

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE ELISA EN LECHE PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA  
LACTANCIA DE VACAS LECHERAS”**

**Por**

**BIÉNERES VARELA, Diego**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección-Control y Tecnología de los Alimentos de origen animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2012**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dra. Elena de Torres

Segundo miembro:

---

Dr. Ricardo Sienna

Tercer miembro:

---

Dr. Carlos Morón

Autor:

---

Br. Diego Biéneres

Fecha:

4 de Diciembre de 2012

***A mis Abuelas***

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mi familia, por haber creído en mí y apoyado en todo momento.
- A mis amigos, por haberme acompañado y apoyado en esta etapa muy importante de mi vida.
- A los Dres. Ricardo Sienra, Helena Guarino, Carlos Morón y al Br. Guillermo Tort por haberme dado la posibilidad de trabajar con ellos y enseñarme siempre, despertando en mi el interés por la investigación.
- A Rubén Braga y su familia que juntos con Beatriz me ayudaron siempre y sin ellos este trabajo no sería posible.
- A la Dra. María Laura Sorondo por su apoyo en este ensayo.
- Al Dr. Luis Barros por el préstamo de materiales para la extracción de leche.
- A la Dra. Elena de Torres y al Dr. Fernando Vila, por su colaboración en la interpretación de datos.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
TABLA DE CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
Características generales.....	13
El agente de la LBE.....	14
Epidemiología.....	14
Pérdidas económicas.....	16
LBE y Salud pública.....	17
Diagnóstico.....	17
Situación en otros países.....	18
Control y erradicación.....	19
Situación en Uruguay.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	24
HIPÓTESIS.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	24
Selección de establecimientos y animales.....	24
Toma de muestras.....	25

Prueba de laboratorio.....	25
Momento de la colecta de las muestras y análisis.....	26
RESULTADOS.....	28
Etapa de lactación.....	28
Producción de leche.....	28
Células Somáticas.....	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Representación esquemática de la toma de muestras de sangre y leche por vaca.....	27
Tabla 1. Resultados obtenidos en los dos establecimientos y en cada etapa de lactación, comparando los resultados obtenidos con muestra de sangre y muestra de leche.....	28
Tabla 2. Producción de leche mensual de los animales en estudio, de ambos tambos estudiados.....	29
Figura 2. Producción de leche total de los animales en estudio en ambos establecimientos.....	29
Tabla 3. Promedio de células somáticas de los animales estudiados en base mil por ml., en cada mes de su lactancia, en ambos establecimientos.....	30
Figura 3. Porcentaje promedio de animales con recuento celular alto y bajo por etapa del tambo positivo.....	31
Figura 4. Porcentaje promedio de animales con recuento celular alto y bajo por etapa del tambo negativo.....	31

## RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzootica (LBE) es una enfermedad vírica, altamente contagiosa y por ello una enfermedad de rodeo que afecta en forma natural solo al ganado bovino causando disminución productiva, reproductiva e incluso la muerte debido a la formación de linfosarcoma. El objetivo de este ensayo fue establecer la utilidad de la prueba individual de ELISA en leche como prueba de rutina, durante la lactancia en establecimientos lechero con programas de lucha contra esta enfermedad, sin que influyera la etapa de lactación, producción de leche y estado sanitario de la glándula mamaria. Para esto se seleccionaron tambos del departamento de San José, localidad Villa Rodríguez, en los cuales uno de ellos tiene una prevalencia a LBE mayor al 90% y el restante pertenece a un proyecto de control y erradicación de Leucosis con 100% de su rodeo negativo. Dentro de cada establecimiento se escogieron 15 vacas multíparas de similares característica productivas y reproductivas, con fecha prevista para el mes de junio, a las cuales un mes y medio antes del parto se les realizó un estudio de ELISA en suero para confirmar su serología hacia LBE. Luego del parto, se procedió a realizar la toma de muestras, que constó de una primera muestra a los 2 meses y medio, la segunda, a los 5 meses y medio y la tercera, a los 7 meses y medio de lactación. En cada una de estas fechas se le extrajeron muestras de sangre y de leche en el mismo momento al total de la animales en estudio para su posterior estudio en el laboratorio de Virología.

Los resultados obtenidos en el laboratorio para muestras de leche y suero concordaron en su totalidad (100% entre los resultados de suero y sus homologo de leche), demostrando que la etapa de lactación no interfiere en el diagnóstico. Posteriormente se analizó la producción de leche y cantidad de células somáticas para estudiar su efecto en el diagnóstico, demostrando que las variaciones tanto en la producción de leche como en los recuentos celulares, no influyeron en los resultados obtenidos en el laboratorio.

Por lo tanto, este trabajo concluyó que, no existen diferencias en los resultados obtenidos entre la técnica de ELISA en leche y ELISA en suero en las diferentes etapas de lactación, pudiéndose establecer un protocolo de vigilancia con muestras de leche para el diagnóstico de Leucosis Bovina Enzootica, sin que influya en el diagnóstico, la producción de leche y el estado sanitario de la glándula mamaria.

## **SUMMARY**

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is a viral disease, highly contagious, therefore a rodeo disease which naturally affects only bovine herd causing decrease in production, reproduction and even death due to the formation of lymphosarcoma.

The objective of this essay was to establish the utility of the ELISA test on individual milk as a routine test during lactation in dairy farms with programs to combat this disease without the influence of lactation stage; milk production and mammary gland sanitary state.

With this purpose we selected dairy farms from Villa Rodriguez, San Jose – Province where one of them has EBL prevalence over 90% and the rest participates in a control and eradication program with rodeo 100% negative.

We selected 15 multiparous cows with similar productive and reproductive characteristics from each farm, with predicted delivery date on June a month and a half before calving we them an ELISA test to confirm their ELB serology. After calving – day 0 samples were taken at days 75, 150 and 225. Milk and blood samples were taken at the same moment.

Serum and milk tests results matched in 100% cases showing that lactation doesn't interfere with diagnosis. Milk production and somatic cells count were analyzed afterwards, to study its effect in diagnosis, showing no influence in laboratory results.

## INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina Enzootica (LBE) es una enfermedad vírica que afecta en forma natural solo al ganado bovino causando disminución productiva, reproductiva e incluso la muerte debido a la formación de linfosarcoma (Da y col., 1993; D'Angelo y col., 1998; Fernandes y col., 2005).

Es una enfermedad infecciosa, altamente contagiosa y por ello una enfermedad de rodeo (Fernandes y col.2005) producida por un virus de RNA exógeno, que pertenece a la familia Retroveridae (Fernandes y col. 2005) y dentro de ella se ha recientemente incluido en el género delta retrovirus (Kerkhops y col. 1992). Este virus afecta principalmente a los linfocitos B (Ballagi-Pordany y col. 1992), pero también posee la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T (Schwartz y col. 1994) y monocitos (Doménech y col.1991).

Esta enfermedad afecta animales mayores de dos años y tiene un periodo de incubación largo, de uno a cinco años (Hopkins y col.,1997; Monti y Franquena, 2005). La LBE, por las condiciones de manejo y sistemas de producción, afecta especialmente al ganado lechero, habiendo sido demostrada una mayor sensibilidad en líneas genéticas de alta producción (Jacobs y col.,1991; DiGiacomo,1992a; Jacobsen y col., 1998).

La prevalencia de la enfermedad ha ido aumentando en el correr de los años en las poblaciones de ganado lechero, facilitando el contagio las prácticas de manejo dentro de las que se destacan el empleo de materiales o instrumentos capaces de vehiculizar sangre a partir de animales infectados. Tareas rurales rutinarias, ya sea como el descorne, castración, vacunación y extracción de sangre colaboran significativamente en la difusión de la enfermedad, si no se aplican estrictas medidas de bioseguridad e higiene. (Dimmock y col.,1991; Perino y col.,1992; Scott y col.,1992; Pelzer,1997).

En establecimientos lecheros la difusión de LBE varía según países y regiones, llegando en algunos casos al 100% de predios infectados y dentro de ellos , pudiendo afectar en casos extremos hasta el 90% de los animales adultos (Huber y col.,1991; Kaja y Olson,1982).

En la actualidad un factor importante en la prevalencia lo constituye las exportaciones de ganado lechero en pie seronegativo a LBE, que determina disminución de reemplazos negativos y concentración de individuos seropositivos en los predios lecheros.

Otros factores que intervienen en la difusión de la LBE, como artrópodos e insectos hematófagos, han demostrado ser transmisores del virus en forma experimental, pero su participación en condiciones prácticas resulta difícil

cuantificar (Kaja y Olson,1982; DiGiacomo, 1992b; Pollari y col.,1992; Wentink y col.,1993).

En el calostro y la leche se encuentran cantidades importantes de provirus así como de anticuerpos anti\_LBE, pero su rol en la transmisión natural es muy discutida (Guarino y col., 1989; DiGiacomo,1992c; Jacobs y col., 1995).La transmisión por intermedio del semen ha sido comunicada por Lucas y col en 1980 y si bien la posibilidad de contagio mediante inseminación artificial, parece ser baja, debe tenerse en cuenta que, el riesgo puede llegar ser alto, si el toro es positivo y posee un proceso inflamatorio crónico en su tracto genital, ya que linfocitos infectados estarán presentes en el semen (Monke, 1986; Kelly y col., 1993).

Las manifestaciones clínicas son muy variables, pudiendo cursar en forma asintomática de por vida, o, generando linfocitosis persistente o, en menor medida, una forma tumoral como es el caso del Linfosarcoma (Jacobs y col.,1991; Da y col.,1993; Fernandes y col.,2005). En nuestro país, el primer caso de linfosarcoma fue diagnosticado por Casas y Quiñones en el año 1952.

