

14
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DETECCION DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB) MEDIANTE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN AGAR GEL (IDAG) EN DOS UNIDADES DE PRODUCCION DE LECHE EN EL MUNICIPIO DE ZUMPANGO, ESTADO DE MEXICO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

JOSE JUAN CASTILLO ESTRADA

ASESORES: M.V.Z. LUIS ARTURO NAVARRO MORALES
M.V.Z. CARLOS GONZALEZ SILVA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268082

OK
291



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Detección del virus de la leucosis bovina (VLB) mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) en dos unidades de producción de leche en el municipio de Zumpango, Estado de México".

que presenta el pasante: José Juan Castillo Estrada
con número de cuenta: 8758773-7 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de septiembre de 1998

PRESIDENTE	<u>MVZ. Luis A. Navarro Morales</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Luz M. Ortega de Ochoa</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Raúl Mar Cruz</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Carlos H. Flores Vázquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Rafael Pérez González</u>	

DEDICATORIAS

Este trabajo no es solamente el producto de un esfuerzo personal, sino, del fruto y la cooperación de todas aquellas personas que han sido testigos de mi vida y que han colaborado en mi formación personal y profesional. A todas ellas, les agradezco sus consejos, su paciencia, su ternura y su cariño para mi persona.

¡Gracias!

A mi Padre (qepd): Gracias a usted, que siempre lo tomo como ejemplo de perseverancia, tenacidad, honradez y trabajo.

¡Que ahí en el infinito en donde está, el Creador lo premie!

A mi Madre: Gracias por el cariño de Madre que siempre he tenido y que siempre ha querido lo mejor para su hijo.

A mis Hermanos(as): Siempre hemos sido una familia y espero que nunca decaiga ese espíritu de cariño, comprensión y cooperación entre nosotros.

A mis Hijos: Para que nunca dejen escapar el duendecillo travieso que todos llevamos dentro.

A mi familia "Postiza": Gracias por darme cobijo, cariño y consuelo cuando lo necesité, y que ustedes, desinteresadamente me lo ofrecieron.

A mis amigos de Generación: Muchachos, pasamos hambres, desvelos, alegrías y un sinnúmero de sinsabores, pero logramos identificarnos siempre como hermanos. Donde quiera que estén ¡Gracias!

A mis amigos en el desempeño

Profesional: La Docencia nos unió bajo un signo distintivo: el tratar de transmitir nuestros saberes a quienes lo necesiten.

A mi Asesor: Gracias por permitirme realizar un sueño dorado: la práctica de la Medicina Veterinaria.

A mis Sinodales: Porque siempre y para siempre sigan encauzando y escuchando a sus discípulos en el proceso enseñanza –aprendizaje.

A tí: Que sin interés mezquino lograste despertar en mí, el amor y el cariño hacia tu persona.

A aquellos compañeros que no se

han titulado: La Rueda de la Vida nos coloca a veces en situaciones que no nos permite lograr nuestra metas. No desesperes, ¡lucha y esfuérzate por alcanzar lo anhelado!

RESUMEN

El presente trabajo, fue realizado en el municipio de Zumpango, Estado de México, con el fin de detectar la presencia del virus de leucosis bovina (VLB) en dos unidades de producción : “San Francisco de Asís” y “Los Pirineos”. La prueba serológica utilizada para detectar el VLB fue la de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG).

Se muestrearon al azar 50 vacas lactantes en cada una de las unidades de producción, en edades que fluctúan entre los cuatro a los seis años; el total de vacas muestreadas fue de 100.

En la unidad de producción “San Francisco de Asís”, de 50 vacas muestreadas, 38 resultaron positivas y doce negativas, con porcentajes del 76% y 24% respectivamente. En la unidad de producción “Los Pirineos”, de 50 vacas muestreadas, 31 resultaron positivas y 19 negativas, con porcentajes del 62 % y 38 % respectivamente.

De las 100 vacas muestreadas en las dos unidades de producción, 69 resultaron positivas y 31 negativas, con porcentajes del 69% positivas y 31% negativas.

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	Pág. 2
2.- ÍNDICE.....	Pág. 3
3.- INTRODUCCIÓN.....	Pág. 5
4.- ANTECEDENTES:	
A. Presencia de la leucosis bovina en México y en otros países...	Pág. 7
5.- LEUCOSIS BOVINA:	
A. Sinonimias.....	Pág. 9
B. Etiología.....	Pág. 9
C. Transmisión de la enfermedad:	
I.- Vertical.....	Pág. 11
II.- Vía calostro.....	Pág. 12
III.- Horizontal.....	Pág. 12
D. Presentación y signos clínicos:	
I.- Leucosis Esporádica Bovina.....	Pág. 14
II.- Leucosis Enzoótica Bovina.....	Pág. 16
E. Diagnóstico clínico	Pág. 20
F. Diagnóstico diferencial.....	Pág. 22
G. Diagnóstico de laboratorio.....	Pág. 22
H. Prevención, control y erradicación.....	Pág. 24
6.- OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES.....	Pág. 27

7.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 28
8.- RESULTADOS.....	Pág. 40
9.- DISCUSIÓN.....	Pág. 42
10.- CONCLUSIONES.....	Pág. 45
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 47

INTRODUCCIÓN

Los estudios de detección y prevalencia de enfermedades infecciosas del ganado bovino han demostrado ser de gran utilidad en medicina veterinaria. Dichos estudios tienen las siguientes funciones: 1) Proporcionar información sobre la detección, distribución y frecuencia de enfermedades infecciosas del ganado bovino, como es la leucosis bovina, lo cual hace posible asignar prioridades a los programas de control e investigación de enfermedades; 2) Sentar las bases para evaluar el avance de los programas de control; 3) Identificar los hatos de ganado con problemas infecciosos; 4) Proporcionar las bases para evaluar el efecto socioeconómico y la posible repercusión de estas enfermedades en la salud humana.

Este estudio realizado trata de proporcionar una visión real de la presencia de leucosis bovina en la zona lechera del municipio de Zumpango, Estado de México, y podrá servir como modelo para otros estudios que eventualmente podrán ser incluidos en un programa continuo de reconocimiento de esta enfermedad.

La leucosis bovina (LB) es descrita como una enfermedad oncogénica que afecta al ganado bovino y se puede considerar la enfermedad neoplásica maligna más frecuente del ganado bovino, aunque probablemente menos del 10 % del total de animales portadores sanos asintomáticos desarrolla leucosis bovina y alrededor del 29 % presenta la forma benigna de linfocitosis persistente (18). Esta enfermedad tiene cierta importancia económica principalmente por tres razones: 1) Por la restricción a la exportación de ganado a los países en los que se ha erradicado la enfermedad; 2) Por el problema clínico

especialmente en vacas adultas; 3) Por ser causa de decomiso por tumores con las consecuentes pérdidas económicas directas (15,18, 29).

Asimismo, la LB ocasiona pérdidas potenciales en el mercado de exportación, siendo en el año de 1978 de 56,156 cabezas de ganado con valor de cerca de 145 millones de dólares (6).

ANTECEDENTES

PRESENCIA DE LA LEUCOSIS BOVINA EN MÉXICO Y OTROS PAÍSES

Los primeros informes de la enfermedad en México datan del año 1967. En el año de 1969 se diagnosticaron 6 casos; en 1971 se diagnosticaron 33 casos; en 1972 se diagnosticaron 10 casos; 1973 se diagnosticaron 18 casos y en 1974 se diagnosticaron 37 casos (1,18).

