, Trono y col., realizaron un estudio en Argentina, analizando rodeos de tambo de las principales regiones lecheras del país (10 regiones en 4 provincias: Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires y encontraron una prevalencia general de establecimientos del 84%, mientras que la prevalencia individual resultó ser del 32,85 % de los animales. Trabajos realizados en la provincia de Corrientes con pequeños productores lecheros, encontraron una prevalencia de 18,85%, con un rango comprendido entre 7,55 y 24,49% según la localidad muestreada (Jacobo y col., 2007).

La introducción de la infección por VLB en rodeos lecheros en Brasil parece estar vinculado a la importación de ganado de cría de alto valor de los Estados Unidos y Canadá, seguido por la introducción masiva de animales de Uruguay durante los años 70. En un estudio, Flores y col. (1992) mostraron que el índice de animales positivos importados de Uruguay sin duda contribuyó de manera significativa a la difusión de VLB en el país. La prevalencia en Brasil puede ser estimada en 23,7% (7862/33), ocurriendo en una mayor magnitud en la región sureste, con una tasa entorno de 39,8% (4821/12110). La LBE se encuentra ampliamente distribuida en las regiones centro-oeste (23,9%), sur (14,18%- 2053/14476), noreste (13,86%- 756/5454) y la región norte se estima una prevalencia próxima al 17% (Fernandes y col., 2009).

Por otra parte en Chile, Grau y Monti (2010) analizaron por la técnica de ELISA, 4360 animales de predios pequeños (menos de 40 animales), medianos (entre 40 y 200 animales) y grandes (más de 200 animales), encontrando una prevalencia aparente de 2,1%, 10,1% y 30,1% en los predios pequeños, medianos y grandes respectivamente.

#### 4.2.2. SITUACIÓN EN EL URUGUAY

Uruguay está posicionado internacionalmente como un importante exportador de lácteos. Exporta el 70 % de la producción nacional y se caracteriza por la gran intensificación del sector lechero en los últimos años. La misma se ve reflejada en el aumento de la producción anual de leche (1620 millones de litros en el 2005 vs 2177 millones litros en 2012), la disminución de establecimientos remitentes (3312 vs 3119 respectivamente) y la disminución de la superficie dedicada a la lechería (852.000 has vs 817.000 has respectivamente) (DIEA- MGAP, 2013).

Del punto de vista económico, la principal importancia de la Leucosis bovina, se debe a las restricciones de los mercados internacionales para la compra de animales en pie. Históricamente Uruguay ha exportado vaquillonas Holando para diversos países, siendo esta enfermedad una de las principales barreras sanitaria (MERCOSUR, 1996). Consecuentemente el incremento de animales positivos en nuestro país ha ido en aumento en las últimas décadas. Esto ha llevado que actualmente en Uruguay, esta enfermedad sea una de las más prevalentes en el ganado bovino lechero, ocasionando pérdidas económicas directas e indirectas.

Las primeras evidencias de la enfermedad en nuestro país fueron presentadas en la década del 60 por Quiñones y Casas (1963). En un trabajo realizado en 1996 en el Noreste del Uruguay, donde se muestrearon 30 predios y se analizaron 400 animales por la técnica de ELISA, la prevalencia de LBE fue de 20%, presentando el 77% de los predios, algún animal seropositivo (Mederos e Irigoyen, 1998).

En un estudio realizado en 53 establecimientos lecheros del departamento de Florida, donde se recolectaron en forma aleatoria muestras de sangre de 1060 animales, el análisis serológico permitió proyectar una prevalencia para LBE en dicho departamento de 46,62 % (Guarino, 2001).

En otro ensayo realizado durante 1997-2000 en 4 establecimientos de la cuenca lechera de Salto, la población estudiada fue 534 animales de raza Holando, comprendiendo 380 vacas, 39 vaquillonas, 115 terneras. El análisis serológico demostró que 238 animales (45%) fueron positivos al ELISA (Collazo y col., 2002).

En el año 2003 la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77%, 72% y 57%, respectivamente (Zaffaroni y col., 2007).

Finalmente, Furtado y col. (2013) en el año 2009 estudiaron 689 vacas en producción de 41 establecimientos de productores familiares pertenecientes a cuencas lecheras del centro del país (Departamentos de Durazno, Florida y Tacuarembó). Las muestras fueron procesadas por la técnica de Inmunodifusión en gel agar y los resultados revelaron un porcentaje de positividad serológica del 10,4% (IC 95% 8,3% a 13,0%). Analizados por departamento, se encontró un 11% de animales seropositivos en Durazno, un 14 % en Florida y 9 % en Tacuarembó.

No existe hasta el momento en la literatura estudios realizados sobre la prevalencia y la transmisión de esta enfermedad en campos de recría que nucleen animales de diferentes productores del Uruguay.

### **4.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD**

El VLB se transmite por vía horizontal y vertical, siendo la primera la principal vía de contagio. Los animales portadores asintomáticos son las grandes fuentes de infección en los rodeos. Esta transmisión se da por el traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano. En las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados, transformando a estos, en una fuente potencial de contagio (De la Sota, 2004). Su infectividad dependerá del recuento de linfocitos infectados en el fluido (Straub, 1982), el cual puede aumentar si ocurre un proceso exudativo (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

La mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo tanto cualquier medida de manejo o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, descorne, aplicación de inyectables, palpación rectal que se practiquen sin tomar medidas profilácticas correspondientes, son una importante forma de diseminación de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerickx y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997). En un trabajo realizado por González y col. (2001) se demostró que la transmisión de la infección con VLB ocurría utilizando pequeños volúmenes 5, 10 o 50  $\mu$ l de sangre total periférica de bovinos seropositivos asintomáticos inoculados por distintas vías: intradérmica, subcutánea, intramuscular o endovenosa. Van Der Maaten y Miller (1977) demostraron que una cantidad de 2500 linfocitos inoculados vía intradérmica es suficiente para causar infección en bovinos. Esto confirma la hipótesis que el uso de agujas comunes en vacunaciones o inyecciones parenterales favorece la diseminación del virus entre los animales del rebaño.

Además, la edad en que los animales se contagian está influida por la situación epidemiológica dentro del rodeo, ya que en aquellos con elevadas prevalencias se favorece la aparición de la infección en individuos más jóvenes (DiGiacomo, 1992). En este sentido, Nava y col. (2011) encontraron que el 43,28% de vacas con hasta dos partos tenían anticuerpos contra VLB, mientras que vacas con tres partos o más, el 71,70% eran seropositivas. Esto refleja una asociación directa entre el número de partos y la positividad ( $P=0,0001$ ). Sin embargo, se considera que tal resultado debe estar más relacionado con el factor edad, ya que los animales más adultos son los que tienen mayor número de partos, y han tenido más riesgo de infección. Los estudios realizados por Kaja y Olson (1982) y Monke (1986) demostraron que la inseminación artificial con semen procesado no tiene riesgo de infección a su progenie o vaca inseminada.

Por otro lado, en cuanto al contagio por inseminación artificial, en el semen procesado se verifica la presencia de leucocitos, siendo que una alta concentración de estas células es motivo de descarte. Debido a que el virus está presente sólo en los linfocitos, esta medida reduce las posibilidades de la presencia del virus en el semen. Además, el semen se diluye 50 veces o más durante el procesamiento, reduciendo la concentración de leucocitos que pueden estar presentes en una dosis de semen (Pelzer y Sprecher, 1993 citado por Machado y col., 1998).

En relación a los factores de riesgo en el contagio de VLB, se constató en un análisis de regresión logística que el sistema de crianza es un factor de riesgo, donde

animales criados en sistemas intensivos presentaron 19,1 veces más chance de infectarse cuando son comparados con aquellos criados en sistemas extensivos (Santos y col., 2013).

Por otro lado, también se ha demostrado que insectos hematófagos pueden jugar un rol importante en la propagación del VLB (Manet y col., 1989). En aquellos lugares donde la carga de insectos chupadores es alta se considera que estos pueden contribuir a la expansión de la enfermedad (Johnson y Kaneene, 1992).

Finalmente, la transmisión vertical puede ocurrir en hasta un 15 % de los casos y tiene lugar cuando un animal infectado lo transmite a la progenie por vía transplacentaria o vía digestiva a través del calostro (Martín y col., 2000).

El ganado bovino lechero generalmente tiene mayores índices de prevalencia comparado con el ganado de carne. Estas observaciones sugieren que las prácticas de manejo que tienden a diferenciar bastante entre la producción lechera y de carne, son factores significativos en la transmisión de VLB. No se han reportado diferencias significativas de infección según sexo o raza (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Estudios indican que existe influencia genética fuerte en la infección por el virus. El polimorfismo de gen BoLA del complejo mayor de histocompatibilidad se ha asociado a la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de linfocitosis persistente o del linfosarcoma inducido por el virus (Lewin y Bernoco, 1986).

#### **4.4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

En los bovinos pueden distinguirse tres fases después del contagio con VLB:

A) Una fase inaparente, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y la producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales, principalmente la glicoproteína gp51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989).

B) Linfocitosis persistente desarrollada por un 30 a 70 % de los animales infectados con edades entre 3 y 6 años, que desde el punto de vista clínico parecen estar sanos (Beier, 2008). Se define Linfocitosis persistente como un aumento en el recuento de linfocitos superior a 3 desvíos estándar sobre la media (Marshak., 1968) y se acepta como persistente al demostrar linfocitosis en 2 muestras analizadas separadas en el tiempo por un periodo de 60 a 90 días (Bendixen, 1963).