Como fue mencionado anteriormente, la importancia clínica de la LBE no es de mayor relevancia en la mayoría de los rodeos. Algunos estudios han demostrado que se afecta la dinámica de la infección dentro de los establecimientos y la persistencia de los anticuerpos pasivos (Sienra y col.,1996; Sienra y col., 2001), aumentado así las pérdidas económicas por enfermedades secundarias a esta.

Cabe mencionar que no existen vacunas eficaces para esta enfermedad y que por lo tanto, son muy importantes las medias de control para evitar la difusión dentro del rodeo. Las más importantes que se han tomado en el caso de la Unión Europea (U.E), han sido el serotest y el posterior sacrificio de animales positivos mayores de 12 meses, logrando en dos a tres años la erradicación de la enfermedad de los rebaños (Kaja y Olson, 1982). Es de destacar que la erradicación por este procedimiento significa un alto costo y requiere políticas nacionales. Otra postura diferente fue la tomada por Estados Unidos de América (E.U.A) y Canadá, que han considerado inconveniente desarrollar programas de erradicación debido a diferentes factores, como por ejemplo el alto potencial genético de los animales infectados, pérdidas económicas, aunque estas sean cuestionables por algunos autores, y el posible potencial zoonótico (DiGiacomo,1992b; Perino y col.,1992). A pesar de ello, estos dos países poseen programas de control a causa de las restricciones impuestas por los países compradores de material genético, como en el caso de los Centros de Toros.

La O.I.E. reconoce tres técnicas de diagnóstico para la LBE, ellas son como pruebas prescriptas IDGA y ELISA y como alternativa PCR (Manual de la OIE de Animales Terrestres, 2004). El desarrollo del método de ELISA (Enzima

Ligada a un InmunoAbsorbente) significó un importante avance en el diagnóstico de la LBE, teniendo una elevada sensibilidad y especificidad, aplicándose tanto en muestras individuales como en mezclas. La realización en leche, que evita la extracción de sangre y facilita el proceso de obtención de muestras en grandes poblaciones (Sienra y Guarino, 1991; Rhodes y col., 2003), es una de las principales ventajas que tiene esta técnica, incluyendo la disminución del riesgo de difusión por causas iatrogénicas. Por tal motivo, y desde hace ya muchos años, el ELISA en leche ha sido reconocida y utilizada para el diagnóstico de la enfermedad, con adecuados niveles de sensibilidad y especificidad (DiGiacomo,1992b; Brenner y col.,1994). La misma técnica se está utilizando en la Unión Europea en tanque, como parte del sistema de vigilancia de la LBE.

Este ensayo busca determinar si la prueba de ELISA en leche individual, se comporta de igual forma en las tres etapas de lactación, y si la producción de leche junto con el estado sanitario de la glándula mamaria, la afectan en su recomendación para el diagnóstico y control de la enfermedad a nivel de tambos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Características Generales

La Leucosis Bovina (LB) es una enfermedad del ganado bovino, que se manifiesta clínicamente por el desarrollo de neoplasias malignas del tejido linfoide. La primera descripción fue realizada en Alemania en 1871, y a partir de entonces la afección ha sido comunicada en prácticamente todos los países del mundo (Kaja y Olson,1982; Ott y col.,2003; Rhodes y col.,2003). En base a estudios epidemiológicos, clínicos y patológicos, la LBE ha sido clasificada en dos grupos: Enzootica y Esporádica. La Leucosis Bovina Enzootica (LBE) es la de mayor importancia debido a que, por su carácter contagioso, constituye un problema de rodeo (Bendixen,1995). Esta forma de la enfermedad es causada por el virus de la Leucosis Bovina (vLB), el que en condiciones naturales afecta exclusivamente a la especie bovina. En la práctica, el problema se observa en ganado lechero debido a las condicionantes de manejo, exigencias productivas, estratificación etaria y probablemente, predisposición genética (Huber y col.,1981; Sierra y col., 1983, DiGiacomo, 1992b; Rhodes y col.,2003).

La gran mayoría de los animales infectados por el vLB permanecen como portadores asintomáticos de por vida. Dentro de ellos, algunos evidencian Linfocitosis Persistente (LP), y solo un pequeño porcentaje desarrolla la forma maligna de la enfermedad, el Linfosarcoma (Jacobs y col., 1995).

La prevalencia de la LBE a nivel de establecimientos lecheros varía según los países y regiones, llegando en algunos casos a cifras de 40-60%, pudiendo afectar en casos extremos al 90% de los animales (Kaja y Olson,1982; Hopkins y DiGiacomo, 1997). La alta relación infección/enfermedad, el aparente bajo o mínimo impacto sobre la producción, las escasas perspectivas de desarrollo de vacunas efectivas, y la ausencia de pruebas sobre su transmisión al ser humano, han determinado respuestas disímiles por parte de las autoridades sanitarias de los diferentes países en relación a la actitud a asumir frente a la enfermedad (Kaja y Olson,1982; Monti y Frankena,2005).

La LBE ha recibido especial interés durante las dos últimas décadas, especialmente en razón de las exigencias sanitarias que aplican numerosos países, tendientes a impedir la introducción de material genético o animales infectados (DiGiacomo, 1992b; Ott y col.,2003; Rhodes y col.,2003).La avanzada campaña de erradicación que se encuentra desarrollando la Unión Europea hace esperar mayores restricciones en el corto plazo, que repercutirán necesariamente en el ámbito extracomunitario.

## **El Agente de la LBE (vLBE)**

El vLBE es un RNA virus exógeno, que pertenece a la familia Retroviridae, y dentro de ella se ha recientemente incluido en el género Deltaretrovirus. Es un agente emparentado estructural y funcionalmente con los virus humanos T-linfotrópicos HTLV-1 y HTLV-2 (Código de Animales Terrestres de la OIE 2004). En condiciones naturales el vLB afecta exclusivamente al bovino, pero en forma experimental infecta e induce leucosis en ovinos (Nagy y col., 2002). Las proteínas estructurales comprenden la p12, p14, p15 y p24, mientras que las glicoproteínas de la cubierta son la gp30 y gp51. Los dos elementos antigénicos de interés son la proteína mayor del virión o antígeno p24, y la glicoproteína de la cubierta o antígeno gp51 (Everman y Jackson, 1997; Nagy y col., 2002; Código de animales terrestres de la OIE, 2004).

## **Epidemiología**

Resulta claro que la LBE es una afección relacionada directamente con sistemas de manejo intensivo, con estrecho contacto físico de los animales y una participación importante del ser humano. Existe una clara tendencia a que la tasa de infección se incremente a medida que aumenta la edad, siendo en general escasa la incidencia de la infección en individuos menores de 2 años (Dimmock y col., 1991). También ha sido demostrada mayor susceptibilidad en animales con alto potencial lechero (Detilleux y col., 1991; Jacobs y col., 1991; Jacobs y col., 1995).

La transmisión natural en rodeos lecheros es más lenta en aquellos con una baja o moderada prevalencia de la infección, mientras que en establecimientos con alta prevalencia, difunde mucho más rápidamente (Dimmock y col., 1991). 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, 1992c). El vLB en condiciones naturales se presenta íntimamente asociado a los linfocitos, siendo muy raro que se pueda encontrar en forma de partículas libres (Johnson y Kaneene, 1991; Kaja y Olson, 1982). Desde el momento que la única fuente de virus son los linfocitos de los animales infectados, todos los materiales que puedan contener éste tipo de célula blanca representan el mayor factor de riesgo.

Las prácticas de manejo que facilitan la transmisión horizontal del vLB incluyen tanto, el contacto entre categorías, como procedimientos y materiales que posibiliten el pasaje de pequeñas cantidades de sangre entre un animal y otro (DiGiacomo, 1992c; Pelzer, 1997). Dentro de ellos se destacan la

castración, descorne, tatuajes u otras formas de identificación como las caravanas, extracción de pezones supernumerarios, inyecciones, premunición, palpación rectal, etc. (Pelzer y Sprecher, 1993; Sargeant y col., 1997). Algunas de estas posibles formas de transmisión iatrogénica han sido objeto de divergencias, como es el caso de la palpación rectal (Hopkins y col., 1991; Hopkins y DiGiacomo, 1997; Shirley y col., 1997). El posible rol de artrópodos e insectos hematófagos también ha sido comprobado en forma experimental, aunque resulta difícil estimar su alcance en condiciones prácticas (Perino y col., 1990; DiGiacomo 1992a; Johnson y Kaneene, 1992; Wentink y col., 1993). Luego de la infección, los animales infectados seroconvierten en períodos variables de tiempo, que según un estudio reciente de Monti y Frankena (2005), se ubica entre 47 y 57 días.

Si bien en el calostro y en la leche se pueden detectar importantes cantidades del vLBE, su importancia en la transmisión natural de la enfermedad es objeto de controversias (Guarino y col., 1989; DiGiacomo 1992c; Jacobs y col., 1995). Los terneros nacidos de madres positivas ingieren con el calostro importantes cantidades de anticuerpos anti-vLB, fruto del pasaje de los mismos desde la sangre hacia la glándula mamaria en las etapas finales de la preñez. Ello explica que las madres puedan ser serológicamente "falsas negativas" durante el parto, y los terneros positivos como resultado de la absorción de anticuerpos maternos. Estos anticuerpos maternos declinan progresivamente con la edad, hasta desaparecer en su totalidad hacia el 6<sup>to</sup> u 8<sup>vo</sup> mes de vida (Villonata y col., 1990; Sienna y col., 1996a; Felmer y col., 2006).

En un trabajo realizado en Uruguay por Sienna y col. (1996b), se estudió la desaparición de los anticuerpos calostrales en relación a la edad de los terneros. Sobre un total de 51 animales positivos en la primera semana de vida, a los 6 meses de edad, tan solo 3 (6%) mantenían dicha condición. A los 8 meses, la totalidad de los terneros fueron negativos a la prueba de IDGA.

