



Tesis de Maestría

Programa para la Investigación Biomédica

**Desarrollo de un nuevo método diagnóstico para la
Leucosis Bovina Enzoótica y su validación como
herramienta para el control de la enfermedad.**

Estudiante: Dr. Andrés Addiego.

Tutor: Dr. Sergio Bianchi

Co-tutor: Dr. Otto Pritsch.

Índice.

Resumen.	4
Introducción.....	6
Leucosis Bovina Enzoótica.	6
Virus de la Leucemia Bovina (VLB).....	11
Epidemiología y situación sanitaria.	17
Transmisión y factores de riesgo asociados a la propagación intra-rodeo.	23
Fisiopatología de la infección por VLB.	25
Diagnóstico de la infección por VLB.....	30
Costos económicos asociados a la infección por VLB.	40
Estrategias de control de la enfermedad.....	50
Problema identificado.	51
Objetivo general.....	52
Objetivos específicos.	52
Materiales y Métodos.....	53
Muestreo establecimientos bovinos.	53
Expresión y purificación de p24.	54
Expresión y purificación de ectoENV.	55
Técnica de ELISA.....	57
Kit Comercial VMRD.	57
Técnica de PCR.	57
Análisis estadístico.....	59
Resultados y Discusión.....	61
ELISA indirecto anti p24.....	61
ELISA indirecto anti ecto-ENV.	73
¿El ELISA p24 es capaz de identificar bovinos que presenten una respuesta de anticuerpos anti p24 pero no anti gp51?.....	95

Análisis epidemiológico en Tambo Modelo.	102
Conclusiones y Discusión general.	135
Objetivo específico 1.	135
Objetivo específico 2.	136
Objetivo específico 3.	136
Objetivo específico 4.	137
Discusión general.	137
Perspectivas.	140
Agradecimientos.	142
Bibliografía.	143

Resumen.

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una zoonosis bovina de amplia prevalencia y distribución mundial causada por la infección crónica del Virus de la Leucemia Bovina (VLB). Por las características propias de los sistemas de producción y las condiciones de manejo de los establecimientos productivos lecheros, que favorecen la transmisión horizontal de la infección por el VLB, la prevalencia de la infección es mucho mayor en los rodeos lecheros. Es en los rodeos lecheros donde se concentran sus efectos negativos, tanto a nivel sanitario como en los costos asociados a la infección y comercialización de subproductos provenientes de rodeos con alta prevalencia de LBE. El diagnóstico serológico de la infección por VLB es posible a partir de múltiples kits diagnósticos comerciales, sin embargo su costo es una limitante para su amplia utilización.

En Uruguay, nos encontramos en una etapa de pre-contemplación del problema de la LBE. Se sospecha una prevalencia alta, con amplia distribución territorial. A su vez, existe un riesgo comercial latente, frente a posibles limitaciones o restricciones comerciales a productos o subproductos provenientes de rodeos infectados por el VLB. Sin embargo, no contamos con registros nacionales de prevalencia, ni con programas que aborden el control de la enfermedad y tiendan disminuir su transmisión horizontal y prevalencia en los rodeos. Dado este problema, nos propusimos desarrollar un método diagnóstico alternativo, con eficacia similar a los kits diagnósticos existentes, capaz de ser utilizado a gran escala y con un costo menor.

Hemos desarrollado, puesto a punto y evaluado en distintos rodeos nacionales tres herramientas diagnósticas serológicas. Especialmente una de ellas con un rendimiento similar a técnicas serológicas validadas, lo que posibilitó articular un proyecto inter-institucional para la producción de un kit diagnóstico comercial de la LBE. Situación que podría propiciar un programa de control de la LBE a nivel nacional.

Introducción.

Leucosis Bovina Enzoótica.

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad bovina infecciosa, causada por un deltáretrovirus oncogénico llamado Virus de la Leucemia Bovina (VLB). Su primera descripción data de 1871, cuando Leisering describe la presencia de esplenomegalia irregular con conglomerados macroscópicos tumorales en vacunos. Su forma clínica más llamativa, aunque menos frecuente, se caracteriza por presentar una importante esplenomegalia tumoral debido a la acumulación de linfocitos B transformados. Los infiltrados tumorales no se presentan exclusivamente a nivel esplénico, sino que también pueden aparecer a nivel hepático, miocárdico, ocular, cutáneo, laríngeo y en nódulos linfoides.¹ El VLB comparte similitudes estructurales con otros virus del género deltáretrovirus: virus linfotrópico de células T humanas tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II) y virus de inmunodeficiencia en simios (STLV).

La infección por el virus genera una enfermedad infecciosa linfoproliferativa que afecta casi exclusivamente al ganado bovino, siendo éste el principal reservorio natural del virus.² Se transmite fundamentalmente en forma horizontal mediante el contacto de bovinos susceptibles con secreciones que contengan células infectadas (ocurre mayormente debido a prácticas de manejo veterinario).

La LBE presenta una distribución mundial, esparcida en todos los continentes fundamentalmente debido al comercio de bovinos en pie, con una elevada prevalencia especialmente en Sudamérica, Estados Unidos y Canadá. Otros países, fundamentalmente de la Unión Europea (UE), han llevado a cabo programas de erradicación exitosos.³ En Uruguay la situación no es clara, ya que no contamos con cifras oficiales de prevalencia, y tanto a nivel de las autoridades sanitarias como del aparato productivo se está en una etapa de pre-contemplación del problema. De todas maneras, como se explicará luego, hay elementos para presumir una prevalencia alta de la leucosis con una gran extensión territorial.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) incluye a la LBE como enfermedad bovina en su Manual Sanitario para Enfermedades Terrestres 2015, donde establece normas respecto al establecimiento de zonas libres de

LBE y buenas prácticas de manejo para el comercio de bovinos entre territorios.⁴

En la Tabla 1 se presenta el estatus sanitario de Europa y las Américas con respecto a VLB, y se muestran las regiones declaradas libres de VLB. Tanto en América del Sur, como en África, Asia y Medio Oriente (datos no mostrados) la información es mucho menos sistemática, basada en registros de rodeos específicos, registrándose la presencia de VLB en esas regiones pero no datos fidedignos de prevalencia.² Como se expondrá luego más exhaustivamente, tanto América del Norte como América del Sur son regiones de alta prevalencia del VLB, en contraposición con aquellas regiones cuyos sistemas productivos han establecido programas de control y erradicación de la leucosis.

Destacamos que EEUU, Canadá, Argentina y Uruguay (entre otros países de América del Sur) son los únicos grandes productores lácteos y de otros subproductos bovinos, cuyos rodeos presentan una alta prevalencia de leucosis. En contraposición con el continente europeo, Australia y Nueva Zelanda, esto representa una desventaja comparativa enorme, sobre todo a nivel comercial.

Hablaremos luego del riesgo para el país que implica ser vendedores de productos y subproductos bovinos en un contexto de prevalencia presumiblemente alta de LBE, y en muchos casos comercializarlos a compradores (UE) que han erradicado el problema de la leucosis.

Tabla 1. Países declarados libres de VLB. Europa y Oceanía son zonas de baja prevalencia o con grandes regiones libres de VLB. En cambio, tanto América del Norte como América del Sur son zonas con alta prevalencia de VLB. Tanto en África, Asia como Medio Oriente, también existen registros de VLB (datos no mostrados en tabla). Modificado de Polat y colaboradores, 2017.²

Europa	Andorra	Países declarados libres de LBE	1994, libre VLB.	⁵
	Chipre		1995, libre VLB.	
	Republica Checa		2010, libre VLB.	
	Dinamarca		1990, libre VLB.	
	Estonia		2013, libre VLB.	
	Finlandia		2008, libre VLB.	
	Irlanda		1999, libre VLB.	

	Noruega		2002, libre VLB.		
	España		1994, libre VLB.		
	Suiza		2005, libre VLB.		
	Suecia		2007, libre VLB.		
	Eslovenia		2006, libre de VLB.		
	Reino Unido		1996, libre VLB.		
	Holanda		2009, libre VLB.		4
	Polonia		2017, libre de VLB.		6
	Ucrania, Croacia, Italia, Portugal, Bielorrusia, Letonia, Rumania, Bulgaria, Grecia.	Aún no declarado libre de VLB.	VLB presente.	4,5 ,7	
Oceania	Australia	2013, libre VLB [†] (ganado lechero)		8	
	Nueva Zelanda	2008, libre VLB.		9	
América del Norte	EEUU	Alta prevalencia	<ul style="list-style-type: none"> • 83.9% rodeos lecheros. • 39% rodeos ganaderos 	10	
	Canadá		<ul style="list-style-type: none"> • 89% rodeos, con variaciones regionales. 	11 – 13	
América del sur	Brasil, Argentina, Chile, Bolivia, Perú, Venezuela, Uruguay, Paragua, Colombia.	Registros aislados en rodeos, no datos sistemáticos de prevalencia.		14 – 22	

El virus desarrolla una infección crónica para la cual no hay cura ni tratamiento, sin embargo la historia natural de la enfermedad puede seguir caminos diversos.

La mayoría de los bovinos infectados cursa la infección de manera subclínica y sin manifestaciones paraclínicas, sin embargo actualmente se sabe que presentan un desarreglo en su sistema inmune asociado a menor producción de leche, menor longevidad y mayor ineficiencia reproductiva.²

De los bovinos infectados, aproximadamente un tercio presenta una proliferación persistente de linfocitos B no transformados, denominada linfocitosis persistente (LP). La LP se caracteriza por un aumento permanente y sostenido en sangre periférica de una población policlonal no maligna de linfocitos B predominantemente CD5⁺IgM⁺. En cambio, un pequeño porcentaje de los bovinos infectados (1-5%) desarrolla luego de un período de latencia prolongado (mayor a 4-5 años desde la primo-infección) una leucemia/linfoma a linfocitos B. La historia natural de la enfermedad no debe entenderse necesariamente como estadios sucesivos en la evolución de la infección, sino que son diferentes formas de expresión de la misma, no presentándose de forma sucesiva en todos los casos. No están claros los determinantes de progresión entre un estadio y otro, ni existen biomarcadores que permitan identificar animales progresores.^{2,23}

Mecanismos de transmisión leucosis bovina

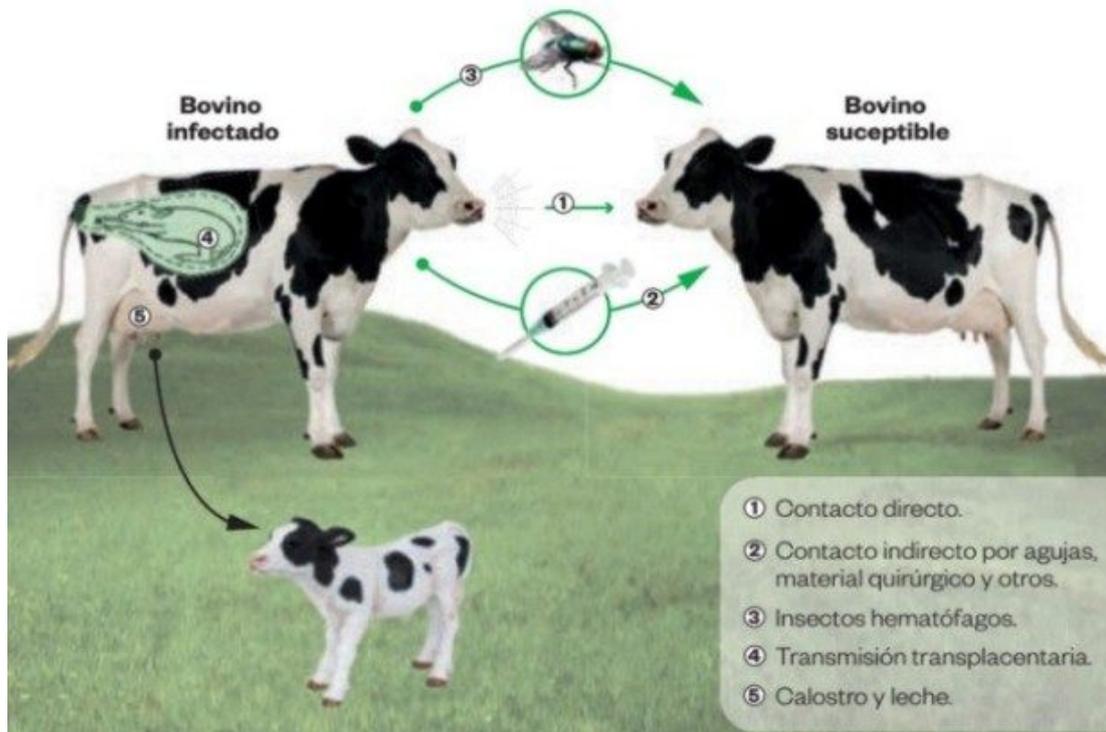


Figura 1. Mecanismos de transmisión de la LBE. Modificado de Castelli y colaboradores, 1999.²⁴

La infección primaria ocurre cuando una célula infectada (que contiene ADN copia del VLB integrado en su genoma) es transmitida a un bovino susceptible mediante diferentes mecanismos de transmisión (Figura 1). Durante este período inicial, el ADN proviral es intensamente expresado produciéndose partículas virales capaces de infectar nuevos linfocitos B. Durante esta etapa, el bovino experimenta un síndrome de impregnación viral (influenza símil) debido a la activa replicación viral y al inicio de la respuesta inmune. Luego de algunas semanas post primo-infección, la respuesta inmune montada en el huésped limita la infección de nuevas células. Sin embargo, los linfocitos infectados sí proliferan, transfiriendo el provirus integrado a su progenie. En esta etapa, la carga proviral (cantidad de linfocitos B con el provirus integrado/cantidad total de linfocitos B) es de alrededor de 1%. Luego de la primo-infección, la mayoría de los animales serán portadores asintomáticos del virus, pudiéndose sólo realizar diagnóstico serológico por la presencia de anticuerpos específicos anti-VLB o la identificación directa de ADN proviral.⁸

Luego de la primo-infección, en 30-50% de los bovinos infectados sobreviene un período de latencia de meses a algunos años, luego del cual se desarrolla el estadio de linfocitosis persistente (LP), caracterizado por un aumento del número absoluto de linfocitos B en sangre periférica (mayor a 10000/mm³). La LP representa un estadio subclínico de la enfermedad, aunque ya en éste estadio se documentan disfunciones en el sistema inmune del bovino. Puede durar varios años y es considerado un estadio pre tumoral, dada su potencialidad para progresar al estadio leucemia/linfoma.⁸

La leucemia/linfoma representa el estadio clínico con las manifestaciones clínicas más llamativas de la infección, predominantemente en bovinos adultos (mayores de 3-5 años). Como dijimos anteriormente, un 5% de los bovinos infectados progresan hasta este estadio. El proceso de transformación maligna dura al menos algunos años, y clínicamente se caracteriza por el desarrollo de grandes masas tumorales a nivel ganglionar, asociando hepato-esplenomegalia, presentándose globalmente como un deterioro en el estatus del animal, astenia, pérdida de peso y alteraciones del tránsito digestivo, lo que determina la baja performance productiva del animal conduciendo finalmente a la muerte o a su sacrificio.^{25,26} El estadio leucemia/linfoma no necesariamente es precedido por el estadio de LP, aunque ocurre así en 2/3 de los casos. A

diferencia de la LP, la expansión celular en esta etapa es monoclonal u oligoclonal, originada a partir de una o unas pocas células infectadas transformadas.⁸ La infección natural por el VLB sólo se ha confirmado en tres especies: *Bos Taurus* (ganado doméstico), *Bos Indicus* (cebú) y *Babalus Bubalis* (búfalo de agua). Artificialmente puede observarse la infección de otras especies, presentado diferente curso clínico. La inoculación del VLB en ovinos y caprinos resulta en el desarrollo de leucemia/linfoma con una latencia mucho menor que en bovinos (meses) y en casi la totalidad de los animales infectados. En conejos, la infección por el VLB genera un estado de inmunodeficiencia que conduce a la muerte.⁸

Virus de la Leucemia Bovina (VLB).

El VLB es un virus ARN del género deltaretrovirus perteneciente a la familia retroviridae, estructural y funcionalmente relacionado a otros retrovirus bovinos y humanos. Luego de la infección celular, el genoma viral se retro-transcribe a ADN copia, el cual se integra al ADN celular (provirus). Esta estrategia posibilita la transmisión del material genético viral hacia la progenie celular de la célula índice durante la mitosis. Dependiendo de las condiciones inmunológicas del huésped, el provirus puede permanecer transcripcionalmente silente o activo produciendo partículas virales infectantes.⁸

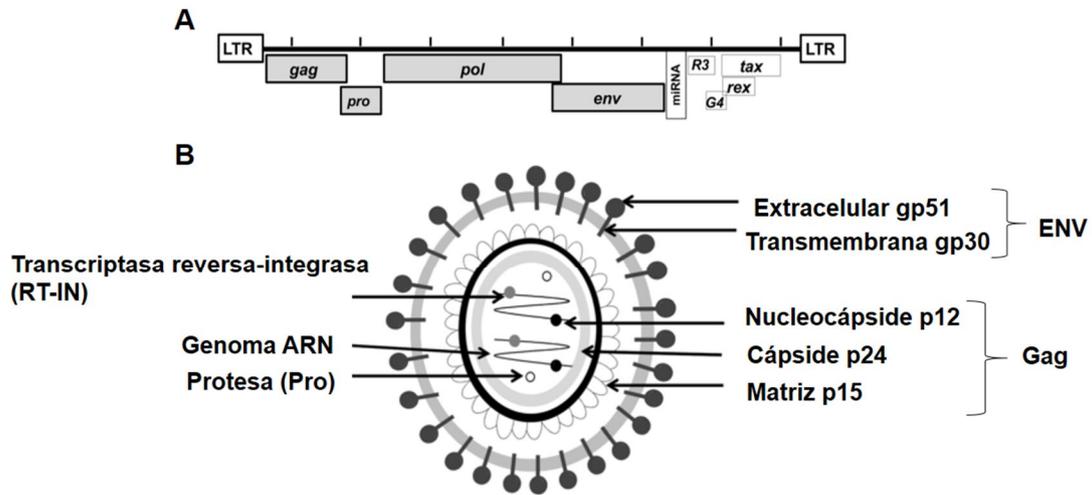


Figura 2. Representación esquemática del genoma y la partícula viral del VLB. **A)** Genes estructurales y de proteínas enzimáticas: *gag*, *pro*, *pol* y *env*; genes regulatorios: *tax* y *rex*; genes accesorios: *R3*, *G4* y *microARN*. **B)** Proteínas codificadas por los genes estructurales y de proteínas enzimáticas: glicoproteína ENV (*gp51* y *gp30*) codificada por el gen *env*, proteína Gag (*p12*, *p24* y *p15*) codificada por el gen *gag*, transcriptasa reversa e integrasa (RT-IN) codificada por el gen *pol*, y proteasa (Pro) codificada por el gen *pro*. Modificada de Polat y colaboradores.

El genoma del VLB está compuesto por las regiones estructurales llamadas *gag*, *pol* y *env* (Figura 2), necesarias para la síntesis de la partícula viral. La partícula viral tiene un diámetro de entre 60 y 125 nm, compuesta por una región central nuclear electrodensa rodeada por una cápside viral. Su genoma de ARN tiene 9kb de extensión aproximadamente. El genoma completo, además de los genes que codifican las proteínas estructurales y enzimas, contiene una región denominada pX, y está flanqueado a ambos lados por largas secuencias de repetidos terminales (LTR)^{1,2}.

El gen *gag* codifica el precursor Pr44^{gag}, un polipéptido que se cliva formando las proteínas no glicosiladas de la partícula viral: *p15*, *p24* y *p12*. La proteína de matriz (MA, *p15*), que corresponde al extremo NH₂-terminal del precursor *gag*, se une al ARN viral e interactúa también con la membrana lipídica viral. La proteína *p12* (nucleocápside, NC) es rica en prolina, y también se une fuertemente al ARN viral. La proteína *p24* constituye la cápside (CA) de la

partícula viral, y su ensamblado es imprescindible para lograr una partícula viral infectante. Esta proteína es un blanco de la respuesta inmunológica del huésped. Los bovinos infectados presentan títulos de anticuerpos anti p24; además presenta dos epítopes reconocidos por linfocitos T.¹ Como se desarrollará más adelante, la proteína p24 ha sido utilizada en el desarrollo de métodos diagnósticos dada su inmunogenicidad. La respuesta humoral anti p24, es específica, pero no constante.

El gen pol codifica, entre otros péptidos, la transcriptasa reversa (RT), una polimerasa de ADN dependiente de ARN que se activa preferentemente en presencia de Mg²⁺. La RT del VLB presenta alta fidelidad, teniendo menor porcentaje de error en la introducción de residuos que la RT del VIH-1 con una performance similar en la elongación (extensión del extremo 3'). Luego de la infección de células susceptibles, la RT sintetiza dos moléculas de ADN circulares (ADN proviral). La integración de las moléculas provirales en el genoma de la célula hospedero es dirigida por la integrasa (IN).¹

El gen env es transcrito como una poliproteína de 72kDa llamada pr72^{env}. Este precursor luego es clivado en dos péptidos glicosilados: uno extracelular gp51 (SU) y otro transmembrana gp30 (TM). TM y SU están asociados de forma estable formando un complejo mediante puentes disulfuros. TM es pobremente inmunogénica, mientras que SU es altamente inmunogénica, induciendo durante la infección una respuesta de anticuerpos específicos robusta y persistente. Dada su inmunogenicidad, varios trabajos la han intentado utilizar en el desarrollo de métodos diagnósticos para la enfermedad, así como en el desarrollo de vacunas. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra epítopes conformacionales de SU con actividades neutralizantes. Durante la división celular, la poliproteína precursora no se distribuye de forma uniforme en ambas células hijas, sino que se concentra predominantemente en una. Esto ha sido postulado como un mecanismo de inmunoescape viral. Se cree que la infección de nuevas células ocurre mediante la fusión de una célula infectada (que expresa las proteínas env en su membrana) con un linfocito no infectado. La proteína TM juega un papel fundamental en este proceso, utilizando un péptido de fusión que desestabiliza ambas membranas celulares permitiendo su fusión. Además de esta actividad, TM realiza también funciones de señalización celular mediante su motivo ITAM en su porción citoplasmática,

estando implicada en la modulación del tráfico intracelular de Env, así como en la interacción y regulación de algunos aspectos del sistema inmune favoreciendo el inmunescape viral¹.

La región pX, que se localiza entre ENV y el extremo 3'LTR, codifica las proteínas regulatorias Tax y Rex, y además otras proteínas accesorias como R3 y G4.

Las proteínas regulatorias están implicadas en la regulación de la transcripción viral, transformación leucémica inducida por el VLB y en la salida del ARN viral desde el núcleo celular al citoplasma.² La proteína Tax es un activador transcripcional de la expresión viral, y es otro blanco de la respuesta inmune del huésped presentando epítopes T y B. Su integridad es clave para que ocurra la infectividad viral.¹ Las proteínas accesorias R3 y G4, son también importantes para mantener la carga viral alta durante la infección, y están implicadas en el proceso de transformación leucémico. Se ha visto en infecciones experimentales de ovinos con VLB atenuados (deleción de R3 y G4) una historia natural con menor carga viral, siendo la progresión hacia la leucemia más infrecuente y con mayor latencia.^{2,27,28}

El tropismo mayoritario del virus es por linfocitos B con expresión de IgM en membrana, donde se replica mayoritariamente y es capaz de generar una transformación oncogénica. Se ha reportado que puede infectar otros tipos celulares como monocitos y macrófagos.^{1,14,29}

Se han descrito 10 genotipos de VLB con diferente distribución a nivel mundial, sin embargo no se han asociado a diferentes cursos clínicos de la enfermedad.⁷ Inicialmente, el estudio filogenético para la identificación de genotipos se realizó a partir del gen ENV, utilizando la secuencia de la glicoproteína de superficie gp51. De este modo, inicialmente se definieron 7 *clusters* o genotipos basados en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de productos de PCR (RFLP-PCR).³⁰ Luego, mediante el análisis de la secuencia completa del VLB y la secuenciación de cepas de VLB aisladas en diferentes lugares geográficos, se identificaron los diez genotipos conocidos hasta el momento (Figura 3).²

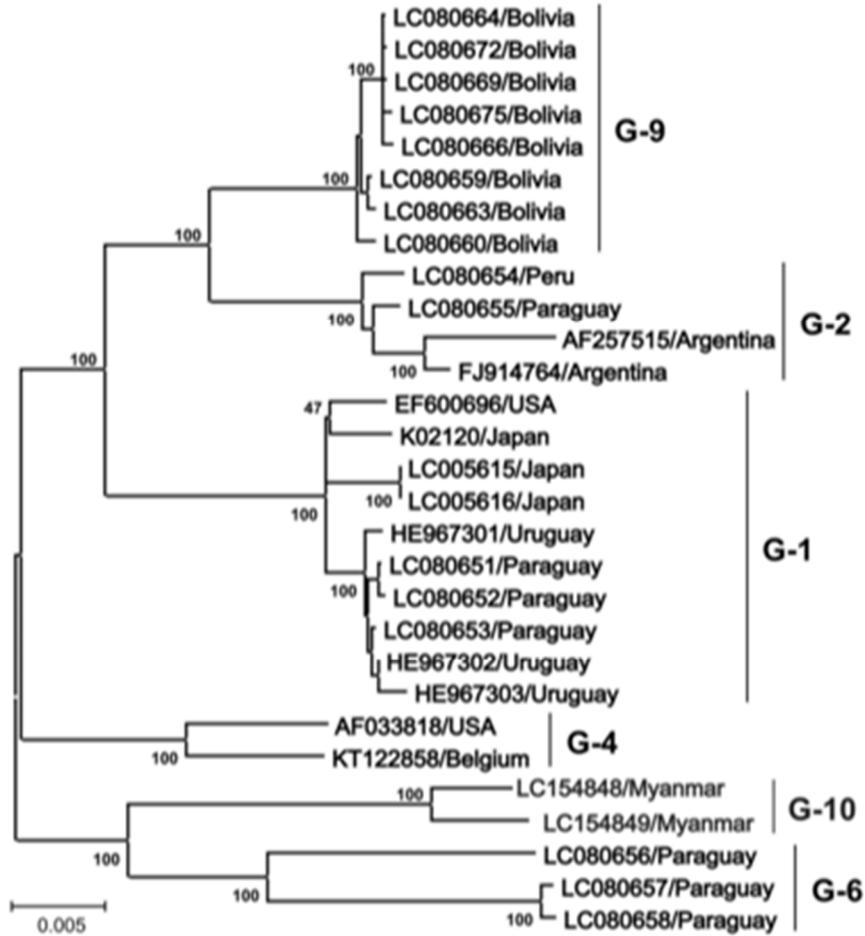


Figura 3. Árbol filogenético construido con las secuencias completas del genoma de VLB obtenidas de GeneBank. En Uruguay se han identificado tres cepas del genotipo 1. Tomado de Polat y colaboradores.

A pesar de la similitud en ciertos aspectos de la biología y la patogénesis con el HTLV, sumado a la alta exposición al VLB a través del consumo de leche y carne bovina, no se ha demostrado que el VLB infecte humanos. Sin embargo, en los últimos años la inocuidad del VLB ha sido puesta en duda, generándose notoriedad con respecto a posible riesgo para la salud humana.

EL VLB como agente causante de enfermedad humana.

Varios estudios han intentado demostrar una asociación entre la exposición ocupacional y dietética al VLB con neoplasias en humanos, sin embargo no existen actualmente evidencias contundentes de que el VLB represente un riesgo para la salud humana.^{8,31-33}

Se han encontrado secuencias génicas del VLB en tejidos neoplásicos mamarios, pero no se ha podido demostrar un rol etiológico del VLB en el cáncer de mama humano.³⁴⁻³⁷ Sin embargo, actualmente existe preocupación creciente respecto a este tema y hay cierta controversia al respecto, incluso en los últimos dos años se han publicado varios trabajos que pretenden poner el tema en el tapete. En este sentido, interesa destacar una revisión realizada por Lawson y colaboradores recientemente publicada sobre la relación entre el cáncer de mama y virus oncogénicos, entre los cuales mencionan al VLB.³⁸ Por otro lado, el trabajo realizado por un grupo australiano se plantea la hipótesis de una relación causal entre el cáncer de mama en humanos y la exposición al VLB, sustentando su hipótesis a partir de los trabajos que han identificado la presencia de ADN proviral del VLB en biopsias de tumores mamarios.

Pero, ¿cuántos trabajos hay publicados sobre la presencia de ADN proviral en muestras de tumores mamarios humanos? (Tabla 2). La evidencia disponible se encuentra conformada por estudios de casos y controles, que en su mayoría analizan de forma retrospectiva muestras de tejido mamario humano, tanto proveniente de lesiones malignas o premalignas como de tejido mamario sano. Mediante técnicas de identificación directa de ADN viral establecen asociaciones entre la presencia y ausencia de ADN proviral y la situación de salud o enfermedad (no lesiones neoplásicas o lesión neoplásica).

Tabla 2. Cáncer de mama y VLB. Trabajos que evidencian la presencia de ADN proviral en muestras de tejido mamario humano. CDI: carcinoma ductal infiltrante. Estudios de casos y controles. Modificado de Lawson y colaboradores.

Procedencia.	Casos	Controles	Técnica	Casos VLB +	Controles VLB +	Ref.
Colombia	CDI.	Lesión benigna.	PCR	19/53 (36%)	24/53 (45%)	³⁹
EEUU.	CDI.	Tejido mamario normal	PCR in situ.	67/114 (59%)	30/104(29%)	³⁶
Australia	CDI.	Lesión benigna.	PCR in situ.	40/50 (80%)	19/46 (41%)	⁴⁰
EEUU.	CDI.	Tejido mamario normal.	PCR in situ.	36/61 (57%)	20/103 (20%)	⁴¹
EEUU.	CDI.	Tejido mamario normal.	Secuenciación completa.	0/51	0/19	⁴²

Como surge de la Tabla 2, la evidencia que hay sobre el posible rol etiopatogénico del VLB en el cáncer de mama se sustenta en estudios de casos y controles que han identificado la presencia de ADN proviral en muestras de tejido mamario humano, tanto tumoral como no tumoral. Al respecto interesa destacar el trabajo de Gillet y colaboradores⁴² que realizan el secuenciado completo de 51 muestras tumorales y no son capaces de encontrar secuencias de ADN proviral, lo que representa una evidencia firme que aleja la asociación propuesta por otros autores. En suma, la controversia existe. Como puede verse en la bibliografía referenciada, varios trabajos plantean la duda del posible rol etiopatogénico del VLB en el cáncer de mama. Como se dijo anteriormente, en este tema no sólo está implicada la seguridad alimenticia de los subproductos bovinos, sino que también están en juego intereses comerciales importantes a nivel global.

Epidemiología y situación sanitaria.

Actualmente la infección por el VLB, sobre todo en rodeos lecheros, tiene una prevalencia alta con una diseminación global. Esto es cierto para la mayoría de los países donde se han llevado a cabo estudios epidemiológicos de prevalencia, salvo para el continente europeo donde se han realizado programas de manejo y campañas de erradicación exitosas. La UE ha declarado a la mayoría de sus países miembros libres de LBE, permaneciendo la enfermedad en: Ucrania, Croacia, Italia, Portugal, Bielorrusia, Letonia, Rumania, Bulgaria y Grecia. De forma similar, Nueva Zelanda y Australia establecieron programas de erradicación en los años 90s. En 2008 Nueva Zelanda ha sido declarada libre de BLV, y en 2013 Australia ha declarado sus rodeos lecheros libres de VLB ^{8,9,43-47} (Tabla 1).

Durante los años 60' la LBE ya era conocida como una enfermedad esparcida mundialmente con alta prevalencia entre los rodeos lecheros tanto en el continente europeo como en Norteamérica. En 1964 la OIE lanzó una recomendación a los países para que establezcan programas de control de la enfermedad, recomendando evitar el comercializar bovinos de rodeos infectados. En 1967 la OIE estableció la LBE como el tumor más frecuente en bovinos, responsable de importantes pérdidas económicas en Europa y América del Norte, recomendado a los países que establezcan capacidades de

diagnóstico serológico. A partir de este punto, la enfermedad se volvió endémica en países que no implementaron medidas de control y seguimiento. Desde el punto de vista epidemiológico, la LBE es una enfermedad que se disemina y manifiesta clínicamente de forma muy lenta. Luego de la introducción de bovinos infectados a un rodeo libre de VLB, los primeros casos de linfoma aparecerán al menos luego de 5 años, y podría llevar incluso décadas antes de que la prevalencia sea alta y la enfermedad tenga un impacto cuantificable.⁸

A continuación describiremos la situación epidemiológica y sanitaria de los países ganaderos más relevantes.

Estados Unidos no ha llevado a cabo programas exhaustivos de control y erradicación de la enfermedad, y la prevalencia intra-rodeos lecheros reportada varía entre 23% y 46%^{48,49}. En 2007, el Departamento de Agricultura de EE.UU. a través de su Programa Nacional de Monitoreo de Salud Animal (NHAMS), publicó que un 83,9% de los rodeos lecheros eran positivos para VLB. El trabajo involucra la participación de los 17 Estados que presentan mayor producción de leche en el país, representando el 79% de las operaciones lecheras y abarcando un 82,5% de las vacas lecheras del país. Además, presenta datos comparativos con respecto a un relevamiento similar realizado en 1996.¹⁰ El trabajo inicial representa el primer estudio exhaustivo de prevalencia en rodeos lecheros en el país del NAHMS, y revela una distribución extendida del VLB en los tambos lecheros de todo EE.UU. Previo a este trabajo ya existían reportes de prevalencia del VLB en el país, pero restringidos a ciertas zonas geográficas o incluso a estados particulares, pero no relevamientos a nivel nacional. Para definir la prevalencia en los rodeos lecheros de EE.UU., durante el período febrero a marzo de 1996 se seleccionaron aleatoriamente muestras de tambos de al menos 30 bovinos productores en 20 estados. Los tambos fueron visitados por funcionarios federales, obteniéndose muestras de sangre de 1006 bovinos. El diagnóstico se realizó mediante inmunodifusión en gel de agarosa (AGID). Se demostró la presencia de bovinos seropositivos en un 89% de los rodeos relevados, y la prevalencia intra-rodeo fue de al menos 25% en el 75% de los rodeos positivos. En suma, estimaron una prevalencia nacional alta de rodeos positivos para VLB con una gran distribución geográfica, sumado a una prevalencia individual

también alta de los rodeos afectados.⁵⁰ Este trabajo inicial ya planteaba la necesidad de un programa de control y erradicación de la LBE que incluyera buenas prácticas de manejo veterinario para disminuir la prevalencia de la enfermedad, dado que la estrategia de eliminación de los bovinos seropositivos resultaba económicamente inviable. El diseño del relevamiento de 2007 del NAHMS es diferente al de 1996. En esta ocasión, se obtuvieron muestras de leche de los tanques colectores de los tambos seleccionados y el diagnóstico se realizó mediante ELISA. Sin embargo, ambos trabajos revelan una prevalencia alta en los rodeos lecheros de EE.UU. con una gran distribución geográfica. En sus conclusiones el Departamento de Agricultura reitera la inviabilidad de eliminar animales seropositivos y la necesidad de instalar programas que disminuyan riesgos de transmisión horizontal.¹⁰

Puede afirmarse que existe en el país una preocupación creciente con respecto a la LBE, incluso en la actualidad ya existen algunos programas en marcha para certificación de rodeos libres de VLB. En Uruguay, como veremos más adelante, se cree que estamos en una situación epidemiológica similar, pero muchos más relegados con respecto a la generación de conciencia por parte de los organismos rectores oficiales.

El mismo programa (NAHMS) llevó adelante un trabajo en 1997 en rodeos cárnicos. Con respecto a la prevalencia para VBL, informa una prevalencia individual de 10.3%, con un 38% de rodeos positivos. El relevamiento involucró los 23 estados con mayor producción de carne bovina, realizándose diagnóstico mediante AGID o ELISA en suero. A diferencia del trabajo para rodeos lecheros descrito anteriormente, estos resultados no representan una prevalencia nacional dado el insuficiente número de muestras. Sin embargo, representa el relevamiento más exhaustivo que se ha realizado en rodeos para carne.⁵¹

El impacto de la LBE ocurre especialmente en los rodeos lecheros dadas las características de su sistema productivo, el cual resulta más propicio para la transmisión horizontal del VLB, asociando mayor prevalencia intra-rodeo, lo que se asocia a mayor morbilidad y costos económicos. Sin embargo, aunque menos estudiado, el problema de la prevalencia en los rodeos para carne podría también ocasionar costos económicos, especialmente si su prevalencia continúa en aumento, o si, como analizaremos más adelante, se instalan

restricciones comerciales a subproductos bovinos provenientes de rodeos positivos.

En Canadá también se han llevado a cabo estudios de prevalencia en varias provincias, demostrando un alto porcentaje de seroprevalencia, con un 89% de los rodeos infectados y una prevalencia intra-rodeo de entre 20 y 37%.¹⁴ Un trabajo inicial relevó muestras de suero de tambos de la provincia de Ontario. De una seroteca compuesta por más de 12000 sueros, fueron seleccionados mediante un sistema aleatorio computarizado 920 sueros de 263 rodeos para testear anticuerpos anti-VLB y otros retrovirus bovinos. El diagnóstico de anticuerpos anti-VLB se hizo por la técnica de AGID, y el porcentaje de bovinos que presentaron anticuerpos anti-VLB fue de 25,7%.⁵² Un estudio posterior estableció la prevalencia en las provincias de Prince Edward Island, Nova Scotia y New Brunswick. El diagnóstico de anticuerpos anti-VLB se realizó mediante la técnica de ELISA, testeándose un total de 2604 bovinos de los cuales 37,6% presentaron anticuerpos específicos contra VLB.⁵³ Luego de estos estudios iniciales de prevalencia, estudios similares en otras provincias han encontrado resultados similares, concordantes con una situación epidemiológica de alta prevalencia en los rodeos bovinos, y con una amplia distribución geográfica en el país.^{12,54,55}

En América del Sur hay menor cantidad de estudios sobre la prevalencia de la enfermedad en los rodeos bovinos. Porcentajes de prevalencia entre 34 y 50% han sido reportados por trabajos en Colombia, Venezuela, Chile y Uruguay. En Brasil hay considerable variación en la prevalencia de la enfermedad en los diferentes estados, con estudios que reportan niveles de hasta 50% de prevalencia en algunas regiones. Para América del Sur, con la excepción de Argentina, no hay en la actualidad datos de prevalencia a nivel nacional, habiendo muchos trabajos que reportan bovinos seropositivos en tambos puntuales o en ciertas zonas, conformando una información fragmentaria, y poco sistemática, pero que demuestran la presencia de VLB en los rodeos bovinos.^{14-17,19}

En Argentina se han llevado a cabo estudios más exhaustivos sobre la prevalencia de la enfermedad en los rodeos. Durante 1999 se llevó a cabo el primer estudio nacional de seroprevalencia para el VLB en bovinos lecheros. Para estimar la prevalencia estudiaron muestras serológicas de más de 10000

bovinos mayores de 18 meses, pertenecientes a 363 tambos diferentes de las mayores áreas productivas del país. Para la realización del estudio desarrollaron un ELISA que detectaba en suero anticuerpos específicos para el VLB. Demostraron una prevalencia global de 32,85%, con una diseminación de la enfermedad en todas las áreas del país testeadas y un 84% de rodeos positivos.²¹ El trabajo mencionado representa actualmente el estudio más exhaustivo que se ha llevado a cabo con respecto a la prevalencia del VLB en Sudamérica.

La situación epidemiológica en Asia es más incierta. Hay pocos trabajos que den cuenta de la prevalencia de la enfermedad, así como pocos programas de erradicación y manejo de bovinos infectados. En Camboya y Taiwán llama la atención los resultados de dos estudios que reportan sólo un 5% de los bovinos infectados.^{56,57} Lo interesante del estudio en Camboya es que demostraron la presencia del VLB en un país tropical por primera vez, y además que el trabajo fue realizado en 544 bovinos utilizados como animales de tiro. El diagnóstico lo realizaron utilizando la técnica de AGID a partir de muestras de sangre periférica. Demostraron un 5,3% de prevalencia de anticuerpos anti-VLB en esta población de bovinos⁵⁷. La baja proporción de bovinos infectados demostrada puede explicarse fundamentalmente por el diferente manejo que reciben estos bovinos destinados a la tracción a sangre, donde gran parte de los factores de riesgo asociados a mayor prevalencia en los rodeos lecheros no están presentes, situación similar a lo que ocurre con los rodeos ganaderos. Esto resalta el impacto del manejo a nivel de los tambos de producción intensiva, y de la iatrogenia en la transmisión y aumento de la prevalencia de la enfermedad en el rodeo. En Taiwán se llevó a cabo un estudio epidemiológico que analizó 29469 muestras séricas de vacas lecheras de 1 a 12 años de edad en 1985 y 1986. El diagnóstico de infección se realizó mediante la técnica de AGID. Demostraron una prevalencia de 8,4% en 1985 y de 5,8% en 1986. Este trabajo representa el segundo estudio epidemiológico realizado en el país, ya que uno anterior de 1979-1980 mostraba una prevalencia de 1,9%. Los autores explican el aumento en la prevalencia de bovinos infectados debido a la importación de vacas en pie, presuntamente infectadas, para ser incorporadas a los rodeos productivos.⁵⁶

Japón ha realizado amplios estudios de prevalencia y ha llevado a cabo algunos programas de manejo y control de los factores de riesgo de la infección. Se ha reportado un 28,6% de prevalencia en los bovinos lecheros y un 68,1% de rodeos infectados.^{58,59} En Corea la prevalencia excede el 50% de los bovinos, con un 86,6% de rodeos infectados.⁶⁰

En Medio Oriente los niveles de prevalencia al parecer son algo menores que en otras regiones, encontrándose alrededor del 20% de prevalencia.^{61,62} Esta situación presenta algunas excepciones que incluyen Turquía e Irán.^{63,64} Sin embargo, la información en muchos casos es fragmentaria y primaria.¹⁴

Como fue descripto, la prevalencia en los rodeos bovinos varía entre los diferentes países, y dado su mecanismo de transmisión, presenta en los rodeos lecheros una prevalencia mayor que en los rodeos no lecheros. A su vez, a nivel de los rodeos lecheros la prevalencia está fundamentalmente asociada a aquellos sistemas productivos que presentan un manejo más intensivo, y especialmente a aquellos que no aplican prácticas de manejo veterinario tendientes a disminuir la transmisión horizontal y la propagación de la infección. Lo que resulta claro es que presenta una distribución mundial, pero que hoy en día es cada vez más un problema de las regiones cuyos sistemas productivos no han aplicado en los últimos 10 años programas de control y erradicación de la LBE.

¿Qué ocurre en Uruguay? No existen estudios exhaustivos que determinen la prevalencia de la infección en Uruguay, aunque se presume alta. Hay al menos tres trabajos que dan cuenta de rodeos lecheros positivos a nivel nacional.^{19,20,65} Tanto por las características de la estructura productiva del país, como por la ausencia de políticas públicas que encaren la problemática de la leucosis a nivel nacional, tenemos elementos para pensar que la situación epidemiológica es similar a la de Argentina o EE.UU. Destacamos la necesidad que tiene el país de encarar un programa que permita conocer la prevalencia global de la enfermedad como insumo primario y esencial para definir el estado de situación epidemiológico actual, que permita planificar un programa de control y erradicación de la enfermedad.

Transmisión y factores de riesgo asociados a la propagación intrarodeo.

Dentro de un rodeo, la infección por VLB es esparcida más frecuentemente de forma horizontal, por contacto directo o indirecto de linfocitos infectados provenientes del torrente sanguíneo (o en menor medida de leche) de un animal infectado a bovinos susceptibles. La transmisión vertical transplacentaria ha sido documentada, sin embargo parece tener un peso relativo menor en importancia.⁶⁶ La contribución relativa de las diferentes formas de transmisión se encuentra determinada, entre otros factores, por la frecuencia y naturaleza de exposición al agente viral y por la prevalencia dentro del rodeo.⁶⁷ Cualquier programa de control de la enfermedad exitoso deberá en primera instancia ser capaz de reconocer y controlar los modos de transmisión de la enfermedad, dado que una vez que el bovino es infectado desarrolla una infección crónica por el VLB, transformándose en la mayoría de los casos en un foco de infección para otros bovinos dentro del rodeo.

