

01672  
11  
2ej

LINFOSARCOMA BOVINO EN LA CUENCA LECHERA  
DE TIZAYUCA HIDALGO, MEXICO (ESTUDIO CITOQUIMICO  
INMUNOLOGICO Y BIOQUIMICO).

Tesis presentada ante la  
División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la  
Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del grado de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

(PA. A)

POR

JUAN IGNACIO MONROY BASILIO

APROBADA POR

1990

Dra. ALINE S. DE ALUJA      Dr. FRANCISCO TRIGO TAVERA

Dra. ROSA MARIA GARCIA E.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

### RESUMEN

	PAGINAS
I. INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	8
II. HIPOTESIS.....	15
III. OBJETIVO GENERAL.....	15
IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
V. MATERIAL Y METODOS.....	17
VI. RESULTADOS.....	20
1. SEROLOGIA.....	20
2. BIOMETRIA HEMATICA.....	20
3. GLOBULINAS.....	21
4. DESHIDROGENASA LACTICA.....	21
5. CALCIO Y FOSFORO.....	22
6. CITOQUIMICA.....	22
7. CUADROS.....	23
8. FIGURAS.....	28
VII. DISCUSION.....	38
VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. BIBLIOGRAFIA.....	47

## 1. INTRODUCCION

El Linfomasarcoma Enzootica Bovino (LEB) en su forma clínica, es un padecimiento neoplásico fatal producido por un Retrovirus tipo C y caracterizado por la proliferación y agregación de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, con la correspondiente variación de las manifestaciones clínicas<sup>66</sup>. Otros términos que frecuentemente se utilizan como sinónimos son: Leucosis (refiriéndose al aumento de linfocitos sanguíneos), linfomasarcoma, linfoma, hemoblastosis, linfoblastoma, linfadenosis, linfomatosis, linfoma maligno, linfocitoma, leucosis viral bovina, complejo viral leucosis linfomasarcoma, leucemia bovina aunque este último término no es correcto desde el punto de vista patológico, ya que éste tipo de reacciones ocurren en otros padecimientos en el ganado<sup>24</sup>.

Se han publicado múltiples estudios con relación a la clasificación de esta enfermedad denotando dos formas importantes: Leucosis Enzootica Bovina (LEB), que se presenta en ganado mayor de tres años y Leucosis Esporádica Bovina, la cual a su vez se subdivide en tres categorías según su presentación; Juvenil, Tímica y Cutánea. En la Leucosis Esporádica no se ha podido demostrar la presencia del Retrovirus Tipo C<sup>20,66</sup>.

Dentro del complejo de Leucosis Enzootica Bovina, se puede considerar al LEB como la enfermedad neoplásica maligna más frecuente del ganado bovino, aunque sólo una pequeña fracción probablemente menor al 10% del total de animales portadores

sanos asintomáticos a la infección del virus de la leucosis bovina (VLB) desarrollan LEB y alrededor de un 29 % presentan la forma benigna de linfocitosis persistente (LP) <sup>20,24,61</sup>.

De acuerdo a la revisión histórica elaborada por Bendixen <sup>8,p</sup>, el LEB fue descrito por primera vez en Alemania en 1878. A principios del siglo XX múltiples estudios indicaron que en algunos hatos la enfermedad ocurría únicamente en pequeños grupos de animales. Posteriores investigaciones permitieron el desarrollo de cuadros o claves hematológicas de referencia, pero estas fueron pruebas poco eficaces para los propósitos de investigaciones epidemiológicas y de estudios experimentales <sup>8,p,20,24,70</sup>.

Actualmente las estadísticas sobre la LEB en el mundo no son exactas, ya que sólo en algunos países es un padecimiento de denuncia obligatoria <sup>24</sup>. En los continentes Europeo y Asiático, la enfermedad se encuentra distribuida ampliamente <sup>30</sup>. En Dinamarca un 20% de animales son seropositivos a VLB. Porcentajes similares se existen en Italia <sup>70</sup>, Francia <sup>40</sup>, Inglaterra <sup>16</sup>, Bélgica <sup>54</sup>, Yugoslavia <sup>36</sup>, Rusia <sup>81</sup>, India <sup>82</sup>, Japón <sup>32</sup> y varios países más <sup>24</sup>.

En el continente Americano se han realizado estudios de seroprevalencia. Se estima que el 20% de los bovinos lecheros en los E.U.A., están infectados con el virus y en un porcentaje menor el ganado de engorda. También se considera que es la principal causa de los decomisos por tumores, con las consecuentes pérdidas económicas directas calculadas en

más de siete millones de dólares anuales<sup>24,83,63</sup>. En Canadá fueron estudiados sueros de bovinos productores de leche encontrándose una prevalencia de 10%. Marín et al.<sup>56</sup>, determinaron 21% de seropositividad en el ganado bovino productor de carne en Venezuela. Igualmente se ha detectado la enfermedad mediante estudios serológicos en Brasil<sup>28,30</sup>, Colombia<sup>24</sup> y Argentina<sup>24</sup>.

Por lo expuesto puede apreciarse que el virus y las lesiones que produce se encuentran presentes en las poblaciones ganaderas más importantes del mundo.

En México, los conocimientos relativos a la LEB, datan de 1967<sup>1,80</sup>. Posteriormente se diagnosticaron clínicamente nueve casos en un total de 22,669 animales sacrificados en el rastro de Ferrería<sup>80</sup>. Aluja<sup>2</sup> encontró 110 casos de linfosarcoma en el país, durante 1969 a 1974 de acuerdo a los datos proporcionados por la Red Nacional de Laboratorios de Patología Animal. Este informe indica que en 17 entidades principalmente del centro de la República está presente la enfermedad, asimismo se hace mención de un incremento anual en el número de casos.

Jaramillo<sup>35</sup> recopiló entre 1966 y 1975 información de diferentes instituciones oficiales de diagnóstico en el Valle de México, encontrando 40 casos. Posteriormente la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico (SARH) informó de 220 casos clínicos de 1969 a 1982 en toda la República Mexicana. En el ganado lechero de la cuenca de Tizayuca Hidalgo, se

demostró en 1983 un 40% de seropositividad<sup>47,84</sup> Larios y col.<sup>48</sup> determinaron anticuerpos contra VLB, encontrando porcentajes variables entre 8 y 50% en los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Yucatan y Tamaulipas.

Los primeros estudios epidemiológicos de VLB, demostraron que la enfermedad ocurría en congregaciones familiares estrechas, lo cual fue interpretado originalmente como un efecto hereditario. Sin embargo, ésta opinión empezó a declinar durante los años cincuentas cuando fueron establecidas las etiologías virales de las leucemias en roedores y aves<sup>24</sup>. El descubrimiento de un virus leucogénico en los mamíferos y las observaciones de LB como un suceso enzoótico, dirigió a investigadores a especular que la etiología en el ganado bovino también era de naturaleza viral. Poco antes de que el VLB fuera clasificado<sup>22</sup>, el progreso en el entendimiento de la biología molecular del virus fue impedido por la falta de un sistema apropiado de cultivos de tejido para su replicación. En 1974 Van Der Maaten et al.<sup>57</sup> demostraron que el VLB podía ser cultivado en células fetales de bazo de borrego y posteriormente en células fetales de pulmón de bovino<sup>75</sup> y de murciélago<sup>29</sup>. El aprovechamiento de estos sistemas de cultivo permitió producir material para la caracterización bioquímica y biofísica del virus. Posteriores trabajos<sup>86</sup>, mostraron que el virus contenía una enzima denominada "transcriptasa de reversa". Esta característica fue la base para clasificar al virus como Retrovirus. Después

de la infección inicial de una célula, la enzima viral cataliza la reacción citoplásmica y da como resultado la producción de moléculas de DNA las cuales son copias complementarias del RNA viral. Entonces las copias de RNA son integradas dentro del DNA cromosomal de los núcleos celulares. Una vez que ocurre la integración, la información viral puede ser retenida indefinidamente a través de DNA celular durante la división mitótica normal. El genoma viral puede continuar el código para la producción de sus propias proteínas, pero esto no es un requisito para que el proceso de replicación viral pueda ser completado; sin embargo, el mecanismo de transformación celular producido por el VLB aún no ha sido completamente aclarado<sup>79,43</sup>. Actualmente el virus, alternativamente llamado de la Leucosis Bovina o Tipo C, está clasificado como un RNA tumoral, morfológicamente similar a los virus C causantes de leucemias en otras especies; de la subfamilia Oncoviridae, familia Retroviridae (por utilizar la enzima transcriptasa de reversa para su replicación), género tipo C, del grupo Oncornavirus, subgénero Oncovirus tipo C de mamíferos, especie Oncovirus tipo C de bovino<sup>4,66</sup>. El virus posee un diámetro aproximado de 120 nm, contiene un sólo filamento de RNA 70S y RNA dependiente de la DNA polimerasa. El virus es fácilmente destruido por pasteurización, sobrevive por pocas horas en el medio ambiente y puede ser preservado por períodos prolongados a temperaturas entre 70 a 180 C bajo cero cuando es mantenido en medios amortiguados. Contiene principalmente dos tipos de partículas antigénicas importantes: El antígeno

externo compuesto de glicoproteínas sensibles al éter y llamado gp51 o 60 que es el de mayor tamaño (70,000 Daltons), y el antígeno interno, formado de proteínas resistentes al éter y acetona llamado p24 o 25 de menor peso molecular (24,000 Daltons)<sup>75,78</sup>.

El VLB difiere de los tipo C de otras especies mamíferas por no poseer antígenos p30 y p70. Con base en esta diferencia el VLB es reconocido como un virus único leucémico. Además de ser exógeno, la proteína p24 o 25 no contiene ninguno de los antígenos determinantes interespecie o específicos intraespecie, por lo que no se han detectado reacciones antigénicas cruzadas en otros virus bovinos tipo C, aviáres o de otros mamíferos. Sin embargo, el virus se encuentra relacionado genética y antigénicamente con el virus de la leucosis ovina. Ambos tienen antígenos p24 y comparten antígeno p51, presentan reacción cruzada inmunológica e inducen a la formación de sincitios cuando infectan cultivos celulares<sup>24</sup>. El rango de infectividad in-vitro es muy amplio ya que se replica en cultivos celulares de ovino, murciélago, humano, simio, canino, caprino y equino. Los intentos por infectar células de rata y ratón han sido infructuosos<sup>74,86</sup>.