Sólo terneros alimentados con calostro de vacas positivas evidencian anticuerpos pasivos, aunque ellos sean hijos de madres negativas (Nagy y col., 2002). Ferrer y Piper (1981), determinaron que el 14,6% de terneros nacidos de vacas seropositivas y criados en aislamiento o semi-aislamiento, desarrollaron la infección antes de los 24 meses de edad (Felmer y col., 2006). Dimmock y col. (1991) observaron que, las nuevas infecciones se limitan a terneros hijos de vacas negativas a quienes se les administra leche proveniente de vacas positivas, debido a la práctica común de utilizar mezcla de calostro o leche en su alimentación. Cuando los terneros fueron criados sólo con leche de vacas negativas no aparecieron nuevas infecciones.

En un ensayo realizado en dos tambos se analizó la relación entre la condición serológica de la madre y de las terneras al momento del nacimiento y su posterior condición de infectados a los 18 meses de edad. En ninguno de los

establecimientos estos factores de riesgo evidenciaron una influencia significativa en la difusión de la enfermedad (Sienra y col, 1996a).

La transmisión por intermedio del semen ha sido comunicada por Lucas y col 1980 y si bien es discutida la difusión por inseminación artificial, debe tenerse en cuenta que el riesgo puede ser alto si el toro es positivo y posee un proceso inflamatorio crónico en su tracto genital, ya que linfocitos infectados estarán presentes en el semen (Kaja y Olson, 1982; Monke, 1986).

Los embriones no parecen ser fuentes significativas de infección, siempre que la membrana pelúcida se mantenga intacta y se realicen los lavados en las diluciones recomendadas (Johnson y Kaneene,1992). La transmisión intrauterina del vLB reconoce una importancia mucho menor que la vertical, aunque entre un 6-8% de casos pueden presentarse como resultado de infección transplacentaria a partir de vacas positivas (DiGiacomo,1992b; Hopkins y Digiacomo,1997).

Existen elementos que señalan la participación de factores genéticos en la susceptibilidad del ganado frente al vLBE. La predisposición de ciertas líneas genéticas a desarrollar LP, es un hecho bien conocido desde hace muchos años (Johnson y Kaneene,1992; Negay y col., 2002).

### **Pérdidas Económicas**

En la LBE las pérdidas económicas directas por linfosarcoma son las más fácilmente visibles y cuantificables. Ellas implican una disminución en la producción, deterioro del estado general, y muerte o refugio de los individuos afectados (Sienra y col., 1983; Rhodes y col., 2003b). Si bien en la mayoría de los establecimientos los casos de la neoplasia son poco frecuentes, en algunos rodeos la inusual incidencia de linfosarcoma determina un importante impacto económico (Ballagi-Pordany y col, 1992).

Respecto al efecto de la infección sobre la producción y reproducción de los rodeos infectados existen opiniones dispares y contradictorias. Existen estudios que no evidencian diferencias productivas entre animales seronegativos y seropositivos (Jacobs y col., 1991; Sargeant y col., 1997, Radostits y col, 2002). Otras investigaciones, sin embargo, han encontrado que los animales infectados presentan una disminución significativa en la producción lechera (Wu y col., 1989; Detilleux y col., 1991; Servicios Agrícola Ganadero. Ministerio de Agricultura de Chile,1992; Pelzer y col.,1993), alteraciones en la composición de la leche, incremento en el intervalo interparto y el índice de refugos (Scott1990; Da y col1993).

Por otra parte, las restricciones del mercado internacional y el alto costo de los programas de control representan un costo indirecto sumamente importante en

la mayoría de los países. En un relevamiento efectuado por Ott y col (2003), que comprendió 20 estados de E.U.A., se concluyó que las vacas seropositivas tuvieron una disminución de 218 Kg en su producción frente a las seronegativas. En el mencionado estudio las pérdidas económicas totales para E.U.A se estimaron en 525 millones de U\$D (Ott y col., 2003).

En otro reciente estudio realizado también en E.U.A, Rodhes y col en el año 2003, se estimó una pérdida anual por la forma sub clínica de 6.400 U\$D para un tambo de 100 vacas y una prevalencia de LBE del 50% (Rhodes y col., 2003a).

### **LBE y Salud Pública**

Numerosos estudios han demostrado que el vLBE se encuentra presente en leche de las vacas con LBE, y que a partir de ella es posible infectar experimentalmente bovinos u ovinos (Kelly y col.,1993; Sienna y col., 1998). Tal circunstancia ha generado preocupación, debido al riesgo que puede significar para el ser humano el consumo de tan vital alimento procedente de rodeos infectados. Se han efectuado importantes relevamientos y hasta el presente, no ha sido posible determinar una relación entre el vLBE y de las neoplasias linfoides en el ser humano. (Wentink y col., 1990). No obstante esto, recientes estudios realizados por Buhering y col (2003) han puesto en evidencia el genoma del vLBE y aún proteínas del capsido en pacientes humanos con cáncer de mama (Collazo y col., 2002). El significado de ello todavía no está claro y es un terreno abierto a nuevas investigaciones.

### **Diagnóstico**

Numerosas técnicas de laboratorio se han utilizado con tal finalidad, e incluyen métodos directos para identificar el agente, y métodos indirectos destinados a verificar la presencia de anticuerpos específicos. El empleo de métodos destinados a identificar antígenos virales, proteínas codificadas por el virus o las propias partículas virales ha permitido una muy temprana detección de la infección (Johnson y Kaneene,1992). Dentro de éstas técnicas se destaca la Reacción en Cadena a la Polimerasa -PCR-, que representa un método de muy elevada sensibilidad (Kelly y col.,1993; Tronko y col.,1997; Felmer y col, 2006) y que se ha utilizado en el Uruguay, especialmente para el control del semen.

En los estudios de rutina se aplican métodos indirectos, como Inmunodifusión en Gel Agar -IDGA- y ELISA. La IDGA tiene a favor su bajo costo, simplicidad y facilidad de lectura, por lo que constituye una técnica ampliamente difundida para el diagnóstico de la LBE (Everman y col.,1997; Radostits y col.,2002). La IDGA posee la desventaja de no detectar bajos

niveles de anticuerpos post-infección, y en condiciones naturales puede demorar hasta 12 semanas para identificar un animal seropositivo. La IDGA es menos sensitiva que otras técnicas serológicas, como RIA y ELISA, especialmente cuando éstas emplean anticuerpos monoclonales (Guarino y col., 1989; Monke y col.,1992; Felmer y col.,2006).

Un aspecto importante de las pruebas, es su relación con los sueros positivos de referencia, por lo que la U.E. ha tomado como tal un único control positivo conocido como E4, contra el cuál se deben validar todos los test aprobados para su uso con aceptación oficial (Kerkhops y col., 1992).

El desarrollo del método de ELISA (Enzima Ligada a un InmunoAbsorbente) ha significado un importante avance en el diagnóstico de la LBE. Ello está dado no solamente por la elevada sensibilidad y especificidad, sino también porque puede ser aplicado tanto en muestras individuales como en mezcla (en el caso de la leche puede ser utilizada la leche del tanque de frío y en suero formar pool de hasta 10 animales). La elevada sensibilidad del ELISA permite también su aplicación en leche, evitando la extracción de sangre y facilitando el proceso de obtención de muestras en grandes poblaciones (Rhodes y col.,2003; Sienna y Guarino, 1991).

La técnica de ELISA realizada en leche tiene la ventaja de la simplicidad en la toma de la muestra, ya que no requiere la extracción venosa que puede repercutir en los animales desde el punto de vista de la maniobra en sí misma y el posible efecto de transmisión iatrogénica. Por tal motivo, y desde hace ya muchos años, el ELISA en leche ha sido reconocida y utilizada para el diagnóstico de la enfermedad, con adecuados niveles de sensibilidad y especificidad (Brenner y col, 1994). La misma técnica se está utilizando en la U.E. en tanque, como parte del sistema de vigilancia de la LBE.

### **Situación en Otros Países**

Si bien la LBE tiene una distribución mundial, resulta muy difícil establecer la real prevalencia de la enfermedad. Ello es debido a que, salvo en aquellos países que cuentan con programas nacionales de erradicación, la mayoría de los estudios epidemiológicos involucran a un limitado número de animales y establecimientos, o representan relevamientos sesgados como los son aquellos derivados de las remisiones de materiales para el diagnóstico.

En E.U.A. y Canadá la LBE se encuentra sumamente difundida, y dependiendo de las regiones, hasta el 100% de los tambos se encuentran infectados. La prevalencia a nivel de establecimientos oscilaría entre 25-50%, alcanzando en algunos casos cifras muy superiores (Scott y col.,1992; Pelezer y col.,1993; Jacobsen y col., 1998).

En otros países, la información proveniente de relevamientos parciales o zonales, expresan amplias variaciones y resulta difícil establecer generalizaciones. Existe pues, una gran diversidad de situaciones que van desde regiones con muy pocos establecimientos afectados, hasta áreas con el 50% de prevalencia. Tal situación ha sido observada en países con sistemas de producción tan disímiles como Brasil (Angelino y col., 1992), Israel (Brenner y col., 1994) y Australia (Dimmock y col., 1991). En Argentina la situación es similar a la situación de Uruguay, con un crecimiento importante de las tasas de infección en los últimos años (Alejo y col., 2000)

En Europa muchos países han implementado programas de lucha obligatoria contra la LBE, correspondiendo en primer lugar a Dinamarca en 1965 (Bendixen, 1965) y luego Alemania en 1976 (Johnson y Kaneen, 1992), extendiéndose luego en forma obligatoria a toda la Unión Europea. En la actualidad 12 de los 15 miembros originales de la U.E. se encuentran oficialmente libres de LEB: Bélgica, Dinamarca, Alemania, España, Irlanda, Francia, Luxemburgo, Holanda, Austria, Finlandia, Suecia y Reino Unido (UE Decisión 2005/28/C)

Con el objetivo de declarar predios libres, se están llevando a la práctica programas de control voluntario en muchos países, entre ellos E.U.A, Canadá (DiGiacomo, 1992a) y Chile (Servicio Agrícola Ganadero, Chile, 1992).