Un programa de control de la LBE a nivel nacional deberá incluir al menos tres aspectos: intervenciones a nivel de manejo veterinario, que tiendan a disminuir la transmisión de la enfermedad; diagnóstico y segregación de bovinos infectados; y eliminación de bovinos infectados seleccionados.⁶⁸ Los cambios a nivel del manejo veterinario serán efectivos si apuntan a disminuir los factores de riesgo de transmisión, y si éstos a su vez son bien entendidos y su riesgo relativo ha sido cuantificado. La relevancia de la transmisión hematogena presenta un peso relativo variable, dependiendo de la prevalencia de la infección dentro del rodeo, de qué prácticas veterinarias se realicen y con qué frecuencia. Está bien establecido que cualquier práctica veterinaria que favorezca el intercambio de sangre o secreciones entre los bovinos del rodeo representa un factor de riesgo. En un ámbito productivo múltiples prácticas habituales favorecen este intercambio: examen de preñez (mediante tacto rectal), inyecciones percutáneas, colocación de caravanas, tatuaje y descornaje^{67,69-72}. En este sentido, Sprecher y colaboradores implementaron en un tambo con alta prevalencia de infección por VLB un programa de control de los factores de riesgo. Dicho programa incluía: uso no reutilizable de agujas y guantes obstétricos, desinfección de equipamiento para tatuaje, descornaje

eléctrico y alimentación de terneros con complementos y calostro tratado por calor. En dos años fueron capaces de disminuir la prevalencia del 44 al 17%. Esto sin recurrir a segregación y eliminación de bovinos.⁷³

Un estudio llevado a cabo en 113 tambos lecheros de Michigan por el grupo de Erskine y colaboradores en 2012, determinó y cuantificó prácticas de manejo veterinario específicas asociadas a la transmisión de la infección. Calcularon la prevalencia a partir de muestras de leche mediante un ELISA comercial para detección de anticuerpos anti-VLB. Luego relevaron, mediante un cuestionario, cuáles eran las prácticas de manejo veterinario habituales en ese tambo. Sus resultados son coincidentes con reportes previos sobre prácticas asociadas a mayor riesgo de infección por el VLB, como utilización de gubia quirúrgica para descornaje, reutilización de agujas, no control de insectos hematófagos, número de exámenes reproductivos (reutilización guantes) y número de inyecciones percutáneas. La utilización exclusiva de inseminación artificial también fue asociada a menor prevalencia en los rodeos analizados, comparados con aquellos que utilizan monta tradicional.⁶⁸ Otros estudios han identificado como factores de riesgo de transmisión prácticas de manejo veterinario similares.^{69,74,75}

Recientemente se ha publicado un trabajo realizado en tambos lecheros de Canadá, cuyo objetivo fue determinar los factores de riesgo más importantes asociados con la prevalencia de la infección dentro de un rodeo. En primera instancia demostraron una prevalencia de la infección alta en las siete provincias estudiadas, con un 78.3% de los tambos relevados seropositivos. Uno de los factores de riesgo más evidentes que demostraron fue el hecho de introducir bovinos al tambo sin conocer su estatus infeccioso para el VLB, siendo éste un factor de riesgo no sólo para ésta sino para muchas otras enfermedades infecciosas. De los tambos estudiados solo el 25% (65) no introdujeron bovinos al tambo dentro del periodo estudiado, de los que sí lo hicieron el 88% no testearon los bovinos introducidos para conocer el estatus de infección por VLB.⁷⁶ Cualquier programa de control de la enfermedad exitoso, requerirá como mínimo que el ingreso de nuevos bovinos al tambo sea de bovinos libres de VLB. Este punto requerirá un cambio en las prácticas de manejo veterinario a nivel nacional, dado que actualmente no es una conducta habitual.

La examinación rectal para determinar la preñez de los bovinos es reconocida como una posible ruta de transmisión del VLB, asociada al número de palpaciones con el mismo guante, al nivel de contaminación del guante con linfocitos infectados y a la edad de los bovinos examinados. El cambio de guantes entre diferentes maniobras se reconoce como una práctica que corta la transmisión, una conducta de manejo veterinario que puede reducir la transmisión de la enfermedad dentro de un rodeo. Otro factor de riesgo para la transmisión del VLB es el uso de gubia quirúrgica para descornaje.⁷⁶

En suma, existen reconocidos factores de riesgo que se asocian a mayor prevalencia en los rodeos. La mayoría de ellos son de práctica habitual en el manejo veterinario de los rodeos nacionales. Un programa de control y erradicación de la enfermedad exitoso, deberá educar respecto de estos factores de riesgo en pos de generar manuales de manejo que disminuyan el riesgo de transmisión horizontal de la enfermedad. Pero sobre todo, para realizar una correcta valoración inicial y seguimiento, será necesario contar con capacidades diagnósticas de bajo costo y eficaces.

Fisiopatología de la infección por VLB.

La evidencia con respecto al impacto negativo de la infección por VLB sobre el status inmunológico del bovino es creciente. Como se dijo anteriormente, el VLB tiene un tropismo predominante por el linfocito B, causando en la etapa de LP una expansión policlonal de esta subpoblación. Sin embargo, el efecto de la infección por VLB sobre el sistema inmune del hospedero no se limita a alteraciones sobre la población de linfocitos B. Existe evidencia de alteraciones en otras poblaciones celulares del sistema inmune, así como desarreglos más generales como ser alteraciones en la producción de citoquinas y en la expresión de receptores celulares, y cambios en las capacidades proliferativas y apoptóticas de algunos tipos celulares, incluso en la etapa asintomática (AL).⁷⁷

Los linfocitos B infectados por el VLB expresan típicamente un fenotipo caracterizado por la presencia de CD5 y CD11, dos marcadores poco frecuentes en el linfocito B no infectado. Una vez infectada, la célula permanece en esa condición en forma persistente. Característicamente no expresa niveles significativos de proteínas virales, pero sin embargo transcribe

grandes cantidades de microARNs virales, que se cree juegan un rol en la patogenia de la infección. Otro componente esencial en la patogenia de la infección es la proteína viral Tax, que como dijimos actúa como oncogén estimulando la proliferación celular, pero también activa la expresión de otras proteínas virales estructurales.

La historia natural de la infección se caracteriza por una alta tasa de proliferación y recambio linfocitario, donde aquellas células infectadas que expresan antígenos virales son eliminadas eficientemente por el sistema inmune del huésped. Sin embargo, aquellas células que silencian la expresión de proteínas virales no pueden ser eliminadas. Se genera así un ciclo continuo en el cual las células infectadas son estimuladas a proliferar sobre todo en órganos linfoides secundarios, pero simultáneamente son eliminadas por el sistema inmune predominantemente en la periferia. Esto se asocia con una expresión anormal en los niveles de citoquinas y otros desarreglos en el sistema inmune.⁸ A su vez, los linfocitos B de sangre periférica no expresan niveles significativos de proteínas virales.

Los órganos linfoides, especialmente el bazo, ejercen un rol preponderante en el control de la infección, pero luego de un periodo de latencia de varios años, las respuestas citotóxicas y humorales se debilitan en el huésped. Hecho éste que se ha visto asociado a una menor capacidad para recuperarse de otras enfermedades como la mastitis por ejemplo.^{78,79} Durante la progresión de la enfermedad, en el estadio de LP, los linfocitos B infectados adquieren al menos dos comportamientos: una proporción mayoritaria tiende a tener una proliferación disminuida, en cambio una subpoblación minoritaria permanece proliferando y estimulando al sistema inmune. Luego, modificaciones genéticas en la célula infectada, como mutaciones en el gen p53 o aberraciones cromosómicas, son capaces de gatillar el inicio de la transformación neoplásica y el desarrollo de la leucemia/linfoma.⁸

Los bovinos infectados en estadio LP presentan una alteración en sus niveles de citoquinas circulantes y su producción en respuesta a estímulos. Células mononucleares de sangre periféricas (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) provenientes de bovinos infectados en estadio LP expresan menor cantidad de ARN mensajero de IL-2, IL-4 e INF-gamma, en comparación con aquellas provenientes de bovinos no infectados. Incluso bovinos infectados en

estadio LP expresan menos IL-2 que aquellos bovinos infectados pero en estadios precoces de la enfermedad.⁸⁰ Otro trabajo similar a partir de PBMC, demostró que aquellas células provenientes de bovinos infectados en estadio AL presentan mayores niveles de ARN mensajero de IL-12p40 que las células provenientes de bovinos no infectados.⁸¹ En el mismo sentido, otros investigadores demostraron que bovinos en estadio LP presentan niveles serológicos aumentados de IL-6 en comparación con bovinos en estadio AL y no infectados.⁷⁹ La respuesta a estímulos de células del sistema inmune provenientes de bovinos infectados también se ha demostrado alterada, con mayor producción de IL-2 cuando PBMC son cultivadas y estimuladas *in vitro*⁸²; y también de IL-6 en otro trabajo que utiliza diferentes estímulos inmunogénicos.⁷⁹ Otros estudios también demuestran una expresión diferencial en PBMC según provengan de bovinos infectados o no.⁸³ En suma, se puede afirmar que el bovino infectado presenta alterada la secreción de interleuquinas, y que a su vez la alteración es variable en función del estadio de la infección. Dado su rol en la regulación del sistema inmune, es esperable que estas alteraciones tengan implicancias en el estatus inmunológico del bovino infectado, como por ejemplo en su capacidad de respuesta frente a microorganismos.

La infección por VLB produce también desarreglos a nivel de la respuesta inmune humoral. Los bovinos en estadio LP presentan una alteración evidente a nivel del sistema inmune humoral dada la expansión policlonal de linfocitos B CD5+. Esta población representa aproximadamente un 30% de los linfocitos B del bovino, pero tras la expansión linfocitaria pasan a constituir el 95% de los linfocitos B del animal en estadio LP. Además, constituyen la principal población de células donde se integra el virus.^{84,85}

A su vez, los linfocitos B de bovinos infectados (tanto en estadio AL como LP) expresan mayor cantidad de moléculas MHC de clase II sobre la superficie celular, en comparación con aquellos de bovinos no infectados.^{82,84,86,87}

En un estudio de expresión génica utilizando *microarrays*, se buscaron las diferencias en células bovinas cultivadas en ausencia y presencia de la proteína Tax. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de varios genes implicados en la transcripción y reparación del ADN, y también en genes implicados en la regulación del ciclo celular, entre otros. En conjunto, se

demonstró un desarreglo en varias vías de señalización en linfocitos B expuestos a la proteína Tax, que podrían estar explicando resultados previos en cuanto a la expresión anormal de receptores de superficie y de citoquinas.⁸⁸ Hay trabajos que muestran cómo la infección por VLB afecta la respuesta inmune humoral del bovino. PBMC de bovinos en estadio LP tienen aumentada la expresión de la cadena μ y disminuida la de λ a nivel de ARN mensajero, lo que refleja una alteración en la transcripción de inmunoglobulinas.⁸⁷ Sin embargo, los bovinos infectados no presentan diferencias en la concentración serológica de inmunoglobulinas con respecto a los no infectados. Sobre este punto, hay un trabajo que muestra cómo bovinos infectados por el VLB presentan menor título de anticuerpos específicos cuando son inmunizados con un antígeno vaccinal. Los investigadores inocularon *Escherichia coli* J5 y observaron que la producción de anticuerpos específicos IgG2 es menor que en bovinos no infectados. Estas diferencias no se observaron en otros isotipos de inmunoglobulinas (IgM e IgG1)⁸⁹

Como dijimos, el VLB tiene un tropismo notoriamente marcado por los linfocitos B, aunque también puede infectar otros tipos celulares.⁹⁰ Durante la historia natural de la infección otras poblaciones celulares ven afectada su función, lo cual es particularmente cierto para los linfocitos T. Éstos, aislados a partir de PBMC de bovinos infectados, presentan un fenotipo característico propio de linfocitos con actividad disminuida. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de LAG3, un regulador negativo de la activación y proliferación del linfocito T, está aumentada en linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de bovinos infectados, tanto en estadio AL como LP⁹¹. Este aumento se evidencia también a nivel del ARN mensajero de LAG3, tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ provenientes de bovinos infectados en estadio LP como AL.⁹² Otros investigadores demostraron que linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de bovinos infectados tanto en estadio AL como LP, expresan mayores niveles de Tim3 (un regulador negativo de la activación y proliferación celular), del mismo modo observaron que a nivel de linfocitos T CD8+ la expresión de Gal9 (ligando de Tim3) está aumentada.⁹³

Los bovinos en estadio LP presentan un mayor número de linfocitos B que expresan el receptor PD-L1 (*Programmed Death-ligand 1*). La proporción de células positivas para PD-L1 a partir de PBMC en bovinos infectados se

correlaciona positivamente con el estadio de la enfermedad y con otros predictores de progresión como leucocitosis, carga viral y título de anticuerpos específicos, y a su vez se correlaciona negativamente con el nivel de expresión de INF-gamma.⁹⁴ El receptor PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) es conocido como un receptor inhibitorio involucrado en la inmunoevasión celular neoplásica y en la patogenia de varias infecciones crónicas. Se ha demostrado cómo un bloqueo de PD-L1 sobre PBMC provenientes de bovinos infectados aumenta la producción de IL-2 e IFN-gamma, incrementando la función de los linfocitos T e inhibiendo la expresión de proteínas virales en linfocitos B *in vitro*.^{91,95}

Otro hallazgo característico en los bovinos en estadio LP es que presentan una proporción mayor de linfocitos T CD4+ que expresan FoxP3 (fenotipo asociado a linfocitos T reguladores). Los linfocitos T reguladores se caracterizan por tener la capacidad de regular la activación, proliferación y diferenciación de otras poblaciones linfocitarias. Existe una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos T CD4+FoxP3+, la leucocitosis total y la carga viral, y una correlación negativa con la expresión de IFN-gamma.⁹⁶ Resumiendo, en conjunto se han demostrado las siguientes alteraciones: una expresión aumentada de LAG3 y Tim3 en linfocitos T, una mayor expresión de PD-L1 en linfocitos B, un aumento proporcional de linfocitos T reguladores y una expresión disminuida de IFN-gamma. Estas alteraciones en su mayoría se demuestran para estadios avanzados de la infección y la evidencia en general es *in vitro*, sin embargo es posible hablar de una actividad al menos alterada de los linfocitos T en los bovinos infectados.⁷⁷ Otro mecanismo efector que se ve alterado en los animales infectados es la actividad citotóxica dependiente de linfocitos T.^{97,98}

Hay también algunos trabajos que muestran cómo la infección por VLB afecta también mecanismos efectores y poblaciones celulares del sistema inmune innato, fundamentalmente a nivel de monocitos y macrófagos. Bovinos infectados en estadio AL presentan un mayor porcentaje de monocitos CD11b+ CD32+ entre los leucocitos circulantes. Pero al mismo tiempo estos monocitos expresan menor cantidad de CD11b, MHC de clase II y CD14 en superficie.⁹⁹ En el mismo sentido, macrófagos cultivados a partir de monocitos de bovinos infectados en estadio AL presentan una menor expresión en superficie de

CD11b y CD14.⁹⁹ Las proteínas mencionadas son importantes receptores que participan en la función de monocitos y macrófagos: CD11b participa como receptor en mecanismos de adhesión y migración celular¹⁰⁰; CD32 es un co-receptor de linfocito B implicado en la regulación del título de anticuerpos¹⁰¹; el MHC de clase II participa en la presentación antigénica a linfocitos T CD4+; y CD14 participa como co-receptor para LPS. Se puede afirmar que esta expresión anormal de proteínas en las poblaciones celulares mencionadas representa una evidencia indirecta de una disrupción en su función como células efectoras del sistema inmune. En este sentido, monocitos provenientes de bovinos infectados en estadio AL presentan una reducción en la actividad fagocítica para *E. coli* en comparación con aquellos provenientes de bovinos no infectados.^{77,99}

En suma, hasta aquí se ha intentado presentar evidencia de cómo la infección por VLB afecta el sistema inmune del bovino, y cómo esto ocurre en el estadio LP pero también en el estadio AL. Un compromiso del estado inmunológico es esperable que afecte la performance productiva de los bovinos infectados, especialmente en tambos de producción intensiva. El estatus sanitario del bovino, determinado en gran parte por la robustez de su sistema inmunológico, resulta especialmente relevante en pos de obtener la mejor performance productiva.

Diagnóstico de la infección por VLB.

Por las características de la enfermedad, con un porcentaje mayoritario de los bovinos infectados que no presentan linfocitosis persistente ni alteraciones clínicas, o lo harán mucho tiempo luego de la primo-infección, el diagnóstico de la infección se hace fundamentalmente por métodos serológicos mediante la identificación de anticuerpos específicos contra el VLB. Otra estrategia es la identificación del ADN proviral integrado en los linfocitos B periféricos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica es de uso cada vez más extendido, pero sin reemplazar la serología como técnica de diagnóstico preponderante.^{102,103}

El manual de la OIE sobre animales terrestres en su versión 2008 (luego actualizada en 2012 sin posteriores revisiones) propone varias estrategias diagnósticas aceptadas por este organismo rector:

1) Identificación del agente viral: mediante aislamiento del virus en PBMC cultivadas. Luego se puede realizar la identificación de antígenos virales (p24 y gp51) en el sobrenadante de cultivo, sea por radioinmunoanálisis (RIA), ELISA o inmunodifusión en gel de agar (AGID). La presencia de partículas virales del VLB puede demostrarse por microscopía electrónica, o puede identificarse el ADN proviral por PCR.

2) Detección de ácidos nucleicos mediante PCR: el mencionado manual propone un protocolo utilizando secuencias cebadoras localizadas en el gen *env* que codifica la proteína gp51. El gen *env* se encuentra muy conservado en la evolución, y tanto el gen como su producto proteico están presentes en todos los animales infectados a lo largo de las distintas fases de la infección. La técnica de PCR se utiliza principalmente como diagnóstico confirmatorio ante un diagnóstico serológico dudoso. Es especialmente útil en los siguientes casos:

- Terneros con inmunidad pasiva proveniente del calostro.
- Muestras de tumor (diagnóstico diferencial entre linfoma esporádico y vinculado a LBE).
- Primo-infecciones (previo al desarrollo de respuesta humoral).
- Casos dudosos por serología (resultados “débilmente” positivos en ELISA diagnóstico).

3) Pruebas serológicas: se basan en la identificación de anticuerpos específicos contra las proteínas virales p24 y gp51. La OIE ha validado el diagnóstico serológico tanto mediante la técnica de AGID en suero, como mediante la técnica de ELISA en suero y leche. La técnica de AGID es en general menos sensible que la técnica de ELISA. Para ambas el manual mencionado anteriormente propone un protocolo.¹⁰² La UE también ha validado las técnicas diagnósticas definidas por la OIE.¹⁰⁴

Históricamente el diagnóstico de la LBE era clínico y hematológico (basado en la elevación de linfocitos circulantes), con confirmación anatomopatológica *post-mortem*. Dada la baja sensibilidad de este esquema y el desarrollo de nuevas técnicas, actualmente se realiza diagnóstico de LBE fundamentalmente mediante serología. El diagnóstico serológico presenta entre sus ventajas el hecho de poder ser utilizado a gran escala en los rodeos lecheros, virtud que ha sido utilizada en esquemas de control y erradicación de la enfermedad.

Como se dijo, es problemático en animales jóvenes, no diferenciando entre anticuerpos específicos provenientes de la inmunidad pasiva o activa. Además, existen algunos casos de bovinos infectados que presentan una respuesta de anticuerpos específicos débil, lo que también genera problemas diagnósticos. Técnicas como la PCR, basadas en la amplificación de ADN proviral, son complementarias al diagnóstico serológico y de especial utilidad en los casos mencionados.⁸

El diagnóstico hematológico, basado en el aumento del número absoluto de linfocitos en sangre periférica, fue incluso utilizado en programas de control y erradicación de la enfermedad durante los años 50' y 60' con diferentes niveles de éxito.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Con respecto al diagnóstico anatomopatológico, la LBE siempre debe sospecharse ante una proliferación neoplásica del tejido linfoide, tanto en forma de linfomas sólidos en múltiples territorios ganglionares, como en una infiltración difusa de diferentes órganos. Sin embargo, no es posible diferenciar aquellos linfomas esporádicos de los linfomas inducidos por el VLB sin técnicas de biología molecular capaces de identificar la presencia del provirus en la muestra histológica.⁸ En la Figura 4 se muestra cómo las técnicas serológicas y de PCR son capaces de diagnosticar la enfermedad en estadios preclínicos.

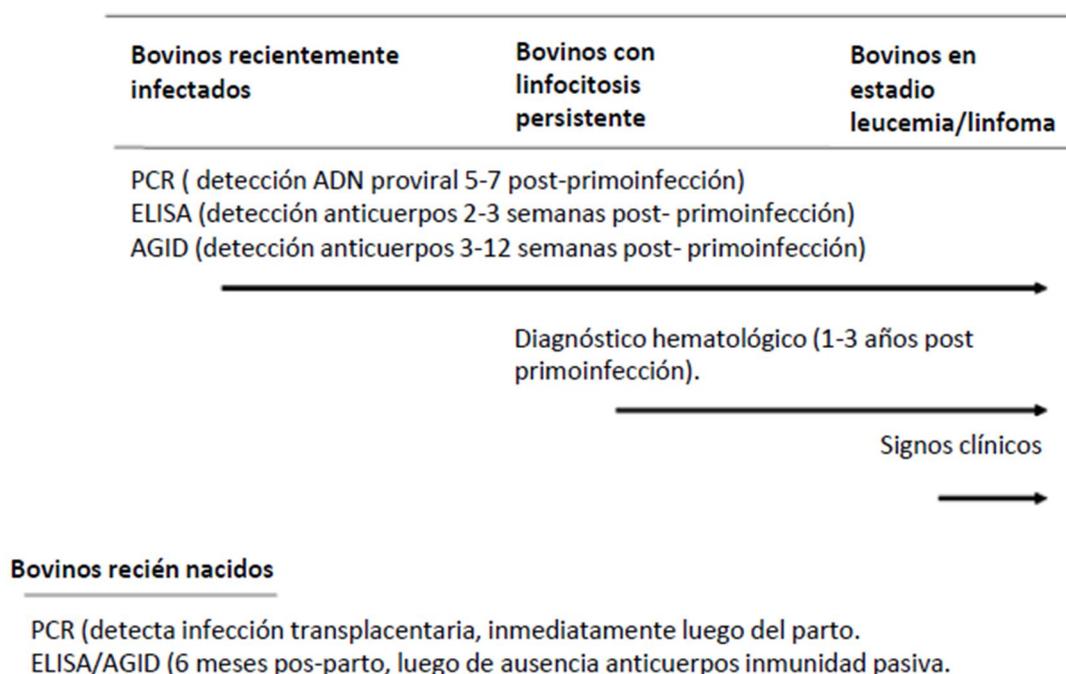


Figura 4 Posibilidades diagnósticas de acuerdo a estadio de LBE. Modificado de EFSA 2015.

En la actualidad disponemos de gran variedad de técnicas diagnósticas para la infección por VLB, muchas incluso utilizadas a nivel comercial y en programas de control, seguimiento y erradicación de la enfermedad. Las técnicas diagnósticas actuales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: a) serológicas y b) detección de ADN proviral mediante técnica de PCR.² A continuación se presenta una tabla, donde se esquematizan las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas actualmente (Tabla 3).

Tabla 3 Técnicas diagnósticas disponibles para el diagnóstico de la infección por BLV. AGID: inmunodifusión gel agarosa; PHA: ensayo de hematoaglutinación pasiva; RIA: radioinmunoensayo. Adaptada de Polat et al. 2017.

	<u>Técnica.</u>	<u>Muestra</u>	<u>Target.</u>	<u>Ref.</u>
a) Serológica.	Ensayo			
	AGID	suero	Anticuerpos (p24, gp51)	22,56,108-111
	ELISA	suero leche (individual o tanque)	Anticuerpos (p24, gp51)	22,109-129
	PHA	partícula viral	Glicoproteína viral.	130
	RIA	suero	Anticuerpo (anti-p24)	131,132
b) Detección ADN viral.	Técnica de PCR (single, semi-nested, nested)	PBMC sangre periférica biopsias tumorales células somáticas leche. semen	Provirus.	22,109,126,133,134
	PCR cuantitativa	saliva secreciones nasales.		110,135-140
	PCR en sangre periférica	suero		141,142

a) Diagnóstico serológico.

Hay múltiples trabajos publicados que desarrollan y ponen a punto una técnica diagnóstica para la infección por VLB. Utilizan distintas estrategias, pero el objetivo común es poner en evidencia anticuerpos específicos contra las proteínas virales (fundamentalmente gp51, y en algunos casos p24). La respuesta de anticuerpos contra la glicoproteína gp51 aparece antes, es más constante y alcanza títulos mayores, por lo tanto los métodos serológicos que buscan poner en evidencia anticuerpos específicos contra ella como regla general tienden a ser más sensibles.⁸ La respuesta específica de anticuerpos anti VLB (especialmente anti gp51 y p24) puede ser detectada 2-3 semanas

post infección, persistiendo durante toda la vida del animal. Evidenciar la respuesta de anticuerpos anti p24 y anti gp51 es el objetivo de la mayoría de las técnicas serológicas actualmente disponibles: AGID^{22,56,108-110}, PHA^{110,130}, ELISA^{109,110,125,126,143} y RIA¹³¹. La AGID es una técnica barata, actualmente superada por la técnica de ELISA. Sin embargo es aún utilizada, siendo de utilidad como técnica de *screening*, *aunque* presenta problemas de sensibilidad y no es útil para testear muestras de leche. El ELISA representa una técnica serológica superadora, con mayor especificidad y sensibilidad que AGID, es robusta, de fácil utilización a gran escala y capaz de ser utilizada para analizar muestras de suero y leche. Ambas técnicas tienen problemas en el diagnóstico de terneros menores a 6 meses con presencia de anticuerpos maternos. La PHA detecta glicoproteínas del VBL, siendo una técnica sensible al pH y otras condiciones del laboratorio, poco práctica para utilización a gran escala. El RIA presenta problemas logísticos similares para su utilización a gran escala². Ni la PHA ni el RIA son utilizadas a gran escala en programas de *screening*.

Como se dijo, para el serodiagnóstico de infección por el VLB la OIE recomienda actualmente tanto la técnica de AGID como la de ELISA. Ambas han sido validadas utilizando un suero de referencia internacional denominado E05. Este suero define el límite inferior de la sensibilidad para pruebas diagnósticas de rutina, tanto en AGID como en ELISA, en suero como en leche. El suero E05, producido en Alemania en el Laboratorio de Referencia para LBE, consiste en un pool de 24 sueros de bovinos naturalmente infectados con VLB.⁸

Uno de los primeros trabajos que utilizan la técnica de ELISA para el diagnóstico para la infección por VLB es el de Poli y colaboradores en 1981. En él desarrollan un ELISA indirecto que detecta la presencia de anticuerpos específicos contra el VLB en suero bovino en una dilución de 1/20. Para la sensibilización de las placas utilizaron una preparación de la proteína viral env, sin aclarar su grado de pureza ni su forma de preparación. Determinaron la sensibilidad y especificidad del ELISA en función de su performance frente a la técnica de AGID, comparando los resultados de ambas técnicas en 230 sueros de 4 tambos diferentes.¹²⁸ El trabajo descrito tiene el mérito de poner a punto una técnica diagnóstica novedosa para la época, mucho más sensible que la utilizada ampliamente hasta ese momento. Sin embargo, presenta algunas

falencias en cuanto al tamaño de la muestra y al diseño utilizado para calcular las propiedades de la técnica diagnóstica.

Diez años más tarde, Klintevall y colaboradores evaluaron la performance de un ELISA diagnóstico similar al descrito anteriormente desarrollado por Juntti y colaboradores en 1989.¹²⁹ Éste es un ELISA indirecto que permite la detección de anticuerpos específicos para el VLB tanto en suero como en leche, habiendo sido evaluada su sensibilidad y especificidad con respecto a la técnica de AGID. Este ELISA fue incluso utilizado como método diagnóstico en un programa de erradicación de la LBE en Suecia. La sensibilización fue realizada con partículas virales producidas en células FLK (*Fetal Lamb Kidney*) persistentemente infectadas. Luego de colectado, el sobrenadante de cultivo fue ultracentrifugado sin pasos posteriores de purificación. Lo novedoso de éste desarrollo fue la capacidad de realizar diagnóstico a partir de muestras de leche, con un rendimiento muy similar al realizado en suero.¹²⁹

Luego de estos trabajos iniciales, otros ELISA diagnósticos han sido publicados. La mayoría utilizan para el paso de sensibilización de la placa partículas virales sin un alto grado de pureza ni caracterización.^{21,132} Este hecho compromete la potencia diagnóstica de los ensayos mencionados hasta el momento. Sin embargo, esto no surge de los valores de sensibilidad y especificidad proporcionados por los investigadores. Por ejemplo, tanto en el trabajo de Klintevall y colaboradores como en otros, definen la performance del ELISA frente a técnicas diagnósticas más antiguas de amplio uso en dicho momento (en muchos casos AGID) con probada menor sensibilidad que la técnica de ELISA. A su vez, la producción de antígenos virales para dichas técnicas era similar. Por tanto, en general estos métodos diagnósticos tendían a sobrestimar sus parámetros de sensibilidad y especificidad. Sumado a que en muchos casos no representaban valores de sensibilidad y especificidad estadísticos debido al pequeño número de muestras con el cual habían sido evaluados. Por todo esto, se debe ser cuidadoso al utilizar estos métodos diagnósticos en un programa de diagnóstico y control de la enfermedad a gran escala. La utilización de partículas virales para la sensibilización obedece sobre todo a que durante mucho tiempo fue muy dificultoso producir las proteínas virales más inmunogénicas (gp51 y p24).

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad diagnóstica otra estrategia utilizada fue la realización de un ELISA de captura. Consiste en sensibilizar la placa con un anticuerpo monoclonal anti-gp51 para luego realizar una incubación con un lisado de partículas virales. Portetelle y colaboradores en 1983 desarrollaron uno de los primeros ELISA utilizando este principio para el diagnóstico de VLB en suero. Produjeron y purificaron un anticuerpo monoclonal anti-gp51 con el cual sensibilizaron la placa. Luego realizaron una incubación con una preparación del VLB no purificada previamente, asegurando de esta forma que moléculas de gp51 queden adsorbidos a la placa. La producción del anticuerpo monoclonal la realizaron en ratón, mientras que las partículas virales fueron producidas a partir de células FLK. Los sueros fueron testados a una dilución de 1/20.¹¹² Esta estrategia asegura mayor especificidad y sensibilidad sin la necesidad de purificar las proteínas virales.

Posteriormente, otro grupo pone a punto un ELISA diagnóstico tanto para suero como para leche. Utiliza el ELISA desarrollado por Portetelle¹¹², pero usando como anticuerpo secundario un anticuerpo monoclonal anti-IgG1 conjugado a peroxidasa (el trabajo original utiliza un anticuerpo antisuero policlonal). El objetivo del trabajo fue mejorar la capacidad de detección de anticuerpos anti-VLB en pos de poder utilizar muestras de leche, las cuales se utilizaron a una dilución de 1/5. En este trabajo se demostró que los títulos de anticuerpos anti-VLB en leche son en promedio un 9% de los títulos en suero. Así, al testear las muestras de leche a diluciones menores, los autores logran resultados muy similares a los obtenidos a partir de muestras de suero. En sus conclusiones proponen utilizar para el diagnóstico a gran escala muestras de leche, dado que la performance del ELISA es comparable al realizado a partir de muestras de suero. Entre sus ventajas se encuentra que la obtención de la muestra es mucho más práctica y fácil, y no conlleva los riesgos iatrogénicos de la punción.¹²⁷ Estudios posteriores han explorado esta estrategia produciendo anticuerpos monoclonales anti-gp51 contra otros epitopes, desarrollando diferentes ELISA indirectos tanto en suero como en leche, y obteniendo resultados comparables.^{113-117,143}

Una estrategia diferente fue la planteada por Portetelle en 1989¹¹⁸ cuando desarrollaron un ELISA de competencia utilizando dos anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos anti-gp51. Realizaron la

sensibilización en dos pasos, utilizando inicialmente un anticuerpo monoclonal anti-gp51, incubando luego con una preparación de partículas virales de VLB no purificadas de forma similar al trabajo anterior del grupo¹¹². Luego de incubar con las muestras de suero, realizaron la incubación con un segundo anticuerpo monoclonal anti-gp51 conjugado. La presencia de anticuerpos anti-gp51 en las muestras de suero se observa como la ausencia de señal al revelar el ELISA. En los pocillos donde los anticuerpos anti-gp51 presentes en los sueros bovinos se unen específicamente a las partículas virales que contienen gp51, el anticuerpo monoclonal anti-gp51 conjugado no se podrá unir, y por tanto no habrá señal. Esta estrategia demostró ser tan sensible y aún más específica que el ELISA indirecto descrito por el mismo grupo previamente.¹¹⁸

Hasta ahora hemos descrito métodos diagnósticos para LBE que intentan demostrar la presencia de anticuerpos anti-gp51. Sin embargo, otros investigadores han desarrollado métodos diagnósticos buscando la respuesta de anticuerpos anti-p24 que se produce en el bovino infectado. Un trabajo inicial describe la puesta a punto de un ELISA indirecto que utiliza la proteína p24 para el diagnóstico de LBE en muestras de suero. La proteína fue purificada a partir de un concentrado de cultivo celular de células FLK mediante cromatografía de afinidad y gel filtración. Los autores comparan su técnica diagnóstica frente a la técnica de AGID, obteniendo una sensibilidad de 98,1% y una especificidad de 96,7%.¹¹⁹ Sin embargo, el ELISA desarrollado no demuestra ser comparable a otro ELISA anti-gp51. Es sabido que la técnica de ELISA es una técnica mucho más sensible que la técnica de AGID, por tanto los resultados obtenidos por estos autores son en parte explicables por diferencias a nivel de las técnicas comparadas. Actualmente, la tendencia a nivel mundial y en Sudamérica es a realizar el diagnóstico de infección por el VLB mediante técnica de ELISA.

Trabajos posteriores han utilizado también la proteína p24 para la detección de anticuerpos anti-p24 con fines diagnósticos. Un grupo argentino¹²⁰ desarrolló un ELISA indirecto para diagnóstico de la infección viral en suero utilizando una proteína p24 recombinante. Realizaron la expresión de la proteína en un sistema de expresión en *E.coli*, y luego de algunos pasos de purificación, obtienen una proteína con un aceptable grado de pureza verificado por SDS-

PAGE y Western Blot. Para el ensayo utilizaron muestras de suero en una dilución 1/25. La evaluación de la performance de su ELISA indirecto frente a un ELISA indirecto anti-gp51 comercial (VMRD Inc., USA) y AGID (UNLP-AGID) mostró una performance comparable frente al AGID, pero claramente inferior al ELISA indirecto validado.¹²⁰. De todos modos los autores proponen su método diagnóstico como un buen método de *screening*, planteando que es ligeramente superior al AGID, técnica aún muy utilizada en Sudamérica. Una estrategia similar siguieron Larsen y colaboradores en 2013¹²¹, desarrollando un ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-p24 en suero. Sin embargo, no lo pusieron a punto para diagnóstico a nivel de rodeos lecheros a gran escala, ni proporcionan datos de especificidad y sensibilidad diagnóstica en su estudio.

Es sabido que los bovinos infectados generan una respuesta de anticuerpos contra la proteína p24, aunque ésta es generalmente de menor título y algo menos constante que la respuesta de anticuerpos contra la proteína gp51. Sin embargo, de estar presente es específica de infección por VLB. Lo distintivo y remarcable de los ELISA indirectos anti-p24 descritos, es que utilizan una proteína con alto grado de pureza, lo que no ocurre con la utilización de la proteína gp51 en los estudios analizados previamente.

Ambos métodos (utilizando p24 o gp51 en la sensibilización de la placa) en principio son sinérgicos y complementarios, siendo necesario un estudio más exhaustivo para determinar por ejemplo casos de bovinos infectados seronegativos para gp51 pero seropositivos para p24. No existe actualmente la técnica diagnóstica serológica perfecta (*gold standard*), y varios de los tests diagnósticos presentan problemas de especificidad y sensibilidad, habiendo pocos estudios a gran escala que valoren en el terreno las propiedades diagnósticas de un método dado.

No profundizaremos en las otras técnicas diagnósticas serológicas mencionadas en la tabla 1 (PHA, RIA), siendo su mención anecdótica. Por distintas razones, dichos métodos han sido superados en lo referente al diagnóstico de la infección por VLB por las técnicas antes mencionadas.

b) Identificación del agente viral.

El VLB es capaz de integrarse en diversos sitios del genoma hospedero¹⁴⁴ permaneciendo transcripcionalmente silente, en algunos casos sin generar una respuesta de anticuerpos anti VLB. Los métodos basados en la técnica de PCR son capaces de detectar ADN proviral varias semanas antes de que se manifieste una respuesta de anticuerpos evaluable mediante técnicas serológicas.¹⁴⁵ Se pueden realizar a partir de un amplio número de muestras bovinas: PBMC de sangre periférica, muestras de tumor, células somáticas de muestras de leche, semen, saliva y secreciones nasales. Además, puede mejorar la sensibilidad y especificidad diagnósticas. Sin embargo, su implementación para grandes cantidades de muestras presenta algunas desventajas: preparación laboriosa de la muestra, falsos positivos por contaminación de la muestra, necesidad de más equipamiento y entrenamiento que las técnicas serológicas, entre otras.²

Más allá de ello, en las últimas dos décadas se han desarrollado métodos para identificar ADN proviral del VLB mediante técnica de PCR. Inicialmente se desarrollaron varios métodos de “*single PCR*”^{22,109}, y luego fueron desarrollados métodos de “*nested PCR*” con mucha mayor sensibilidad.^{111,145–148}

La PCR cuantitativa es actualmente un método muy eficiente para el diagnóstico de bovinos infectados, siendo especialmente útil para detectar ADN proviral en animales infectados con bajo título de anticuerpos (por ejemplo durante la fase aguda de la primoinfección.).^{7,110,135–140} Para propósitos diagnósticos las secuencias del genoma del VLB localizadas entre los genes *pol* y *env* son consideradas las más apropiadas para detecciones provirales, permitiendo detectar todos los genotipos de VLB conocidos.⁸

La identificación directa del ADN proviral es fundamentalmente ventajosa para detectar infección en terneros, dado la presencia de anticuerpos provenientes del calostro como fuente de falsos positivos. Es también una técnica de utilidad para diferenciar linfomas esporádicos de aquellos inducidos por el VLB. En casos de resultados serológicos no concluyentes, es una técnica que puede terminar de definir el estatus sanitario del bovino.⁷ Sin embargo, actualmente no es una técnica que cumpla las necesidades de un programa de control y

erradicación de la enfermedad como método de *screening*. Entre otras cosas por su alto costo y su laboriosidad, aún más teniendo en cuenta la buena performance de los métodos serológicos tanto en suero como en leche.

Costos económicos asociados a la infección por VLB.

Como se describió anteriormente, son múltiples los estudios que aportan evidencia de cómo la infección por VLB altera la función linfocitaria del bovino, afectando el estatus inmunológico del mismo.^{89,91,93,149} En el mismo sentido, pero ahora ya con respecto a las variables productivas del bovino, existen reportes que indican cómo la infección por VLB afecta la producción de leche y la longevidad del animal.^{8,68,149,150}

El desarrollo de leucemia/linfoma a células B es la manifestación final de la infección por VLB. Muchos intentos se han hecho para cuantificar el impacto sanitario y económico de la infección por VLB y el desarrollo posterior de leucemia/linfoma, así como su impacto en los parámetros productivos y la inmunocompetencia del bovino infectado.⁸ Dadas las características productivas y la biología del VLB, el impacto ocurre especialmente en rodeos lecheros, siendo muy limitados los intentos para cuantificar los efectos de la infección a nivel de los rodeos bovinos no lecheros.

Leucemia/Linfoma.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura publicada sobre el impacto de la LBE en los rodeos lecheros, la incidencia de leucemia/linfoma y las pérdidas productivas debidas a la infección por VLB.³³ Con respecto al desarrollo de leucemia/linfoma, identificaron un solo trabajo¹⁵¹ que consiste en un estudio de corte de 2,5 años de duración y que involucró 7760 bovinos. En él investigaron la incidencia de linfoma en tambos bovinos de California y la relación de esta patología con la presencia de anticuerpos específicos contra el VLB. La serología fue determinada por la técnica de AGID para anticuerpos anti-gp51 y anti-p24. Demostraron que la prevalencia de linfoma era 75 veces más alta en bovinos infectados por VLB. El trabajo no incluye un análisis que cuantifique los costos asociados a una mayor incidencia de leucemia/linfoma, ni cómo eso podría repercutir en la ecuación global del productor.^{8,33,151}

El impacto del desarrollo de leucemia/linfoma se encuentra subcuantificado. Una fracción de los bovinos que presentan leucemia/linfoma permanecerá necesariamente sin diagnóstico específico, dado que pueden morir de otras causas o ser sacrificados en los tambos sin que sea identificada dicha enfermedad. Históricamente se ha estimado que hasta el 15% de las leucemia/linfoma no son diagnosticados.⁸ Al ser una manifestación terminal de la infección por VLB, se manifiesta clínicamente sobre el final del ciclo productivo del bovino, ya sea en el frigorífico (una vez faenado el animal, pudiendo ser incluso la causa del envío a frigorífico) o sea en el rodeo, llevando a la muerte del bovino o a su eutanasia. En general, la prevalencia de leucemia/linfoma no es registrada en el rodeo. Su registro se ha hecho de forma más rigurosa en los frigoríficos durante las inspecciones de carcazas, como prevalencia de animales requisados debido a leucemia/linfoma. En Estados Unidos, la última publicación de la *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) con respecto a decomiso de carcazas corresponde al año fiscal 2002. De un total de 5.175.861 bovinos faenados, fueron decomisados 25.037 (0,48%) en la inspección *post-mortem* debido a leucemia/linfoma. Estos datos, comparados con el periodo 1958-1967, representan un incremento de un 500% en la prevalencia de linfoma a nivel de frigorífico.^{152,153} En 2009, White y Moore publicaron datos más recientes (del período 2005-2007), demostrando que la proporción de bovinos provenientes de tambos lecheros requisados debido a leucemia/linfoma en la inspección *post-mortem* se había incrementado a 0,8%.¹⁵⁴ En Canadá, registros similares en los frigoríficos registran hasta 2012 una incidencia de 0,5% de decomisos de carcazas debido a leucemia/linfomas. (<http://www.agr.gc.ca/>).

Debemos tener en cuenta que la prevalencia de leucemia/linfoma probablemente sea mayor a la calculada a partir del decomiso en frigorífico, dado que no incluye los casos intra-rodeo. Otro aspecto que redundante en el subregistro es el hecho de que una fracción de las carcasas son aprobadas luego de un "*parcial dressing*" (que implica la aprobación de la carcasa luego de la excéresis de ganglios linfáticos y/o vísceras comprometidas), sumado a que el diagnóstico de leucemia/linfoma en carcasas presenta una sensibilidad del entorno del 86%.¹⁵⁵ En suma, el registro de carcasas decomisadas en frigorífico representa una forma imperfecta de cuantificar el impacto de

leucemia/linfoma, pero representa la fuente de datos indirecta más sistematizada que existe.

Con respecto a este punto, Uruguay tiene el grave problema de que no posee un registro nacional de carcasas decomisadas debido a leucemia/linfoma, y por tanto desconocemos su incidencia en los rodeos.

Producción.

Diferentes estrategias se han utilizado para cuantificar el efecto de la infección por VLB en el bienestar del bovino infectado, así como en sus parámetros productivos en los rodeos lecheros. Dado que en los rodeos operan diferentes variables de confusión, ha sido difícil en la mayoría de los estudios definir conclusiones inequívocas, generándose entre diferentes trabajos evidencias encontradas. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en su revisión sistemática mencionada anteriormente^{8,33}, aborda algunos de estos aspectos.

Producción de leche.

El impacto de la infección por VLB en la producción de leche es muy difícil de cuantificar. Ambos parámetros están influenciados por las siguientes variables: edad, tamaño del rodeo, número de terneros y genotipo. Varios estudios han demostrado una asociación entre el antígeno leucocitario bovino (BOLA) y la susceptibilidad o resistencia a la infección por VLB.¹⁵⁶ Incluso un trabajo demostró una asociación entre la raza del bovino y su predisposición a la infección por VLB¹⁵⁷. Además, un alto rendimiento en cuanto a producción de leche se correlaciona con un riesgo incrementado de infección por VLB.