El modo natural de la transmisión de los Oncovirus es vertical, que ocurre de una generación a otra y horizontal descrita como la diseminación del virus entre animales de la misma generación, considerada esta última como la forma más importante. Otros autores utilizan el término de vertical

para denotar la transmisión genética únicamente, e incluyen las demás formas dentro de la transmisión horizontal o por contagio<sup>24</sup>. La transmisión del virus en general puede ser clasificada también como prenatal y posnatal, considerándose más precisa para ser utilizada en los programas dirigidos al control y erradicación<sup>24</sup>. La transmisión prenatal ocurre de forma transplacentaria dentro de los seis primeros meses de gestación en aproximadamente 18% del total de casos<sup>46,71</sup> y son diagnosticados mediante la determinación de anticuerpos sericos fetales a partir de la tercera semana de gestación por identificación directa del virus y en becerros recién nacidos por medio de pruebas inmunológicas antes de la ingestión del calostro materno<sup>20,24</sup>. La transmisión de la enfermedad no ocurre a través de ovocitos, espermatozoides o embriones por lo que la transferencia de estos de donadoras positivas a receptoras negativas son medios que pueden ser utilizados en programas de erradicación de la LEB<sup>31</sup>.

Lucas<sup>50</sup> demostró en 1981 la presencia del VLB en semen de toro. Sin embargo, la transmisión por esta vía no representa mayor importancia cuando el semen es utilizado bajo las técnicas estandarizadas para inseminación artificial<sup>10</sup>.

La forma más frecuente de la transmisión del virus bajo condiciones naturales, es por contacto directo posnatal con animales infectados. La infección a través de leche y calostro es relativamente rara,<sup>13</sup> a pesar de que el virus está presente frecuentemente en estas secreciones. Este efecto

puede ser atribuido a la acción de los anticuerpos protectores virus neutralizantes que reciben los becerros de madres infectadas<sup>58</sup>. Se sabe que los insectos hematófagos como moscas y garrapatas<sup>77</sup>, instrumentos descornadores<sup>17</sup>, tatuadores, quirúrgicos y transfusión de sangre infectada así como palpación rectal, desempeñan un papel importante en la diseminación del VLB<sup>11,20,24,33</sup>.

La transmisión experimental in-vivo del VLB en ovinos y bovinos, induce a la actividad oncogénica y también existen datos preliminares sobre cierto grado de patogenicidad en chimpancés, cabras, hamsters, conejos, venados cola blanca, perro, cerdo, búfalo de agua, y capibaras<sup>5,24,52</sup>. El virus no es infectante para el ser humano bajo condiciones naturales, aunque sí lo es en cultivos celulares. Existen estudios epidemiológicos que demuestran cierta relación entre áreas con elevada frecuencia de LEB y altos porcentajes de leucemia en humanos. Estas observaciones, combinadas con otros estudios biológicos y epidemiológicos requieren profundizar los estudios sobre el riesgo de salud pública<sup>18</sup>.

## 1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIONES

Durante la década de los sesentas, las pruebas de virus neutralización (VN)<sup>23</sup>, fijación de complemento (FC)<sup>64</sup>, inmunofluorescencia indirecta (II)<sup>24</sup>, inhibición temprana de la policariocitosis (ITP)<sup>30</sup>, radio inmuno análisis (RIA)<sup>60</sup>,

inhibición de la transcriptasa de reversa (ITR)<sup>83</sup>, inmuno difusión en gel de agar (IDGA)<sup>85</sup>, fueron adaptadas para la detección de anticuerpos específicos contra el VLB. Aunque el sistema RIA parece ser el de mayor sensibilidad, la prueba de IDGA producida comercialmente es práctica, económica, con buen grado de sensibilidad y ampliamente utilizada en los trámites de importación de bovinos y de semen. La Comunidad Económica Europea y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de America (USDA) la recomiendan para estudios de seroprevalencia y medidas de control<sup>20,62</sup>.

La prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA), se utiliza también para la detección y cuantificación de anticuerpos contra el VLB<sup>12</sup>, debido a que es sumamente sensible, específica y sencilla para ser adaptada como técnica de rutina en el laboratorio de diagnóstico<sup>13,40,53,54,70,87</sup>.

La relación que existe entre la infección por el VLB, el linfosarcoma y la Leucocitosis Persistente (LP) es muy importante para entender los complejos mecanismos implicados en la patogénia de la enfermedad. Estudios retrospectivos de gran cantidad de casos, demostraron que aproximadamente uno por cada tres animales seropositivos al VLB, tuvieron antecedentes de haber presentado LP<sup>24,25</sup>. Ferrer et al.<sup>15,26</sup> observaron en 1979, que el VLB puede ser detectado en casi todos los bovinos que presentan LP, sin embargo en ocasiones más del 60% de los animales seropositivos de VLB, no presentan esta condición. Asimismo solo una parte de los

animales que presentan LP desarrollan en determinado momento de su vida la forma maligna de la enfermedad (LEB). Por otro lado, una pequeña proporción del grupo de animales en estado de PSA sin presentar LP desarrolla la forma LEB y no necesariamente la LP antecede a la forma tumoral de la enfermedad, de tal manera que el diagnóstico basado en el conteo leucocitario solo detecta una pequeña proporción de los animales portadores del VLB<sup>61</sup>. Por lo tanto es obvio que las claves hematológicas, no son adecuadas como indicadores de la infección y la condición de LP tiene poco valor por sí solas en programas de control y erradicación<sup>8,9</sup>. Sin embargo la probabilidad de que un animal con LP este infectado es mayor que en un animal que no la presenta<sup>25</sup>.

Actualmente se utilizan varios métodos, entre ellos microscopía electrónica<sup>61</sup>, detección de inmunoglobulinas en la membrana citoplasmática e histoquímica enzimática<sup>21</sup> para caracterizar la morfología y la función de células linfoides normales y de naturaleza neoplásica. Algunos estudios demuestran que las enzimas adenosin-trifosfatasa (ATPasa) y fosfatasa ácida (FA) son efectivas como marcadores de superficie en linfocitos T y B respectivamente<sup>65</sup>. En bovinos con LP, la mayoría de los linfocitos son tipo B siendo detectada esta característica por el incremento en el número de células en sangre periférica y en ganglios linfáticos, inmunoglobulinas de superficie y anticuerpos eritrocíticos receptores del complemento<sup>21</sup>. Los ovinos

infectados experimentalmente con el VLB, desarrollan linfosarcoma con elevada frecuencia y las células neoplásicas presentes en sangre periférica son de tipo B<sup>50,85</sup>. El linfosarcoma en humanos en sus diferentes clasificaciones (linfoma linfocítico, linfoma pobremente diferenciado, linfoma histiocítico y leucemia linfocítica crónica) ocurre usualmente en individuos adultos y también es predominantemente un desorden celular de tipo B<sup>27</sup>.

Raich<sup>73</sup> utilizó técnicas citoquímicas para reconocer y clasificar linfocitos de bovinos en sangre periférica, en ganglios linfáticos con linfosarcoma tipo adulto, juvenil y tímico y en células de ovinos infectados con el VLB. Los resultados se compararon con las mismas técnicas en linfocitos normales. Los métodos citoquímicos fueron; Sudan-Negro-B (SN-B), Acido Peryódico de Schiff (PAS), Fosfatasa Acida (FA), Naftol AS-D Cloracetato (NASDC) y Alfa Naftil Acetato (ANA) esterasa.

La aplicación de reacciones citoquímicas en leucocitos de ovinos y bovinos con linfosarcoma, son útiles para demostrar características específicas y únicas. Estas reacciones parecen efectivas para aclarar la patogénia y establecer una clasificación celular en los desórdenes linfoproliferativos en estas especies, similar a lo establecido en el hombre<sup>73</sup>.

Existen otras pruebas diagnósticas complementarias dentro del grupo de procesos tumorales en el hombre y en algunas especies de animales<sup>44,37,90,93</sup>. La hipercalcemia es una

complicación bien reconocida en procesos neoplásicos malignos de humanos y en carcinomas de glándula mamaria, pulmón y riñón, melanoma múltiple, Linfomas malignos tipo Hodgkin y no Hodgkin también han sido descritos en asociación con hipercalcemia<sup>6</sup>. El o los mecanismos de esta condición se desconocen, aunque las hipótesis más satisfactorias son las siguientes: Las células tumorales de algunos linfomas secretan sustancias productoras de hipercalcemia las cuales pueden o no estar relacionadas inmunológicamente con la hormona paratiroidea (HPT). Estas sustancias varían en la actividad biológica y sólo producen hipercalcemia cuando son muy activas o se presentan en grandes cantidades. La invasión de células neoplásicas a médula ósea, puede predisponer a la hipercalcemia debido a la secreción local de las sustancias activadoras de osteoclastos. Efectos similares se han detectado con la participación de componentes derivados del sistema prostaglandina-sintetasa<sup>41</sup>.

El linfosarcoma es la neoplasia más común asociada a la hipercalcemia en perros y gatos, aunque no ha sido aclarada completamente la causa de este desorden, se considera que es debido al efecto de una sustancia hormonal de resorción ósea (e.g., prostaglandina E2, factor de actividad osteoclástica). Este factor induce a la resorción ósea y a la movilización de calcio sólo cuando la médula ósea esta infiltrada por células tumorales<sup>37</sup>. En bovinos con LEB, no se han realizado estudios referentes a la

concentración sérica de los minerales calcio y fósforo y a la posible presencia de factores de actividad osteoclástica.