### **Control y Erradicación**

Al no existir vacunas efectivas contra la enfermedad, se ha debido optar por otras alternativas de lucha contra la enfermedad. Se han establecido dos grandes estrategias, con algunas variantes, en los programas de control de la LBE. La más radical es la denominada "serotest y sacrificio", que implica identificar a todos los bovinos mayores de 8-12 meses que se encuentren infectados y proceder luego a su sacrificio. Los resultados obtenidos mediante éste método son muy efectivos respecto al control de la enfermedad, ya que es posible sanear totalmente los establecimientos en períodos de 2-3 años (Kaja y Olson, 1982). Los países de la UE han optado por esta estrategia radical de erradicación mediante sacrificio. El empleo del método de ELISA en leche permite despistar establecimientos positivos en forma rápida y económica. Hay que destacar que la erradicación significa un alto costo, requiere de políticas nacionales y regionales estables, amplia infraestructura diagnóstica y sistemas eficientes de identificación e indemnización. No obstante ello, los programas nacionales pueden llevar largo tiempo en su aplicación, tal es el caso de Finlandia que a pesar de su escasa población lechera la erradicación de la LBE demoró más de 30 años de lucha (Nuotio y col., 2003).

En otros países, especialmente E.U.A y Canadá, se ha considerado inconveniente encarar programas de erradicación debido principalmente a la elevada prevalencia de la infección, la alta calidad del material genético de las poblaciones afectadas, las escasas o cuestionables pérdidas económicas y la improbable transmisibilidad al ser humano. Parecería ser que en las circunstancias actuales el altísimo costo económico no reportaría, ni directa o indirectamente, beneficios que justifiquen tal tipo de actitud (Perino y col., 1992). Sin embargo, tanto E.U.A como Canadá poseen programas limitados de control, especialmente referidos a los Centros de Toros, debido a que las restricciones de muchos países que adquieren material genético exigen que éste provenga no sólo de animales sino también de rodeos negativos a la LBE (Kaja y Olson.,1982).Ello ha sucedido también en otros países, con el objetivo de poder enfrentar las mencionadas restricciones sanitarias internacionales.

Los programas voluntarios de control pueden, en casos de una escasa prevalencia de la enfermedad, establecer la metodología del "serotest y sacrificio (DiGiacomo, 1992b). Ella consiste en realizar examen serológico de todos los animales susceptibles, y eliminar a aquellos que resulten positivos. Con tres o cuatro exámenes trimestrales es posible declarar establecimientos libres (Guarino y col.,1991).

También se han propuesto esquemas de "refugio selectivo", eliminando en forma preferencial los individuos con linfocitosis persistente o con mayores niveles de anticuerpos, aunque ello en el pasado no ha logrado resultados esperado a nivel de las poblaciones infectadas (Perino y col., 1992; Collazo y col.,2002; Rhodes y col., 2003).

Para el control de la LBE en la mayoría de las oportunidades se ha optado por procedimientos basados en la separación de los animales positivos: "serotest y segregación" (Shettigara y col.,1989; Sienna, 2001). Esta técnica implica disminuir el riesgo de contagio separando físicamente a los bovinos positivos de aquellos negativos, y minimizando prácticas de manejo que puedan favorecer la transmisión de la enfermedad. Ello requiere la aplicación de rígidas normas de bioseguridad y una separación física entre los animales de 1500-2000 metros. Si bien en algunas oportunidades los resultados han sido variables, en general se ha logrado disminuir significativamente la prevalencia e incidencia de la LBE.

Dado que en nuestras condiciones de trabajo la segregación puede ser muy difícil de lograr y mantener, el serotest asociado a meticulosas medidas de manejo preventivo puede constituir una herramienta útil y de bajo costo (DiGiacomo, 1992b).

Luego de reducir la prevalencia a niveles bajos, cualquiera sea el método de control seleccionado, es posible encarar finalmente un programa de erradicación. Las medidas de bioseguridad destinadas a la protección de los

predios se basan en el chequeo de todo los bovinos que ingresan al mismo, incluyendo también al material genético. Controles periódicos -semestrales o anuales- permiten conservar los establecimientos libres de la enfermedad (Guarino y col., 1989; Nuotio y col., 2003).

### **Situación en el Uruguay**

En nuestro país el linfosarcoma fue diagnosticado por primera vez por Casas y Quiñones en 1952, en tanto que los primeros estudios clínicos y epidemiológicos fueron realizados en la Facultad de Veterinaria por el Dr. M. Podestá y colaboradores en 1971 (no publicado). En dicha oportunidad se realizaron relevamientos basados en los hallazgos hematológicos para el diagnóstico subclínico de la LBE, ya que en esa época no se disponía de técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad.

A partir de 1977 el Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino", - en la actualidad DILAVE -, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, introdujo la técnica de IDGA en base al empleo de kits comerciales. Hasta 1996 se habían procesado aproximadamente 17.000 sueros, provenientes de animales de exportación, casos clínicos, establecimientos con planes de saneamiento o diagnóstico, etc. De ese total de sueros procesados resultaron positivos el 20%.

Un creciente número de casos clínicos fueron diagnosticados por diferentes veterinarios, especialmente en la cuenca lechera, generando un manifiesto interés por el estudio de la enfermedad. En 1983, Sienna y col comunican un cuadro clínico, patológico, hematológico y serológico de linfosarcoma bovino juvenil en una vaquillona de 10 meses de edad. El relevamiento serológico de las vacas del establecimiento evidenció una prevalencia del 57%.

Entre 1987 y 1989 el DILAVE y Conaprole (Cooperativa Nacional de Productores de Leche) desarrollaron un proyecto con el objetivo de evaluar la prevalencia de LBE utilizando la técnica de IDGA. De los 128 establecimientos seleccionados al azar, 35 resultaron positivos (27,3%); con 4,1% de infección a nivel individual (Guarino y col., 1991).

En 1989 se efectuaron ensayos tendientes a determinar la sensibilidad y especificidad del IDGA frente a dos métodos de Elisa: uno indirecto y otro por competición. Ambas técnicas de Elisa se mostraron muy similares, y la IDGA evidenció una sensibilidad del 91,3% y una especificidad del 100% (Guarino y col, 1989).

Utilizando la técnica de ELISA en leche, la Facultad de Veterinaria realizó un relevamiento sobre 100 tambos de San José, Colonia y Canelones. En dicha oportunidad el porcentaje de establecimientos positivos fue del 52,3% (Sienna y

Guarino, 1991). Relevamientos posteriores alertaron sobre la importante difusión de la infección en la población lechera del país (Hopkins y col., 1991).

Con motivo de las exportaciones a Brasil, especialmente a partir de 1988, varios laboratorios veterinarios particulares han venido realizando las pruebas serológicas solicitadas por los exportadores. Al ser rechazadas para la exportación las hembras positivas, se ha generado un filtro sanitario negativo en perjuicio de sanidad de los rodeos en cuanto a la enfermedad. La preocupación de veterinarios y productores por la enfermedad y su significación, determinó que, establecimientos en muchas zonas del país implementaran programas voluntarios de control y, en algunos casos, de erradicación de la enfermedad. Sin embargo, la ausencia de legislación específica, impide reconocer oficialmente a los predios libres. Subsanan ésta, significaría un importante estímulo para aquellos productores que han encarado la lucha contra la LBE, y ubicaría al país dentro de aquellos que ya han iniciado sus programas voluntarios de control.

En un estudio financiado por el INIA y la Facultad de Veterinaria se analizó el efecto de la LBE sobre los principales parámetros reproductivos y productivos en establecimientos lecheros del Uruguay, incluyendo: 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  $417 \pm 64$  días frente a  $389 \pm 6$  días en las negativas (Sienra y col, 2000).

En otros estudios, se han logrado caracterizar importantes aspectos de la enfermedad, como ser la dinámica de la infección dentro de los establecimientos y la persistencia de los anticuerpos pasivos (Sienra y col, 1996, Sienra y col, 2001). Así mismo se ha analizado la influencia de la infección sobre la fórmula leucocitaria (Sienra y col, 1998, Sienra y col, 2001, Collazo y col, 2002)

Desde 2005 las crecientes exportaciones de bovinos lecheros en pie, especialmente hacia la República Popular China, han reactivado la preocupación por la enfermedad en razón de la exigencia de seronegativos por parte de los importadores.

Existiendo conocimientos y adecuada capacitación en la epidemiología y el diagnóstico, el desafío que se planteaba era, la aplicación de los mismos para lograr su instrumentación práctica a nivel de los establecimientos afectados, ofreciendo así respuesta a los productores lecheros interesados en controlar o eliminar la enfermedad de sus predios. Con tal motivo, en el año 2006 se obtuvo el apoyo del INIA concretando así el desafío de pasar de la academia a la instrumentación de programas concretos de lucha contra la enfermedad. En

dicho proyecto, el componente de erradicación se basó en serodiagnóstico, refugio inmediato de positivos y estrictas medidas de bioseguridad. Uno de los establecimientos lleva ya dos años libre de reaccionantes al vLBE (Sierra y col., 1983), mientras que el otro, recién en diciembre de 2010 evidenció condición de negativo en todos sus individuos.

Para los programas de predios libres de LBE, se deben realizar al menos tres pruebas anuales, que si pudieran realizarse en leche, simplificarían el manejo, evitarían situaciones estresantes y prevendrían posibles contagios de origen iatrogénico.