En el año de 1982, en Mexicali, Baja California Norte, se encontró una prevalencia de anticuerpos contra el virus de LB en un 32 % en sueros de bovinos colectados en rastros municipales al utilizar la prueba de IDAG (4,15,18).

En el año de 1986, en los estados de Puebla, Oaxaca y Tamaulipas se encontraron anticuerpos contra el virus de LB en un 17%, 34% y 54% respectivamente, de un total de 638 bovinos muestreados (15).

En el ganado lechero de la cuenca de Tizayuca, Hidalgo, se demostró en 1983 un 40 % de seropositividad con la prueba de inmunodifusión en agar-gel (18).

En los estados de Washington e Idaho en los Estados Unidos, se encontraron 12.6 % de reactores positivos en seis hatos de vacas Holstein-Friesian, mientras que en el estado de Florida se encontraron el 47.8 % de reactores positivos. El Centro Nacional de Enfermedades de los Animales de los EUA, calcula que un 25% de los bovinos lecheros del

país, presentan títulos de anticuerpos contra el VLB con % de seropositivos en los hatos que van desde un 10% hasta un 48% en diferentes estados de la Unión Americana (7,9,15).

El país que señala la mayor prevalencia de anticuerpos contra el VLB es Venezuela (49%), le siguen Japón (44%) y Filipinas (38%) (15).

LEUCOSIS BOVINA

SINONIMIAS

La leucosis bovina, recibe diferentes nombres: linfosarcoma, leucemia bovina, linfomatosis, leucosis enzoótica bovina, linfoma, hemoblastosis, linfoblastoma, linfadenosis, linfoma maligno, linfocitoma, linfomacitosis, linfoma del ganado, linfoma maligno del ganado y complejo viral leucosis linfosarcoma (1,4,15,18,23).

ETIOLOGÍA

El virus de la leucosis bovina fue aislado por primer vez en 1969 a partir de linfocitos infectados de un bovino. Es un Oncornavirus de la familia Retroviridae. Morfológicamente es similar a los virus tipo C, causantes de leucemia en otras especies. Contienen la enzima transcriptasa reversa, lo que le permite producir, cadenas de ADN acopladas a la estructura de su propio ARN (15,23,29). Estas cadenas dobles de ADN se insertan en la cromatina nuclear de un linfocito permaneciendo ahí indefinidamente a lo largo de divisiones celulares. Un organismo así infectado responde produciendo anticuerpos contra el virus, los que no lo pueden atacar por su ubicación intracelular, sin embargo, inhiben la liberación de viriones a la circulación general, razón por la cual no hay viremia (15).

El VLB contiene dos tipos de antígenos principales, el antígeno externo compuesto de glicoproteínas, designado gp 51 o gp 60, el cual es el de mayor tamaño (70.000 Daltons), y el antígeno interno constituido por proteínas y designado p 24 o p 25, de peso molecular menor (24,000 Daltons). Estos antígenos son muy importantes desde el punto de vista de diagnóstico por serología (5,15,22,23).

El VLB es destruido por radiación ultravioleta, por congelación o por calor a 56 °C durante 30 minutos (30).

TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

Dado que la LB es una enfermedad infecciosa, determinar las formas de transmisión es de gran importancia en el desarrollo efectivo de las medidas de control. En base a datos serológico se sabe que el virus es transmitido lentamente incrementándose la infección con la edad. La transmisión del virus entre los animales ocurre primariamente por la sangre infectada. El virus de la leucosis bovina es antigénicamente diferente de cualquier otro virus del bovino y dentro de condiciones naturales solamente afecta al bovino, aunque experimentalmente lo haga en ovinos y caprinos (15,29).

La transmisión del virus puede ser vertical y horizontal.

VERTICAL

PRENATAL.- El VLB es capaz de atravesar la barrera placentaria en el bovino, lo que sucede en el 18 % de los animales portadores del virus. Al tercer mes de gestación, el feto ha adquirido competencia inmunológica demostrable por la producción de anticuerpos contra el VLB. En Japón se encontró un 26 % de becerros infectados *in utero* por el VLB al nacimiento y antes de ingerir calostro materno (15).

No hay evidencias que demuestren que el virus de LB pueda ser transmitido vía óvulo o espermatozoides; todas las evidencias indican lo contrario, ya que el gameto es incapaz de transmitir el virus como parte inherente del tejido (23). Al parecer, en la transferencia de embriones raramente ocurre la infección por VLB de madres infectadas a la progenie (3,23).

VÍA CALOSTRO

Se ha demostrado la presencia del VLB en la leche de hasta un 50% de las vacas infectadas, pero no se considera como una forma importante de transmisión del VLB hacia el becerro. Recientemente se ha demostrado que los linfocitos afectados por el VLB son capaces de sobrevivir a su paso por los estómagos de los rumiantes y atravesar la pared intestinal e infectar los órganos de los neonatos (15,23).

HORIZONTAL

Diferentes estudios han demostrado que la forma de transmisión más común e importante del VLB es a través del contacto con animales infectados por el virus mediante las formas descritas a continuación (15,29).

El papel de insectos chupadores de la sangre o hematófagos es sumamente importante para la transmisión del virus de la LB (15,20,22). Esto está reforzado por el hecho de que el ganado se infecta en mayor grado durante los meses de verano, cuando más abundan éstos. En linfocitos de bovino, recuperados de “moscas del establo” (Stomoxys calcitrans) se ha encontrado el VLB, así como en la “mosca del caballo” (Tabanus fuscicostatus). Después de la inoculación intradérmica, intravenosa, intramuscular o subcutánea de 0.0005 ml de sangre (con un contenido de 2,500 linfocitos) procedente de ganado portador del VLB a animales susceptibles, se ha detectado la producción de anticuerpos contra el VLB en estos últimos (7,15,20,23,30,31).

Un papel importante en la diseminación del VLB es el uso múltiple de agujas y jeringas contaminadas, descornadores, instrumentos quirúrgicos, aretadores, etc.(15,23,29).

Experimentalmente se ha transmitido la infección por el VLB a través de la introducción de linfocitos infectados en el útero, lo cual puede ocurrir al usar eyaculados contaminados con pus o sangre por medio de la inseminación artificial (15,30).

Estudios realizados, documentan que es posible la transmisión rectal de VLB por sangre contaminada. La introducción de 500 ml de sangre por vía rectal en vacas, hizo posible que 5 semanas después de la inoculación, éstas resultaran seropositivas. Sin embargo, la introducción de 2 ml de sangre infectada con VLB en un guante obstétrico durante la palpación rectal, hizo que resultaran seropositivas al VLB después de 5 semanas (9,32).

Experimentalmente se han infectado ovejas y cabras con el VLB, pero la transmisión natural no se ha evidenciado (30).

Hasta el momento, no se ha demostrado la presencia del VLB en saliva o en secreciones nasales, ni en el ser humano (22,23).

PRESENTACIÓN Y SIGNOS CLÍNICOS

Existen dos tipos de presentaciones de LB: la esporádica y la enzoótica (1,15).

LEUCOSIS ESPORÁDICA BOVINA

Tiene características distintas a la presentación enzoótica. Ocurre al azar en ganado menor de tres años de edad e incluye las formas juvenil, tímica y cutánea (15). No es contagiosa y por lo general se presenta como casos individuales dentro de un hato. No se han aislado o demostrado partículas virales a través de la microscopía electrónica, ni se han encontrado anticuerpos contra el virus (19).

FORMA JUVENIL O MULTICÉNTRICA

Ocurre más comúnmente en becerros de tres a seis meses de edad, aunque otros autores manejan que se presenta desde el nacimiento hasta los dos años de edad, caracterizándose por una linfadenopatía generalizada (1,15,19).

