

Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Licenciatura en Biología.

Orientación Ecología.

**ASPECTOS SOBRE EL DIAGNÓSTICO DE LEUCOSIS
ENZOÓTICA BOVINA**

TESIS DE GRADO

Estudiante Br. GONZALO RAMA

Tutor Ana Meikle

Co-Tutor Otto Pritsch

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2009

Agradecimientos.

Este trabajo se realizó en conjunto entre la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo y el Laboratorio de Técnicas Nucleares de Facultad de Veterinaria de la República. Para llevar a cabo este trabajo conté con la colaboración y dedicación de un grupo de personas sin la cual hubiese sido imposible llegar a tal fin, por esto agradezco a Gonzalo Moratorio, Paula Nicolini, Rodrigo Puentes, Agustín Furtado, Paula Pesina y Lourdes Adrien. Gracias a Otto por confiar en esta interacción, por la paciencia y espíritu solidario. Gracias a Ana por impulsar esto, por los aportes a mi crecimiento académico y humano, por el empuje permanente, por llevar adelante al LTN y dejarme formar parte.

Gracias a todos los que integran el LTN.

Gracias a mi familia y amigos por ser parte de esto.

Tabla de contenido.	Pag.
1. Resumen	4
2. Introducción.	6
2.1. Importancia del sector lacteo en Uruguay	6
2.2. Leucosis Enzoótica Bovina	8
2.2.1. <u>Importancia de la enfermedad</u>	8
2.2.2. <u>Antecedentes en Uruguay</u>	8
2.2.3. <u>Virus de la Leucosis Bovina (VLB)</u>	9
2.2.4. <u>Etiopatogenia de la Enfermedad</u>	11
2.2.5. <u>Diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina</u>	11
3. Justificación	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
5.1. Objetivo General	15
5.2. Objetivos Específicos	15
6. Materiales y Métodos	16
6.1.1. <u>Población de estudio</u>	16
6.2. Experimento 1. Análisis comparativo de las metodologías diagnósticas IDGA, ELISA y PCR.	16
6.2.1. <u>Muestras</u>	16
6.2.2. <u>IDGA</u>	17
6.2.3. <u>ELISA</u>	17
6.2.4. <u>Extracción de ADN y PCR</u>	18
6.2.5. <u>Cálculos de sensibilidad y especificidad</u>	19
6.3. Recuento Leucocitario Total (RLT) y Diferencial (RLD)	19
6.3.1. <u>Muestras</u>	19
6.3.2. <u>Recuento Leucocitario Total (RLT) y Diferencial (RLD)</u>	19
6.3.3. <u>Análisis estadístico</u>	20
6.4. Experimento 3. Título de anticuerpos contra VLB alrededor del parto	21
6.4.1. <u>Análisis estadístico</u>	21
7. Resultados	22
7.1. Experimento 1. Estudio comparativo de IDGA, ELISA y PCR	22
7.2. Experimento 2. Recuento Leucocitario Total y Diferencial	25
7.3. Experimento 3. Título de Anticuerpos contra VLB	28
8. Discusión	29
9. Conclusiones	33
10. Referencias Bibliográficas	34

Resumen

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), enfermedad causada por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), presenta una alta prevalencia entre el ganado lechero en nuestro país, teniendo importantes implicancias a nivel productivo. Este trabajo busca profundizar en el conocimiento de la ecología y epidemiología del VLB; específicamente de la interacción del patógeno y el huésped y otras patologías concurrentes en términos de respuesta inmune y los cambios que ésta conlleva durante el parto. El control de la LEB está basado principalmente en un correcto diagnóstico de los animales positivos. En este trabajo comparamos la sensibilidad y especificidad de las metodologías de inmunodifusión en gel agar (IDGA), ensayo por inmuno-absorción ligado a enzima (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tradicional para el diagnóstico de la LEB en 65 vacas Holando. La sensibilidad y especificidad obtenidas tomando al ELISA como método de referencia, fueron de 72 % y 100 %, para IDGA y 94 % y 77 % para PCR, respectivamente. Por otra parte, al tomar PCR como método de referencia, la sensibilidad y especificidad fueron 45 % y 100 % para IDGA y 61 % y 97 % para ELISA, respectivamente. El análisis comparativo de los métodos mostró que la PCR presentó mayor sensibilidad, seguido por ELISA e IDGA. Asimismo, analizamos el porcentaje de animales positivos que presentan linfocitosis y cambios en la fórmula leucocitaria en dos tambos, de los cuales sólo uno disponía de registros sanitarios diarios. Los resultados obtenidos muestran que el promedio de linfocitos aumenta significativamente en los animales infectados con VLB, observándose también que la presencia de enfermedades concurrentes afecta de forma relevante el número total de leucocitos. Finalmente, estudiamos la variación de la concentración de anticuerpos antes y después del parto mediante la técnica de ELISA, en vacas infectadas con VLB. Encontramos que los anticuerpos específicos anti-VLB

disminuyen en los días cercanos al parto, pudiendo llegar a niveles no detectables por los métodos serológicos de diagnóstico, lo que aumenta la ocurrencia de falsos negativos. La generación de conocimiento científico sobre estos temas en nuestro país promoverá un manejo más racional de los recursos resultando en un beneficio económico para el productor a mediano y largo plazo, mejorando los planes de manejo del agro-ecosistema lechero.

Introducción

Importancia del sector lácteo en el Uruguay

El sector lácteo es responsable del 15% del producto bruto agropecuario. La producción per cápita es indudablemente la más alta de toda América, estando en el orden de los 438 litros por habitante/año. El consumo por habitante también es de singular importancia, llegando a 228 litros por habitante/año. La producción ha tenido un crecimiento muy fuerte en los últimos 20 años, a una tasa promedio del 5% al 7% anual. El fuerte aumento de la producción lechera fue consecuencia de un incremento constante de la productividad, acompañado de un aumento de escala, predominantemente en términos de vacas en ordeño. La aplicación de la tecnología llevó a pasar de 1.695 a 3.388 litros por vaca en producción en los últimos 15 años, y hoy, más del 50% del área lechera tiene pasturas mejoradas. Su uso intensivo, con implementación de concentrados y el uso de ensilados, ha permitido crecer la producción por hectárea (Bonifacino, 2008)

La industria láctea uruguaya alcanzó niveles récord de exportación en 2007 al colocar 175 mil toneladas por un valor de 351,6 millones de dólares. El aumento en volúmenes con respecto al 2006 fue del 17,4 % mientras el aumento de ingreso de divisas fue del 27,7%. Los principales importadores fueron México (31 %), Venezuela (15%), Cuba (10%), Federación Rusa (6%) y Brasil (5%), cuyas compras conjuntas ascendieron a 235 millones de dólares. Por su parte, la industria láctea realizó fuertes inversiones de manera tal de adecuarse a los mercados de exportación cada vez más exigentes. Nuestro país se ha transformado en una nación exportadora de lácteos, al extremo de que el 60% de la producción se

destina a mercados exteriores. Los productos que se exportan son, fundamentalmente, leche en polvo, leche UHT, manteca, quesos, quesos rallados y en polvo, preparaciones alimenticias a base de productos lácteos, caseína y caseinatos, crema y dulce de leche (DIEA- MGAP, 2008). En los últimos años se han agregado a ese grupo de productos nuevos desarrollos tecnológicos, tales como derivados del suero e ingredientes de base láctea para las industrias de la alimentación y de cosmética.

Si bien las necesidades de la región sustentan perspectivas de crecimiento para el sector lechero, el panorama de los mercados internacionales es confuso, no solo por la crisis económica mundial sino por las trabas comerciales crecientes que pueden poner límites a la industria láctea en su capacidad de captar la mejora del mercado regional. Estas trabas comerciales tanto para subproductos lácteos como para la exportación de ganado lechero en pie, implican en la mayor parte de los casos la inocuidad del producto, especialmente en lo que tiene que ver con la presencia de patógenos. Por otro lado, la existencia de enfermedades infecciosas (bacterianas, virales o parasitarias) a nivel del ganado bovino puede incidir directamente en la disminución de los niveles de producción.

