



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

RESPUESTA SEROLÓGICA, CARGA VIRAL Y LINFOCITOSIS
PERSISTENTE EN BOVINOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA
LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA (vLEB).

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

JESÚS DE NAZARE ZAVALA HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL: **DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO**

COMITÉ TUTORAL

DR. JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABELLO

DR. JORGE LUÍS TÓRTORA PÉREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

El virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB) causa tres formas de presentación en el ganado bovino: 1) Respuesta serológica (asintomático), en la mayoría de casos, 2) Linfocitosis persistente (LP), inicio de la enfermedad (subclínica), y 3) Linfoma, la minoría de los casos (forma clínica, LEB). En México, no existe un seguimiento diagnóstico ni se han determinado las pérdidas económicas relacionadas a la infección por vLEB en ganado lechero. Con el fin de determinar la presencia del vLEB y la relación la respuesta serológica y la carga viral con el desarrollo de linfocitosis persistente, se muestrearon para tamizaje por prueba de ELISA indirecta, 80 vacas de un hato lechero de alta prevalencia, de las cuales se seleccionaron 47 vacas para formar dos grupos experimentales, mediante un cuadro de contingencia de 2X2 con los datos de prueba de ELISA y RT-PCR punto final para la detección de vLEB en sangre. Finalmente, se realizaron dos muestreos mensuales adicionales para determinación de linfocitosis persistente (LP), respuesta serológica por prueba de ELISA y carga viral por PCR cuantitativo (PCRq). Se encontró una alta seroprevalencia (66%) de LEB y los animales se agruparon en: Grupo 1 (ELISA+/PCR+, 21 vacas), Grupo 2 (ELISA+/PCR-, 6 vacas) y Grupo 3 (ELISA-/PCR-, 20 vacas). La prueba de ELISA y RT-PCR son comparables para el diagnóstico ($J^2 < 0.001$ y coeficiente de Cramer=0.77) y hubo una concordancia perfecta entre ELISA y PCRq. Se observaron diferencias significativas en los valores de leucocitos y linfocitos ($P < 0.001$) los cuales fueron significativamente más altos en el grupo 1 con desarrollo de LP. Los grupos 2 y 3 no desarrollaron LP durante todo el experimento. La carga viral, determinada por expresión del gen *pol*, del grupo 1 fue significativamente más alta que en el grupo 2. La carga viral presentó una fuerte correlación con el diagnóstico de LP. Los datos sugieren que los animales de los grupos 2 y 3 poseen ciertos mecanismos de resistencia ya que no desarrollaron LP a pesar de pertenecer a un hato con alta prevalencia de LEB. Particularmente, el último grupo ya que permaneció negativo a lo largo del experimento.

ABSTRACT

Bovine leukemia virus (BLV) causes three clinical states in cattle: 1) serologic response (asymptomatic), the vast majority of infected animals, 2) persistent lymphocytosis (PL), onset of disease (subclinical), and 3) lymphoma, the minority of cases (clinical form, bovine enzootic leukemia). In Mexico, there is no diagnosis monitoring and economical losses regarding BLV infection in dairy cattle are undetermined. In order to determine the presence of BLV and the relationship of serologic response and viral load with PL development, 80 cows from a high prevalence dairy herd were sampled for an indirect ELISA test screening. Then, 47 cows were selected and grouped through a 2X2 contingency table based on ELISA test and end point RT-PCR for BLV blood detection data. Finally, two additional monthly samplings were done to determine PL, serologic response by ELISA test, and viral load by quantitative PCR (qPCR). A high seroprevalence (66%) was found, and the animals were grouped as follow: Group 1, (ELISA+/PCR+, 21 cows), Group 2, (ELISA+/PCR-, 6 cows) and Group 3, (ELISA-/PCR-, 20 cows). The ELISA test and RT-PCR are comparable for disease diagnosis ($J^2 < 0.001$ y Cramer coefficient = 0.77), and there was a perfect agreement between ELISA and PCRq. Significant differences were found in leukocyte and lymphocyte values ($P < 0.001$) which were significantly higher in the group 1 with PL. The groups 2 y 3 did not developed PL during the whole experiment. The group 1 viral load, determined by gene *pol* expression, was significantly higher than the group 2. The viral load had a strong correlation with PL diagnosis. The data suggest that animals from groups 2 y 3 group possess some kind of resistance because PL was absent even though they belong to a high prevalence BL herd. Particularly, the latter group since it remained negative throughout the experiment.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DO: Densidad Óptica.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético.

ELISA: Ensayo inmunoenzimático.

env: Envoltura del vLEB

g: Gravedades.

g: Gramos.

LBE: Leucosis Bovina Esporádica.

LEB: Leucosis Enzoótica Bovina.

M: Mol o moles.

mg: Miligramos.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

min: Minutos.

µg: Microgramos.

µl: Microlitros.

mL: Mililitros.

mM: Milimolar.

nM: Nanomoles.

ng: Nanogramos.

NTC: Non Template Control (control sin ADN).

pb: Pares de bases.

PI: Porcentaje de Inhibición.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction).

pH: Potencial de hidrogeniones.

pM: Picomoles.

pol: polimerasa.

PBMC: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

RT: Transcriptasa reversa (retrotranscripción).

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

Taq: *Thermus aquaticus*.

U: Unidades.

vLEB: Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina.

INTRODUCCIÓN

La primera descripción de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) se publicó en Alemania en el año de 1871 (Gillet, *et al.*, 2007). Es una enfermedad que afecta a los bóvidos en general (*Bos taurus*, *Bos indicus* y *Bubalus bubalis*) (Molnár, *et al.*, 2000). Transcurrió cerca de un siglo antes de que la etiología de la enfermedad fuera establecida con la identificación del virus en los linfocitos de los animales infectados; y no fue sino hasta la década de los setentas que se desarrolló una prueba capaz de identificarlo (Radostits, *et al.*, 2002; Hernández, *et al.*, 2006).

Algunas sinonimias utilizadas son: Sarcoma Linfomatoso, Leucemia linfática, Pseudoleucemia, Leucosis (Mascaro, 1975), Linfosarcoma, Linfoma, Hemoblastosis, Linfoblastoma, Linfadenosis, Linfomatosis, Linfoma maligno, Linfocitoma, Leucosis Viral Bovina (Meischke, 1980), Complejo Viral Leucosis-linfosarcoma, Leucemia Bovina y Leucosis Enzoótica Bovina (Ferrer, *et al.*, 1979).

Etiología

La LEB es una enfermedad infecciosa causada por un virus ARN, el virus de la leucosis enzoótica bovina (vLEB); es clasificado en el género *Deltaretrovirus*, de la familia *Retroviridae*, por lo que comparte características con otros virus leucémicos de diferentes especies (Van Regenmortel, *et al.*, 2000). El diámetro del virus envuelto es de 90 a 120 nm, contiene un nucleoide central de 60 a 90 nm, su densidad es de 1.16 a 1.17 g/mL y el coeficiente de sedimentación del

ARN viral es de 60 a 70 s. Los viriones maduran por gemación y contienen una proteína interna en la cápside que actúa como antígeno con un peso molecular de 24 000 Daltons (**p24**) y una glicoproteína en la envoltura con un peso molecular de 51 000 Daltons (**gp51**) la cual también es altamente antigénica (Klintevall, *et al.*, 1997).