FORMA TÍMICA

Ocurre más comúnmente en ganado de uno a dos años de edad, en donde el timo es el principal órgano afectado, sin embargo, se observa dolor al respirar, pérdida de peso y disminución del apetito (1,19, 23).

FORMA CUTÁNEA

Es poco frecuente, presentándose en animales de uno a tres años de edad; se caracteriza por la aparición de tumoraciones linfoides en la piel, de unos 5 centímetros de diámetro que aparecen en cuello, dorso, ancas y muslos y con frecuencia los nódulos carecen de pelo siendo necesario diferenciar de melanomas. Existen informes que afirman la regresión espontánea de la forma cutánea (1,2,19,23).

LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

Se presentan en animales mayores de cuatro años, caracterizándose por tumoraciones de desarrollo lento en los ganglios linfáticos, en los órganos o en ambos, que en un momento dado causan alteraciones en las funciones vitales del organismo (15,25,29).

El examen clínico del animal sospechoso de leucosis enzoótica bovina debe incluir la palpación de todos los ganglios externos: mandibulares, parotídeos, retrofaringeos, preescapulares, subiliacos y retromamarios; por palpación rectal los sublumbares e iliofemorales. La palpación de nódulos linfáticos externos e internos permitió el diagnóstico del 58 % de los casos de leucosis enzoótica bovina. La distribución de las tumoraciones que afectan a los nódulos linfáticos es por lo general asimétrica y no generalizada (15).

El abomaso se encuentra afectado aproximadamente del 60 al 80 % de los casos de leucosis enzoótica bovina. Los animales padecen una o varias úlceras sangrantes con heces oscuras y mal olientes, producto de la sangre digerida o bien, heces diarreicas. Además existen debilidad generalizada y anemia por pérdida de sangre con anisocitosis, poiquilocitosis y olicromasia de eritroblastos (12,15,19).

Los tumores en útero, vagina y región perivaginal, son detectados durante las palpaciones del aparato genital, principalmente al final de la gestación, al parto o al inicio de la lactancia (15).

En más del 50% de los casos de leucosis enzoótica bovina hay invasión tumoral al pericardio, miocardio o endocardio. A la percusión de la zona cardíaca, se encuentra una zona amplia de sonido mate; hay taquicardia y los latidos pueden ser más fuertes o más débiles pero están entrecortados entre sí, se escuchan arritmias en los últimos estadios de la enfermedad y el lado derecho del corazón se encuentra más frecuentemente afectado (12,19,26,30).

Otros órganos afectados son los ojos, produciéndose en ellos exoftalmia debido a la tumoración de los linfonodos retrobulbares; hay además edematización de las conjuntivas, resequedad de la córnea y ulceración con ruptura de la misma (15,30).

Un 16% de los animales con leucosis enzoótica bovina presentaron tumoraciones de las meninges de las regiones lumbar y sacra, lo que se manifestó como parálisis progresiva de los miembros posteriores, adoptando en ocasiones la posición de perro sentado (15,30).

Algunos casos muestran tumoraciones del bazo, los cuales, están acompañados de conteos linfocitarios muy altos y con frecuencia terminan con una hemorragia intraabdominal fatal (15).

Otros órganos afectados son los riñones, ureteres, hígado, músculos, vasos sanguíneos y nódulos linfáticos mediastínicos (15,30).

Bendixen afirma que del 2 al 5 % del ganado adulto muere de leucosis enzoótica bovina cada año (30).

FACTORES COMPARATIVOS

ENTRE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA/LEUCOSIS ESPORÁDICA BOVINA

LEUCOSIS BOVINA

LEUCOSIS
ENZOÓTICA
BOVINA

LEUCOSIS
ESPORÁDICA
BOVINA

Causada por el virus
de Leucosis Bovina

Causa desconocida

Leucemia
Leucosis
Linfoma
Linfosarcoma

Leucemia (rara)
Leucosis
Linfoma
Linfosarcoma

Linfocitosis persistente

Forma Tímica

Forma Juvenil

Forma Cutánea

Diagnóstico por serología

Diagnóstico por métodos

hematológicos.

No serológicos

Fuente: Reed (23)

CUADRO I
HALLAZGOS EN ANIMALES AFECTADOS POR LEUCOSIS
ENZOÓTICA BOVINA

Agrandamiento de más de un nódulo linfático accesible	58
Indigestión (úlceras y tumoraciones abomasales)	62
Tumores en útero, vagina y región perivaginal	33
Tumores en corazón	50
Exoftalmos	9
Parálisis de los miembros posteriores	16
Tumores en bazo	9
Timpanismo ruminal con reflejo abomasal	19
Leucemia	64
Anemia por pérdida de sangre	57
Linfocitosis	30
Tumores de las meninges en las regiones lumbar y sacra	13

Fuente: Medina Cruz Mario (15)

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Se realiza en base a los signos clínicos como: pérdida de peso, disminución en la producción láctea, linfadenopatía externa, disminución del apetito, parálisis posterior, problemas respiratorios, exoftalmos unilateral o bilateral, diarrea, constipación y problemas cardiovasculares (15,30).

Se han dado casos en donde se auxilió al diagnóstico clínico, usando la ecocardiografía para detectar casos del linfoma del corazón en el ganado, asociado con la forma de leucosis bovina enzoótica, por el cuarto espacio intercostal derecho (26).

CUADRO II

DIAGNÓSTICO CLÍNICO: FRECUENCIA DE SIGNOS PREDOMINANTES DE LEUCOSIS BOVINA EN CASOS DE CAMPO

SIGNOS	%
Pérdida de peso	80
Disminución en la producción láctea	77
Linfoadenopatía externa	58
Disminución en el apetito	52
Parálisis posterior	41
Fiebre	23
Problemas respiratorios	14
Exoftalmos bilateral	13
Diarrea	12
Constipación	8
Exoftalmos unilateral	7
Problemas cardiovasculares	7

Fuente: Reed (23)

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Dependiendo de los signos clínicos es necesario diferenciar de tuberculosis, pericarditis traumática y con rabia en su forma paralítica. Este diagnóstico debe de auxiliarse con las pruebas de laboratorio que se consideren necesarias.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Dado que mucho ganado (95%) no presenta una respuesta clínica después de la infección de VLB, la detección depende de la demostración del virus en los linfocitos o la detección de anticuerpos para VLB. Antes de que la etiología del VLB fuera entendida, la detección de la infección era por métodos hematológicos o hemogramas como la clave de Bendixen, la de Goetze, la de Goettinger o la de Tolle . Estos exámenes no son confiables porque solamente el 30% del ganado afectado con VLB desarrolla linfocitosis, la cual es muy común y natural y no necesariamente indica la presencia del VLB. Intentos para erradicar con estos métodos hematológicos en algunos países de Europa han fallado (16,29,30).

Se han utilizado también, el diagnóstico histológico sobre todo en animales en fase tumoral de la enfermedad, pero no es específico. Otro método de diagnóstico es la microscopia electrónica, buscando partículas virales y proyecciones nucleares de la membrana linfocitaria (1).