Una de las patologías más prevalentes en el ganado bovino lechero, con implicancias directas en la disminución de la calidad sanitaria, disminución de producción y generación de trabas comerciales sanitarias es la Leucosis Bovina Enzoótica.

Leucosis Enzoótica Bovina

Importancia de la enfermedad

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa de carácter crónico, producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que infecta preferencialmente a los linfocitos B, causando una transformación maligna que puede concluir en una leucemia crónica o linfosarcoma (Ferrer, 1980). Afecta a bovinos en general, pero las producciones intensivas como los tambos son las más afectadas (de la Sota, 2004). La LEB tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico en la producción debido a la mortalidad causada directamente por la patología tumoral, a la alteración del sistema inmune del ganado infectado (que produce el aumento concomitante de otras enfermedades infecciosas) y a las restricciones impuestas a la exportación de ganado en pie, semen y/o embriones infectados (Trainin y col., 2005). Asimismo, pueden detectarse rastros de linfocitos infectados con VLB (ADN proviral) en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer y col., 2006), por lo que las restricciones podrían potencialmente extenderse a la exportación de estos productos.

Antecedentes en el Uruguay

Kantek-Navarro y col. en (1982) detectaron la presencia del VLB por IDGA en 18,3% de 482 muestras de suero de vacas de Uruguay importadas por la Cooperativa de Laticínios de Curitiba (CLAC). Durante el período 1992-1997 fueron analizadas por IDGA 19774 muestras de suero de vacas de Uruguay importadas

por el estado de Rio Grande do Sul (Brazil), de las cuales el 16.3% presentaron anticuerpos contra VLB (Van der Laan y col., 1999). 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 LEB fue de 20 %, presentando, el 77 % de los predios, algún caso positivo al virus (Mederos e Irigoyen, 1998). En un plan piloto de monitoreo de salud animal realizado en 1998 por la Facultad de Veterinaria se determinó un 46,6 % de seroprevalencia en 53 establecimientos muestrados en el departamento de Florida (Gil, A) (1998)¹. 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). Se sugirió que la falta de programas de control de esta enfermedad, así como la exigencia de libre de leucosis para la exportación animal, llevó a un aumento de su prevalencia en nuestro país (Acta 84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, CONAHSA, 2005)².

Virus de la Leucosis Bovina (VLB)

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un retrovirus exógeno que junto al virus T-linfotrópico humano (HTLV) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV) pertenecen al género deltavirus de la familia *Retroviridae*. Estos retrovirus exhiben *in vivo* linfotropismo y son caracterizados por las propiedades transformantes de una proteína viral reguladora única denominada Tax, la cual puede transactivar tanto genes virales como celulares (revisado por Poiesz, 1995). Algunos de los animales infectados con BLV pueden generar linfomas y/o proliferación de linfocitos B

¹ Comunicación personal

² www.mgap.gub.uy/dgsg/CONAHSA/ACTAS/Acta%2084.pdf

(denominado linfocitosis persistente) pero la mayoría del ganado infectado es portador sano del virus (Burny y col, 1988).

La partícula viral consiste principalmente en dos moléculas de ARN simple hebra, estabilizados mediante interacción con la nucleoproteína p12 (nucleocápside). Este complejo a su vez está rodeado por una estructura denominada cápside, formado por el autoensamblado de la proteína p24. Rodeando a la cápside se encuentra una malla de proteínas de matriz las cuales entran en contacto directo con una membrana celular formada por una bicapa lipídica la cual también incluye a la glicoproteína de envoltura Env la cual se cliva por proteólisis en gp30 transmembrana (TM) y en la glicoproteína de superficie gp51 (SU). El genoma viral codifica también para las enzimas transcriptasa reversa y proteasa, y para las proteínas reguladoras Tax y Rex.

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*. Cuando estas células infectadas se cultivan *in vitro*, usualmente en co-cultivo con ciertas líneas celulares, las partículas virales comienzan a producirse y aparecen en el sobrenadante de cultivo. Un aumento de esta producción de partículas virales ha sido reportado luego de la estimulación con mitógenos (Ressang y col, 1974).

Hasta el momento han sido reportados 4 genomas completos de VLB (aislado belga, japonés, australiano y argentino) a nivel mundial (Rice y col, 1984 ; Rice y col, 1985 ; Sagata y col., 1985 ; Coulston y col., 1990, Dube y col., 2000). En Argentina Monti y col. (2005) analizaron por RFPL 120 aislados diferentes encontrando que 117 correspondían al genoma argentino y 3 correspondían al australiano. La comparación del aislado argentino con los otros genomas disponibles muestra un porcentaje de variación de su secuencia nucleotídica de

aproximadamente 5%.

Etio-patogenia de la Enfermedad

La transmisión del VLB puede ser horizontal o vertical. La transmisión horizontal es considerada la más importante y generalmente ocurre por malas prácticas de manejo veterinario (iatrogénia), por contacto con sangre, mucosas, remanentes de tejidos infectados y por insectos hematófagos (Mammerickx y col., 1987; de la Sota, 2004). La transmisión vertical ocurre hasta en un 15 % de los casos y tiene lugar cuando una vaca infectada lo transmite a la progenie vía transplacentaria o vía digestiva a través del calostro (Martín y col., 2000).

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 (LP), 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); c) enfermedad tumoral propiamente dicha (leucemia / linfoma / linfofibrosarcoma), presente entre un 0.1 y 10 % de los animales infectados y que es la forma irremediablemente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988).

Diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Los animales que presentan linfoma pueden ser detectados mediante diagnóstico

clínico, pero aquellos infectados asintomáticos y/o con LP requieren de pruebas de laboratorio para realizar el diagnóstico. La detección serológica, mediante inmunodifusión en gel agar (IDGA) o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), de anticuerpos principalmente contra la glicoproteína gp51 de la envoltura viral, constituye el método más comúnmente usado para la identificación de animales infectados (Martín y col., 2000; González y col., 2001). Estas técnicas son reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (Beier, 2008) y aceptadas por la mayoría de los Gobiernos, incluido nuestro país, como pruebas oficiales para el diagnóstico de VLB. Por otra parte, se ha descrito el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método diagnóstico directo, que detecta secuencias del gen *env*, codificante de la glicoproteína gp51 del VLB (Ballagi-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006). Esta metodología también es aceptada actualmente por la OIE como prueba de diagnóstico de VLB, aunque en forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas mencionadas (Beier, 2008).

Se ha reportado que el método diagnóstico más sensible es la PCR, luego el ELISA, siendo IDGA la que detecta menor número de animales positivos (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2001; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007). Para el control de esta enfermedad es muy importante la unificación de criterios sobre el método diagnóstico a utilizar (Acta 84, CONAHSA, 2005), por lo que se debe conocer la sensibilidad y especificidad de los diversos métodos validados y disponibles. Guarino y col. (comunicación nacional, 1989) compararon los diagnósticos por IDGA, ELISA indirecto y ELISA por competición y determinaron un 10 % más de animales positivos mediante los dos ELISA, que por IDGA. Si bien IDGA, ELISA y PCR se encuentran disponibles en nuestro país, ya sea como método de aplicación oficial en el diagnóstico de VLB (IDGA) o en investigación

(ELISA y PCR), no hay reportes en Uruguay de estudios comparativos de estas tres herramientas en un mismo trabajo.