La determinación de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) y sus isoenzimas como prueba diagnóstica ha sido bien establecida en medicina humana<sup>3,81</sup>. En medicina veterinaria son escasos los estudios que se han desarrollado en rumiantes. La enzima DHL se encuentra ampliamente distribuida en las células de los tejidos y fluidos corporales. Cuando existe un incremento en la permeabilidad de la membrana celular o se desintegra ésta, ocurre un flujo enzimático hacia la corriente sanguínea, especialmente cuando se presenta el daño en un órgano o tejido con gran actividad enzimática. Prasse<sup>72</sup> investigó las iso-enzimas de DHL en el suero de bovinos clínicamente sanos y en animales enfermos, concluyendo que este puede ser el mejor criterio para detectar algunos padecimientos, en lugar de determinar únicamente la concentración total de la enzima<sup>34,41</sup>. Diferentes estados fisiológicos (stress, edad, preñez), además el sexo y raza, pueden alterar su concentración. En ovinos con distrofia muscular aguda, se observa un notable aumento de la isoenzima DHLs. En investigaciones recientes se han establecido los niveles séricos de las iso-enzimas de DHL en varios tejidos de bovinos clínicamente sanos. Los resultados sugieren también que esta determinación enzimática puede ser usada en el diagnóstico diferencial de daños hepáticos y musculares<sup>41</sup>. Los humanos con tumores

malignos y los animales con carcinomas, generalmente muestran incremento en la actividad sérica de la enzima DHL. En las leucemias de ovinos y bovinos, la actividad de la DHL sérica se incrementa, además presenta notable actividad en las células tumorales<sup>41,76,91</sup>.

## **II.- HIPOTESIS**

- 1.- Los bovinos infectados naturalmente con el VLB y con reacciones serológicas positivas a este, presentan linfocitosis con formas celulares blásticas en sangre periférica.
- 2.- Los niveles séricos de la enzima Deshidrogenasa Láctica (DHL) y de calcio están elevados y los de fósforo disminuidos.
- 3.- Los niveles séricos de gamaglobulinas están aumentados.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Perfeccionar el diagnóstico de la LEB por medio de la determinación de algunas alteraciones humorales y celulares y la correlación entre ellas.

## **IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Determinar en los bovinos infectados naturalmente con el VLB, algunas alteraciones humorales:
  - 1-1 Determinar anticuerpos contra el VLB, por medio de las técnicas de ELISA e IDGA.
  - 1-2 Determinar y cuantificar la enzima DHL en suero.
  - 1-3 Determinar y cuantificar los minerales calcio y fósforo en suero.
  - 1-4 Determinar y cuantificar las fracciones de inmunoglobulinas en suero.

2.- Clasificar la población de linfocitos en frotis de sangre periférica por métodos citoquímicos: Wright, Acido-Periodico de Schiff (PAS), Peroxidasa y Verde Metil Pironina

2-1 Realizar biometría hemática completa: leucocitos/mm<sup>3</sup>, conteo diferencial y en cifras absolutas de leucocitos, hemoglobina (g/dl) y hematocrito (%).

## V.- MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en un complejo agropecuario del estado de Hidalgo, La población promedio es de 30,000 bovinos de la raza Holstein-Friesian, distribuidos en una superficie aproximada de 75 hectáreas bajo un sistema de explotación intensiva.

El estudio constó de dos fases:

Fase I - Selección de cuatro grupos de animales en producción con las siguientes características:

GRUPO I.- 10 animales ELISA positivos más Leucocitosis Persistente (LP).

GRUPO II.- 10 animales serológicamente positivos a LEB utilizando la prueba de ELISA.

GRUPO III.- 10 animales ELISA positivos más presentación clínica de la enfermedad.

Grupo IV.- 15 animales clínicamente sanos y ELISA negativos (como controles).

De cada animal se obtuvieron dos muestras de 12 ml de sangre cada uno, uno sin y el otro con anticoagulante (Etilen-Diamino-Tetra-Acético EDTA), a partir de la vena coccigea, empleando el sistema de tubos al vacío\*. De la sangre colectada sin anticoagulante se obtuvo el suero mediante centrifugación y se congeló a -20 C hasta el momento de su análisis.

El criterio empleado para seleccionar a los 45 animales fue el siguiente: Se realizaron tres muestreos previos (con \*Becton Dickinson de México.

intervalos de un mes cada uno), en los animales con antecedentes clínicos y hemáticos indicativos de LEB y linfocitosis persistente.

Se adaptó la prueba indirecta de ELISA<sup>9B</sup> en suero sanguíneo para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos contra el VLB empleando un antígeno glicoproteico comercial\*. Las reacciones se interpretaron como positivas cuando las diluciones fueron iguales o mayores de 1/64. Para la detección de los 10 animales con LP, en la sangre colectada con anticoagulante EDTA, se determinó la cantidad de leucocitos por mm<sup>3</sup>. La cuenta diferencial se expresó en porcentajes y en cifras absolutas, de acuerdo con las técnicas convencionales descritas por Benjamin<sup>10</sup>.

Fase II.- De los 45 animales seleccionados para formar los cuatro grupos, se realizaron tres muestreos sanguíneos seriados con intervalos de un mes cada uno y se procedió en la misma forma ya descrita. La DHL se determinó en el suero inmediatamente después de su obtención empleando el método cinético con reactivos comerciales\*. El procedimiento utilizado para la prueba indirecta de ELISA fue el desarrollado por Todd y Adair<sup>97</sup>. Para la prueba de IDGA el agar fue preparado al 0.9% en solución amortiguadora de fosfatos pH 8.6, de esta solución se vertieron 15 ml a una caja de Petri. Una vez gelificado se hicieron siete orificios de 5mm de diámetro; uno central para el antígeno rodeado de seis equidistantes para tres sueros problemas y sus controles respectivos:

\* Pitman Moore Inc. USA

\*\* Merck Lab.

positivo, negativo y positivo moderado. Las cajas fueron mantenidas a 20 C durante 48 horas. La prueba se registró como positiva cuando las líneas de precipitación fueron idénticas a las del suero control positivo. Las determinaciones en el suero de los minerales calcio y fósforo se realizaron empleando las técnicas de espectrofotometría de luz visible con reactivos comerciales. La técnica de electroforesis se utilizó para valorar las diferentes fracciones de globulinas en suero sanguíneo<sup>60</sup>. Para las reacciones citoquímicas, se tifieron los cuatro frotis obtenidos de la sangre con anticoagulante con los métodos de Wright, ácido peryódico de Schiff (PAS), peroxidasa y verde-metil-pironina de acuerdo al manual de tinciones de las Fuerzas Armadas<sup>55</sup>. La reacción de las tinciones en los linfocitos, fue determinada de acuerdo al criterio previamente establecido por Bennett y Reed<sup>7</sup> sobre un rango de cero a tres marcas (+), adicionalmente fueron tabulados los porcentajes de linfocitos con reacción positiva a las tinciones. La biometría hemática (BH) completa: glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB), hematocrito (Ht), y hemoglobina (Hb) se realizó en los tres muestreos de sangre con EDTA de cada animal según las técnicas descritas por Benjamin<sup>40</sup>.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza totalmente al azar y con un nivel de significancia de ( $p < 0.01$ ).

## VI. RESULTADOS

### 1 SEROLOGIA

Los resultados de los 30 sueros de los bovinos detectados como positivos y de los 15 negativos con la prueba de ELISA fueron comprobados con IDGA.

Ninguno de los 15 animales del grupo control negativo presentó reacciones seropositivas al VLB durante los tres muestreos seriados.

Con la prueba de ELISA el título de anticuerpos más elevado se observó en un animal del grupo I (1/512).

La especificidad de la prueba de IDGA fue de 100% comparada con los resultados de ELISA.

En los treinta bovinos que formaron los tres grupos de animales seropositivos, el título de anticuerpos detectados mediante la prueba de ELISA permaneció constante durante las tres repeticiones (una cada mes) no presentándose diferencias estadísticas significativas (CUADRO 1).

### 2 BIOMETRIA HEMATICA

Los valores de hematocrito (Ht) en los animales de los grupos 1, 2, y 4 no presentaron variaciones importantes pero en el grupo 3 los niveles fueron significativamente bajos ( $p < 0.05$ ). En el conteo de glóbulos rojos (GR) no se observaron cambios significativos en los grupos 1, 2 y 4, pero en el grupo 3 fueron bajos ( $p < 0.05$ ). La concentración

de hemoglobina (Hb) en el grupo 3 fue baja ( $p < 0.05$ ) y en los otros grupos normales. En los animales de los grupos 1 y 3 hubo aumento considerable en el número de leucocitos ( $p < 0.01$ ) lo que en los grupos 2 y 4 se mantuvieron dentro de los límites normales. El porcentaje de linfocitos en los grupos uno y tres fue significativamente superior al de los otros grupos ( $p < 0.01$ ) (CUADRO 2 y FIGURAS 1, 2, 3, 4 y 5).

### 3 GLOBULINAS

Los animales de los grupo (positivos con presentación clínica de la enfermedad), 2 (positivos), y grupo 1 (positivos mas leucocitosis persistente), presentaron niveles séricos elevados estadísticamente significativos ( $p < 0.01$ ) en la fracción gamma de las globulinas (Fig.13). La concentración de la fracción beta estaba significativamente mas baja ( $p < 0.05$ ) en los tres grupos de animales seropositivos con respecto al grupo control negativo (Fig. 12). Las proteínas totales estaban significativamente mas altas ( $p < 0.01$ ) en los tres grupos de animales positivos al VLB (Fig. 6). Los niveles en el suero de la fracción alfa se encontraron significativamente más elevadas ( $p < 0.01$ ) en el grupo tres (Fig. 9) y la albúmina más baja ( $p < 0.01$ ) en el mismo grupo (CUADRO 2 y FIGURA 8).

### 4 DESHIDROGENASA LACTICA (DHL)

En ninguno de los grupos de animales durante los

tres muestreos seriados, se detectaron diferencias significativas en la concentración sérica de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) y los valores se comportaron dentro de los rangos normales de concentración (CUADRO 4 y FIGURA 16).

## 5 CALCIO Y FOSFORO

Los niveles en el suero de los minerales calcio y fósforo no sufrieron variaciones estadísticas significativas ni entre los cuatro grupos de animales ni entre los tres muestreos seriados, manteniéndose los valores dentro de los rangos normales (CUADRO 4y FIGURAS 14 15).