Actualmente, hay siete exámenes serológicos para detectar el VLB: Inmunodifusión en Agar-Gel, Radioinmunoensayo, ELISA, Virus Neutralización, Fijación del Complemento, Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) e Inmunofluorescencia Indirecta. La prueba de Inmunodifusión en Agar-Gel (IDAG), es generalmente usada como prueba estándar para detectar animales seropositivos al VLB en los Estados Unidos de América y en la Comunidad Económica Europea dando como resultado que el número de positivos al VLB varíe, pero casi siempre es superior al 50%. Sin embargo, algunos autores mencionan que esta prueba falla en detectar animales positivos, sobre todo cuando hay títulos bajos de anticuerpos. Aún así, esta prueba constituye el método de diagnóstico más práctico y efectivo para la identificación de ganado infectado por el VLB, sobre todo en Estados Unidos de América y en algunos países europeos como Dinamarca, país con la mayor historia en erradicación de la leucosis bovina, ya que presenta una sensibilidad (la mínima cantidad de anticuerpos proteínicos que permite reconocer) del 98.5% y una especificidad (la capacidad para dar reacciones positivas verdaderas) del 99.8% (4,5,10,12,13,15,16, 17,23,24,25,28,29,31).

PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN

Al tener en cuenta que la infección por VLB es responsable del estado de leucosis esporádica bovina y de la leucosis enzoótica bovina y, que este virus es transmitido principalmente por contacto, resulta obvio que una de las formas más eficientes de limitar la propagación del VLB consiste en la remoción o segregación de todo ganado afectado por cualquiera de las dos formas (15).

En vista de la importancia que los vectores biológicos como moscas, mosquitos, garrapatas y otros artrópodos tienen en la transmisión de esta enfermedad, es esencial que en cualquier programa de erradicación del VLB se efectúe el control de estos vectores biológicos. Asimismo es importante evitar el uso de agujas, jeringas, bisturís, descornadores, aretadores, guantes obstétricos, etc., contaminados con sangre, en grupos de animales (9,15,32).

Si se considera que de un 18% de los becerros nacidos de madres positivas al VLB se encuentran afectados al nacimiento, resulta factible mantener el 70-82% restante, libre de la infección. Estos becerros se deben de separar de las madres portadoras y tomar su primer calostro y leche de vacas negativas al VLB (1,15,18,27,30).

La pasteurización del calostro o de la leche a 63° por treinta minutos, así como la fermentación natural o la agregación del ácido láctico al calostro, destruye al VLB y no afecta apreciablemente la actividad protectora de los anticuerpos neutralizantes

presentes, lo que ayuda a proteger a los becerros de la infección por VLB durante los primeros meses de vida (15,30).

Si tomamos en cuenta que para que el VLB estimule la producción de anticuerpos en el organismo se requieren cuando menos dos semanas a partir de la inoculación viral, resulta insuficiente un sólo muestreo para la detección de la totalidad de los animales infectados en un hato, aún si se utilizan las pruebas más sensibles.

En Bélgica, sólo los animales positivos a las pruebas serológicas se eliminan, mientras que los animales negativos se conservan en el hato para ser muestreados una o dos veces más. En este mismo país al usar la prueba de IDAG como método de diagnóstico de infección por VLB, se encontró que en dos hatos con prevalencias de 56% y de 37%, se requirió de 3 pruebas y del sacrificio de reactores positivos para eliminar la infección. En otro hato con 22 % de animales infectados se requirieron 2 pruebas para eliminar todos los animales seropositivos y en dos hatos más, con prevalencias de 2 % y 10%, bastó de la eliminación de reactores positivos a la primera prueba para eliminar la infección (1,15,30).

Este mismo sistema de control se utiliza ahora en Alemania, Holanda, Dinamarca, Suiza y en general en aquellos países pertenecientes a la Comunidad Económica Europea (30).

En Canadá se ha realizado de manera experimental un programa de erradicación de ganado contaminado con VLB, haciendo pruebas sucesivas cada 6 meses en los hatos, para detectar el ganado que resulta negativo en una primera prueba utilizando la IDAG (27).

En Japón se realizó también un programa de erradicación de ganado positivo a VLB, utilizando la prueba de IDAG, en un periodo de 8 años comprendido entre 1978 a 1986, realizando muestreos cada 6 meses en un hato de 500 vacas. En el periodo comprendido entre 1978 a 1981, el porcentaje de ganado afectado por el VLB fue de 75.1%; para 1982, el porcentaje fue del 72.8%; en 1983, fue del 54.6%; para 1984, disminuyó a un 32.7 % y en 1985, fue del 12.4%. Para 1986, el hato estaba libre del VLB. Obviamente, el ganado que salió positivo a VLB, fue eliminado, introduciendo ganado libre del VLB (21).

VACUNAS

Se ha utilizado en Japón, de manera experimental, el uso de vacunas inactivadas usando la línea celular LK₁₅, con resultados no del todo satisfactorios, ya que la vacuna produce anticuerpos contra el VLB en títulos muy bajos, pero no se descarta que en un futuro se utilice la vacuna como medida de prevención al VLB (8).

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de la respuesta inmune al virus de la leucosis bovina utilizando la prueba serológica de inmunodifusión en agar-gel en bovinos productores de leche.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar que la prueba de inmunodifusión en agar-gel es efectiva para detectar la infección por el virus de la leucosis bovina.
- Determinar qué porcentajes de las vacas muestreadas mediante la prueba de inmunodifusión en agar-gel son seropositivas al virus de la leucosis bovina.
- Valorar si es costeable utilizar la prueba de inmunodifusión en agar-gel para detectar la infección por el virus de la leucosis bovina en México.
- Explicar por qué la prueba de inmunodifusión en agar-gel es utilizada en algunos países en programas de erradicación de leucosis bovina.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

a) BIOLÓGICO:

- 100 vacas en producción, raza Holstein-Friesian, en edades que fluctúan entre los cuatro y seis años de edad.
- Antígeno de referencia para la prueba de anticuerpos contra leucosis bovina (Nombre comercial : “Bovine Leukemia Antibody Test Kit”. Leukassay * B, producido por los laboratorios Rhone Merieux, Inc. y distribuido por Pitman-Moore, Inc.)
- Suero proveniente de los animales muestreados.

b) NO BIOLÓGICO

- Tubos de vacutainer sin anticoagulante con capacidad de 7 ml
- Cajas de Petri
- Sacabocados
- Pipetas Pasteur
- Cámara húmeda
- Agar-gel
- Cloruro de sodio
- Agua destilada
- Fuente de luz
- Bomba de vacío con cánula integrada
- Termómetro de laboratorio

MÉTODO

Se extrajo sangre de las 100 vacas lactantes provenientes de las unidades de producción "San Francisco de Asís" y "Los Pirineos "; se puncionó la vena mamaria con los tubos de vacutainer, dejando que se separaran las dos fracciones de la sangre para proceder a realizar la prueba de IDAG con el suero obtenido.

El "kit" que contiene el antígeno para la prueba de anticuerpos contra leucosis bovina, presenta los siguientes componentes: antígeno glicoproteína, diluyente para el antígeno, suero reactivo positivo de referencia. En general, los sueros de las vacas muestreadas nos darán las siguientes reacciones dependiendo de si presentan o no una respuesta inmunológica al virus del VLB. El suero negativo no contiene anticuerpos contra el antígeno glicoproteína del virus de leucemia bovina, por lo cual, no forma inmunoprecipitado y no causa desviación de la línea de control. El suero positivo moderado contiene un bajo nivel de anticuerpos contra el antígeno glicoproteína del virus de leucemia bovina causando una desviación de la línea, doblada con respecto a la pared donde se colocó el antígeno, pero que no forma una línea de identidad. El suero positivo causa una línea de inmunoprecipitación con el antígeno y forma las líneas de identidad con la línea de control. La base para la prueba de IDAG es la migración concurrente de el antígeno y el anticuerpo a través del agar, el cual presenta una concentración salina elevada. Esta concentración salina elevada es necesaria para aumentar o realzar la formación del inmunoprecipitado. Como el antígeno y el anticuerpo se combinan específicamente, estos forman un inmunoprecipitado el cual es retenido en la matriz del gel, produciéndose una línea de inmunoprecipitación visible. Una variación extrema en la concentración del anticuerpo o antígeno en los huecos del gel, pueden alterar la aparición y

localización de las líneas de inmunoprecipitación. Otros factores que pueden afectar la reacción de inmunoprecipitación son las variaciones en la concentración de electrolitos, pH y temperatura. Niveles altos de lípidos en algunos casos, pueden afectar la formación de las líneas de inmunoprecipitación .