Es por ello que este trabajo tiene como objetivo estudiar la factibilidad de incluir, en el programa de erradicación de la LBE, muestreos en leche en lugar de muestreos de suero. Sabiendo que la técnica de ELISA en suero posee una elevada correlación con su homóloga en leche, deberá estudiarse si esta correlación se mantiene a lo largo de la curva de lactancia. Ello es debido a que durante el ciclo de la lactancia, se producen modificaciones cuali y cuantitativas en la leche, que, en general no han sido consideradas en los estudios de validación.

En el estudio se utilizarán dos kits de diagnóstico comercial, de un mismo laboratorio y aprobados por la Unión Europea, lo que asegura su confiabilidad y el reconocimiento posterior de sus resultados.

## **OBJETIVOS GENERALES**

Establecer la utilidad de la prueba individual de ELISA en leche como prueba de rutina, durante la lactancia en establecimientos lechero con programas de lucha contra la Leucosis Bovina Enzoótica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Evaluar la concordancia entre dos técnicas de ELISA, una para suero y otra para leche.
- b. Estudiar la utilidad de la prueba de ELISA en leche para diferentes etapas de la lactancia, tomando en cuenta no solo este factor sino también la producción de leche y el estado sanitario de la glándula mamaria.
- c. Establecer un protocolo de vigilancia en base a muestras de leche.
- d. Difundir los resultados obtenidos en este estudio.

## **HIPÓTESIS**

El diagnóstico de Leucosis Bovina Enzoótica se podrá realizar a partir muestras de leche en todo momento de la lactancia sin que sus resultados se vean afectados por el momento de obtención o el estado sanitario de la glándula mamaria.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Selección de Establecimientos y Animales:**

El estudio se realizó en dos tambos comerciales del departamento de San José, en la localidad de Villa Rodríguez. Uno de los establecimientos participa de un programa voluntario de erradicación de LBE mientras que el otro, posee una prevalencia > 90%. La población de vacas en ordeño de 160 y 220, respectivamente. Ambos establecimientos cuentan con adecuado sistema de identificación animal, registros productivos, reproductivos y sanitarios, asesoramiento veterinario permanente y compromiso participativo del productor y colaboradores.

En cada establecimiento se seleccionaron 15 animales dentro de la población, vacas multíparas, con parto previsto para el otoño, procurando la mayor concentración de fechas de los mismos. Se relevaron los antecedentes individuales de cada una de las vacas seleccionadas, dentro de los cuales se incluyeron edad, número de lactancia, fecha prevista de parto, antecedentes serológicos, etc., que se incluirán en una base de datos en Excel y en planillas individuales impresas. A todos los animales seleccionados, más cinco suplentes, se les realizó una prueba serológica en un plazo máximo de un mes previo a la fecha de parto prevista, a los efectos de confirmar su condición serológica.

### **Toma de Muestras**

Las muestras de suero se obtuvieron por venopunción coccígea, empleando agujas (18G) y jeringas (5cc), desechables, depositándolas en tubos sin anticoagulante. Los mismos, correctamente identificados, fueron conservados a temperatura ambiente en gradillas, transportadas al laboratorio dentro de las 6 hs. próximas y centrifugadas para obtener el suero a 1500 rpm/10min.

Una vez finalizado el proceso de centrifugación, se extrajo el suero, el cual se dispuso en tubos Eppendorf de 1.5 ml, lo cuales fueron conservados en freezer a -18 °C hasta el momento de su procesamiento. Cada muestra se conservó por duplicado a los efectos de mantener un banco de sueros para pruebas de verificación.

En el caso de las muestras de leche, las mismas se tomaron en el momento del control lechero mensual, asegurando que estén bien homogeneizadas a partir del medidor. Las mismas, adecuadamente identificadas, fueron depositadas en frascos con tapa de 20ml, y conservadas en caja térmica refrigeradas en el transporte al laboratorio donde fueron conservadas en freezer hasta su procesamiento.

### **Pruebas de Laboratorio**

Los análisis de laboratorio se realizaron en el Área de Virología (Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UDELAR). Para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína de la cubierta (antigp51) del virus de la LBE en sangre, se utilizó un kit comercial indirecto de Elisa "SERELISA BLV Ab Mono Indirect"®, con pocillo sensibilizado con gp51, producido por el Laboratorio Synbiotics (Francia) y reconocido por la UE, procediendo en la forma convencional y acorde a las instrucciones especificadas en el mismo.

La lectura de las placas se realizó mediante un lector de Elisa Multiskan MS352®, Labystems (Finlandia) con filtro de 450nm, y establecidas las densidades ópticas (DO) de los controles, se establecerá el índice de DO, considerando las muestras con índice  $<0,125 \times OD$  p como negativas y  $>0,125$  como positivas.

En el caso de las muestras de leche, la detección de los anticuerpos se efectuó mediante kit de ELISA para leche del mismo laboratorio, por duplicado en pocillo con antígeno celular y antígeno viral gp51, "LACTELISA BLV Ab Bi Indirect"® (Synbiotics, Francia), acorde a las especificaciones del mismo y con lectura en el mismo equipo y filtro utilizados para los sueros. Para la interpretación se estableció la diferencia de DO entre pocillos para cada muestra (dDO), sea control positivo y negativo así como las problema, estableciendo el índice =  $0,25 \times (dDO \text{ muestra} - dDOp)$ , siendo considerados positivos valores =  $0 > a 0$  y negativos cuando el índice es  $< -(dDOp)/16$ .

Todos los resultados fueron registrados mediante planillas elaboradas para dicho fin, y conservadas las lecturas impresas en papel térmico.

### **Momento de la colecta de las muestras y análisis de la Información**

La primera muestra fue exclusivamente de suero, y se realizó como máximo un mes antes del parto, ya que muestras obtenidas más próximas al parto pueden brindar resultados falsos negativos por concentración de anticuerpos en el calostro. (Brandon y col 1971)

Luego del parto, se tomaron muestras simultáneas de suero y leche, relacionadas con las tres etapas clásicas de la curva de lactancia: inicio, medio y final. A los efectos de evitar falsos negativos en las primeras semanas de lactancia, la primera muestra se obtuvo recién entre los 2 y 3 meses, la segunda entre los a los 5 y 6 y la tercera entre los 8 y 9 meses de lactancia. En la Figura 1 se presenta el esquema de la toma individual de las muestras.

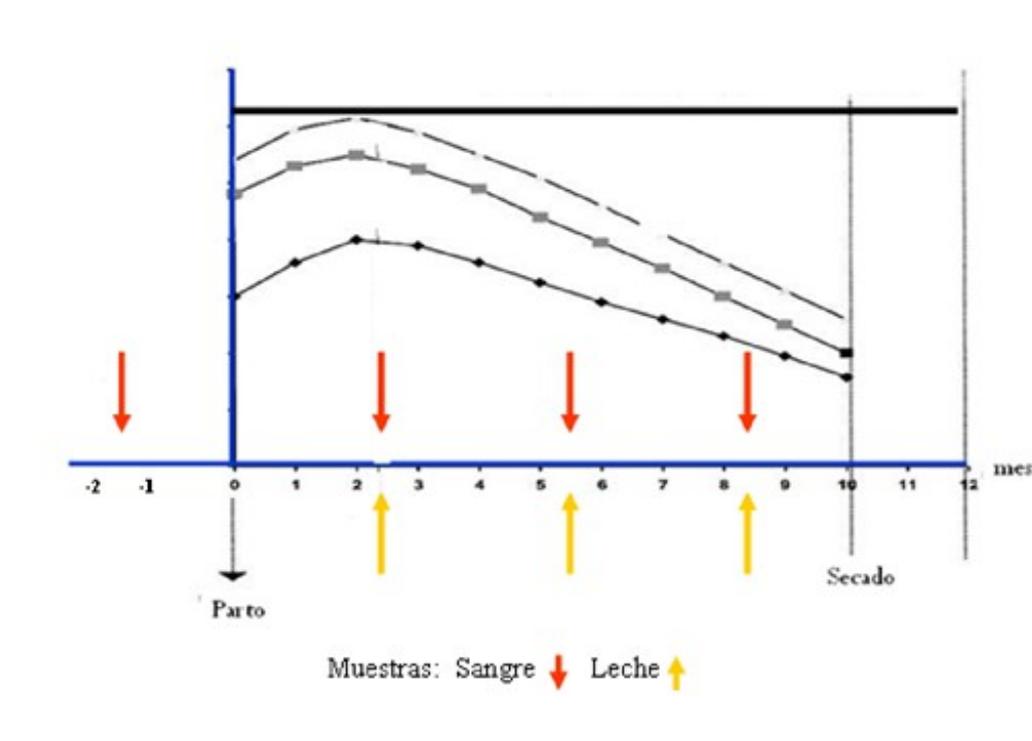
De acuerdo al protocolo de muestras, de cada vaca se obtuvieron un total de siete muestras: 4 de suero y 3 de leche, lo que llevó a un total general de muestras de 210.

A los efectos de la comparación de los resultados, se consideró como prueba de referencia la de ELISA en suero, utilizando los criterios de validación establecidos en el "Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para Animales Terrestres" de la OIE, Sec.1.1, Cap.1.1.4 inc.b, con animales de referencia con estado de infección conocido (2004).

Se determinó para la prueba de ELISA en leche la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo mediante el software

WINEPISCOPE vs. 2.0, "Evaluación de Test Diagnósticos", a los niveles de confianza de 95; 97,5; 99 y 99,5%.

**Figura 1.** Representación esquemática de la toma de muestras de sangre y leche por vaca.



Para una correcta interpretación de los datos obtenidos se realizaron cuatro estudios comparativos, con el fin de poder detectar, en caso que existiera alguna variante.