Estudios iniciales que pretendieron cuantificar el impacto de la infección por VLB en la producción del bovino, arrojaron resultados contradictorios, no concluyentes o incluso que bovinos seropositivos presentaban mayor rendimiento en cuanto a producción de leche¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. El rendimiento global de un bovino en producción no se puede explicar sino es por un modelo multivariable donde las variables de confusión son difíciles de despejar. Muchos de los estudios preliminares mencionados son estudios observacionales simples que comparan rendimiento entre bovinos seronegativos y seropositivos para el VLB, y que presentan problemas de diseño, sobre todo en cuanto a la conformación de grupos seronegativos. Otro aspecto importante que en estos estudios

preliminares no fue tomado en cuenta, es el hecho de incluir datos de toda la vida productiva del bovino. Muchos de estos trabajos excluyeron el último ciclo productivo del bovino en el cual fue sacrificado, descartando de esta forma información importante. Teniendo en cuenta la biología de la LBE, es esperable que los efectos de la infección por VLB ocurran tardíamente en la vida del animal.⁸

Cuantificar el efecto sobre la producción de leche que tiene la infección por el VLB requiere un diseño de estudio que contemple la biología de la infección, y un análisis de datos que permita corregir las variables de confusión mencionadas. Existen dos estudios que demuestran la asociación entre la prevalencia de infección por VLB en un rodeo y un descenso en la producción de leche. Ott y colaboradores en 2003 estudiaron la asociación entre la infección por VLB y el valor de la producción anual en rodeos lecheros de Estados Unidos, en el contexto de un monitoreo general de la sanidad de los bovinos lecheros realizado en 1996. Analizaron 1006 tambos en 20 estados, realizaron diagnóstico serológico mediante AGID y construyeron un modelo de regresión multivariable con el que demostraron que, por cada punto porcentual que aumenta la seropositividad para el VLB en un rodeo, disminuye 9,5 kg por vaca y por año la producción de leche.⁴⁹

Otro trabajo realizado por Erskiney y colaboradores en 2012 reportó resultados similares en cuanto a la asociación entre prevalencia y menor producción de leche. Utilizando muestras de leche, diagnosticaron seropositividad para VLB mediante la presencia de anticuerpos anti VLB por ELISA. Demostraron que la prevalencia de anticuerpos anti VLB en un rodeo lechero se correlaciona linealmente de forma negativa con la producción de leche por parte del rodeo. En ambos trabajos, la menor producción de leche es demostrada para el total del rodeo. Cuando se analiza el efecto de la prevalencia del VLB sobre la producción de leche, hay que tener en cuenta que tanto la longevidad del bovino como el número de terneros que tuvo son variables de confusión. Los bovinos más añosos tienden a producir más leche, y la prevalencia de infección por VLB en esta subpoblación es mayor.⁶⁸ Como se dijo, el verdadero impacto de la infección por VLB sobre la producción de leche es difícil de cuantificar. Esto explica en parte por qué no ha sido reconocido por largo tiempo, e incluso subestimado.⁴⁸

En otro estudio se valoraron los efectos de la infección por VLB sobre la producción de leche y el rendimiento graso durante un período de 6 años. Los autores demostraron que en bovinos infectados en estadio LP el rendimiento graso y la producción de leche declina con los años, en comparación con bovinos infectados con VLB pero en estadio AL.¹⁶⁰

La asociación entre la presencia de anticuerpos anti VLB y una menor producción de leche fue demostrada por varios trabajos, pero la asociación establecida es entre seroprevalencia para el VLB y una menor producción del rodeo^{49,149,161}. Otros trabajos intentaron evidenciar esta asociación a nivel del bovino individual, sin embargo no lograron demostrarla^{158,162-164}.

Norby y colaboradores sin embargo, lograron relacionar negativamente la producción de leche de un bovino dado con la positividad para anticuerpos anti VLB tanto en leche como en suero. A partir de la misma base de datos utilizada en trabajos anteriores¹⁴⁹, en lugar de reportar el efecto global de cada rodeo, correlacionaron el estatus serológico de cada bovino analizado con su rendimiento en cuanto a producción de leche¹⁶⁵. Este trabajo es el primero que reporta una asociación negativa entre la presencia de anticuerpos contra el VLB en leche y suero, con el rendimiento de un bovino individual en lo que refiere a la producción anual de leche. El resultado obtenido se contrapone al obtenido en trabajos previos^{158,162-164}, lo cual podría ser explicado al menos en parte por diferencias en: el diseño de los trabajos, la selección y obtención de muestras, en otros factores independientes que afectan la producción de leche, como también diferencias en el tamaño y la composición de los rodeos. En el trabajo realizado por Jacobs y colaboradores, 1991¹⁵⁸ se seleccionaron aleatoriamente tambos en el área de Ontario, Canadá. La prevalencia media de los tambos seleccionados fue de 36%, similar a la obtenida por Norby y colaboradores¹⁶⁵ que fue de 34% lo que no justifica la discrepancia. Sin embargo el primer estudio se utilizaron tambos de menor tamaño, con una media de 44 bovinos, en los cuales podrían estar jugando diferentes variables de confusión que afecten los resultados. El trabajo de Kale y colaboradores, 2007¹⁶² se realizó sólo en un tambo, mientras Norby y colaboradores utilizaron una base de datos proveniente de 105 tambos del estado de Michigan, con rodeos que varían desde 116 a 6492 bovinos en producción. En el caso del trabajo de Tiwari y colaboradores, 2007¹⁶³ se incluyó un número mucho mayor

de bovinos y un área de estudio geográficamente más extensa, muestreando un número similar de muestras de animales por tambo seleccionado. Ambos estudios presentan diferencias, sin embargo en la forma de selección de los bovinos, el trabajo de Tiwari y colaboradores utilizó un modelo multivariable que incluía no solo seropositividad para VLB, sino para muchos otros patógenos bovinos. Estas últimas variables no fueron incluidas en el estudio de Norby y colaboradores¹⁶⁵, de haberlo hecho podrían haber introducido variables de confusión que no permitiera obtener resultados con significancia estadística.¹⁶⁵

En suma, a pesar de lo que se creía originalmente, existe evidencia de que bovinos infectados por el VLB presentan una reducción estadísticamente significativa en la producción de leche.⁸

Reproducción.

La revisión de la EFSA identificó dos trabajos relacionados a este aspecto, el de Heald y colaboradores del año 1992 y el de Tiwari y colaboradores del 2003. Definieron como indicador de problemas reproductivos el intervalo de tiempo entre dos partos para un bovino dado. Heald no pudo demostrar diferencias significativas en el intervalo mencionado atribuibles a la infección por VLB¹⁶⁶, mientras que Tiwari demostró diferencias en el intervalo mencionado asociada a infección por VLB, pero sólo para el intervalo entre el primer y segundo ternero, no para los intervalos subsiguientes¹⁶⁷. En suma, no existe evidencia clara de que la infección por VLB afecte la capacidad reproductiva de los bovinos infectados, al menos estudiada de forma indirecta como intervalo de tiempo entre dos pariciones.⁸

Mastitis.

Otro aspecto sobre la infección por VLB difícil de cuantificar es el compromiso del sistema inmune que se genera en el bovino infectado aún en etapa subclínica. Como se dijo, varios trabajos han demostrado alteraciones en el sistema inmune producto de la infección por VLB. Sin embargo, ha resultado difícil demostrar que esto redunde en una mayor tendencia a padecer enfermedades infecciosas, o a un estatus sanitario menor que redunde *per se* en mayores costos económicos. Intuitivamente, es esperable que las alteraciones descritas en el sistema inmune del bovino infectado afecten

negativamente su capacidad de respuesta frente microorganismos y su homeostasis global.⁴⁸

La EFSA en su revisión sistemática define la prevalencia de mastitis como elemento indirecto de estatus inmunológico.^{8,33} El trabajo ya mencionado de Heald y colaboradores no pudo demostrar diferencias estadísticamente significativas al respecto. La influencia de la infección por VLB en el desarrollo de mastitis fue estudiada analizando el recuento de células somáticas en leche de bovinos infectados y no infectados¹⁶⁶. Hasta el momento no hay trabajos que permitan afirmar que las alteraciones por la infección de VLB redunden en mayor probabilidad de padecer enfermedades infecciosas o comorbilidades específicas.⁸

Longevidad de bovinos en el contexto productivo.

Se ha demostrado que la infección por VLB afecta también la longevidad del bovino. Rodeos con alta prevalencia de VLB tienden a tener una media de edad menor, en parte porque es más probable que los bovinos infectados de mayor edad sean sacrificados.⁴⁸ El primer estudio que indicó de manera indirecta que la infección por VLB afectaba la longevidad del bovino fue el denominado estudio Michigan, que demostró que dentro de un rodeo la proporción de bovinos añosos (definidos como con tres terneros o más) disminuye conforme aumenta la prevalencia de VLB en el rodeo.¹⁴⁹

Un rodeo que mantiene su tamaño constante es renovado anualmente con incorporación de nuevos bovinos a la producción y eliminación (sacrificio) de otros. La tasa de sacrificios está determinada en parte por las edades y el número de ciclos productivos (número de pariciones) de los bovinos del tambo. Bovinos con bajo rendimiento en la producción de leche son eliminados del rodeo más frecuentemente, aun siendo jóvenes. Por otro lado, los animales más viejos (con mayor número de pariciones) o con condiciones comórbidas, determinan en mayor medida la necesidad de ser eliminados de la producción. Dada la dinámica productiva de un rodeo lechero, el efecto de la infección por VLB sobre la tasa de sacrificios en el rodeo debe considerar la edad del bovino y el número de ciclos productivos del animal (partos). Aún teniendo en cuenta esto, la mayoría de los trabajos definen el estatus de infectado por VLB de acuerdo a la serología del bovino, pero en general no se tiene en cuenta cuándo ocurre la primo-infección. Este aspecto puede ser generador de

confusión, dado que los efectos de la infección por VLB pueden retrasarse meses o incluso años.⁸

En los rodeos lecheros, los bovinos inician el ciclo productivo cuando tienen alrededor de dos años de vida, cuando luego de su primera gestación comienzan a producir leche. Esta latencia en el inicio productivo resulta costosa para la industria, por lo tanto se los intenta mantener en producción durante varios ciclos productivos (varias gestas). De este modo, tambos con baja longevidad presentan una población de bovinos mayoritariamente compuesta por vacas con uno o dos terneros, por lo que aún no ha alcanzado el máximo potencial en cuanto a producción de leche.⁶⁸ Una forma de cuantificar longevidad en los rodeos lecheros es calcular el promedio de terneros que han tenido las vacas que lo componen. Un aspecto a tener en cuenta es el hecho de que, en un contexto productivo, algunos bovinos son eliminados de forma prematura (habiendo gestado solamente uno o dos terneros) debido a que no cumplen los estándares productivos. Es recomendable que para estudiar el efecto de la infección del VLB sobre la tasa de sacrificios y longevidad del bovino a nivel del tambo, se focalice el trabajo en bovinos con tres terneros o más, a modo de eliminar esta variable de confusión precoz.⁸

La EFSA en su revisión^{8,33} cita cuatro trabajos que abordan el efecto de la infección por VLB sobre la longevidad del bovino. Un trabajo inicial de Thurmond y colaboradores en 1985, analizó la tasa de sacrificios entre bovinos seropositivos y seronegativos, demostrando que en bovinos seropositivos mayores de 3 años la tasa de sacrificios era mayor¹⁶⁸. El estudio ya mencionado de Healden de 1992, estimó la media de la tasa de sacrificios en bovinos seropositivos y seronegativos, siendo mayor en los primeros, pero no proporcionó una medida de dispersión, por lo cual no es posible saber si sus resultados son estadísticamente significativos¹⁶⁶. Otro trabajo contemporáneo a este último de Pollari y colaboradores, demostró que para bovinos mayores de 36 meses y seropositivos para VLB, la tasa de sacrificio era mayor.¹⁶⁹ Por último, un trabajo realizado por el grupo de Bartlett en 2013 también demostró que los animales seropositivos del rodeo tienden a ser sacrificados antes que aquellos no infectados. Relevaron 3849 bovinos lecheros de 112 tambos en el Estado de Michigan (EEUU.). Mediante ELISA diagnosticaron la presencia de anticuerpos anti VLB a partir de muestras de leche, y luego del diagnóstico los

bovinos fueron seguidos por una media de 597 días. Demostraron que los bovinos con anticuerpos anti VLB morían o eran sacrificados significativamente más que aquellos que no los presentaban. En el mismo sentido, la probabilidad de supervivencia del bovino durante el período de observación se asociaba significativamente al título de anticuerpos anti VLB. Conforme el título de anticuerpos presentes en leche aumenta, disminuía la probabilidad de supervivencia durante el período de observación. Los bovinos que presentaban los títulos más altos tenían un 40% más de chance de morir o ser sacrificados durante el período de observación que los bovinos sin anticuerpos contra VLB.¹⁵⁰

En suma, existe evidencia estadísticamente significativa de que la infección por VLB en los rodeos lecheros se asocia con la menor longevidad del bovino en un sistema productivo.⁸

Como se describió en la sección de epidemiología y situación sanitaria, dado el creciente número de regiones y países que han erradicado o puesto en marcha programas de control y erradicación de la LBE, existe actualmente a nivel comercial mayor conciencia sobre el estatus sanitario con respecto al VLB, y sobre todo un interés creciente para poner en valor el estatus libre de VLB.

En nuestro país, al no contar con un plan estratégico de control y erradicación de la enfermedad, casi para lo único que se utiliza el diagnóstico de VLB de forma masiva es a la hora de exportar animales en pie. La gran mayoría de los países, aún aquellos que no han erradicado ni tienen en marcha programas de control y erradicación de la enfermedad, no aceptan animales infectados por VLB. Actualmente esta es una restricción que se limita a los bovinos exportados en pie, y no a los subproductos cárnicos o lácteos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dado que el virus se integra a los linfocitos B, su diagnóstico es posible a partir de los subproductos industrializados de un bovino infectado. Un escenario que limite el acceso a los mercados debido a este criterio sanitario, por ejemplo para todos los subproductos comerciales bovinos, sería preocupante para el Uruguay. Hoy en día no hay elementos para plantearlo como un escenario inminente, pero sí es un escenario plausible en el mediano plazo.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia sospechada en los rodeos nacionales, sumado al hecho de que una vez implementado un programa de control y

erradicación el descenso en la prevalencia no es instantáneo sino a largo plazo, es importante plantearnos como país la posibilidad de poner en funcionamiento un programa de dichas características, ya que los costos económicos de una eventual limitación en el acceso a mercados serían de alto impacto para la industria láctea nacional. Sobre este punto, no deja de ser preocupante que la UE defina las trabas comerciales como uno de los principales costos asociados a la infección por VLB. Más aún si se considera que el documento de la UE, más allá de representar una opinión científica basada en la mejor evidencia disponible, pueda también ser visto como un posicionamiento político.⁸

La propagación de la enfermedad es fundamentalmente horizontal e iatrogénica. Tradicionalmente se recomiendan ciertas prácticas de manejo veterinario para disminuir la propagación de la enfermedad dentro del rodeo, disminuyendo la transmisión hacia bovinos no infectados. Las prácticas recomendadas incluyen fundamentalmente la no reutilización de agujas y el uso guantes de tacto, utilización de la técnica de inseminación artificial preferentemente, segregación de animales seropositivos, alimentación de terneros con reemplazos de calostro o calostro previamente pasteurizado y la limpieza y desinfección de elementos corto-punzantes previo a su reutilización. Esencialmente, limitar cualquier práctica que propicie el intercambio de células entre bovinos del rodeo. Aunque han demostrado utilidad, no son de implementación habitual en el manejo veterinario en nuestro país. Aparte de los cambios en la práctica veterinaria que conllevan, su implementación tiene costos económicos, lo que dificulta su generalización hasta tanto no se considere por parte del productor el aumento de la prevalencia en su rodeo como un problema serio. Dicho de otro modo, el problema de la infección por el VLB actualmente no está en la ecuación de costos del sistema productivo, pero es esperable que lo esté en el mediano plazo, implicando un aumento de los mismos.

Estrategias de control de la enfermedad.

Estrategias de control de la infección.

El virus desarrolla una infección crónica en todos los casos, no existiendo tratamiento efectivo ni una vacuna eficaz. Que el agente infeccioso sea un retrovirus complejiza la probabilidad de tener una vacuna efectiva.¹⁷⁰ Han habido intentos de realizar una selección genética de bovinos resistentes a la infección por VLB, o de bovinos más proclives a desarrollar un estadio LP mantenido.¹⁷¹ La selección de animales portadores de alelos DRB3.2 (que se han asociados a resistencia frente a la infección por VLB) no resultó eficaz. Sin embargo, la selección de bovinos con mejor perfil de resistencia al VLB es una estrategia que podría disminuir costos económicos.

En un contexto de prevalencia alta como en nuestro país, la estrategia que ha demostrado mayor utilidad para controlar la enfermedad, disminuir la incidencia y abatir la prevalencia en el mediano plazo, implica varios pasos secuenciales. Entre ellos está la identificación de los bovinos infectados, la segregación de los mismos para impedir la propagación de la enfermedad y la puesta en marcha de prácticas de manejo veterinario que tiendan a disminuir la transmisión horizontal iatrogénica. Sólo la etapa de diagnóstico serológico ya es costosa económicamente. Comercialmente existen varios laboratorios que ofrecen el diagnóstico a partir de muestras de leche y suero. Sin embargo, el costo por bovino es elevado, en parte porque recurren a kits comerciales importados de alto precio. Muchos países que han erradicado la enfermedad realizaron campañas de diagnóstico y eliminación de bovinos positivos. En estos casos se partía de una prevalencia baja, con estructuras productivas diferentes a la de nuestro país, por lo que una estrategia en ese sentido no es planteable actualmente para Uruguay.⁴⁵

En un rodeo lechero determinado, la prevalencia de infección por VLB está directamente asociada a mayores costos económicos. Las pérdidas económicas anuales calculadas para la industria lechera en Estados Unidos asociadas a la infección por VLB se estiman en 525 millones de dólares. Estos cálculos no incluyen el impacto asociado a la infección subclínica en la longevidad del bovino.^{48,49,172}

Programas de erradicación exitosos.

Incluso antes que se reconociera al VLB como agente etiológico de la LBE, se llevaron a cabo en Europa intentos para erradicar la enfermedad. Los primeros, durante los años 50' y 60', se basaron en la eliminación de rodeos (Dinamarca, Alemania) o bovinos (Estonia, ex URSS) con linfocitosis persistente.^{173,174} Durante los años 80' se llevaron a cabo relevamientos de prevalencia basados en diagnósticos serológicos en la mayoría de los países europeos. En general, la prevalencia para VLB, con algunas excepciones era baja, siendo en muchos países del entorno del 10%. Durante el periodo 1993-2010, varios proyectos se pusieron en marcha para erradicar la enfermedad de la UE, logrando la mayoría de los estados miembros el estatus de libre de VLB. Para lograr el estatus sanitario libre de VLB la UE requiere que el 99,8% de los rodeos del país estén libres de VLB (Coincil Directive 64/432/EEC). Actualmente, el VLB está presente solo en algunos de los miembros más nuevos de la UE (Rumania, Bulgaria, Hungría, Croacia, Estonia, Grecia), así como en algunas regiones de Polonia, Italia y Portugal. Sin embargo, aunque aún no erradicada, la mayoría de estos estados o regiones tienen en marcha activos programas de erradicación y están muy cerca de lograr tal objetivo.⁸ Ya se ha mencionado el caso de Nueva Zelandia y Australia, que mediante programas de control y erradicación han logrado erradicar la LBE de rodeos lecheros. Esta situación le confiere una ventaja sanitaria cualitativa frente a otros grandes productores de alimentos.

Problema identificado.

- LBE es una amenaza latente para nuestro sistema productivo ganadero especialmente en su sector lechero; teniendo en cuenta su rol protagónico en la economía doméstica. Visualizamos la necesidad que tiene el país, de encarar de forma sistemática el problema leucosis.
- Cualquier escenario que pretenda encarar la problemática de la infección por VLB, implica una etapa diagnóstica necesaria para cuantificar la entidad del problema. Pero también como insumo para la toma de decisiones que disminuyan la transmisión intra y extra rodeo, y que reduzcan la prevalencia.

- El diagnóstico de leucosis mediante los kits diagnósticos existentes implica una inversión millonaria, teniendo en cuenta un costo aproximado de entre 2-3 dólares americanos por bovino y que el Uruguay tiene 12 millones de bovinos y 800.000 bovinos lecheros. Contar con un método propio para el diagnósticos de la LBE que sea barato y eficiente, representa un avance hacia la caracterización y el control de la LBE.

Objetivo general.

Desarrollar un test diagnóstico alternativo a los kit comerciales existentes y evaluarlo en una población amplia de bovinos. Estudiar su reproducibilidad, confiabilidad así como sus valores de sensibilidad y especificidad, esperando que los mismos sean similares a los kits comerciales más ampliamente utilizados. A su vez, pretendemos que presente un costo menor a los kits comerciales.

Objetivos específicos.

- 1) Desarrollar, poner a punto y evaluar un ELISA indirecto anti p24, a partir de muestras de suero.
- 2) Desarrollar, poner a punto y evaluar un ELISA indirecto capaz de reconocer el ectodominio de ENV, a partir de muestras de suero.
- 3) Desarrollar, poner a punto y evaluar un ELISA indirecto capaz de reconocer el ectodominio de ENV, a partir de muestras de leche.
- 4) Evaluación de la historia natural de la infección por VLB en un tambo modelo experimental, e identificación de factores asociados a mayor prevalencia.

Materiales y Métodos.

Muestreo establecimientos bovinos.

Obtención y procesamiento de muestras bovinas (suero, células somáticas de sangre periférica, leche).

Obtención de muestras.

Para el desarrollo del presente trabajo se obtuvieron muestras de 7 establecimientos lecheros nacionales. En cada establecimiento fueron relevados todos los bovinos pertenecientes al mismo. De los 7 establecimientos, 6 son establecimientos productivos privados representativos de la realidad del sector con sistemas productivos habituales de la realidad nacional. Sus rodeos se componen de una mezcla heterogénea de bovinos de todas las edades, tanto en la etapa de producción de leche como en la etapa de pre-producción de leche. Para el acceso a los mismos se contó con la aprobación del propietario en todos los casos, siendo relevados en el mismo día todos los bovinos del tambo. De cada bovino se cuenta con los datos de trazabilidad presentes en la caravana del animal. El otro establecimiento relevado es un tambo modelo experimental, gestionado por una agencia de investigación agropecuaria nacional. Se tuvo acceso al mismo, gracias a un acuerdo institucional. En este establecimiento, no sólo se lleva registro de trazabilidad (programa nacional de trazabilidad) sino también de información sanitaria, patronímica y genealógica de cada bovino relevado. Las muestras de leche fueron obtenidas exclusivamente de este establecimiento. El mencionado tambo fue relevado en varias oportunidades, según las necesidades del proyecto.

En cada tambo los bovinos relevados fueron los bovinos adultos pertenecientes al tambo, es decir vaquillonas o vacas.

Procesamiento de muestras.

Suero: Se puncionó la vena central de la cola, para extracción de muestra de sangre. (*Vacurette® Blood Collection Tube with Serum Clot Activator*). Se obtuvo el suero dentro de las 24hs de extracción de la muestra.

ADN: Se puncionó la vena central de la cola, para extracción de muestra de sangre. (*Vacurette® Blood Collection Tube with Serum Clot Activator*). Se obtuvo el ADN a partir de la sangre total extraída, se almacenó a -20°C.

Leche: La obtención se realizó en contexto del ordeño habitual del tambo el día del relevamiento, obteniéndose una alícuota de lo producido por el bovino ese día, durante el control de calidad de leche del tambo.

Almacenamiento.

Todas las muestras de sangre, tanto para extracción de ADN, como de suero y de leche, fueron remitidas al Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur Montevideo donde se llevaron a cabo los experimentos de mesada.

Para el caso de las muestras de suero y leche, se almacenaron en una seroteca a -80°C en las condiciones de almacenaje específicas. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

Expresión y purificación de p24.

Para la producción de p24 se utilizó el protocolo desarrollado y puesto a punto por el Dr. Gonzalo Obal en su tesis doctoral.¹⁷⁵ Para ello se amplificó la secuencia completa del gen p24 obtenido a partir del ADN copia de la línea celular FLK (*fetal lamb kidney*) persistentemente infectada con VLB, y se clonó en un vector de expresión bacteriano pET28a(+) bajo la acción del promotor T7. Para ello se diseñaron los *primers* *p24NheI_FOR* (5'-TGGCTAGCTTGCCAATCATATCTGAAGGG-3') y *p24BamHI_REV* (5'-CCGGATCCTTAGAGAACTGCAGGCTGTTTCAC-3'), con el propósito de insertar la secuencia de p24 entre los sitios de corte *NheI* y *BamHI* y diseñar una construcción de p24 conteniendo un *tag* de histidinas (His6) escindible por trombina en el extremo N-terminal. Cabe destacar que el *primer* reverso contiene un codón STOP inmediatamente después del último residuo de la proteína p24. La secuencia y orientación de la construcción fue confirmada por secuenciación, y el plásmido resultante fue usado para transformar mediante shock térmico la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

La expresión de p24 se realizó por inducción con 1mM IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,7.

Luego de la inducción, el cultivo se incubó a 30°C durante 4hs y las bacterias se cosecharon por centrifugado a 6.000g durante 20 minutos.

Las células cosechadas fueron re suspendidas en buffer 20 mM fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 7.4 y lisadas mediante incubación en hielo por 30 minutos, en presencia de inhibidor de proteasas libre de EDTA (*Complete EDTA Free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany*) y ADNasa. A continuación, el lisado bacteriano se sonicó durante 5 minutos (en hielo) y se centrifugó a 20.000 g por 40 minutos a 4°C, dando lugar a un sobrenadante de proteínas solubles conteniendo p24.

La proteína de interés (p24 conteniendo un *tag* de histidinas en su extremo N-terminal) fue purificada por cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC). Para ello se cargó el extracto obtenido en una columna HisTrap FF de 1mL (GE Healthcare LifeScience, Marlborough, MA, USA) equilibrada en buffer 20 mM fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 7.4. Luego de lavar con este buffer, se eluyó la proteína con un gradiente de concentración de imidazol de 15 mL, desde 20mM hasta 500mM. Finalmente se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna *Hi Load Superdex 16/600 75 PG (GE HealthcareLifeScience, Marlborough, MA, USA)* equilibrada en 20mM HEPES pH 7.5, 50mM NaCl utilizando un equipo *AKTA Purifier (GE HealthcareLifeScience, Marlborough, MA, USA)*.

La proteína purificada fue concentrada por ultrafiltración y almacenada a una concentración de aproximadamente 20mg/ml en presencia de 0,02% NaN₃.

El grado de inducción en la etapa de expresión y de pureza en las distintas etapas de purificación, se determinó mediante SDS-PAGE y tinción por Coomassie.

Expresión y purificación de ectoENV.

La expresión de ecto-ENV se realizó a partir de la línea de celular S2 de *Drosophila melanogaster* transfectada de manera estable. Dicha línea celular fue desarrollada durante la tesis doctoral de la Dra. Lorena Tome.¹⁷⁶

Llamamos ecto-ENV, a la proteína recombinante, que contiene gp51, y el ectodominio de gp30, gracias a una mutación en el sitio de clivaje. En la Figura 5, se muestra un esquema de la proteína completa, nuestra proteína

recombinante (ecto-ENV) contiene gp51 (SU), y el ectodominio de gp30, no incluyendo el dominio transmembrana y la cola citoplasmática.

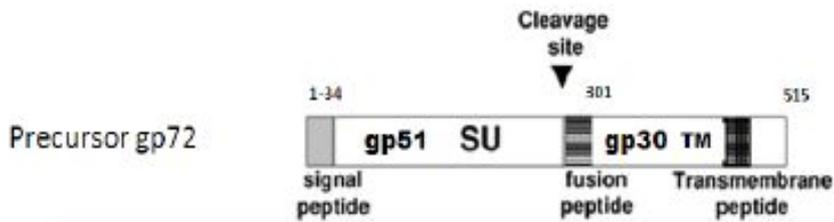


Figura 5. Precursor ENV-BLV-Gp72. En secuencia primaria (515aa) se observa el péptido señal (1-34), la subunidad gp51 (SU), el sitio de procesamiento proteolítico (cleavage site) y la subunidad gp30 (TM). Modificado de Tesis Dra. Tomé.

Las células S2 transfectadas de manera estable fueron cultivadas en alta densidad en medio *Insect-Xpress* (Lonza Bioscience, Walkersville, MD, USA) en frascos Erlenmeyer de 250 mL. Una vez alcanzada una densidad celular de $7-7,5 \times 10^6$ células/mL, se realizó la inducción de la expresión de ecto-Env con $5 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (Sigma-Aldrich). El sobrenadante se cosechó a las 30hs post inducción.

Luego de cosechado el sobrenadante se lo clarificó, y posteriormente se centrifugó durante a 8.000g durante 30 min a 4°C . Finalmente se ajustó el pH a 8 con Tris 1M pH 9.6 y se filtró por $0,45 \mu\text{M}$.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad, empleando una columna StrepTrap HP de 1 mL (GE HealthcareLife). Se cargó en la columna mediante bomba peristáltica (previo lavado y equilibrado de la columna). Las condiciones de la cromatografía de afinidad fueron de un flujo 1mL/min. La elución se realizó en un paso único empleando el buffer de unión conteniendo 2,5mM de destiobiotina. Para la elución se utilizó el equipo *AKTA prime* (Fast Performance LiquidChromatography, GE HealthcareLifeScience).

Las fracciones correspondientes al sobrenadante crudo, *flow through*, lavados y eluato se recuperaron y corrieron en geles de poliacrilamida al 12% con SDS y posterior tinción con Coomassie.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante espectrofotometría midiendo absorbancia a 280 nm.

Técnica de ELISA.

Se realizaron tres ELISAs indirectos diferentes, un ELISA indirecto anti ecto-ENV a partir de muestras de suero y leche; y un ELISA indirecto anti p24. La sensibilización se realizó con la proteína recombinante p24 y ecto-ENV respectivamente, las condiciones de sensibilización se comentan más adelante durante la puesta a punto. La solución de bloqueo utilizada fue: PBS-leche 3%-*tween* 0,2%. Los sueros bovinos fueron diluidos en la solución de bloqueo. El anticuerpo secundario utilizado fue un IgG anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:1000, recomendada por el fabricante. Para el revelado se utilizó tetrametilbenzidina (TMB) 6 mg/mL, cortando la reacción luego de 12 min. con ácido sulfúrico 11%. La lectura de la absorbancia se realizó mediante espectrofotómetro a 450nm. La solución de lavado utilizada fue: PBS-*tween* 0,2%.

Kit Comercial VMRD.

Se utilizó un ELISA indirecto comercial (*Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit, from Veterinary Medical Research & Development -VMRD, Pullman, WA, USA-*) capaz de reconocer anticuerpos anti gp51 en muestras de suero bovino. Se realizó según las indicaciones del fabricante.^{177,178}

Técnica de PCR.

La detección del ADN proviral se realizó mediante *nested* PCR. Se utilizó el protocolo aprobado por la OIE, en su Manual sobre animales terrestres, capítulo sobre Leucosis Bovina Enzoótica.¹⁰² La región de VLB amplificada es el gen de gp51 (*env*), y en nuestro caso realizamos modificaciones a partir de un protocolo desarrollado por *Fechner et al. de 1996*.¹⁷⁹

Se realizó la extracción y purificación del ADN total a partir de sangre total bovina. Se utilizó el kit comercial *Illustra blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Life Sciences)*. El ADN se eluyó en 100µL de H₂O ultrapura.

Primers utilizados:

	Oligo	Secuencia de Env (5'-3')	Posición
1 ^{er} Round	BLV-env-1	TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA	5032-5053
	BLV-env-2	AACAACAACCTCTGGGAAGGG	5629-5608
2 ^{do} Round	BLV-env-3	CCCACAAGGGCGCGCCCGGTTT	5099-5121
	BLV-env-4	GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG	5542-5521

El tamaño del producto del 1^{er} round utilizando los oligonucleótidos BLV-env-1/BLV-env-2 es de 598 pb y el tamaño del producto del 2^{do} round utilizando Env-3/BLV-env-4 es de 444 pb.

1^{er} round:

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50µl conteniendo una mezcla de 5µl de buffer de PCR (10x), 4µL de ADN 25 ng/µL, 1,5µL de cada oligonucleótido 10µM (BLV-env-1 y BLV-env-2), 1µL de dNTP (10mM), 1,5µL MgCl₂ (50 mM), 0,25µl de Taq ADN Polimerasa (5U/µL) (Invitrogen), 35.25µl H₂O.

Las condiciones de la amplificación fueron: 2 min a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C, 60 segundos a 72°C y 4 min. a 72°C.

2^{do} round:

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50µl conteniendo una mezcla de 5µl de buffer de PCR (10x), 4µL de ADN 25 ng/µL, 1,5µL de cada oligonucleótido 10µM (BLV-env-3 y BLV-env-4), 1µL de dNTP (10mM), 1,5µL MgCl₂ (50 mM), 0,25µl de Taq ADN Polimerasa (5U/µL) (Invitrogen), 35.25µl H₂O.

Las condiciones de la amplificación fueron: 2 min a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C, 60 segundos a 72°C y 4 min. a 72°C.

Posteriormente se analizaron 5µl del producto de amplificación, mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Los geles fueron preparados en buffer 1xTBE (Tris Borato EDTA) conteniendo 1,5µg/mL de Bromuro de etidio. Los productos se visualizaron bajo luz UV. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Se consideró como resultado positivo, aquél cuyo producto de PCR tenga un tamaño de 444pb. Las muestras con resultados negativos (que no tengan productos del tamaño esperado, 598pb) en el 1^{er} round de PCR, se consideraran positivas si se obtiene un resultado positivo en el 2^{do} round de PCR.

Análisis estadístico

Análisis de curvas ROC.

El análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*), originado en los años 50, se ha convertido en un método que ha demostrado utilidad para evaluar la eficacia de una técnica diagnóstica. Entre sus ventajas ofrece un índice de eficacia intrínseco de la técnica diagnóstica, no influenciada por elementos arbitrarios como la elección de un punto de corte *a priori*. Su índice de eficacia, AUC (área bajo la curva), determina la capacidad intrínseca de una técnica diagnóstica para diferenciar entre casos y controles.¹⁸⁰

La curva ROC presupone que ambas poblaciones de casos y controles superponen sus distribuciones. Una separación completa entre ambas poblaciones implica discriminación perfecta, mientras que una superposición completa implica no discriminación. La cantidad de resultados positivos y negativos dependerá del punto de corte seleccionado. Variando el mismo, el gráfico relaciona la sensibilidad *versus* 1-especificidad. Cuanto mayor es la capacidad de discriminación del test diagnóstico su curva ROC se acercará al ángulo recto, mientras que una curva ROC que se acerque a la diagonal refleja una performance del test diagnóstico no mejor que el azar. El AUC es una medida combinada y eficiente de la sensibilidad y especificidad que describe la validez inherente del test diagnóstico. Si el AUC es igual a 1, implica que la discriminación del test diagnóstico entre casos y controles es perfecta, por lo que la distribución de ambas poblaciones no se superpone. En cambio si AUC es igual a 0,5, implica una discriminación no mejor que el azar, es decir una curva ROC que atraviesa la diagonal del gráfico.¹⁸⁰

En nuestro caso, el análisis de curvas ROC se llevó a cabo con el *software PrismGraphPad*. Luego de la construcción de las curvas, se seleccionó un punto de corte con sus correspondientes valores de sensibilidad y especificad.

En cada caso evaluamos nuestro test diagnóstico frente a una población definida previamente como de verdaderos positivos y negativos.

Índice kappa.

El índice kappa es una medida de concordancia entre dos variables. Compara la probabilidad de concordancia obtenida, con la esperable de forma aleatoria si ambos eventos fueran estadísticamente independientes. A partir de su desarrollo en la década de los 60, fue aplicado de forma creciente en el análisis de la performance de técnicas diagnósticas. En nuestro caso se utilizó el software *PrismGraphPad* para su cálculo.¹⁸¹⁻¹⁸⁴

El mencionado software otorga a los siguientes valores de kappa un determinado nivel de concordancia:

$\kappa=0$	<u>Nivel de concordancia:</u> peor que exclusivamente explicado de forma aleatoria.
$\kappa < 0.20$	<u>Nivel de concordancia:</u> pobre
$\kappa 0.21 - 0.40$	<u>Nivel de concordancia:</u> modesto
$\kappa 0.41 - 0.60$	<u>Nivel de concordancia:</u> moderado
$\kappa 0.61 - 0.80$	<u>Nivel de concordancia:</u> bueno
$\kappa 0.81 - 0.99$	<u>Nivel de concordancia:</u> muy bueno
$\kappa 1$	<u>Nivel de concordancia:</u> perfecto

Resultados y Discusión.

ELISA indirecto anti p24.

De acuerdo con el objetivo específico 1, se procedió a la producción de la proteína viral p24 recombinante, puesta a punto de un ELISA indirecto anti p24 y evaluación de su performance en el terreno.

Producción de p24.

Realizada la transformación, inducción y cultivo; se cosechó el sobrenadante de interés para ser purificado. Se realizó una IMAC, y posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular.

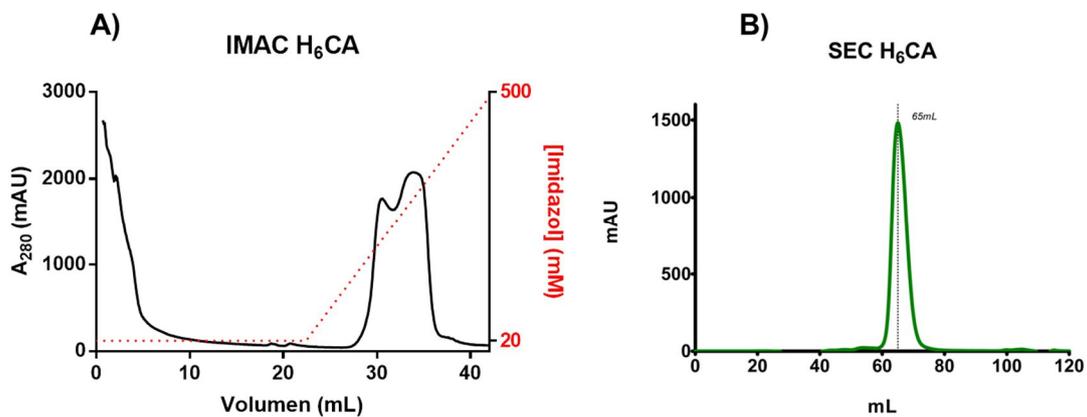


Figura 6. **A)** IMAC, con gradiente de imidazol. En ordenadas se grafica la absorbancia a 280, en abscisas se grafica el volumen de columna. La línea de puntos rojos expresa la concentración de imidazol. **B)** SEC, en ordenadas se grafica la absorbancia 280, en abscisas se grafica el volumen de columna en mL.

Luego del lavado de extracto bacteriano, se obtuvo del IMAC, un pico de absorbancia con aproximadamente una concentración de 200mM de imidazol. Posteriormente mediante la cromatografía de exclusión molecular, confirmamos que se obtiene un pico único, estrecho al volumen esperado (63ml) (Figura 6).

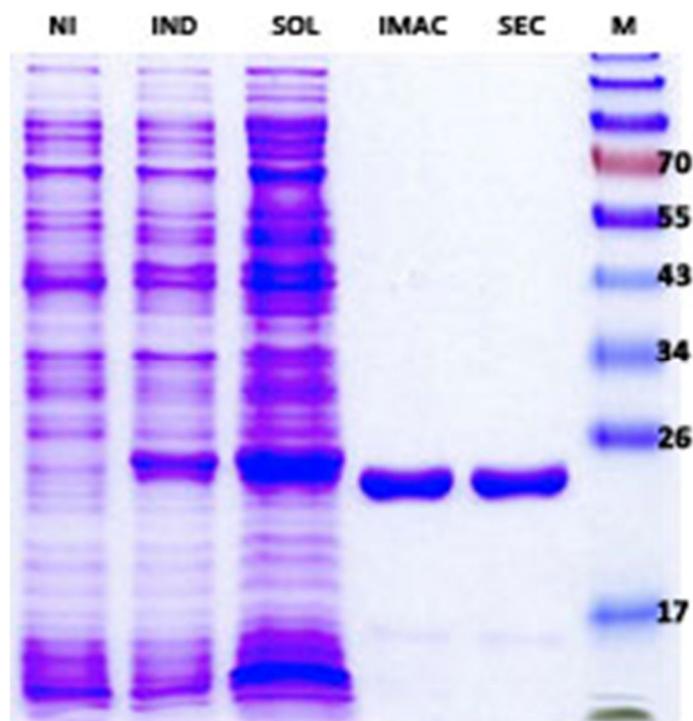


Figura 7. SDS-PAGE y tinción por Coomassie. De izquierda a derecha, se cargó: alícuotas del sobrenadante en cultivo: NI: previo a inducción, I: inducido; sobrenadante de cultivo, flow through de IMAC y flow through de SEC.

Se realizó un SDS-PAGE y tinción por Coomassie, para determinar el grado de inducción del cultivo, y el grado de pureza en las distintas etapas de la purificación. Se observa en la Figura 7, como la fracción de peso molecular 24, correspondiente a nuestra proteína de interés es enriquecida, y a su vez logra una purificación prácticamente sin contaminantes.

En suma, de acuerdo al protocolo desarrollado previamente, fue posible obtener una proteína recombinante con un alto grado de pureza, insumo que nos permitió desarrollar los posteriores experimentos de la presente tesis.

Puesta a punto de ELISA p24.

El protocolo *a priori* para la realización del ELISA, producto de resultados previos era el siguiente: sensibilización utilizando la proteína p24 pura a una concentración a definir en una solución de buffer bicarbonato 0,05M pH 9.6, 100µL por pocillo. Bloqueo 2horas a TA con la solución de bloqueo. Esta solución no interacciona específicamente ni con la proteína p24 ni con los sueros bovinos (resultados previos, no mostrados).

Se siembran 100µL de los sueros bovinos a una dilución a definir.

Como anticuerpo secundario se utiliza un IgG anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:1000. El anticuerpo secundario no interacciona específicamente ni con la proteína p24, ni con la solución de bloqueo (resultados no mostrados).

Las dos variables a poner a punto fueron: qué título de suero utilizar, y qué concentración de proteína utilizar para sensibilizar la placa.

Con este objetivo y utilizando 2 sueros, uno verdaderamente positivo (positivo para VMRD y para la técnica de PCR) y otro verdaderamente negativo (negativo para VMRD y técnica de PCR), se diseñó la siguiente placa (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño de placa de ELISA para puesta a punto del ELISA p24. Ambos sueros, “verdaderamente” positivo (S+) y “verdaderamente” negativo (S-), fueron sembrados a los siguientes títulos: 1/10, 1/50, 1/100, y 1/500 respectivamente. A su vez, la proteína p24 fue utilizada a las siguientes concentraciones de sensibilización: 10µg/mL, 5µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL, 0,625µg/mL, 0,3125µg/mL, 0,078µg/mL, 0,039µg/mL y 0,019µg/mL.

		Concentraciones de sensibilización, *ug/ml									
Título.		10*	5*	2,5*	1,25*	0,625*	0,3125*	0,078*	0,039*	0,019*	
S+	1/10										
	1/50										
	1/100										
	1/500										
S-	1/10										
	1/50										
	1/100										
	1/500										

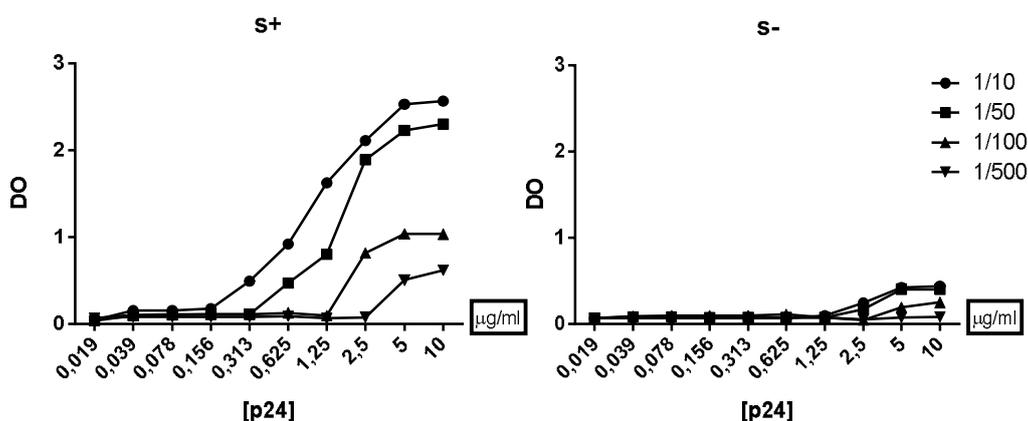


Figura 8. Puesta a punto del ELISA p24. Ambos sueros fueron testeados a los títulos 1/10, 1/50, 1/100, y 1/500 respectivamente, frente a concentraciones de sensibilización desde 10µg/mL hasta 0.019µg/mL. **A la izquierda** se exponen los resultados para el suero

verdaderamente positivo (S+); **a la derecha** para el suero verdaderamente negativo (S-).
Diseño de placa de acuerdo a **Tabla 4**.