Estos virus codifican transcriptasa inversa (polimerasa y nucleasa) que utiliza el ARN del virus para sintetizar un ADN complementario de cadena única que a su vez es replicado para formar un ADN de cadena doble. La enzima que lleva a cabo la copia de ARN a ADN también es capaz de degradar el ARN viral original, esta enzima permite a los virus convertir el ARN de cadena sencilla lineal en ADN de cadena doble, para después ser insertado en el ADN cromosómico de la célula hospedadora por otra enzima viral llamada integrasa (Fenner *et al.*, 1987). Este estado integrado el ADN del virus se denomina provirus (Van Regenmortel, *et al.*, 2000) y puede mantenerse de una manera latente asociado al material genético de la célula hospedadora y multiplicarse cada vez que esta se divide (Rebhun, 1999). En otros casos el provirus empieza a transcribirse sirviendo el ARN como ARN_m para la síntesis de las proteínas víricas y como material genético para su incorporación en nuevos viriones que pueden infectar a las células adyacentes (Fenner, 1992).

El vLEB afecta tejidos linfáticos infectando linfocitos cuando estas células maduran, la presencia del virus se mantiene (Doménech *et al.*, 1999). El vLEB afecta principalmente a los linfocitos y se ha sugerido que el virus podría influir en la actividad del sistema inmunitario, provocando una disminución en la capacidad

de respuesta inmune (Emanuelson, *et al.*, 1992); la infección podría ser inmunosupresiva, y en forma subclínica incrementar procesos como mastitis o micosis (Brenner, *et al.*, 1989; Doménech, *et al.*, 1999).

Menos del 10% del ganado infectado con vLEB desarrollará linfoma (Dimmock, *et al.*, 1986). Aproximadamente un tercio del ganado infectado con vLEB desarrolla linfocitosis persistentes. Los animales con linfocitosis y la mayoría de los animales que se infectan con vLEB no desarrollan la enfermedad clínica (Casal, *et al.*, 1990). En estos animales la producción de leche y la fertilidad no se afectan (Pollari, 1993). La LEB se presenta bajo las formas de:

1. Linfoma: conocida como Leucosis, es la forma clínica de la enfermedad, de características tumorales, se desarrolla en menos del 10% de los animales infectados, luego de meses o años de incubación y puede llegar a ser mortal (Grimshaw, *et al.*, 1979).
2. Linfocitosis permanente: de condición benigna y asintomática. Los animales afectados permanecen clínicamente sanos desarrollándose aproximadamente en un 30% de los animales infectados (Batmaz, *et al.*, 1995; Dušinský, *et al.*, 2000).
3. Portadores asintomáticos: son la gran mayoría de los bovinos infectados (65% a 70%) (Barrientos, 2002; de la Sota, 2004).

Los animales infectados, presenten signos o no, son fuente de infección, la fuente de infección es el animal infectado (Hernández, *et al.*, 2006). La transmisión de la enfermedad ocurre por la transferencia de células infectadas en calostro,

leche (Murphy, 1999; Hernández, *et al.*, 2006) o por medio de sangre infectada en vehículos y vectores (Wilesmith, *et al.*, 1980). Debido a que el virus puede estar presente en la sangre, la leche, la orina, el semen y los exudados vaginales (Dimmock, *et al.*, 1991), las temporadas de partos son un factor predisponente para que se transmita la enfermedad (Pollari, *et al.*, 1993 b), se puede transmitir por medio de insectos hematófagos (Manet, *et al.*, 1989; Perino, *et al.*, 1990), sangrías de varios animales con la misma aguja, tactos rectales (Hopkins, *et al.*, 1991; Wentink, *et al.*, 1993; Divers, *et al.*, 1995), castraciones y descornado con el mismo elemento sin desinfectar, equipo para aretar y tatuar e instrumental quirúrgico no desinfectado, entre otras maniobras clínicas (Wilesmith, *et al.*, 1980). También se ha demostrado la presencia del virus en secreciones nasales (Lucas, *et al.*, 1993).

Las garrapatas y las moscas mordedoras han sido implicadas en la transmisión de la enfermedad, pero en consideración a la persistencia de las células infectadas por vLEB en la sangre, se puede pensar en otros insectos hematófagos (*Tabanus* spp.) (Manet, *et al.*, 1989; Perino, *et al.*, 1990).

Menos del 20% de los becerros hijos de madres infectadas nacen con vLEB, esto debido a que el virus atraviesa la barrera placentaria infectando al feto en desarrollo. Otros autores argumentan que el porcentaje de transmisión vertical oscila entre el 3% y el 16% (Radostits, *et al.*, 2002). Se ha realizado la detección temprana del provirus por medio de PCR en terneros provenientes de vacas con linfocitosis persistente (Ballagi, *et al.*, 1992; Agresti, *et al.*, 1993; Eaves, *et al.*, 1994). Diversos estudios han indicado que ni el ovocito ni el espermatozoide se ven afectados por el vLEB. Consecuentemente no existe riesgo de diseminación

del vLEB por medio de la transferencia de embriones e inseminación artificial, esto, obviamente bajo estrictas medidas de sanidad, ya que los instrumentos obstétricos sin desinfectar podrían ser vehículos de transmisión (Rebhun, 1999). La diseminación del vLEB en animales susceptibles requiere contacto directo y prolongado con animales infectados (Casal, *et al.*, 1990; Murphy, 1999). Se ha demostrado que cantidades tan pequeñas como 0.001 mL de sangre pueden contener suficientes linfocitos infectados como para transmitir la enfermedad (Dimmock, *et al.*, 1991).

El periodo de incubación puede ser muy largo, ya que el brote puede aparecer a los 4 o 5 años después del caso original o después de hacer transfusiones sanguíneas con sangre procedente de bovinos afectados (Rebhun, 1999; Correa, 2002). Tras la exposición, se necesitan por lo menos dos semanas para que aparezcan anticuerpos demostrables (Kahrs, 1985).

Cuando el animal se infecta con el vLEB produce anticuerpos (IgG1, IgG2 y IgGM) que circulan en la sangre por periodos largos de tiempo (Batmaz, *et al.*, 1995). La persistencia de estos anticuerpos en el suero es causada por la presencia continua del vLEB en linfocitos de la sangre (Klintevall, *et al.*, 1993). Se ha comprobado que en terneros los anticuerpos calostrales llegan a durar hasta 71 días (Johnson, *et al.*, 1987; Lassauzet, *et al.*, 1990).

Los linfomas en el ganado bovino se presenta en 4 formas diferentes: enzoótica y cutánea en adultos, tímica y del ternero en bovinos jóvenes. También se sabe que tan solo la forma adulta o enzoótica se halla asociada a la infección por el vLEB y para los otros linfomas no se ha definido su etiología (Mohanty y Dutta, 1981).