## 6 CITOQUIMICA

Las reacciones de las tinciones de peroxidasa y PAS fueron negativas en los leucocitos de sangre periférica de los bovinos seropositivos y negativos al VLB. La reacción de la tinción de verde metil pironina fue positiva en 25 % de los linfocitos de sangre periférica de los bovinos del grupo 1, 4% en el grupo 2 , 6 % en el grupo 3 y 2 % en el grupo control negativo 4. (CUADRO 5).

# CUADRO 1

## NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-VLB

GRUPOS MUESTREOS	I 1-2-3	II 1-2-3	III 1-2-3	IV 1-2-3
1	1/128* (+)**	1/64* (+)**	1/128* (+)**	-
2	1/64 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	-
3	1/64 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	-
4	1/64 (+)	1/64 (+)	1/258 (+)	-
5	1/512 (+)	1/64 (+)	1/128 (+)	-
6	1/256 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	-
7	1/64 (+)	1/128 (+)	1/64 (+)	-
8	1/64 (+)	1/64 (+)	1/128 (+)	-
9	1/64 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	-
10	1/64 (+)	1/64 (+)	1/64 (+)	-
11				-
12				-
13				-
14				-
15				-

\* PRUEBA DE ELISA

\*\* PRUEBA DE IDGA POSITIVA

I- (+ LP)

II- (+)

III- (+ TUMORAL)

IV- (CONTROL -)

## CUADRO 2

### BIOMETRIA HEMATICA

GRUPO	No. DE BOVINO	HT ** %	G.R ** mm <sup>3</sup>	HB * g/100ml	G.B. ** mm <sup>3</sup>	LINFOCITOS ** %
1	10	36.35 <sup>b</sup>	6.92 <sup>b</sup>	11.95 <sup>b</sup>	25.71 <sup>a</sup>	71.32 <sup>a</sup>
2	10	37.67 <sup>b</sup>	7.15 <sup>b</sup>	12.18 <sup>b</sup>	7.82 <sup>c</sup>	59.84 <sup>b</sup>
3	10	30.96 <sup>c</sup>	6.35 <sup>c</sup>	10.09 <sup>c</sup>	15.57 <sup>b</sup>	67.43 <sup>a</sup>
4	15	40.30 <sup>a</sup>	7.95 <sup>a</sup>	13.04 <sup>a</sup>	8.13 <sup>c</sup>	47.75 <sup>c</sup>

•• LAS MEDIAS CON DIFERENTES LETRAS SON ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS P<0.01

• LAS MEDIAS CON DIFERENTES LETRAS SON SIGNIFICATIVAS P<0.05

1- ( + LP )      3- ( + TUMORAL )

2- ( + )        4- ( CONTROL - )

### CUADRO 3

#### CONCENTRACION DE PROTEINAS SERICAS

GRUPO	No. DE BOVINOS	ALBUMINA g %**	GLOBULINAS				PROT.T. g % **
			ALFA1 g % **	ALFA2 g % *	BETA g % *	GAMMA g % **	
1	10	2.87 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	0.89 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	2.99 <sup>a</sup>	7.64 <sup>a</sup>
2	10	2.88 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.90 <sup>b</sup>	2.91 <sup>a</sup>	7.62 <sup>a</sup>
3	10	2.39 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	0.86 <sup>b</sup>	3.02 <sup>a</sup>	7.58 <sup>a</sup>
4	15	2.96 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>	1.02 <sup>a</sup>	1.98 <sup>b</sup>	7.01 <sup>b</sup>

\*\* LOS PROMEDIOS CON DIFERENTES LETRAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS A P < 0.01

• LOS PROMEDIOS CON DIFERENTES LETRAS SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS A P < 0.05

1- (+ LP)    3- (+ TUMORAL )

2- (+)      4- ( CONTROL - )

## CUADRO 4

### CONCENTRACION DE MINERALES Y DHL EN SUERO

GRUPO	No. DE BOVINOS	CALCIO mg/100ml	FOSFORO mg/100ml	D H L U. I.
1	10	7.88 <sup>a</sup>	5.83 <sup>a</sup>	378.17 <sup>a</sup>
2	10	8.44 <sup>a</sup>	5.73 <sup>a</sup>	408.77 <sup>a</sup>
3	10	8.33 <sup>a</sup>	5.72 <sup>a</sup>	449.53 <sup>a</sup>
4	15	8.14 <sup>a</sup>	5.47 <sup>a</sup>	391.58 <sup>a</sup>

1 - (+ LP)

2 - (+)

3 - (+TUMORAL)

4 - CONTROL (-)

a - ESTADISTICAMENTE NO SIGNIFICATIVO (P>0.05)

## CUADRO 5

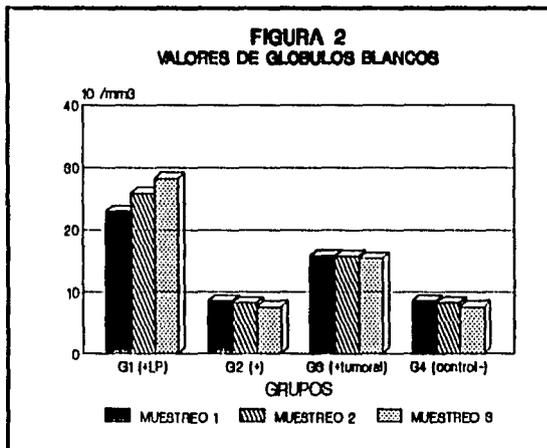
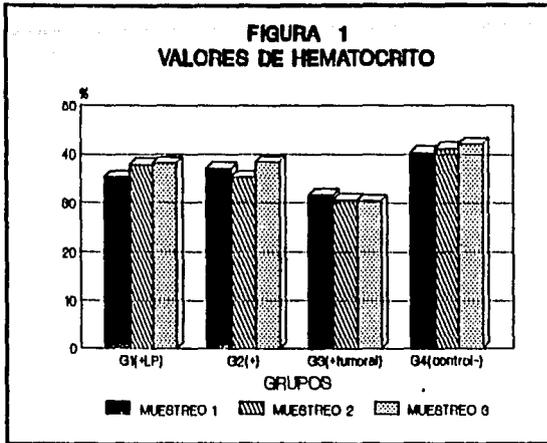
### CARACTERISTICAS CITOQUIMICAS EN LINFOCITOS DE BOVINOS NORMALES Y SEROPOSITIVOS AL VLB

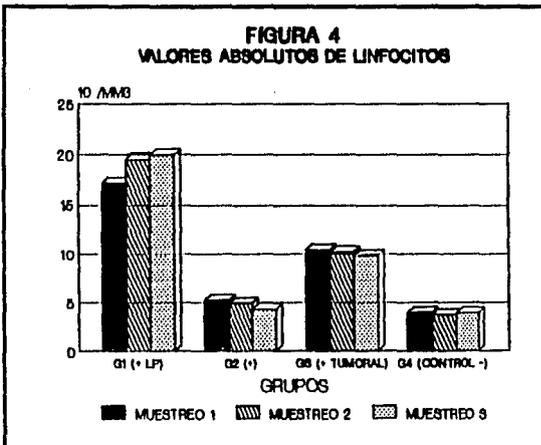
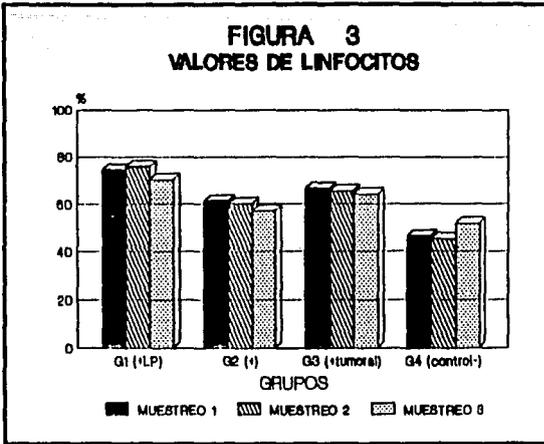
GRUPO	No.DE ANIMALES	P.A.S.			PEROXIDASA			V.M.P.		
		1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
		%			%			%		
1	10	-	-	-	-	-	+	(25)	+++	
2	10	-	-	-	-	-	+	(4)	+	
3	10	-	-	-	-	-	+	(6)	+	
4	15	-	-	-	-	-	+	(4)	+	

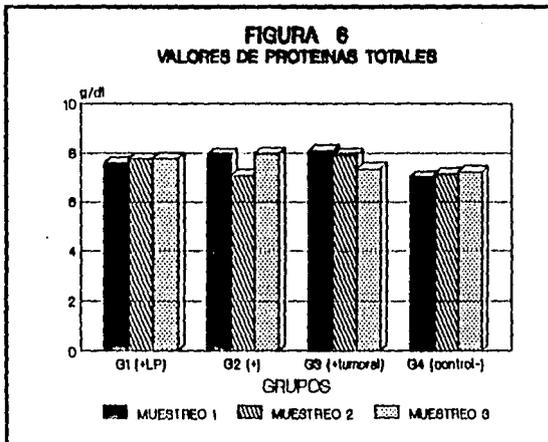
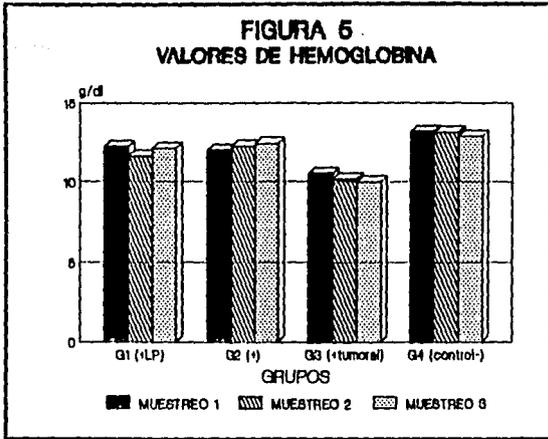
+++ FUERTEMENTE POSITIVO  
 ++ MODERADAMENTE POSITIVO  
 + LIGERAMENTE POSITIVO  
 - NEGATIVO