Como se desprende de la Figura 8, con concentraciones de sensibilización menores a 5µg/mL de p24, la DO obtenida desciende para cualquier título utilizado. Siendo el último punto cercano a la saturación del sistema para el suero positivo (S+) en los títulos 1/10 y 1/50, pero sin determinar grandes valores de DO con el suero negativo (S-). Por tanto definimos trabajar con una concentración de 5µg/mL de p24 para la sensibilización. Con respecto a la dilución a utilizar para el primario, definimos trabajar con el título 1/50, dado que a la concentración de proteína elegida (5µg/mL) presenta niveles menores de DO si observamos el suero negativo.

En suma, con una concentración de sensibilización de 5µg/mL de p24 y un título de 1/50, obtenemos la mayor diferencia de DO entre ambos sueros negativo y positivo respectivamente. El suero positivo presenta valores de DO cercanos a la saturación del sistema, y a su vez el suero negativo presenta valores de DO cercanos al cero. Los valores de DO obtenidos en pocillos donde no se siembra el anticuerpo primario (suero bovino), pero sí se sensibiliza, bloquea y siembra el anticuerpo secundario, son cercanos a cero para todas las concentraciones de proteína (resultados no mostrados), con lo cual decimos que ni la solución de bloqueo ni el anticuerpo secundario interaccionan inespecíficamente con la proteína utilizada para sensibilizar la placa (p24).

Protocolo ELISA p24

De acuerdo a los resultados previos, el protocolo para ELISA p24 quedó definido de la siguiente manera:

La sensibilización se realiza ON a 4°C, utilizando la proteína p24 pura a una concentración de 5µg/mL en una solución de buffer bicarbonato 0,05M pH 9.6, 100µl por pocillo. Se realiza el bloqueo con 200µL de PBS-leche 3%-*tween* 0,2%, 2 horas a TA. Se testean los sueros a una dilución de 1/50 en PBS-leche 3%-*tween* 0,2%, se siembran 100µL por pocillo. Como anticuerpo secundario se utiliza un IgG anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1/10000. El revelado se realiza utilizando tetrametilbenzidina (TMB) 6 mg/mL, cortando la reacción luego de 12 min. con ácido sulfúrico 11%. La

lectura de la absorbancia se realiza mediante espectrofotómetro a 450nm. Para los lavados se utiliza PBS-0,2% *tween*.

Los valores de DO se expresan en función de la DO de un suero positivo conocido. En cada placa se siembra un mismo suero positivo conocido (normalizador), y los valores de DO son expresados en función de la DO de ese suero en cada placa. De este modo se disminuye la variabilidad interplaca. Para la realización de los análisis estadísticos subsiguientes siempre se trabajó con valores de DO normalizados.

Con el protocolo de ELISA p24 definido, se procedió al cálculo del punto de corte y valores de sensibilidad y especificidad de la técnica diagnóstica.

Análisis ROC. Cálculo de punto de corte.

El cálculo del punto de corte, se realizó mediante un análisis ROC. Para esto se seleccionó una población de 235 bovinos adultos. Como se dijo anteriormente, el estatus infectado para VLB no cuenta con un *gold standard* diagnóstico. Por lo tanto, para definir una población de bovinos verdaderos positivos y verdaderos negativos recurrimos al resultado de una prueba serológica validada (VMRD) y a otra que identifique al agente viral (técnica de PCR, protocolo de la OIE). Definimos como doble negativo o verdadero negativo a un bovino que haya resultado negativo para ambas técnicas. De forma análoga, definimos como doble positivo o verdadero positivo a un bovino positivo para VMRD y para la técnica de PCR.

De los 235 bovinos adultos seleccionados para el análisis ROC, 101 correspondían al grupo de los doble positivos y 134 al grupo de los doble negativos. Concomitantemente todos los bovinos pertenecientes a la población seleccionada fueron testeados con nuestro ELISA p24 de acuerdo al protocolo puesto a punto anteriormente (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del ELISA p24 en la población de bovinos utilizados para realización análisis ROC. Dp: bovinos positivos para la técnica de PCR y para VMRD. Dn: bovinos negativos para la técnica de PCR y para VMRD. Los resultados para ELISA p24, son los obtenidos utilizando como punto de corte una DO de 0.4344.

		Dp	Dn	total
ELISA p24	positivo	89	13	102
	negativo	12	121	133
total		101	134	235

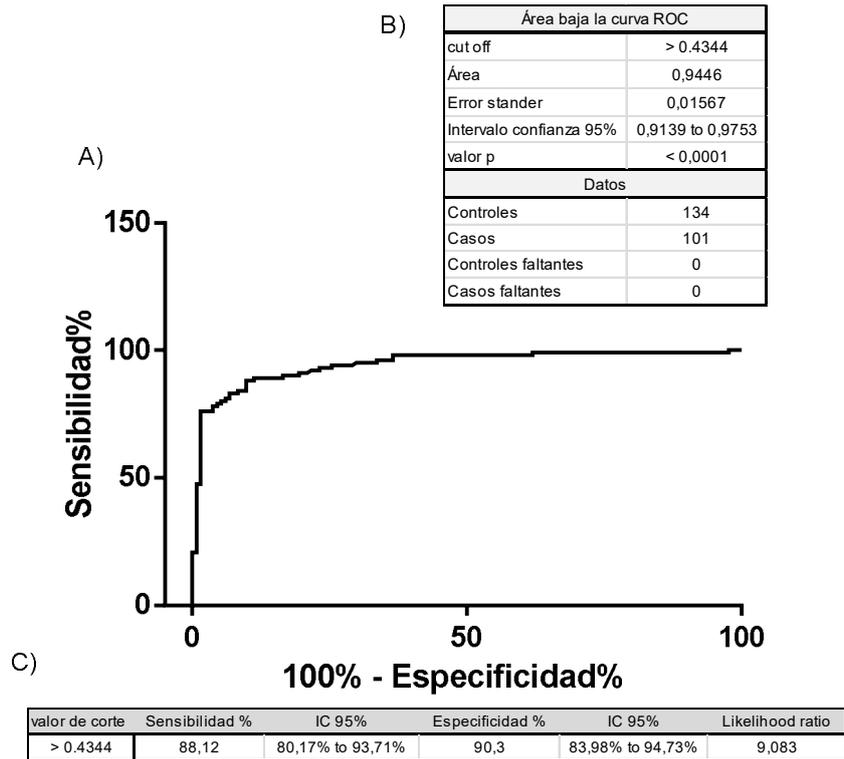


Figura 9. Análisis ROC para el ELISA p24. **A)** Curva ROC. **B)** Resultados análisis ROC. **C)** Se muestra el valor de corte seleccionado (0,4344) y sus respectivos valores de especificidad, sensibilidad y likelihood ratio.

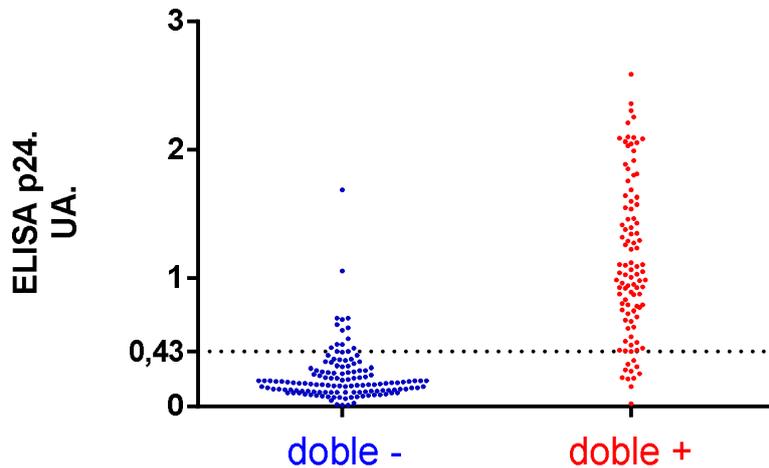


Figura 10. Resultados de DO para ELISA p24. En abscisas se encuentran agrupados los bovinos de acuerdo a la categoría doble negativo (bovino negativo para VMRD y técnica de PCR) y doble positivo (bovino positivo para VMRD y técnica de PCR). La DO en ordenadas se presenta en unidades arbitrarias (UA.) **N=235**

En suma, se realizó el análisis ROC, a una población de 235 bovinos adultos, los cuales fueron seleccionados y categorizados como verdaderos positivos y negativos en base a dos técnicas diagnósticas validadas por la OIE. Hecho esto, se seleccionó como punto de corte para nuestro ELISA p24 el valor de DO de 0,4344. La sensibilidad calculada fue de 88,12%, y la especificidad de 90,3%. El área bajo la curva ROC fue de 0.9446 (Tabla 5, Figuras 9 y 10).

Performance ELISA p24.

Luego de la puesta a punto y el cálculo del punto de corte, procedimos a valorar una población más amplia de bovinos. Se obtuvieron muestras de sueros bovinos procedentes de 5 establecimientos lecheros, cada muestra fue doblemente testada, tanto mediante el kit comercial (VMRD) como mediante nuestro ELISA p24. Como medida de performance de nuestro ELISA p24 frente a la técnica de referencia, se calculó el índice kappa.

La obtención de muestras se realizó como se describió en MyM. Ambos ELISAS se realizaron de acuerdo al protocolo del fabricante, y el protocolo descrito anteriormente. Durante la recolección de muestras, cada muestra fue identificada con un número interno o el número de caravana del sistema nacional de trazabilidad; a la hora de realizar tanto la técnica de VMRD como ELISA p24, el operador no conocía los resultados de la otra técnica. Luego se entrecruzaron los datos. Todas las muestras fueron testadas en el Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur Montevideo.

Fueron analizados un total de 952 muestras de suero provenientes de bovinos adultos (Tabla 6).

Tabla 6. ELISA p24 versus VMRD. Resultados de los 952 sueros bovinos analizados para cada método diagnóstico. N=952

	ELISA p24		total.
	positivo	negativo	
VMRD +	505	99	604 (63,4%)
VMRD -	44	304	348 (36,6%)
total.	549 (57,7%)	403 (42,3%)	952

Como se observa en la Tabla 6, del total de 952 bovinos testados: 604 (63.4%) resultaron positivos, mientras que 348 (36.6%) resultaron negativos para la técnica serológica de referencia (VMRD).

La prevalencia global en los cinco establecimientos analizados, es congruente con resultados y estimaciones previas.^{2,19-21} Para comparar los resultados obtenidos entre ambas técnicas serológicas, lo que se hizo fue calcular el índice kappa, se realizó a través del software PrismGraphpad.

Tabla 7. Índice Kappa, para la comparación entre ELISA p24 y VMRD. **N=952**

N° concordancias observadas.	809	84,4%
N° concordancias random esperadas.	495,6	52,06%
Índice Kappa	0,687	
ES kappa	0,024	
IC 95% kappa	0,640-0,734	
Nivel de concordancia	Buena.	

Como surge de la Tabla 7, el nivel de concordancia observado entre ambas técnicas serológicas fue “bueno”. Se obtuvieron un total de 809 concordancias, que representan un 84,4% del total de los resultados obtenidos. El nivel de concordancia esperable de forma aleatoria es de 52,02%, que corresponde a un total de 495,6 concordancias. El índice kappa obtenido es de 0,687, con un IC95% de 0,649-0,734 y un error estándar de 0,024. Podemos decir que nuestro ELISA indirecto anti rp24, con una sensibilidad calculada de 88.12% y especificidad calculada de 90.3% (Tabla 5, Figuras 9 y 10), perfomó de una forma comparable a un test serológico validado en una muestra amplia de bovinos procedentes de diferentes rodeos nacionales (Tabla 7).

En la Figura 11, se representan los 952 sueros analizados. En rojo aquellos bovinos positivos para VMRD, en azul aquellos bovinos negativos para VMRD; en ordenadas se grafica la DO obtenida para ELISA p24.

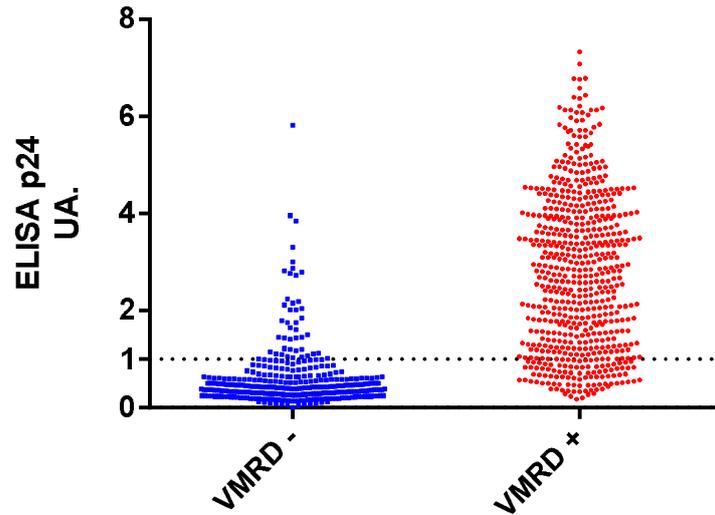


Figura 11. Sueros bovinos testeados por ambos métodos diagnósticos. En ordenadas se muestran los resultados para ELISA p24, se expresan los valores de DO normalizados por cut off. Con lo cual resultados mayores a 1 son positivos, y menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los sueros de acuerdo a su resultado para VMRD. Se muestran los resultados de los 952 sueros bovinos analizados para la evaluación de performance de ELISA p24. *UA: unidades arbitrarias. N=952

La evaluación de la performance en el terreno de nuestro ELISA p24 suero, es producto del relevamiento en 5 establecimientos lecheros nacionales, el tamaño de sus rodeos va desde 17 bovinos hasta 416 bovinos. Todos los bovinos evaluados son adultos (vaquillonas o terneros) que en su gran mayoría se encontraban en producción (se refiere a bovinos adultos que ya han tenido su primera parición y por tanto se encuentran expuestos a ordeño 2 veces por día); otros estaban en pre-producción (se refiere a bovinos adultos pero que aún no han entrado al ciclo productivo). Se evaluaron un total de 952 bovinos. De este conjunto de bovinos, no contamos con datos sanitarios, patronímicos o genealógicos exhaustivos. No sabemos exactamente cuántos de cada rodeo se encontraban produciendo, o cuantas lactadas tenía cada bovino analizado. De todas maneras podemos decir que todos los rodeos evaluados, provienen de tambos representativos de la realidad del sector lechero, con un mayor porcentaje de bovinos adultos y en producción, destacamos del mismo modo que las condiciones sanitarias son las habituales del sector y la realidad nacional. Destacamos especialmente estos últimos 2 puntos (composición etaria del rodeo, y estatus sanitario), dado que es justamente la población

objetivo a donde apunta el desarrollo de los kit's diagnósticos de ésta tesis. El objetivo es desarrollar y evaluar: Kit's diagnósticos que sean capaces de performar de forma comparable a un kit validado en el terreno, con una mezcla heterogénea de bovinos adultos provenientes de tambos dedicados a la producción lechera intensiva.

De la prevalencia de leucosis en cada tambo analizado, podemos decir que para el kit validado (VMRD) la prevalencia global fue de 63,4% (Tabla 8).

Tabla 8. Población de sueros bovinos analizados. Resultados para VMRD y ELISA p24, agrupados de acuerdo al tambo de procedencia. Resultados en valores absolutos, y porcentaje de positivos para cada técnica. N=952

Tambo	Sueros	VMRD			ELISA p24		
		Positivo	Negativo	Positivos (%)	Positivo	Negativo	Positivos (%)
Tambo 1	416	289	127	69,5	249	167	59,9
Tambo 2	207	132	75	63,8	123	84	59,4
Tambo 3	132	31	101	23,5	44	88	33,3
Tambo 4	180	136	44	75,6	120	60	66,7
Tambo 5	17	16	1	94,1	13	4	76,5
Total	952	604	348	63,4	549	403	57,8

En primera instancia vemos que la totalidad de los rodeos analizados presentan bovinos positivos para LBE. Con respecto a la prevalencia de LBE en cada tambo, la mayoría de los tambos relevados tienen una prevalencia global en el entorno de 60%, cercana a la media calculada (Tabla 8) y congruente con resultados y estimaciones previas.^{2,19-21} En los cinco tambos se obtienen resultados de congruencia entre ambas técnicas serológicas de acuerdo a lo mostrado previamente para la totalidad de los bovinos muestreados (Tabla 7).

Encontramos 2 tambos con prevalencias alejadas del promedio (Tambo 5 y Tambo 3). En el Tambo 5, de los 17 bovinos evaluados sólo uno fue negativo para VMRD (94.1% positivos) y 4 para ELISA p24 (76.5% positivos), dado el bajo número de bovinos evaluados en este tambo no es posible sacar conclusiones estadísticas. Durante el muestreo de tambos a relevar, se pretendió valorar específicamente un tambo de menos de 30 bovinos adultos, dado que representan un porcentaje importante del total de los tambos nacionales. No contamos con la distribución de edades del tambo, pero dado la menor escala del tambo, y la producción menos intensiva realizada en el

mismo, una de las posibles causas de la mayor prevalencia en este tambo podría ser la mayor longevidad de los bovinos del mismo. Como se dijo en la introducción, la longevidad de un rodeo se relaciona directamente con la prevalencia de leucosis.⁴⁸

El Tambo 3, presenta una prevalencia llamativamente menor (23,5% para VMRD y 33,3% para ELISA p24), la particularidad de este tambo es que es un tambo escuela. Se encuentra inserto en el sistema productivo, pero también es un tambo donde se forman oficios relacionados al sector lechero y ganadero. Con respecto a la longevidad de los bovinos del rodeo, no podemos decir que sea estadísticamente menor. Una posible explicación podría estar en el manejo más cuidadoso, y control de los factores de riesgos de transmisión horizontal. De todos modos la explicación es multicausal, como se dijo en la introducción del total de rodeos nacionales, es esperable una prevalencia alta, con la mayoría de rodeos con al menos algunos bovinos infectados pero con prevalencias que pueden ir desde muy bajas a muy altas, dependiendo de gran cantidad de factores no completamente comprendidos.

Por último destacamos, que el presente no representó un muestro exhaustivo que nos permita obtener datos de prevalencia extrapolables a nivel nacional o regional por fuera de los rodeos analizados. De todas maneras los porcentajes de bovinos positivos obtenidos en todos los rodeos analizados por ambos métodos diagnósticos, hablan de la carga de leucosis que presentan los rodeos nacionales.

Discusión.

Con respecto al cumplimiento del objetivo específico 1, se logró poner a punto un ELISA indirecto para diagnóstico de VLB a partir de muestras de suero utilizando la proteína recombinante p24. (Tabla 4, Figura 8). Luego de la puesta a punto, mediante la selección de una población de bovinos definidos como verdaderos positivos y verdaderos negativos, se procedió a realizar un análisis ROC para definir el punto de corte de nuestro ELISA p24. Del análisis ROC surge la elección de 0,4344 como punto de corte, es decir el valor de DO a partir del cual un resultado se considera positivo. La sensibilidad y especificidad calculada para este punto de corte resultó 88,12% y 90,3% respectivamente (Tabla 5, Figuras 9 y 10).

Luego de definido el punto de corte para nuestra técnica diagnóstica, se procedió a evaluar un número más amplio de bovinos. Se logró evaluar un total de 952 bovinos adultos provenientes de 5 tambos nacionales, conformando una mezcla heterogénea y representativa de la realidad nacional del sector lechero (Tabla 8). De cada muestra de suero bovino se obtuvieron resultados de VMRD y ELISA p24. Se calculó el índice kappa, obteniéndose un valor de 0,687 que corresponde a una congruencia definida como buena (Tabla 6 y 7, Figura 11).

El índice kappa obtenido se encuentra dentro de lo esperado, teniendo en cuenta que el kit de referencia busca la presencia de anticuerpos anti gp51, mientras que nuestro ELISA p24 detecta anticuerpos anti p24. La proteína viral gp51 es mucho más inmunógena, generadora de una respuesta de anticuerpos de mayor título y más constante en la historia natural de la infección por VLB.^{2,48} De todas maneras nuestros valores de sensibilidad y especificidad son aceptablemente buenos, y comparables al kit de referencia con las limitaciones mencionadas. Por tanto, es esperable que del total de positivos identificados por la técnica serológica que reconoce anticuerpos anti gp51, un porcentaje no sean identificados como positivos por la técnica serológica que reconoce anticuerpos anti p24.

Otro aspecto que no se puede menospreciar, es el hecho de que el kit de referencia utilizado no representa un *gold standard* para el diagnóstico de la infección. Para determinar la performance real de nuestro ELISA indirecto, debemos asumir el estatus infectado como un elemento multiparamétrico que no se puede describir exclusivamente por el kit comercial mencionado. La realización de nuestro ELISA p24 incluye la sensibilización con la proteína p24, producida como se mencionó en un sistema de E.Coli, y purificada con un alto grado de pureza.

Por tanto, hemos sido capaces de poner a punto un ELISA indirecto para muestras de suero bovino utilizando para la sensibilización una proteína viral con un alto grado de pureza, que performa de forma comparable al kit de referencia. Queda planteada la interrogante de si nuestro ELISA diagnóstico anti p24 es capaz de identificar bovinos infectados que presenten una respuesta de anticuerpos anti p24, pero no anti gp51, y si de constatarse esto,

resulta relevante en la historia natural de la infección y para su diagnóstico. Analizaremos este punto más adelante.

ELISA indirecto anti ecto-ENV.

Durante el desarrollo de esta tesis fue posible poner a punto y evaluar un ELISA indirecto capaz de reconocer anticuerpos anti ecto-ENV, tanto en muestras provenientes de suero como leche bovinas, de acuerdo con los objetivos específicos 2 y 3.

La ventaja de éste ELISA frente al presentado anteriormente (ELISA p24), es que al utilizar la proteína ecto-ENV para la sensibilización, es capaz de poner en evidencia la presencia de anticuerpos específicos anti gp51. La respuesta de anticuerpos anti gp51 durante la historia natural de la infección es más precoz, constante y robusta, por lo que es *a priori* más interesante para el desarrollo de un kit diagnóstico para leucosis.^{2,8}

Muchos de los kits diagnósticos validados, entre ellos VMRD, reconocen anticuerpos anti gp51 (Figura 3, Tabla 3). Sin embargo, muy pocos aclaran la naturaleza del antígeno utilizado para sensibilizar o su grado de pureza. Nuestro antígeno, como se aclaró anteriormente, es producido en un sistema eucariota con alto grado de pureza.

Producción de ecto-ENV.

A partir del cultivo de la línea celular S2, se cosechó el sobrenadante conteniendo la proteína de interés soluble, para realizar la purificación de la misma mediante cromatografía de afinidad.

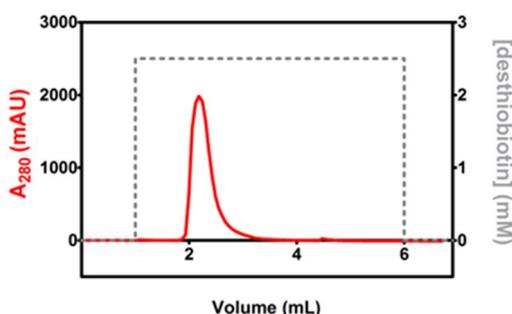


Figura 12. Cromatografía de afinidad, utilizando columna StrepTrap HP de 1 mL (GE HealthcareLife).

De la figura 12, surge la obtención de un pico único de absorbancia a un volumen de 2ml. Se obtuvieron aproximadamente 7mg/L de cultivo.

Posteriormente, las fracciones correspondientes al sobrenadante crudo, *flowthrough*, lavados y eluato se recuperaron y corrieron en geles de poliacrilamida al 12% conteniendo SDS, siendo revelados con coomasie.

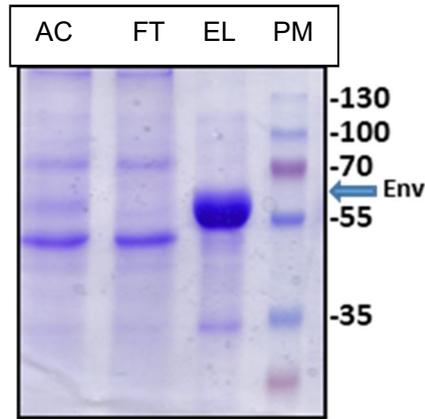


Figura 13. SDS-PAGE-coomasie. Se sembraron de izquierda a derecha: sobrenadante crudo (AC), *flow through* (FT) y eluato (EL) de cromatografía de afinidad.

Se observa en la Figura 13, en el carril correspondiente al eluato obtenido de la la cromatografía de afinidad, una banda de 55kDa. Tamaño esperado para ectoENV. La proteína obtenida tiene baja concentración de contaminantes.

En suma, de acuerdo al protocolo desarrollado previamente, fue posible obtener una proteína recombinante con un alto grado de pureza, insumo que nos permitió desarrollar los posteriores experimentos de la presente tesis.

Puesta a punto de ELISA indirecto anti ectoENV en suero (ectoENV-S).

Se partió de un protocolo inicial similar al utilizado para el ELISA p24. De forma análoga, las dos variables a poner a punto eran: la sensibilización utilizando la proteína recombinante ecto-ENV pura, en una dilución a definir; y el título de los sueros primarios a utilizar.

Con este fin se utilizaron 2 sueros bovinos, uno verdaderamente positivo (positivo para VMRD y para la técnica de PCR) y otro verdaderamente negativo (negativo para VMRD y técnica de PCR), para la construcción de la siguiente placa (Tabla 9).

Tabla 9. Diseño de placa de ELISA, para puesta a punto de ectoENV-S. Ambos sueros, “verdaderamente” positivo (S+) y “verdaderamente” negativo (S-) fueron sembrados a los siguientes títulos: 1/10, 1/50, 1/100, y 1/500 respectivamente. A su vez la proteína ecto-ENV fue utilizada a las siguientes concentraciones de sensibilización: 4µg/mL, 3µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL, 0,625µg/mL, 0,3125µg/mL, 0,078µg/mL, 0,039µg/mL, 0,019µg/mL.

		Concentraciones de sensibilización, *µg/ml									
		Título.	4*	3*	2,5*	1,25*	0,625*	0,3125*	0,078*	0,039*	0,019*
S+	1/10										
	1/50										
	1/100										
	1/500										
S-	1/10										
	1/50										
	1/100										
	1/500										

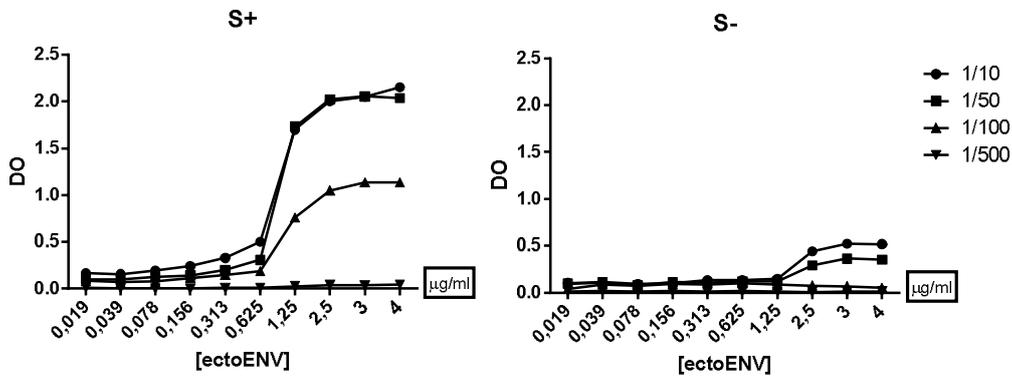


Figura 14. Puesta a punto ectoENV-S. Ambos sueros fueron testeados a los títulos 1/10, 1/50, 1/100, y 1/500 respectivamente, frente a concentraciones de sensibilización desde 4µg/mL hasta 0.019µg/mL. **A Izquierda)** resultados para el suero verdaderamente positivo (S+); **A Derecha)** para el suero verdaderamente negativo (S-). Diseño placa de acuerdo a **Tabla 9**.

Como surge de la Figura 14, para concentraciones de sensibilización menores a 2.5µg/mL, la DO obtenida desciende para cualquier título utilizado. Siendo éste el último punto cercano a la saturación del sistema para el suero positivo en los títulos 1/10 y 1/50, pero sin determinar grandes valores de DO con el suero negativo. Por tanto, definimos trabajar con una concentración de 2.5µg/mL de ecto-ENV para la sensibilización. Con respecto a la dilución de suero, definimos trabajar con el título 1/50 dado que a la concentración de proteína elegida presenta niveles menores de DO si observamos el suero negativo (Figura 14).

En suma, para el ELISA ectoENV-S con una concentración de sensibilización de 2.5µg/mL de ecto-ENV y un título de 1/50 de los sueros, obtenemos la mayor diferencia de DO entre los sueros negativo y positivo. Mientras el suero positivo presenta valores de DO cercanos a la saturación del sistema, el suero negativo presenta valores de DO cercanos a cero. Los valores de DO obtenidos en pocillos donde no se siembra el anticuerpo primario (suero bovino), pero si se bloquea y se siembra el anticuerpo secundario, son cercanos a cero para todas las concentraciones de proteína (resultados no mostrados). Con lo cual decimos que ni la solución de bloqueo ni el anticuerpo secundario interaccionan inespecíficamente con la proteína utilizada para sensibilizar la placa (ecto-ENV).

Protocolo ectoENV-S.

De acuerdo a los resultados previos, el protocolo para el ELISA ectoENV-S quedó definido de la siguiente manera: la sensibilización se realiza ON a 4°C, utilizando la proteína recombinante ecto-ENV pura a una concentración de 2,5µg/mL en una solución de buffer bicarbonato 0,05M pH 9.6, 100µl por pocillo. Se realiza el bloqueo con 200µl de PBS-leche 3%-*tween* 0,2%, 2 horas a TA. Se testean los sueros a una dilución de 1/50 en PBS-leche 3%-*tween* 0,2%, se siembran 100µl por pocillo. Como anticuerpo secundario se utiliza un IgG anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1/10000. El revelado se realiza utilizando tetrametilbenzidina (TMB) 6 mg/mL, cortando la reacción luego de 12 min. con ácido sulfúrico 11%. La lectura de la absorbancia se realiza mediante espectrofotómetro a 450nm. Para los lavados se utiliza PBS-0,2% *tween*. En cada placa se testeó un mismo suero positivo conocido (normalizador), y los valores de DO fueron expresados en función de la DO de ese suero. De este modo se disminuye la variabilidad inter-placa.

Con el protocolo de ectoENV-S definido, se procedió al cálculo del punto de corte y de valores de sensibilidad y especificidad de la técnica diagnóstica.

Análisis ROC. Cálculo del punto de corte.

El cálculo del punto de corte se realizó mediante un análisis ROC en una población seleccionada, de forma análoga a como se hizo para ELISA p24, utilizando la misma población de bovinos.

De los 236 bovinos adultos seleccionados para el análisis ROC, 102 correspondían al grupo de los doble positivos y 134 al grupo de los doble negativos. Concomitantemente todos los bovinos pertenecientes a la población seleccionada fueron testeados con nuestro ELISA ectoENV-S (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados del ELISA ectoENV-S en la población de bovinos utilizados para realización análisis ROC. **Dp:** bovinos positivos para la técnica de PCR y para VMRD. **Dn:** bovinos negativos para la técnica de PCR y para VMRD. Los resultados para ELISA ectoENV-S son los obtenidos utilizando como punto de corte una DO de 0,4965.

		Dp	Dn	total
ectoENV-S	positivo	102	3	106
	negativo	0	131	131
	total	102	134	236

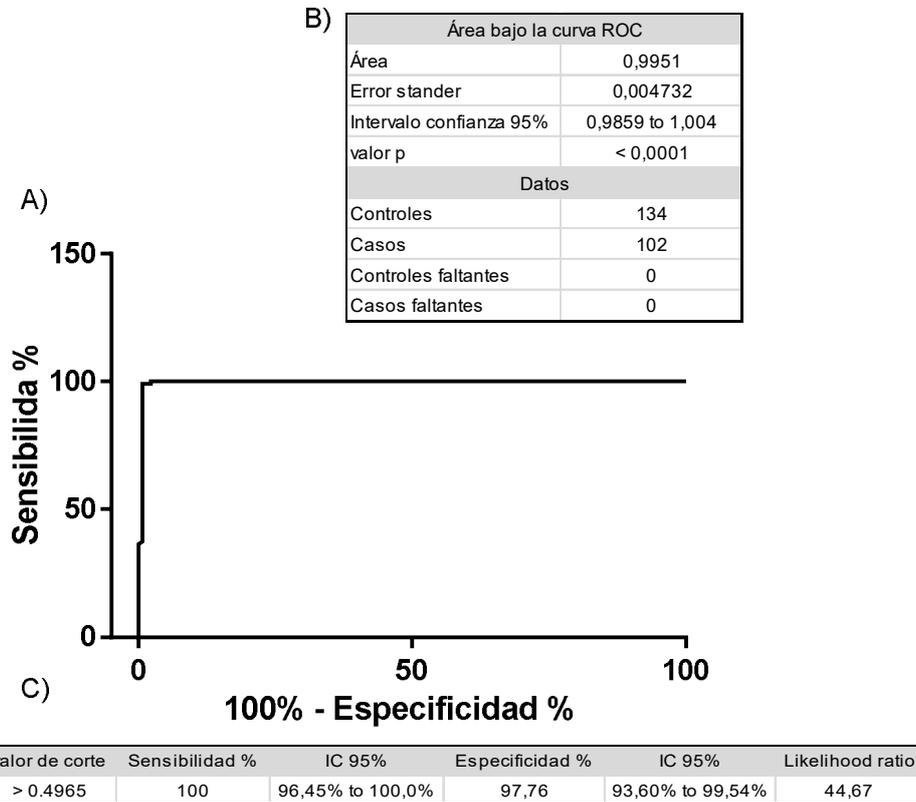


Figura 15. Análisis ROC, para ELISA ectoENV-S. **A)** Curva ROC. **B)** Resultados del análisis ROC. **C)** Se muestra el valor de corte seleccionado (0,4965) y sus respectivos valores de especificidad, sensibilidad y likelihood ratio.

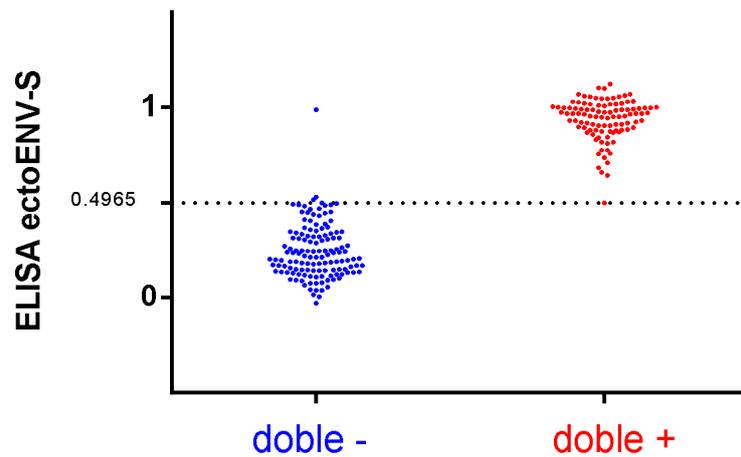


Figura 16. Resultados del ELISA ectoENV-S. En abscisas se encuentran agrupados los bovinos de acuerdo a la categoría doble negativo (bovino negativo para VMRD y técnica de PCR) y doble positivo (bovino positivo para VMRD y técnica de PCR). La DO en ordenadas se presenta en unidades arbitrarias (UA.) **N=236**

En suma, se realizó el análisis ROC a una población de 236 bovinos adultos, los cuales fueron seleccionados y categorizados como verdaderos positivos y negativos en base a dos técnicas diagnósticas validadas por la OIE. Hecho esto, se seleccionó como punto de corte para nuestro ELISA ectoENV-S el valor de DO de 0,4965. La sensibilidad calculada fue de 100% y la especificidad de 97,76%. El área bajo la curva ROC fue de 0,9951 (Tabla 10, Figuras 15 y 16).

Performance ectoENV-S.

Luego de puesto a punto, se procedió a evaluar la performance del ELISA ectoENV-S frente al kit comercial validado (VMRD). Se siguió el mismo esquema que para ELISA p24, con la salvedad que el número de muestras relevadas fue mayor.

Todas las muestras obtenidas fueron doblemente testeadas (VMRD y ELISA ectoENV-S). Fueron analizados un total de 1781 sueros bovinos provenientes de 7 establecimientos lecheros nacionales. Se compararon los resultados del kit comercial mencionado con los obtenidos con nuestro ELISA ectoENV-S. El análisis de performance se realizó mediante el cálculo del índice kappa. Destacamos que la población de 952 sueros utilizada en la evaluación del

ELISA p24 (Tabla 6) forma parte de ésta población más amplia de bovinos aquí evaluada (Tabla 11).

Tabla 11. ELISA ectoENV-S versus VMRD. Resultados de los 1781 sueros bovinos analizados, para cada método diagnóstico. **N=1781**

	ectoENV-S		total.
	positivo	negativo	
VMRD +	850	51	901(50,6%)
VMRD -	40	840	880(49,4%)
total.	890(50%)	891(50%)	1781

Como surge de la Tabla 11, del total de 1781 bovinos testeados 901 (50.6%) resultaron positivos, mientras que 880 (49.4%) resultaron negativos para la técnica de referencia (Tabla 11). La prevalencia global en los siete establecimientos analizados es congruente con resultados y estimaciones previas.^{2,19-21}

Para comparar los resultados obtenidos entre ambas técnicas serológicas, calculamos el índice kappa.

Tabla 12. Índice Kappa para la comparación entre ELISA ectoENV-S y VMRD. **N=1781**

N° concordancias observadas.	1690	94,89%
N° concordancias random esperadas.	890,5	50%
Índice Kappa	0,898	
ES kappa	0,01	
IC 95% kappa	0,877-0,918	
Nivel de concordancia	Muy buena.	

Como surge de la Tabla 12, el nivel de concordancia observado entre ambas técnicas serológicas fue “muy bueno”. Se obtuvieron un total de 1690 concordancias que representan un 94,89% del total de los resultados obtenidos. El nivel de concordancia esperable de forma aleatoria es de 50%, que corresponde a un total de 890,5 concordancias. El índice kappa obtenido es de 0,898 con un IC95% de 0,877-0,918 y un error estándar de 0,01 (Tabla 12). Podemos decir que nuestro ELISA ectoENV-S, con una sensibilidad calculada de 100% y especificidad calculada de 97,76% (Tabla 10, Figuras 15 y

16), se comportó de una forma comparable a un test serológico validado en una muestra amplia de bovinos procedentes de diferentes rodeos nacionales. En la figura 17 se representan los 1781 sueros analizados. En rojo aquellos bovinos positivos para VMRD y en azul aquellos bovinos negativos para VMRD; en ordenadas se grafica la DO obtenida para ectoENV-S.

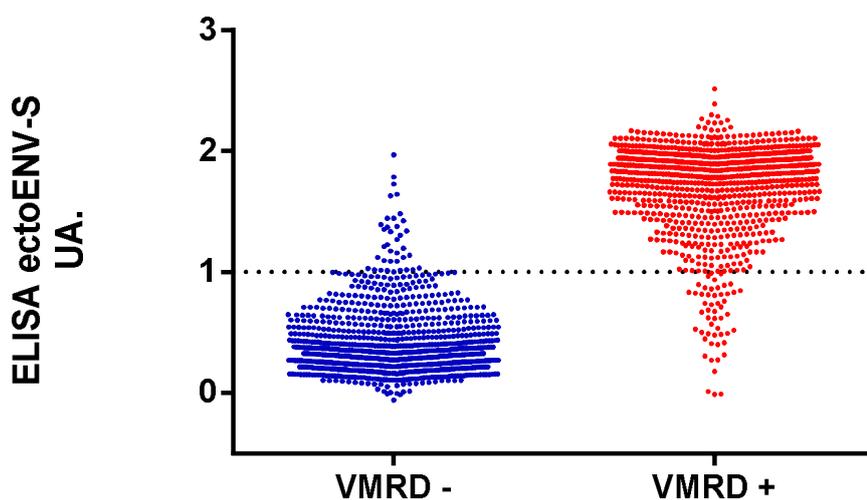


Figura 17. Sueros bovinos testeados por ambos métodos diagnósticos (VMRD y ELISA ectoENV-S). En ordenadas se muestran los resultados para ELISA ectoENV-S (valores de DO normalizados por cut off, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos y menores a 1 negativos). En abscisas se agrupan los sueros de acuerdo a sus resultados para VMRD. Se muestran los resultados de los 1781 sueros bovinos analizados para la evaluación de performance de ectoENV-S. *UA: unidades arbitrarias N=1781.

Como se dijo, para esta instancia fueron relevados 7 establecimientos lecheros nacionales, siendo el tamaño de sus rodeos de 17 a 471 bovinos. Los criterios generales para la elección de los establecimientos fueron los mismos a los anteriormente descritos para el ELISA p24, pero en esta oportunidad se agregaron 2 establecimientos con la finalidad de incrementar el número de bovinos a evaluar para obtener mayor robustez estadística. Se agregaron los siguientes establecimientos: Tambo 7, un establecimiento productivo del sector privado con un alto índice de industrialización; y Tambo 6 un tambo modelo productivo y experimental. De este modo se amplió la muestra a evaluar en 829 bovinos, con 2 tambos de más de 300 animales en cada uno. (Tabla 13).

Un aspecto distintivo de Tambo 6 es que, dado que es un tambo modelo y experimental, contamos con registros sanitarios, patronímicos y genealógicos

de los bovinos evaluados, información de la que no disponemos en los otros tambos evaluados. Esta información adicional no es imprescindible para el análisis que realizamos aquí, pero será relevante en etapas subsiguientes del desarrollo de la tesis.

Tabla 13. Población de sueros bovinos analizados. Resultados para VMRD y ectoENV-S agrupados de acuerdo al tambo de procedencia. Se expresan valores absolutos y porcentaje de positivos para cada técnica. N=1781

Tambo	Sueros	VMRD			ectoENV-S		
		Positivo	Negativo	Positivos (%)	Positivo	Negativo	Positivos (%)
Tambo 1	416	289	127	69,5	283	133	68
Tambo 2	207	132	75	63,8	121	86	58,5
Tambo 3	132	31	101	23,5	39	93	29,5
Tambo 4	180	136	44	75,5	128	52	71,1
Tambo 5	17	16	1	94,1	14	3	82,4
Tambo 6	471	120	351	25,5	121	350	25,7
Tambo 7	358	177	181	49,4	184	174	51,4
Total	1781	901	880	50,6	890	891	50%

En cuanto a la prevalencia de leucosis podemos decir que para el kit validado (VMRD) la prevalencia global fue de 50,6%. (Tabla 11). Si realizamos el análisis de qué ocurrió en cada tambo individual (Tabla 13), para los tambos ya analizados los resultados de prevalencia son los mismos (Tabla 8: Tambos 1 a 5, ver performance ELISA p24).

Destacamos que en todos los tambos evaluados, la concordancia entre VMRD y ELISA ectoENV-S fue muy buena, de acuerdo a los resultados globales (Tabla 13).