C) Enfermedad tumoral propiamente dicha presente entre un 0,1% y 10% de los animales infectados y que es la forma irremediamente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988).

La estrategia replicativa del VLB involucra, como primera fase, el reconocimiento específico de las proteínas externas de la envoltura viral por parte de la célula huésped, y la penetración a través del mecanismo de fusión (Brasseur y col., 1988). En el citoplasma se sintetiza una copia de ADN complementario a partir del ARN viral utilizando la enzima transcriptasa reversa. Las secuencias presentes a ambos extremos del genoma viral se repiten en cada extremo del nuevo ADN dando lugar a los extremos terminales o LTRs. La nueva molécula de ADN penetra al núcleo celular, se duplica y circulariza y se integra al azar y en forma permanente, al genoma celular en forma de provirus (Luciw y Leung, 1992).

Inmediatamente después de la infección, la expresión genética y la producción de viriones maduros se activa en la célula huésped y se puede identificar una viremia pasajera que dura de 10 a 12 días post-infección (Schwartz y col., 1994), después de lo cual aparece una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones activos en los órganos de los animales infectados.

Durante el primer mes post infección, las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos (Fulton y col., 2006). Uno de los indicadores más tempranos de infección es el aumento de la respuesta humoral antiviral entre la primera y octava semana postinoculación. Los anticuerpos reconocen los epítopes de gp51 y p24 y colaboran con la muerte de las células productoras de virus (Gillet y col., 2007).

Trabajos realizados en Argentina ponen en manifiesto que alrededor del 10 % de los animales detectados por PCR, nacen infectados, y que no hay progresión de la infección hasta los 12 meses de edad. A partir de entonces, el nivel aumenta paulatinamente hasta alcanzar el 24% de animales infectados a los 27 meses, para luego elevarse a un 61% a los 36 meses, coincidiendo con el ingreso a la lactancia (Gutiérrez y col., 2011).

Los terneros nacidos de madres infectadas con VLB poseen anticuerpos de origen materno hasta los 6 meses de edad aproximadamente (Thurmond y col., 1982; Johnson y col., 1987), pudiendo interferir con las pruebas serológicas de rutina.

Es una enfermedad que puede llegar a infectar en forma inaparente a un elevado porcentaje de los animales del establecimiento (60%) o puede evolucionar a una linfocitosis persistente (30–35%) y finalmente al desarrollo tumoral (linfosarcomas) (Fenner y col., 1992), pero que suele manifestarse entre los 5 y los 8 años, en un bajo porcentaje de la población (5–10 %) (Chamizo, 2005).

Los animales con LP no presentan otro signo que valores anormales de linfocitos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos animales sufren un desorden inmunológico, con cambios en el tipo de respuesta de linfocitos TCD4, modificando el perfil de citoquinas presentes en los animales (Kabeya y col., 2001).

La sintomatología causada por el linfosarcoma tiene un comienzo muy insidioso y pueden llevar a la muerte del animal al principio o al final del curso de la enfermedad. Se observa astenia, adelgazamiento, disminución del apetito, fatiga, disminución del rendimiento lácteo, anemia. Las adenopatía o tumefacciones ganglionares constituyen el signo característico, no siempre simétricas ni generalizadas (De la Sota, 2004). Los síntomas dependen del lugar donde aparecen los tumores (OIE, 2012). Estas lesiones pueden determinar una serie de trastornos funcionales de origen mecánico como compromiso de los bronquios, disnea, compresión del nervio vago, del esófago produciendo meteorismo crónico, del corazón con edemas e hidropesías del timo, de médula espinal con parálisis posterior, y de los ojos produciendo exoftalmia.

En relación a la influencia de la infección por el virus sobre parámetros reproductivos, existen controversias encontradas en los antecedentes existentes sobre este tema. No está suficientemente claro si la infección subclínica con VLB afecta la performance reproductiva del ganado bovino. Investigaciones previas establecen que las diferencias de los parámetros reproductivos entre seropositivos y seronegativos no son significativas (Huber y col., 1981; Kale y col., 2007). En este sentido, Betancur y Rodas (2008) plantea que no hay correlación entre la presencia de la infección por VLB y otros trastornos reproductivos tales como aborto, repetición de servicios o reabsorción embrionaria. Por otro lado, Kale y col. (2007) no encontraron diferencias significativas en el número de inseminaciones por preñez e intervalo interparto entre animales seropositivos y seronegativos al virus.

Sin embargo, ensayos realizados en sistemas de producción de leche, encontraron que vacas infectadas con VLB, requerían más servicios por concepción (García y col., 2000). En Canadá, VanLeeuwen y col. (2010) encontraron que la tasa de concepción de animales seropositivos fue un 7% menor que la de los animales negativos. A su vez, en un estudio de ganado lechero en Suecia se observó que el efecto de la infección por VLB sobre la fertilidad es mínimo, sin embargo la producción de leche era más baja en animales infectados que en los no infectados (Emanuelson, 1992).

En un experimento realizado en Uruguay donde se analizó el efecto de la LBE sobre los principales parámetros reproductivos y productivos en establecimientos lecheros



(Intervalo Parto/Servicio, Servicios/Concepción, Intervalo Interparto, Producción y Composición de la Leche y Tasa de Refugos), solamente el Intervalo Interparto se evidenció significativamente mayor en las seropositivas 417+ 64 días frente a 389 + 6 días en las negativas (Sierra y col., 2000).

Considerando la alta tasa de seroprevalencia encontrada en el ganado lechero del territorio uruguayo y los diferentes hallazgos (algunos contradictorios) acerca del impacto que la infección por VLB pueda tener sobre los parámetros reproductivos del ganado, son necesarias más investigaciones a campo y con técnicas más sofisticadas de diagnóstico, para comprender el real impacto de este virus en los sistemas productivos de nuestro país.

#### **4.5. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR**

El virus de LBE infecta naturalmente al ganado bovino, aunque puede infectar ovejas en forma experimental, generando en estas últimas una patogénesis más aguda. A pesar de generar una respuesta antiviral fuerte, el virus persiste indefinidamente a lo largo de la vida del animal, aparentemente en un estado de transcripción silenciado, por lo menos en una proporción de células infectadas. Luego de la infección, la actividad humoral y citotóxica detiene eficientemente el ciclo replicativo del virus, pero permite la expansión mitótica de aquellas células que contienen el provirus (Florins y col., 2007). Uno de los indicadores más tempranos de infección es el comienzo de la respuesta humoral antiviral entre una y ocho semanas post inoculación. Se sintetizan anticuerpos que reconocen los epítopes estructurales (gp51 y p24) y proteínas regulatorias (Tax y Rex) (Florins y col., 2007). Del punto de vista inmunológico, la enfermedad por VLB se puede dividir en tres estadios: serológicamente positivo pero negativo a linfocitosis, serológicamente positivo con linfocitosis persistente (LP), y leucemia (Kabeya y col., 2001).

Los animales seropositivos a LBE en fases tempranas de la infección, desarrollan una respuesta celular a predominio de linfocitos T helper tipo 1 (Th1), con producción de interferón gamma. En fases más crónicas con presencia de linfocitosis persistente (LP), se produce una respuesta Th2. Las alteraciones en la expresión de citoquinas mostraron estar correlacionadas con la progresión de la enfermedad en infecciones crónicas por retrovirus, sugiriendo que el balance de las citoquinas puede contribuir a la progresión de la enfermedad. Pyeon y col. (1996) examinaron los perfiles de citoquinas en células mononucleares de bovinos de cada estadio de la enfermedad y demostraron que la producción de citoquinas Th1 como IL2, eran promovidas en animales serológicamente positivos más que en aquellos con LP. Los animales serológicamente positivos también expresaban más IL12, clave para una respuesta Th1, pero esta disminuía en estadios más avanzados (Yakobson y col., 1998). Sin embargo, el aumento en la expresión de citoquinas Th2 como IL10, se detectó en macrófagos de animales con LP. Se cree que IL2 juega un rol en la progresión de la enfermedad, provocando la proliferación de linfocitos B, contribuyendo a la LP inducida por el virus (Trueblood y col., 1998). La susceptibilidad a la expansión clonal de los linfocitos B infectados por el virus está asociada con alelos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (Nagaoka y col., 1999).

Adicionalmente, las células T infectadas con el VLB aumenta la expresión de receptores inmunoinhibitorios, lo que aumenta la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador, por ejemplo, aumentando la expresión de IL-10 o disminuyendo la de INF gamma. La expresión de los receptores inmunoinhibitorios esta correlacionado positivamente con la carga proviral (Bartlett y col., 2014).

La LBE tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico. La alteración del sistema inmune provocado por la infección viral puede aumentar la incidencia de otras patologías afectando a la producción de leche y originando pérdidas directas por mortandad (Trainin y Brenner, 2005).

#### **4.6. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD**

El diagnóstico de la enfermedad en estados avanzados con presencia de tumores se puede realizar mediante examen clínico, biopsia y/o necropsia pero en aquellos animales asintomáticos o que presentan linfocitosis persistente se requieren pruebas de laboratorio para realizar la confirmación.