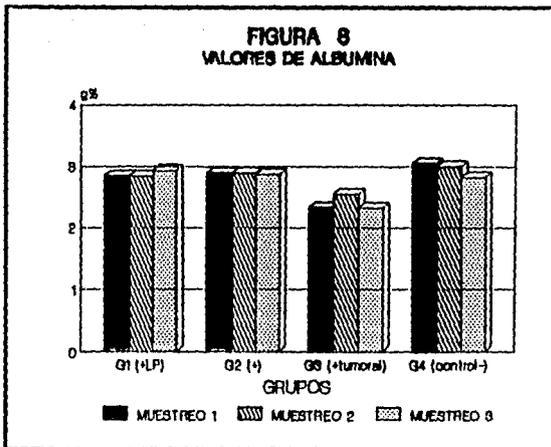
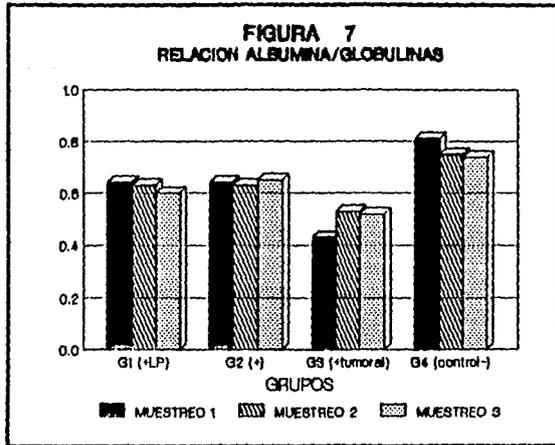
P.A.S. ACIDO PERIODICO DE SCHIFF  
 VMP VERDE METIL PIRONINA  
 1o-2o-3o• No. DE MUESTREOS

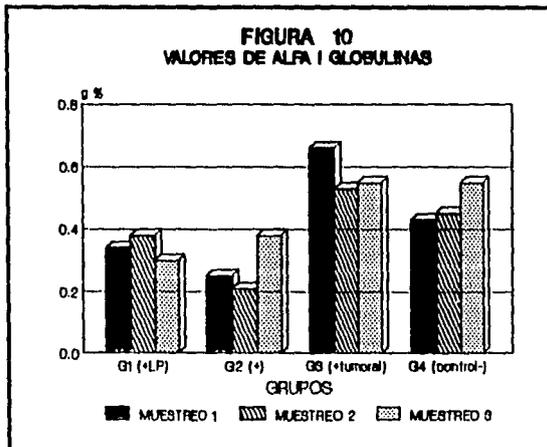
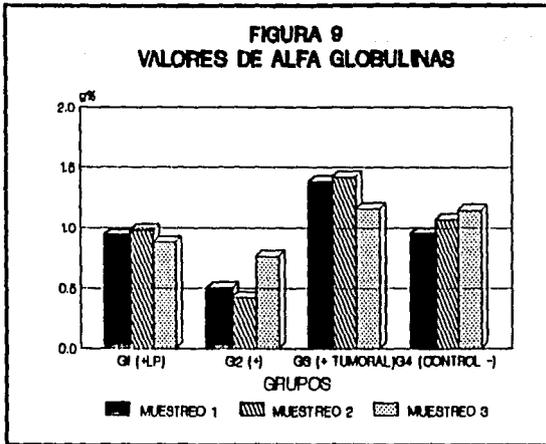
1- ( + LP)  
 2- (+)  
 3- ( + TUMORAL )  
 4- ( CONTROL - )

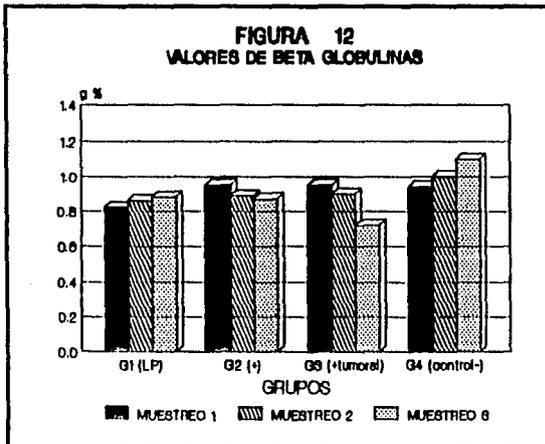
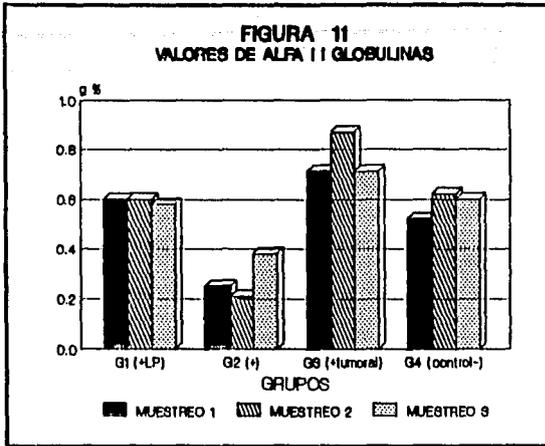


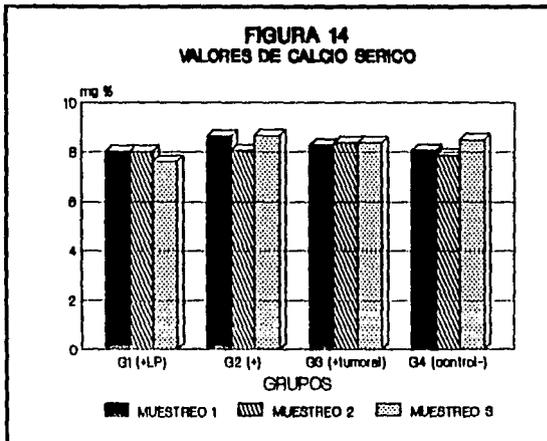
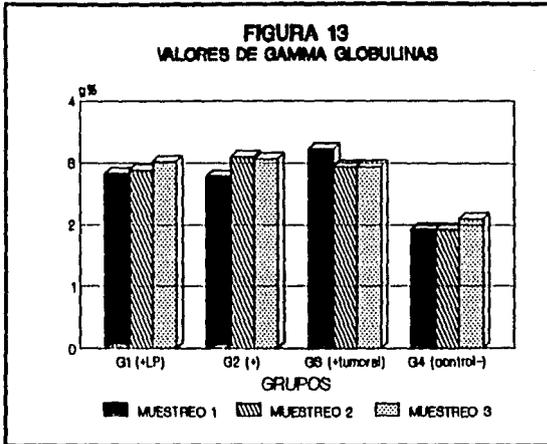


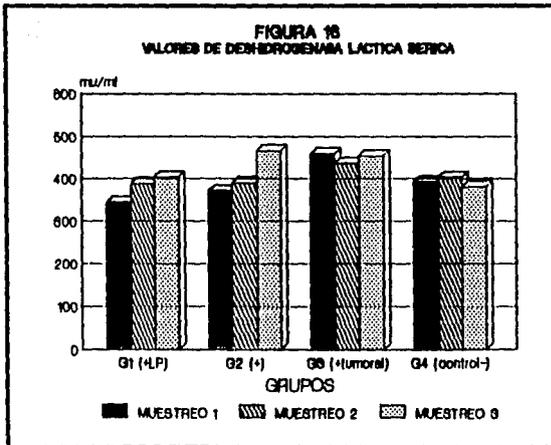
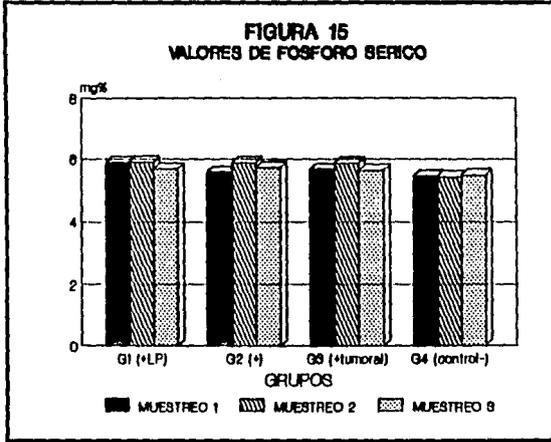




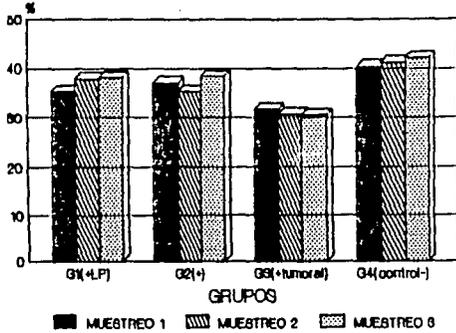




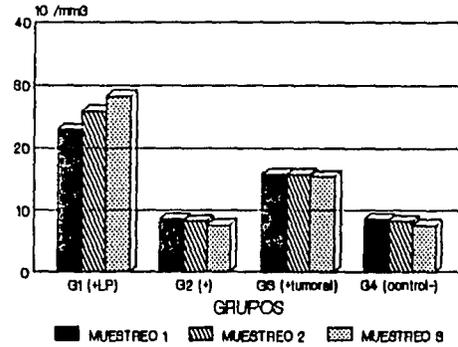




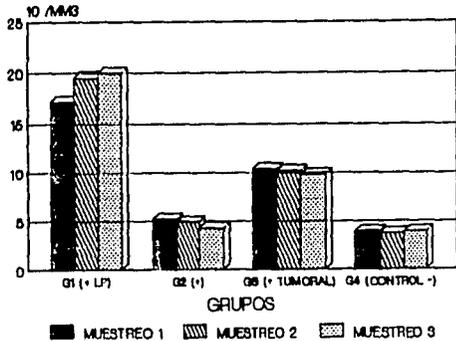
**FIGURA 1**  
**VALORES DE HEMATOCRITO**