Varios reportes y manuales proponen que para el diagnóstico de la VLB se utilicen métodos serológicos en un período comprendido entre 2 semanas antes y un mes después del parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996). Se ha reportado que se detecta un mayor porcentaje de falsos negativos – utilizando IDGA como método de diagnóstico - en vacas que se encuentran cercanas al parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996). Esto se explica por un descenso de los anticuerpos maternos circulantes debido al transporte de los mismos hacia la glándula mamaria, en la producción de calostro. Como se mencionó anteriormente, el ELISA es un método más sensible que el IDGA, y se desconoce si existe una variación de títulos de anticuerpos determinados por ELISA en el periparto.

Durante muchos años las alteraciones hemáticas fueron consideradas como fase pretumoral de LEB y constituyeron la base del diagnóstico en los planes de control y erradicación de esta enfermedad. Sin embargo, con el desarrollo e introducción de 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, epidemiología y control de la LEB (Sienra y col., comunicación nacional, 1998), quienes mostraron que del conjunto de animales que presentaban leucocitosis, la mayor proporción eran VLB positivos por ELISA. Además, determinaron que los animales seropositivos tienen mayor promedio de leucocitos y linfocitos circulantes que los seronegativos, mientras que no encontraron diferencias significativas promedio con respecto a neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Por otro lado, Collazo y col.

(comunicación nacional, 2002) mostraron que la frecuencia de muestras con recuento de leucocitos totales aumentado es significativamente mayor en vacas seropositivas con respecto a sus congéneres seronegativos.

Debido a que el recuento celular de la línea blanca (recuento leucocítico diferencial, RLD) se ve afectado por otras enfermedades (no VLB), las investigaciones que tengan como fin estudiar los efectos de este virus sobre el RLD deben de registrar los eventos sanitarios de los animales. No hemos encontrado reportes respecto al porcentaje de animales positivos para VLB con linfocitosis y/o recuento celular de la línea blanca en animales clínicamente sanos y/o con registros sanitarios.

Justificación

Si consideramos a la ecología como la rama de la biología que estudia las interacciones de los seres vivos con el medio, su distribución y su abundancia, y cómo esas propiedades son afectadas por la interacción entre los organismos y el ambiente, esta propuesta esta enmarcada en la orientación Ecología debido a que este trabajo busca profundizar en el conocimiento de la ecología y la epidemiología del VLB; específicamente de la interacción del patógeno y el huésped y otras patologías concurrentes, así como los cambios inmunes a los que se ve sometida la vaca lechera durante el parto.

Teniendo en cuenta la importancia económica de la LEB en nuestro país y en el mundo, la generación de conocimiento científico de la misma en nuestro país promoverá un manejo más racional de los recursos resultando en un beneficio económico al productor a mediano y largo plazo sin que signifique grandes inversiones, lo que constituye el primer factor limitante para mejorar los planes de manejo del agro-ecosistema lechero.

Hipótesis

1. La PCR es un método de diagnóstico más sensible que el ELISA y la IDGA para detectar la infección por VLB.
2. El diagnóstico de leucocitosis y linfocitosis en animales infectados por VLB puede ser afectado por la incidencia de enfermedades concurrentes.
3. La concentración de anticuerpos específicos contra BLV (medida mediante la técnica de ELISA) en animales positivos a Leucosis varía cercano al parto por la inmunodepresión (concentración de anticuerpos en el calostro).

Objetivos

Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la Leucosis Bovina en nuestro país.

Objetivos Específicos

1. Comparar los métodos IDGA, ELISA y PCR para el diagnóstico de LEB.
2. Establecer el porcentaje de animales positivos que presentan linfocitosis y cambios en la fórmula leucocitaria en animales clínicamente sanos y con registros sanitarios diarios.
3. Determinar la cantidad de anticuerpos específicos anti-BLV en animales positivos a Leucosis alrededor del parto.

Materiales y Métodos

Población de estudio

El protocolo experimental fue realizado de acuerdo a las pautas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 115 vacas de raza Holando: 76 vacas, 3 a 7 años de edad, pertenecientes a un tambo localizado en el Departamento de Paysandú (Tambo I) y 39 vacas de 3 años, de un tambo del Departamento de Flores (Tambo II).

Experimento 1. Análisis comparativo de las metodologías diagnósticas IDGA, ELISA y PCR.

Muestras

En este se procesaron las mismas 65 muestras (sueros/ADN) obtenidas del Tambo I, mediante estas tres técnicas. Para obtener el suero y ADN se extrajeron 6 ml de sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) sin y con anticoagulante (K_2 EDTA), respectivamente. Para el posterior análisis de los sueros por IDGA y ELISA las muestras se centrifugaron antes de las 48 hs durante 10 min a 2000 rpm y luego se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C por 24 hs hasta que se procesaron.

IDGA

Los 65 sueros se procesaron utilizando la técnica de referencia de IDGA (Beier, 2008). La misma fue realizada utilizando un kit comercial, gentilmente cedido por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata – Argentina (aprobado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria, SENASA, Argentina, Exp. 41.285/87). Las muestras fueron procesadas siguiendo las indicaciones del fabricante (FCV-UNLP-Argentina). Se utilizó una solución de agar al 1% en buffer Tris-HCl con 8.5% de NaCl pH 8 y se sembró 35 µl de cada muestra, incubándose a temperatura ambiente con humedad hasta su lectura final (72 hs). Se utilizó un control positivo, incluido en el kit, por cada dos muestras.

ELISA

Se analizaron los 65 sueros mediante la técnica de referencia de ELISA (Beier, 2008). Se utilizó un kit comercial para anticuerpos contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio 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, utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, que poseen una baja concentración de anticuerpos contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus densidades ópticas (D.O).

Extracción de ADN y PCR

A partir de sangre entera de estas 65 vacas se aisló ADN genómico mediante digestión con proteinasa K y precipitación con NaCl, según protocolo modificado de Miller, Dykes y Polesky (1988). Se realizó una PCR anidada para amplificar una región altamente conservada del gen *env* que codifica para la glicoproteína de superficie gp51 de la envoltura viral del VLB. Para la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores: 5'-ATG CCY AAA GAA CGA CGG-3' (sentido) y 5'-CGA CGG GAC TAG GTC TGA CCC -3' (antisentido). El programa de termociclado utilizado fue: 2 min a 95 °C, y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 58 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C, y se obtuvo un producto de amplificación correspondiente a un fragmento de 903 pares de bases (pb) (Moratorio, G) (2009)³. A partir de 5 ul del producto de la primera amplificación se realizó una segunda ronda de PCR (amplificación anidada), utilizando los cebadores 5'-CTT TGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3' (sentido) y 5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3' (antisentido). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 95 °C y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 min a 57 °C y 1 min a 72 °C. El tamaño del fragmento obtenido fue de 440 pb (Ballagi-Pordani y col., 1992). Se trabajó con un volumen final de reacción de 50 ul conteniendo: 100 ng de ADN genómico (primera ronda) o 5 ul del primer producto de amplificación (segunda ronda), 1x buffer (20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl), 200 nM de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA). Los ciclados se realizaron en un termociclador Multigene (Corbett, modelo CG1-96) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (Syngene, Synoptics, Ltd) luego de su electroforesis en gel de

³ Comunicación personal

agarosa (2 %) con tinción de bromuro de etidio (EtBr) y 100 bp DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) como marcador de tamaño. En todos los ensayos como control positivo se utilizó ADN de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con VLB (Van der Maaten y Miller, 1975). Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb del gen GAPDH para cada muestra (Tiscornia y col., 2004). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico.

Cálculos de sensibilidad y especificidad

Para comparar los tres métodos utilizados se calcularon los parámetros: Sensibilidad = $(VP / (VP + FN)) * 100$ y Especificidad = $(VN / (VN + FP)) * 100$, donde VP: Verdadero Positivo, VN: Verdadero Negativo, FP: Falso Positivo y FN: Falso Negativo (Crowther, 2009).