El diagnóstico de la LBE se puede realizar tanto detectando la presencia de anticuerpos circulantes específicos en sangre, así como detectar el genoma viral en los linfocitos infectados (OIE, 2012). Debido al hecho de que hasta el momento no existen vacunas para esta enfermedad, el diagnóstico serológico sigue siendo una práctica de rutina en muchos países. Las técnicas de referencia empleadas son la Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). En el caso de la detección molecular, se pueden utilizar técnicas como la nested-PCR y la *Real Time* PCR (Felmer y col. 2006; Rama y col., 2010; OIE, 2012).

Durante muchos años las alteraciones hemáticas fueron consideradas como fase pretumoral de la LBE y constituyeron la base del diagnóstico en los planes de control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo con el desarrollo e introducción de la IDGA se pudieron evidenciar importantes limitaciones de sensibilidad y especificidad de las claves hematológicas, perdiéndose el interés por las alteraciones hematológicas como herramienta de diagnóstico, epidemiológica y control de LBE (Sienra y col. 1998).

La detección serológica, mediante IDGA o ELISA es principalmente contra gp51 de la envoltura viral, constituyendo los métodos más comúnmente usados para la identificación de animales infectados (Martín y col., 2000; González y col., 2001; OIE, 2012). Son técnicas aceptadas por nuestro país como pruebas oficiales para el diagnóstico del VLB.

La IDGA es la prueba diagnóstica universalmente utilizada, simple en su realización y de bajo costo, sin embargo tiene algunas desventajas como una sensibilidad un poco inferior a otras técnicas y los anticuerpos no se pueden detectar en todos los casos antes de las 8 semanas o aun varios meses postinfección (Álvarez y Oriani, 2000). Las ventajas del ELISA se basan en la rapidez de ejecución, la capacidad de evaluar un gran número de muestras, la lectura objetiva, y la alta sensibilidad, siendo ideal para un programa de control y/o erradicación.

En un estudio comparativo entre IDGA, ELISA y la nested-PCR, el ELISA diagnosticó un 6 % más de muestras positivas que la IDGA mientras que la nested-PCR detectó un 23 % y un 17% más de positivos que la IDGA y el ELISA respectivamente. Tomando a ELISA y PCR como métodos de referencia la IDGA presentó una sensibilidad del 72% y 100% de especificidad en comparación con la técnica de ELISA, y ésta un 61% de sensibilidad y un 97% de especificidad cuando se la compara con la PCR (Rama, 2009). Del punto de vista diagnóstico, es importante considerar que si bien los anticuerpos séricos contra las proteínas estructurales gp51 y p24 persisten durante toda la vida, su título puede sufrir fluctuaciones, en particular en el período periparto, lo que puede llegar a no ser

detectables por las pruebas serológicas de rutina como IDGA y ELISA, resultando en diagnósticos falsos negativos (Ferrer y col., 1977; Agresti y col., 1993).

No hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa. Sin embargo, la infección activa se puede confirmar mediante la detección del provirus de LBE mediante PCR (OIE, 2012). El diagnóstico molecular es muy útil cuando nos quedan dudas sobre la capacidad de las técnicas serológicas en animales con bajos títulos de anticuerpos o en infecciones recientes donde aún no se pueden detectar niveles de anticuerpos en suero. En este caso, la nested-PCR es una técnica muy utilizada, detectando básicamente secuencias del gen *env*, codificante de la glicoproteína gp51 del VLB (Ballagi-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006). El inconveniente de esta técnica a nivel práctico, es sobre todo la necesidad de infraestructuras adecuadas y técnicos altamente capacitados, para evitar contaminaciones entre muestras de animales. Del punto de vista diagnóstico, la nested-PCR puede ser utilizada de forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas (Beier, 2008).

Más recientemente, se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) muy útiles para la cuantificación de carga viral en animales infectados (OIE, 2012; Rola-Luszczak, 2013). La sensibilidad de estas técnicas es similar a las obtenidas en la nested-PCR, sin embargo la posibilidad de contaminación es ampliamente reducida. Las técnicas de qPCR nos permiten estimar la carga viral presente en linfocitos infectados, siendo útil cuando queremos determinar la asociación cuantitativa de VLB en animales infectados y la repercusión de este sobre variables de interés productivo, reproductivo y/o sanitario. Gutierrez y col. (2012) encontraron que la respuesta humoral refleja el nivel de infección in vivo (carga proviral). Una débil reactividad de anticuerpos p24 podría ser un buen indicador de baja carga proviral. La reactividad a anticuerpos p24 de los animales con un alta carga proviral fue significativamente más altos que los de los animales con baja e indetectable carga proviral. Determinando los mismos una medida útil en el control del VLB, especialmente en rodeos altamente infectados.

#### **4.7. TRATAMIENTO, CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD**

Durante los últimos años ha habido una serie de intentos de desarrollar una vacuna contra VLB sin resultados positivos. Por ejemplo, se han evaluado vacunas inactivadas obtenidas a partir de células persistentemente infectadas, pero estas inducían una fuerte respuesta humoral neutralizante y protegían parcialmente a ovinos y bovinos de un desafío a bajas dosis, sin embargo, estos se infectaban en desafíos a dosis altas (Miller y Vaan der Maaten, 1978; Fukuyama y col., 1993). También se han intentado varios lisados de células (a partir de membrana plasmática o células extraídas de tumores por VLB o células FLK infectadas con el virus) (Ristau y col., 1987), pero a pesar que estas otorgaron protección parcial, esta estrategia implica un riesgo intrínseco de transmisión de enfermedades (Rodríguez y col., 2011).

Las primeras vacunas de subunidades virales fueron desarrolladas a partir de glicoproteínas de superficie gp51. Estas vacunas eran inmunogénicas, sin embargo, no protegían contra el desafío con el virus (Onuma y col., 1984; Kabeya y col., 1996). También se han intentado vacunas recombinantes, utilizando péptidos sintéticos de gp51 y vacunas de DNA, pero no han sido eficientes en bovinos u ovinos (Burny, 1996).

Dado que aún no se ha desarrollado una vacuna eficiente, el control de la enfermedad se basa en su diagnóstico mediante pruebas serológicas.

Existen 3 estrategias básicas para el control de la infección por VLB:

1. Identificación de animales positivos y sacrificio: La principal limitante de la implementación de este programa es la alta prevalencia inicial y el valor de los animales así como su potencial genético y reproductivo. Los programas de erradicación solo pueden ser utilizados si la prevalencia es de un 1%, para que el número de animales removidos no afecte la producción. Este tipo de programa implica políticas de compensación económicas para los productores, lo cual contribuye a la falta de adherencia y falla de estos programas. Los países Europeos han optado por esta estrategia radical, sin embargo en países como Estados Unidos, Argentina, Canadá y Japón, esto no es posible debido a las altas prevalencias, pérdidas de material genético y cuestionables pérdidas económicas (Pelzer, 1997; Rodríguez y col., 2011).
2. Identificación de animales positivos y segregación: Está basado en la segregación de animales positivos en lugar de sacrificarlos. Este tipo de programa permite que el productor mantenga animales de alta producción, o genéticamente superiores al mismo tiempo que reduce la incidencia de la infección (Pelzer, 1997). Este programa consiste en mantener los animales seropositivos en un rodeo separados de los animales seronegativos. Shettigara y col. (1989) establecen que la distancia mínima entre los rodeos debe ser de 200 metros. Una alternativa es manejo diferencial entre animales infectados y no infectados que cohabitan en un mismo predio. Las desventajas incluyen un incremento de costos, el aumento de labor por manejo de varios rodeos en una misma unidad de producción y requiere una adherencia al programa a largo plazo.

3. Monitoreo e implementación de medidas de manejo correctivas: Este programa se enfoca en limitar la transferencia de células infectada presentes en sangre, leche, secreciones, excreciones, jeringas e instrumentos quirúrgicos (Rodríguez y col., 2011). Comparado con las estrategias anteriores, esta no requiere realizar mayores inversiones o eliminación de animales. Las principales desventajas de este programa es el cambio de rutina en el establecimiento, entrenamiento del personal, estar sujeto al factor humano y la existencia de otras fuentes de infección como los insectos hematófagos. En este tipo de estrategias, es posible que los resultados no sean evidentes hasta luego de varios años.

Podría haber una cuarta estrategia basada en la selección genética de ganado resistente a la infección contra VLB. La respuesta inmunológica y la resistencia o susceptibilidad está influenciada por el complejo mayor de histocompatibilidad del huésped (MHC) que en bovinos se refiere al gen Antígeno Linfocitario Bovino (BoLA). La resistencia genética a la infección por VLB parece ser un mecanismo complejo controlado por múltiples genes, cada uno de los cuales contribuye sutilmente al fenotipo (Rodríguez y col. 2011). El inconveniente de este tipo de selección, es la limitación de la selección de los animales por otras características genéticas o fenotípicas con interés productivos distintos.

## **6. HIPÓTESIS**

**6.1** La seroprevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en un campo de recría aumenta y está asociada a intervenciones sanitarias y/o a cambios en el manejo animal y estado fisiológico de los mismos a pesar de las medidas higiénicas y de manejo implementadas en el campo de recría.

**6.2** La enfermedad subclínica afecta negativamente la ganancia de peso y el comportamiento reproductivo de las vaquillonas Holando confinadas en el sistema de recría donde se realizó el estudio.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo General**

Evaluar la transmisión y el impacto de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en animales asintomáticos en un campo de recría del Uruguay.