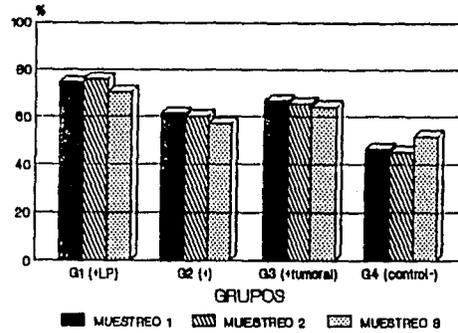
**FIGURA 2**  
**VALORES DE GLOBULOS BLANCOS**



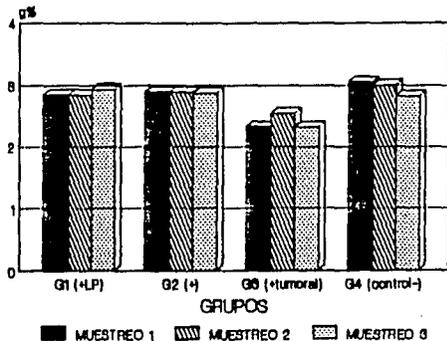
**FIGURA 4**  
**VALORES ABSOLUTOS DE LINFOCITOS**



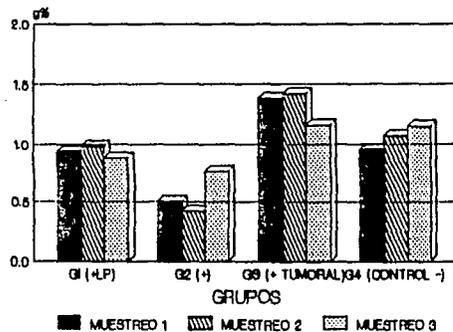
**FIGURA 3**  
**VALORES DE LINFOCITOS**



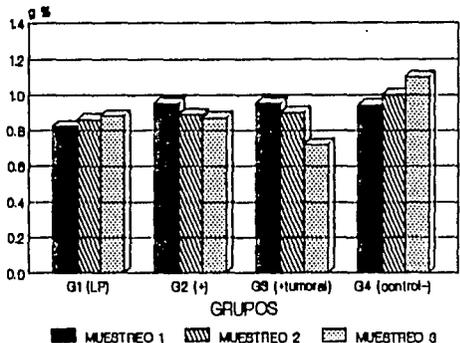
**FIGURA 8**  
VALORES DE ALBUMINA



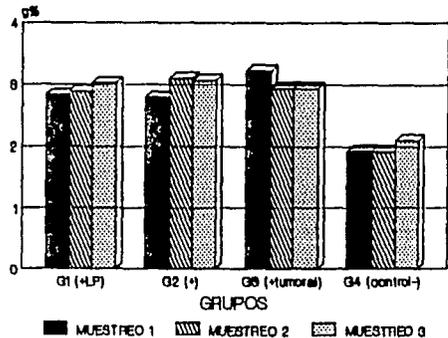
**FIGURA 9**  
VALORES DE ALFA GLOBULINAS



**FIGURA 12**  
VALORES DE BETA GLOBULINAS



**FIGURA 13**  
VALORES DE GAMMA GLOBULINAS



## VII. DISCUSION

En este trabajo resalta que la infección con el VLB está asociada directamente con la respuesta de los anticuerpos anti-VLB. Esta característica proporciona una confiable opción para la identificación de animales infectados mediante pruebas inmunológicas como ya lo señalaron Ferrer et al.<sup>24</sup>.

Recientemente, se han desarrollado múltiples estudios sobre la detección y cuantificación de anticuerpos anti-VLB. Kajikawa et al.,<sup>40</sup> demostraron que la sensibilidad de la prueba de ELISA es mayor que la prueba de IDGA, para la detección de anticuerpos contra el virus de la LB. En otro trabajo se comprobó mayor efectividad en la prueba de ELISA que en la de IDGA utilizando anticuerpos monoclonales,<sup>3,6</sup> para la detección de animales infectados con el VLB. Burridge<sup>44</sup> observó en 32 muestras de sangre de bovinos infectados con VLB, escasa variación en los títulos de anticuerpos dentro de un período aproximado de seis meses, similar a lo obtenido en este estudio.

También se ha comprobado la efectividad de estas dos pruebas (ELISA-IDGA) en el suero de leche de bovinos infectados, resultando la primera más sensible y con menor porcentaje de falsos positivos. Klimentwiski<sup>44</sup> empleó la técnica de ELISA en sueros sanguíneos para demostrar 51.7 % de reactores positivos al VLB comparado con 42.4 % con la de

IDGA. Los resultados del presente trabajo confirman lo referido por los autores citados ya que la prueba de ELISA resultó ser igualmente específica y sensible. El título de anticuerpos detectados durante un período de tres meses no presentó variaciones importantes. Toma et al.<sup>99</sup> observaron alta especificidad en la prueba de ELISA (99%) en muestreos seriados de sangre y leche de bovinos infectados con el VLB y concluyeron que ELISA es una prueba factible para detectar infecciones iniciales y monitorear hatos libres de la enfermedad. Sin embargo a pesar de que la prueba de ELISA ha demostrado ser muy sensible y específica para la medición de anticuerpos, la prueba de IDGA puede ser considerada una buena alternativa para ser aplicada en estudios epidemiológicos por su bajo costo y fácil desarrollo.

Algunos estudios han demostrado aumento en la concentración de las fracciones gamma y alfa globulinas asociado con el decremento de la albúmina y concentración normal de betaglobulina en bovinos clínicamente afectados con linfosarcoma<sup>18, 50</sup>. Similares resultados fueron observados en los grupos 1, 2, y 3 del presente estudio aunque la concentración de la fracción beta fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que lo informado por otros<sup>18, 50</sup> en los mismos grupos. En seres humanos con neoplasias linfoproliferativas y en bovinos con linfosarcoma se ha detectado un incremento progresivo de la fracción alfa de las globulinas de acuerdo con el desarrollo de la enfermedad.

Aunque los niveles séricos de la fracción alfa fueron significativamente elevados en los grupos 1, 2, y 3 con respecto al grupo 4, no hubo diferencias estadísticas entre los grupos seropositivos lo cual sugiere que la fracción alfa no tiene relación con respecto a la presentación de enfermedad. Kinushita et al.<sup>45</sup> no detectaron diferencia en la concentración de proteínas totales, y notaron aumento considerable de la fracción alfa y disminución de beta y gamma en el suero de bovinos con linfosarcoma. Los gatos con linfomas y linfadenopatías generalizadas presentan hipergammaglobulinemia<sup>6,67</sup>.

En ninguno de los grupos ni entre los muestreos se observaron variaciones significativas en la concentración sérica de la enzima DHL y los valores se comportaron dentro de los rangos normales. Esto indica que la importancia del enzimograma no puede ser establecido con base en los resultados del presente trabajo. Sin embargo, otros estudios han identificado incrementos importantes en los niveles séricos de la enzima DHL y sus isoenzimas DHL1 y DHL2 en bovinos con padecimientos de tipo cardiaco. En casos subclínicos de LEB se ha observado aumento de los niveles séricos de las isoenzimas DHL2, DHL3 y DHL total con decremento de la isoenzima DHL1. En otros estudios se ha comprobado el aumento en la actividad de la enzima DHL total en bovinos infectados con el VLB y también en seres humanos adultos con leucemias de linfocitos tipo T causadas por

retrovirus. Ishihara et al.<sup>34</sup> demostraron alta correlación en la elevada actividad de la isoenzima DHL1 con el aumento en la concentración de linfocitos en sangre periférica de bovinos con leucosis. Silkina et al.<sup>81</sup> observaron notable incremento en la actividad de las isoenzimas DHL4 y DHL5 en el suero de ovinos infectados experimentalmente con el VLB.

En medicina humana la hipercalcemia combinada con la hipofosfatemia han sido ampliamente reconocidas en asociación con linfomas generalizados principalmente cuando la médula ósea se encuentra infiltrada por las células tumorales y sólo en casos excepcionales en neoplasias localizadas. Esta condición parece ser más común en seres humanos con mielomas múltiples. En este estudio no se observaron variaciones significativas en la concentración sérica de calcio y fósforo en ninguno de los 4 grupos de animales seropositivos particularmente en el grupo de los animales clínicamente enfermos. La incidencia de este desequilibrio de electrolitos combinado con reacciones neoplásicas en animales domésticos se desconoce pero algunos estudios indican que es baja<sup>37</sup>.

En programas diseñados para erradicar el LEB de poblaciones ganaderas, es de gran utilidad contar con pruebas diagnósticas confiables para detectar a los animales reactivos positivos. Actualmente se practica una prueba diagnóstica relacionada directamente con la identificación del incremento persistente en el número de linfocitos en sangre periférica<sup>84, 85</sup>. Las claves de Goetze y Bendixen son

descritas incorrectamente como una característica del estado prodrómico del LEB, aunque el incremento en el número de linfocitos no siempre precede a la presentación de la forma clínica de la enfermedad. Otras condiciones patológicas como ciertas enfermedades de origen viral pueden estar acompañadas de un incremento de linfocitos sanguíneos con duración variable. En el presente estudio se comprobó la relación que existe entre la elevada concentración persistente de leucocitos en sangre periférica y el aumento considerable de linfocitos. Los programas de erradicación de la LEB requieren de pruebas sensibles, baratas y rápidas para detectar el estado inicial de la enfermedad. Varios métodos serológicos se han desarrollado, sin embargo los antisueros necesarios no son de fácil obtención. Como alternativa inmediata las tablas hemáticas pueden ser de utilidad como diagnóstico presuntivo mas no confirmativo de LEB. Estas pruebas están basadas en la demostración de un incremento del conteo absoluto de linfocitos (tres o más desviaciones estándar de la concentración media considerada como normal para las respectivas razas y edades en 2 o 3 muestras de sangre colectada a intervalos de por lo menos tres meses cada uno<sup>9,42</sup> . Las observaciones realizadas en este estudio son indicativas de que el período de seguimiento de los animales puede reducirse a tres meses con resultados confiables tanto de tipo serológico como hemático.