El antígeno para la prueba de anticuerpos contra leucosis bovina es una antígeno glicoproteína obtenido de una línea de células ovinas infectadas persistentemente. El suero reactivo positivo de referencia contiene anticuerpos contra el antígeno glicoproteína del virus de leucosis bovina. Este tiene la capacidad para formar una línea de inmunoprecipitación específica con el antígeno glicoproteína. El suero positivo de referencia es adicionado con la prueba, el cual funciona como guía para la interpretación de las reacciones del virus de los sueros a estudiar.

Para realizar la prueba de IDAG, se siguieron los siguientes pasos:

1. PREPARACIÓN DEL AGAR

- A. Se preparó la solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 8.6) mezclando 85g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada estéril.
- B. Se preparó una solución de agar al 0.9 %, añadiendo 9 g de agar por un litro de solución salina, hirviendo esta solución hasta que el agar se disolvió completamente.
- C. Se usaron cajas de Petri de 100 mm de diámetro colocando en ellas 15 mililitros de la solución de agar al 0.9 % a una temperatura de 55 a 60°C en cada caja, con un espesor de 3 mm.
- D. Se dejó enfriar el agar en las cajas de Petri a temperatura ambiente.

2. CORTE DE LOS HUECOS EN EL AGAR (VER FIGURA 1).

- A. Se hicieron los huecos con un sacabocados haciendo un hueco central y seis huecos periféricos, con un diámetro de 5 mm cada uno y separados 3 mm uno de otro.
- B. Se removieron los tapones de agar de cada hueco con una cánula conectada a una línea de vacío.

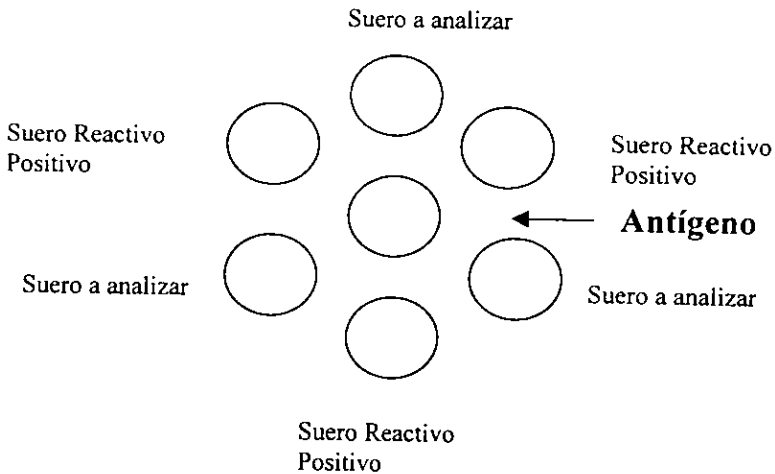
3.- LLENADO DE LOS HUECOS E INCUBACIÓN DE LAS CAJAS DE PETRI (VER FIGURA 1).

Nota: Es necesario prevenir la contaminación de los reactivos por bacterias, por lo que todo el material debe ser estéril.

- A. Se colocó en cada hueco un volumen de 0.08 ml de cada uno de los reactivos con una pipeta Pasteur, procurando que quedaran al nivel superior del agar.
- B. Se colocó el antígeno rehidratado en el hueco central.
- C. Se colocó el suero reactivo positivo de referencia en tres huecos periféricos alternados.
- D. Se colocaron los sueros a analizar provenientes de tres vacas distintas, en sus respectivos huecos periféricos.
- E. Un total de 3 sueros a analizar son examinados con su respectivo suero patrón.
- F. Se incubaron de 24 a 72 horas a una temperatura de 20 a 27 °C en una cámara húmeda cerrada.

Figura 1

Ubicación de los buecos en el agar

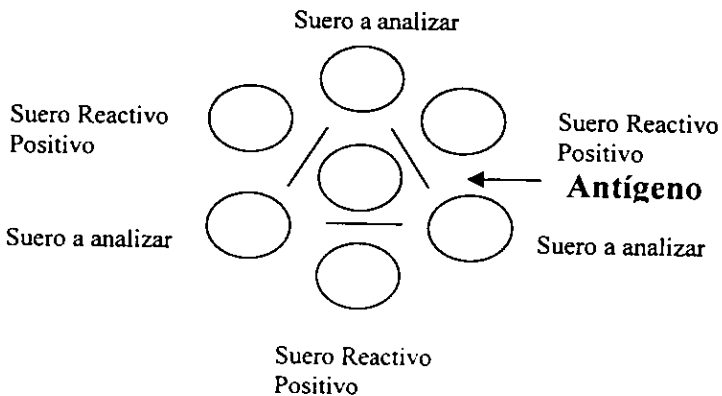


4.- LECTURA DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR-GEL (VER FIGURA 2).

- A. Se utilizó una lámpara que emite una luz estrecha e intensa con el fin de tener una buena iluminación para observar las líneas de precipitación sobre un fondo oscuro.
- B. Siempre hay que leer primero la línea del control patrón en cada caja de Petri.

Figura 2

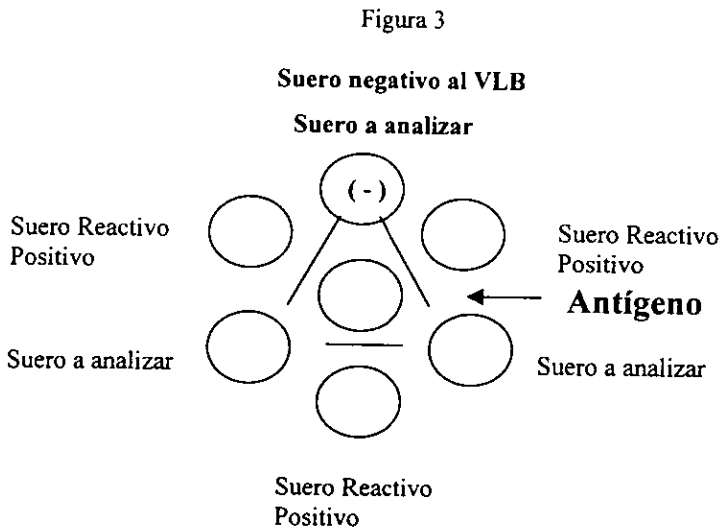
Líneas de Control Patrón entre el Antígeno y el suero positivo de referencia.