### **7.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la seroprevalencia contra LBE en los animales que ingresan al campo de recría y su relación con la edad de los mismos.
- Determinar la tasa de seroconversión de LBE en la población durante el período entre el ingreso de los animales al establecimiento hasta su egreso.
- Determinar la ganancia de peso, manifestación de celo, número de servicios, tasa de concepción y porcentaje de preñez en vaquillonas seropositivas (asintomáticos) y seronegativas al virus de la LBE.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Caracterización del establecimiento y medidas de manejo utilizadas.**

El estudio se llevó a cabo en un establecimiento de la cuenca sur del Uruguay, donde se realiza la recría de terneras de raza Holando de diferentes productores lecheros de la zona. Los animales ingresan con aproximadamente 8 meses de edad y permanecen en el campo alrededor de 18 meses hasta su regreso al productor original con 7 meses aproximadamente de gestación. El establecimiento no tiene exigencias sanitarias en cuanto al ingreso de animales con serología positiva a Leucosis Bovina Enzoótica.

Al ingreso, son identificadas con una caravana que indica el productor y el número asignado al animal. Luego son pesadas, desparasitadas y sometidas a un plan sanitario pre establecido (Tabla 1). Durante los primeros 30 días los animales de los distintos productores se encuentran en un mismo lote de “cuarentena” sobre pasturas. Posteriormente y según el peso, ingresan en lotes al rodeo general de aproximadamente 3500 animales (integrado por un total de 108 productores). La recría de los mismos es realizada sobre campos mejorados, praderas, verdeos y con el suplemento de grano húmedo y heno en la época de menor oferta de forraje y a las categorías que lo requieren. El manejo reproductivo del establecimiento se realiza en dos periodos al año, Junio-Julio y Noviembre-Diciembre. Consiste en sincronización de las vaquillonas, detección de celo visto dos veces por día, inseminación artificial (IA) (hasta tres por animal), repaso con toros luego de cada periodo de IA y diagnóstico de gestación.

Como medidas higiénico-sanitarias habituales se sumergen en desinfectantes las agujas de las jeringas multidosis, material de descorne, material quirúrgico, guantes, o cualquier material que entre en contacto con sangre.



Tabla 1. Medidas de manejo y sanidad aplicadas en el establecimiento.

<b>ACTIVIDAD</b>	
<b>Día 0 (Ingreso):</b>	Identificación. Vacunación contra Clostridios. Desparasitación.
<b>Día 7:</b>	Vacunación contra carbunco. Tuberculinización.
<b>Día 14:</b>	Vacunación con RB51 y contra Queratoconjuntivitis.
<b>Día 21:</b>	Descorne. Suplemento vitamínico.
<b>Día 30:</b>	Segunda dosis contra clostridios. Distribución por peso e ingreso al rodeo general.
<b>Al año de ingreso:</b>	Revacunación contra clostridios cada 6 meses. Revacunación anual contra queratoconjuntivitis. Revacunación Aftosa. Antiparasitarios según coprología. Vacunación contra enfermedades reproductivas.  Suplementación con sales minerales. Registro mensual del peso de los animales.

\*Todas las vacunaciones son realizadas con jeringa multidosis, sumergiéndolas en desinfectantes entre animales.

## 8.2. Obtención de muestras

El trabajo comprendió un muestreo de 389 animales pertenecientes a 29 productores del establecimiento mencionado en el punto 8.1. Previo al comienzo de las actividades, se realizó una toma de sangre a la entrada de los animales al campo de recría y se obtuvieron los animales seronegativos que se utilizaron para el estudio. Para esto, se extrajo sangre sin anticoagulante y se procesó por la técnica ELISA (punto 8.3). Se reiteró el muestreo cada 3 meses aproximadamente durante 18 meses (2011-2013) hasta el regreso de los animales a su establecimiento de origen.

## 8.3. Detección de anticuerpos anti gp51 mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Se utilizaron kits comercial para la detección de anticuerpos contra gp51 del VLB en suero con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA, aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se utilizaran 50 µl de suero diluido 1:25. La lectura se realizó a 620 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, y se estableció la línea de corte para cada placa a partir del promedio de las lecturas de las densidades ópticas (D.O) de estos sueros

controles. Según las densidades ópticas de las muestras positivas se las clasificó en positivos débiles, moderados y fuertes (Gutierrez y col., 2012).

#### **8.4. Elaboración de registros**

Se elaboraron planillas utilizando Microsoft office Excel con el fin de visualizar la evolución serológica en relación a las medidas de manejo sanitario y reproductivo en el periodo de estudio. Se registraron la evolución del estado serológico de cada animal individualmente durante 18 meses y las fechas en que se realizaron actividades de manejos sanitarios, registro de peso y manejos reproductivos.

#### **8.5. Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos en los 5 muestreos realizados durante los 18 meses de estudio (cada 3 meses aproximadamente); se evaluó la existencia de animales infectados mediante la seroconversión y se utilizaron tablas de registros diagramadas para dicha actividad.

La prevalencia se estimó con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%). Suponiendo un 20% de tasa de transmisión, el error al determinar el IC 95% fue de  $\pm 7,8\%$ .

Para analizar las distintas variables como: manifestación de celo, número de servicios, tasa de concepción y porcentaje de preñez, se utilizó la prueba de Chi<sup>2</sup>. Por otro lado, para analizar la ganancia de peso se utilizó ANOVA corregida por el peso vivo inicial. El nivel de significancia fue de un 95%. El análisis estadístico fue realizado con el software STATA v 11.2 (StataCorp, 2009).

## 9. RESULTADOS

La prevalencia serológica contra VLB al ingreso de las vaquillonas al establecimiento fue de 45%. La tasa de seroconversión durante 12 meses fue de 39,8% con un intervalo de confianza entre 30,5 % y 49%. Los animales ingresados pertenecían a 29 productores de la zona de los cuales 2 de ellos ingresaron al campo de recría sin animales seropositivos, 2 ingresaron el 100% de animales seropositivos, 11 ingresaron 50% o más de los animales seropositivos y 14 ingresaron menos del 50% de animales seropositivos. Al final del estudio todos los productores egresaron con al menos un animal seropositivo (Fig. 2). La tasa de seroconversión al finalizar el estudio (18 meses) fue de 52,7% con un intervalo de confianza de 43,5% y 61,9% y la prevalencia serológica estimada contra VLB al egreso de los animales fue de 73,6%. No se encontró asociación entre la edad (diente de leche, dos dientes,  $\geq$  cuatro dientes) y la presencia de anticuerpos anti-VLB ( $p=0,28$ ).

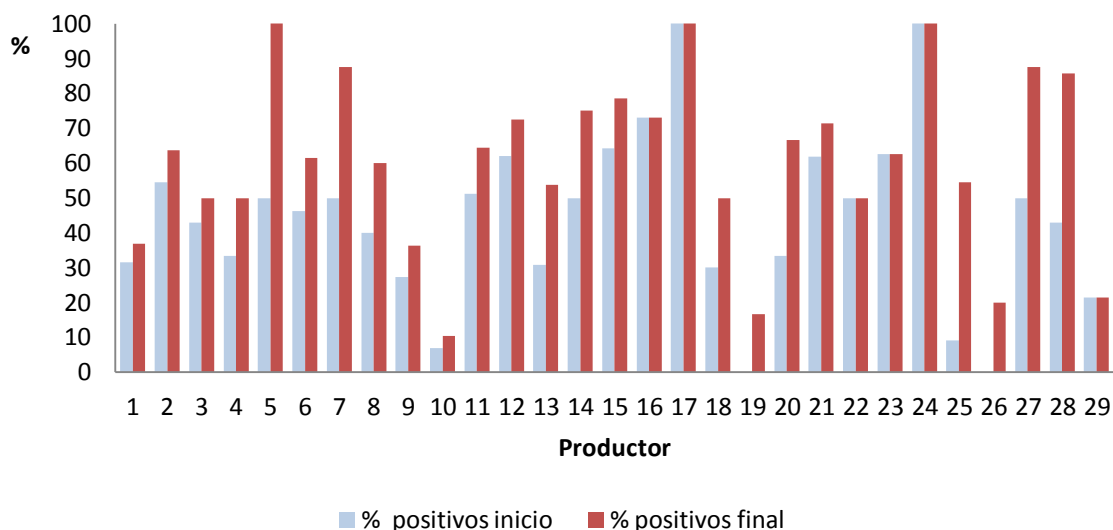


Figura 2. Prevalencia serológica del VLB por productor (n= 29) al inicio y final del estudio.

La incidencia serológica fue analizada en 5 sangrías durante 18 meses y comparada con el manejo sanitario y reproductivo realizado por período. Se encontró una incidencia de 25%, 7%, 6,4%, 6,8% y 20%, en los meses setiembre-diciembre 2011, diciembre-marzo 2012, marzo-julio 2012, julio-diciembre 2012 y diciembre-marzo 2013 respectivamente. Durante la primer sangría (incidencia de 25%), los animales se encontraban en cuarentena y aún no habían ingresado al rodeo general, habiéndose realizado en este período la identificación con caravanas, vacunaciones (carbunco, clostridiosis, queratoconjuntivitis, RB51) y refuerzos, prueba de la tuberculina, desparasitaciones, suplemento vitamínico inyectable y descorne de los mismos. En la segunda sangría (incidencia de 7%) el manejo realizado durante ese período fue la revacunación contra clostridiosis y la extracción de sangre para brucelosis (prueba de Rosa de Bengala). En la tercer sangría (incidencia de 6.4%) y en la cuarta (incidencia de 6,8%) se realizó el manejo reproductivo con

sincronización de celo, inseminación artificial, diagnóstico de gestación por tacto rectal y ecografía, y vacunación contra leptospirosis. En la quinta sangría, cuando los animales se encontraban próximos a su entrega, entre 7 y 8 meses de gestación se observó un nuevo pico en la seroconversión del 20% (Fig. 3).