Las principales variantes que éste trabajo analizó fueron: el diagnóstico de leche en comparación con la suero, la etapa de lactación de las vacas, los niveles de producción de leche y el estado sanitario de la glándula mamaria.

Para ello se eligieron vacas de la misma fecha de parto para uniformizar tanto etapa de lactación como época del año.

La cantidad en litros de producción de leche y recuento de células somáticas se obtuvieron a través del control lechero mensual realizado por el productor.

## RESULTADOS

### Comparación de Técnicas y Etapa de Lactación:

Se observa en la tabla 1 como se comportaron las diferentes técnicas en cada uno de los establecimientos y en cada etapa de lactación. Los resultados obtenidos permiten establecer que la etapa del ciclo de lactación no interfirió en el diagnóstico de LBE en leche.

Por su parte, los valores obtenidos para las muestras analizadas en los dos tambos mediante la técnica de ELISA en leche, concordaron con los obtenidos en suero, descartando posibles errores de diagnóstico según la procedencia de la muestra.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos en los dos establecimientos y en cada etapa de lactación, comparando resultados de sangre y leche.

	TAMBO POSITIVO		TAMBO NEGATIVO	
	ETAPA 1			
	ANI. POS	ANI. NEG	ANI. POS	ANI. NEG
RES. SANGRE	15	0	0	15
RES. LECHE	15	0	0	15
	ETAPA 2			
RES. SANGRE	15	0	0	15
RES. LECHE	15	0	0	15
	ETAPA 3			
RES. SANGRE	15	0	0	15
RES. LECHE	15	0	0	15

### Producción de leche:

Cuando se estudio la producción de leche entre los tambos, se realizó un Test de  $t$  para identificar las posibles diferencias entre ambas, resultando que no existían diferencias significativas entre ellos ( $P=0,93$ ) con un nivel de confianza del 95%.

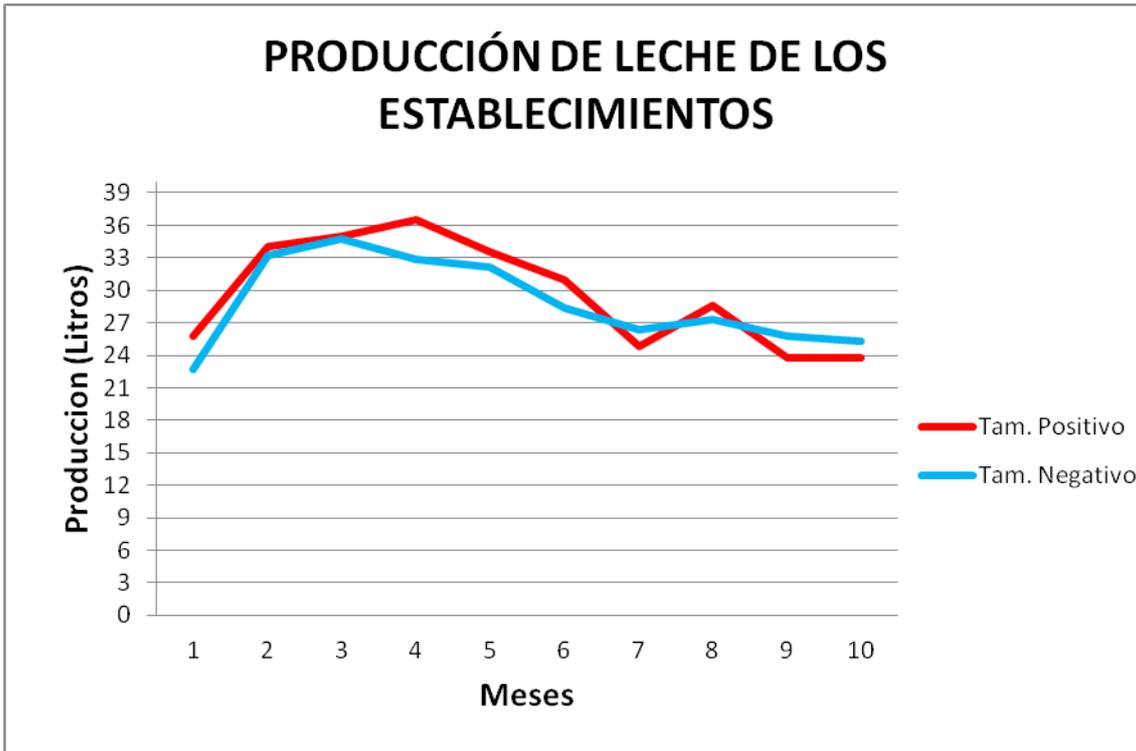
En el caso de la producción de leche, ni la cantidad, ni la variación de sus componentes, afectaron el diagnóstico de ELISA en leche.

Estos datos fueron obtenidos del control lechero de los establecimientos. Figura 2 y Tabla 2.

**Tabla 2.** Producción de leche mensual de los animales en estudio, de ambos tambos estudiados.

Mes	Litros Tam. Pos.	Litros Tam. Neg.
1	25,8 ± 6,7	22,7 ± 8,7
2	34 ± 5,1	33,2 ± 9,7
3	35 ± 6,5	34,8 ± 8,8
4	36,5 ± 6,0	32,8 ± 7,6
5	33,6 ± 4,5	32,2 ± 5,6
6	31 ± 3,8	28,4 ± 5,3
7	24,8 ± 5,4	26,4 ± 6,5
8	28,6 ± 5,9	27,3 ± 4,5
9	23,8 ± 4,9	25,8 ± 4,9
10	23,8 ± 5,3	25,3 ± 5,3

**Figura 2.** Producción de leche total de los animales en estudio en ambos establecimientos.



**Células Somáticas:**

El estudio de las células somáticas fue realizado con el cometido de analizar el estado sanitario de la glándula mamaria por la correlación directa que existe entre ésta y la mastitis. Sus datos fueron obtenidos por el control lechero mensual que realizaron los establecimientos estudiados.

**Tabla 3.** Promedio de células somáticas de los animales estudiados en base mil por ml., en cada mes de su lactancia, en ambos establecimientos.

Mes	Cel/MI Tambo Neg.	Cel/MI Tambo Post.
1	1213,1 ± 1628,3	353 ± 472,5
2	402,3 ± 845,8	437,9 ± 528,5
3	216,7 ± 267,1	371,8 ± 527,8

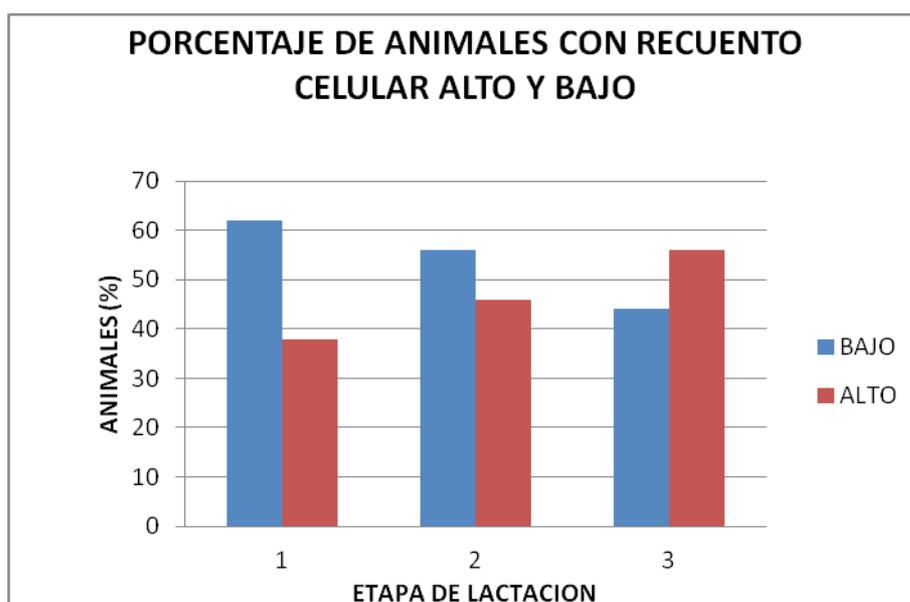
4	607 ± 727	449,3 ± 749,5
5	679,6 ± 980,4	457,4 ± 519,4
6	747,6 ± 900,8	536,5 ± 753,2
7	495,5 ± 725,7	570,8 ± 854,5
8	344,8 ± 364,4	496,1 ± 622,8
9	287,3 ± 244,3	1182,3 ± 1827,2
10	463,4 ± 626,4	626,7 ± 685,3

Los valores fueron analizados, con el Test de *t*, llegando a la conclusión que no existieron diferencias significativas entre los tambos ( $P=0,34$ ) con un nivel de confianza del 95%.

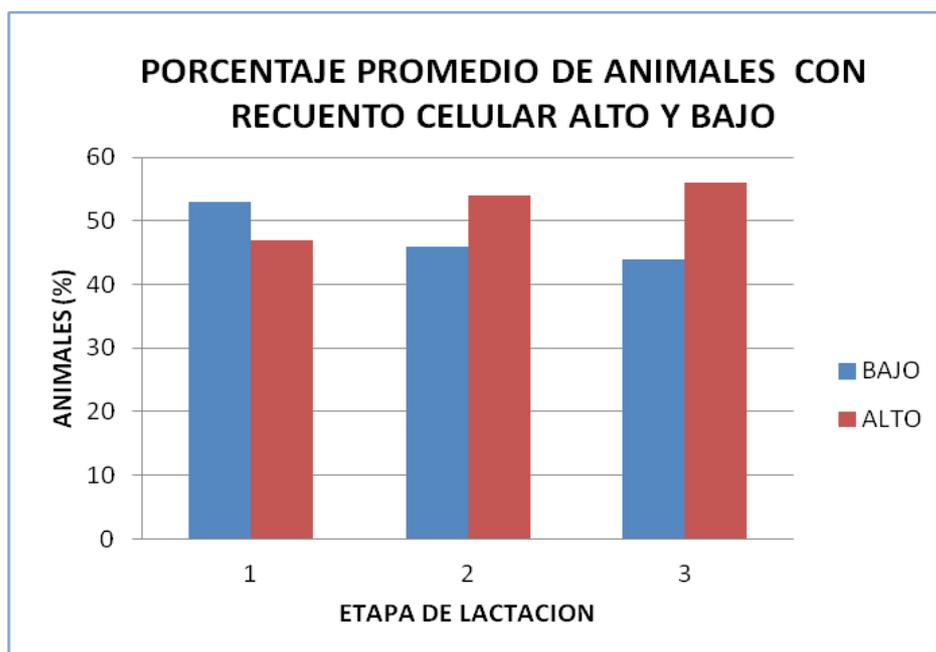
Para estudiar el posible efecto de las Células Somáticas sobre la técnica de ELISA en leche, los animales se discriminaron por etapa de lactación y por recuento celular. Considerando un recuento celular bajo, a animales con menos de 200.000 cel./ml. y animales con recuento celular alto aquellos que contengan más de 200.000 cel./ml.