El Tambo 7 presenta una prevalencia de 49,4%, similar a la prevalencia global, y sobre todo similar a los demás tambos. Del análisis de prevalencias de los diferentes tambos, hay tres tambos que se alejan de la media y de los resultados esperados. El caso de los Tambos 3 y 5 ya fue analizado (Tabla 8, ver performance ELISA p24). Otro tambo con una prevalencia llamativamente baja es el Tambo 6, como se dijo un tambo modelo experimental pero también productivo, gestionado por un instituto de investigación agropecuaria nacional. Su prevalencia global fue de 25,5%, similar a la obtenida para el otro tambo escuela (Tambo 3). De la población del Tambo 6 sabemos que se compone de

un 40% de bovinos jóvenes que aún no hay entrado al ciclo de ordeño diario. Esta subpoblación es habitual que presente una prevalencia menor a la población expuesta a ordeño diario y más añosa.^{48,68,149} Como se dijo anteriormente, no conocemos la composición demográfica del Tambo 3. La menor prevalencia de leucosis en ambos tambos escuela seguramente tiene una explicación multicausal, pero podría decirse que dado su condición de tambo modelo se tiene mayor cuidado en cuanto a las prácticas de manejo veterinario que tienden a disminuir la prevalencia de infección por el VLB en el rodeo, sumado tal vez a una población de bovinos menos añosa. No parece causal que del total de rodeos evaluados ambos tambos escuela presenten la menor prevalencia global.

Discusión.

Con respecto al cumplimiento del objetivo específico 2, en primera instancia se logró poner a punto el ELISA ectoENV-S (Tabla 9 y Figura 14). Posteriormente, análisis ROC mediante, se seleccionó el valor de DO de 0,4965 como punto de corte. La sensibilidad calculada fue de 100% y la especificidad de 97,76%. El área bajo la curva ROC fue de 0.9951 (Tabla 10, Figuras 15 y 16).

Luego se procedió a evaluar su performance frente a una técnica serológica validada. Como indicador de performance se utilizó el índice kappa. Se analizaron 1781 bovinos provenientes de 7 rodeos diferentes, representativos de la industria lechera nacional, incluyendo bovinos en producción de edades diversas y bovinos en pre producción. El índice kappa obtenido fue de 0,898 con un IC95% de 0,877-0,918 y un error estándar de 0,01 (Tabla 11-13 y Figura 17). Por tanto, decimos que hemos sido capaces de desarrollar y poner a punto un ELISA indirecto capaz de diagnosticar LBE a partir de muestras de suero, con valores de congruencia comparables a una técnica serológica de referencia.

Teniendo en cuenta las limitaciones de la comparación, dado que el kit comercial no representa un *gold standard* y sabiendo que no se conocen sus valores de sensibilidad y especificidad, las discrepancias en los resultados podrían explicarse por limitaciones relacionadas a estos aspectos. De todos modos, como se dijo este kit comercial se utilizó como parámetro frente al cual se pretendía performar al menos de forma comparable, dado que el mismo es ampliamente utilizado a nivel mundial, habiéndose impuesto como referencia

diagnóstica en el mercado dado su confiabilidad en el terreno, no especialmente por grandes análisis poblacionales de su especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivos y negativos. Creemos que este objetivo específico fue cumplido, habiendo sido capaces de desarrollar en nuestro laboratorio un test de ELISA indirecto útil para el diagnóstico en suero bovino, con aceptables valores de sensibilidad y especificidad, a un costo mucho menor que el kit de referencia, y utilizando un antígeno puro producido en un sistema eucariota.

Destacamos igualmente la presencia de leucosis en todos los rodeos nacionales evaluados, con una prevalencia media de 49,4%. (Tabla 13). Estos valores de prevalencia son similares a reportes previos. Resulta especialmente interesante el hecho de que los dos tambos escuela evaluados presenten una menor prevalencia, hecho que resalta la importancia del manejo veterinario como uno de los determinantes de la misma.⁶⁸

Puesta a punto de ELISA indirecto anti ectoENV, en leche (ectoENV-L).

Luego de la puesta a punto de ecto ENV-S y su evaluación en el terreno, nos planteamos la interrogante de si éramos capaces de recrear los mismos resultados pero a partir de muestras de leche. Como se expresa en la introducción^{2,8,48}, la leche es una muestra mucho más propicia para llevar a cabo programas de diagnóstico y control de la leucosis en rodeos lecheros. Por tanto, contar con una herramienta capaz de diagnosticar de forma confiable y efectiva la LBE a partir de muestras de leche resulta de gran utilidad. En ese sentido, y de acuerdo con el objetivo específico 3, comenzamos con la puesta a punto y evaluación posterior de un ELISA indirecto a partir de muestras de leche.

Para esto se partió del protocolo utilizado para la puesta a punto de ENV-S, debiéndose determinar las 2 variables fundamentales del sistema: con qué concentración de proteína sensibilizar y qué dilución de leche utilizar.

Se utilizaron 2 muestras de leche, una verdaderamente positiva (positiva para VMRD y para la técnica de PCR) y otra verdaderamente negativa (negativo para VMRD y técnica de PCR). Se diseñó la placa que se muestra en la Tabla 14.

Debemos destacar que las muestras utilizadas provenían de bovinos considerados verdaderamente negativo y positivo, dado que tanto VMRD como la técnica de PCR a partir de células somáticas de sangre periférica, certifican la presencia de anticuerpos anti gp51 y ADN proviral respectivamente en el torrente sanguíneo del bovino; y no la presencia de anticuerpos en la leche del mismo. Sin embargo, dado que existen muy pocos kit diagnósticos validados a partir de muestras de leche, sumado a la robustez y mayor uso que presenta el diagnóstico a partir de suero o la propia identificación del ADN proviral², nos pareció importante poner a punto la técnica en estas condiciones. Otro aspecto subjetivo pero no menor, es el hecho de la confianza instalada en el sector productivo que tiene el diagnóstico a partir de muestras de suero, y especialmente a partir de kits comerciales como VMRD. Por tanto para convencer al sector productivo de la utilidad de nuestro ELISA diagnóstico en leche, no pareció determinante testarlo frente a test serológicos. Las muestras utilizadas fueron las mismas que para la puesta a punto del ELISA ectoENV-S (Tabla 9).

Tabla 14. Diseño de placa de ELISA, para puesta a punto de ELISA ectoENV-L. Ambas muestras de leche, provenientes de bovinos “verdaderamente” positivo (S+) y “verdaderamente” negativo (S-), fueron sembradas a las siguientes diluciones: 1/1, 1/10, 1/20, y 1/40 respectivamente. A su vez, la proteína recombinante ectoENV fue utilizada a las siguientes concentraciones de sensibilización: 4µg/mL, 3µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL, 0,625µg/mL, 0,3125µg/mL, 0,078µg/mL, 0,039µg/mL, 0,019µg/mL.

		Concentraciones de sensibilización, *ug/ml								
Título.		4*	3*	2,5*	1,25*	0,625*	0,3125*	0,078*	0,039*	0,019*
S+	1									
	1/10									
	1/50									
	1/100									
S-	1									
	1/10									
	1/50									
	1/100									

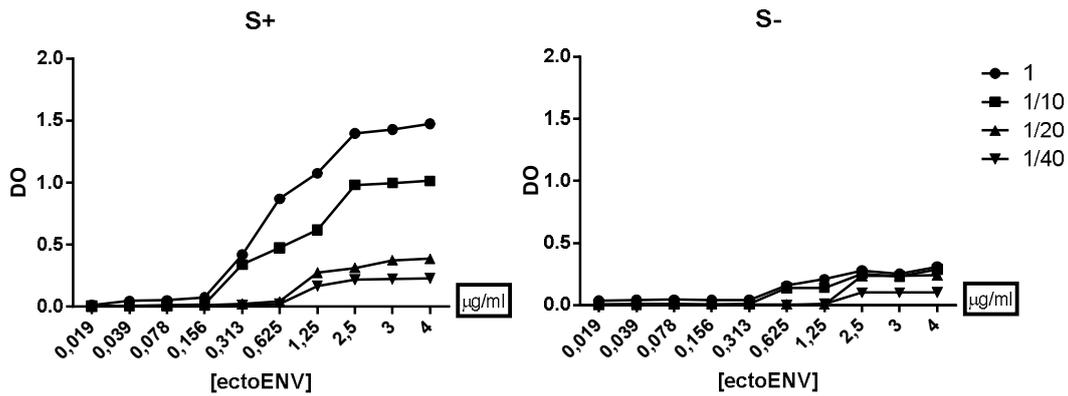


Figura 18. Puesta a punto de ELISA ectoENV-L. Ambas muestras de leche fueron testeadas a las siguientes concentraciones 1/1; 1/10, 1/20 y 1/40 respectivamente, frente a concentraciones de sensibilización desde 4µg/mL hasta 0.019µg/mL. **A izquierda**) Resultados obtenidos a partir de muestra de leche de bovino “verdaderamente” positivo (S+). **A derecha**) Resultados obtenidos a partir de muestra de leche de bovino “verdaderamente” negativo (S-).

Como surge de la Figura 18, para concentraciones de sensibilización menores a 2.5µg/mL la DO cae para cualquier dilución de primario utilizada, al igual que lo que ocurrió para ectoENV-S (Figura 14). Por tanto, parece claro que la concentración de sensibilización más adecuada es 2.5µg/mL. Otro aspecto a favor de utilizar ésta concentración de sensibilización es que, pensando en un eventual kit diagnóstico comercial, nos permite ofrecer un sistema en el cual una misma placa (sensibilizada con 2.5µg/mL de ectoENV) sea capaz de adaptarse a testear tanto muestras de suero como de leche. Por tanto, teniendo en cuenta las ventajas logísticas que señalamos, nos decidimos a trabajar con una concentración de 2.5µg/ml de ectoENV para la sensibilización. Con respecto a la dilución a utilizar, dado la mayor facilidad que conlleva no diluir la muestra, sumado a que diluirla hace caer la DO para la muestra proveniente del bovino positivo, optamos por elegir la condición con la muestra de leche no diluida. Teniendo en cuenta además que esta condición no genera valores de DO altos cuando se testea la muestra proveniente del bovino negativo (Figura 18).

En suma, con una concentración de sensibilización de 2.5µg/ml de ectoENV y utilizando la muestra de leche sin diluir previo centrifugación por 10min a 4°C y 10.000rpm, obtenemos la mayor diferencia de DO entre ambas muestras de leche provenientes de los bovinos positivo y negativo respectivamente. La

muestra de leche positiva presenta valores de DO cercanos a la saturación del sistema, y a su vez la negativa presenta valores de DO cercanos al cero. Nuevamente destacamos que los valores de DO obtenidos en pocillos donde no se siembra el primario (muestra de leche), pero sí se sensibiliza, bloquea y se siembra el anticuerpo secundario, son cercanos a cero para todas las concentraciones de sensibilización (resultados no mostrados), con lo cual decimos que ni la solución de bloqueo ni el anticuerpo secundario interaccionan inespecíficamente con la proteína utilizada para sensibilizar la placa (ectoENV).

Protocolo ectoENV-L.

De acuerdo a los resultados previos, el protocolo para ELISA ectoENV-L quedó definido de la siguiente manera: la sensibilización se realiza O.N. a 4°C, utilizando la proteína recombinante ectoENV pura a una concentración de 2,5µg/mL en una solución de buffer bicarbonato 0,05M pH 9.6, 100µL por pocillo. Se realiza el bloqueo con 200µL de PBS-leche 3%-*tween* 0,2%, 2 horas a T.A. Las muestras de leche se testean sin diluir luego de una centrifugación de 10min a 4° y 10.000rpm, sembrándose 100µL por pocillo. Como anticuerpo secundario se utiliza un IgG anti bovino conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1/10000. El revelado se hace utilizando tetrametilbenzidina (TMB) 6 mg/mL, deteniendo la reacción luego de 12 min. con ácido sulfúrico 11%. La lectura de la absorbancia se realiza mediante espectrofotómetro a 450nm. Para los lavados se utilizó PBS-0,2% *tween*. Los valores de DO obtenidos se normalizaron por el valor de DO obtenido en cada placa de un suero positivo conocido (normalizador).

Análisis ROC. Cálculo del punto de corte

Se realizó de forma análoga al ELISA p24 suero y ELISA ectoENV-S. La población de verdaderos positivos y negativos seleccionada fue de 214 bovinos adultos, de los cuales 122 eran negativos para VMRD y la técnica de PCR, mientras que 92 eran positivos para VMRD y la técnica de PCR (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados del ELISA ectoENV-L en la población de bovinos utilizados para realización análisis ROC. **Dp**: bovinos positivos para la técnica de PCR y para VMRD. **Dn**: bovinos negativos para la técnica de PCR y para VMRD. Los resultados para ELISA ectoENV-L son los obtenidos utilizando como punto de corte una DO de 0,4587.

		Dp	Dn	total
ectoENV-L	positivo	89	1	90
	negativo	3	121	124
	total	92	122	214

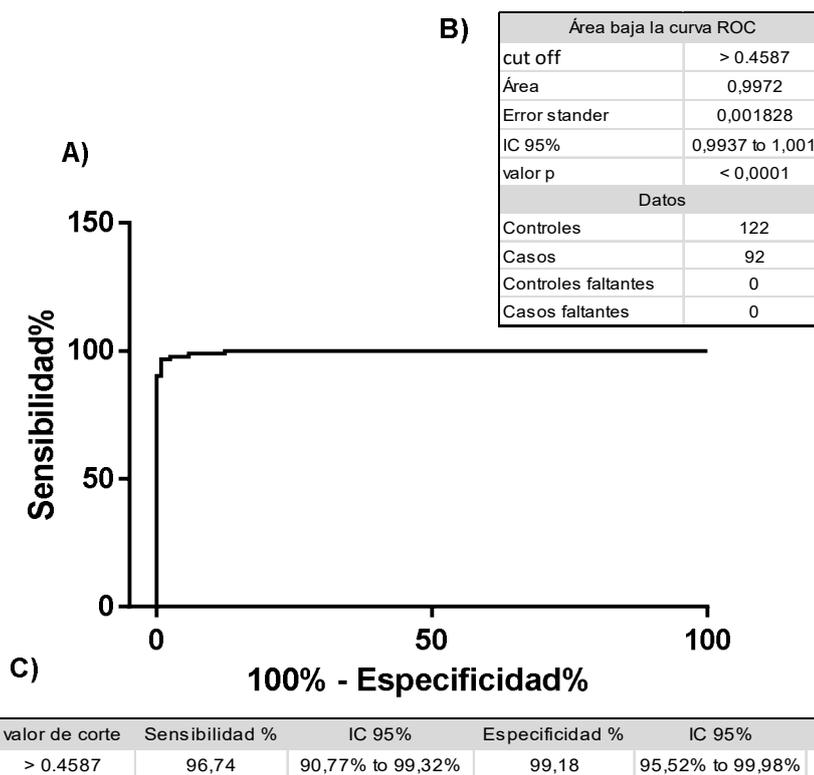


Figura 19. Análisis ROC, para ELISA ectoENV-L. **A)** Curva ROC. **B)** Resultados del análisis ROC. **C)** Se muestra el valor de corte seleccionado (0,4587) y sus respectivos valores de especificidad, sensibilidad y likelihood ratio.

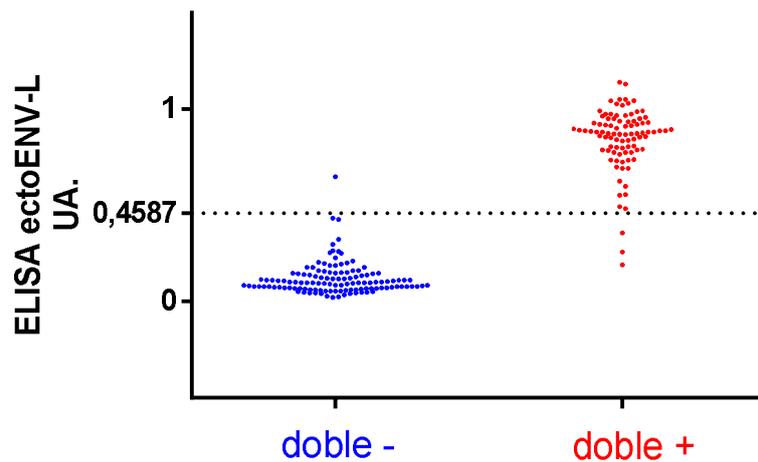


Figura 20. Resultados del ELISA ectoENV-L. En abscisas se encuentran agrupados los bovinos de acuerdo a la categoría doble negativo (bovino negativo para VMRD y técnica de PCR) y doble positivo (bovino positivo para VMRD y técnica de PCR). La DO en ordenadas se presenta en unidades arbitrarias (UA.) **N=214**.

En suma, se realizó el análisis ROC a una población de 214 bovinos adultos, los cuales fueron seleccionados y categorizados como verdaderos positivos y negativos en base a dos técnicas diagnósticas validadas por la OIE. Hecho esto se seleccionó como punto de corte para nuestro ELISA ectoENV-L el valor de DO de 0,4587. La sensibilidad calculada fue de 96,76%, y la especificidad de 98,18%. El área bajo la curva ROC fue de 0.9972. (Tabla 15, Figuras 19 y 20).

Performance ectoENV-L.

Definido el protocolo y su punto de corte, se pretendió evaluar nuestro ELISA ectoENV-L en una muestra amplia de bovinos frente al kit comercial.

De los tambos relevados, sólo en uno fue posible la obtención de muestras pareadas de suero y leche (Tambo 6). Se extrajeron muestras de bovinos adultos en producción tanto de suero como de leche el mismo día. Al igual que con las otras técnicas diagnósticas, se pretendió valorar varios rodeos pero no se logró por problemas logísticos y de costos. Se procedió de forma análoga a como se hizo para ELISA p24 y ELISA ectoENV-S. Se calculó el índice kappa como medida de congruencia entre las diferentes técnicas diagnósticas.

Fue posible analizar un total de 479 muestras pareadas provenientes de bovinos en situación de producción de entre 2 y 9 años. A cada bovino se le

extrajo una muestra de sangre para realización de test serológicos (VMRD y ectoENV-S) y de leche para realización de ectoENV-L. Luego de obtenidos los resultados se entrecruzaron los datos para determinación de congruencia entre las diferentes técnicas (Índice Kappa).

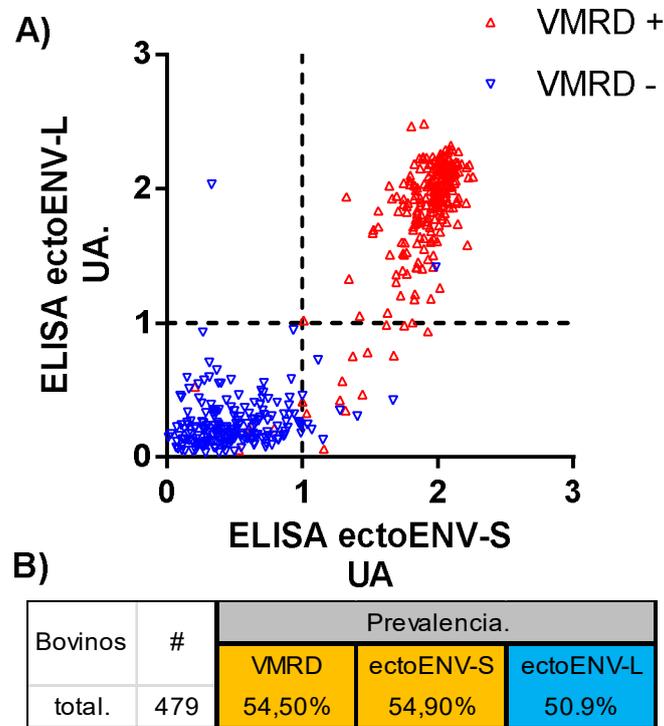


Figura 21. Resultados de los 479 bovinos testeado con las distintas técnicas. Cada bovino fue testeado para VMRD y ELISA ectoENV-S y ectoENV-L. A) Se representa gráficamente la DO de los 479 bovinos analizados. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off de ELISA ectoENV-L, mientras que en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off de ELISA ectoENV-S. Para ambos ELISAs un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. En rojo se representan aquellos sueros que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD – están en azul. *UA: unidades arbitrarias N=479. B) Cifras de prevalencias para VLB de acuerdo al método diagnóstico utilizado.

De los 479 bovinos analizados, 261 (54.5%) resultaron positivos y 218 (58.4%) negativos para el kit de referencia. Los resultados obtenidos con nuestro ELISA indirecto anti ectoENV, tanto a partir de muestras de leche (ectoENV-L) como suero (ectoENV-S), muestran un alto nivel de congruencia (Figura 21).

La prevalencia de leucosis calculada para esta población de bovinos provenientes del Tambo 6 es sustancialmente mayor que la mostrada anteriormente (Ver Tabla 13, Tambo 6). Surge de los resultados anteriores que

la prevalencia para el Tambo 6 para los 471 bovinos analizados era de 25.5%. Sin embargo, aquí se evaluaron exclusivamente los bovinos en producción del tambo, y no el conjunto del tambo como anteriormente (Tabla 13). Como se describió en la introducción, la población de bovinos en producción representa una población con mayor carga de leucosis.^{2,48,68,149} Analizaremos este punto más adelante.

A continuación se presenta el índice kappa obtenido de la comparación de las tres técnicas diagnósticas tomadas de a dos para esta población de 479 bovinos: ectoENV-L frente a VMRD y frente a ectoENV-S, y ectoENV-S frente a VMRD.

1) ectoENV-L versus VMRD. Índice Kappa.

Tabla 16. ELISA ectoENV-L versus VMRD. N=479

	ectoENV-L		total.
	positivo	negativo	
VMRD +	242	19	261(54.5%)
VMRD-	2	216	218(45,5%)
total.	244(50.9%)	235(49,1%)	479

Tabla 17. ELISA ectoENV-L versus VMRD. Índice Kappa para la comparación entre ectoENV-L y VMRD. N=479.

N° concordancias observadas.	458	95,62%
N° concordancias random esperadas.	239,9	50%
Índice Kappa	0,912	
ES kappa	0,019	
IC 95% kappa	0,876-0,949	
Nivel de concordancia	Muy buena.	

En la Figura 22, se representan los 479 bovinos analizados. En rojo aquellos bovinos positivos para VMRD, y en azul aquellos bovinos negativos para VMRD; en ordenadas se grafica la DO obtenida para ectoENV-L.

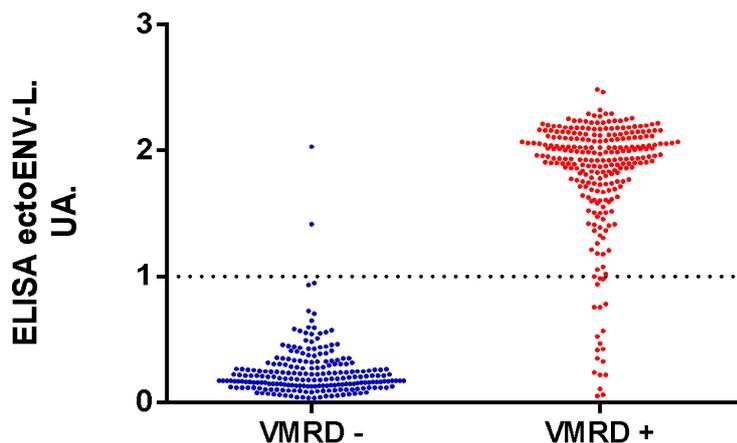


Figura 22. ELISA ectoENV-L versus VMRD. En ordenadas se muestran los valores de DO normalizados por cut off para el ELISA ectoENV-L. Los resultados mayores a 1 son positivos, y los menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a su resultado para VMRD. Se muestran los resultados de los 479 bovinos analizados para la evaluación de la performance de ELISA ectoENV-L *UA: **unidades arbitrarias N=479**.

Como surge de la Tabla 17, el nivel de concordancia observado entre ambas técnicas serológicas fue “Muy bueno”. Se obtuvieron un total de 458 concordancias, que representan un 95,62% del total de los resultados obtenidos. El nivel de concordancia esperable de forma aleatoria es de 50%, que corresponde a un total de 239,9 concordancias. El índice kappa obtenido es de 0,912 con un IC95% de 0,876-0,949 y un error estándar de 0,019. Podemos decir que nuestro ELISA indirecto ectoENV-L, con una sensibilidad calculada de 96,76% y especificidad calculada de 98,18%. (Figura 19), performó para la población de bovinos analizada de una forma comparable a un test serológico validado (Tablas 16 y 17, Figura 22).

2) ectoENV-L versus ectoENV-S. Índice Kappa.

Tabla 18. ELISA ectoENV-L versus ELISA ectoENV-S. **N=479**

		ectoENV-L		total.
		positivo	negativo	
ectoENV-S	positivo	243	20	263(54,9%)
	negativo	1	215	216(45,1%)
total.		244(50,9%)	235(49,1%)	479

Tabla 19. ELISA ectoENV-L versus ELISA ectoENV-S. Índice Kappa para la comparación entre ectoENV-L y ectoENV-S. N=479.

N° concordancias observadas.	458	95,62%
N° concordancias random esperadas.	239,9	50%
Índice Kappa	0,912	
ES kappa	0,019	
IC 95% kappa	0,876-0,949	
Nivel de concordancia	Muy buena.	

En la Figura 23, se representan los 479 bovinos analizados.

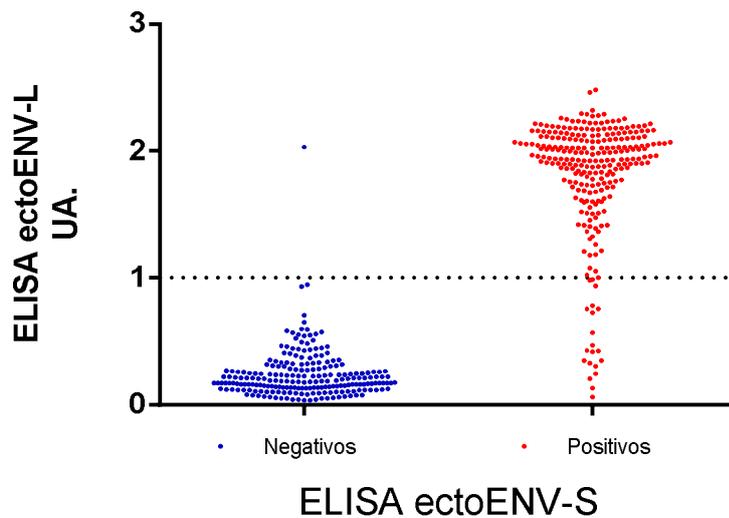


Figura 23. ELISA ectoENV-L versus ELISA ectoENV-S. En ordenadas se muestran los resultados para el ELISA ectoENV-L. Se expresan los valores de DO normalizados por cut off, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos, y menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a su resultado para ELISA ectoENV-S. Se muestran los resultados de los 479 bovinos analizados para la evaluación de la performance de ELISA ectoENV-L *UA: unidades arbitrarias N=479.

Como surge de la Tabla 19, el nivel de concordancia observado entre ambas técnicas serológicas fue “Muy bueno”. Se obtuvieron un total de 458 concordancias, que representan un 95,62% del total de los resultados obtenidos. El nivel de concordancia esperable de forma aleatoria es de 50%, que corresponde a un total de 239,9 concordancias. El índice kappa obtenido es de 0,912 con un IC95% de 0,876-0,949 y un error estándar de 0,019. Podemos decir que nuestro ELISA indirecto ectoENV-L, con una sensibilidad calculada de 96,76% y especificidad calculada de 98,18% (Figura 19), performó

de una forma comparable a nuestro ELISA indirecto ectoENV-S (Tablas 18 y 19, Figura 23).

Destacamos que los valores obtenidos luego del cálculo del Índice Kappa son exactamente los mismos para ambas comparaciones realizadas: ectoENV-L frente a VMRD y ectoENV-L frente a ectoENV-S (Tablas 17 y 18). Para esta población de bovinos analizada, nuestro ELISA ectoENV-L performa igualmente bien frente a ambas técnica serológicas, la de referencia y la desarrollada por nosotros.

La comparación entre ELISA ectoENV-S y VMRD se realizó anteriormente como parte integral de la evaluación de performance de ELISA ectoENV-S. Se analizaron un total de 1781 bovinos de 7 tambos diferentes, obteniéndose un índice kappa de 0,898 (Tabla 12). A continuación se presenta un nuevo análisis para estos procedimientos.

3) ectoENV-S versus VMRD. Índice kappa.

Tabla 20. ELISA ectoENV-S versus VMRD. N=479.

	ectoENV-S		total.
	positivo	negativo	
VMRD +	255	6	261(54.5%)
VMRD-	8	210	218(45,5%)
total.	263(54,9%)	216(45,1%)	479

Tabla 21. ELISA ectoENV-S versus VMRD. Índice Kappa, para la comparación entre ectoENV-S y VMRD. N=479.

N° concordancias observadas.	465	97.08%
N° concordancias random esperadas.	241,6	50%
Índice Kappa	0,941	
ES kappa	0,016	
IC 95% kappa	0,911-0,971	
Nivel de concordancia	Muy buena.	

Surge de la Tabla 21, que nuevamente se obtuvo un nivel de concordancia definido como “muy bueno”, con un índice kappa de 0,941 (IC 95% 0,911-0,971). Destacamos que se obtiene para esta población de bovinos un nivel de congruencia estadísticamente mayor al obtenido para la misma comparación durante el análisis de performance de ectoENV-S (Tabla 12). En este caso la población de bovinos evaluada se compone en su totalidad de bovinos adultos que se encuentran en la etapa de producción, mientras que el cálculo del índice

kappa anterior incluye una población más heterogénea, con bovinos de todas las edades.

En la Figura 24 se muestran los resultados para los 479 bovinos analizados.

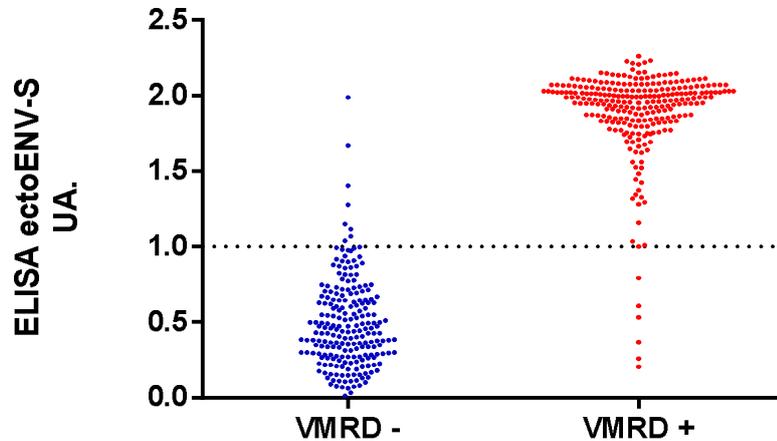


Figura 24. ELISA ectoENV-S versus VMRD. En ordenadas se muestran los resultados para el ELISA ectoENV-S, expresándose los valores de DO normalizados por cut off. Así, resultados mayores a 1 son positivos, y menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a su resultado para VMRD. Se muestran los resultados de los 479 bovinos analizados para la evaluación de la performance de ELISA ectoENV-L *UA: unidades arbitrarias N=479.

Discusión.

La importancia del diagnóstico de leucosis a partir de muestras de leche es capital para el control y erradicación de la enfermedad.^{2,48,117,132,164} Como muestra biológica, con respecto al suero presenta ventajas comparativas: en primera instancia es una muestra con la que el sector productivo lechero está habituado a trabajar y manipular; y además, múltiples variables sanitarias, pero también bioquímicas, son analizadas para determinar las características del producto individual que es vertido al tanque de leche común de cada tambo. Se evalúa la composición proteica, de grasas, así como el porcentaje de células somáticas, entre otras variables productivas sanitarias que el productor tiene en cuenta a la hora de verter o no la producción del bovino al tanque común. De hecho, las muestras obtenidas en el Tambo 6 representan una alícuota del muestreo sanitario mensual que realiza el mencionado tambo.

Por otro lado, el diagnóstico de leucosis en muestras de leche no conlleva el riesgo de aumentar la transmisión horizontal de la enfermedad y no tiene costos asociados a la extracción, dado que es una muestra que se obtiene 2

veces al día. Por lo expuesto, tener un test diagnóstico fiable a partir de muestras de leche es de gran valor.

Con respecto al cumplimiento del objetivo específico 3, realizamos la puesta a punto y análisis ROC para el cálculo del punto de corte y valores de especificidad y sensibilidad de ectoENV-L. Los valores de sensibilidad y especificidad que obtuvimos fueron de 96,76% y 98,18% respectivamente (Tablas 14 y 15, Figuras 18-20). Posteriormente, se procedió a evaluar su performance en una población de bovinos adultos de un tambo modelo experimental, y se utilizó el índice kappa como medida de congruencia entre las diferentes técnicas diagnósticas.

De la comparación entre nuestro ELISA ectoENV-L frente a ambas técnicas serológicas (VMRD y ectoENV-S), se obtiene un índice de concordancia definido como muy bueno ($\kappa=0,912$ y $\kappa=0,912$ respectivamente), demostrando que ectoENV-L es capaz de performar de forma comparable a las dos técnicas serológicas empleadas.

Por tanto, hemos sido capaces de desarrollar, poner a punto y evaluar en el terreno un ELISA indirecto que reconoce anticuerpos anti ectoENV, de utilidad para el diagnóstico de LBE a partir de muestras de leche. Además, este método mostró resultados comparables tanto a una técnica serológica validada como a otra técnica serológica desarrollada por nosotros.

A su vez, de la comparación entre ELISA ectoENV-S y VMRD surge que el índice kappa calculado es discretamente superior al calculado anteriormente, esta diferencia es leve pero estadísticamente significativa (Tablas 11-12 versus Tablas 20-21).

¿El ELISA p24 es capaz de identificar bovinos que presenten una respuesta de anticuerpos anti p24 pero no anti gp51?

Como se aclara en la introducción, se han desarrollado varios ELISA indirectos diagnósticos para la infección por el VLB utilizando la proteína recombinante p24 como antígeno. Muchos de estos trabajos han validado sus resultados frente a técnicas con conocidas limitaciones de sensibilidad.^{2,119-121} Nuestros resultados de performance de ELISA p24 fueron analizados frente a otra técnica de ELISA validada, y no frente a otras técnicas de inmunodiagnóstico

(AGID, PHA, RIA, Tabla 3) que aunque aprobadas por la OIE, no son tan robustas como la técnica de ELISA. Dadas las características inmunógenas de la proteína utilizada los resultados obtenidos son en parte esperados.²

Nos propusimos determinar si mediante el ELISA p24 éramos capaces de identificar bovinos que presenten una respuesta de anticuerpos anti p24 (ELISA p24 positivo), pero no una respuesta de anticuerpos anti gp51 (ELISA ectoENV-S y VMRD negativos).

Del análisis de performance del ELISA p24 ya contábamos con 952 sueros bovinos adultos provenientes de 5 tambos a los cuales se los testeó para VMRD y ELISA p24. La concordancia en este caso fue definida como buena, con un índice kappa de 0,687, un IC95% de 0,649-0,734 y un error estándar de 0,024 (Tablas 6-7, Figura 11).

A su vez, se calculó la concordancia entre el ELISA p24 y el ELISA ectoENV-S.

Tabla 22. Resultados para los tres métodos diagnósticos (VMRD, ELISA p24 y ELISA ectoENV-S). Para cada método se muestra la cantidad absoluta de positivos y negativos y el porcentaje de positivos. N=952

Tambo	Sueros	VMRD			ELISA p24			ectoENV-S		
		Positivo	Negativo	Positivos (%)	Positivo	Negativo	Positivos (%)	Positivo	Negativo	Positivos (%)
Tambo 1	416	289	127	69,5	249	167	59,9	283	133	68
Tambo 2	207	132	75	63,8	123	84	59,4	121	86	58,4
Tambo 3	132	31	101	23,5	44	88	33,3	39	93	29,5
Tambo 4	180	136	44	75,6	120	60	66,7	128	52	71,1
Tambo 5	17	16	1	94,1	13	4	76,5	14	0	82,4
Total	952	604	348	63,4	549	403	57,8	585	367	61,4

El porcentaje de bovinos positivos para el ELISA p24 es globalmente menor, y en general menor en cada tambo individual (Tabla 22). Para esta población el análisis de concordancia entre el ELISA p24 y VMRD ya se mostró (Tablas 6-8, Figura 11).

1) ELISA p24 versus ELISA ectoENV-S. Índice kappa.

Tabla 23. ELISA p24 versus ELISA ectoENV-S. N=952.

		ELISA p24		total.
		positivo	negativo	
ectoENV-S	positivo	493	92	585 (61,4%)
	negativo	56	311	367(38,6%)
total.		549 (57,8%)	403 (42,2%)	952

Tabla 24. Índice Kappa para la comparación entre ELISA p24 y VMRD. **N=952**

N° concordancias observadas.	804	84,45%
N° concordancias random esperadas.	492,7	52%
Índice Kappa	0,678	
ES kappa	0,024	
IC 95% kappa	0,630-0,725	
Nivel de concordancia	Bueno	

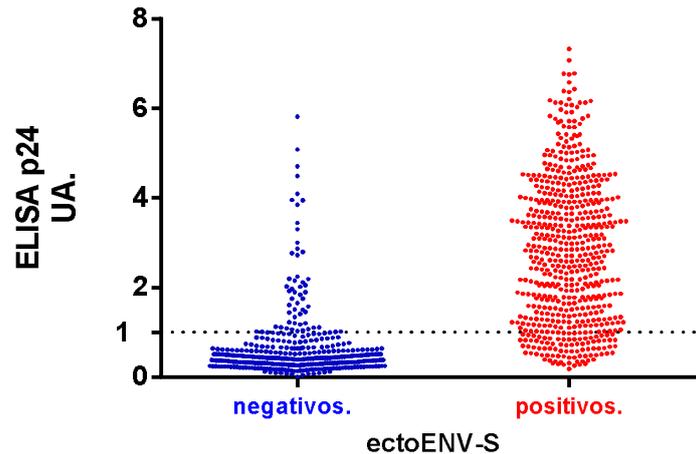


Figura 25. ELISA p24 versus ELISA ectoENV-S. En ordenadas se muestran los resultados para el ELISA p24, expresándose los valores de DO normalizados por cut off, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos, y los menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a su resultado positivo o negativo para el ELISA ectoENV-S. *UA: unidades arbitrarias **N=952**

Para la población de bovinos analizada, la performance del ELISA p24 evaluada mediante el cálculo del índice kappa, tanto frente a VMRD como a ELISA ectoENV-S, no presentó diferencias estadísticas. Frente a la técnica serológica de referencia, el índice kappa calculado fue de 0,687, con un IC95% de 0,649-0,734 y un error estándar de 0,024. (Tablas 6-7, Figura 11). Mientras que frente a nuestro ELISA ectoENV-S el índice kappa calculado fue 0,678, con un IC95% de 0,630-0,725 y un error estándar de 0,024, que se define como un nivel de concordancia bueno (Tablas 23-24, Figura 25). A su vez, para esta población el índice kappa para la comparación entre ectoENV-S y VMRD fue de 0,872, con un IC95% 0,840-0,904 y un error estándar de 0,016, con un nivel de concordancia definido como muy bueno (resultados no mostrados). Como es esperable, estos resultados tampoco difieren estadísticamente de los

obtenidos anteriormente para la misma comparación (Tablas 11-13 y Figura 17).

En suma, ¿cuántos sueros de la población analizada resultaron negativos para ambas técnicas serológicas anti gp51 pero positivos para el ELISA p24?

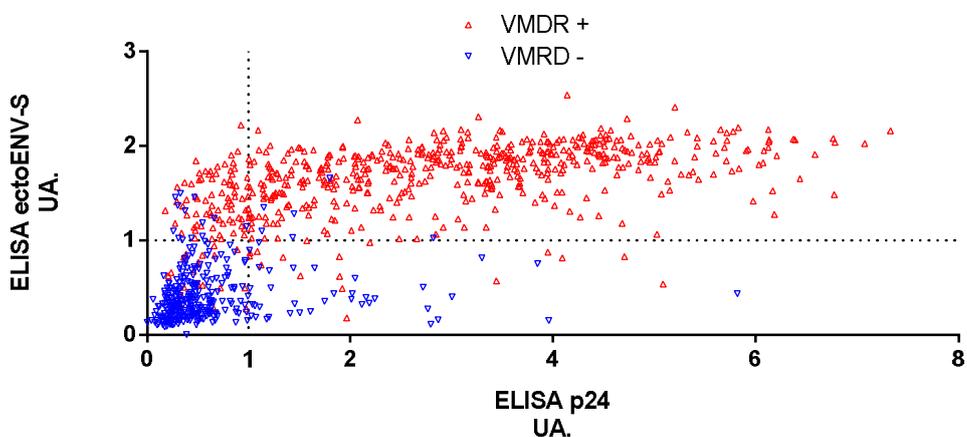


Figura 26. Sueros bovinos testeados por tres métodos serológicos (VMDR, ELISA ectoENV-S y ELISA p24). En ordenadas se expresa la DO normalizada por cut off obtenida para el ELISA ectoENV-S, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos y resultados menores a 1 son negativos. En abscisas se expresa la DO normalizada por cut off obtenida para el ELISA p24, igualmente resultados mayores a 1 son positivos y resultados menores a 1 son negativos. Se encuentran representados en color rojo aquellos sueros que resultaron VMDR +, mientras que aquellos VMDR – están de azul. *UA: unidades arbitrarias N=952.

Surge de los resultados de concordancia, que ambas técnicas serológicas anti gp51 presentan un 94% de resultados concordantes (resultados no mostrados, Figura 26). Para analizar las discrepancias entre una respuesta humoral anti p24 y anti gp51, se recurrió al 94% de los resultados concordantes. Se consideraron sueros gp51 + aquellos sueros positivos para VMDR y ELISA ectoENV-S, y sueros gp51 - aquellos negativos para ambas técnicas serológicas anti gp51. A continuación se presentan los resultados obtenidos de la población mencionada (Tabla 25, Figura 26).

Tabla 25. Bovinos con respuesta humoral anti gp51 concordante. **gp51+**: sueros positivos para VMDR y ELISA ectoENV-S. **gp51 -**: sueros negativos para VMDR y ELISA ectoENV-S. N=895.

	ELISA p24		total.
	positivo	negativo	
gp51+	487	79	566
gp51-	38	291	329
total.	525	370	895

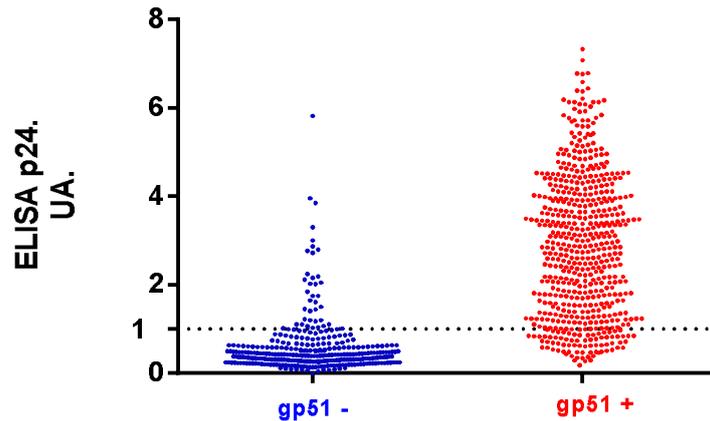


Figura 27. Bovinos con respuesta humoral anti gp51 concordante. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off para el ELISA p24. Resultados mayores a 1 son positivos, mientras que resultados menores a 1 son negativos. En abscisas se encuentran agrupados los sueros de acuerdo a la categoría gp51 - y gp51 + respectivamente. **gp51-:** sueros negativos para VMRD y ELISA ectoENV-S. **gp51+:** sueros positivos para VMRD y ELISA ectoENV-S. **N=895**

De la población de 952 sueros bovinos adultos testeados frente a las 3 técnicas serológicas (Tabla 22), nuestro ELISA p24 mostró resultados similares sin diferencias estadísticas, con un índice kappa definido como bueno tanto frente a la técnica serológica de referencia como frente a nuestro ELISA ectoENV-S (Tablas 6-7, Figura 11; y Tablas 23-24 y Figura 25 respectivamente).

A su vez, ambas técnicas serológicas que reconocen anticuerpos anti gp51 presentaron un 94% de resultados concordantes (Figura 26). Se utilizó este subgrupo de bovinos con resultados concordantes para VMRD y ELISA ectoENV-S (gp51 - y gp51 + respectivamente) para identificar bovinos con una respuesta serológica anti 24 pero no una respuesta serológica anti gp51 (Figura 27, Tabla 25).