El uso de tinciones citoquímicas ha sido

recomendado para en la clasificación y caracterización de leucemias agudas y padecimientos linfoproliferativos en el hombre y algunos animales domésticos<sup>18, 60</sup>. En estudios previos se ha identificado la población de linfocitos sanguíneos en seres humanos con leucemias predominando los de tipo B. En casos de linfomas bovinos tipo tímico y juvenil en ocasiones los linfocitos no pueden ser caracterizados como de tipo T o B y quizá presentan una etapa de transformación maligna, o representan una reacción pre-B, similar a lo que sucede en seres humanos con leucemias linfocíticas agudas. Ovinos infectados experimentalmente con el VLB, desarrollan linfosarcoma con elevada frecuencia seis meses después de la inoculación y los linfocitos de sangre periférica son generalmente de tipo B. En consecuencia ha sido de gran utilidad la aplicación de reacciones citoquímicas en adición a marcadores inmunológicos hacia la caracterización de linfocitos en sangre periférica de animales clínicamente sanos y con desordenes linfoproliferativos. La reacción citoquímica positiva a la tinción de verde metil pironina en frotis de sangre periférica en el grupo 1 fue estadísticamente superior comparada con los resultados de los grupos 2, 3, y 4 confirmando el posible efecto linfoproliferativo de células inmaduras (posiblemente tipo B) aunque en este trabajo no se utilizaron marcadores específicos de superficie para comprobar esto. Las reacciones de las tinciones con peroxidasa y PAS fueron negativas en

todos los grupos confirmando el origen no granulocítico y monocítico en las reacciones leucocíticas principalmente de los grupos 1 y 3. Las observaciones realizadas por Lucks et al.<sup>51</sup> en seres humanos con problemas linfoides indican que la transformación *in vivo* de los linfocitos ocurre a nivel intrafolicular de casi todos los tejidos de tipo linfoide y las células grandes pironinofílicas del centro folicular pueden transformarse en tipo B.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Aluja, A. S. y Uruchurtu, A.: Linfosarcoma (Leucemia) en bovinos. *Vet. Méx.* 3: 18-22 (1967).
- 2.- Aluja, A. S.: Linfosarcoma bovino. *Vet. Méx.* 6: 73-77 (1975).
- 3.- Aoki, R.: DHL and its isoenzyme. What readings for the values. *Jpn. J. Clin. Med.* 34: 2462-2472 (1976).
- 4.- Andrews, C., Pereira, H. G., and Widy, P.: Viruses of the vertebrates. 4th ed. Bailliere Tindall, London (1978).
- 5.- Baumgarten, E. and Olson, C.: Host range of bovine leukosis virus: preliminary report. *Fourth International Symposium of Bovine Leukosis.* Bologna Italia. 338-346 (1980).
- 6.- Bender, A., Robinson, A., Kashmira, S., Woods, W., McClain, A., Smithson, A., Heyn, R., Finaly, J., Shuman, L., and Gibson, R.: A molecular biologic study of bovine leukemia and non-Hodgkins lymphoma. *Am. J. Epid.* 126: 767 (1983).
- 7.- Bennett, J. M. and Reed, C. E.: Acute leukemia cytochemical profile: Diagnostic and clinical implications. *Blood Cells I:* 101-108 (1975).
- 8.- Bendixen, H. J.: In *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* (C.A. Brandly and C. Cornelius eds.) vol. 10 pp 129-204. Academic Press. New York (1965a).
- 9.- Bendixen, H.: In *Bovine Medicine and Surgery*, (W.J., Gibbons E.J. Catcott and J.F. Smithcors eds.) *Am. Vet. Publ. Wheaton Illinois:* 547-560 (1970).
- 10.- Benjamin, M. M.: *Outline of Veterinary Clinical Pathology 3rd ed.* The Iowa State University Press, Ames, Iowa. (1982).
- 11.- Ishihara, K., Ohtani, T., and Kitagawa, H.: Clinical studies in bovin leukemia in japanese black cattle III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes pattern in grups of leukemic cattle and those negative and positive for antibody against bovine leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42: 289-295 (1980).
- 12.- Bidwell, D. E., Bartlett, A. and Voller, A.: Enzyme Immunoassays for viral diseases. *J. Infect. Diseases.* 136: suppl. 274-278 (1977).

13. -Biancifiori, F. and Cenci, G.: ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis virus. *Fourth Int. Symposium on Bovine Leukosis*. Bologna Italia : 167-172 (1982).
14. -Burrige, . J., Thurmand, M. C. and Miller, J. M.: Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologics test. *Am J. Vet. Res.* 10 : 1866-1867 (1982).
15. -Burrige, M. J., Puhr, D. M. and Hennemann, J. M.: Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *J.A.V.M.A.* 179: 704-707 (1981).
16. -Crowley, A. J.: Enzootic bovine leukosis in Great Britain the development of a policy cattle viruses. *S. Vet. J.(GB)* 3 : 162-171 (1982).
17. -DiGiacomo, F., Darlington, L. and Everman, F.: Natural Transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. *An. J. Com. Med.* 49: 340-342 (1985).
18. -Dohan, J. K., Burmeister, L. ., Stephanie, V. F. and Grainer, T. C.: Relationships of bovine leukemia virus prevalence in dairy cattle to human limphocitic leukemia. *Am. J. Vet. Res.* 48 : 235-238 (1987).
19. -Donald, R.: Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus . *J.A.V.M.A.* 188 :823-826 (1986).
20. -Everman, J. F., DiGiacomo, R. F. and Hopkins, S. G.: Bovine leukosis virus: Understanding viral transmission and the methods of control. *Vet. Med.* 82: 1051-1058 (1987).
21. -Esteban, E. H., Thorn, R. M., and Ferrer, J. F.: An amplifield immunoperoxidase assay to detect bovine leukemia virus expression: Development and comparison with other assays. *Cancer Resch.* 45: 3231-3235 (1985).
22. -Ferrer, J. F., Avila, L. and Stock, N. D.: Serological detection of Type C viruses found in bovine cultures. *Cancer Res.* 32: 1864-1877 (1972).
23. -Ferrer, J. F., Piper, C. E., Abt, D. A. and Marshak, R. R.: Diagnosis of bobine leukemia virus infection : Evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. *Am. J. Vet. Resch.* 38: 1977-1981 (1977).

- 24.-Ferrer, J. F.: Bovine Limphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24: 1-68 (1980).
- 25.-Ferrer, J. F., Marshak, R. Abt, D. and Kenyon, J.: Persistent lymphocytosis in cattle: it's cause nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9: 851-857 (1978).
- 26.-Ferrer, J. F.: Relationship between Lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle. *J.A.V.M.A.* 175 : 705-708 (1979).
- 27.-Freedman, A., Boyd, A., Bieber, F., Daley, J., Rosen, K., Orowitz, J., Levy, D. and Nadler, L.: Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 70 : 418-427 (1987).
- 28.-Gomez, M., Moojen, V., Fernandez, J., and Ferreiro, L.: Detection of serum antibodies to bovine leukosis virus in cattle in the State of Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinaria UFRGS.* 13: 15-22 (1985).
- 29.-Graves, D. D. and Ferrer, J. M.: In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Resch.* 36: 4152 (1975).
- 30.-Gullemain, B., Mamoun, R. Z., Astier, T., Duplan, J. F. and Parodi, A. L.: Early polykariocytosis inhibition test: Evaluation of its performance in a seroepidemiological survey of bovine leukemia virus induced antibodies in cattle. *Ann. Rech. Vet.* 9: 709-720 (1978a).
- 31.-Hare, D., Mitchel, D., Singh, L., Bovillant, P., Eaglesome, D., Ruckerbauer, M., Bielanski, A. and Randall, B.: Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus control and eradication. *Canadian Vet.J.* 26: 231-234 (1985).
- 32.-Honma, T. and Onuma, M.: Bovine leukemia virus infection in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42: 5-8 (1980).
- 33.-Hopkins, S. G., Evermann, J. F., DiGiacomo, R. F., Parish, S. M., Ferrer, J. F., Smith, S. and Bangert, R. L.: Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. *Vet.Rec.* 122: 387-391 (1988).

- 34.-Ishihara, K., Ohtani, T. and Kitagawa, H.: Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzymes pattern in groups of leukemic cattle and those negative and positive for antibody against bovine leukemia virus. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42: 289-295 (1980).
- 35.-Jaramillo, B. R.: El Linfosarcoma de Bovinos en la cuenca lechera del Valle de Mexico. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F., (1975).
- 36.-Jazbec, I., Klinkom, M. and Gregorovic, V.: The ELISA test for diagnosing enzootic bovine leukosis from the tissue fluids of internal organs. *Zbornik Biotehiske Fakultate Univerze Eduardo Kardelja v Ljubljani Veterinarstvo.* 24:117-121 (1987).
- 37.-Jubb, R. V. and Kennedy, P. C.: Pathology of Domestic Animals. 3ed ed. Academic Press, New Yorck . p 386-392 (1985).
- 38.-Kaaden, O. and Stephenson, J.: Detection of BLV infection: Serological methods. *Ann Rech. Vet.* 9: 406-605 (1978).
- 39.-Kantec, C. E., Kruger, E. R. and Welter, V. R.: Prevalence of bovine enzootic leukosis among dairy cattle in Parana State, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 3: 125-129 (1983).
- 40.-Kajikawa, O., Koyama, H., Sasaki, T., Yoshikawa, T. and Salte, H.: Studies on Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of antibodies in cattle infected with bovine leukemia virus. *Jps. J. Vet. Sci.* 45 : 347-353 (1983).
- 41.-Keller, P.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage. *Res. Vet. Sci.* 17: 49-58 (1974).
- 42.-Keyon, S. and Piper, C.: Cellular basis of persistent lymphocytosis in cattle infected with bovine leukemia virus. *Infect. and Immunol.* 16: 891-897 (1977).
- 43.-Kettmann, R., Deshamps, J., Covez, D., Claustrioux, J., Palm, R. and Burny, A.: Chromosome integration domain for bovine leukemia provirus in tumors. *J. Virol.* 47: 146-150 (1983).
- 44.-Klimentowski, S.: Comparasion of DGIA and ELISA tests on blood and milk for diagnosing bovine leukosis. *Medycyne Weterynaryjna.* 42 : 342-346 (1986).