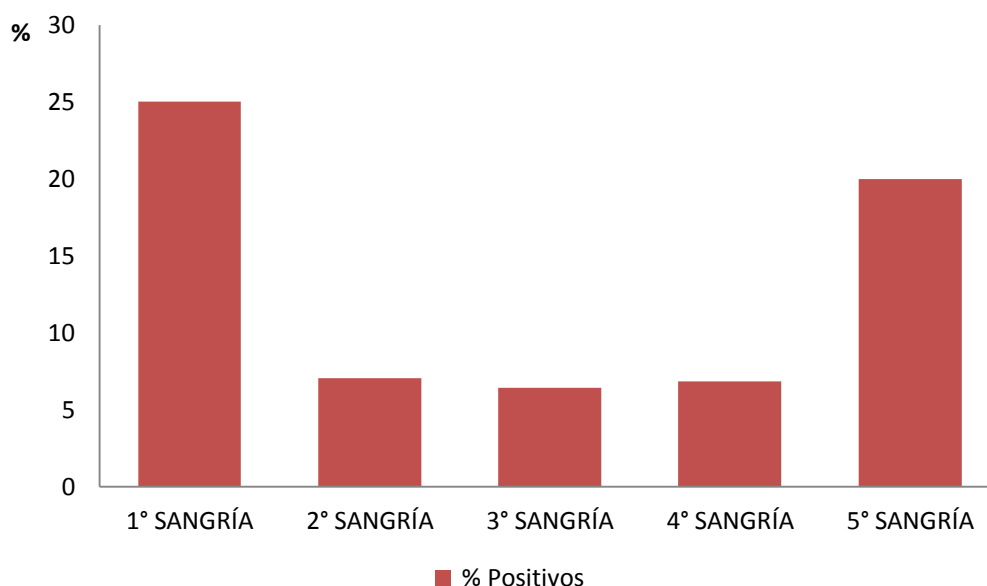


Figura 3. Incidencia de seropositivos al VLB por sangrías.

La ganancia de peso fue evaluada entre dos registros: al ingreso (Setiembre 2011) y a los doce meses del ingreso de los animales al campo de cría (Setiembre 2012). El promedio de la ganancia de peso en el grupo de animales seronegativos fue de 164,3 kgs y la del grupo de los animales seropositivos fue de 160,5 kgs, no encontrándose diferencias significativas ( $p=0,58$ ). Corregido por el peso vivo inicial: 163,6 y 160,7 kg respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla descriptiva del peso vivo de los animales al ingreso (Set-2011) y a los 12 meses (Set-2012) y ganancia de peso entre ambos períodos.

	Parámetros	PV (Set 2011)	PV (Set 2012)	Ganancia de Peso
Seronegativos	Media	185,73	350,03	164,29
	Desvío Estándar	30,61	45,82	34,34
	Error Estándar	3,63	5,43	4,08
	n	71	71	71
Seropositivos	Media	197,79	358,25	160,46
	Desvío Estándar	43,54	50,92	32,44
	Error Estándar	3,15	3,68	2,35
	n	191	191	191

$P>0,05$

En cuanto a los resultados reproductivos, se evaluaron distintos parámetros de eficiencia reproductiva en dos períodos (Junio-Julio y Noviembre-Diciembre). Analizando los animales de ambos períodos conjuntamente, se pudo determinar que la presencia de anticuerpos anti-VLB, no influye en la manifestación de celo de las vaquillonas ni en el número de servicios requeridos por animal ( $p=0,49$  y  $p=0,60$  respectivamente). A su vez, en el grupo de los animales seropositivos, tampoco existió relación entre el grado de seropositividad (débil, moderado o fuerte) y el número de servicios requeridos ( $p=0,92$ ). Por otro lado, del análisis de 251 vaquillonas inseminadas en ambos períodos reproductivos, se pudo determinar que no existe asociación entre la preñez y la serología al VLB entre negativas y positivas ( $p=0,38$ ) y tampoco entre positivas débiles, moderadas y fuertes ( $p=0,54$ ). Al comparar la tasa de concepción de todos los animales en cada período, se encontró un 80,5% y 76,1% de concepción en Junio-Julio y Noviembre-Diciembre respectivamente ( $p=0,42$ ) (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de concepción según el período reproductivo.

<b>Período Reproductivo</b>	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Vaquillonas Preñadas</b>
Junio-Julio	35/180 (19,44%)	145/180 (80,56%)
Noviembre-Diciembre	17/71 (23,94%)	54/71 (76,06%)

$P>0,05$

Al analizar separadamente por período reproductivo (Junio-Julio y Noviembre-Diciembre), se pudo determinar una tasa de concepción de 77,50% en los animales seronegativos y de 81,43% en los seropositivos en el primer período de inseminación artificial (Junio-Julio), no encontrándose diferencias significativas ( $p=0,58$ ). En este período se requirió 1,65 y 1,64 servicios para lograr una preñez en los animales seronegativos y seropositivos respectivamente.

Por otro lado, en el segundo período reproductivo (Noviembre-Diciembre), la tasa de concepción fue de 93,33% en los animales seronegativos y de 66,67% en los seropositivos, encontrándose diferencias significativas ( $p=0,005$ ) (Tabla 4 y 5). La cantidad de servicios necesarios para lograr una preñez en este período fue de 1,46 y 2,35 para los animales seronegativos y seropositivos respectivamente.

Tabla 4. Porcentaje de animales seronegativos y seropositivos al VLB en cada período reproductivo según diagnóstico de gestación.

<b>Serología al VLB</b>	<b>Período Junio-Julio</b>		<b>Período Noviembre-Diciembre</b>	
	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Vaquillonas Preñadas</b>	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Vaquillonas Preñadas</b>
Negativas	9/40 (22,50%)	31/40 (77,50%)	2/30 (6,67%)	28/30 (93,33%) <sup>a</sup>
Positivas	26/140 (18,57%)	11/140 (81,43%)	26/78 (33,33%)	52/78 (66,67%) <sup>b</sup>

$P<0,05$ .

Tabla 5. Porcentaje de animales seropositivos por grado de positividad al VLB en cada período reproductivo según diagnóstico de gestación.

<b>Serología al VLB</b>	<b>Período Junio-Julio</b>		<b>Período Noviembre-Diciembre</b>	
	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Vaquillonas Preñadas</b>	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Vaquillonas Preñadas</b>
Positiva débil	1/16 (6,25%)	15/16 (93,75%)	2/6 (33,33%)	4/6 (66,67%)
Positiva moderada	5/27 (18,52%)	22/27 (81,48%)	8/18 (44,44%)	10/18 (55,56%)
Positiva fuerte	20/97 (20,62%)	77/97 (79,38%)	16/54 (29,63%)	38/54 (70,37%)

P>0,05

Por otro lado no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de animales preñados por toro o por IA tanto en las seronegativas como en las seropositivas. Sin embargo se observó una tendencia de estar vacía (no gestada) si la vaquillona era positiva al VLB ( $p=0.092$ ) (Tabla 6). Finalmente del análisis de la serología de los toros utilizados para el repaso de la inseminación artificial, se obtuvo un 57 % de toros seropositivos.

Tabla 6. Porcentaje de animales preñados o vacíos según estado serológico.

<b>Serología al VLB</b>	<b>Vaquillonas Vacías</b>	<b>Preñez por toro</b>	<b>Preñez por IA</b>
Negativas	3/33 (9,09%)	9/34 (26,47%)	49/184 (26,63%)
Positivas	30/33 (90,91%)	25/34 (73,53%)	135/184 (73,37%)

P>0,05

## **10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

La seroconversión anual en el campo de recría analizado fue de un 39,8% con un intervalo de confianza entre 30,5% y 49,0%. Se pudo observar que existe un ingreso elevado de animales jóvenes seropositivos al VLB, lo que determina que la dinámica de seroconversión se vea influenciada por las medidas de manejo del establecimiento. Si bien no existían estudios similares en otros campos de recría del Uruguay, era de esperar que la prevalencia fuera algo similar a los estudios realizados en el ganado lechero en cuencas del sur del país (prevalencias que van desde el 11 al 77%). Sin embargo, al ser animales jóvenes los analizados en el presente trabajo (aproximadamente 8 meses), el porcentaje de seropositivos encontrado al inicio del estudio (45%) fue algo superior a lo que se esperaba (10-20%) teniendo en cuenta trabajos previos. En Uruguay, Furtado y col. (2013), encontraron una seroprevalencia contra el VLB del 10,4% en animales adultos de pequeños productores lecheros de la cuenca centro-sur del país y en Argentina Gutiérrez y col. (2011) encontraron una seroprevalencia de 11% en animales de 9 meses de edad y 17% en animales a los 18 meses de edad. En este sentido, los hallazgos de la presente investigación, con un 45% de animales seropositivos a los 8 meses de edad, se podría explicar principalmente por el hecho de que Uruguay históricamente vende vaquillonas Holando a distintos países del mundo, donde se les exige que sean seronegativas a Leucosis Bovina, lo que podría determinar una selección de los animales positivos en el rodeo lechero nacional. Esta temática preocupa a las autoridades sanitarias del Uruguay y hasta el momento no se ha encontrado una solución clara y eficaz. En este caso, algunos de los productores que envían animales al campo de recría estudiado, venden ocasionalmente vaquillonas para exportación. Además rodeos con una alta cantidad de animales infectados, condiciona a la aparición de la infección en individuos más jóvenes (DiGiacomo, 1992; Monti y col., 2007), pudiendo asociarse la alta prevalencia encontrada a estas situaciones.