Al diagnosticar la infección es importante reconocer cual de las formas clínicas es la que provoca la enfermedad. Tres formas de la enfermedad, tímica, del ternero y cutánea, se encuentran incluidas en una categoría denominada Leucosis Bovina Esporádica (LBEs) (Onuma, *et al.*, 1979; Klintevall, *et al.*, 1993), debido a que no existe evidencia epidemiológica que indique que son enfermedades infecciosas relacionadas con vLEB (Vernau, *et al.*, 1997). En la presentación de estas enfermedades no se han encontrado anticuerpos contra vLEB y se desconoce la etiología de las LBEs, solo la forma adulta o enzoótica de la LEB es causada por el vLEB (Onuma, *et al.*, 1979; Vernau, *et al.*, 1992). Pero los informes son polémicos ya que se ha descrito el caso de una vaca Angus de 4 años de edad con linfoma, negativa con IDGA al vLEB (Southwood, *et al.*, 1996). Sin embargo otro estudio demostró que pueden haber vacas seropositivas, negativas a PCR y vacas seronegativas pero positivas a PCR por lo que aun no se debe excluir al vLEB como probable agente causal (Jacobs, *et al.*, 1992).

La forma del ternero usualmente se presenta en animales de menos de 6 meses de edad; consiste en una tumoración generalizada y simétrica de los linfonodos externos e internos, frecuentemente se observa una infiltración de células tumorales linfoides en el hígado, bazo, y médula ósea. (Medina, 1994). Como resultado de una complicación de la médula ósea, la sangre periférica continuamente muestra un conteo elevado de leucocitos, debido a la presencia de numerosos linfocitos con características malignas (Dinter y Morein, 1990).

La segunda forma de LBEs, es el linfoma tímico, se presenta en ganado de 6 meses a 2 años de edad; se observa una infiltración linfocitaria masiva del timo, caracterizada por una marcada tumoración (Thorp, *et al.*, 1994). En los linfonodos

preescapulares y mediastínicos también ocurre esta infiltración y se presenta una inflamación de la porción anterior del mediastino, que comprime posteriormente el esófago, vasos y corazón (Angel, *et al.*, 1991). También se han descrito metástasis del linfoma tímico que comprimen la médula espinal produciendo la posición de “perro sentado” en las terneras (Holmes, *et al.*, 1990). Hay edema ventral, hidrotórax y posteriormente falla circulatoria (Medina, 1994), a veces el cuadro se caracteriza por disnea, taquipnea, colapso de las yugulares y ruidos cardiacos apagados. Un considerable número de animales presenta timpanismo (Thorp, *et al.*, 1994).

La presentación cutánea es la tercera forma de LBEs, es la única forma de linfoma en la que se puede esperar una recuperación del animal enfermo (Okada, *et al.*, 1989). Es el más raro de los linfomas bovinos, suele presentarse en animales de 18-30 meses de edad. Se caracteriza por nódulos circulares blanco grisáceos o placas distribuidas por toda la piel del animal. Al principio pueden verse las lesiones como pequeñas ronchas en cuello y lomo, pueden ser completamente subcutáneas y lisas o bien irregulares y prominentes. Las lesiones tienden a formar costras, con frecuencia son friables y sangran con facilidad (Dinter y Morein, 1990). Suele haber aumento de los linfonodos superficiales y de algunos internos. Puede haber edema subcutáneo y los tumores subcutáneos pueden desaparecer temporalmente, pero por regla general reaparecen. Hay infiltración linfocitaria en el hígado, bazo, riñón y otros órganos internos (Khars, 1985). La biometría hemática muestra leucemia en el 33% de los casos aproximadamente. Una peculiaridad de esta presentación es la desaparición casi espontánea de las tumoraciones y la recuperación del animal. Para su diagnóstico

diferencial es necesaria considerar las dermatosis y las tumoraciones por células cebadas (Medina, 1994).

La forma adulta de linfoma es más frecuente y se observa casi siempre en el grupo de cuatro a ocho años de edad. El periodo de incubación es de meses hasta cuatro o cinco años. En el curso de este padecimiento influyen al parecer factores genéticos (Detilleux, *et al.*, 1991), inmunológicos y de estrés, se comprueba también a menudo linfocitosis persistente (LP o PL) con aumento de volumen generalizado de los linfonodos (Dušinský, *et al.*, 2000); sin embargo, 30% o más de los bovinos adultos activamente infectados con vLEB no tienen linfocitosis persistente, y la formación franca del tumor al parecer es rara (Mohanty y Dutta, 1981).

En las vacas adultas infectadas que tienen tumores clínicos o linfosarcoma, se deben subrayar dos sucesos. El primero, que menos del 5% de todas las vacas positivas a LEB desarrollan tumores o la enfermedad asociada con el linfoma. La mayoría de las vacas infectadas son asintomáticas, inmunocompetentes y tan productivas, como las compañeras de hato seronegativas (Brenner, *et al.*, 1989; Jacobs, *et al.*, 1991; Sargeant, *et al.*, 1997a). El otro, que si bien en las vacas el linfoma ocurre en varias presentaciones clínicas, debidas a la implicación del órgano blanco afectado, la mayoría requiere de diferenciación cuidadosa de otras enfermedades. El linfoma se puede disfrazar con un gran número de enfermedades inflamatorias o debilitantes de las vacas (Radosiits, *et al.*, 2002). Los signos clínicos rara vez se presentan antes de los dos años de edad y son más frecuentes en las vacas cuya edad está comprendida entre 3 y 6 años. Si bien el linfoma de la forma adulta pueda aparecer en los

órganos blanco en ganado vacuno de 6 meses de edad, es probable que el linfoma en animales de menos de 2 años de edad no esté relacionado con la infección por el vLEB (Rebhun, 1999).

La enfermedad se inicia con signos muy vagos, solamente después de algunas semanas de la infección, comienzan a aparecer algunos signos, tales como enflaquecimiento, mucosas pálidas, cansancio y disnea (Mascaro, 1975). Los linfonodos estarán aumentados de tamaño, lisos y firmes; en el ganado lechero son fácilmente visibles y, además, ocurre edema local, ocasionalmente todo el tejido subcutáneo tendrá tumores de 5 a 11 cm. de diámetro (Medina, 1994). Los signos iniciales corresponden a la afectación de los linfonodos superficiales (Correa, 2002).

Por regla general, lo que primeramente se observa es una linfadenopatía superficial al momento del reconocimiento de los animales que se ven afectados. El tamaño y la localización de los linfonodos aumentados de volumen explican con frecuencia los signos observados, sin embargo, no siempre pueden corresponder a las lesiones (Kahrs, 1985).

Muchos casos se diagnostican después del parto y los ganaderos sospechan de otras enfermedades relacionadas al parto, como metritis, mastitis o cetosis. A veces los primeros signos que se observan son cojeras, marchas anormales o parálisis (Kahrs, 1985); esta parálisis puede tener su origen en la compresión epidural de la médula espinal, esto puede ocurrir a pesar de que el apetito y el estado de carnes del animal sean normales (Rebhun, 1999).

Es importante insistir en que el ganado infectado con vLEB no está necesariamente enfermo (Brenner, *et al.*, 1989). Menos del 5 % del ganado

infectado con el virus desarrolla tumores y muere de linfoma (Grimshaw, *et al.*, 1979). Los signos clínicos de la enfermedad usualmente no se presentan sino hasta después de un tiempo considerablemente largo (más de 4 años y hasta 8 años) después de la infección con vLEB (Jacobs, *et al.*, 1991; Sargeant, *et al.*, 1997a). La causa por la cual solo algunos de los animales infectados presentan la enfermedad es aún una incógnita, pero, como ya se ha mencionado anteriormente, factores genéticos, inmunológicos, de estrés y ambientales solos o en interacción, parecen estar relacionados (Emanuelson, *et al.*, 1992). La localización de las masas neoplásicas determina los signos clínicos y el curso de la enfermedad (Grimshaw, *et al.*, 1979; Gibbons, 1984). El diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina se sujeta a dos objetivos. El primero es la detección de la infección por el virus de la LEB y, el segundo es la detección del linfoma (Dinter y Morein, 1990).