- 45.-Kinushita, S., Tojo, H., Usada, N., Oota, T., Satou, Y., Hirashawa, H., Tanaka, K., Koizumi, H., Tokada, T. and Aoki, S.: Serum sialic acid and glycoprotein levels in bovine leukosis. *J. Jpn. Vet. Med. Ass.* 40: 89-92 (1987).
- 46.-Kono, Y., Sentsui, H., Arai, K., Fujigaki, A., Enomoto, C., Iwasaki, H. and Ishida, H.: Serological methods to detect calves infected in utero with bovine leukemia virus. *Jps. J. Vet. Sci.* 45: 453-461 (1983).
- 47.-Larios, F., Madewell, B., Fernandez, L., Garcia, J. y Monroy, J.: Estudio seroepidemiológico sobre el complejo Leucosis-Linfosarcoma en el altiplano de México. IX Congreso Nacional de Buiatría (memorias) Puebla México: 245-249 (1983).
- 48.-Larios, F., Madewell, B. y Monroy, J.: Complejo leucosis linfosarcoma. Estudio epidemiológico en bovinos Pardo-Suizo. Reunion de Inv. Pec. en Méx. Memorias (1985).
- 49.-Levy, D., Kettmann, R., Djilaili, S., Marchand, P., Minoprio, P. and Parodi A. L.: Comparison between T and B lymphocytes in the expression of bovine Oncovirus. *Ann. Rech. Vet.* 18: 316-317 (1987).
- 50.-Lucas, M. H., Dawson, M., Chasey, D., Wibberley G. and Roberts, D. H.: *Vet. Rec.* 106: 128 (1981).
- 51.-Luks, R. and Collins, D., R.: Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* 34: 1488-1503 (1974).
- 52.-Mammerickx, M., Portetelle, D. and Burny, A.: Experimental cross transmission of bovine leukemia virus (BLV) between several animals species. *Fourth International Symposium of Bovine Leukosis Bologna Italia* (1980).
- 53.-Mammeririx, M., Portetelle, D., Bruck, C. and Burney, A.: Use of an ELISA involving monoclonal antibody for the detection of antibodies against bovine leukemia virus in a herd with incidence of enzootic bovine leukosis. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin B.* 31: 210-218 (1984).
- 54.-Mammerickx, M., Portetelle, D. and Bruck, C.: Le diagnostic de la leucose bovine enzootique a l'aide d'un test immuno-enzymatique(ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. *Ann. Méd. Vét.* 128: 55-63 (1984).

55. -Manual of Histologic Stainings Methods of the Armed forces Institute . Third Edition by Lee G. Luna (1968).
56. -Marín, C., Lopez, M., Alvarez, M. and Palencia, L.: Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Reach. Vet.* 9:743-745 (1978).
57. -Maaten, van der M. J. Miller, J. M. and Boothen, A D.: Replicating Type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 491 (1974).
58. -Maaten van der M. J.: Levamisole does not affect the virological and serological responses of bovine leukemia. *Can. J. Comp. Med.* 47: 474-479 (1983).
59. -Mattheus, W. and Welland, F.: Studies on leukotic bovine and ovine precipitating serum antibodies and the electrophoretic behaviour of the antigen specific for leukotic cattle. *Vet. Microbiol.* 1: 263-274 (1976).
60. -McDonald, H. C. and Ferrer, J. F.: Detection, quantitation and characterization of the major internal antigen of the bovine leukemia virus by radioimmuno assay. *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 875-882 (1976).
61. -Medina, C. M.: Leucosis bovina. *Vet. Méx.* 19: 151-159 (1988).
62. -Miller, M. J. and Maaten van der, M. J.: Bovine leukosis- It's importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.* 65: 2194-2203 (1982).
63. -Miller, J. M. and Maaten van der, M. J.: A review of methods to control bovine leukosis. *Proceedings of the United States Animal Health Association.* 86: 119-125 (1982).
64. -Miller, J. F. and Maaten, van der M. J.: A Complement-fixation test for the bovine leukemia (C-Type) virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1699-1702 (1974).
65. -Miller, J. M. and Maaten, van der M. J.: Use of glicoprotein antigen in in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer.* 13: 1369-1375 (1977).
66. -Mohanty, L. and Dutta, F.: Virus de leucemia bovina (VLB). *Virologia Veterinaria.* 353-358 . *Editorial Interamericana* (1983).

- 67.-Mooney, S. C., Patnaik, A. K., Hayes, A. A. and McEwen, E. G.: Generalized lymphadenopathy resembling lymphoma in cats: six cases (1972-1976). *J.A.V.M.A.* 190 : 60 (1987).
- 68.-Moulton, E. J.: Tumors in Domestic Animals. University of California Press., U.S.A. (1978).
- 69.-Parodi, A. L., Dargent, F. and Crespeau, F.: Histological classification of canine malignant lymphoma. *J. Vet. Med.* 435: 178-192 (1988).
- 70.-Perrin, B., Perrin, M., Fedida, M. and Berger, B.: Enzoootic bovine leukosis: Study of 11 herds and different diagnostic techniques. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 137: 838-845 (1986).
- 71.-Piper, C. E., Ferrer, J. F., Abt, D. A. and Marshak, R. R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 165-168 (1979).
- 72.-Prase, K. W.: Lactic dehydrogenase activity and isoenzyme distribution in serum of normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* 30: 2181-2184 (1969).
- 73.-Raich, P. C., Takashima, I. and Olson, C.: Cytochemical reactions in bovine and ovine lymphosarcoma. *Vet. Pathol.* 20: 322-329 (1983).
- 74.-Ressang, A., Ellens, O., Mastenbrock, N., Quak, J., Miller, J. and Maaten, van der M. J.: *Zentralbl Veterinärmed, B* 23: 566-579 (1961).
- 75.-Ressang, A., Mastenbrock, N., Quak, J., Griensuen, D., Colafat J., Hageman, C., Sovissi, T. and Swen, S.: Studies on bovine leukemia. I. Establishment of type C virus-producing cell line. *Zentralbl Veterinärmed Reihe B.* 21: 602 (1974).
- 76.-Riley, V. and Wroblewski, F.: Serial lactate dehydrogenase activity in plasma of mice with growing or regressing tumors. *Science.* 132: 151-152 (1960).
- 77.-Romero, H, Abaracon, D., Rowe, A. and Silva, G.: Bovine leukemia virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Rec.* 115: 440-441 (1984).
- 78.-Rosen, C., Sodroski, J., Kettman, R., Burny, A. and Haseltine, W.: Transactivation of the bovine leukemia virus long terminal repeat in BLV-infected cell. *Science.* 227: 320-322 (1985).
- 79.-Rutili, D., Severini, M., Rampichini, L. and Titoli, T.: Epidemiologic study on enzootic bovine leukemia in Italy. *Ann. Vet. Reach.* 9: 761-764 (1978).

- 80.-Shioya, M., Yanagisawa, M., Kawasamura, T. and Kanno, T.: Separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate (cellogel). *Jpn. J. Clin. Pathol.* 19: 469-472 (1971).
- 81.-Silkina, L. F.: Dehydrogenase in the blood serum of sheep with experimentally induced leukosis. *Veterinariya, Moscow. USSR.* 1:41-42 (1984).
- 82.-Singh, V. P., Bansal, M. P. and Kumar, A.: Application of radioimmunoassay for detection of antibodies against bovine leukemia virus infection in cattle, sheep and rabbits. *Ind. J. Virol.* 2: 89-93 (1986).
- 83.-Sorensen, D. K. and Beal, V. C.: Prevalence and economics of bovine leukosis in the United States. *Proceedings Bovine Leukosis USDA.*: 33-35 (1979).
- 84.-Susan, V. M., Onuma, M., Aguilar, R. and Murakami, Y.: Prevalence of bovine Herpesvirus-1, Parainfluenza-3, bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine Adenovirus-7, Bovine Leukemia Virus and Bluetongue virus antibodies in cattle in México. *Jpn. J. Vet. Med. Resch.* 31: 125-132 (1983).
- 85.-Takashima, I. and Olson, C.: Bovine leukosis virus in sheep. Lymphocyte modification and surface-immunoglobulin-bearing cell numbers. *Vet. Microbiol.* 5: 1-12 (1980).
- 86.-Theilen, G. H., and Madewell, B. R.: Bovine leukemia disease complex (malignant lymphoma, leukosis, lymphosarcoma). *Veterinary Cancer Medicine* . 252-272. *Medicine Lea and Febiger, Phil.* (1979).
- 87.-Todd, D. and Adair, B. M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet. Rec.* 107: 124-126 (1980).
- 88.-Toma, B., Uvillauze, A., Prevost, P., Duret, C., Eliot, M., Chappuis, G. and Parodi, A. L.: Detection of bovine leukosis by the ELISA test on bulk and individual milk samples. *Ann. Rech. Vet.* 17: 75-83 (1986).
- 89.-Uruchurtu, A.: Incidencia de Linfosarcoma en bovinos del D. F., Tesis de licenciatura. Esc. Nac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México (1967).
- 90.-Valli, B. J. and McSherry, B.: Histology of lymphoid tumors in dog, cat and cow. *Vet. Pathol.* 18: 494-512 (1981).

- 91.-Yasutomi, Y., Takahashi, K., Kurosawa, T., Sonoda, M. and Onuma, M.: Early diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Jps. J. Vet. Sci.* 49 : 957-963 (1987).
- 92.-Yoshikawa, T., Yamamura, H., Oyamada, T., Horowitz, J., Levy, D. and Nadler L.: Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 70: 418-427 (1987).
- 93.-Walker, I. R.: Lymphoma with hipercalcemia. *CMA Journal.* 111:928-930 (1974).
- 94.-Weber, A., Bendixen, Jr., Hammer, R., Jessen, C. and Pomeroy K.: Correlative studies of the frequency of blood lymphocytic nuclear pokets and persistent lymphocitosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 35: 537-541 (1974).
- 95.-Wuu, K. D., Graves, D. and Ferrer, J.: Inhibition of the reverse transcriptase of bovine leukemia virus by antibody in sera from leukemic cattle and immunological characterization of the enzyme. *Cancer Res.* 37: 1438-1442 (1977).