La tasa de seroconversión de la enfermedad obtenida luego de 12 meses de trabajo (39,8%), también fue superior a lo esperado, teniendo en cuenta sobre todo las buenas prácticas higiénicas de trabajo utilizadas por los funcionarios del campo evitando el contagio y la propagación de enfermedades entre los animales. Para esto, la rutina del establecimiento se basa en desinfectar los materiales por inmersión en productos químicos, luego de cada maniobra que se utilicen instrumentos quirúrgicos, cortantes o agujas. De esta manera se intenta inactivar el virus y evitar el contagio entre animales. Si bien algunos desinfectantes comerciales son recomendados para inactivar partículas virales, es cuestionable su eficacia para la eliminación de viriones presentes en el interior de las células, como es el caso de VLB donde incluso el virus está integrado como provirus en el genoma celular. Por otro lado, la presencia de materia orgánica acumulada en el desinfectante, podría disminuir la eficiencia del producto. En este sentido, se deben realizar investigaciones contundentes que demuestren la utilidad práctica de la desinfección por inmersión de agujas e instrumental para inactivar el virus de la Leucosis bovina. Comparando estos resultados con trabajos similares realizados recientemente en Argentina, Gutiérrez y col. (2011) encontraron una tasa de transmisión de 24% en 27 meses, lo que nos permite deducir que la tasa del 39,8% (12 meses) obtenida en la presente investigación, es claramente superior y que otras causas pueden estar influyendo en la transmisión de la Leucosis bovina en el campo de recría. En este

sentido, Gutiérrez y col. (2011), encontraron que aun aplicando prácticas de manejo tendientes a evitar la transmisión horizontal iatrogénica del VLB, no observaron cambios significativos en la prevalencia luego de 3 años de estudio en un rodeo cerrado en Argentina. Sin embargo, en un trabajo realizado en Virginia (Estados Unidos) con rodeos lecheros, se logró reducir la prevalencia del virus de un 44% a un 17% en dos años instaurando el uso de una aguja y un guante de tacto por animal, desinfectando material de tatuado, utilizando descorne eléctrico, sustituto lácteo y tratamiento térmico del calostro previa administración (Sprecher y col., 1991).

La incidencia serológica de 25% encontrada en la primera sangría, coincidió con el período de mayor manejo de los animales, lo que pudo haber determinado una mayor seroconversión por transferencia de sangre infectada entre los animales. La transmisión horizontal del virus por vacunaciones, descornes, tactos y cirugías, es una de las principales vías de transmisión de la Leucosis bovina (Mammerickx y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997). Aunque también se debe tener en cuenta que en el caso de VLB, existe un periodo ventana de 2 a 8 semanas luego de la infección (Toma y col., 1990), donde pudo haber animales que ingresaron ya infectados al campo de recría, pero que no fueron detectados por ELISA en el primer muestreo realizado al ingreso al campo. En infecciones recientes donde aún no se pueden detectar niveles de anticuerpos en suero o cuando quedan dudas sobre la capacidad de las técnicas serológicas en animales con bajo títulos de anticuerpos, es útil el diagnóstico molecular mediante PCR, en busca del provirus (OIE, 2012). Esto resulta una limitante en el presente trabajo. Sin embargo, y para minimizar los resultados falsos negativos, se utilizó un kit de ELISA comercial con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (VMRD, cod. 5505.20, WA, USA).

El pico de 20% de seroconversión observado en la quinta sangría (aproximadamente 18 meses de iniciado el estudio), presenta como antecedentes las medidas de manejo reproductivas (concentración de animales para detección de celo dos veces al día, inseminación artificial, diagnóstico de gestación y repaso con toros). Esto podría estar relacionado directamente con la mayor transmisión de la enfermedad en este período (Giraud y col., 2010), aunque se pudo constatar que las medidas de manejo aplicadas en el campo son rigurosas y tendientes a evitar la diseminación por esta vía. No se puede descartar la posible transmisión durante el entore, ya que un 57 % de los toros utilizados eran seropositivos y por lo tanto potencialmente capaces de excretar el virus por el semen (Cañibano, 2011). Se considera que la utilización de inseminación artificial en vaquillonas disminuye la prevalencia del VLB, en comparación con los que utilizan monta natural (Erskine y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito que existe una depresión del sistema inmunológico en el periparto que se cree asociada a factores endócrinos y nutricionales (Goff y Horst, 1997; Vangroenweghe y col., 2005; Lamote y col., 2006; Rama y col., 2012). Se ha visto que la prostaglandina E2 es inmunosupresora, inhibiendo la producción de IL-12 por los macrófagos, la producción de citoquinas tipo 1 (IL-2 e IFN gamma) por las células T CD4+ y suprime la proliferación de células T. Además, la producción de prostaglandina E2 y el cambio en las funciones de los macrófagos contribuyen a la supresión de la respuesta mediada por células en animales con enfermedad avanzada (Kabeya y col., 2001). También ha sido demostrado que el tratamiento con corticoides y prolactina en combinación con la insulina, estimula la expresión del VLB en ensayos con líneas celulares en cultivo (Niermann y Buehring, 1997). Si bien



son experimentos *in vitro*, podría ser importante del punto de vista práctico, ya que ambas hormonas aumentan alrededor del parto.

Por lo expresado en los párrafos anteriores y relacionado a la transmisión de la LBE, se puede deducir que sí la iatrogenia es la vía principal más aceptada de transmisión de la enfermedad (Hopkins y DiGiacomo, 1997), las medidas de manejo no están siendo suficientes para detener la propagación viral u otras vías de transmisión están jugando un rol más importante en la diseminación del virus. En este sentido, se ha demostrado la importancia de vectores mecánicos en la propagación viral entre animales (Manet y col., 1989). Por lo tanto, en el caso de Uruguay, no se podría descartar entonces la posible transmisión horizontal por tábanos y moscas de los cuernos. Si bien en el establecimiento estudiado, se realiza el control estricto de estos insectos, las altas cargas encontradas en determinadas épocas del año, podría determinar un aumento en la transmisión de LBE. Por otro lado, algunos autores han sugerido que el contacto directo entre animales podría estar jugando un rol crítico en la transmisión viral. Sargeant y col. (1997), demostraron una significativa disminución en la prevalencia luego de tres años de completa separación física entre los animales negativos y positivos. Gutiérrez y col. (2011) sugieren diseñar una estrategia alternativa basada en la segregación selectiva de los animales de acuerdo a su carga proviral en sangre periférica. En este sentido, sí el contacto directo entre animales es una vía de transmisión realmente crítica y quizás más relevante que la iatrogenia, se podría discutir la real eficacia de la estrategia utilizada por algunos países, donde una de las propuestas de control de la enfermedad se basaría en la identificación y manejo diferencial de los rodeos seropositivos y seronegativos en un mismo establecimiento con los animales en contacto físico.

Analizando la seropositividad como indicador de infección y los parámetros estudiados en este trabajo, no se encontraron diferencias significativas en la manifestación del celo y tampoco en ganancia de peso durante el periodo de un año. Sí se encontraron diferencias significativas en la tasa de concepción entre animales negativos y positivos en el segundo período reproductivo (Noviembre-Diciembre). La misma fue 27,2% más alta en los animales seronegativos. Actualmente todavía no existe un consenso internacional en cuanto al impacto del VLB en relación a este indicador. Algunos autores han encontrado que la tasa de concepción de animales seropositivos fue un 7% menor que la de los animales seronegativos (VanLeeuwen y col., 2010). Por otra parte Kale y col. (2007) no observaron diferencias en la performance reproductiva entre animales seropositivos y seronegativos. En este último estudio se analizó el número de inseminaciones necesarias por preñez en animales seronegativos (1,50) y seropositivos (1,52), no encontrándose diferencias significativas ( $p=0.88$ ). Contrario a estos resultados, en el presente ensayo el número de servicios requeridos para lograr una preñez en el periodo de noviembre fue de 1,46 y 2,35 en los animales seronegativos y seropositivos respectivamente. En este sentido, García y col. (2000) también encontraron que las vacas seropositivas requirieron mayor número de servicios que las vacas seronegativas.