Hemos identificado un grupo de 38 sueros bovinos negativos para ambas técnicas serológicas anti gp51, pero sin embargo positivas para ELISA p24 (Tabla 27, Figura 25). Este subgrupo podría justificar la utilidad del diagnóstico serológico mediante la identificación de anticuerpos anti p24 en situaciones puntuales. De todos modos, no hemos confirmado estos resultados por otras técnicas serológicas, ni mediante identificación directa del agente infeccioso. Además, estos resultados también podrían ser falsos positivos para el ELISA p24. Especialmente teniendo en cuenta que la producción de la proteína p24 se realiza en un sistema de E.coli, donde podrían quedar contaminantes

(epitopes) de *E. Coli* que sean los que están generando la positividad en las muestras si es que estos bovinos han desarrollado una respuesta humoral contra esa bacteria.

Dado que el objetivo del presente trabajo era proporcionar un método diagnóstico sensible y específico, a un valor costo efectivo, consideramos no avanzar en la caracterización de la respuesta de anticuerpos anti p24 durante la historia natural de la infección. Como se observa en la Figura 26, el comportamiento de los sueros positivos para p24 se parece al comportamiento esperado para un test diagnóstico menos sensible y menos específico. Un porcentaje importante de los sueros negativos para el ELISA p24, son sin embargo positivos para los métodos serológicos anti gp51. Mientras que de aquellos sueros positivos para el ELISA p24, un subgrupo pequeño no lo son para los métodos serológicos anti gp51.

Por tanto, nuestro ELISA p24 es un método diagnóstico con un aceptable rendimiento pero inferior a las técnicas serológicas que detectan la presencia de anticuerpos anti gp51. Además, dado el nivel de congruencia obtenido entre éstas técnicas serológicas y nuestro ELISA ectoENV-L, es esperable que el ELISA p24 también tenga un rendimiento diagnóstico inferior a este último.

ELISA p24 versus ELISA ectoENV-L.

De la población de bovinos adultos testeados para el ELISA p24, se lograron obtener muestras pareadas de leche en 214 de ellos. A continuación presentamos el análisis de concordancia entre los resultados del ELISA p24 y ectoENV-L.

Los 214 bovinos forman parte de la población de bovinos en producción del Tambo 6, sus edades van de 2 a 9 años.

Recordamos que nuestro ELISA p24 ya demostró tener un nivel de concordancia bueno frente a las técnicas serológicas VMRD y ectoENV-S (Tablas 6-7, Figura 11; y Tablas 23-24 y Figura 25).

Tabla 26. ELISA p24 versus ELISA ectoENV-L. N=214.

		ectoENV-L		total.
		positivo	negativo	
ELISA p24	positivo	78	15	93
	negativo	12	109	121
total.		90	124	214

Tabla 27. Índice Kappa para la comparación entre ELISA p24 y ELISA ectoENV-L **N=214**.

N° concordancias observadas.	187	87,38%
N° concordancias random esperadas.	109,2	51,04%
Índice Kappa	0,742	
ES kappa	0,046	
IC 95% kappa	0,652-0,833	
Nivel de concordancia	Bueno.	

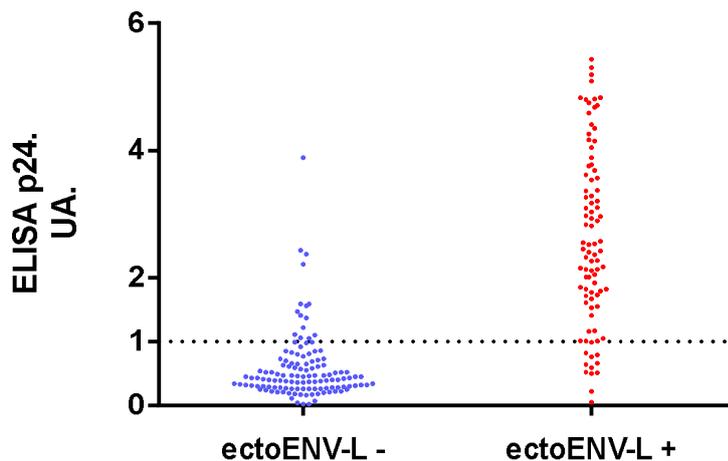


Figura 28. ELISA p24 versus ELISA ectoENV-L. En ordenadas se muestran los resultados para ELISA p24, se expresan los valores de DO normalizados por cut off. Resultados mayores a 1 son positivos, y menores a 1 negativos. En abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a su resultado positivo o negativo para ectoENV-L. *UA: unidades arbitrarias **N=214**.

Con respecto a la concordancia entre nuestro ELISA p24 y el ELISA ectoENV-L, para la población analizada de 214 bovinos se obtuvo un índice kappa de 0,742 con un IC95% de 0,652-0,833, y un error estándar de 0,046, con un nivel de concordancia definido como bueno (Tabla 26 y 27, Figura 28). Destacamos que el índice kappa no presenta diferencias estadísticas con aquellos calculados para la comparación entre el ELISA p24 y las dos técnicas serológicas anti gp51.

En suma, la comparación de nuestro ELISA p24 frente a las dos técnicas serológicas anti gp51 y frente a nuestro ELISA ectoENV-L, presenta un nivel de resultados concordantes del entorno de 85%, sin diferencias estadísticas entre las técnicas que reconocen anticuerpos anti gp51 (Tablas 7,24 y 27).

Análisis epidemiológico en Tambo Modelo.

Luego de una fase inicial que implicó el desarrollo y evaluación de distintas herramientas diagnósticas, de acuerdo con el objetivo específico 4 se describió el comportamiento biológico de la infección por VLB en un tambo modelo, y a su vez se evaluó la utilidad de los test diagnósticos desarrollados. Para esto las herramientas utilizadas fueron: ELISA ectoENV-S y ectoENV-L, VMRD, y técnica de PCR.

En esta instancia el tambo elegido fue el Tambo 6, utilizado previamente como parte de la valoración de performance de ELISA ectoENV-S y ectoENV-L (Tabla 13).

El mencionado tambo es un establecimiento modelo, productivo-experimental, propiedad de un instituto nacional de investigación agropecuario, en el cual se lleva registro de los parámetros productivos de cada bovino individual, así como su genealogía y su condición sanitaria. Es un tambo cerrado en el cual no entran bovinos adultos provenientes de otros rodeos, todos los bovinos ingresan como embriones. A su vez, cuenta con laboratorio propio adyacente a la planta productiva, donde múltiples variables biológicas y sanitarias de la leche producida es evaluada, así como las condiciones sanitarias de los bovinos durante todo el ciclo productivo. Gracias a un acuerdo institucional con el Institut Pasteur Montevideo en el marco de un programa de colaboración, fue posible el acceso a muestras de los animales de este tambo.

Durante 3 años se realizó el relevamiento de distintas subpoblaciones del tambo. La obtención de muestras biológicas fue realizada en todos los casos por personal entrenado del establecimiento, de acuerdo a protocolos sanitarios internos del tambo. La población estable del tambo es de unos 400 bovinos, de los que aproximadamente la mitad se encuentran en producción (se refiere a bovinos adultos expuestos a ordeño 2 veces al día), y la otra mitad en pre-producción (se refiere a bovinos adultos que aún no han entrado al ciclo productivo de ordeño, previo a primera parición). El recambio anual de bovinos adultos en producción es de 10% aproximadamente. La selección de los animales que pasan a refugio es multiparamétrica, teniendo en cuenta variables productivas y sanitarias. La infección por VLB no es una de las variables sanitarias utilizadas.

Por las características particulares del Tambo 6, como son contar con personal habituado a evaluar múltiples variables biológicas, contar con laboratorio propio donde extraer y procesar las muestras, y sobre todo la posibilidad de realizar seguimiento de los bovinos evaluados, además de conocer no solo su condición sanitaria sino patronímicas, nos decidimos a trabajar en esta instancia con el mencionado tambo.

Muestreo Bovinos en PRE-producción.

La población de bovinos en pre producción son aquellos bovinos que aún no han entrado al ciclo de producción de leche, dado que aún no han tenido su primera parición. Representan una población epidemiológicamente diferente de aquellos bovinos que se encuentran produciendo leche. Son bovinos más jóvenes, y además no están sometidos a los ciclos diarios de ordeño. La prevalencia de LBE en esta población se ha descrito como menor.^{48,68,150}

Relevamos 204 bovinos de entre 0 y 2 años cumplidos, pertenecientes a la población de bovinos en pre-producción. De cada muestra bovina se obtuvieron los resultados serológicos para VMRD y ELISA ectoENV-S, y a partir de células de sangre periférica se llevó a cabo la técnica de PCR para poner en evidencia ADN proviral. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos para cada técnica diagnóstica.

*Tabla 28. Resultados de los bovinos en pre-producción analizados. Se muestran los resultados positivos de cada cohorte etario y del total de bovinos analizados para cada técnica diagnóstica utilizada (técnica de PCR, VMRD y ELISA ectoENV-S). Resultados expresados en valor absoluto y como porcentaje de bovinos positivos. *1er. R: primer round. *2do.R: segundo round. # cantidad bovinos. N=204*

Bovinos Pre-producción. Resultados positivos.						
Edad(años)	#	Técnica de PCR			VMRD	ectoENV-S
		1 ^{er.} R.	1 ^{do.} R.	total		
0	73	0	2	2	3	2
1	88	5	3	8	8	9
2	43	1	1	2	3	2
total	204	6	6	12(5,74%)	14(6,86%)	13(6,37%)

Para esta población de bovinos, ambas técnicas serológicas (VMRD y ELISA ectoENV-S) presentaron una prevalencia para LBE baja (6.86% y 6.37% respectivamente), al igual que la técnica de PCR (5.74%) (Tabla 28).

Nuestro ELISA ectoENV-S fue puesto a punto frente a una población de bovinos adultos, mayormente en producción, mientras que la población aquí analizada representa una población de bovinos exclusivamente en pre-producción, con bovinos adultos pero también terneros. Para determinar la congruencia entre ambas técnicas serológicas en esta población, se calculó el índice kappa.

Tabla 29. ELISA ectoENV-S versus VMRD, bovinos en pre-producción evaluados $N=204$

	ectoENV-S		total.
	positivo	negativo	
VMRD +	8	6	14
VMRD-	6	184	190
total.	14	190	204

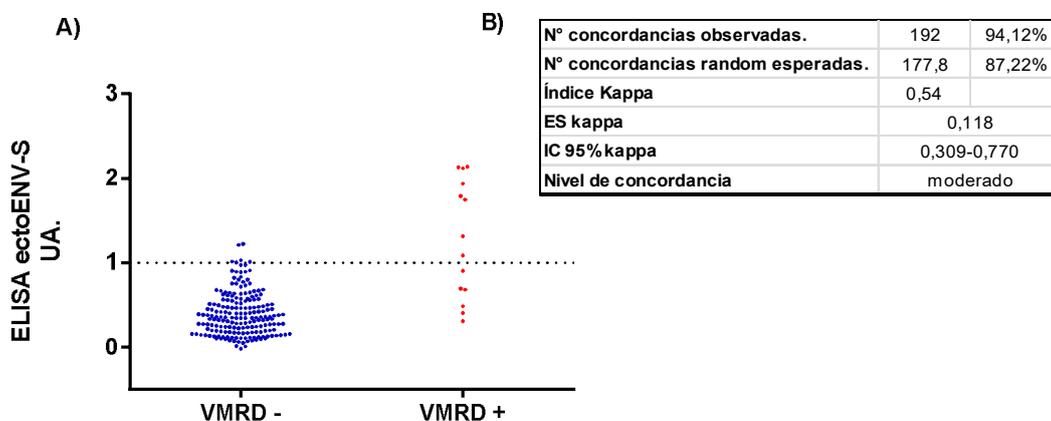


Figura 29. Resultados de la comparación entre el ELISA ectoENV-S y VMRD. A) ELISA ectoENV-S versus VMRD. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off para ectoENV-S. Resultados mayores a 1 son positivos, mientras que resultados menores a 1 son negativos. En abscisas se encuentran agrupados los bovinos de acuerdo a su resultado positivo o negativo para VMRD. $N=204$. *UA: unidades arbitrarias B) Índice Kappa para la comparación entre ELISA ectoENV-S versus VMRD $N=204$.

En este caso se obtuvo un índice kappa de 0,54 con un IC95% de 0,309-0,770, y un error estándar de 0,118, con un nivel de concordancia definido como

moderado (Figura 29). Como se dijo anteriormente, esta población es una población de bovinos más jóvenes y con una baja carga de leucosis. Para esta población de bovinos el nivel de concordancia obtenido no fue el mismo que se obtuviera previamente para la misma comparación (Tabla 12).

Anteriormente hemos demostrado que nuestro ELISA ectoENV-S presenta un nivel de concordancia definido como muy bueno frente a la técnica de referencia. Tanto para el caso de una población de bovinos amplia y heterogénea (ver Performance ELISA ectoENV-S, Tabla 12), como frente a una población más homogénea de bovinos exclusivamente en producción (Tablas 20-21 y Figura 24).

Surge sin embargo de los resultados de la Figura 29, que para el caso de esta población de bovinos más jóvenes ambas técnicas serológicas presentan discordancias en la identificación de bovinos positivos (Tabla 29, Figura 29). ¿Qué ocurre cuando agregamos al análisis el resultado para técnica de PCR? (Figura 30).

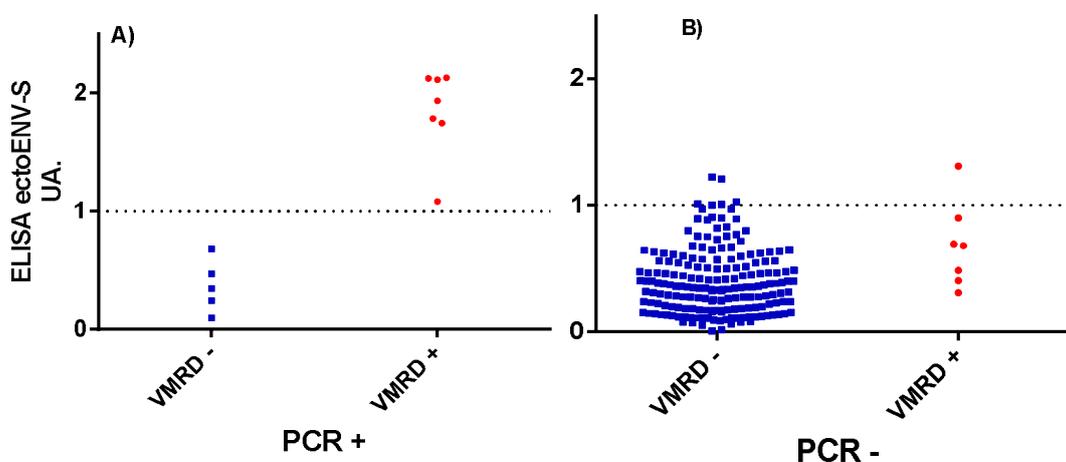


Figura 30. Bovinos analizados mediante VMRD, ELISA ectoENV-S y técnica de PCR. Se representan los 204 bovinos. **A)** Bovinos positivos para técnica de PCR. En ordenadas se grafica la DO para ELISA ectoENV-S, en abscisas se agruparon los bovinos de acuerdo al resultado negativo o positivo para VMRD. **B)** Bovinos negativos para de PCR. En ordenadas se grafica la DO para ELISA ectoENV-S, en abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo al resultado negativo o positivo para VMRD. Los resultados de DO para ELISA ectoENV-S se presentan normalizados por el valor de cut off, con lo cual valores mayores a 1 son positivos, y menores a 1 son negativos. *UA: unidades arbitrarias. N=204.

En la Figura 30 se pone de manifiesto cómo ambas técnicas serológicas discrepan de la técnica de PCR. De los 204 sueros analizados, 14 resultaron positivos para VMRD, pero sin embargo de éstos sólo 7 resultaron positivos para la técnica de PCR. En el mismo sentido, nuestro ELISA ectoENV-S identificó como negativos 6 de estos 14 sueros, todos los cuales resultaron negativos para la técnica de PCR (Figura 30).

Ambas técnicas serológicas correlacionan de forma moderada frente a los resultados de la técnica de PCR. Identifican correctamente aquellos bovinos positivos para PCR, pero sin embargo con aquellos bovinos negativos para la técnica de PCR tienen problemas. Una explicación posible es que estos bovinos negativos para la técnica de PCR presenten anticuerpos anti VLB producto de la inmunidad pasiva.

En suma, a pesar de las discrepancias mostradas, podemos decir que aún para esta población de bovinos jóvenes nuestro ELISA ectoENV-S obtiene resultados comparables a la técnica de referencia, especialmente si tenemos en cuenta los resultados para la técnica de PCR (Figura 30). Ambas técnicas serológicas presentan algunos resultados discordantes en la población de sueros negativos para la técnica de PCR. Es posible que la técnica serológica de referencia sea capaz de reconocer una respuesta serológica de tipo IgM, con lo cual logre identificar mayor cantidad de bovinos positivos en esta población de bovinos jóvenes.

La población de bovinos evaluada en esta instancia representa a la población de bovinos más jóvenes de un tambo, aquellos bovinos que formarán luego de su primera gesta el plantel de bovinos en producción. La prevalencia de LBE en esta población, por los tres métodos diagnósticos utilizados, es de un dígito, mucho menor que la calculada para cualquier tambo en esta tesis (Tabla 13). Si recordamos, el porcentaje de bovinos positivos para VMRD en los tambos analizados fue desde 23.5% a 94.1%. Aún si analizamos la prevalencia global del Tambo 6 es de 23.5%. Esto es congruente con reportes previos de cómo la prevalencia de LBE se correlaciona con la edad del bovino, y tiende a ser mayor en aquellos rodeos que tienen bovinos más añosos.^{2,149}

La importancia de identificar una subpoblación de un tambo que presente una menor prevalencia es fundamental para poder desarrollar programas de control

de los factores de riesgo de transmisión y control de la enfermedad. Durante este relevamiento se logró demostrar que la población de bovinos no expuestos a ordeño representan una población de menor prevalencia de VLB, en un contexto de mayor prevalencia global del tambo. Esto representa un elemento importante dado que es una población sobre la cuál actuar para prevenir su infección una vez que ingresen al sistema de producción. En un contexto de alto recambio de bovinos productores, donde los bovinos que ingresan al plantel productor provienen exclusivamente de la población de bovinos de baja prevalencia, una correcta identificación de los factores de riesgo de transmisión, así como una selección de los bovinos a eliminar, podría disminuir drásticamente la prevalencia global del tambo.

Muestreo Bovinos en Producción.

La población de bovinos en producción se compone de los bovinos que se encuentran produciendo leche al momento del muestreo. Representa una población más heterogénea desde el punto de vista etario, y más expuesta a iatrogenia veterinaria por el manejo más intensivo al que están expuestos. Como dijimos, el Tambo 6 es un predio cerrado en el cual todos los bovinos en producción provienen originariamente de la población de bovinos en pre-producción. Básicamente, entre estas dos poblaciones de bovinos los animales en producción presentan dos diferencias fundamentales:

- son una población más añosa; en general compuesta de bovinos desde 2 años cumplidos hasta 9 años, que ya han tenido su primera parición;
- son expuestos a ordeño 2 veces por día durante los años que dure su ciclo productivo.

Tanto por la persistencia en el tiempo de los factores de riesgo para la transmisión del VLB, como por su mayor longevidad, representan en general una población con mayor prevalencia para LBE.^{48,68}

En esta instancia fueron relevados 252 bovinos adultos de la población de bovinos en producción, de entre 2 y 9 años cumplidos, de los cuales se obtuvieron muestras pareadas de suero y leche. De cada muestra de sangre bovina se obtuvieron los resultados serológicos para VMRD y ELISA ectoENV-S, y a partir de células de sangre periférica se llevó a cabo la técnica de PCR

para evidenciar la presencia de ADN proviral. A partir de las muestras de leche se obtuvieron los resultados empleando el ELISA ectoENV-L. Todas las muestras fueron obtenidas el mismo día.

En la Tabla 30, se muestran los resultados obtenidos para cada técnica diagnóstica (PCR, VMRD y ELISA ectoENV-S; los resultados de ELISA ectoENV-L se muestran luego).

*Tabla 30. Resultados de los bovinos en producción analizados por diferentes técnicas. Se muestran los resultados positivos de cada cohorte etario y del total de bovinos analizados para cada técnica diagnóstica utilizada (técnica de PCR, VMRD y ELISA ectoENV-S). Resultados expresados en valor absoluto y como porcentaje de bovinos positivos.*1er. R: primer round. *2do.R: segundo round. # cantidad bovinos. N=252*

Bovinos en producción.						
edad(años)	#	Bovinos PCR +			VMRD	ectoENV-S
		1 ^{er.} R.	2 ^{do} R.	total		
2	54	8	7	15	10	12
3	67	14	7	21	23	23
4	32	13	8	21	18	18
5	40	21	3	24	22	23
6	27	9	7	16	16	16
7	17	9	1	10	10	10
8	8	4	0	4	4	4
9	7	2	1	3	3	3
total	252	80	34	114(45.2%)	106(42%)	109(43,3%)

La prevalencia de LBE en esta población es mucho más alta que la obtenida para la población de bovinos en pre-producción. El porcentaje de bovinos positivos tanto para VMRD como para ELISA ectoENV-S fue de 42 y 43.3% respectivamente, en concordancia con los resultados obtenidos para la técnica de PCR (45.2%) (Tabla 30).

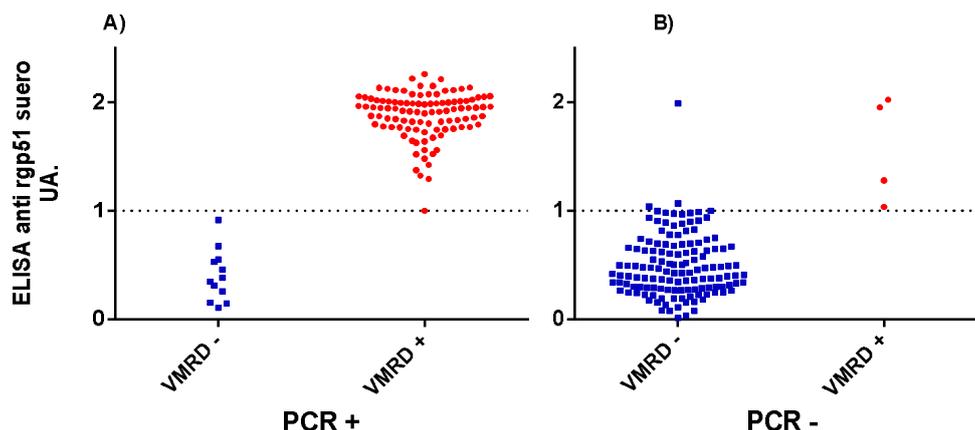


Figura 31: Se representan los resultados de los 252 bovinos en producción analizados por las diferentes técnicas. **A) Bovinos positivos para técnica de PCR.** En ordenadas se grafica la DO para el ELISA ectoENV-S, en abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo al resultado negativo o positivo para VMRD. **B) Bovinos negativos para técnica de PCR.** En ordenadas se grafica la DO para el ELISA ectoENV-S, en abscisas se agrupan los bovinos de acuerdo a al resultado negativo o positivo para VMRD. Los resultados de DO para el ELISA ectoENV-S, se presentan normalizados por el valor de cut off, con lo cual valores mayores a 1 son positivos, y menores a 1 son negativos. *UA: unidades arbitrarias. N=252.

Surge de la Figura 31 que las tres técnicas diagnósticas obtuvieron, para esta población de bovinos, una concordancia cercana al 100%. A continuación se muestran los porcentajes de resultados concordantes para cada técnica y sus respectivos índices kappa.

1) ELISA ectoENV-S versus VMRD.

Tabla 31. ELISA ectoENV-S versus VMRD. N=252

	ectoENV-S		total.
	positivo	negativo	
VMRD+	106	0	106
VMRD-	3	143	146
total.	109	143	252

Tabla 32. Índice Kappa para la comparación entre ELISA ectoENV-S y VMRD N=252.

N° concordancias observadas.	249	98,81%
N° concordancias random esperadas.	128,7	51,07%
Índice Kappa	0,976	
ES kappa	0,014	
IC 95% kappa	0,948-1000	
Nivel de concordancia	Muy bueno.	

Nuevamente la concordancia entre ambas técnicas serológicas es definida como muy buena, obteniéndose un índice kappa de 0,976 con un IC95% de 0,948-1, y un error estándar de 0,014 (Tablas 31 y 32).

2) ELISA ectoENV-S versus Técnica de PCR.

Tabla 33. ELISA ectoENV-S versus técnica de PCR. N=252.

	ectoENV-S		total.
	positivo	negativo	
PCR+	102	12	114
PCR-	7	131	138
total.	109	143	252

Tabla 34. Índice Kappa para la comparación entre ELISA ectoENV-S versus técnica de PCR. N=252.

Nº concordancias observadas.	233	92,46%
Nº concordancias random esperadas.	127,6	50,65%
Índice Kappa	0,847	
ES kappa	0,034	
IC 95% kappa	0,781-0,913	
Nivel de concordancia	Muy bueno	

De la comparación entre el ELISA ectoENV-S y la técnica de PCR resultó una concordancia definida como muy buena, obteniéndose un índice kappa de 0,847 con un IC95% de 0,781-913, y un error estándar de 0,034 (Tabla 33 y 34).

3) VMRD versus Técnica de PCR.

Tabla 35. VMRD versus técnica de PCR. N=252.

	VMRD		total.
	positivo	negativo	
PCR+	102	12	114
PCR-	4	134	138
total.	106	146	252

Tabla 36. Índice Kappa para la comparación entre VMRD y técnica de PCR. N=252.

Nº concordancias observadas.	236	93,65%
Nº concordancias random esperadas.	127,9	50,76%
Índice Kappa	0,871	
ES kappa	0,031	
IC 95% kappa	0,810-0,932	
Nivel de concordancia	Muy bueno	

De la comparación entre VMRD y la técnica de PCR resultó una concordancia definida como muy buena, obteniéndose un índice kappa de 0,871 con un IC95% de 0,810-932, y un error estándar de 0,031 (Tablas 35 y 36).

En suma, para esta población de bovinos analizada ambas técnicas serológicas presentan un concordancia de resultados de 98,81% (Tablas 31 y 32), similares a los obtenidos anteriormente (Tabla 12 y 21). Del mismo modo, la congruencia de cada técnica serológica frente a la técnica de PCR presenta en ambos casos un nivel de concordancia definido como muy bueno, con un nivel de resultados concordantes de 92,46% para el ELISA ectoENV-S, y 93,65% para VMRD, con un índice kappa de 0,847 y 0,871 respectivamente, sin diferencias estadísticas (Tablas 33-36).

ELISA ectoENV-L.

De los bovinos analizados anteriormente (Tabla 30), fue posible obtener muestras pareadas de leche para realización de ELISA ectoENV-L en 231 de ellos. Por problemas logísticos no se logró obtener muestras pareadas (muestra de suero y leche del mismo bovino en un mismo momento) de la totalidad de los 252 bovinos analizados. A continuación se presentan los resultados de los 231 bovinos en producción, a los cuales si se logró asociarle resultados de ELISA ectoENV-L.

En la Tabla 37 se muestran los resultados obtenidos para técnica de PCR, VMRD y ELISAs ectoENV-S y ectoENV-L de los 231 bovinos en producción mencionados.

*Tabla 37. Resultados de los bovinos en producción analizados por distintas técnicas. Se muestran los resultados positivos de cada cohorte etario y del total de bovinos analizados para cada técnica diagnóstica utilizada (PCR, VMRD, ELISA ectoENV-S y ELISA ectoENV-L). Resultados expresados en valor absoluto y como porcentaje de bovinos positivos.*1er. R: primer round. *2do.R: segundo round. # cantidad bovinos. N=231.*

Bovinos en Producción.					
Edad(años)	#	Bovinos positivos			
		PCR	VMRD	ectoENV-S	ectoENV-L
2	53	15	10	12	11
3	58	16	18	18	14
4	28	17	14	14	14
5	36	23	21	23	22
6	26	16	16	16	16
7	16	10	10	10	10
8	7	4	4	4	4
9	7	3	3	3	2
total	231	104(45%)	96(41,6%)	100(43,3%)	93(40.3%)

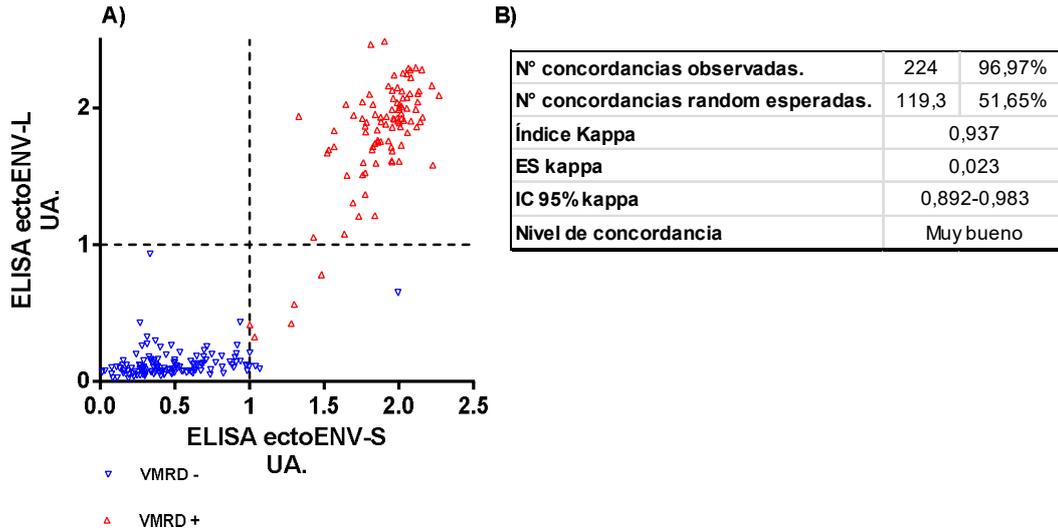


Figura 32. Correlación de resultados de bovinos en producción analizados con distintas técnicas. **A)** En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off de ELISA ectoENV-L, mientras que en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off de ELISA ectoENV-S. Para ambos ELISAs un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. Se representan en rojo aquellos bovinos que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD - están de azul. **N=231 B).** Índice Kappa para la comparación entre el ELISA ectoENV-L y VMRD **N=231**.

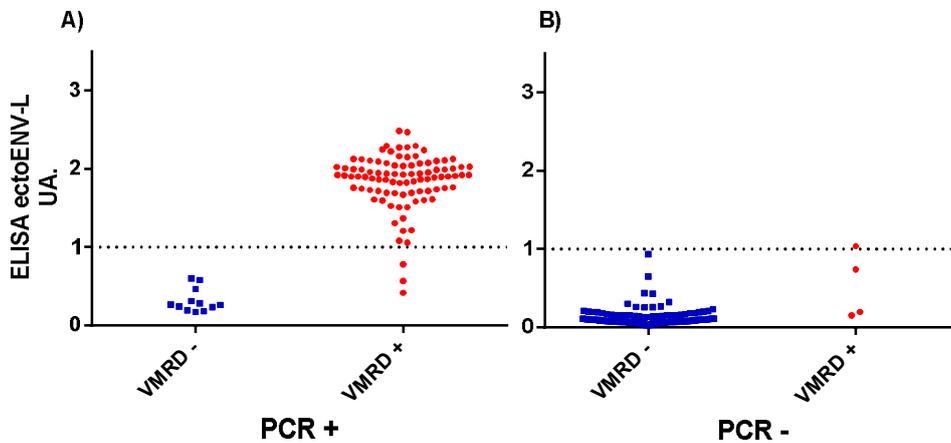


Figura 33. Se representan los resultados comparativos de los 231 bovinos analizados por diferentes técnicas. **A) Bovinos positivos para técnica de PCR.** En ordenadas se grafica la DO para el ELISA ectoENV-L, en abscisas se agruparon los bovinos de acuerdo al resultado negativo o positivo para VMRD. **B) Bovinos negativos para técnica de PCR.** En ordenadas se grafica la DO para ELISA ectoENV-L, en abscisas se agruparon los bovinos de acuerdo al resultado negativo o positivo para VMRD. Los valores de DO se presentan normalizados por el valor de cut off, con lo cual valores mayores a 1 son positivos, y menores a 1 son negativos. *UA: unidades arbitrarias. **N=231**.

Para esta población de 231 bovinos el nivel de concordancia entre ectoENV-L y VMRD obtenido fue definido como muy bueno, con un total de 96,97% de concordancias y un índice kappa de 0,937, no obteniéndose diferencias estadísticas para la misma comparación realizada previamente (Figura 32, Tabla 17). Del mismo modo, los resultados de ambas técnicas serológicas presentan niveles de concordancia de acuerdo a lo obtenido previamente, y a su vez también con la técnica de PCR (Figura 33).

Con respecto a cómo se distribuye la carga de LBE en el tambo analizado, demostramos que la población de bovinos en producción presenta para el kit de referencia una prevalencia de 42% (Tabla 30), mientras que la población de bovinos en pre producción presenta para la misma técnica una prevalencia de 6,86% (Tabla 28). De resultados previos contábamos con un valor de 25,5% de bovinos positivos para el total del tambo (Tabla 13). En suma, hemos demostrado para el tambo analizado cómo la población de bovinos más jóvenes representa una población de menor carga de LBE, y a su vez como la población de bovinos en producción aporta la mayor carga de LBE. Para un tambo cerrado como éste, donde no existe la posibilidad de que ingresen bovinos adultos infectados, el aumento de la prevalencia asociado a la edad y la situación productiva del bovino es revelador, y habla de la importancia de los factores de riesgo de transmisión y cómo el manejo intensivo expone a los bovinos adultos a la infección por VLB.

Con respecto a las herramientas diagnósticas utilizadas, se han replicado los resultados de congruencia para las diferentes técnicas diagnósticas. Para el caso de ectoENV-S hemos demostrado su utilidad para el diagnóstico de LBE, tanto en una población de bovinos en pre producción como en producción. Para el caso de la población de bovinos en producción los resultados de congruencia no presentan diferencias estadísticas con los obtenidos previamente. En el caso de la población de bovinos en pre producción, se obtuvo un índice kappa menor, 0,54 con un IC95% de 0,309-0,770, y un error estándar de 0,118, con un nivel de concordancia definido como moderado (Figura 29). Las diferencias en esta población más joven podrían explicarse por un reconocimiento de la técnica de referencia de isotipos tipo IgM. De todas maneras, aún en esta población donde las diferencias con la técnica de referencia son algo mayores, se obtiene una correcta concordancia.

En cambio, para en caso de ectoENV-L nuevamente se obtienen resultados de concordancia de acuerdo a lo obtenido durante la evaluación de performance. Por tanto, creemos que ambos ELISAs diagnósticos han demostrado ser útiles para describir la situación epidemiológica del Tambo 6, validándose como herramientas diagnósticas.

Seguimiento epidemiológico.

El Tambo 6 fue relevado a lo largo de 2 años en varias oportunidades.

Primer Relevamiento.

Durante un relevamiento inicial se testeó la población de bovinos en pre-producción y la población de bovinos en producción (resultados ya mostrados, Muestreo de Bovinos en PRE-Producción y Muestreo de Bovinos en Producción). De este modo, se obtuvo una foto de situación de la prevalencia de LBE en el tambo (Tablas 28 y 30).

Se relevaron 204 bovinos en pre-producción y 252 bovinos en producción, de los cuales se obtuvieron muestras pareadas de 231 de ellos. Como se describe en las dos secciones precedentes, estas instancias nos permitieron evaluar en el terreno las herramientas biotecnológicas desarrolladas, estudiando si preformaban de acuerdo a los resultados previos y frente a la técnica de PCR (Tablas 28-37, Figuras 29-33).

Tabla 38. Primer relevamiento del seguimiento epidemiológico en el tambo de referencia. Se muestran los resultados positivos para las tres técnicas empleadas a partir de sangre periférica, tanto para la población de bovinos en pre producción como en producción. N=456.

Primer relevamiento.	#	PCR	VMRD	ectoENV-S
		%bovinos positivos.		
Bovinos en Pre producción	204	5,74	6,86	6,37
Bovinos en Producción	252	42,2	42	42,8

En conjunto, en dos instancias diferentes separadas en el tiempo por un año, se evaluaron un total de 456 muestras bovinas. En la tabla 38 se compendian los resultados para las distintas técnicas diagnósticas de lo que denominamos primer relevamiento (Tabla 38).

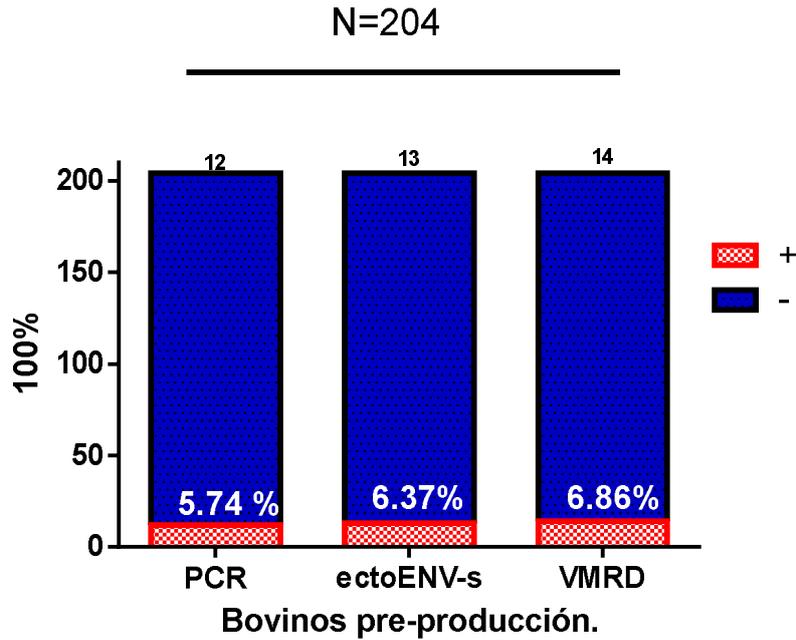


Figura 34. Resultados de bovinos en pre-producción testeados durante el primer relevamiento. Cada bovino fue testeado con tres técnicas diagnósticas (PCR, ELISA ectoENV-S y VMRD). Se muestra el número absoluto y el porcentaje de bovinos positivos para cada técnica. **N=204**

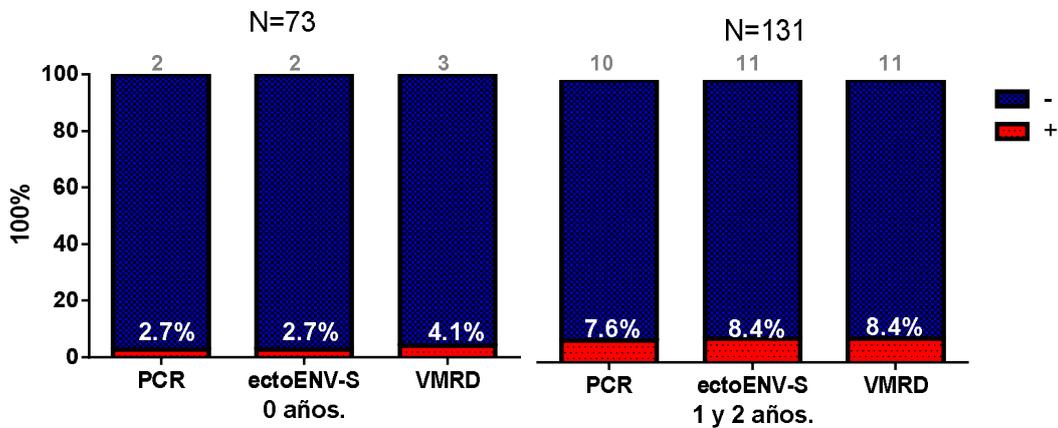


Figura 35. Resultados de bovinos en pre-producción testeados durante el primer relevamiento según edad de los animales. Cada bovino fue testeado con tres técnicas diagnósticas (PCR, ELISA ectoENV-S y VMRD). Se muestra el número absoluto y el porcentaje de bovinos positivos para cada técnica. **N=204** **A la izquierda)** Bovinos en pre-producción, cohorte etario 0 años. Cantidad de bovinos positivos (valor absoluto y relativo) para cada técnica diagnóstica. **N=73** **A la derecha)** Bovinos en pre-producción, cohorte etario 1 y 2 años. Cantidad de bovinos positivos (valor absoluto y relativo) para cada técnica diagnóstica. **N=131**

Si bien es difícil demostrar diferencias estadísticas, parece claro que aún en un contexto de baja prevalencia para LBE, aquellos bovinos más añosos dentro de un subgrupo son los que presentan mayor carga de infección (Figura 35).

La prevalencia de LBE en la población de bovinos en producción parece aumentar con la edad del bovino (Figuras 36 y 37).

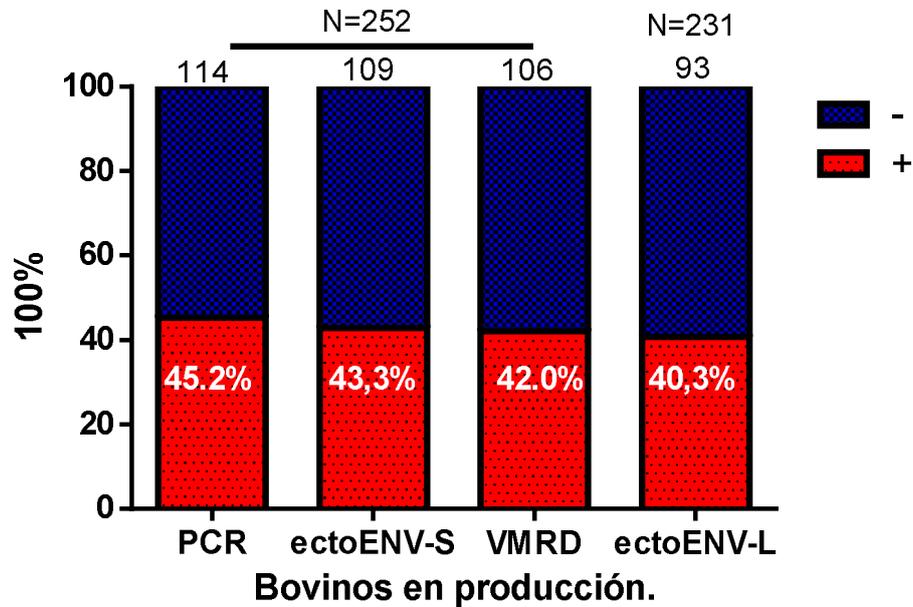


Figura 36. Resultados de bovinos en producción testeados durante el primer relevamiento por distintas técnicas. Cada bovino fue testeado con tres técnicas diagnósticas (PCR, ELISA ectoENV-S y VMRD). Se muestra para cada técnica el porcentaje de bovinos positivos. En la columna de la derecha se muestran los resultados para ELISA ectoENV-L de los 231 bovinos analizados.

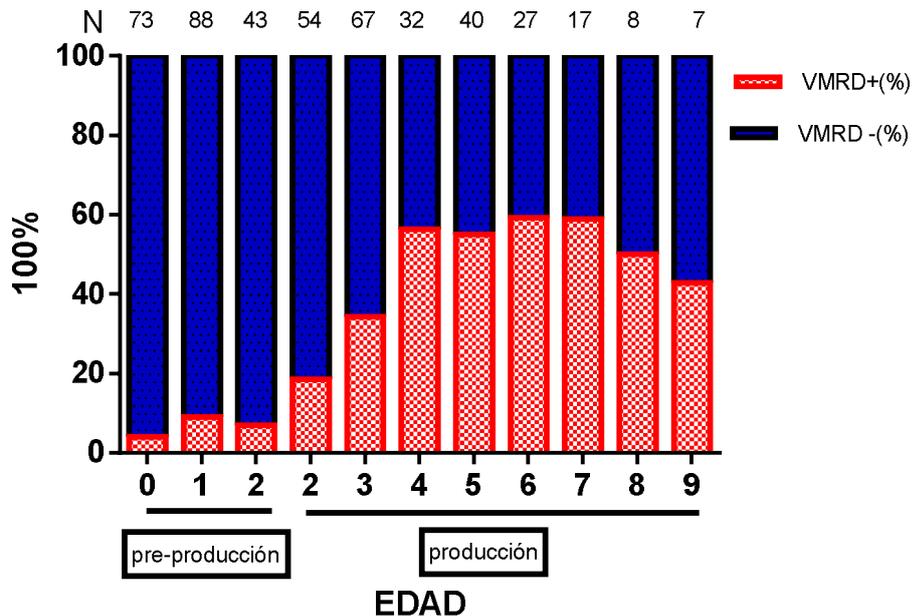


Figura 37. Resultados de bovinos según edad analizados durante el primer relevamiento mediante utilización de VMRD. **A la izquierda (0-2 años)** se muestran los resultados para la población de bovinos en pre-producción (**N=204**); **a la derecha (2 a 9 años)** se muestran los resultados para los bovinos en producción (**N=252**). Los bovinos están agrupados de acuerdo a su edad en años. Arriba de cada columna se muestra el número absoluto de bovinos de cada cohorte etario. En ordenas se grafica le porcentaje de bovinos positivos para VMRD de cada cohorte etario. **N=456**

En suma, con respecto a las conclusiones del primer relevamiento, en primera instancia ambas herramientas diagnósticas (ectoENV-S y ectoENV-L) nos permitieron describir adecuadamente la situación epidemiológica de forma comparable al kit de referencia.