Cuando se realizó la comparación de los resultados de células somáticas, el recuento celular alto o bajo no mostró interferencia con el resultado de la técnica, ya que a distintos recuentos en el momento del diagnóstico, no variaron los resultados obtenidos en el laboratorio. Tabla 3 y Figuras 4 y 5.

**Figura 3.** Porcentaje promedio de animales con recuento celular alto y bajo por etapa de lactación del tambo positivo.



**Figura 4.** Porcentaje promedio de animales con recuento celular alto y bajo por etapa de lactación del tambo negativo.



## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a través de la técnica de ELISA en leche como ELISA en suero en las diferentes etapas de lactación concordaron en su totalidad, determinando que la técnica ELISA en leche es un método adecuado para el diagnóstico de la enfermedad (Nguyen y Maes, 1993; González y Nivaldo, 1999 Felmer y col., 2006), sin afectarse por la producción de leche o el estado sanitario de la glándula mamaria.

Como antecedente en Uruguay se menciona una publicación en el año 1991 de Sierra y Guarino, donde se realizó la técnica de ELISA en leche mezcla para diagnosticar establecimientos del sur del Uruguay con LBE. En este trabajo se diagnosticaron establecimientos con LBE, pero por el tipo de muestras utilizadas, no se logró determinar la cantidad de animales infectados.

Un trabajo realizado en Francia por Toma y col. (1986), en 88 establecimientos, con un número de 1250 animales en ensayo, permitió identificar del 92 al 94% de los animales infectados con una especificidad del 98 al 99%, mientras que Hofierk y Granatova en 1988, publica que el rendimiento de la técnica de ELISA en leche, fue de 96,3 a 100%. Nguyen publica un trabajo realizado en 1993 en el Institut Vaccinal du Docteur Pourquoi, donde también obtuvo una

concordancia del 100% entre las mencionadas técnicas. Los tres autores anteriormente mencionados obtuvieron similares resultados, que concuerdan con los resultados obtenidos en este ensayo, aprobando la hipótesis principal de este trabajo donde se pretende utilizar las muestras de leche como muestra de rutina, concordando también con lo mencionado por Florent y col en 1988.

Si bien es sabido que la composición de la leche varía a lo largo de la curva de lactancia, ya sea por su etapa de lactación, por el aumento de la producción de leche, etc (Aguilar, 2011), Sorge y col. concluyen en un trabajo realizado en 2011, que la producción de leche no influye en el diagnóstico de LBE por la técnica de ELISA realizada en muestras de leche. Nuestro trabajo es coincidente con lo reportado por este autor, ya que diferentes producciones de las vacas analizadas, no produjo variaciones en los resultados obtenidos por la técnica de ELISA en leche

Yavru y col en 2007 publican un trabajo experimental donde comparan no solo la técnica de ELISA en leche y ELISA en suero sino también, el estado grávido o no de los animales, donde concluyen, que, en el caso de vacas gestantes se comporta mejor el ELISA en leche.

Lo antes mencionado adquiere relevante trascendencia en nuestros sistemas productivos lecheros. En Uruguay se trata de inseminar a los animales a los 60 días post parto para poder obtener un ternero por vaca por año, es decir que los animales a estudiar en un protocolo de vigilancia, van a estar en su mayoría gestantes.

Este es otro argumento a favor de realizar ELISA en leche para la vigilancia de LBE.

En cuanto, animales que presentaron recuento celular mamario alto (mayor de 200.000 cel. /ml.), los mismos no influyeron en los resultados obtenidos en las diferentes etapas de lactación, observándose un incremento de este recuento a medida que avanzaba la lactación.

Con la utilización de las muestras de le se minimiza el stress que sufren los animales por la venopunción, mejorando así el Bienestar Animal.

En lo que refiere exclusivamente a la técnica, no existen diferencias en su procesamiento (solo en el tipo de muestra a estudiar), ya que los tiempos de incubación y los procedimientos son similares a los realizados por muestras en suero.

## **CONCLUSIÓN**

En este trabajo se ha llegado a la conclusión de que no existen diferencias en los resultados obtenidos entre la técnica de ELISA en leche y ELISA en suero en las diferentes etapas de lactación, pudiéndose establecer un protocolo de vigilancia con muestras de leche para el diagnóstico Leucosis Bovina Enzoótica, sin que influya la producción de leche y estado sanitario de la glándula mamaria en el diagnóstico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilar, L (2011)**. Estudio de la evolución de la producción y la composición de leche en un sistema de producción lechera de base pastoril. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República de Uruguay. 23p.
2. **Alejo D, Gutiérrez S, Dolcini G, Esteban E.; Odeón A, Fernández Sainz I, Casaro A. (2000)**. Prevalencia de la infección por el virus de la Leucosis Bovina (BLV) en tambos de los partidos de General Puyrredón y Balcarce. Rev. Arg. Prod. Anim. 20 (1): 77-83.
3. **Angelino J, García M, Birgel E. (1992)**. Estudio epidemiológico de la Leucosis Enzoótica de los bovinos en rebaño bovino lechero de la raza Holandesa Negra y Blanca. XIII Congr. Panam. C. Vet. Santiago de Chile, Chile P.196.
4. **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.

5. **Bendixen H J. (1965).** Bovine Enzootic Leukosis. *Adv. Vet. Sci.* 10:129-204.
6. **Brandon MR, Watson DL, Lascelles AK. (1971).** The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Biol Med Sci* 49:613-623.
7. **Brenner J, Moss S, Moalem U. (1994).** A comparative study of the Elisa and Agid Techniques for the detection of Bovine Leukosis virus antibodies in serum and milk. *Israel J. Vet. Med.* 49(4):165-167.
8. **Buehring G, Philpott SM, Choi KY. (2003).** Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res. Hum. Retr.* 19(12):1105-1113.
9. **Collazo L, Sienna 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. c.c.p.322-325.
10. **Da Y, Shanks D, Steward JA, Lewin HA. (1993).** Milk and fat decline in bovine Leukemia virus-infected Holstein cattle with Persistent Lymphocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90:6538-6541.
11. **D'angelino JL, García M, Birgel EH. (1998).** Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *J. Dairy Res.*, 65: 693-695.
12. **Detilleux JC, Freeman AE, MillerLD. (1991).** Comparison of natural transmission of bovine leukaemia virus in Holstein cows or two genetic lines selected for high and average milk production. *Amer. J Vet Res.* 52(9):1551-1559.
13. **DiGiacomo RF. (1992a).** The epidemiology and control of Bovine Leukemia virus infection. *Vet.Med.* 87(3):248-257.
14. **DiGiacomo RF. (1992b).** Vertical transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet.Med.* 87(3):258-262.
15. **DiGiacomo RF. (1992c).** Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet.Med.* 87(3):263-271.
16. **Dimmock CK, Chung YS, Mackenzie AR. (1991).** Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herd. *Austr.Vet.J.* 68(7):230-233

17. **Doménech A, Govache J, Llames I, Paya M, Suárez G, Gómez L. (2000).** In vitro infection of cells of the monocytic macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 81: 109-118.
18. **Evermann, JF, Jackson, MK. (1997).** Laboratory diagnostic test for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet.Clin. North Am Food Anim Pract.* 13(1):87-106.
19. **Felmer, R.; Zúñiga, J.; Recabal, M.; Chavez, R. (2006).** Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38(2):137-141.
20. **Fernandes Camargos M, Clare A, Minardi da Cruz C, Moreira Lessa Maurílio L, Andrade Rocha D, Oliveira Pellegrin A. (2005).** Testes de diagnóstico para o virus da leucemia bovina. *Rev. Bras.Cien. Vet.*12: 149-150.
21. **Florent G, Delgoffe J, Zygraich N. (1988).** Detection of Antibodies to Bovine Leukemia Virus in Bovine Milk Samples with an ELISA Involving Two Monoclonal Antibodies. *Vet Micr* 18: 89-93.
22. **Gonzalez B, Nivaldo E. (1999).** Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (EBLV) antibodies by means of enzymatic immunoabsorption Assay (Elisa) performed in milk. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Chile) 52 p.
23. **Guarino H, Saizar J, Sierra R. (1989).** Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. XVII Jornadas Uruguayas de. Buiatría, Paysandú, Uruguay.c.c.4:1-7.
24. **Guarino H, Capano F, Gil A. (1991).** Leucosis Bovina Enzoótica: relevamiento serológico en establecimientos del sur del país. II Jornadas Técnicas de Fac. Vet. 40:14-16.
25. **Hofirek B, Granatova M. (1988).** Demonstration of antibody to bovine Leukosis virus in Milk by the ELISA test. *Acta Vet. Brno.* 57: 133-146.
26. **Hopkins SG, DiGiacomo RF, Evermann JF, Christensen JD, Deitelhoff DP, Mickelsen WD. (1991).** Rectal palpation and transmission of Bovine Leukemia virus in dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Ass.*199 (8):1035-1038.
27. **Hopkins SG Y DiGiacomo RF. (1997).** Natural transmission of Bovine Leukemia virus in Dairy and beef cattle. *Vet.Clin. North Am Food Anim. Pract.* 13(1):107-128.