El hecho de que se haya encontrado diferencias significativas en la tasa de concepción solamente en el período Noviembre-diciembre y no en el periodo Junio-Julio entre animales seronegativos y seropositivos (Tabla 4) no pudo ser explicado en este trabajo. Podría quizás deberse a mayores cargas virales presentes en los

animales seropositivos según la época del año, lo que determine un mayor impacto en la tasa de concepción. Durante la época más cálidas, la presencia de insectos hematófagos es notoriamente más elevada, pudiendo producirse reinfecciones de los animales positivos, y por lo tanto el aumento de la carga viral (efecto *booster*). Si esto fuera así, una mayor carga viral coincidiría con el segundo periodo reproductivo en el presente estudio. Esta hipótesis no ha sido estudiada y debería ser analizada en futuras investigaciones. En el presente trabajo, se clasificó en 3 rangos los títulos de anticuerpos en los animales seropositivos (débiles, moderados y fuertes). Esto indirectamente reflejaría la carga viral en los animales infectados (Gutiérrez y col., 2012). Sin embargo las diferencias encontradas en los índices reproductivos según el grado de seropositividad, no fueron significativas (Tabla 5). Factores nutricionales y de manejo también podrían explicar las diferencias encontradas en la tasa de concepción en ambos periodos. Para verificar esto, se comparó la tasa de concepción global entre todos los animales de cada periodo, no encontrándose diferencias significativas en Julio-Julio comparados con Noviembre-Diciembre (Tabla 4).

En conclusión, este trabajo sugiere que, independientemente de la vía de contagio, los campos de cría podrían estar participando de manera importante en la propagación de la enfermedad entre los animales de distintos productores e influyendo de manera negativa en la performance reproductiva de los animales. A partir de los resultados obtenidos, más investigaciones deben ser realizadas buscando identificar las vías más importantes de transmisión y si en todos los campos de cría la dinámica de transmisión es similar, con el fin de disminuir la propagación del virus entre los productores lecheros de la zona.

## **11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abreu, V.L.V., Silva, J.A., Modena, C.M., Moreira, É.C., Figueiredo, M.M.N. (1990). Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 42:203-210.
2. Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Marozzi, A., Cavalleri, D., Peri, E., Poli, G., Ginelli, E. (1993). Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 54:373-378.
3. Alfonso, R., Almansa, J.E., Barrera, J.C. (1998). Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogotá savannah and the Ubaté and Chiquinquirá Valleys, Colombia. *Rev. Sci. Tech.* 17:723-732.
4. Álvarez, N., Oriani, D.S. (2000). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta diagnóstica de leucosis enzoótica bovina. *Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa.* p. 104-109. Disponible en: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n02a14alvarez.pdf>  
Fecha de consulta: 15/08/14.
5. Ballagi-Pordany, A., Klintevall, K., Merza, M., Klingeborn, B., Belak, S. (1992). Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. (B).* 39: 69-77.
6. Bartlett, P.C., Sordillo, L.M., Byrem, T.M., Norby, B., Grooms, D.L., Swenson, C.L., Zalucha, J., Erskine, R.J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Javma.* 244(8):914-922.
7. Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees).* 2a ed. Paris, Ed. OIE, p. 723-738.
8. Bendixen, H.J. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: Leukosis Enzootica bovis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 108:1241-1267.
9. Betancur, C., Rodas, J. (2008). Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev. MVZ Córdoba.* 13(1):1197-1204.
10. Brasseur, R., Cornet, B., Burny, A., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J.M. (1988). Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *Aids. Res. Hum. Retrovir.* 4:83-90.
11. Burny, A. (1996). Comparative approach to retroviral vaccines. *Aids. Res. Hum. Retrovir.* 12(5):389-392.

12. Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van den Broeke, A., Willems, L., Thomas, R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32:149-70.
13. Cañibano, E.O., Schang, S., Gutierrez, S.E. (2011). Leucosis Enzootica Bovina. Facultad de ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina. 30p.  
Disponible en: [http://biblio.unicen.edu.ar/?p=get\\_document&id=59286-1](http://biblio.unicen.edu.ar/?p=get_document&id=59286-1)  
Fecha de consulta: 15/08/14.
14. Carvalho, A., Almeida, J.C., Guimarães, L., Estanislao P., Freitas, J.C., Santos, C. (1998). Anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina em animais da raça leiteira importados do Uruguay. *Pesq. Agrop. Gaúcha* 4:35-38.
15. Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *REDVET.* 6(7):2-25.  
Disponible en:  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf>  
Fecha de consulta : 01/08/14.
16. Collazo, L., Sienra, R., Irabuena, O., Guarino, H., Navarro, M., Lavarello, L. (2002). Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado lechero. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p. 322-325.
17. Costa, M., Bussoni, A., Mello, R., Santoro, M., Rodríguez, D., Landa, F. (2010). Campos de recría en el Uruguay: gestión de los recursos y formas contractuales. *Agrociencia (Uruguay)*. 14(2):66-76.
18. De la Sota, M.D. (2004). Manual de procedimientos Leucosis Bovina Enzootica, Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. Disponible en:  
[http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manual\\_es\\_de\\_procedimiento/09%20Leucosis.pdf](http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manual_es_de_procedimiento/09%20Leucosis.pdf) Fecha de consulta: 28/07/14.
19. Del Fava C., Pituco, E.M. (2004). Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *O Biológico.* 66:1-8.
20. DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet. Med.* 87(3):263-271.
21. Emanuelson, U. Scherlinga, K., Petterssonc, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 12: 121-131.

22. Erskine, R.J., Bartlett, P.C., Byrem, T.M., Render, C.L., Febvay, C., Houseman, J.T. (2012). Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J. Dairy Res.* 79: 445-450.
23. Felmer, R., Zúñiga, J., Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38(2):137-141.
24. Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studdert, M., White, D. (1992). *Retroviridae*. En: Fenner y col. *Virología Veterinaria*. Zaragoza. Acribia. p. 571- 600.
25. Fernandes, C.H.C., de Melo, L.E.H., Tenorio, T.G.S., Mendes, E.I., Fernandes, A.C.C., Ramalho, T.R.R., Moura Sobrinho, P.A., Mota, R.A. (2009). Soroprevalencia e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. *Arq. Inst. Biol. (Sao Paulo)*. 76(3):327-334.
26. Ferrer, J.F. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24:1-68.
27. Ferrer, J.F., Piper, C.E., Abt, D.A., Marshak, R.R. (1977). Diagnosis of bovine leukemia virus infection: evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. *Am. J. Vet. Res.* 38:1977-1981.
28. Flores, E.F., Weiblen, R., Oliveira, C., Kreutz, L.C. (1992). Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soros de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *A Hora Veterinária*. 12:5-8.
29. Florins, A., Gillet, N., Asquith, B., Boxus, M., Burteau, C., Twizere, J.C., Urbain, P., Vandermeers, F., Debacq, C., Sanchez-Alcaraz, M.T., Schwartz-Cornil, I., Kerkhofs, P., Jean, G., Thewis, A., Hay, J., Mortreux, F., Wattel, E., Reichert, M., Burny, A., Kettmann, R., Bangham, C., Willems, L. (2007). Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front. Biosci.* 12:1520-1531.
30. Fukuyama, S., Kodama, K., Hirahara, T., Nakajima, N., Takamura, K., Sasaki, O., Imanishi, J. (1993). Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 55:99-106.
31. Fulton, B.E., Portella, M., Radke K. (2006). Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. *J. Virol.* 80(16):7873.
32. Furtado, A., Rosadilla, D., Franco, G., Piaggio, J., Puentes, R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria*. 49(191):29-37.

33. García F., Calderón A., Almansa J., Garzón C., Márquez D., Jiménez G., Jaramillo F. (2000). Efectos de la infección por el virus de la leucosis bovina sobre la producción y reproducción en un hato lechero. *Rev. FMVZ.* 47(2):39-44.
34. 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.* 4:18.
35. Giraudo, J., Bérnago, E., Schneider, M., Magnano, G., Macías, A., Sticotti, E., Maciό, M. Leucosis Enzoόtica Bovina. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.  
Disponible en:  
[http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Prod\\_Animal/Documentos/2012/Sanidad%20Ganadera/Giraudo%20et%20al%202010%20R%C3%ADo%20Cuarto.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Prod_Animal/Documentos/2012/Sanidad%20Ganadera/Giraudo%20et%20al%202010%20R%C3%ADo%20Cuarto.pdf) Fecha de consulta: 16/08/14.
36. Goff, J.P., Horst R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:1260-1268.
37. González, E.T., Olivia, G.A., Varela, A., Bonzo, E., Licursi, M., Etcheverrigaray, M.E. (2001). Leucosis Enzoόtica Bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria.* 21(2):12-20.
38. Grau, M., Monti, G. (2010). Between and within-herd seroprevalence for bovine leukosis virus infection in dairy herds from southern Chile. *Arch. Med. Vet.* 42:87-91.
39. Guarino, H. (2001). Plan Piloto de monitoreo en lechería. Principales enfermedades infecciosas en la cuenca lechera de Florida. *Rev. Plan Agrop.* 96:46-48.
40. Gutierrez, G. (2010). Estudio de la dinámica de la infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalência. Disponible en: Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, 165 p. Disponible en:  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4809\\_Gutierrez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4809_Gutierrez.pdf)  
Fecha de consulta: 16/08/14.
41. Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Dos Santos, M.J., Rondelli, F., Fondevila, N., Trono, K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 151:255–263.
42. Gutiérrez, G., Carignano, H., Alvarez, I., Martínez, C., Porta, N., Politzki, R., Gammella, M., Lomonaco, M., Fondevila, N., Mario Poli, M., Trono, K.