Experimento 2. Recuento Leucocitario Total (RLT) y Diferencial (RLD).

Muestras

En el Tambo I se contó con información de registros sanitarios diarios, lo que permitió clasificar a los animales en sanos y enfermos, mientras que en el Tambo II no se disponía de esta información, por lo que se asumió la presencia de animales sanos y enfermos. Para el recuento celular las muestras se almacenaron a 4 °C por 24 hs hasta que se procesaron.

Recuento Leucocitario Total (RLT) y Diferencial (RLD)

El RLT (leucocitos/mm³) se realizó en 115 muestras (Tambo I y II) mediante

microscopía óptica (Nikon, modelo Alphaphoto YS2), utilizando una cámara de Neubauer y el reactivo de Turk para realizar la coloración (0.5 ml de Ácido acético y 2 gotas de azul de metileno en 100 ml de agua destilada). En el Cuadro 1 para el Tambo I sólo se consideraron los animales clínicamente sanos (n=67), es decir, sin registro de enfermedades desde un mes antes hasta un mes después del muestreo. Los animales enfermos que se excluyeron fueron 5 VLB positivos y 4 VLB negativos por ELISA.

El RLD se realizó en 76 muestras seleccionadas de acuerdo al resultado de ELISA (19 positivas y 18 negativas, Tambo I; 19 positivas y 20 negativas, Tambo II), mediante la observación al microscopio óptico de frotis sanguíneos teñidos según el protocolo del kit Tinción-15 (Biopur, Rosario, Argentina). Los animales fueron clasificados en las siguientes categorías de acuerdo al número de linfocitos/mm³ de sangre: Normal (<6500 linfocitos/mm³ para 3-6 años de edad y <5500 linfocitos/mm³ para >6 años); Moderadamente aumentado (6500-9000 linfocitos/mm³ para 3-6 años y 5500-7500 linfocitos/mm³ para >6 años) y Patológicamente aumentado (>9000 linfocitos/mm³ para 3-6 años y >7500 linfocitos/mm³ para >6 años) (Tolle, 1965).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2009). El recuento de leucocitos fue evaluado mediante un modelo que incluyó los efectos de grupo: positivo vs negativo por ELISA, tambo (I y II) y estado de salud (sano vs enfermo, para el Tambo I). La normalidad de la distribución de los valores de leucocitos y del porcentaje de linfocitos, monocitos y polimorfonucleados (PMN: neutrófilos, basófilos y eosinófilos), fue evaluada mediante un test de normalidad. Debido a que

la distribución de monocitos no fue normal, fue corregida aplicando el logaritmo. El nivel de significancia considerado fue $\alpha=0.05$

Experimento 3. Título de Anticuerpos contra VLB alrededor del parto

Se seleccionaron 15 vacas Holando las cuales fueran a parir en otoño del 2009, luego de un primer diagnóstico de ELISA que permitió clasificarlas en 4 positivas, 6 negativas control y 5 dudosas (bordes). De cada una de estas se extrajo sangre en 6 oportunidades separadas cada 20 días cubriendo un rango de muestreo de 50 días preparto a 70 días posparto. La extracción de sangre y la obtención del suero se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que en el Experimento 1. Las 90 muestras correspondientes a los 15 animales se almacenaron a -20°C hasta su análisis en una misma placa de ELISA. Por ultimo, se definieron rangos de días al parto y se compararon los promedios de D.O. de cada grupo.

Se tomaron como borde los animales que presentaron D.O. cercana al valor de corte ($\text{D.O.} < \text{Valor de Corte} + 0.07$, $\text{D.O.} > \text{Valor de Corte} - 0.07$). El Valor de Corte se calculó como el promedio de D.O. de los tres controles positivos para esa placa de ELISA.

Análisis estadístico

Los datos de D.O. se procesaron con el software SAS (procedimiento mixto) incluyendo en el modelo el grupo (positivos, negativos y dudosos, periodo respecto del parto y a interacción entre ambos. Se considero $P < 0.05$ como significativo y valores entre $P > 0.05$ y $P < 0.15$ como tendencia.

Resultados

Experimento 1. Estudio comparativo de IDGA, ELISA y PCR

Los controles positivos fueron correctamente diagnosticados por las tres metodologías (datos no mostrados para IDGA y ELISA). Los resultados del diagnóstico de VLB por PCR se muestran en la Figura 1.