En esta prueba se observan los siguientes tipos de reacciones:

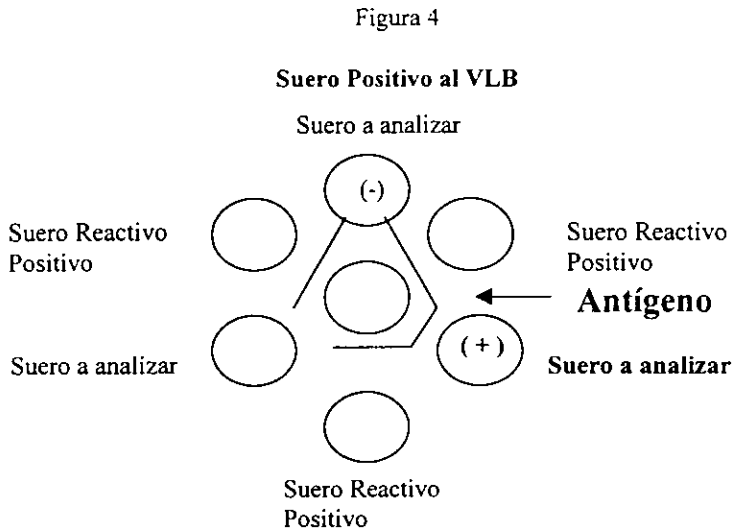
1) NEGATIVO (VER FIGURA 3).

Las líneas de control formada entre el antígeno y suero positivo de referencia se continúan hasta llegar en línea recta al hueco donde está el suero a analizar .



2) POSITIVO (VER FIGURA 4).

La línea de control se une en forma continua con la línea formada entre el suero a analizar y el antígeno, doblándose ligeramente.

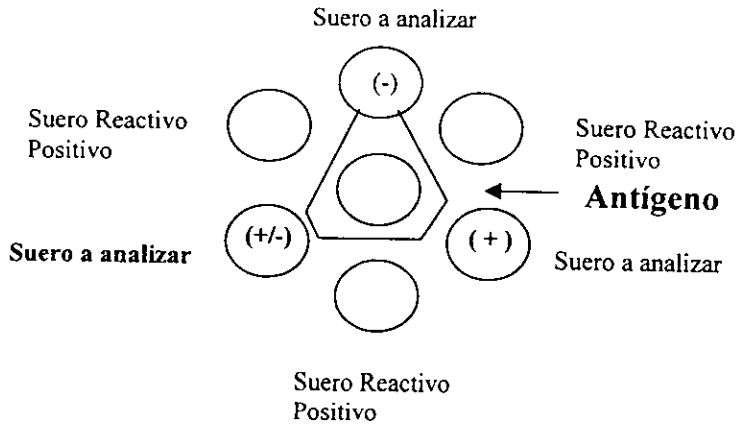


3) POSITIVO MODERADO (VER FIGURA 5).

La línea de control se dobla ligeramente hacia el hueco del suero a analizar. Estas reacciones son las más difíciles de detectar y son fácilmente ignoradas, por lo que se recomienda que se repita nuevamente la prueba para confirmarlas. Un positivo moderado puede ocurrir si hay un filtrado de suero positivo bajo la capa de agar dentro del hueco del suero negativo o si el suero negativo es contaminado con suero positivo.

Figura 5

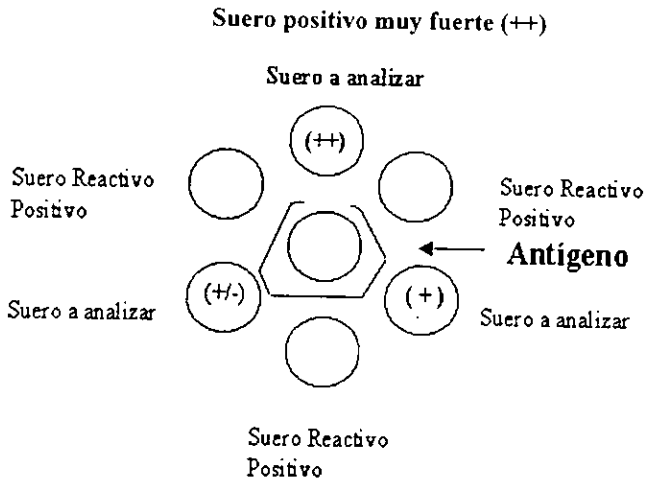
Suero Positivo Moderado (+/-)



4) POSITIVO MUY FUERTE (VER FIGURA 6).

La línea de control se dobla hacia el hueco del antígeno antes de llegar al hueco que contiene el suero a analizar y se continúa como una línea extensa muy pálida entre el suero a analizar y el antígeno. Esta línea se sitúa muy cerca del hueco que contiene el antígeno.

Figura 6



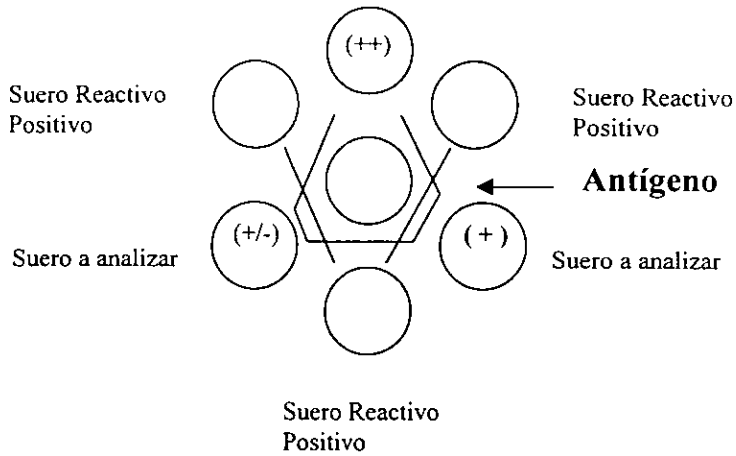
5) LÍNEAS NO ESPECÍFICAS (VER FIGURA 7).

Estas líneas pueden cruzar cada una la línea de control o debilitarse para unir la línea suavemente. Estas líneas son formadas por las reacciones antígeno-anticuerpo dadas por el VLB.

Figura 7

Líneas no específicas

Suero a analizar



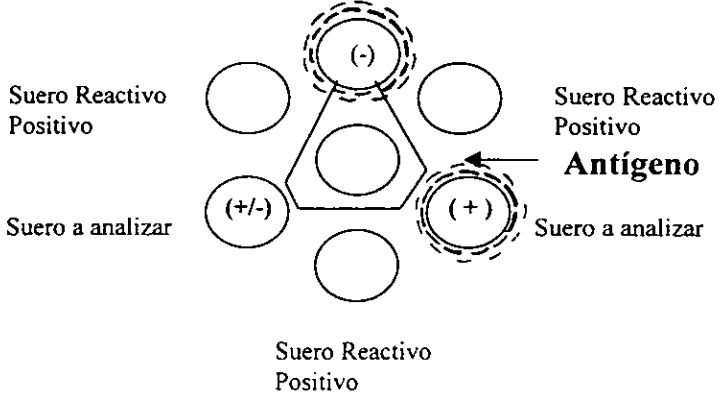
6) HALO ALREDEDOR DE LOS HUECOS (VER FIGURA 8).

Ocasionalmente se forma un halo debido a lípidos en el suero, alrededor del hueco del suero a analizar, siendo necesario repetir la prueba.

Figura 8

Halo alrededor de los huecos

Suero a analizar

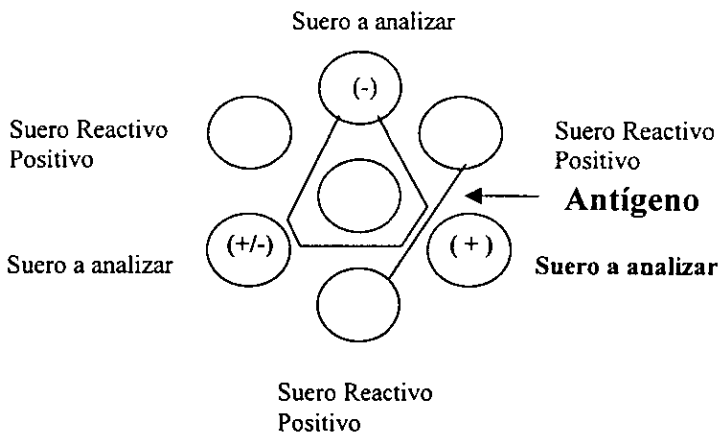


7) SUERO POSITIVO CON UNA SEGUNDA LÍNEA (VER FIGURA 9).