28. **Huber NL, DiGiacomo RF, Evermann JF, 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.
29. **Jacobs RM, Heeney JL, Godkin MA, Leslie K, Taylor JA, Davies C, Valli V. (1991).** Production and related variables in Bovine Leukemia virus-infected cows. *Vet.Res.Comm.* 15:463-474.
30. **Jacobs R, Pollari FL, McNab E, Jefferson B. (1995).** A serological survey of Bovine Syncytial virus in Ontario. Associations with Bovine Leukemia and Immunodeficiency like viruses, production records and management practices. *Can.J.Vet.Res.* 59(4):271-278.
31. **Jacobsen KL, Rockwood GA, DerVartanian MK. (1998).** Bovine Leukemia virus (BLV): preliminary report on the lack of transmission to calves fed whole milk from BLV- seropositive cows. *AgriPract.* 10(5):22-26.
32. **Johnson R, Gibson C, Kaneene J. (1985).** Bovine leukaemia virus: a herd- based control strategy. *Prev Vet Med* 3: 339-342.
33. **Johnson R & Kaneene B. (1992).** Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet.Bull.* 62(4):278-312.
34. **Kaja R & Olson C. (1982).** Non-infectivity of semen from bulls infected with Bovine Leukosis virus. *Theriogenology.* 18(1):107-111.
35. **Kelly EJ, Jackson MK, Marsolais G, Morrey JD, Callan R. (1993).** Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of polymerase chain reaction. *Am.J.Vet.Res.* 54(2):205-209.
36. **Kerkhops P, Knapen K, Mammerickx M. (1992).** Methodologie du controle des coffrets de diagnostic ELISA de leucose bovine enzootique. *Ann. Med. Vet.* 136(4):275-277.
37. **Lucas MH, Dawson M, Chasey D, Wibberly G, Roberts DH.(1980).** Enzootic Bovine Leukosis virus in semen. *Vet.Rec.* 106 (4):128.
38. **Monke DR. (1986).** Noninfectivity of semen from bulls infected with Bovine Leukosis virus. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 188(8):823-825.
39. **Monke DR, Rohde RF, Hueston WD, Milburn RJ. (1992).** Estimation of the sensibility and specificity of the agar gel immunodiffusion test for Bovine Leukemia virus: 1296 cases (1982-1989). *J.Am.Vet.Med.Ass.* 200(12):2001-2004.

40. **Monti GE, Frankena K. (2005).** Survival analysis on aggregate data to assess time to sero-conversion after experimental infection with Bovine Leukemia virus. *Prev Vet Med.* 68(2-4):241-262.
41. **Nagy DW, Tyler JW, Stoker A, Kleiboeker SB. (2002).** Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virus-infected cows. *J Am Vet Med Assoc.* 220(11):1681-1684.
42. **Nguyen V, Maes R. (1993).** Evaluation of an Enzyme-Linked Immunoassay for detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus in serum and milk. *J. Clin. Microbiol.* 31(4): 979-981.
43. **Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen EM (2003).** Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.* 59(1-2):43-49.
44. **Oficina Internacional de Sanidad Animal. (OIE). (2004).** Código de Enfermedades Terrestres. Cap. 2.3.4 Leukosis Bovina Enzoótica. Disponible en [www.oie.int/es/](http://www.oie.int/es/) Fecha: 28/09/2012.
45. **Ott SL, Johnson R, Wells SJ. (2003).** Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med.* 61(4):249-262.
46. **Pelzer KD, Sprecher DJ. (1993).** Controlling BLV infection on dairy operations. *Vet. Med.* 88(3):275-283.
47. **Pelzer KD. (1997).** Economics of Bovine Leukemia virus infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13(1):129-141.
48. **Perino LJ, Wright R, Hoppe KL, Fulton RW. (1992).** Bovine Leukosis virus Transmission with mouth parts from *Tabanus* after interrupted feeding. *Am. J. Vet. Res.* 51(8):1167-1169.
49. **Pollari FL, Waugsphacht VL, DiGiacomo RF, Evemann JF. (1992).** Effects of Bovine Leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56(4):289-295.
50. **Radostits OM., Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002).** *Medicina Veterinaria.* 9ªed. Madrid. Interamericana. 2T.
51. **Rhodes JK, Pelzer KD, Johnson YJ. (2003a).** Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.*; 223(3):346-352.

52. **Rhodes JK, Pelzer KD, Johnson YJ, Russek-Cohen E. (2003b).** Comparison of culling rates among dairy cows grouped on the basis of serologic status for bovine leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc.* 223(2):229-231.
53. **Sargeant JM, Kelton DF, Martin SW, Mann ED. (1997).** Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev Vet Med.* 31(3-4):211-221.
54. **Schwartz I, Bensard A, Polack B, Perrin B, Bertheley M, Stott J. (1994).** In vivo leukocyte tropism of bovine leukaemia virus in sheep and cattle. *J Virol* 68: 4589-4596.
55. **Scott M, Smith T, Kellogg DW, Mauromoustakos A. (1992).** Comparison of milk yield and quality of dairy cows that tested seropositive for bovine leukemia virus. *J. Dairy Sci.* 73(suppl.1):262.
56. **Servicio Agrícola Ganadero. Ministerio de Agricultura de Chile. (1992)** Sistema de Certificación de Predios Libres de Leucosis Bovina Enzoótica. [www.minagri.gob.cl](http://www.minagri.gob.cl). Fecha 29/09/2012.
57. **Shettigara P, Samagh B, Lobinowich E. (1989).** Control of Bovine Leukemia virus infection in dairy herds by Agar Gel Immunodiffusion test and segregation of reactors. *Can.J.Vet.Res.* 53(1):108-110.
58. **Shirley JE, Smith JF, Stokka GL, Scoby R, Van Anne T.( 1997).** Bovine Leukosis. *Comp.Cont.Educ.Pract. Vet.* 19(5):651-654.
59. **Sienra R, Bonnevaux J, Martino P. (1983).** Descripción de un caso clínico de Leucosis Bovina en una ternera de 10 meses de edad. XI Jornadas Uruguayas de. Buiatría, Paysandú, Uruguay. cc.4:1-7.
60. **Sienra R, Guarino H. (1991).** Prevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras de leche mezcla de tambos de Canelones, Colonia y San José, II Jor.Téc.Fac.Vet. p.41
61. **Sienra R, Guarino H, Gil A, Nuñez A, Villamil J. (1996a)** Leucosis Bovina Enzoótica: efecto de la condición serológica de las vacas sobre las crías luego del nacimiento y a los 18 meses de edad. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Campo Grande, MS (BRASIL) PN9-481.
62. **Sienra R, Guarino H, Gil A, Nuñez A, Villamil J. (1996b)** Duración de los anticuerpos colostrales contra el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en terneros de campo. VI Congreso Nacional.de Veterinaria.Montevideo, Uruguay. p:11-15.

63. **Sienra R, Nuñez A, González A, Ceretta ME, Guarino H, Morón C. (1998).** Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado Lechero. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p: 23-25.

64. **Sienra R, Ceretta ME, Guarino H, Morón C, de Torres E (2001).** Recuentos Totales y Fórmula Leucocitaria en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en vacas lecheras. VII Congreso Nacional de Veterinaria Montevideo, 19-22 nov. CD ROM.

65. **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. Avances de Investigación en Sanidad Animal. Serie FPTA-INIA 01: 21-38.

66. **Sienra R, Guarino H, Ceretta ME, de Torres E, Morón C. (2001).** Epidemiología de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en rodeos lecheros del Uruguay. VII Congreso Nacional de Veterinaria Montevideo, Uruguay. p: 19-22.

67. **Sienra R. (2001).** Plan Piloto Monitoreo en Lechería. Actividades y principales enfermedades en los establecimientos estudiados. Rev. Plan Agrop. 95:27-30.

68. **Sorge U, Lissemore K, Cantin R, Kelton DF. (2011).** Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. J. Dairy Sci 94 (10): 5062-5064.

69. **Stott M, Thurmond M, Dunn S, Osburn B, Stott J. (1991).** Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. J Gen Virol 72, 307-15.

70. **Toma B, Vuillaume A, Prévost P, Duret C, Eloit M, Chappuis G, Parodi A. (1986).** Diagnosis of enzootic bovine leukosis by the ELISA test of mixed and individual milk. Ann Rech Vet 17(01): 75:83.

71. **Trono K., Pacheco J, Lager I. (1997).** Detección de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Rev. Med. Vet. 78(6):393-395.

72. **Villonta G, Segovia P, Montes G, Durán Y. (1990).** Duración y Títulos de anticuerpos calostrales antiviral Leucemia Bovina y Transmisión natural de la infección en terneros de un predio de la región Metropolitana, Chile. Avanc. Cienc. Vet. 5(2):114-118.

73. **Wentink GH, Oirschot JT, Pelgrim W, Wensing T, Gruys W. (1993).** Experimental transmission of Bovine Leukosis virus by rectal palpation. *Vet.Rec.* 132(6):135-136.

74. **Wu M-C, Shanks RD, Lewin HA. (1989).** Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical Bovine Leukemia Virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86(2): 993-996.

75. **Yavru S, Kale M, Simsek A Bulut O. (2007).** Comparison of BLV antibodies in late pregnant and non-pregnant Holstein cows using serum and milk ELISA. *Veterinarium*, 18: 50-55.