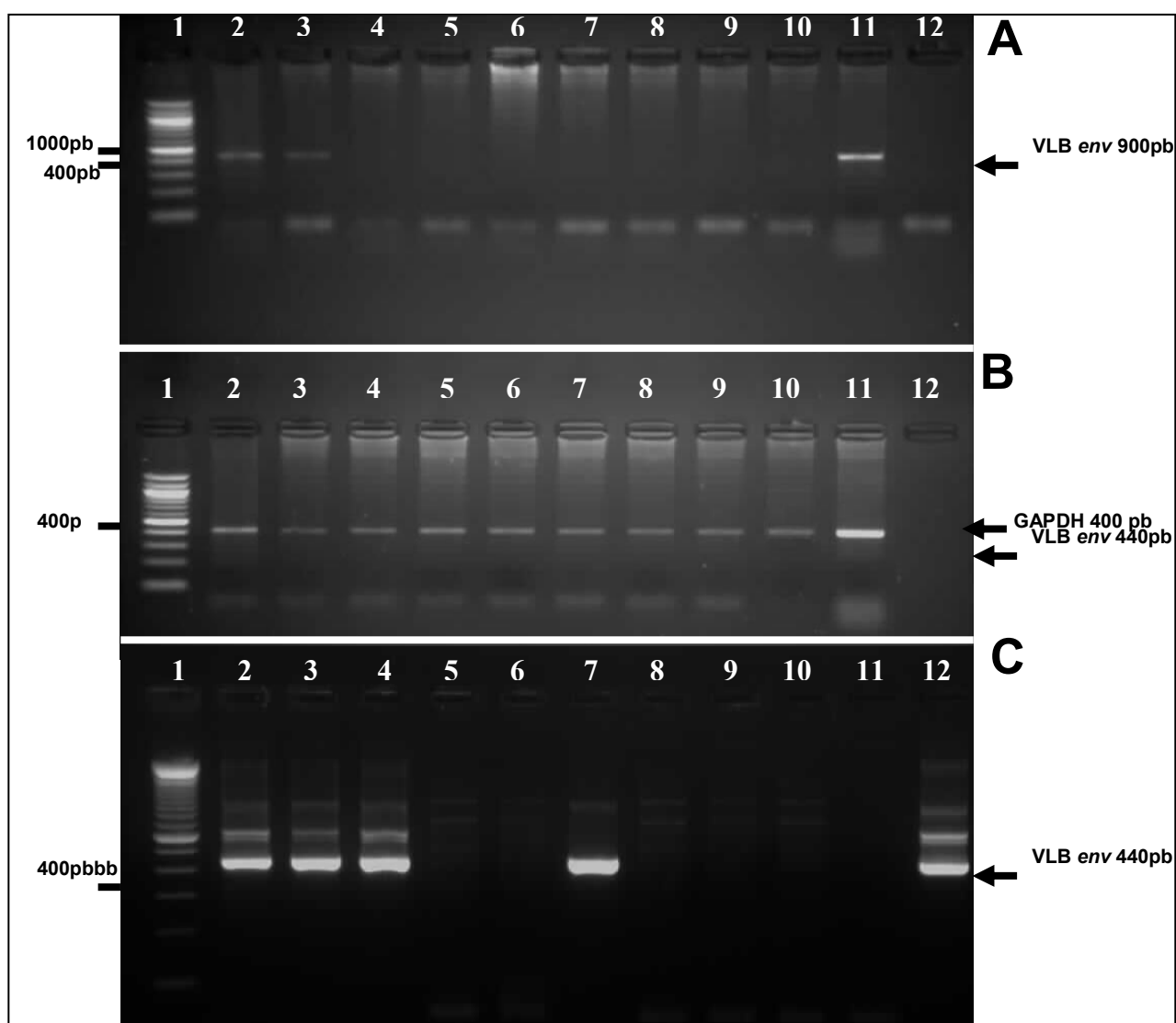


FIGURA 1. Foto de la primera y segunda amplificación por PCR con el control de

GAPDH. En el carril 1 se observa el marcador de 100 pb. En los carriles 2 al 10 se sembraron muestras de ADN bovino para su diagnóstico. En el carril 11 (gel A, B) y 12 (gel C) se sembró el control positivo (FLK-VLB) y en el 12 (gel A, B) y 11 (gel C) el control negativo (agua destilada). En el gel A se observa la primera amplificación, la banda de 900 pb en los carriles 2 y 3 diagnostica estas muestras como positivas. El gel B es el control con el gen GAPDH y verifica la presencia de ADN en las 9 muestras y la ausencia en el control negativo con agua destilada en el carril 12. El gel C muestra la segunda amplificación de 440 pb, este diagnostica 2, 3, 4 y 7 como positivas 5, 6, 8, 9 y 10 como negativas al no presentar la banda.

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de diagnósticos positivos y negativos para VLB obtenidos por cada una de las tres metodologías utilizadas.

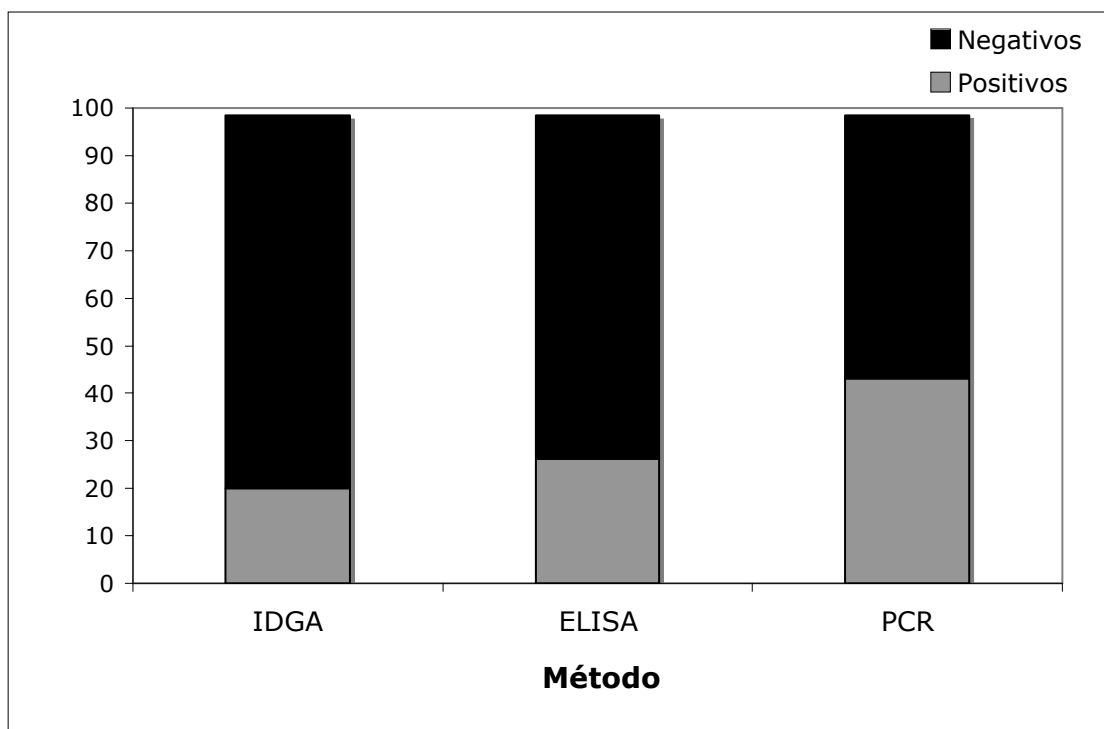


FIGURA 2. Porcentaje de animales positivos y negativos determinados por inmunodifusión en gel agar (IDGA), Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y Reacción en cadena de la polimerasa.

Para las 65 muestras procesadas, los resultados del diagnóstico fueron: IDGA, 13 positivas y 52 negativas; ELISA, 18 positivas y 47 negativas; PCR, 28 positivas y 37 negativas. Todos los diagnósticos positivos por IDGA también resultaron positivos por ELISA y PCR. Solo una muestra que se determinó como positiva por ELISA resultó ser negativa por PCR e IDGA. Esta muestra presentó una D.O. de 0.49 unidades de absorbancia y la línea de corte para esa placa de ELISA se estableció en 0.46 unidades de absorbancia. ELISA diagnosticó un 6 % más de muestras positivas que IDGA, correspondientes a 5 muestras (Fig.2), mientras que PCR detectó un 23 % y un 17 % más de positivos, que IDGA y ELISA, respectivamente.

En el Cuadro 1 se muestran los valores de sensibilidad y especificidad para los métodos comparados, tomando a ELISA y PCR como métodos de referencia.

La seroprevalencia determinada por ELISA fue de 23,6 % en el Tambo I y 48,7% en el Tambo II.

CUADRO 1. Porcentaje de Sensibilidad y Especificidad calculadas tomando a ELISA y PCR como métodos de referencia.

Referencia		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
ELISA	IDGA	72	100
	PCR	94	77
PCR	IDGA	45	100
	ELISA	61	97

Experimento 2. Recuento Leucocitario Total y Diferencial

En la Figura 3 se muestra el porcentaje de animales VLB positivos y negativos por ELISA que presentaron niveles normales, moderadamente aumentados o patológicamente aumentados de linfocitos (Tolle, 1965). Se observa que el 92 % de los animales VLB negativos presentó valores normales de linfocitos, mientras que el 66 % de los positivos presentó niveles patológicamente aumentados.

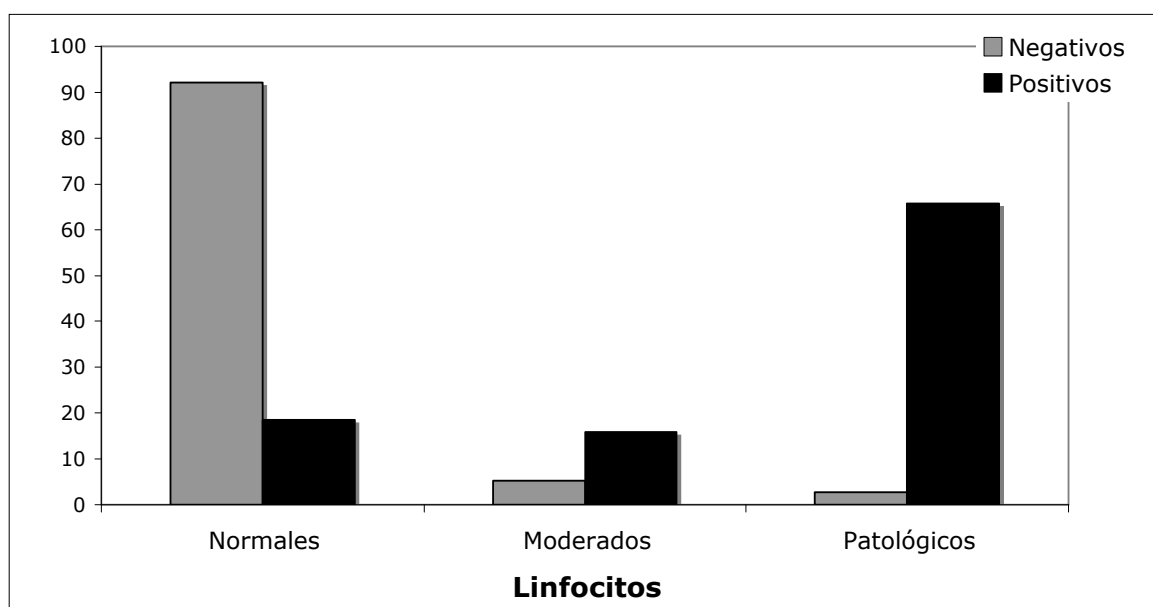


FIGURA 3. Porcentaje de animales positivos y negativos por ELISA con niveles normales, moderadamente aumentados y patológicamente aumentados de linfocitos.