Detección de la infección por el virus de la LEB

A partir de la década de los noventa se comenzaron a aplicar los métodos moleculares para la identificación del virus de la LEB (Agresti, *et al.*, 1993; Eaves, *et al.*, 1994; Blankenstein, *et al.*, 2000). Ya se han descrito algunas ventajas en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras y tejidos, pero se debe destacar que es 10% más sensible que ELISA y 17.7% más sensible que IDGA ya que puede detectar el provirus en los linfocitos (Fechner, *et al.*, 1996; Kuźmak, *et al.*, 1999). Esta prueba ha demostrado ser un método de alta especificidad y sensibilidad en la selección de terneras libres de la enfermedad ya que permite el diagnóstico temprano del provirus incluso, al haber sido

calostradas, lo cual no puede ser realizado con los métodos serológicos que detectan anticuerpos anti-vLEB (Ballagi, *et al.*, 1992; Klintevall, *et al.*, 1994).

Detección de linfoma en bovinos infectados con el vLEB

El diagnóstico de la enfermedad requiere una investigación serológica y patológica. Los tejidos seleccionados para estudios histopatológicos, deberán ser tomados por biopsia o necropsia; para el diagnóstico de rutina se deberán tomar muestras de corazón, aurícula derecha, riñón, hígado, bazo, linfonodos con parte de las masas tumorales, que se conservan en formalina al 10% o algún otro conservador y se envían de inmediato al laboratorio de patología veterinaria, para ser procesadas por la técnica histológica de rutina, también se les puede realizar inmunohistoquímica (Reinacher, *et al.*, 1989; Alexander *et al.*, 1996). A la revisión de los cortes histológicos de los tejidos, se observarán infiltraciones masivas de células linfoides neoplásicas, con mitosis aberrantes, densamente agrupadas con cambios en la arquitectura celular normal (Vernau, *et al.*, 1992). Esto detectará linfoma, pero la infección por vLEB solo será comprobable con la exploración clínica y con los resultados de las pruebas serológicas, esto debido a las presentaciones de la Leucosis Bovina Esporádica (Dinter y Morein, 1990).

En la hematología las alteraciones de los glóbulos blancos en la LEB se observaran principalmente en los linfocitos. El examen sanguíneo consiste principalmente en la evaluación cuantitativa y cualitativa de los linfocitos y las células similares a ellos. Los siguientes cambios son típicos para los animales en la fase subclínica de leucosis (Batmaz, *et al.*, 1995): aumento en el número de

linfocitos, aparición de células anormales del tipo mononuclear, las llamadas células de la leucosis o linfoidocitos, que son grandes, de 18-20 micrómetros, de forma irregular, de citoplasma grande, tamaño y forma del núcleo variable y nucleolos bien diferenciados (Gibbons, 1984).

Las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad son:

- ❖ Inmunodifusión en gel de agar (IDGA o AGID) (Johnson, *et al.*, 1987).
- ❖ ELISA (Simard, *et al.*, 2000 b).
- ❖ Radioinmunoensayo (RIA) (Ferrer, *et al.*, 1979).
- ❖ Virusneutralización (VM) (Murphy, 1999).
- ❖ Fijación de complemento (Miller, *et al.*, 1989).
- ❖ Inmunofluorescencia directa (Ferrer, *et al.*, 1979).
- ❖ Test de la transcriptasa inversa (de la Sota, 2004).

Las pruebas de ELISA, RIA y VN, son más sensibles, pero el IDGA es más usada por su sencillez, además porque en lugares donde se realizan pocas pruebas al año, no se justifica la inversión en equipos más sofisticados (Monke, *et al.*, 1992).

La prueba de inmunodifusión en agar (IDGA) es una técnica específica para la detección de anticuerpos en muestras séricas de ejemplares individuales (Johnson, *et al.*, 1987; Simard, *et al.*, 2000 a). Resulta inadecuada para muestras de leche, pues sobre éstas carece de especificidad y sensibilidad (Burton, *et al.*, 1986). Esta prueba ha mostrado ser muy eficaz en programas de erradicación.

En el mercado se pueden encontrar juegos de reactivos para su realización (Monke, *et al.*, 1992; Simard, *et al.*, 2000 a).

El método inmunoenzimático (ELISA) es posible utilizar la técnica en sus variantes indirecta o una de bloqueo o competitiva; en ambos casos, comercialmente se encuentran juegos de reactivos disponibles para su empleo. Algunas pruebas de ELISA son lo suficientemente sensibles para ser aplicables a mezclas de muestras (Simard, *et al.*, 2000 b). Las pruebas se llevan a cabo en microplacas de base sólida. Estas placas se revisten con el antígeno vLEB de captura y el suero se utiliza a una dilución predeterminada con solución salina amortiguada con fosfatos (Kozaczyńska, 1999).

Se ha demostrado que en la infección experimental en terneros, la seroconversión se detecta de 4 a 5 semanas (Klintevall, *et al.*, 1997). Esta prueba tiene la capacidad de detectar y cuantificar anticuerpos contra el vLEB y, debido a que es muy sensible, específica y sencilla, ha sido adoptada como técnica rutinaria en el diagnóstico de la enfermedad (Biancifiori y Cenci, 1982). También ha tenido buenos resultados al cruzar el muestreo en sangre y leche detectando anticuerpos anti-vLEB en ambas muestras (Brenner, *et al.*, 1994). Actualmente en Canadá, se ha implementado la realización de la prueba de ELISA en leche para hacer seguimiento de los hatos completos tomando muestras periódicas del tanque de leche (Sargeant, *et al.*, 1997 b).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México la enfermedad pertenece a la lista B de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), la cual la clasifica entre las enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y sanitario a nivel nacional, cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables (Ward, 1995; www.oie.int, 2005).

Sin embargo, en México el diagnóstico de LEB no se realiza rutinariamente por lo que la introducción de ganado infectado de Norteamérica durante los últimos 15 años ha generado un incremento de casos clínicos de LEB. En el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT) la situación no es diferente, ya que sólo se diagnostican los casos clínicos mediante los hallazgos a la necropsia y no se cuenta con un sistema adicional de diagnóstico para el monitoreo de la enfermedad que complemente la evaluación hematológica. Lo anterior conduce al desconocimiento de la prevalencia de la enfermedad y de las pérdidas asociadas a su presencia. En un estudio preliminar en el CAIT, se observó que el 29% de las vacas presentaban linfocitosis persistente, mientras que el 55% de estas vacas fueron positivas por prueba de ELISA (Hernández, *et al.*, 2006). Lo anterior revela que existe diferencia entre las pruebas empleadas rutinariamente para el diagnóstico de LEB, por lo que es necesario utilizar métodos diagnósticos más sensibles como los moleculares. Por otro lado, los factores que contribuyen a que únicamente una baja proporción de los animales infectados por el vLEB

desarrollen la forma clínica de la enfermedad, aún representan una incógnita, pero invariablemente el desarrollo de linfocitosis persistente precede a la presencia de linfoma, el cual representa la forma clínica de LEB. En este sentido se considera que los factores que con mayor probabilidad están involucrados corresponden a diferencias genéticas e inmunológicas y la interacción con el estrés y las condiciones ambientales (Emanuelson, *et al.*, 1992)

HIPÓTESIS

La respuesta inmune humoral conduce a la reducción de la carga viral en sangre y disminuye las probabilidades de desarrollo de linfocitosis persistente.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la relación de la respuesta serológica y la carga viral, con respecto al desarrollo de linfocitosis persistente en un hato positivo a vLEB.