Ocasionalmente un suero positivo puede mostrar una segunda línea de inmunoprecipitación. Esto indica una posible reacción a un segundo antígeno del VLB.

Figura 9

Suero Positivo con una segunda línea



5.- INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

Los animales que salen positivos al VLB por inmunodifusión en Agar-Gel indica que llevan el virus de por vida, pero no necesariamente se va a dar la formación de tumores. Si la prueba sale negativa indica que se está libre de la infección desde 12 semanas antes del muestreo. Todos los animales negativos y expuestos a posibles contactos a la enfermedad deben ser aislados y vueltos a examinar de manera regular 2 veces, con doce semanas de intervalo entre una prueba y otra. Solamente de esta manera se puede obtener de manera real, un grupo de animales negativos al VLB.

6.- DIFICULTADES EN LA INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA.

- a) En becerros que consumieron calostro de vacas infectadas pueden tener anticuerpos pasivos que desaparecen a los 6 meses de edad. Mucho ganado, sin embargo, adquiere la infección a través de la leche contaminada de madres con VLB.
- b) Los animales que salieron positivos moderados se deben tener en observación durante el periodo de incubación. Al muestrearse un mes más tarde la reacción encontrada es más fuerte.
- c) Algún ganado infectado por VLB no desarrolla altos niveles de anticuerpos. En este caso, un segundo muestreo nos dará resultados similares.

Fuente: Miller, J. M. (16).

La prueba de IDAG se realizó en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), perteneciente a la SAGAR, ubicada en el municipio de Tecámac, Edo. de México.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la unidad de producción "San Francisco de Asís" fueron los siguientes: de 50 vacas muestreadas, 38 de ellas resultaron positivas al VLB y 12 resultaron negativas, obteniéndose un porcentaje del 76 % de positivas y 24 % de negativas.

En el caso de la unidad de producción "Los Pirineos", de 50 vacas muestreadas 31 reaccionaron en forma positiva y 19 en forma negativa, dando un porcentaje del 62% como rectoras positivas y 38% como negativas.

El total de vacas muestreadas en las dos unidades de producción fueron 100, de las cuales 69 resultaron positivas y 31 negativas, con porcentajes del 69% y 31% respectivamente como lo demuestra el cuadro III y las gráficas I y II.

Cuadro III

Porcentajes de vacas positivas y negativas al VLB

Unidad de producción	No. de vacas Muestreadas	No. de Positivas	%	No. de Negativas	%
"San Francisco de Asís"	50	38	76	12	24
"Los Pirineos"	50	31	62	19	38
TOTAL	100	69	69	31	31

GRÁFICA I

Porcentajes de vacas positivas y negativas al VLB



GRÁFICA II

TOTAL DE VACAS POSITIVAS Y NEGATIVAS AL VLB



DISCUSIÓN

En nuestro país, en los estados de Puebla, Oaxaca, Tamaulipas, se ha utilizado con éxito la prueba de inmunodifusión en agar-gel (IDAG), para detectar la respuesta inmune contra el VLB, encontrándose anticuerpos del virus en un 17%, 34% y 54% respectivamente (15,18). Es importante hacer notar de que Oaxaca es un estado donde la importación de ganado proveniente de otros países es casi nula, los porcentajes de ganado bovino positivo al VLB son bastante elevados. Por lo tanto, cabe suponer que en el resto del país la prevalencia del virus es considerablemente alta.

Hasta el momento, los estudios de leucosis bovina en México en cuanto a su prevalencia han sido mínimos, lo que motivó a realizar el presente trabajo, encontrándose porcentajes de seropositivos en un 76% en la unidad de producción "San Francisco de Asís" y un 62% en la unidad de producción "Los Pirineos", con un porcentaje total del 69% de seropositivos. En el Estado de México, en el municipio de Zumpango, la importación de ganado bovino proveniente de Estados Unidos y Canadá es muy acentuada, lo que ha incrementado el porcentaje de vacas positivas al VLB, aunado a prácticas deficientes en el manejo y a que los animales importados no presentan un certificado que avale que estén libres del virus.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, los porcentajes generados superan en mucho a los que presentan algunos estados de la Unión Americana y a los países con mayor prevalencia como se observa en los cuadros IV y V.

Estos porcentajes tan elevados pueden ser debido al mismo manejo que se hace sobre el hato, ya que por ejemplo, con una sola jeringa se inyecta a todo el ganado, sin ningún medio de desinfección al inyectar entre vaca. Del mismo modo se utiliza la sierra para descornar y con un solo guante obstétrico se hace palpación a varias cabezas de ganado, con los consiguientes riesgos que esto entraña. Otro factor importante que se debe considerar en estos porcentajes obtenidos, es el papel que juega la “mosca del establo” (*Stomoxys calcitrans*), ya que en los meses de septiembre y octubre de cada año, verdaderos enjambres de estas moscas se abaten sobre el ganado, aumentando los riesgos de contraer la infección por el virus. También, hay que considerar la edad de la vacas, ya que a mayor edad, los riesgos de contraer la infección por el virus, se incrementan.

CUADRO IV

PREVALENCIA DEL VLB EN ALGUNOS PAÍSES

PAÍS	%
CANADA	40.5
ESTADOS UNIDOS	20.0
FILIPINAS	38.0
JAPÓN	44.0
DINAMARCA	06.0
VENEZUELA	49.0

Fuente: Medina Cruz Mario (15).

Shettigara, P.T. (27).

Tyler, L. (30).

CUADRO V

PREVALENCIA DEL VLB EN ALGUNOS ESTADOS DE MÉXICO

ESTADO	%
PUEBLA	17.0
BAJA CALIFORNIA NORTE	32.0
OAXACA	34.0
HIDALGO (Cuenca lechera de Tizayuca)	40.0
TAMAULIPAS	54.0
* EDO. DE MÉXICO (Zumpango)	69.0

Fuente: Medina Cruz Mario (15).

Monroy Basilio, Juan I. (19).

* Resultados obtenidos en la presente tesis.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se concluyó que la presencia del VLB en el municipio de Zumpango, Estado de México, es muy importante debido a los altos porcentajes obtenidos de vacas seropositivas al mismo; esto probablemente como resultado de la importación de ganado portador del virus procedente de Estados Unidos y Canadá, países donde se realizan actualmente programas para erradicar el virus de sus hatos. Asimismo las prácticas de manejo y la edad de las vacas son causa importante para que estos porcentajes fueran considerablemente altos.

Solamente instituyendo programas de detección del VLB en los hatos de ganado bovino e implementando medidas de control sanitarias y de manejo, podremos disminuir a largo plazo la presencia del virus en México.

De vital importancia es el control de los vectores biológicos como moscas, mosquitos, garrapatas y otros artrópodos; evitar el uso de agujas, jeringas, bisturíes, descornadores, aretadores, guantes obstétricos, etc., en grupos de animales, si estos no se desinfectan entre vaca y vaca; pasteurizar el calostro con leche provenientes de vacas seropositivas que se da como alimento a becerros; eliminar las vacas positivas al VLB; exigir el certificado que avale que el ganado importado esté libre del VLB.