Con respecto a la prevalencia de LBE en el tambo, demostramos cómo la población de bovinos en pre producción representa un grupo de animales con menor carga de LBE, y que la prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad del bovino. A su vez, a partir del ingreso a la producción se produce un aumento de la prevalencia.

Segundo relevamiento.

Un año después del primer relevamiento se relevó nuevamente todo el Tambo 6. Fueron evaluados al igual que durante el primer relevamiento todos los bovinos pertenecientes a la categoría de bovinos en pre-producción como

aquellos pertenecientes a la categoría en producción. En esta instancia no se extrajeron muestras de ADN para realizar la técnica de PCR.

De los bovinos en producción se extrajeron muestras de suero para realización del ELISA ectoENV-S y VMRD, y de leche para realización del ELISA ectoENV-L. De los bovinos en pre-producción se extrajeron muestras de suero para realización del ELISA ectoENV-S y VMRD. Se relevaron un total de 445 bovinos, 248 en producción y 197 en producción.

Tabla 39. Resultados del segundo relevamiento. Se muestran los porcentajes de resultados positivos para las tres técnicas empleadas a partir de sangre periférica y leche respectivamente, tanto para la población de bovinos en pre producción como en producción.

N=445

Segundo relevamiento	#	VMRD	ectoENV-S	ectoENV-L
		%positivos.		
Bovinos en pre-producción	197	9,1	8,1	—
Bovinos en Producción.	248	66,5	66,1	61,3%
total	445	40,9%	40,5%	

Como surge de los resultados de la Tabla 39, se observa un aumento global de la prevalencia para LBE, y también un aumento de la prevalencia en la población de bovinos en producción. El primer de registro de prevalencia que tenemos para este tambo es el obtenido durante la evaluación de performance del ELISA ectoENV-S (Tabla 13). La prevalencia global calculada aumentó de 25.5% (Tabla 13, kit de referencia) a 40.9% (Tabla 39). Entre ambos relevamientos hay dos años de diferencia.

Si analizamos exclusivamente la población de bovinos en pre-producción, entre el primer relevamiento y el segundo relevamiento hay dos años de diferencia.

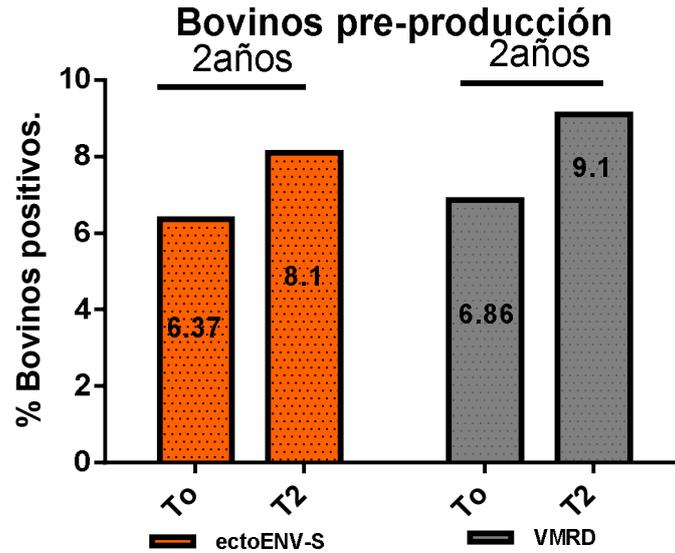


Figura 38. Bovinos en pre-producción testeados durante el primer relevamiento (T0) y el segundo relevamiento (T2). Se muestra el porcentaje de bovinos positivos para el ELISA ectoENV-S y VMRD respectivamente. T0 N=204. T2 N=197

Nuevamente se demuestra que la población de bovinos más jóvenes del tambo, correspondientes al subgrupo de bovinos en pre-producción, presenta una prevalencia para LBE menor al resto del tambo (Tabla 39). Destacamos que entre ambos relevamientos de la población en pre producción transcurrieron 2 años, sin embargo al parecer es una población que no aumentó su prevalencia para LBE, al menos con la misma magnitud que el conjunto del tambo (Figura 38, Tabla 39). En suma, el aumento en la prevalencia global del tambo, no parece explicarse por un aumento en la prevalencia de los bovinos más jóvenes.

Cuando analizamos la población de bovinos en producción, vemos que el comportamiento fue diferente. Para el caso de los bovinos en producción entre ambos muestreos transcurrió tan sólo un año, a diferencia de los 2 años transcurridos para el caso de los bovinos en pre-producción. Ambas poblaciones en producción evaluadas son demográficamente muy similares (Figura 39).

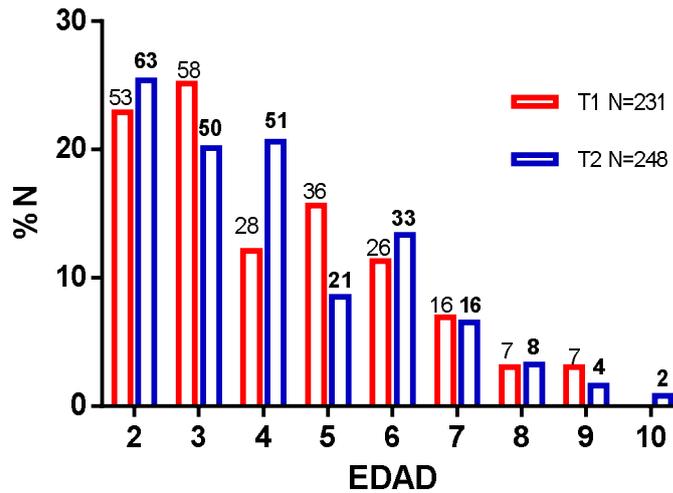


Figura 39. Histograma de frecuencias de cohorte etario de la población de bovinos en producción evaluada tanto durante el primer relevamiento (**T1**) como durante el segundo relevamiento (**T2**). Se muestra la frecuencia relativa de cada cohorte etario con respecto al total de la población evaluada en cada instancia. Sobre cada histograma aparece el número absoluto de bovinos presentes en ese grupo etario. La edad de los animales se refiere a años cumplidos. **T1 N=231, edad: 4.15. T2 N=248, edad: 4.10.* edad:** media de la edad en años de la población de bovinos analizados.

Como surge de la Figura 39, durante el primer relevamiento fueron evaluados un total de 231 bovinos en producción, mientras que durante el segundo relevamiento fueron evaluados un total de 248 bovinos. La composición demográfica de cada población es muy similar, como muestran los histogramas de frecuencias relativas. Entre ambos relevamientos transcurrió un año. De ambas poblaciones tenemos resultados serológicos para el ELISA ectoENV-S y VMRD, y del ELISA ectoENV-L para muestras de leche. La diferencia en la prevalencia obtenida no se explica por diferencias demográficas entre ambas poblaciones (Figura 39).

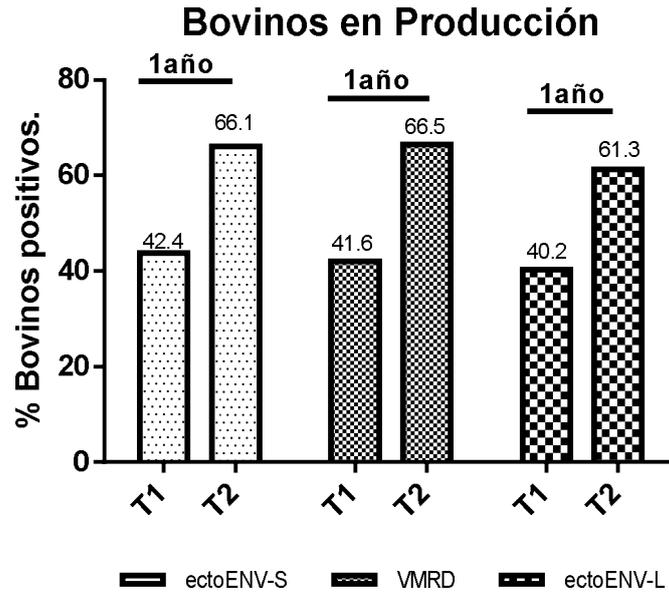


Figura 40. Bovinos en producción analizados durante el primer relevamiento (T1) y durante el segundo relevamiento (T2). Se grafica el porcentaje de bovinos positivos obtenidos para cada técnica realizada (ELISA ectoENV-S, VMRD y ELISA ectoENV-L). Sobre cada histograma puede verse el porcentaje de bovinos positivos para cada técnica respectivamente. Entre T1 y T2 transcurrió un año. T1 N=231. T2 N=248.

Como surge de la Figura 40, el aumento de la prevalencia para LBE que ocurrió al cabo de un año en la población de bovinos en producción parece ser responsable del aumento global de la prevalencia global del tambo (Figura 40).

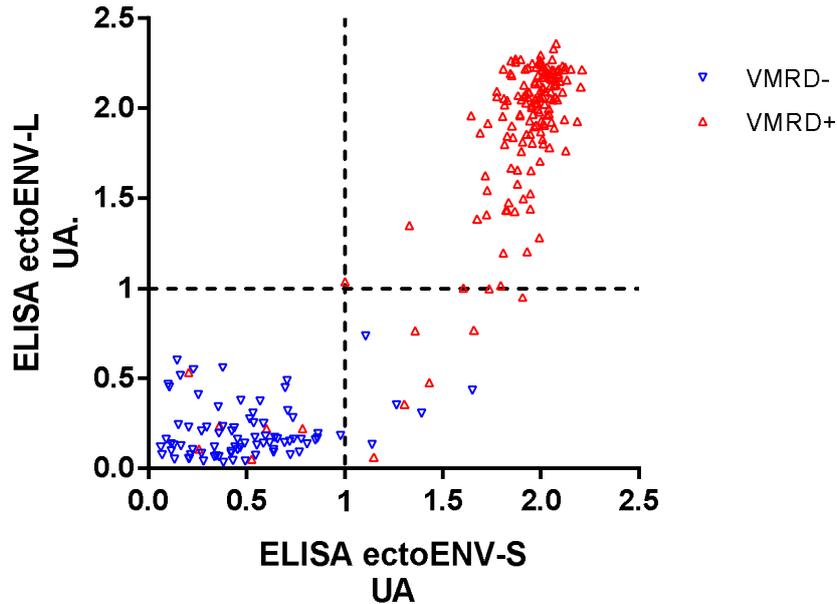


Figura 41. Se representa gráficamente la DO de los 248 bovinos en producción analizados durante el segundo relevamiento (T2). En ordenadas, se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-L, mientras que en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-S. Para ambos ELISAs, un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. Se encuentran representados en rojo aquellos sueros que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD – están de azul. **N=248. *UA: unidades arbitrarias.**

Durante el segundo relevamiento, la congruencia entre ambos métodos serológicos (ELISA ectoENV-S y VMRD) y con ELISA ectoENV-L volvió a ser muy buena. Se obtuvieron resultados congruentes con aquellos obtenidos durante la evaluación de performance (Figura 40).

Como dijimos, el Tambo 6 fue relevado a lo largo de 2 años en varias oportunidades. Inicialmente se obtuvieron muestras de sangre para realizar los análisis de performance de los ELISAs p24 suero y ectoENV-S (Tabla 13). En esta instancia no se pretendió evaluar de forma sistemática el tambo ni obtener un valor de prevalencia del mismo, sino que el objetivo fue obtener un número diverso de muestras para realizar los diferentes análisis de performance. De todas maneras, del muestro obtenido surge que el porcentaje de bovinos positivos para el kit de referencia fue de 25.5% para un número total de 471 bovinos adultos evaluados (Tabla 13).

Luego, durante el primer relevamiento, fueron relevados de manera separada y no concomitantemente ambas subpoblaciones del tambo (bovinos en pre producción y bovinos en producción). Durante esta instancia pudo demostrarse cómo la población de bovinos en pre producción presenta una prevalencia globalmente menor a la obtenida anteriormente para todo el tambo (Tabla 38, Figuras 34-35). Del mismo modo, pudo demostrarse cómo la población de bovinos en producción representa una población con mayor carga global de LBE, y cómo ésta se encuentra influenciada a la situación productiva del bovino y a la edad del mismo (Figuras 36 y 37). Hasta aquí se había obtenido una foto de la prevalencia de LBE en el tambo.

Durante el segundo relevamiento (T2) fue analizado concomitantemente todo el tambo, tanto su población de bovinos en pre producción como en producción. Dado que el primer relevamiento (T0 y T1) fue realizado en dos etapas, el tiempo transcurrido entre el primer y segundo relevamiento fue de 2 años para la población de bovinos en pre producción, y de 1 año para la población de bovinos en producción. Lo que observamos entre ambos relevamientos es un aumento de la prevalencia global de LBE, que se explica fundamentalmente por un aumento de la prevalencia en la población de bovinos en producción (Tabla 39, Figuras 38-41).

Evaluación longitudinal.

A continuación presentaremos tres conjuntos de bovinos que fueron seguidos epidemiológicamente a lo largo de un lapso de tiempo.

1) Bovinos en producción.

Del total de bovinos en producción, un conjunto de 146 bovinos fueron evaluados tanto durante el primer relevamiento (T1) como durante el segundo (T2). Como se dijo anteriormente, para ambas poblaciones en producción evaluadas entre ambos relevamientos transcurrió un año. Destacamos que estos 146 bovinos son parte de la población de bovinos en producción presentados anteriormente, con la particularidad de que estaban presentes en ambos relevamientos. El histograma de frecuencias de ambas poblaciones de bovinos en producción muestra cómo su composición demográfica y media de edad es similar (T1 N=231. edad: 4.15. T2 N=248. edad: 4.10) (Figura 39). Igualmente los 146 bovinos presentes en ambos relevamientos tienen una media de edad similar (N=146. edad: 3.8). El único rasgo distintivo de los 146

bovinos a los que se les realizó el seguimiento es que en T2 no hay bovinos de 2 años. Dado que los animales ingresan a la población de bovinos en producción aproximadamente a los 2 años, y que éstos bovinos fueron seguidos durante su estadía en producción por 1 año, necesariamente la población de bovinos a la que se le realizó seguimiento en T2 tienen 3 o más años. Es decir, del total de la población de bovinos en producción relevada en T2 (Tabla 39), ningún bovino de 2 años pertenece a los 146 bovinos a los que se les realizó seguimiento.

A continuación analizamos cómo se comportaron.

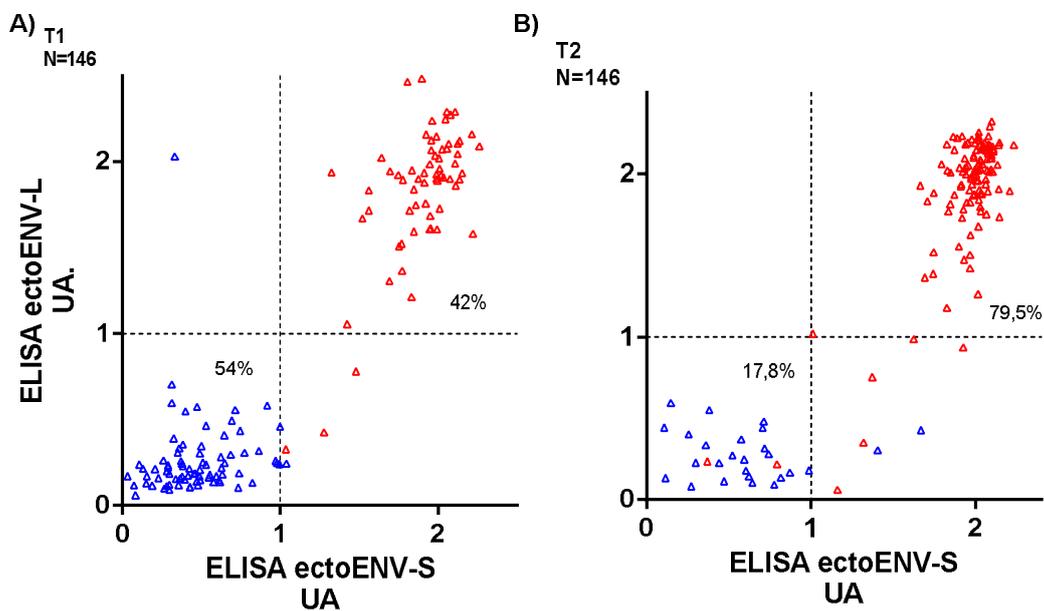


Figura 42. Bovinos en producción analizados en T1 y T2. A) Resultados para los ELISAs ectoENV-S, ectoENV-L y VMRD durante T1. B) Resultados para los ELISAs ectoENV-S, ectoENV-L y VMRD durante T2. Para ambas gráficas, en ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-L, mientras que en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-S. Un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. Se encuentran representados en rojo aquellos bovinos que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD – están en azul. En ambas graficas se muestra la cantidad relativa de animales positivos y negativos para ambos ELISAs desarrollados por nosotros (%). N=146. *UA: unidades arbitrarias.

Tabla 40. Bovinos en producción analizados tanto en el primer relevamiento (T1) como en el segundo (T2). Se muestra la prevalencia para cada método diagnóstico (VMRD, ELISA ectoENV-S y ectoENV-L). N=146

			Prevalencia.		
			VMRD	ectoENV-S	ectoENV-L
total.	146	T1	44,5%	45,2%	43,2%
		T2	82,2%	82,2%	77,4%

Como surge de la Figura 42 y de la Tabla 40, la proporción de bovinos positivos para los tres métodos analizados aumentó en T2 con respecto a T1. Podemos decir que el aumento de la prevalencia visto anteriormente en la población de bovinos en producción de forma global (Figura 40), se objetiva en esta subpoblación de bovinos seguidos durante un año también. En suma, podemos ver cómo para esta población de bovinos seguidos durante 1 año (N=146), la prevalencia prácticamente se duplicó, pasando de 44.5%, 45.2% y 43.2% a 82.2%, 82.2% y 77.4% para VMRD, ELISA ectoENV-S y ectoENV-L respectivamente (Tabla 40).

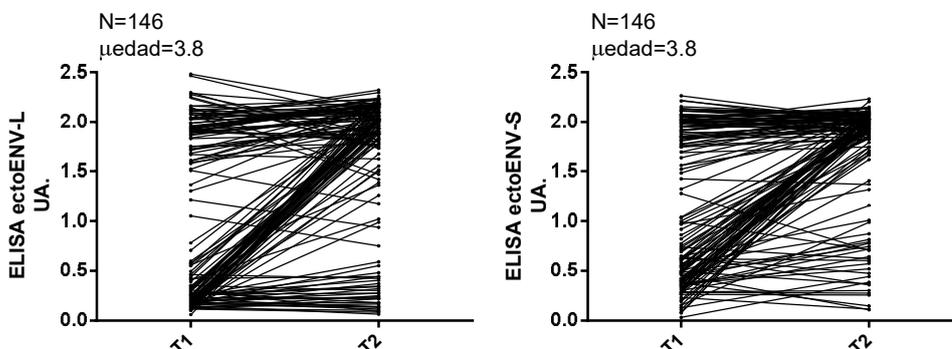


Figura 43. Bovinos en producción analizados en T1 y T2. Resultados de los **ELISA ectoENV-S** (izq.) y **ELISA ectoENV-L** (der.) obtenidos para cada bovino analizado tanto en T1 como en T2 respectivamente. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos y menores a 1 son negativos para ambos ELISAs. ***edad**: media de la edad en años de la población de bovinos analizados. Se consideró la edad de cada bovino en T1. N=146. ***UA**: unidades arbitrarias.

La prevalencia para LBE en esta población de bovinos aumentó para los tres métodos diagnósticos. Los resultados de prevalencia en T1 son similares a los obtenidos durante el primer relevamiento (Figura 35), mientras que los

obtenidos para T2 son algo mayores a los obtenidos durante el segundo relevamiento, pero esperables si tenemos en cuenta que no hay bovinos de 2 años. El comportamiento observado es similar al descrito para la totalidad de la población de bovinos en producción (Figura 39), objetivándose un aumento del porcentaje de bovinos positivos para LBE. A su vez, podemos afirmar que el aumento de la prevalencia no se debe mayoritariamente a la introducción de bovinos infectados desde la población de bovinos en pre producción, sino a la seropositivización de bovinos pertenecientes a la población de bovinos en producción. En suma, hemos asistido a un aumento de la prevalencia para LBE en esta población de bovinos en producción a los que se les realizó el seguimiento a lo largo de un año (N=146). A su vez, esto es concordante con el aumento observado en el tambo, tanto en la prevalencia global de LBE y especialmente en la población de bovinos en producción para el mismo periodo de tiempo.

A continuación se presentan los resultados anteriormente analizados de forma disgregada, tanto para ectoENV-S como para ectoENV-L.

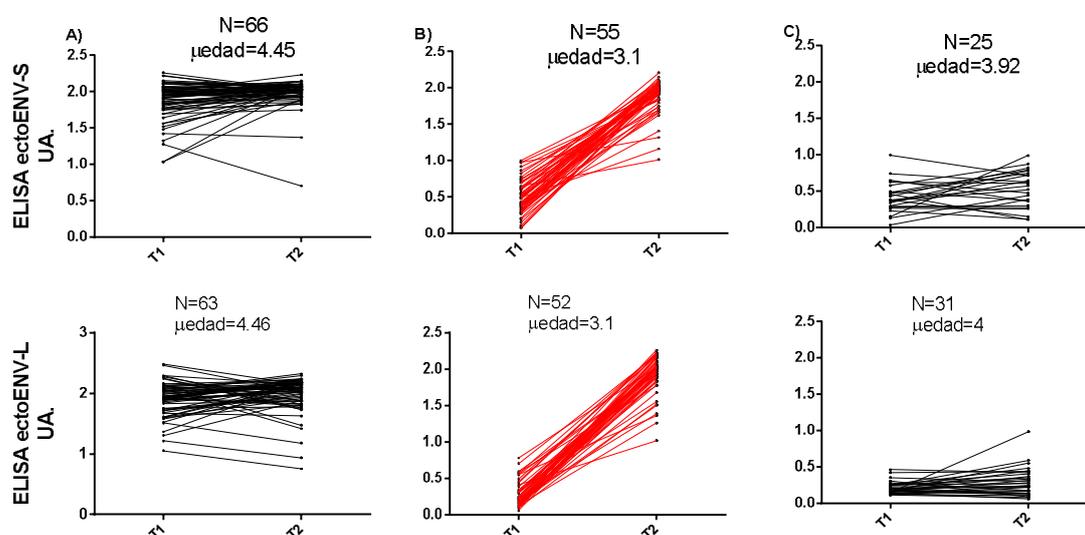


Figura 44. Bovinos en producción analizados en T1 y T2. Resultados del **ELISA ectoENV-S** (arriba) y **ELISA ectoENV-L** (abajo) obtenidos para cada bovino analizado tanto en T1 como en T2 respectivamente. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off, con lo cual resultados mayores a 1 son positivos y menores a 1 son negativos para ambos ELISAs. **A)** Bovinos positivos en T1. **B)** Bovinos negativos en T1 que se positivizaron en T2. **C)** Bovinos que persistieron negativos en T2. Sobre cada grafica se muestra el número de bovinos (N) y su media de edad en años (μ edad). Se consideró la edad de cada bovino en T1. **N=146. *UA: unidades arbitrarias.**

Destacamos de las Figuras 43 y 44 que ambas técnicas de ELISA presentan resultados congruentes de acuerdo a lo mostrado anteriormente. Vemos cómo el aumento del porcentaje de animales positivos ocurre a expensas de un grupo de bovinos que se positivizaron para ambas técnicas diagnósticas. De los bovinos positivos en T1 (tanto para ectoENV-S como para ectoENV-L), solo hay tres casos en los se obtienen resultados negativos en T2. Para el ELISA ectoENV-S, solo hay un suero bovino que resultó positivo en T1 y negativo en T2, y en ambos casos presentó valores de DO muy cercanos al *cut off*. Además, destacamos que es un suero negativo para la técnica de PCR en T1, mientras que para VMRD es positivo en T1 y negativo en T2. Para el ELISA ectoENV-L, hay dos bovinos que resultaron positivos en T1 y negativos en T2. En ambos casos se obtuvieron valores de DO muy cercanos al *cut off* en ambas oportunidades. Estos bovinos resultaron positivos para ambas técnicas serológicas (ELISA ectoENV-S y VMRD) y para la PCR en T1, siendo positivos para ambas técnicas serológicas en T2. En suma, ambos ELISAs se mostraron como técnicas robustas, constituyendo una herramienta biotecnológica que nos permitió describir el comportamiento de la población analizada a lo largo de un año (Figura 43-44).

2) Cambio de categoría productiva (pre-producción a producción).

Ya hemos visto como los bovinos en pre-producción constituyen una población de menor carga de LBE, pero que una vez incluidos en el ciclo productivo (al incorporarse a la población de bovinos en producción) muestran una seroconversión considerable a lo largo del tiempo (Figura 37). Nos interesó saber qué tan rápido aumenta la prevalencia de los bovinos en pre-producción una vez que se incorporan a la población de bovinos en producción. Para esto se realizaron dos seguimientos. En ambos casos se determinó la prevalencia para LBE de un subgrupo de bovinos en pre-producción y luego su prevalencia una vez que forman parte de la población de bovinos en producción. En un caso el intervalo de tiempo entre ambas medidas fue de 1 año, y en el otro de 2 años.

Seguimiento 1 año.

Un conjunto de 86 bovinos fue seguido a lo largo de un año en el cual cambiaron de categoría productiva, inicialmente fueron muestreados como

parte de la población de bovinos en **pre-producción (T0)**, y luego al cabo de 1 año lo fueron como parte de la población de bovinos **en producción (T1)**.

En T0 se obtuvieron muestras de sangre periférica para realización de pruebas serológicas (VMRD y ELISA ectoENV-S) y de células somáticas para realización de técnica de PCR. **En T1** se obtuvieron muestras de sangre periférica para realización de pruebas serológicas (VMRD, ELISA ectoENV-S) y de leche para realización del ELISA ectoENV-L.

1 año

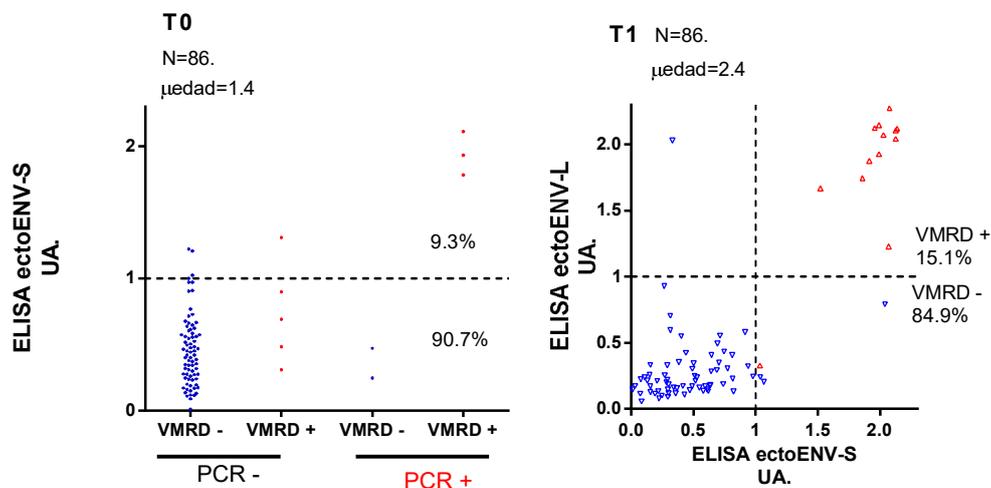


Figura 45. Seguimiento de bovinos de 1 año desde etapa de **pre producción (T0)** a etapa de **producción (T1)**. **A la izquierda (T0)** se muestran los resultados de los 86 bovinos testeados, durante su etapa de pre-producción. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off obtenida para el ELISA ectoENV-S y en abscisas los bovinos se encuentran agrupados de acuerdo al resultado para la técnica de PCR y para VMRD. **N=86**. *UA: unidades arbitrarias. **A la derecha (T1)** se muestran los resultados para los mismos 86 bovinos pero en producción. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-L y en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off del ELISA ectoENV-S. Para ambos ELISAs un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. Se encuentran representados en rojo aquellos sueros que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD – están de azul. En cada gráfica se aclara la media de edad y el porcentaje de bovinos positivos y negativos para la técnica de referencia (VMRD). **N=86**. *UA: unidades arbitrarias. * μ edad: media de la edad en años de la población de bovinos analizados.

Se analizó inicialmente una población de bovinos en pre producción (N=86) con una media de edad de 1,4 años. La concordancia entre los tres métodos utilizados (PCR, VMRD y ELISA ectoENV-S) fue la esperada de acuerdo a resultados previos. Se partió de una prevalencia para el método de referencia de 9,3%. Luego, transcurrido un año del relevamiento inicial (T0), se vuelven a analizar los mismos bovinos obteniéndose muestras de leche y suero para realización de VMRD, ELISA ectoENV-S y ectoENV-L. Los resultados mostraron un aumento de la prevalencia para el kit de referencia llegando a 15,1% (Figura 45).

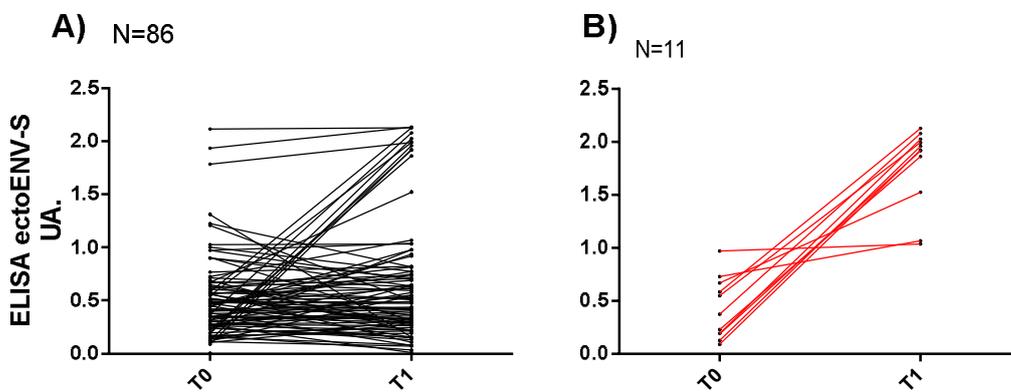


Figura 46. Seguimiento de bovinos a 1 año, desde etapa de pre producción (T0) a etapa de producción (T1). En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off obtenida para ELISA ectoENV-S de cada bovino analizado tanto en T0 como T1. Valores mayores a 1 son positivos mientras que valores menores a 1 son negativos. **N=86**. *UA: **unidades arbitrarias**. En A) se muestran todos los bovinos analizados, mientras que en B) sólo aquellos que se positizaron para ELISA ectoENV-S.

Surge de ambas figuras cómo nuestro ELISA ectoENV-S es capaz de describir el aumento de la prevalencia en la población de bovinos analizados. Se obtienen resultados congruentes, tanto en T0 como en T1, con los otros métodos diagnósticos utilizados. A su vez, podemos ver cómo el aumento de la cantidad de bovinos positivos en T1 se explica por nuevos bovinos que se positivan, y que aquellos bovinos positivos en T0 no cambian de signo. Destacamos que la población de bovinos analizados presenta en T1 una prevalencia baja con respecto a la población total de bovinos en producción, pero concordante con la media de la edad de la población analizada (2,4 años). Es decir, representan un conjunto de bovinos jóvenes con respecto al total de

los bovinos en producción del tambo, pero que sin embargo aumentan su prevalencia para LBE producto de su introducción en la situación de producción (Figuras 45 y 46).

Seguimiento 2 años.

Un conjunto de 142 bovinos fue seguido a lo largo de 2 años. Inicialmente fueron muestreados cuando formaban parte de la población de bovinos en pre-producción (T0), y luego fueron muestreados una vez que formaban parte de la población de bovinos en producción (T2). El intervalo de tiempo transcurrido entre T0 y T2 fue de 2 años.

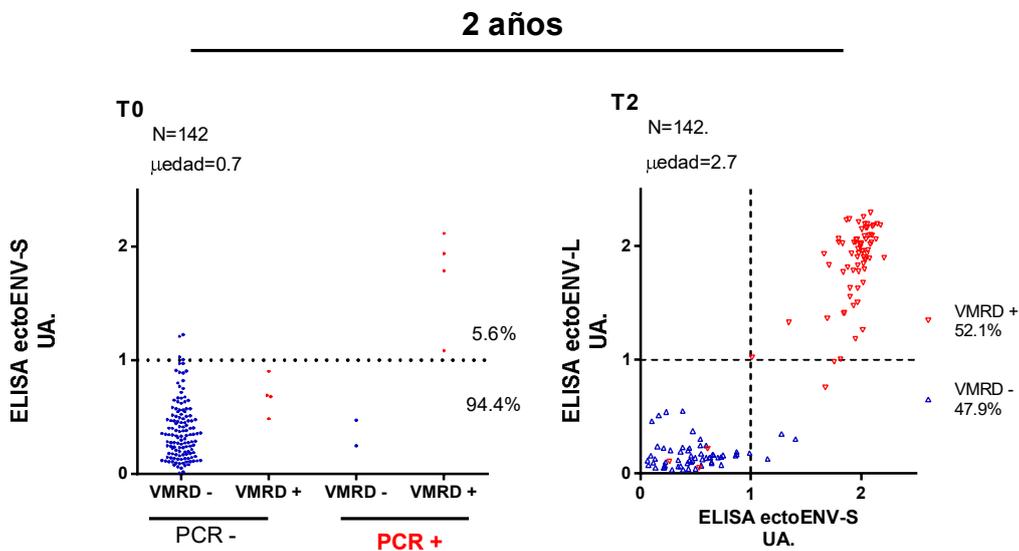


Figura 47. Seguimiento de bovinos a 2 años, desde etapa de **pre producción (T0)** a etapa de **producción (T2)**. **A izquierda (T0)** se muestran los resultados de los 142 bovinos testeados durante su etapa de pre-producción. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off obtenida para ELISA ectoENV-S, y en abscisas los bovinos se encuentran agrupados de acuerdo al resultado para la técnica de PCR y VMRD. **N=142. *UA: unidades arbitrarias. A derecha (T2)** se muestran los resultados para los mismos 142 bovinos pero como bovinos en producción. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off para ELISA ectoENV-L, mientras que en abscisas se grafica la DO normalizada por cut off para ELISA ectoENV-S. Para ambos ELISAs un valor de DO mayor a 1 es un resultado positivo, mientras que un valor menor a 1 es un resultado negativo. Se encuentran representados en rojo aquellos sueros que resultaron VMRD +, mientras que aquellos VMRD – están en azul. En cada gráfica se aclara la media de edad y el porcentaje de bovinos positivos y negativos para la técnica de referencia. **N=142. *UA: unidades arbitrarias.*μedad: media de la edad en años de la población de bovinos analizados.**

Se analizó inicialmente una población de bovinos en pre producción (N=142) con una media de edad de 0,7 años. La concordancia entre los tres métodos utilizados (PCR, VMRD y ELISA ectoENV-S) fue la esperada de acuerdo a resultados previos. Se partió de una prevalencia para el método de referencia de 5,6%. Destacamos que la prevalencia inicial para este conjunto de 142 bovinos es esperable que sea menor a la obtenida anteriormente (Figura 45, seguimiento 1 año), dado que son un conjunto de bovinos con una media de edad menor (0,7 *versus* 1,4). Luego de transcurridos dos años del relevamiento inicial (T0), se vuelven a analizar los mismos bovinos obteniéndose muestras de leche y suero (se realizó VMRD, ELISA ectoENV-S y ectoENV-L). Surge un aumento de la prevalencia para el kit de referencia llegando a 52,1% (Figura 47).

A continuación se analiza la evolución del resultado para el ELISA ectoENV-S de cada bovino de los 142 analizados.

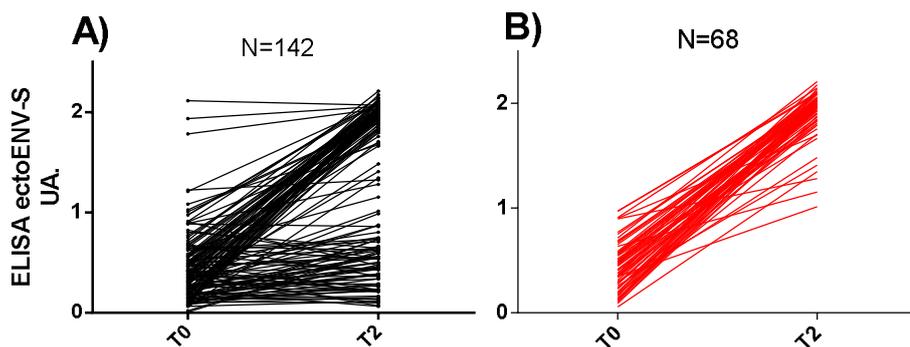


Figura 48. Seguimiento de bovinos a 2 años desde etapa de **pre producción (T0)** a etapa de **producción (T2)**. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off obtenida para el ELISA ectoENV-S de cada bovino analizado tanto en T0 como T2. Valores mayores a 1 son positivos, mientras que valores menores a 1 son negativos. **N=142**. *UA: unidades arbitrarias. En **A)** se muestran todos los bovinos analizados. En **B)** sólo aquellos que se positivizaron para ELISA ectoENV-S al cabo de 2 años **N=68**.

El aumento de la prevalencia para LBE en la población de bovinos analizada ocurre a expensas de un grupo de 68 bovinos que se positivizan para el ELISA ectoENV-S. Destacamos igualmente que ningún bovino positivo para ELISA ectoENV-S en T0 se negativiza en T2 (Figura 48).

¿Cuáles son los bovinos que se positivizan dentro de esta población?

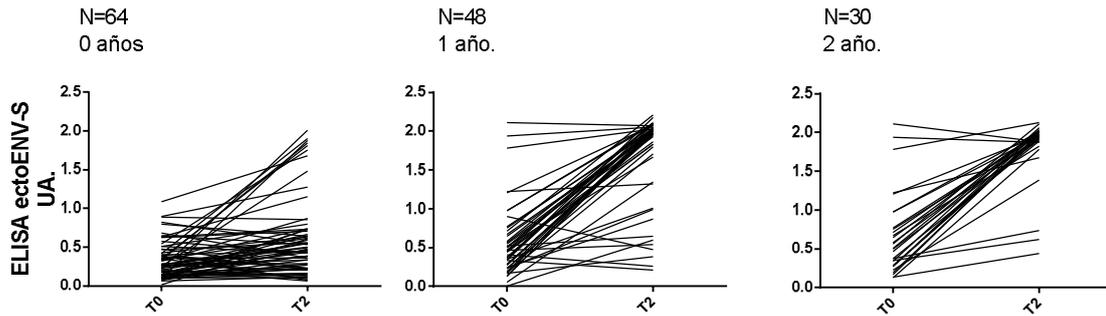


Figura 49. Seguimiento de bovinos a 2 años desde etapa de **pre producción (T0)** a etapa de **producción (T2)**. Se muestran los 142 bovinos testeados, agrupados de acuerdo a la edad en años en T0. En ordenadas se grafica la DO normalizada por cut off obtenida para el ELISA ectoENV-S de cada bovino analizado tanto en T0 como T2. Valores mayores a 1 son positivos, mientras que valores menores a 1 son negativos. **N=142**. *UA: unidades arbitrarias. En **A)** bovinos que tenían 0 años en T0. N=64. En **B)** bovinos que tenían 1 año en T0. N=48. En **C)** bovinos que tenían 2 años en T0. N=30.

Tabla 41. Resultados positivos para el ELISA ectoENV-S y VMRD de los 142 bovinos a los que se les realizó un seguimiento por 2 años. Se muestra la cantidad absoluta y relativa de los bovinos positivos tanto en T0 como T1 de cada cohorte etario para ambas técnicas serológicas. **N=142**.

Seguimiento 2 años.					
Edad(años)	N	T0		T2	
		VMRD	ectoENV-S	VMRD	ectoENV-S
0	64	2(3,1)	1(1,6)	9(14,1)	10(15,6)
1	48	4(8,3)	5(10,4)	39(81,3)	39(81,3)
2	30	2(6,7)	1(3,3)	26(86,7)	27(90)
total	142	8(5,6)	7(4,9)	74(52,1)	76(53,5)

La población de 142 bovinos adultos analizada en este punto durante su relevamiento inicial (T0), estaba compuesta por 64 bovinos de 0 años, 48 bovinos de 1 años y 30 bovinos de 2 años. Surge de la Figura 49 y Tabla 41, que el aumento de la prevalencia para LBE en la población analizada se concentra principalmente en los bovinos que tenían 1 y 2 años en T0. Dado que los bovinos adultos ingresan en producción cuando tienen aproximadamente 2 años, aquellos bovinos más jóvenes del grupo (0 años) son los que menor cantidad de tiempo han estado formando parte de la población de bovinos en producción al momento de realizarse el segundo relevamiento (T2). Por tanto, es esperable que el aumento de la prevalencia

global se concentre en los bovinos de 1 y 2 años (Figura 49). Así, se produjo un mayor aumento de la prevalencia para LBE en aquellos bovinos que mayor tiempo estuvieron formando parte de la población de bovinos en producción. Globalmente, en la población analizada al cabo de 2 años, se demuestra un notable aumento de la proporción de bovinos positivos, lo cual no sólo se explica por el ingreso a la población de bovinos en producción, sino también por un aumento global de la prevalencia de LBE del tambo (Figura 47).

3) Seguimiento extendido.

Un subconjunto de 66 bovinos fue seguido por 2 años. Inicialmente en su etapa de bovinos en pre producción (T0), y luego en su etapa de bovinos en producción 2 años consecutivos (T1 y T2 respectivamente). A continuación se muestran los resultados del ELISA ectoENV-S para cada instancia.

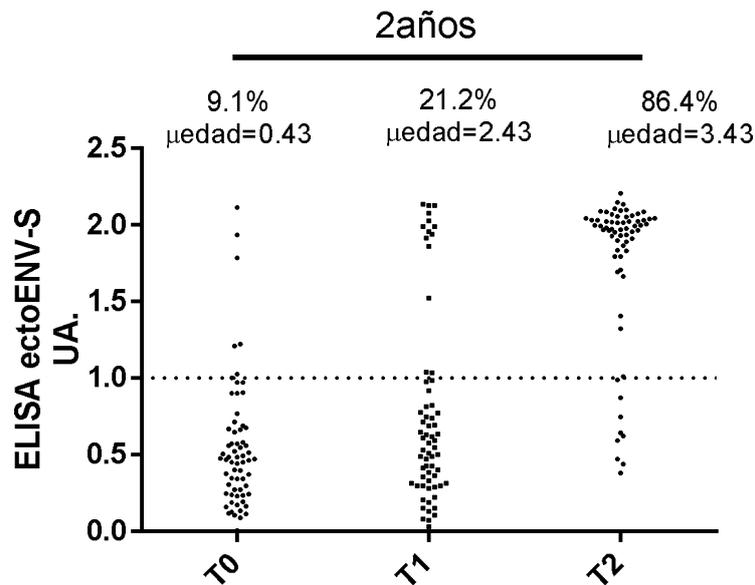


Figura 50. Resultados para el ELISA ectoENV-S de 66 bovinos en tres tiempos a lo largo de 2 años de seguimiento (T0, T1 y T2). En ordenadas se expresa el resultado de DO para el ELISA ectoENV-S normalizados por cut off, con lo cual valores mayores a 1 son positivos y menores a 1 negativos. Para cada instancia (T0, T1 y T2), arriba se expresa la media de la edad en años y el porcentaje de bovinos positivos para LBE. *UA: unidades arbitrarias. N=66.