PARTICULARES

- Determinar la proporción de vacas lecheras infectadas por el vLEB procedentes de un hato positivo, mediante prueba de ELISA indirecta y RT-PCR.
- Determinar los perfiles serológicos frente al vLEB en vacas lecheras procedentes del hato positivo.
- Evaluar el uso (valor) diagnóstico de la prueba de ELISA indirecta y de protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de vLEB en sangre.
- Determinar la proporción de animales con linfocitosis persistente en vacas positivas a vLEB.
- Estimar la carga viral asociada a vacas positivas a vLEB.
- Determinar la correlación de los perfiles serológicos y la carga viral con respecto al desarrollo de linfocitosis persistente en vacas infectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental.

El estudio se realizó en una unidad productora de leche (UPL) con alta prevalencia de LEB, el hato lechero pertenece al Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca (CAIT), de donde se seleccionaron al azar 80 vacas en producción de diferentes edades, a las cuales se les realizó la prueba inmunoenzimática indirecta (ELISA) como tamizaje inicial, para integrar dos grupos: uno de 20 vacas seropositivas y otro de 20 vacas seronegativas a LEB. En ambos grupos se realizaron protocolos de RT-PCR punto final para la detección de vLEB en sangre y conformar los grupos experimentales con base a cuadro de contingencia de 2X2. En todos los grupos, se realizaron 2 muestreos adicionales con intervalos de 1 mes para la obtención de sangre completa con anticoagulante ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) y suero por venopunción de la vena caudal media utilizando agujas estériles calibre 20 y tubos con vacío (Vacutainer®). Las muestras se conservaron a 4°C y se transportaron al laboratorio de Virología y Genética Molecular L-504 y L-505 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (campo 4) de la UNAM.

Las muestras de sangre completa fueron utilizadas en pruebas de biometría hemática y separación de células mononucleares periféricas para la extracción de ARN total y determinar la presencia de linfocitosis persistente así como realizar protocolos de RT-PCR y PCR en tiempo real para la detección del vLEB. Los sueros obtenidos se utilizaron en los protocolos de ELISA indirecta.

1. Biometría Hemática.

El conteo leucocitario se realizó por métodos manuales estándar (Voigt, 2000; Núñez y Bouda, 2007). Se colocó la sangre hasta la marca 0.5 μ l en pipetas de Thoma y el resto se diluyó con solución de Turk (base ácido acético glacial al 2% y azul de metileno) hasta la marca 11 μ l. Posteriormente, la mezcla se agitó durante un minuto y se descartaron tres gotas para proceder al llenado del hemocitómetro. El conteo se realizó en microscopio óptico a 100x. El conteo diferencial leucocitario se realizó en extendidos de sangre previamente teñidos con hemocolorante rápido (HYCEL™). Pasándolos 10 s en el fijador (Alcohol metílico), 10 s en la solución hemocolorante UNO (solución de eosina amarillenta en amortiguador de fosfatos) y 10 s en la solución hemocolorante DOS, solución de Azur-eosina azul de metileno en amortiguador de fosfatos, seguido de un lavado con agua desionizada. Los extendidos se dejaron secar al aire y el conteo se realizó con el objetivo de inmersión (1000x).

2. Serología.

Las muestras de suero se procesaron mediante una técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína **gp51** del vLEB, siguiendo las indicaciones del fabricante (VMRD Inc., Pullman, WA. USA). Primero se diluyeron las muestras de sueros a evaluar a 1:25 con la solución amortiguadora de dilución (G). Se cargaron tres pozos de la placa (A) con el suero testigo positivo (B) y dos con el suero testigo negativo (C) ambos del juego de reactivos, dejando un pozo al que no se le agregó nada (“blanco”). Con una micropipeta se agregaron 50 μ l. de cada muestra de suero en los pozos de la

placa con antígeno asegurándose de que las muestras cubrieran la parte inferior de los pozos. La placa se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Los pozos se lavaron tres veces, utilizando la solución amortiguada de lavado (F), eliminando el contenido de los pozos en una toalla de papel. Se aplicaron 50 µl de anticuerpo marcado con peroxidasa (conjugado D) a todos los pozos de la placa, asegurándose que el conjugado cubriera la parte inferior de los pozos y se incubó la placa a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, se realizó otro lavado y se agregaron 50 µl de la solución de Sustrato (H) y nuevamente se incubó a temperatura ambiente durante 20 min sin vaciar los pozos. Finalmente, se agregaron 50 µl de la Solución de “paro” (stop) (I) y se mezcló el contenido de los pozos agitando suavemente en una superficie plana. La lectura y registro de la prueba se realizó inmediatamente después de la aplicación de la solución de Stop, en un lector de ELISA (MR 600 Microplate Reader a Dynatech) a una longitud de onda de 620-650 nm para establecer la densidad óptica (DO).

3. Validación de la Prueba de ELISA (Punto de Corte).

El punto de corte se obtuvo siguiendo los manuales internacionales de estandarización para protocolos de ELISA emitidos por la OIE (Wright, *et al.*, 1993). Una vez obtenidos los valores de densidad óptica (DO) de todos los sueros, se calculó el porcentaje de inhibición (PI) de cada muestra, el cual fue obtenido utilizando la siguiente ecuación:

$$PI = \frac{DOCN-DO \text{ Muestra}}{DOCN-DOCP} \times 100$$

En la cual DOCN es el valor del promedio de DO del testigo negativo (duplicado), DOCP es el valor del promedio de DO testigo positivo (triplicado) ambos del juego de reactivos comercial. Para validar los resultados se consideraron dos condiciones por cada placa: al obtener el promedio de los valores de DO del control negativo (DOCN) este debió ser: ≤ 0.800 y el cálculo final fue evaluado con la siguiente ecuación:

$$100 \times (\text{DOCN}-\text{DOCP})/\text{DOCN} \leq 80\%$$

La otra condición fue que al obtener el PI a partir de los valores de DO de todas las muestras no se encontrara una diferencia mayor al 25% entre los duplicados. El valor del punto de corte fue determinado tomando en cuenta la suma de tres desviaciones estándares del promedio de la DO del testigo negativo. Esto es que los valores de PI < 35% fueron consideradas negativas y los valores de PI $\geq 40\%$ fueron consideradas como positivas.

4. Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC).

Las muestras de sangre completa se diluyeron de la siguiente manera: 500 μl de sangre con 500 μl de solución Alsever (Dextrosa 0.041 g, Citrato de sodio 0.016 g, ácido cítrico 1.1 mg, cloruro de sodio 8.44 mg y agua desionizada), se depositaron suavemente sobre 500 μl de solución con densidad de 1.077 ± 0.001 (HISTOPAQUE™-1077; 5.7 g/dl de polímero de sucrosa [Ficoll-400], y diatrizoato de sodio 3-5 bis acetilamino -2, 4, 6 ácido triyodobenzóico; SIGMA® (Saint Louis, Missouri USA) en un microtubo de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron a 400 **g** durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se extrajo la interfase

correspondiente a las células mononucleares (Fig. 1) y se lavaron las células tres veces con solución Alsever durante 10 min a 400 **g**.