El Cuadro 2 resume los resultados de recuento celular promedio de los animales VLB positivos y negativos en los dos tambos analizados (considerando solo los animales sanos para el Tambo I). Al comparar animales VLB negativos entre

tambos, se observa que en el Tambo I estos presentaron un número de leucocitos significativamente menor ($P=0.004$) que los VLB negativos del Tambo II. Sin embargo, al considerar la totalidad de los animales VLB negativos del Tambo I (sanos + enfermos), el promedio de leucocitos no resultó diferente entre tambos ($6067/\text{mm}^3 \pm 640$ vs $7312/\text{mm}^3 \pm 541$, $P=0.16$).

La diferencia observada en el número de leucocitos para los animales negativos de ambos tambos afectó al número promedio de linfocitos y de PMN, pero no afectó los porcentajes promedio de estos tipos celulares. En el caso de los monocitos, si bien no existieron diferencias en su número se observó que el porcentaje de monocitos resultó mayor en los animales VLB negativos del Tambo I que del Tambo II ($P=0.004$).

CUADRO 2. Promedio (células/ $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$) de Leucocitos totales, Linfocitos, Polimorfonucleados (PMN) y Monocitos en vacas positivas y negativas por ELISA, para cada tambo. Entre paréntesis se muestran los valores en porcentaje.

ELISA	Tambo 1		Tambo 2	
	N	P	N	P
Leucocitos	4807 ± 647^a	8014 ± 647^{bc}	7312 ± 541^b	9252 ± 556^c
Linfocitos	2299 ± 549^a (48% ^a)	5197 ± 549^c (61% ^b)	3710 ± 460^b (51% ^a)	6564 ± 472^c (70% ^c)
PMN	2370 ± 313^a (48% ^a)	2583 ± 313^a (36% ^b)	3515 ± 262^b (47% ^a)	2584 ± 259^a (28% ^b)
Monocitos	137 ± 50^{ab} (3.1% ^a)	233 ± 73^a (2.6% ^a)	86 ± 42^b (1.1% ^b)	103 ± 43^{ab} (1.1% ^b)

Valores con diferentes letras dentro de las variables consideradas (numero/porcentaje) difieren entre si, $P<0.05$

Al considerar animales VLB positivos entre tambos, no se observaron diferencias respecto al número de leucocitos ni de los distintos tipos celulares de la fórmula leucocitaria. Sin embargo, si hubo diferencias entre los porcentajes de linfocitos y monocitos ($P=0.027$ y $P=0.026$, respectivamente).

Por otra parte, los animales VLB positivos presentaron un número de leucocitos y linfocitos significativamente mayor que los VLB negativos en ambos tambos ($P<0.01$ en todos los casos). En el Tambo I, no se observaron diferencias entre animales VLB negativos y positivos respecto al número de PMN. Sin embargo, en el Tambo II éstos resultaron mayores (número y porcentaje) en los animales negativos ($P=0.01$). No se observaron diferencias en el número de monocitos, ni en relación al resultado de ELISA ni entre tambos.

Experimento 3. Concentración de Anticuerpos contra VLB

En la figura 4 se observa que los animales Positivos presentan D.O. mayores con respecto a los Negativos y los Borde. La D.O. en el grupo de animales positivos disminuye cercano al parto (1.104 ± 0.153 vs 0.79 ± 0.076 , $P < 0.05$) en los días -50 y -10 respectivamente.

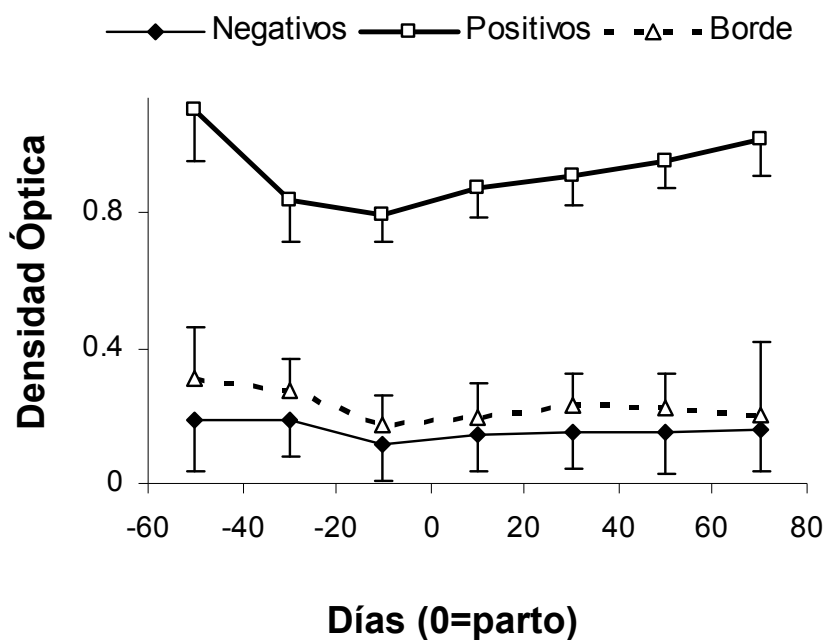


Figura 4. Densidad óptica para vacas lecheras negativas, positivas y categoría borde alrededor del parto.

Se observó que las muestras en el preparto y postparto temprano de un animal positivo a VLB se diagnosticaron todas como negativas. Lo mismo sucedió con 4 de los animales de categoría borde, las muestras en el preparto tardío fueron catalogadas como dudosas, pero las muestras cercanas al parto y las posparto fueron diagnosticadas negativas.

Discusión

Este es el primer estudio comparativo de IDGA, ELISA y PCR como herramientas diagnósticas de LEB en nuestro país. El método diagnóstico más sensible fue la PCR, siendo IDGA la que detectó menor número de animales positivos. Esto coincide con trabajos anteriores (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2001; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007). Si bien la sensibilidad de IDGA y ELISA fue menor que la de PCR, la especificidad de ambos métodos fue mayor.

El hecho de que la PCR tradicional detecte animales que presentan ADN proviral y que sean serológicamente negativos, puede deberse a la presencia de animales inmunotolerantes a VLB (Fechner y col., 1997; Monti y col., 2005). Paralelamente, la PCR permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica, animales cursando un período prolongado de latencia o animales con una baja carga de exposición del virus, así como la detección del virus en terneros infectados que recibieron calostro de madres seropositivas (Kaaften y col., 1982).

Por otro lado, Fechner y col (1997) proponen que ciertas variantes en la secuencia de VLB podrían ser menos inmunogénicas que otras generando, por tanto, resultados serológicos negativos en animales infectados. Sin embargo, otros estudios no logran determinar una correlación entre el genotipo de VLB y el estado serológico de los animales infectados, y proponen que las diferentes respuestas antivirales podrían estar relacionadas con el estado de infección y otros factores del hospedador (Licursi y col., 2002). En particular, la expresión del gen BoLA DRB3.2 ha sido asociada a la susceptibilidad o resistencia del hospedador al aumento de la carga viral (Juliarena y col., 2008).