- (2012). Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet. Res.* 8:187.
43. Hopkins, S.G., DiGiacomo R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 13:107-128.
44. Huber, N.L., DiGiacomo, R.F., Evermann, J.F., Studer, E. (1981). Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am. J. Vet. Res.* 42(9):1477-1481.
45. Islas, L.A., Inchaurtieta, S.C. (1990). Prevalencia de leucosis enzoótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla. *Monografías de Medicina Veterinaria.* 12(1). Disponible en: <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/10459/10515> Fecha de consulta: 17/08/14.
46. Jacobo, R., Storani, C., Cipolini, M., Martínez, D. (2007). Seroprevalencia de Leucosis bovina en rodeos lecheros de la provincia de Corrientes. *Rev. Vet.* 18:29-32.
47. Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62:287-312.
48. Johnson, R., Kaneene, J., Anderson, S. (1987). Bovine leukemia virus: duration of colostral antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 4:371-376.
49. Kabeya, H., Ohishi, K., Ohashi, K., Sugimoto, C., Amanuma, H., Onuma, M. (1996). An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine.* 14:1118-1122.
50. Kabeya, H., Ohashi, K., Onuma, M. (2001). Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63(7):703-708.
51. Kaja, R.W., Olson, C. (1982). Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Theriogenology.* 18:107-112.
52. Kale, M., Bulut, O., Yapkic, O., Gulay, M.S., Pehivanoglu, F., Ata, A., Yavru, S. (2007). Effects of subclinical bovine leukemia virus infections on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *Tdyskr. S. Afr. Vet. Ver.* 78(3):130-132.
53. Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., Burvenich, C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology.* 65:1082-1098.

54. Lewin, H.A., Bernoco, D. (1986). Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim. Genet.* 17:197-207.
55. Luciw, P., Leung, N. (1992). Mechanisms of Retrovirus Replication. En: Luciw, P., Leung, N. *The Retroviridae*. New York, Plenum, p.159-298.
56. Lüchter, F. (2004). Enfermedades crónicas. En Lüchter, F.: *Introducción al estudio de las Enfermedades Infecciosas. Enfermedades infecciosas de los Ruminantes*. Buenos Aires. Editorial Universitaria de la Patagonia. p. 123-143.
57. Machado, F., Van der Laan, C.W., Schuch, L.F., Coelho, D. (1998). Infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). *Cienc. Rural.* 28(1):163-172.
58. Mammerickx, M., Portetelle, D., de Clercq, K, Burny, A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res.* 11:353-358.
59. Manet, G., Guilbert, X. Roux, A., Vuillaume, A., Parodi, A.L. (1989). Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22(3):255-263.
60. Marín, C., de López, N.M., Alvarez, L., Lozano, O., España, W., Castaños, H., León, A. (1978). Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.* 9:743-746.
61. Marshak, R.R. (1968). Criteria for the determination of the normal and leukotic state in cattle. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:243-263.
62. Martín, D., Arjona, A., Viana, M., Soto, I., Barquero, N., Gómez-Lucía, E. (2000). Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzoótica. *Med. Vet.* 17:133-141.
63. Mederos, A., Irigoyen, D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. XXVI Jorn. Urug. Buiatría. Paysandú, Uruguay. p. 19-20.
64. Melo, L.E.H. (1992). Leucose Enzoótica dos Bovinos. Prevalença da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 29:157-158.
65. MERCOSUR/GMC/RES N° 9/96. Normas sanitarias para la importación y exportación de animales bovinos y bubalinos entre los estados parte del MERCOSUR. Buenos Aires, 13 p. Disponible en:



[http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas\\_web/Resoluciones/ES/Res\\_009\\_096\\_.PDF](http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_009_096_.PDF) Fecha de consulta: 10/09/14.

66. MGAP- DIEA (2013). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU;,%EF%BF%BD> Fecha de consulta: 30/01/13.
67. Miller, J.M., Van Der Maaten, M.J. (1978). Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann. Rech. Vet.* 9:871-877.
68. Monke, D.R. (1986). Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188(8):823-826.
69. Monti, G.E, Frankena, K., De Jong, M.C.M. (2007). Evaluation of Natural Transmission of Bovine Leukaemia Virus within Dairy Herds of Argentina. *Epidemiol. Infect.* 135 (2):228-237.
70. Nagaoka, Y., Kabeya, H., Onuma, M., Kasai, N., Okada, K., Aida, Y. (1999). Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Res.* 59:975-981.
71. Nava, Z., Obando, C., Molina, M., Bracamonte, M., Tkachuk, O. (2011). Seroprevalencia de la leucosis enzoótica bovina y su asociación con signos clínicos y factores de riesgo en rebaños lecheros del estado barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Cienc. Vet.* 52(1). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-65762011000100003](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762011000100003) Fecha de consulta: 10/09/14.
72. Niermann, G.L., Buehring, G.C. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology.* 239:249-258.
73. Onuma, M., Hodatsu, T., Yamamoto, S., Higashihara, M., Masu, S., Mikami, T., Izawa, H. (1984). Protection by vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 45:1212-1215.
74. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal (2012). Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 7a. ed. Paris, OIE, 1404 p.
75. Orloff, S.L., Wallingford J.C., Mc Dougal J.S. (1993). Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type I in Human Milk: Effects of Intrinsic Factors in Human Milk and of Pasteurization. *J. Hum. Lact.* 9:13-17.
76. Pelzer, K.D. (1997). Economics of Bovine Leukemia Virus Infection. *Vet. Clin. Am.-Food Anim. Pract.* 13(1):129-141.
77. Portetelle, D., Dandoy, C., Burny, A., Zavada, J., Siakkou, H., Gras-Masse, H., Drobecq, H., Tartar, A. (1989). Synthetic peptides approach to

- identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology*. 169:34-41.
78. Pyeon, D., O'Reilly, K. L., Splitter, G. A. (1996). Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing on persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70: 5706-5710.
79. Rama, G. (2009). Aspectos sobre el diagnóstico de Leucosis Enzoótica Bovina. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay. 40 p.
80. Rama, G., Meikle A., Puentes, R., Moratorio, G., Nicolini, P., Pessina, P., Furtado, A., Pritsch, O. (2010). Estudio comparativo para tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades sobre la formula leucocitaria. *Veterinaria*. (Montevideo). 46:177-180.
81. Rama, G., Pritsch, O., Adrien, M.L., Moratorio, G., Meikle, A. (2012). Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria* (Montevideo). 48(185):11-17.
82. Ressang, A.A., Mastenbroek, N., Quak, J., Van Griensven, L., Calaft, J., Hilgers, J., Hageman, C., Souissi, T., Swen, S. (1974). Studies on bovine leukaemia 1. Establishment of type C virus producing cell lines. *Zentralbl. Veterinarmed.* 21: 602-617.
83. Ristau, E., Beier, D., Wittmann, W. (1987). The course of infection with bovine leukosis virus (BLV) in calves after the administration of cell extract from lymph node tumors of BLV-infected cattle. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 41:323-331.
84. Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. 3(7):1210-1248.
85. Rola-Łuszczak, M., Finnegan, C., Olech, M., Choudhury, B., Kuźmak, J. (2013). Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J. Virol. Methods*. 189(2):258-264.
86. Santos, G.R., de Oliveira, J.M.B., Brandespim, D.F., Oliveira, A.A. da F., Mota, R.A., Pinheiro Júnior, J.W. (2013). Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 35(4):371-377.
87. Sargeant, J.M., Kelton, D.F., Martin, S.W., Mann, E.D. (1997). Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 31:211-221.

88. Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M., Levy, D. (1994). In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J. Virol.* 68:4589-4596.
89. Shettigara, P.T., Samagh, B.S., Lobinowich, E.M. (1989). Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Can. J. Vet. Res.* 5:108-110.
90. Sienra, R., Nuñez, A., González, A., Ceretta, M.E., Guarino, H., Morón, C. (1998). Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado Lechero. XXVI Jorn. Urug. Buiatría, Paysandú, Uruguay. p. 23-25.
91. Sienra, R., Guarino, H., Gil, A. (2000). Influencia de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica sobre la Reproducción y Producción de Rodeos Lecheros. INIA. Avances de Investigación en Sanidad Animal. Serie FPTA-INIA. 1:21-38.
92. Sprecher, D.J., Pelzer, K.D., Lessard, P. (1991). Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199(5):584-588.
93. Straub, O.C. (1982). Transmission studies from leukotic cattle to sheep using secretions, excretions, breath and skin scrapings. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 15:299-309.
94. Thurmond, M.C., Carter, R.L., Puhr, D.M., Burridge, M.J. (1982). Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhod infection. *Am. J. Vet. Res.* 43:1152-1155.
95. Toma, B., Eliot, M., Savey, M. (1990). Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* 9(4):1077-1119.
96. Trainin, Z., Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J. Vet. Med.* 60:94-105.
97. Trono, K.G., Pérez-Filgueira, D.M., Duffy, S., Borca, M.V., Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 83:235-248.
98. Trueblood, E.S., Brown, W.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Stone, D.M., McElwain, T.F. (1998). B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J. Virol.* 72:3169-3177.

99. Van der Maaten, M.J., Miller, J.M. (1977). Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. *Adv. Comp. Leukemia Res.* p. 29-32.
100. Vangroenweghe, F., Lamote, I., Burvenich, C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:283-293.
101. VanLeeuwen, J.A., Haddad, J.P., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Tiwari, A., Tremblay, R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 94:54-64.
102. Yakobson, B., Brenner, J., Ungar-Waron, H., Trainin, Z. (1998). Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 207-218.
103. Zaffaroni, R., Piaggio, J., Nuñez, A., de Freitas, J., Suanes, A., Cernicchiaro, N., Gil, A. (2007). Evolución de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzootica en la cuenca lechera sur del Uruguay. V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay. p. 150-151.