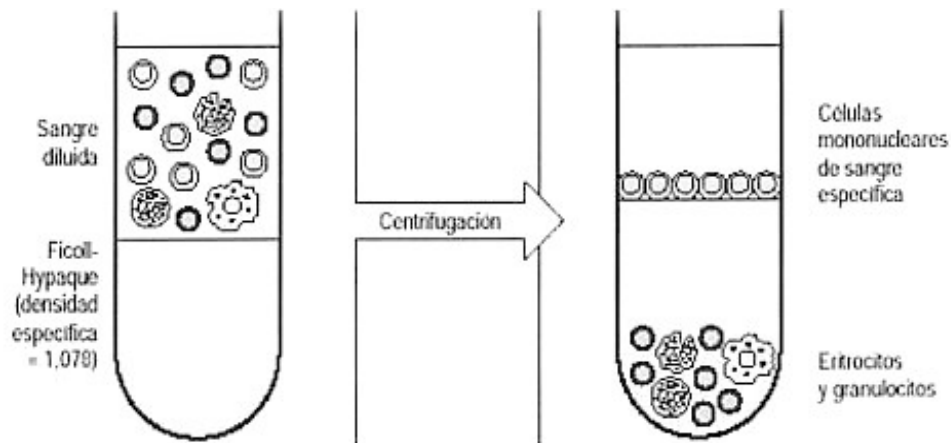


Fig. 1. Separación de células mononucleares por diferencia de densidades.

5. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó a partir de las PBMC sin rebasar la cantidad de células recomendada (1×10^7 a 1.5×10^7) utilizando un sistema de extracción presurizado (QuickGene-Mini80, Fujifilm LifeScience). En un microtubo de centrifuga de 1.5 mL se colocaron las PBMC y se agregaron 5.2 μ l de mercaptoetanol y 520 μ l de solución amortiguada de lisis (LRB con Guanidium Thiocinato), para simultáneamente lisar las células, solubilizar sus componentes y desnaturalizar las RNAsas endógenas. La mezcla se agitó en vortex a velocidad máxima por 30 s y se centrifugó a ≥ 8000 **g** ($\geq 10,000$ rpm) por 10 s, para recuperar el lisado de las paredes del tubo. Posteriormente se añadieron 250 μ l de etanol >99% y se agitó en vortex durante 5 min a máxima velocidad, se centrifugó a ≥ 8000 **g** ($\geq 10,000$ rpm) por 10 s, para recuperar el lisado de las paredes del tubo. El lisado se transfirió al cartucho y por presurización se realizaron tres lavados con

750 μ l de la solución amortiguadora de lavado (WRB). Finalmente, la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril, y se agregaron 50 μ l de solución buffer de elución (ERB). El ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Posteriormente se utilizaron 2 μ l de cada muestra para ser visualizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio. El ARN se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

6. RT-PCR de punto final para la detección de vLEB.

La retrotranscripción se realizó en reacciones de 20 μ l. En un microtubo de 0.2 mL, se agregaron 2 μ g de ARN y 2.5 μ M de iniciador Oligo (dT)₂₀ (Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 11 μ l. La mezcla se incubó a 70°C durante 10 min y a 4°C por lo menos durante 5 min en el termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) para añadir 5 μ l de solución amortiguadora 5x (250 mM Tris HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), 0.01 M de ditioneitol DTT, 0.25 μ M de cada dNTPs y agua grado biología molecular cbp 20 μ l seguida de homogenización e incubación a 37°C en el termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) para añadir 1 U. de enzima RT (Superscript II, Invitrogen,) en el momento del registro de la temperatura 37°C e incubar por un tiempo total de 60 min. El ADN complementario (ADNc), se colocó en hielo y se visualizó en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

El ADNc obtenido se utilizó en protocolos de PCR utilizando los siguientes iniciadores: 2778, 5'- CTA CCT TGC CAG ATC TCA TC -3' 2796 (sentido) y 2979

5'- GCT TGT CGA AGC TCT GCA ATG C -3', 2958 (antisentido) descritos por Poon, *et al* (1993) los cuales amplifican un producto de 202 pb de una región altamente conservada del gen *pol*. La mezcla de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl conteniendo: 4 µl de ADNc, 20 pM de cada uno de los iniciadores Pol2 sense y Pol2 antisense, 5.0 µl amortiguador termoestable libre de magnesio 5X [500 mM KCl, 100 mM Tris - HCl (9.0 de pH), y 1 % Triton X-100], 0.2 µM de cada dNTPs, 1.5 mM, MgCl₂, 1.25 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega Corp., Madison WI., USA) y agua grado biología molecular cbp 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 94.5 C° 300 s, seguido de 35 ciclos a 94.5 C° por 90 s, 60.5 C° por 60 s, y 72 C° por 60 s y un ciclo de elongación final de 72 C° durante 5 min. El producto de la amplificación se visualizó en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

7. Visualización en Geles de Agarosa.

De los fragmentos de ADN amplificados por RT-PCR, el ADNc, y ARN se tomaron 2 a 3 µl de cada uno y se le agregaron 3 µl del amortiguador de carga (loading buffer), cada una de estas mezclas fue cargada en geles de agarosa al 2%, en buffer TBE 1X (89 mM Tris-Cl, 89 mM de Ácido Bórico, 2 mM de EDTA, pH 8.0) y se tiñeron con bromuro de etidio (5 µg/ml).

Para preparar el gel se pesó 1.0 g de agarosa que fue agregado en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 50 mL de TBE y se calentó en micro-ondas por 60 s para disolver la agarosa. Se dejó enfriar un poco, se le agregó el bromuro de etidio y se vació en la charola de la cámara de electroforesis con el "peine" para

que se formaran los pozos. En el primer carril se cargaron 5 µl de marcador de peso molecular y en los demás se cargaron las muestras, se realizó la electroforesis (90 volts por una hora) y se visualizaron las bandas en un trasiluminador de luz ultra violeta (Apollo, Instrumentation), se documentaron tomando fotografías digitales (Doc-It Software UVP® San Gabriel, CA, USA, Olympus® camera).