Por otra parte, en otros trabajos se reportaron casos de muestras seropositivas en las que no se pudo amplificar el ADN del virus (Del Fava y Pituco, 2004; Monti y col., 2005). Esto se puede explicar por fluctuaciones en el número de linfocitos infectados, por la ubicación de los mismos en el huésped o porque existan variaciones genéticas en el virus que afecten el reconocimiento del ADN viral por los cebadores usados en la PCR (Camargos y col., 2005). No obstante, sería conveniente repetir la muestra discordante determinada como positiva por ELISA (con baja D.O.) y negativa tanto por PCR como por IDGA.

Si bien la PCR es más sensible, IDGA y ELISA son los métodos recomendados por la OIE y los más utilizados en los planes internacionales de erradicación de la enfermedad. Asimismo, la aplicación de la PCR requiere de un laboratorio que cuente con la infraestructura necesaria para el manejo de técnicas de virología molecular, donde se pueda tener las precauciones adecuadas, y a través de los procedimientos de control, validar la calidad de los resultados (Beier, 2008). Asimismo, la mayor susceptibilidad a la contaminación de la PCR, hace que el conocimiento y la experiencia del operario sean factores de mayor importancia que en las demás técnicas. El uso de PCR sería adecuado como método diagnóstico complementario en aquellos animales que sean VLB negativos por IDGA y positivos o levemente positivos (baja D.O.) por ELISA, en los cuales se quiera confirmar la presencia del ADN proviral en el genoma de los linfocitos del huésped. En este sentido, el diagnóstico por PCR puede constituir un gran aporte en los programas de erradicación, especialmente en aquellos rodeos con una baja prevalencia de animales infectados, ya que se pueden detectar infecciones recientes, entre 2-4 semanas más temprano que mediante IDGA (Naif y col., 1992; Kelly y col., 1993, González y col., 2001).

Respecto al recuento celular, un mayor porcentaje de animales VLB positivos presentó niveles patológicamente aumentados de linfocitos, lo que explica que el promedio de leucocitos en estos animales fuera mayor en comparación a los negativos. Si bien es marcada la diferencia entre los animales positivos y negativos con niveles patológicamente aumentados de linfocitos (66% vs 3%, respectivamente), existen trabajos donde se reporta una variabilidad de 30% a 70% de animales infectados que presentan linfocitosis persistente (Felmer y col., 2006). Para determinar el establecimiento de linfocitosis persistente, se debería evaluar más de una muestra por animal, obtenidas con un intervalo de semanas o meses, ya que se considera que el nivel de linfocitos debe mantenerse aumentado durante un mínimo de 3 meses (Chamizo, 2005).

La cantidad de linfocitos resultó menor en los animales VLB negativos del Tambo I que los negativos del Tambo II. Teniendo en cuenta que, al considerar solo los animales sanos en el Tambo I, el número promedio de leucocitos fue significativamente inferior que en el Tambo II (donde no se pudo determinar el estado sanitario de los animales), es de relevancia la determinación de la fórmula leucocitaria (porcentaje). Es decir, cuando para el Tambo I se incluyeron los animales enfermos, no se observaron cambios significativos en los porcentajes promedio del RLD, pero sí en el número promedio de células/mm³ de sangre. Por lo tanto, es importante que en el hemograma cada tipo celular esté explícito tanto en número de células/mm³ como por el porcentaje que representa en la fórmula leucocitaria. Para la determinación de efectos de la LEB sobre el recuento celular, se debe considerar la presencia de enfermedades concurrentes (muy frecuentes en vacas lecheras en producción).

Por otra parte, la edad del animal también afecta el recuento celular, siendo en general mayor el número de linfocitos en terneros (Tolle, 1965). Por lo tanto, el

hecho de que en el Tambo II los animales sean más jóvenes, también podría estar influyendo en que presenten mayor porcentaje de linfocitos comparado con los del Tambo I. Asimismo, la prevalencia de LEB en el Tambo II es mayor, lo que hace pensar que en este rodeo la carga viral también sería mayor.

Este trabajo muestra una importante prevalencia de la LEB (27,8 % en el Tambo I y 48,7% Tambo II) incluso en animales jóvenes (Tambo II). La falta de un plan de manejo sanitario adecuado para la erradicación de la enfermedad (Acta 84, COHNASA) y la aplicación del programa de vacunación contra la fiebre aftosa en el 2001 se han propuesto como razones que podrían explicar el aumento de la prevalencia de LEB en Uruguay en la última década (Zaffaroni y col., 2007). El impacto y distribución de la enfermedad a nivel nacional y regional es indiscutible, así como también, las dificultades inherentes a su control y/o erradicación, por lo tanto, el aumento de la investigación científica interinstitucional en este tema y la transferencia tecnológica al sector productivo pueden aportar importantes insumos para la solución de este complejo problema de sanidad animal.

Este trabajo es el primer reporte que demuestra que en el período cercano al parto los títulos de anticuerpos determinados por ELISA bajan. La densidad óptica determinada mediante esta técnica permite describir cuantitativamente el descenso de la concentración de anticuerpos en la sangre circulante en el parto. Hemos encontrado dos reportes respecto al diagnóstico de LEB en el periparto que han utilizado metodologías no cuantitativas. Buridge y col. (1982) estudiaron la caída en el título de anticuerpos en el periparto por medio de diluciones 1:2 del suero por IDGA y de un ensayo de radioinmunoprecipitación inespecífico. Ellos observaron que el diagnóstico de muestras positivas a LEB, pertenecientes al momento del parto, pasaba a ser negativo en menos diluciones que las muestras de pre y posparto. Por otro lado, Hübner y col. (1996) en un estudio obtuvieron un 7.3 % de

falsos negativos en el parto por IDGA, sin determinar el título de anticuerpos. Se ha demostrado que los niveles de inmunoglobulina G1 y M en el suero caen alrededor del parto y que la concentración presente en el calostro, es equivalente a la concentración que desaparece de la sangre circulante en el momento de la calostrogénesis (Dixon, y col. 1961; Larson, 1958). Por lo tanto, es de esperar que los anticuerpos contra VLB descendan en la sangre y se trasladen al calostro en el período cercano al parto.

En nuestro estudio, se consideraron sólo 6 animales positivos para leucosis, por lo que el hallazgo es de relevancia. La utilidad práctica de este conocimiento es evidente: se debe tener muy en cuenta el momento de la toma de sangre para el diagnóstico de LEB. Sin embargo, debido a la planificación de la sanidad de los tambos (momentos puntuales o únicos en la toma de muestra para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a todo el rodeo), como al manejo reproductivo de los rodeos lecheros en nuestro país (partos todo el año), productores y técnicos frecuentemente no visualizan que un resultado negativo no implica que ese animal sea verdaderamente negativo.

Conclusiones

El método diagnóstico que presentó mayor sensibilidad fue la PCR, seguido por ELISA y por IDGA. El número promedio de linfocitos aumentó significativamente en los animales que presentan el VLB, aunque la presencia de enfermedades concurrentes afecta de forma relevante el número total de éstos. El título de anticuerpos disminuye con el parto lo que puede causar la detección de falsos negativos por ELISA, sobretodo en los huéspedes infectados que presentan bajas concentraciones de anticuerpos específicos.