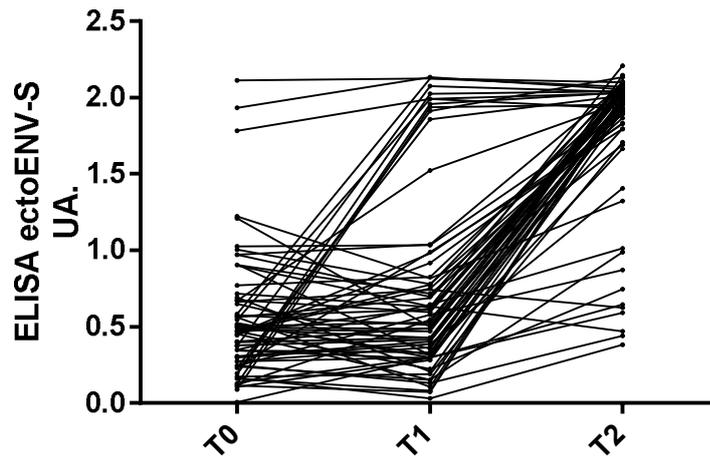


Figura 51. Subconjunto de 66 bovinos analizados durante la tres instancias de relevamiento (T0, T1 y T2 respectivamente). En ordenadas se expresa el resultado de DO para el ELISA ectoENV-S normalizado por cut off, con lo cual valores mayores a 1 son positivos y menores a 1 negativos. *UA: unidades arbitrarias. N=66

La media de edad de la población inicial en T0 fue de 0,43 años, presentando una prevalencia baja de 9,1%, aumentando luego su prevalencia en T1 a 21,2% y finalmente a 86.6 % en T2. El comportamiento observado es similar al descrito previamente. Partiendo de una población de bovinos en pre-producción con una prevalencia de un dígito, ésta aumenta considerablemente una vez que el bovino ingresa a la población de bovinos en producción. Entre T1 y T2 ocurrió en el tambo analizado un fenomenal aumento global de la prevalencia de causa multifactorial, que se objetiva cada vez que se compara la prevalencia para LBE entre T1 y T2 para la población de bovinos en producción. Esta situación también se refleja durante este seguimiento (Figuras 50 y 51).

Conclusiones y Discusión general.

Objetivo específico 1.

Hemos desarrollado un ELISA indirecto capaz de reconocer anticuerpos anti p24 a partir de muestras de suero bovino, de potencial utilidad en el diagnóstico de la LBE. Para esto, hemos partido desde la producción de la proteína recombinante en un sistema de *E.Coli*, pasando por la puesta a punto, cálculo de punto de corte y evaluación en el terreno. El análisis de las curvas ROC muestra que es un método diagnóstico con aceptables valores de sensibilidad y especificidad. Frente a una población definida como de verdaderos positivos y negativos, se obtuvo una sensibilidad de 88,12% y una especificidad de 90,3%, con un área bajo la curva de 0.9446.

Frente a otras técnicas serológicas se obtuvieron adecuados resultados de concordancia. Sin embargo, tanto frente a la técnica de referencia, como frente a los ELISAs ectoENV-S y ectoENV-L desarrollados por nosotros, se comportó sistemáticamente como una técnica con menor sensibilidad y especificidad. De todas formas, siempre presentó un índice kappa en el entorno de 0,7, lo que define un nivel de concordancia bueno. Por tanto, nuestro ELISA p24 es un test diagnóstico robusto, reproducible, confiable pero con niveles de sensibilidad y especificidad algo menores que aquellos que reconocen una respuesta anti gp51.

En cuanto a la relevancia del ELISA anti p24 como método diagnóstico, hay un escenario en el cual se vuelve una técnica relevante. Como se describe en la introducción, no hay vacunas aprobadas efectivas para VLB aunque se han hecho muchos intentos. La proteína gp51, dado su mayor inmunogenicidad, es esperable que forme parte integral de una eventual vacuna. Por tanto, una respuesta vaccinal sería generadora de una respuesta humoral anti gp51. De este modo, de existir una vacuna para VLB que contenga en su formulación a gp51 (y por ende, generadora de una respuesta humoral anti gp51), nuestro ELISA anti p24 podría aportar en diferenciar infecciones de respuestas asociadas a la vacunación. Actualmente es un escenario que no está planteado, pero parece posible en un futuro no muy lejano.

Objetivo específico 2.

Hemos desarrollado un ELISA indirecto capaz de reconocer anticuerpos anti ectoENV a partir de muestras de suero bovino. Al igual que para ELISA p24, se partió de la producción de la proteína recombinante, en este caso en un sistema eucariota. Se utilizó la misma proteína recombinante tanto para ELISA ectoENV-S como ELISA ectoENV-L.

Luego de la puesta a punto, se realizó un análisis ROC, obteniéndose frente a una población de verdaderos positivos y verdaderos negativos, una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97,76%, con un área bajo la curva de 0,9951. Luego se evaluó su desempeño en una población amplia de bovinos, obteniéndose un índice kappa de 0,898 con un IC95% de 0,877-0,918 y un error estándar de 0,01. Durante el análisis del Tambo 6, nuestro ELISA ectoENV-S se validó como herramienta diagnóstica confiable en cada instancia y cada población donde fue utilizada.

Objetivo específico 3.

Utilizando lo desarrollado para el ELISA ectoENV-S, se llevó a cabo un proceso análogo para el desarrollo de un sistema que permita el diagnóstico de LBE a partir de muestra de leche.

Luego de la puesta a punto, se realizó un análisis ROC con una población seleccionada, obteniéndose una sensibilidad de 96,76% y una especificidad de 98,18%, con un área bajo la curva de 0,9972. Del mismo modo, se evaluó su desempeño frente a diferentes técnicas serológicas, obteniéndose como medida de concordancia el índice kappa. Para la comparación con la técnica de referencia, este índice fue de 0,898 con un IC95% de 0,877-0,918 y un error estándar de 0,01.

Con respecto a los ELISAs desarrollados como parte de los objetivos específicos 2 y 3, no solo se han cumplido los mismos, sino que son herramientas que no permitieron luego describir con detalle las características de la infección por LBE en un tambo modelo.

Con respecto a la prevalencia de LBE, vimos que aún sin pretender realizar un muestreo exhaustivo de los rodeos lecheros nacionales, todos los rodeos evaluados tenían una presencia elevada de LBE, lo que indica la magnitud del

problema en cuanto a prevalencia, así como la dispersión y extensión territorial del mismo.

Objetivo específico 4.

Para el desarrollo del objetivo específico 4, evaluamos de forma sistemática y prolongada en el tiempo un tambo modelo. Para esto se utilizaron las herramientas desarrolladas previamente: ELISAs ectoENV-S y ectoENV-L.

Con respecto al Tambo 6 analizado, logramos describir la población de animales en pre producción como una población de menor prevalencia con respecto a la prevalencia global del tambo. A su vez, demostramos que, aún en un contexto de baja prevalencia, el porcentaje de bovinos positivos para LBE se relaciona con la edad del bovino. Del mismo modo, mostramos cómo una vez que el animal ingresa en la etapa de producción tiende a seropositivizarse. También pudimos mostrar cómo la población de bovinos en producción tiende a presentar la mayor carga de LBE del tambo, y que ésta a su vez se distribuye de forma desigual, siendo mayor cuanto más añoso es el bovino. En suma, observamos un comportamiento de la prevalencia de LBE que se relaciona con la situación productiva del bovino y su edad medida en años.

Por otra parte, asistimos a un aumento de la prevalencia para LBE en el tambo a lo largo de los dos años de seguimiento, concentrado principalmente en la población de bovinos en producción, planteando que este comportamiento es de causa multifactorial.

Con respecto a la herramientas utilizadas, demostramos que ambos ELISAs ectoENV-S y ectoENV-L fueron capaces de ofrecer resultados congruentes a lo largo del tiempo, permitiendo describir la evolución de la LBE en las diferentes poblaciones seguidas.

Discusión general.

Hemos contribuido a la visualización del problema de leucosis a nivel nacional mediante el desarrollo de tres técnicas diagnósticas y su utilización en diferentes rodeos nacionales.

Si bien no hemos realizado un estudio exhaustivo de prevalencia de la LBE en los rodeos nacionales, hemos demostramos la presencia de la infección por VLB en todos los rodeos evaluados. La misma presentó una amplia dispersión

territorial y un alto porcentaje de bovinos positivos por rodeo. Creemos que nuestra población muestral es de las más amplias publicadas a nivel de nuestro país. Por escapar a los objetivos de la presente tesis, queda pendiente el diseño de una población muestral que permita estimar la prevalencia de la LBE a nivel nacional.

Hemos desarrollado dos ELISAs indirectos para el diagnóstico de la infección por VLB mediante el reconocimiento de anticuerpos contra dos de sus proteínas estructurales principales, p24 y gp51. Como demostramos anteriormente, ambas técnicas resultaron ser robustas, eficaces y con gran reproducibilidad. Ambas herramientas presentan un alto nivel de desarrollo, desde la producción de la proteína recombinante hasta la evaluación en el terreno. A partir de ellas es planteable el desarrollo de kits comerciales para el diagnóstico de la infección por VLB. Destacamos la importancia estratégica de tener una herramienta propia para el diagnóstico LBE, capaz de ser utilizada en programas a gran escala para el control de la misma. Con respecto a los costos de producción, para ambos casos es mucho menor que cualquier kit comercial en el mercado.

El costo de la producción de las proteínas recombinantes p24 y ecto-ENV, partiendo del plásmido ya construido y la línea celular S2 estable, es muy bajo, explicándose mayormente por el material fungible y reactivos utilizados. Para el caso de la proteína p24, se obtiene a partir de 1L de cultivo, un rendimiento aproximado de 80mg de proteína, suficiente para sensibilizar más de 16.666 placas (4,8 μ g de proteína por placa), en las cuales es posible testear 1.533.272 muestras (92 muestras por placa). A su vez, el costo de producción de 1L de cultivo en cuanto a insumos no supera los 100USD, sin tener en cuenta el costo de mano de obra ni instalaciones del laboratorio.

Para el caso de ecto-ENV el rendimiento de 1L de cultivo es de aproximadamente 10mg de proteína, suficiente para sensibilizar unas 4.166 placas (2,4 μ g de proteína por placa), en las cuales se pueden testear 383.272 muestras. No superando el costo en cuanto a insumos los 100 USD, sin tener en cuenta otros aspecto de la estructura de costos.

El costo del anticuerpo secundario utilizado es de aproximadamente 200USD para un volumen de 2ml, suficiente para realizar 2.000 placas. A su vez, el costo de una placa de ELISA es de aproximadamente 1-3USD.

En suma, siendo conscientes de que el análisis de costos no es exhaustivo, y que no se consideran otros elementos de la estructura de costos como la infraestructura ya instalada en el laboratorio (estufas, columnas de purificación, capacidad instalada para realización de geles de agarosa, y concentración de proteínas), ni horas de trabajo, creemos que el costo por muestra testada es menor que el de cualquier kit comercial disponible en el mercado (entre 2 y 3 USD por muestra). Por tanto creemos que hemos desarrollado tres herramientas propias para el diagnóstico de LBE, capaces de ser utilizadas en el diagnóstico a gran escala de la misma, a un costo mucho menor que los kits diagnósticos existentes, y con una eficacia comparable, esto último especialmente cierto para ELISA ectoENV-S y ELISA ectoENV-L.

Los resultados obtenidos con el ELISA p24 son muy similares a los obtenidos recientemente por Bai y colaboradores¹²², donde desarrollaron un ELISA indirecto capaz de reconocer anticuerpos anti p24 para el diagnóstico de LBE. Tanto frente a una técnica serológica de referencia como frente a la técnica de PCR, nuestros resultados son comparables con los obtenidos por este grupo de investigadores, con valores de sensibilidad y especificidad muy similares. En suma, hemos desarrollado una herramienta capaz de reconocer en bovinos infectados por VLB una respuesta de anticuerpos anti p24, que si bien no supera aquellas técnicas diagnósticas que ponen en evidencia una respuesta humoral anti gp51, son concordantes con resultados de otros grupos.^{120,185} Por lo tanto, consideramos que es una herramienta fiable, robusta, comparable a otras desarrolladas, y con una potencialidad ante el eventual desarrollo de vacunas generadoras de respuestas anti gp51.

Con respecto al ELISA ectoENV, se utilizó como antígeno una proteína recombinante producida en un sistema eucariota, que desde el punto de vista conformacional es muy similar a la proteína nativa, con la posibilidad de trimerizar, y formar epítopes conformacionales. A su vez, por contar con el sitio furina mutado no se produce el clivaje entre la subunidad gp51 y gp30, con lo cual es posible reconocer respuestas contra ambos epítopes. La Dra Tomé ya mostró en su tesis doctoral que tanto la pérdida de la glicosilación así como de la subunidad gp30, se acompaña de una pérdida de la respuesta policlonal anti VLB. Por tanto, contamos con un antígeno capaz de presentarle a la respuesta policlonal anti VLB producto de la infección, una amplia gama de epítopes tanto

conformacionales, proteicos e incluso glucídicos capaces de ser reconocidos. La naturaleza del antígeno utilizado es un punto sustantivo que lo diferencia con la técnica de referencia utilizada. La técnica de referencia VMRD así como otros kits comerciales generalmente no aclaran la naturaleza del antígeno, su grado de pureza, ni su forma de producción. Por otro lado, en vistas al desarrollo de un futuro kit comercial a partir del ELISA ecto-ENV, la ductilidad de ser capaz de testar a partir de la misma placa tanto muestra de suero como de leche bovinas es de una enorme utilidad. Como dijimos anteriormente, el diagnóstico a partir de muestras de leche es una ventaja cualitativa enorme, dada por la menor exposición del bovino a la iatrogenia, y por la practicidad y menor costo asociado.

Con respecto al seguimiento epidemiológico en un tambo modelo experimental, se logró una adecuada coordinación inter-institucional, la cual permitió el seguimiento de cada bovino individual con una excelente trazabilidad. Los aspectos logísticos en cuanto a la extracción de las muestras biológicas por personal del establecimiento, y su posterior traslado a nuestro laboratorio para análisis y procesamiento, representaron tanto para los profesionales del tambo, como para nosotros, un aprendizaje en cuanto a cooperación y complementariedad necesaria como punto de partida para posteriores programas de control y diagnóstico de la LBE.

Desde el punto de vista epidemiológico, gracias a las herramientas utilizadas demostramos que aún en un tambo modelo experimental la prevalencia de LBE es alta, y que a su vez ésta tiende a aumentar con la edad del bovino, ocurriendo un salto una vez que el animal es introducido en la población de bovinos en producción. A su vez, demostramos un aumento de la prevalencia global del tambo analizado, especialmente en la población de bovinos en producción.

Perspectivas.

Producto de los resultados obtenidos, hemos desarrollado 2 trabajos de próxima publicación. Uno inicial sobre la puesta a punto y desarrollo de los tres ELISAs diagnósticos desarrollados. Y otro sobre la cinética y la evolución

temporal de la prevalencia de LBE en el tambo experimental evaluado con mayor detalle.

Por otra parte, los resultados han contribuido a la generación de un proyecto ALIANZA entre el Institut Pasteur de Montevideo, INIA (Instituto Nacional de Investigación agropecuario), MU (Instituto de Mejoramiento Lechero) y la empresa ATGen, que tiene por objetivo desarrollar a partir del ELISA ecto-ENV, un kit comercial para el diagnóstico de la LBE. Actualmente el proyecto se encuentra en pleno desarrollo, con resultados muy promisorios.

En el mismo sentido, la información generada y las herramientas desarrolladas podrían ser de utilizad para el diseño, desarrollo y puesta en práctica de un programa de control de la LBE a nivel nacional.

Agradecimientos.

Al Departamento de Inmunobiología, columna fundamental de mi formación como clínico.

A mis tutores, Sergio y Otto, y al resto del laboratorio (LA Momia, Martin, Natalia, Natalia, Mariana, y Gonza y Lore). Un equipo excluyente en mi formación global, sin el cual nunca hubiera llegado hasta esta instancia.

A Mamá, Papá, Mateo y Rossi.

A Sofí, y a Rossana, Matías, Carla y Raúl (no pudieron estar en anteriores agradecimientos).

Bibliografía.

1. Gillet N, Florins A, Boxus M, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4:18. doi:10.1186/1742-4690-4-18.
2. Polat M, Takeshima S, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology*. 2017;14(1):209. doi:10.1186/s12985-017-0876-4.
3. European OJ of the. 2009/761/EC Commission Decision. *Off J Eur Union*. 2009;(October):34-35.
4. Código Terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/>. Accessed April 3, 2016.
5. OIE 2009. OIE. World animal health information database-version: 1.4. Paris France: World organisation for animal Health; 2009.
6. More S, Bøtner A, Butterworth A, et al. Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL). *EFSA J*. 2017;15(8). doi:10.2903/j.efsa.2017.4956.
7. Rola-Luszczak M, Pluta A, Olech M, et al. The Molecular Characterization of Bovine Leukaemia Virus Isolates from Eastern Europe and Siberia and Its Impact on Phylogeny. *PLoS One*. 2013;8(3):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0058705.
8. EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J*. 2015;13(July):63. doi:10.2903/j.efsa.2015.
9. Chethanond U. The epidemiology of enzootic bovine leukosis in dairy cattle in New Zealand. 1999.
10. United States Department of Agriculture. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U . S . Dairy Operations , 2007. *United States Dep Agric*. 2008;(October).
11. Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D, Keefe G. Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev Vet Med*. 2016;133:1-9. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.09.011.
12. VanLeeuwen JA, Tiwari A, Plaizier JC, Whiting TL. Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can Vet J*. 2006;47(8):783-786.
13. Nekouei OA. Study of prevalence, risk factors, and lifetime impacts of infection with bovine leukemia virus in the Canadian dairy industry. 2015.
14. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*. 2011;3(7):1210-1248. doi:10.3390/v3071210.

15. Marín C, de López NM, Alvarez L, et al. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann Rech vétérinaires Ann Vet Res.* 1978;9(4):743-746.
16. Islas L. Armando; Inchaustieta S. Carlos; Muñoz P. Guillermo. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.12(1), julio 1990.
17. Alfonso R, Almansa JE, Barrera JC. [Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogotá savannah and the Ubaté and Chiquinquirá Valleys, Colombia]. *Rev Sci Tech.* 1998;17(3):723-732. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850543>.
18. Gonzalo Rama AM, y Pritsch O. Tesis de Maestría en Biotecnología.
19. Rama G, Moratorio G, Greif G, et al. Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection. *Retrovirology.* 2011;8(Suppl 1):A17. doi:10.1186/1742-4690-8-S1-A17.
20. Moratorio G, Fischer S, Bianchi S, et al. A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Vet Res.* 2013;44(1):19. doi:10.1186/1297-9716-44-19.
21. Trono KG, Pérez-Filgueira DM, Duffy S, Borca M V., Carrillo C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol.* 2001;83(3):235-248. doi:10.1016/S0378-1135(01)00420-5.
22. Monti GE, Frankena K, Engel B, Buist W, Tarabla HD, de Jong MCM. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2005;17(5):451-457.
23. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.* 2013;4(November):328. doi:10.3389/fmicb.2013.00328.
24. Atilio Mangold, Martín Maciel AA. Sanidad. Leucosis bovina. Diagnóstico, transmisión, control y prevención INTA. 1999.
25. Bendixen HJ. Leucosis in cattle in Denmark. III. Clinical picture of transmissible epidemic and sporadic forms. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1960;67:169-173.
26. MARSHAK RR, CORIELL LL, LAWRENCE WC, et al. Studies on bovine lymphosarcoma. I. Clinical aspects, pathological alterations, and herd studies. *Cancer Res.* 1962;22(2):202-217.
27. Florins A, Gillet N, Boxus M, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L. Even attenuated bovine leukemia virus proviruses can be pathogenic in sheep. *J Virol.* 2007;81(18):10195-10200. doi:10.1128/JVI.01058-07.
28. Willems L, Kerkhofs P, Dequiedt F, et al. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11532-11536.
29. Schwartz I, Lévy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res.* 1994;25(6):521-

- 536.
30. Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, et al. Provirus Variants of the Bovine Leukemia Virus and Their Relation to the Serological Status of Naturally Infected Cattle. *Virology*. 1997;237(2):261-269. doi:10.1006/viro.1997.8784.
 31. Miller J, Maaten M Van der. Bovine Leukosis Its Importance to the Dairy Industry in the United States. 1982:2194-2203. doi:10.3168/jds.S0022-0302(82)82482-X.
 32. Matsumoto Y, Ishikawa S, Nakamura Y, Kazunori K. Consumption of Dairy Products and Cancer Risks. 2007;141(2):587-592.
 33. EFSA - European Food Safety Authority. Annex A – Systematic review. 2015;13(7). doi:10.2903/j.efsa.2015.4188.
 34. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19(12):1105-1113. doi:10.1089/088922203771881202.
 35. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Yeon Choi K, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):772-782. doi:10.3201/eid2005.131298.
 36. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*. 2015;10(9):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0134304.
 37. Baltzell K, Shen H, Buehring G. Oncogenic viruses in nipple aspirate fluid: biomarkers for breast cancer risk assessment? *BMC Proc*. 2009;3(Suppl 5):S4. doi:10.1186/1753-6561-3-s5-s4.
 38. Lawson JS, Salmons B, Glenn WK. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein–Barr Virus (EBV). *Front Oncol*. 2018;8(January). doi:10.3389/fonc.2018.00001.
 39. Giovanna M, Carlos UJ, María UA, Gutierrez MF. Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open J Med Microbiol*. 2013;3:84-90. doi:10.4236/ojmm.2013.31013.
 40. Buehring GC, Shen H, Schwartz DA, Lawson JS. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. Coleman WB, ed. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179367. doi:10.1371/journal.pone.0179367.
 41. Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurty S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. *Cancer*. 2017. doi:10.1002/cncr.31169.
 42. Gillet NA, Willems L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*. 2016;13(1):75. doi:10.1186/s12977-016-0308-3.
 43. Forschner E, Bünger I, Krause HP. [Surveillance investigations of brucellosis-, leukosis- and BHV-free cattle herds. ELISA-based bulk milk studies compared to single animal

- sample studies with traditional test systems. Safety and cost]. *DTW Dtsch tierärztliche Wochenschrift*. 1988;95(5):214-218.
44. Knapen K, Kerkhofs P, Mammerickx M (Institut N de RVB (Belgium)). Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. *Ann Med Vet*. 1993.
 45. Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*. 2003;59(1-2):43-49. doi:10.1016/S0167-5877(03)00057-6.
 46. Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med*. 2007;82(1-2):83-89. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.05.010.
 47. Hayes D, Burton L. Enzootic bovine leucosis eradication scheme. *Surveillance*. 1998;25(4):8-11.
 48. Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 2014;244(8):914-922. doi:10.2460/javma.244.8.914.
 49. Ott SL, Johnson R, Wells SJ. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med*. 2003;61(4):249-262. doi:10.1016/j.prevetmed.2003.08.003.
 50. United States Department of Agriculture. High Prevalence of BLV in U.S Dairy Herds. 1996.
 51. United States Department of Agriculture. Bovien Leukosis Virus in U. S Beef Cattle. 1997.
 52. Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB, Jefferson B. 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* 1995;59(4):271-278.
 53. van Leeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R, Power C, Wichtel JJ. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus and bovine viral diarrhoea virus in Maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*. 2001;42(3):193-198.
 54. VanLeeuwen JA, Forsythe L, Tiwari A, Chartier R. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J*. 2005;46(January):56-58.
 55. Scott HM, Sorensen O, Wu JTY, Chow EYW, Manninen K, VanLeeuwen JA. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhoea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J*. 2006;47(10):981-991. doi:10.1590/S0036-46652011000100003.
 56. Wang CT. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci*. 1991;53(3):395-398.

57. Meas S, Ohashi K, Tum S, et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci.* 2000;62(7):779-781. doi:10.1292/jvms.62.779.
58. Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K ichiro, Yamamoto T, Tsutsui T. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol.* 2011;148(1):84-88. doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.001.
59. Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutsui T. Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011. *J Vet Med Sci.* 2013;75(8):1123-1126. doi:10.1292/jvms.12-0374.
60. Suh GH, Lee JC, Lee CY, et al. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. *J Vet Sci.* 2005;6(3):227-230. doi:200509227 [pii].
61. Hafez SM, Sharif M, Al-Sukayran A, Dela-Cruz D. Preliminary studies on enzootic bovine leukosis in Saudi dairy farms. *DTW Dtsch tierärztliche Wochenschrift.* 1990;97(2):61-63.
62. Meas S, Seto J, Sugimoto C, et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci.* 2000;62(3):329-331.
63. Burgu I, Alkan F, Karaoglu T, et al. Control and eradication programme of enzootic bovine leucosis (EBL) from selected dairy herds in Turkey. *DTW Dtsch tierärztliche Wochenschrift.* 2005;112(7):271-274.
64. Brujeni GN, Poorbazargani TT, Nadin-Davis S, Toloioe M, Barjesteh N. Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle. *J Infect Dev Ctries.* 2010;4(9):576-579.
65. Puentes R, De Brun L, Algorta A, et al. Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res.* 2016;12(1):119. doi:10.1186/s12917-016-0749-x.
66. Gillet NA, Gutiérrez G, Rodríguez SM, et al. Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(10). doi:10.1371/journal.ppat.1003687.
67. Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, et al. Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol.* 2011;151(3-4):255-263. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.035.
68. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J Dairy Res.* 2012;79(4):445-450. doi:10.1017/S0022029912000520.
69. Roberts DH, Lucas MH, Wibberley G, Chasey D. An investigation into the susceptibility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by various routes. *Vet Rec.* 1982;110(10):222-224.
70. Thurmond MC, Portier KM, Puhr DM, Burrige MJ. A prospective investigation of bovine leukemia virus infection in young dairy cattle, using survival methods. *Am J Epidemiol.* 1983;117(5):621-631.

71. Weber AF, Moon RD, Sorensen DK, et al. Evaluation of the stable fly (*Stomoxys calcitrans*) as a vector of enzootic bovine leukosis. *Am J Vet Res.* 1988;49(9):1543-1549.
72. Hopkins SG, DiGiacomo RF, Evermann JF, Christensen JD, Deitelhoff DP, Mickelsen WD. Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(8):1035-1038.
73. Sprecher DJ, Pelzer KD, Lessard P. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199(5):584-588.
74. DiGiacomo RF, Darlington RL, Evermann JF. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. *Can J Comp Med.* 1985;49(3):340-342.
75. Lassauzet ML, Thurmond MC, Johnson WO, Stevens F, Picanso JP. Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Can J Vet Res.* 1990;54(1):184-189.
76. Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med.* 2015;119(3-4):105-113. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.02.025.
77. Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(3-4):103-114. doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.014.
78. Brenner J, Van-Haam M, Savir D, Trainin Z. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet Immunol Immunopathol.* 1989;22(3):299-305. doi:10.1016/0165-2427(89)90017-2.
79. Trainin Z, Brenner J, Meirum R, Ungar-Waron H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;54(1-4):293-302. doi:10.1016/S0165-2427(96)05706-6.
80. Amills M, Ramiya V, Norimine J, Olmstead C a, Lewin H a. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. *Virology.* 2002;304(1):1-9. doi:S004268220291651X [pii].
81. Pyeon D, Splitter GA. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J Virol.* 1998;72(8):6917-6921.
82. Sordillo LM, Hicks CR, Pighetti GM. Altered interleukin-2 production by lymphocyte population from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;207(3):268-273. doi:10.3181/00379727-207-43815.
83. Trueblood ES, Brown WC, Palmer GH, Davis WC, Stone DM, McElwain TF. B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J Virol.* 1998;72(4):3169-3177.
84. Stone DM, Hof AJ, Davis WC. Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected

- lymphocytotic cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;48(1-2):65-76.
85. Meirum R, Moss S, Brenner J. Bovine leukemia virus-gp5 1 antigen expression is associated with CDS and IgM markers on infected lymphocytes. 1997;59:113-119.
 86. Isaacson JA, Flaming KP, Roth JA. Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;64(3):235-248.
 87. Teutsch MR, Lewin HA. Aberrant expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;53(1-2):87-94. doi:10.1016/0165-2427(96)05558-4.
 88. Klener P, Szydal M, Cleuter Y, et al. Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus tax-responsive genes in ovine B cells. *J Virol.* 2006;80(4):1922-1938. doi:10.1128/JVI.80.4.1922.
 89. Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM, Sordillo LM. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int.* 2011;2011:915747. doi:10.4061/2011/915747.
 90. Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, et al. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J Immunol.* 2008;181(2):891-898. doi:181/2/891 [pii].
 91. Konnai S, Suzuki S, Shirai T, et al. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(1):63-69. doi:10.1016/j.cimid.2012.09.005.
 92. Shirai T, Konnai S, Ikebuchi R, et al. Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144(3-4):462-467. doi:10.1016/j.vetimm.2011.08.018.
 93. Okagawa T, Konnai S, Ikebuchi R, et al. Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection. *Vet Res.* 2012;43(1):1. doi:10.1186/1297-9716-43-45.
 94. Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, et al. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via PD-L1 blockade. *Vet Res.* 2011;42(1):103. doi:10.1186/1297-9716-42-103.
 95. Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, et al. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Vet Res.* 2013;44(1):1. doi:10.1186/1297-9716-44-59.
 96. Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, et al. Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol Immunol.* 2013;57(8):600-604. doi:10.1111/1348-0421.12073.
 97. Lundberg P, Splitter GA. gammadelta(+) T-Lp6phocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus

- infection in the natural host. *J Virol.* 2000;74(18):8299-8306. doi:10.1128/JVI.74.18.8299-8306.2000.
98. Florins A, Reichert M, Asquith B, et al. Earlier onset of ??-retrovirus-induced leukemia after splenectomy. *PLoS One.* 2009;4(9):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0006943.
 99. Werling D, Howard CJ, Niederer E, Straub OC. Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes r macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus. 1998:185-195.
 100. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the ?? and ?? subunits in the functions of integrin ??M???. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1336-1345. doi:10.1074/jbc.M406968200.
 101. Veri MC, Gorlatov S, Li H, et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fc??-receptor IIB (CD32B) from the activating Fc??-receptor IIA (CD32A): Biochemical, biological and functional characterization. *Immunology.* 2007;121(3):392-404. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02588.x.
 102. OIE. OIE - Leucosis bovina enzoótica. 2012:792-804.
 103. OIE. *CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES TERRESTRES.*; 2012.
 104. Europea DO de la U. 2009/97/UE. *D Of la Union Eur.* 2009;(3):36-41.
 105. Flensburg JC, Streyffert B. The control of bovine leukosis in denmark, Epidemiologic and diagnostic aspects. *Nord Vet Med.* 1977;29(2):49-67.
 106. Bendixen HJ. Leucosis in cattle in Denmark. II. Pathogenesis and endemic status. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1960;67:57-63.
 107. Götze et al. 1954.
 108. Aida Y, Miyasaka M, Okada K, et al. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *Am J Vet Res.* 1989;50(11):1946-1951.
 109. Kurdi A, Blankenstein P, Marquardt O, Ebner D. [Serologic and virologic investigations on the presence of BLV infection in a dairy herd in Syria]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1999;112(1):18-23.
 110. Jimba M, Takeshima S-N, Murakami H, et al. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res.* 2012;8:167. doi:10.1186/1746-6148-8-167.
 111. Naif HM, Brandon RB, Daniel RC, Lavin MF. Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 1990;25(2-3):117-129. doi:10.1016/0378-1135(90)90071-3.
 112. Portetelle D, BRUCK C, MAMMERICK M, BURNY A. USE OF MONOCLONAL ANTIBODY IN AN ELISA TEST FOR THE DETECTIDN OF ANTIBODIES TO BOVINE LEUKAEMIA VIRUS. 1982.
 113. Ban J, Gieciova E, Orlik O, Altaner C. Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *J Virol Methods.* 1990;30(1):79-87. doi:10.1016/0166-0934(90)90045-H.

114. Knapen AK, Kerkhofs P, Thiry E, Mammerickx M, Epidemiology S, Dec N. Epidemiological Evaluation of a Monoclonal ELISA Detecting Antibodies against Bovine Leukaemia Virus in Serum Pools. 1994;113(3):563-569.
115. Gutierrez SE, Dolcini GL, Arroyo GH, Rodriguez Dubra C, Ferrer JF, Esteban EN. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res.* 2001;62(10):1571-1577.
116. Troiano LDC, Thomaz-Soccol V, Agottani JVB, Brodzinski J, Penha TR, Ozaki SC. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. *Biores Open Access.* 2013;2(1):55-60. doi:10.1089/biores.2012.0295.
117. Walsh RB, Kelton DF, Hietala SK, Duffield TF. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and Serum samples for detection of neosporosis and leukosis in lactating dairy cows. *Can Vet J.* 2013;54(4):347-352.
118. Portetel D, Mammerickx M, Burny A. Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51. *J Virol Methods.* 1989;23:211-222.
119. Molloy JB, Walker PJ, Baldock FC, Rodwell BJ, Cowley J a. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle. *J Virol Methods.* 1990;28(1):47-57. doi:10.1016/0166-0934(90)90086-U.
120. Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol.* 2009;137(3-4):224-234. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.022.
121. Larsen A, Gonzalez ET, Serena MS, Echeverría MG, Mortola E. Expression of p24 gag protein of bovine leukemia virus in insect cells and its use in immunodetection of the disease. *Mol Biotechnol.* 2013;54(2):475-483. doi:10.1007/s12033-012-9587-7.
122. Bai L, Yokoyama K, Watanuki S, Ishizaki H, Takeshima S, Aida Y. Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. *Arch Virol.* 2018. doi:10.1007/s00705-018-4058-5.
123. Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, Kelton DF, Hutchins WA, Meer FJUM Van Der. Short communication: Evaluation of 5 different ELISA for the detection of bovine leukemia virus antibodies. *J Dairy Sci.* 2018:1-5. doi:10.3168/jds.2017-13626.
124. Burrige MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can J Comp Med Rev Can Med Comp.* 1982;46(3):270-271.
125. Schoepf KC, Kapaga AM, Msami HM, Hyera JM. Serological evidence of the occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) virus infection in cattle in Tanzania. *Trop Anim Health Prod.* 1997;29(1):15-19.
126. Zaghawa A, Beier D, Abd El-Rahim IHA, et al. An outbreak of enzootic bovine leukosis in upper Egypt: Clinical, laboratory and molecular-epidemiological studies. *J Vet Med Ser*

- B. 2002;49(3):123-129. doi:10.1046/j.1439-0450.2002.00517.x.
127. Florent G, Delgoffe JC, Zygraich N. Detection of Antibodies to Bovine Leukemia Virus in Bovine Milk Samples with an ELISA involving Two Monoclonal Antibodies. 1988;18:89-93.
 128. Poli G, Balsari A, Toniolo A, Ponti W, Vacirca G. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for bovine leukemia virus antibody. *J Clin Microbiol.* 1981;13(1):46-48.
 129. Klintevall K, Näslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods.* 1991;33(3):319-333. doi:10.1016/0166-0934(91)90032-U.
 130. Fukai K, Sato M, Kawara M, et al. A case of an embryo transfer calf infected with bovine leukemia virus from the recipient cow. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1999;46(8):511-515.
 131. Levy D, Deshayes L, Parodi AL, et al. Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. II. Radioimmunoassay with the major structural protein (BLV p24). *Int J cancer.* 1977;20(4):543-550.
 132. Nguyen VK, Maes RF. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):979-981.
 133. Tajima S, Ikawa Y, Aida Y. Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J Virol.* 1998;72(9):7569-7576.
 134. Tajima S, Tsukamoto M, Aida Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. *J Virol.* 2003;77(7):4423-4430.
 135. Somura Y, Sugiyama E, Fujikawa H, Murakami K. Comparison of the copy numbers of bovine leukemia virus in the lymph nodes of cattle with enzootic bovine leukosis and cattle with latent infection. *Arch Virol.* 2014;159(10):2693-2697. doi:10.1007/s00705-014-2137-9.
 136. Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J Virol Methods.* 2004;115(2):167-175. doi:10.1016/j.jviromet.2003.09.029.
 137. Jimba M, Takeshima S, Matoba K, Endoh D, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology.* 2010;7(1):91. doi:10.1186/1742-4690-7-91.
 138. Tawfeeq MM, Horiuchi N, Kobayashi Y, Furuoka H, Inokuma H. Evaluation of gene expression in peripheral blood cells as a potential biomarker for enzootic bovine leukosis. *J Vet Med Sci.* 2013;75(9):1213-1217.
 139. Brym P, Ruśc A, Kamiński S. Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia-virus infected

- cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;153(3-4):302-307. doi:10.1016/j.vetimm.2013.03.004.
140. Takeshima S, Kitamura-Muramatsu Y, Yuan Y, Polat M, Saito S, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR-2: improvements to the BLV-CoCoMo-qPCR assay for bovine leukemia virus by reducing primer degeneracy and constructing an optimal standard curve. *Arch Virol.* 2015;160(5):1325-1332. doi:10.1007/s00705-015-2377-3.
141. Nishimori A, Konnai S, Ikebuchi R, et al. Direct polymerase chain reaction from blood and tissue samples for rapid diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci.* 2016;78(5):791-796. doi:10.1292/jvms.15-0577.
142. Takeshima S, Watanuki S, Ishizaki H, Matoba K, Aida Y. Development of a direct blood-based PCR system to detect BLV provirus using CoCoMo primers. *Arch Virol.* 2016;161(6):1539-1546. doi:10.1007/s00705-016-2806-y.
143. Monti GE, Frankena K. Survival analysis on aggregate data to assess time to sero-conversion after experimental infection with Bovine Leukemia virus. *Prev Vet Med.* 2005;68(2-4):241-262. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.009.
144. Kettmann R, Meunier-Rotival M, Cortadas J, et al. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(10):4822-4826.
145. Kelly EJ, Jackson MK, Marsolais G, Morrey JD, Callan RJ. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res.* 1993;54(2):205-209.
146. Jacobs RM, Song Z, Poon H, et al. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can J Vet Res.* 1992;56(4):339-348.
147. Agresti A, Ponti W, Rocchi M, et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res.* 1993;54(3):373-378.
148. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol.* 1994;39(3-4):313-321. doi:10.1016/0378-1135(94)90167-8.
149. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 2012;95(2):727-734. doi:10.3168/jds.2011-4760.
150. Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee a, Ledergerber JT, Erskine RJ. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 2013;96(3):1591-1597. doi:10.3168/jds.2012-5930.
151. Thurmond MC, Holmberg CH, Picanso JP. Antibodies to bovine leukemia virus and presence of malignant lymphoma in slaughtered California dairy cattle. *J Natl Cancer Inst.* 1985;74(3):711-714.
152. SERVICE FSAI, AGRICULTURE USDO. ADRS FY 2002 | FSIS Electronic Reading Room. <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/adrsdata/2002/adrsfy02.htm>. Accessed April 20, 2016.

153. Migaki G. Hematopoietic Neoplasms of Slaughter Animals. 1969.
154. White TL, Moore DA. Reasons for whole carcass condemnations of cattle in the United States and implications for producer education and veterinary intervention. *J Am Vet Med Assoc.* 2009;235(8):937-941. doi:10.2460/javma.235.8.937.
155. SMITH HA. THE PATHOLOGY OF MALIGNANT LYMPHOMA IN CATTLE. A STUDY OF 1113 CASES. *Pathol Vet.* 1965;2:68-93.
156. DA Y, SHANKS RD, STEWART JA, LEWIN HA. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Tissue Antigens.* 2013;90(14):72-82. doi:10.1111/tan.12041.
157. Wu MC, Shanks RD, Lewin HA. Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(3):993-996.
158. Jacobs RM, Heeney JL, Godkin MA, et al. PRODUCTION AND RELATED VARIABLES LEUKAEMIA VIRUS-INFECTED COWS IN BOVINE those with persistent lymphocytosis , a benign lymphoproliferative infection , produced significantly less fat than expected by genetic analysis , and had a. *Vet Res.* 1991;15:463-474.
159. Pollari FL, Wangsuphachart VL, DiGiacomo RF, Evermann JF. Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can J Vet Res.* 1992;56(4):289-295.
160. Da Y, Shanks RD, Stewart JA, Lewin HA. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(14):6538-6541.
161. Sargeant JM, Kelton DF, Martin SW, Mann ED. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev Vet Med.* 1997;31:211-221. doi:DOI: 10.1016/S0167-5877(96)01140-3.
162. Kale M, Bulut O, Yapkiç O, et al. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 2007;78(3):130-132.
163. Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, et al. Production Effects of Pathogens Causing Bovine Leukosis, Bovine Viral Diarrhea, Paratuberculosis, and Neosporosis. *J Dairy Sci.* 2007;90(2):659-669. doi:10.3168/jds.S0022-0302(07)71548-5.
164. Sorge US, Lissemore K, Cantin R, Kelton DF. Short communication: Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2011;94(10):5062-5064. doi:10.3168/jds.2011-4339.
165. Norby B, Bartlett PC, Byrem TM, Erskine RJ. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016:1-10. doi:10.3168/jds.2015-10089.
166. Heald MTS, Waltner-Toews D, Jacobs RM, Bruce McNab W. The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario. *Prev Vet Med.* 1992;14(1-2):45-55.

- doi:10.1016/0167-5877(92)90083-R.
167. Tiwari A, Haddad JPA, Dohoo IR, Vanleeuwen JA, Keefe GP, Tremblay R. Effects of seropositivity for agents causing Enzootic Bovine Leukosis, Neosporosis, and Johne's disease on calving to conception interval in Canadian dairy cows. *Proc 10th Int Symp Vet Epidemiol Econ* 2003. 2003;53(9):1689-1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 168. Thurmond MC, Maden CB, Carter RL. Cull Rates of Dairy Cattle with Antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Cancer Res.* 1985;45(5):1987-1989. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/45/5/1987.short>.
 169. Pollari FL, DiGiacomo RF, Evermann JF. Use of survival analysis to compare cull rates between bovine leukemia virus seropositive and seronegative dairy cows. *Am J Vet Res.* 1993;54(9):1400-1403.
 170. Gutiérrez G, Rodríguez SM, De Brogniez A, et al. Vaccination against ??-retroviruses: The bovine leukemia virus paradigm. *Viruses.* 2014;6(6):2416-2427. doi:10.3390/v6062416.
 171. Esteban EN, Poli M, Poiesz B, et al. B Ovine L Eukemia V Irus (Blv), P Roposed C Ontrol and E Radication P Rograms By M Arker a Ssisted B Reeding of G Enetically R Esistant C Attle. *Anim Genet.* 2009;(July):1-25.
 172. Juliarena MA, Lendez PA, Gutierrez SE, Forletti A, Rensetti DE, Ceriani MC. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. *Arch Virol.* 2013;158(1):63-70. doi:10.1007/s00705-012-1459-8.
 173. Bendixen HJ (Royal V and AUC (Denmark). I for F and SVM. Enzootic bovine leukosis. Comprehensive report. In: *13. Conference de La Commission Regionale de l'OIE Pour l'Europe. Transfert d'embryons. Peste Porcine Africaine. Leucose Bovine Enzootique, Madrid (Spain), 27-30 Sep 1988.* OIE; 1989.
 174. Viltrop A, Laht T. The historical background of the control of enzootic bovine leukosis in Estonia. *Rev Sci Tech.* 1996;15(3):1007-1020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9025146>. Accessed April 16, 2016.
 175. Obal G. Bases Biofísicas Y Estructurales Del Ensamblado De La Cápside Retroviral: Virus De La Leucemia Bovina. 2014:136.
 176. Tesis Doctorado Lorena Tome. Estudio de la interacción entre el Virus de la Leucemia Bovina y la célula hospedera.
 177. *Catalog. VMRD.* www.vmr.com. Accessed September 18, 2018.
 178. Adams S. *BLV Update.*; 2009. <https://www.vmr.com/core/files/vmr/library/48a23f21a12e4babda16098d964ee67b.pdf> . Accessed September 18, 2018.
 179. Fechner H, Kurg A, Geue L, et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1996;43(10):621-630.
 180. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical

- Diagnostic Test Evaluation. *Casp J Intern Med.* 2013;4(2):627-635.
181. Czodrowski P. Count on kappa. *J Comput Aided Mol Des.* 2014;28(11):1049-1055. doi:10.1007/s10822-014-9759-6.
182. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005;85(3):257-268.
183. Yang Z, Zhou M. Kappa statistic for clustered matched-pair data. *Stat Med.* 2014;33(15):2612-2633. doi:10.1002/sim.6113.
184. Agresti A. Modelling patterns of agreement and disagreement. *Stat Methods Med Res.* 1992;1(2):201-218. doi:10.1177/096228029200100205.
185. Jaramillo Ortiz J, Montenegro V, de la Fournière S, Sarmiento N, Farber M, Wilkowsky S. Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Vet Sci.* 2018;5(1):13. doi:10.3390/vetsci5010013.