8. Cuantificación de la carga viral de vLEB por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (q-PCR).

La estandarización de la qPCR se realizó por comparación de la amplificación de los productos de los genes constitutivos *pol* y *env* del vLEB. Para la detección del ARN viral se diseñaron los iniciadores específicos para los genes *pol* y *env* del vLEB en el programa IDT's SciTools PrimerQuestSM (Integrated DNA Technologies Whitehead Institute for Biomedical Research). Para el gen *pol* se utilizaron los iniciadores (Pol Fw 5'-GGC GAT TTC TTG CAG CTG TGC TAA-3' y Pol Rv 5'-AAC CTC TGA GCC ACA ACC TTC CTT-3') y para el gen *env* el juego de iniciadores fue: (Env Fw 5'-AAC AAT GTC ATG GAA TTT TCA CTC-3' y Env Rv 5'-AAA AGG TGA TCA GGG GAT CAT A-3'). El PCR en tiempo real se realizó en un equipo LightCycler®480 (Roche™ Diagnostics Indianapolis, IN.USA) usando SYBR® GreenI (10,000X Cambrex Bio Science Rockland Inc. USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl los cuales contenían: SYBR® GreenI 0.165X, amortiguador de PCR 1X (100 mM Tris-HCL pH 8.4 y 500 mM KCl), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTP's de cada uno, 1.25 U de Platinum® Taq ADN polimerasa

(Invitrogen™ São Paulo, SP Brasil) los oligonucleótidos iniciadores para el gen *pol* fueron usados a 300 nM y para el gen *env* a 900 nM, agregando finalmente 12.5 ng de ADNc. Cada muestra se ejecutó por triplicado y con una reacción control sin template de ADNc NTC (Non Template Control) en placas ópticas de 96 pozos (LightCycler®480 Multiwell Plate 96 of Roche™) después de una activación de la enzima a 95°C por 10 min se bajo la temperatura a 60°C por 30 s para alineación de iniciadores y extensión a 72°C por 40 s; por 35 ciclos y se dio una extensión final de 5 min a 72°C. Posterior a la amplificación, se incrementó la temperatura de 60°C a 95°C para construir una curva de disociación (Fig. 2) y determinar la especificidad del producto amplificado.

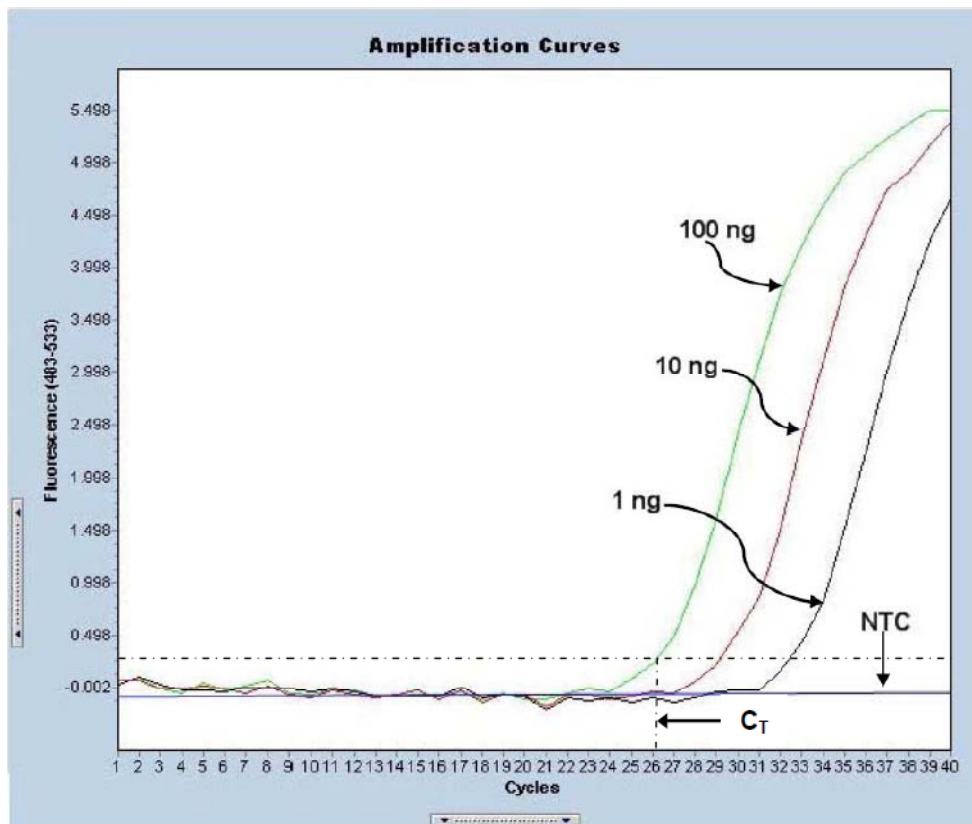


Fig. 2. Evaluación de tres concentraciones de ADNc para la estandarización del PCRq para el gen *env* de vLEB.

9. Método de Cuantificación.

La expresión génica por RT-PCR en tiempo real se realizó por cuantificación relativa. Se comparó el ciclo umbral (threshold cycle, C_T) de la muestra desconocida (positiva a vLEB) con una muestra calibrada que sirvió como referencia (muestra proveniente de animales no infectados por vLEB). Todas las cuantificaciones se normalizaron con un testigo endógeno de Gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (G3PDH), para considerar la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de la transcripción reversa y se determinó el C_P (cross point) de cada muestra y del testigo interno G3PDH (C_T G3PDH) para calcular la diferencia entre la C_P de la muestra y la C_P G3PDH (ΔC_P) y normalizar las diferencias entre la extracción de ARN y la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc. El ΔC_P de cada muestra se substrajo del ΔC_P del calibrador, ésta diferencia corresponde a la $\Delta\Delta C_P$ (Bustin, 2000).

Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta C_P$ para el método de cuantificación relativa son:

$$C_P \text{ de la muestra} - C_P \text{ G3PDH} = \Delta C_P$$

$$\Delta C_P \text{ de la muestra} - \Delta C_P \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_P$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-(-\Delta\Delta C_P)}$$

La diferencia en la expresión de la muestra se expresa como n -veces relativa al calibrador (Applied Biosystems). Los resultados de cada triplicado se expresaron como la media \pm el error estándar.

10. Análisis de resultados.

La relación entre la prueba de ELISA y la RT-PCR de punto final se determinó por prueba de J^2 y coeficiente de Cramer. En todos los muestreos, se realizó análisis de varianza y se calculó la diferencia mínima significativa (DMS) de las medias mediante prueba de *Tukey* para los resultados del leucograma y de la prueba de ELISA mientras que los resultados de la PCRq se analizaron por prueba de *t* de *student*. La correlación entre todos los parámetros evaluados se determinó por prueba de Pearson. En todos los casos, la significancia se determinó a $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Evaluación Serológica Inicial por Prueba de ELISA.

De los primeros 80 sueros evaluados se encontraron 53 vacas (66%) positivas a la gp51 del vLEB y 27 vacas (34%) seronegativas (Fig. 3). Con los resultados de DO de ambos grupos se calculó el P. I. de todas las muestras para evaluar el punto de corte del primer tamiz. (Fig. 4 y 5).

2. Conformación de la Población Experimental.

A partir de 47 muestras de sangre completa (27 seropositivos y 20 seronegativos), se extrajo ARN total y se sintetizó ADNc (Fig. 6 y 7, respectivamente) para realizar la RT-PCR. En las muestras positivas, se obtuvo el producto de amplificación esperado descrito de 202 pb (Fig. 8) (Poon, *et al.*, 1993). De acuerdo al cuadro de contingencia de 2X2 (Fig. 9), se conformaron tres grupos de animales: ELISA+/PCR+ (Grupo 1), ELISA+/PCR- (Grupo 2) y ELISA-/PCR- (Grupo 3). La prueba de ELISA y la de RT-PCR presentaron una alta relación entre sí ($J^2 < 0.001$ y coeficiente de Cramer=0.77).