Entre las pruebas que se utilizan para detectar el VLB, la prueba de inmunodifusión en agar-gel producida comercialmente, es práctica, económica, con buen grado de sensibilidad y se utiliza ampliamente en los trámites de importación y exportación de bovinos y semen. La Comunidad Económica Europea y el Departamento de Agricultura de

los Estados Unidos de América la recomiendan para estudios de seroprevalencia y medidas de control (18).

Si bien la prueba de IDAG es práctica, efectiva y relativamente fácil de realizar, por el momento nuestro país no se encuentra en condiciones de efectuar programas de erradicación del VLB ya que el antígeno para realizar la prueba y el material que se utiliza en la misma no son baratos por lo que no es costeable iniciar estos programas.

A pesar de todos estos inconvenientes en México se debe evaluar la magnitud del problema, ya que si en la zona lechera del municipio de Zumpango, Estado de México, la prevalencia del VLB es alta, cabe suponer que en otras zonas lecheras donde la importación de ganado es importante, ocurre la misma situación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aluja, A. S.: **El Linfosarcoma Bovino**. Veterinaria México, 6:73-77, 1975.
2. Dalgleish, R.; Callanan, J.J.; McNeil, P.E.: **An atypical case of lymphosarcoma (sporadic bovine leukosis) in a heifer**. Veterinary Record, vol. 129, No. 14, 308-310, 1991.
3. DiGiacomo, R.F.; McGinnis, L. K.; Studer, E.; Evermann, J.F.: **Failure of embryo transfer to transmit BLV in a dairy herd**. Veterinary Record, Vol. 127, No 18, 456, 1990.
4. Espada, R.; Foglio, A.; Gurría, F.; López, G.; López, J.: **Prevalencia de anticuerpos contra las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino en Baja California**. Veterinary Record, 17: 23-29, 1986.
5. Evermann, J.F.; DiGiacomo, R.F.; Huber, N.: **Prevalence of bovine leukemia virus antibody in seven herds of Holstein-Friesian cattle**. JAVMA, Vol. 177, No 6, 549-550, 1980.
6. Florent, G.: **An ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus infection**. Veterinary Record, 123: 570-571, 1988.
7. Foil, L.D.; French, D. D.: **Transmission of bovine leukemia virus by Tabanus fuscicostatus**. Am. J. Vet. Res., Vol. 50, No 10, 1771-1773, 1989.
8. Fukuyama, Shin; Kodama, Kazuo; Hirahara, Tadashi: **Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle** J. Vet. Met. Sci. 55(1): 99-106, 1993.

9. Hopkins, S. G.; DiGiacomo, R. F.; Evermann, J. F.; Christensen, I. D.; Deitelhoff, D.P.; Mickelsen, W.D.: **Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in a dairy cattle.** JAVMA, Vol. 199, No. 8, 1035-1038, 1991.
10. Huber, N.L.; DiGiacommo, R. F.; Evermann, J. F. ; Studer, E. : **Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows.** Am. J. Vet. Res. Vol. 42, No. 9, 1477-1481, 1981.
11. Ike, H.; Sasaki, O.K. : **Inhibitory effects of human interferons on the syncytium formation by bovine leukemia virus (BLV) and the proliferation of BLV.** Japanese Journal of Veterinary Science, Vol. 51, No. 4, 801-803, 1989.
12. Klintevall, K.; Berg, A.; Svedlund, G.: **Differentiation between enzootic and sporadic bovine leukosis by use of serological and virological methods.** Veterinary Record, 133: 272, 1993.
13. Lassauzet, M. L.; Johnson, W.; Thurmond, M.; Stevens, F.: **Protection of calostrual antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy.** Can. J. Vet. Res., 53: 424-430, 1989.
14. Lucas, M. H.; Dawson, M.; Chasey, D. Wibberley, G.; Roberts, D. H. : **Enzootic bovine leucosis virus in semen.** Veterinary Record, 106: 174, 1980.
15. Medina, C. M.: **Leucosis bovina.** Veterinaria México, 19: 151-159, 1988.
16. Miller, J. M.; Van Der Maaten, M. J.: **Serological detection of bovine leukemia virus infection. Proceedings of the 2nd CEC seminar on bovine leucosis.** Copenhagen, Octubre 17-18, 1975.

17. Monke, D. R.; Rohde, R. F.; Hueston, W. D. ; Milburn, R. J.: **Estimation of the sensivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1296 cases (1982-1989)**. JAVMA, Vol. 200, No. 12, 2001-2004, 1990.
18. Monroy Basilio, Juan I.; Trigo Tavera, Francisco J.; S. De Aluja, Aline; García Escamilla, Rosa María: **Estudio comparativo entre la prueba de ELISA e Inmunodifusión en el diagnóstico de la leucosis enzoótica bovina**. Veterinaria México, 24 (1), 21-25, 1993.
19. Morales, S.E. ; Ledesma, M. N.; Constantino, C. F. ; Puente, C. E.; Silva, S. P.: **Leucosis cutánea en un bovino Holstein neonato: informe de un caso en México**. Veterinaria México, 25(4), 353-356, 1994.
20. Nielsen, S.; Piper, C.; Ferrer, J.: **Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects**. Am. J. Vet. Res., Vol. 39, No. 7, 1089 –1092, 1978.
21. Ohshima, Kan; Okada, Kosuke; Numakunai, Shigeru: **An eradication program without economic loss in a herd infected with bovine leukemia virus (BLV)**. Japanese Journal of Veterinary Science. Vol. 50, No. 5, 1074-1078, 1988.
22. Olson, C.; Driscoll, D. M.: **Investigation of risk for man**. JAVMA, Vol. 173, No.11, 1470-1472, 1978.
23. Reed, I. : **Enzootic bovine leukosis**, Can. Vet. J. 22: 95-102, 1981.
24. Roberts, D. H.; Lucas, M. H.; Wibberley, G.; Swallow, C: **Infectivity of enzootic bovine leucosis infected animals during the incubation period**. Veterinary Record, 116: 310-313, 1985.

25. Rubino, M. J.; Donham, K. J. : **Inactivation of bovine leukemia virus infected lymphocytes in milk.** Am. J. Vet. Res. , Vol. 45, No. 8, 1553-1556, 1984.
26. Schmitz, D. G.; Seahorn, T. L. : **Use of echocardiography to detect tumors in the heart of a bull with bovine leucosis.** JAVMA, Vol. 205, No. 11, 1590-1592, 1994.
27. Shettigara, P. T.; Samagh, B. S.; Lobinowich, M.: **Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test.** Can. J. Vet. Res. 50, 221-226, 1986.
28. Sprecher, D. J. ; Pelzer, K. D.; Lessard, P.: **Possible effect of altered management practices of seroprevalence of bovine leukemiavirus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection.** JAVMA, Vol. 199, No. 5, 584-588, 1991.
29. Thomas, M. W.; Evermann, J. F.; Miller, M.: **Bovine leukosis in a commercial dairy.** Agri-Practice, Vol. 5 , No. 2, 38-45, 1984.
30. Tyler, L.: **Enzootic Bovine leucosis.** Veterinary Record, 103, 194-198, 1978.
31. Weber, A. F.; Moon, R. D.; Sorensen, D. K.; Bates, D. W.; Meiske, J. C.; Brown, C. A.: **Evaluation of the stable fly (Stomoxys calcitrans) as a vector of enzootic bovine leukosis.** Am. J. Vet. Res. Vol. 49, No. 9, 1543-1549, 1988.
32. Wentink, G. H.; Van Oirschot, J. T.; Pelgrim, W.: **Experimental transmission of bovine leucosis virus by rectal palpation.** Veterinary Record, 132, 135-136, 1993.