Referencias Bibliográficas

- 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.
- Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2a. ed. Paris, Ed. OIE, pp. 723-738.
- Bonifacino J. 2008. Exportaciones de Lácteos de Uruguay. Informe mensual: Precios – Índices mayo, año XII, nº 113, 26 pp. [www. exportacionesUY.com](http://www.exportacionesUY.com).
- 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: 149-170.
- Burridge, M.J.; Thurmond, M.C.; Miller, J.M.; Schmerr, M.J.F.; Van Der Maaten (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. comp. Med.* 46: 270-271.
- Camargos, M.F.; Junior, C.A.O.; da Cruz, C.J.M.; Lessa, L.M.; Rocha, M.A.; Stancek, D.; Pellegrin, A.O.; Reis, J.K.P.; Leite, R.C. (2005). Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina. *Comunicação científica. R. Bras. Ci. Vet.* 12(1)(3): 149-150.
- Camargos, M.F.; Feliziani, F.; De Giuseppe, A.; Lessa, L.M.; Reis, J.K.P.; Leite R.C. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinaria.* 102: 169-173.
- Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET.* VI (7): 2-25.

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html>.

Collazo, L.; Sienra, R.; Irabuena, O.; Guarino, H.; Navarro, M.; Lavarello, L. (2002).

Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en Ganado lechero.

Jorn. Urug. Buiatría XXX. Paysandú, Uruguay. p. 322-325.

Coulston, J.; Naif, H.; Brandon, R.; Kumar, S.; Khan, S.; Daniel, R.C.; Lavin, M.F.

(1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. J. Gen. Virol. 71: 1737-46.

Dube, S.; Dolcini, G.; Abbott, L.; Mehta, S.; Dube, D.; Gutierrez, S.; Ceriani, C.;

Esteban, E.; Ferrer, J.; Poiesz, B.; (2000). The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. Virology 277: 379-86.

Crowther, J.R. (2009). The ELISA Handbook. 2nd ed.. Humana Press. pp 568.

De la Sota, M.D. (2004). Manual de procedimiento Leucosis Bovina Enzoótica,

Dirección Nacional de Luchas Sanitarias, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. 9:1-27.

<http://kogi.udea.edu.co/talleres/Medicina/.../leucosis%20senasa.pdf>.

Del Fava, C.; Pituco, E.M. (2004). Infecção pelo Virus da Leucemia Bovina (BLV) no Brasil. Divulgação Técnica. Biológico, San Pablo, 66(1)(2):1-8.

DIEA- MGAP (2008). Anuario estadístico agropecuario. www.mgap.gub.uy

Dixon, F.J.; Weingle, W.O.; Vázquez, J.J. (1961). Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. Lab. Invest. 10: 216-237.

Fechner, H.; Kurg, A.; Geue, L.; Blankenstein, P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. J. Vet. Med. 43: 621-630.

Fechner, H.; Blankenstein, P.; Looman, A.C.; Elwert, J.; Geue, L.; Albrecht, C.;

Kurg, A.; Beber, D.; Marquardt, O.; Ebner, D. (1997). Provirus variants of the

- bovine leucemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*. 237: 261-269.
- 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.
- Ferrer, J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sc. Comp. Med.* 24:1-68.
- González, E.T.; Oliva, G.A.; Valera, A.; Bonzo, E.; Licursi, M.; Etcheverrigaray, M.E. (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Revista Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.
- Guarino, H.; Saizar, J.; Sienra, R. (1989). Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. *Jorn. Urug. Buiatría XVII. Paysandú, Uruguay*. 4:1-7.
- Hübner, S.O.; Weiblen, R.; Tobias, F.L.; Cancian, N.; Botton, S.A.; Oliveira, M.; Zanini, M. (1996). Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Brasília*, 16 (2)(3): 87-90.
- Juliarena, M.A.; Poli, M.; Sala, L.; Ceriani, C.; Gutierrez, S.; Dolcini, G.; Rodríguez, E.M.; Mariño, B.; Rodríguez-Dubra, C.; Esteban, E.N. (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 39: 432-438.
- Kaaden, O.R.; Lange, S.; Romanowski, W.; Marré, H.; Pfeilsticker, J.; Roselius, R. (1982). Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zentralbl. Veterinarmed.* 29(4): 269-274.
- Kantek, C.E.; Kruger, E.R.; Welte, V.R. (1982). Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do

- Uruguai. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.2, n.3, p.125-126.
- Kelly, E.J.; Jackson, M.K.; Marsolais, G.; Morrey, J.D.; Callan, R.J. (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 54(2):205-209.
- Larson, B.L. Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition (1958). *J. Dairy. Sci.* 16: 1033-1044.
- Licursi, M.; Inoshima, Y.; Wu, D.; Yokoyama, T.; González, E.T.; Sentsui, H. (2003). Provirus variants of bovine leukemia virus innaturally infected cattle from Argentina and Japan. *Veterinary Microbiology.* 96: 17–23.
- 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.
- Martín, D.; Arjona, A.; Soto, I.; Barquero, N.; Viana, M.; Gómez-Lucía, E. (2000). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J. Vet. Méd.* 48: 97-106.
- Mederos, A.; Irigoyen, D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. *Jorn. Urug. Buiatría XXVI.* Paysandú, Uruguay. p. 19-20.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 12: 319-325.
- Monti, G.E.; Frankena, K.; Ángel, K.; Ángel, B.; Buist, W.; Tarabla, H.D.; M De Jong, M.C. (2005). Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of bovine leucemia virus infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 451-457.

- Moratorio, G.; Obal, G.; Dubra, A.; Correa, A.; Bianchi, S.; Buschiazzi, A.; Cristina, J.; Pritsch, O. (2009). Phylogenetic analysis of Bovine Leukemia Viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes.(sin publicar).
- Naif, H.M.; Daniel, R.C.; Coughle, W.G.; Lavin, M.F. (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 30(3): 675-679.
- Poiesz, B.J. (1995). Etiology of acute leukemia: Molecular genetics and viral oncology. *In* Neoplastic Diseases of the Blood (Wiernik, P.H.; Canellos, G.P.; Dutcher, J.P.; Kyle, R.A. Eds.), 3rd ed. pp. 159-175. Churchill-Livingstone, New York.
- Portetelle, D.; Couez, D.; Bruck, C.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Van Der Maaten, M.; Brasseur, R.; Burny, A. (1989). Antigenic variants of bovine leukaemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology*. 1: 27-33.
- 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.
- Rice, N.R.; Stephens, R.M.; Burny, A.; Tilden, R.V. (1985). The gag and pol genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. *Virology* 142: 357-77.
- Rice, N.R.; Stephens, R.M.; Couez, D.; Deschamps, J.; Kettmann, R.; Burny, A.; Tilden, R.V. (1984). The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. *Virology* 138: 82-93.
- Sagata, N.; Yasunaga, T.; Tsuzuku-Kawamura, J.; Ohishi, K.; Ogawa, Y.; Ikawa, Y.

- (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 677-81.
- 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. *Jorn. Urug. Buiatría XXVI*, Paysandú, Uruguay. p. 23-25.
- Tiscornia, A.C.; Cayota, A.; Landoni, A.I.; Brito, C.; Oppezzo, P.; Vuillier, F.; Robillo, C.; Digiero, G.; Gabús, R.; Pritsch, O.(2004). Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. 18(1): 48-56.
- Tolle, A. (1965). Zur Beurteilung quantitativer hematologischer Befunde im Rahmen der Leukose - Diagnostik beim Rind. *Zbl. Vet. Med.* 12 : 281.
- Trainin, Z.; Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel journal of veterinary medicine*. 60(4): 94-105.
- Trono, K.G.; Pérez-Filguiera, D.M.; Duffy, S.; Borca, M.V.; Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 83: 235-248.
- Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M. (1975). Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.* 43: 360-362.
- Van Der Laan, C.W.; Vidor, T.; Braga, F.M.; Halfen, D.; Hubner, S.O. (1999). Leucose Enzoótica Bovina em bovinos produtores de leite importados do Uruguai. *Pesqui. Agropecu. Gaúcha*, v.5, n.1, p.139-141.

Zaffaroni, R.; Piaggio, J.; Nuñez, A.; de Freitas, J.; Suanes, A.; Cernicchiaro, N.; Gil, A. (2007). Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay. p. 150-151.