3. Evaluación de Leucograma.

El leucograma del muestreo inicial mostró que el 77.7% de las vacas seropositivas (Grupo 1 y 2) presentó linfocitosis persistente (LP). En todos los extendidos se observaron linfocitos atípicos (Fig. 10-13). En el grupo 1 (ELISA+/PCR+), el 14.89% (7/21) de las vacas presentaron conteos altos de

leucocitos y linfocitos (LP absoluta) a lo largo del experimento. Los resultados de los conteos leucocitarios y de LP, de los tres muestreos en los diferentes grupos, se muestran en las figuras 14 y 15; respectivamente. Sólo el grupo 1 presentó, en forma estadísticamente significativa, altos conteos leucocitarios y alta proporción de linfocitos mismos que se incrementaron gradualmente a lo largo del experimento. Cabe señalar que los grupos 2 y 3 fueron estadísticamente similares, con excepción del tercer muestreo en el que el grupo 2 presentó proporciones más bajas de linfocitos que el grupo 3.

4. Resultados de ELISA indirecta.

Con los valores de DO del total de muestras (121), se calculó el PI (Fig. 16), los valores de DO de los grupos en los diferentes muestreos se presentan en la Fig.17. Se observa que el grupo 2 (ELISA+/PCR-) presentó valores iniciales de DO similares al grupo 1, mismos que gradualmente fueron disminuyendo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

5. Cuantificación del vLEB por PCRq.

Una vez evaluadas las muestras de ADNc se procedió a realizar la cuantificación génica por PCR en tiempo real de las regiones **pol** y **env** del vLEB, en el ARNm de las PBMC de las vacas infectadas y no infectadas, previamente evaluadas por las pruebas de ELISA y RT-PCR. En las vacas infectadas, en el muestreo 1, se encontró una mayor expresión del gen **pol**. (Fig. 18) que del gen **env** ($P \leq 0.05$). La carga viral para el gen **env** y para el gen **pol** se muestran en las

Fig. 19 y 20. En esta última, los valores de carga viral se comparan con los valores de LP de los diferentes muestreos.

6. Correlación de Pearson entre los parámetros evaluados.

Se encontró una correlación significativa (0.86805) entre los resultados de LP y la carga viral determinada por expresión del gen *pol*.

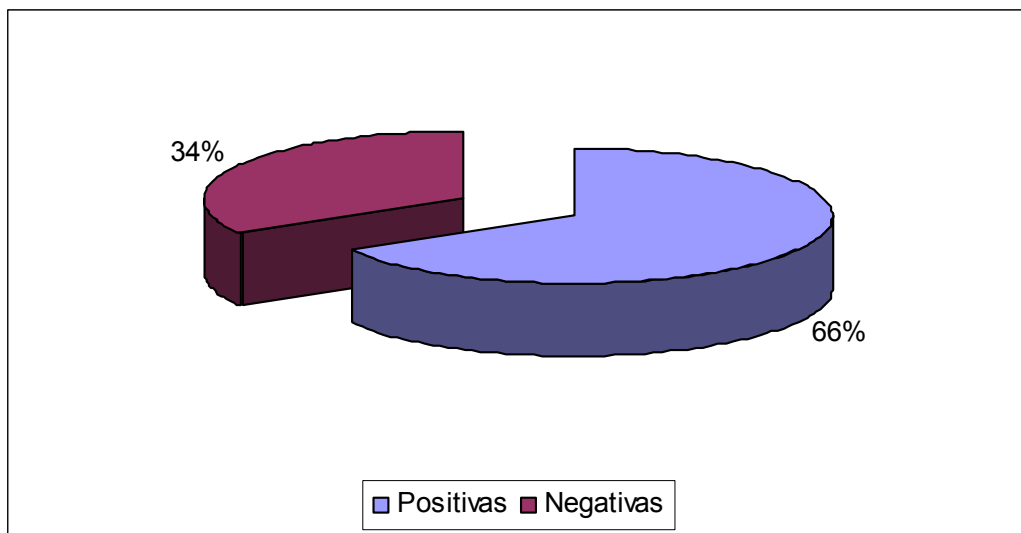


Fig.3. Porcentaje de animales seropositivos y seronegativos a la prueba de ELISA en el tamizaje inicial.

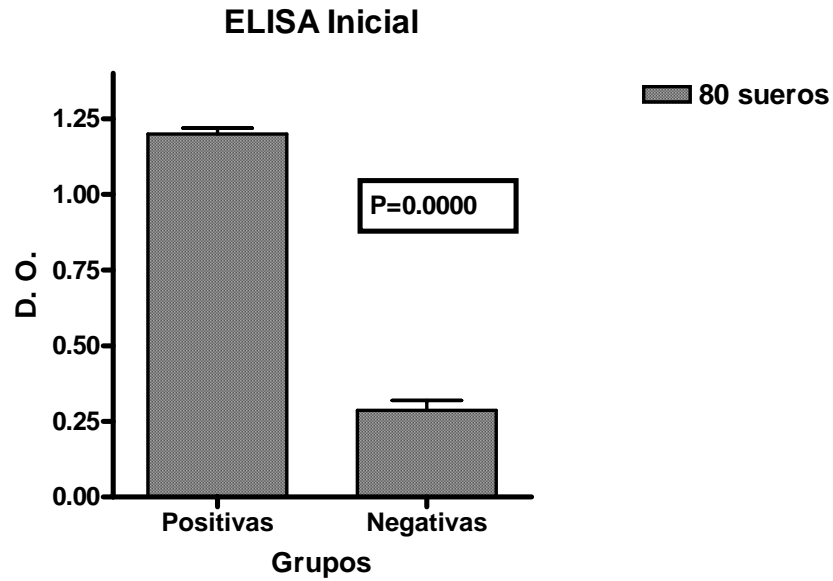


Fig. 4. Evaluación de la densidad óptica obtenida en el Tamizaje Inicial

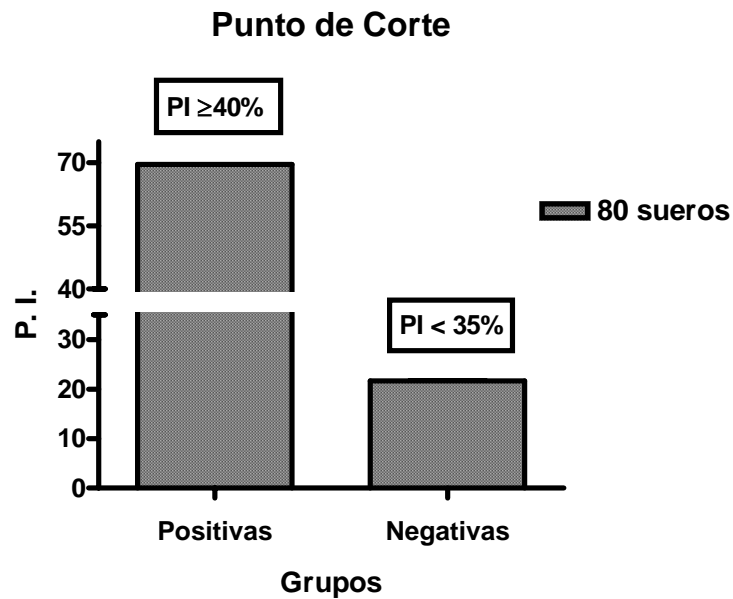


Fig. 5. Evaluación del punto de corte a partir de los valores de DO del primer muestreo realizado.

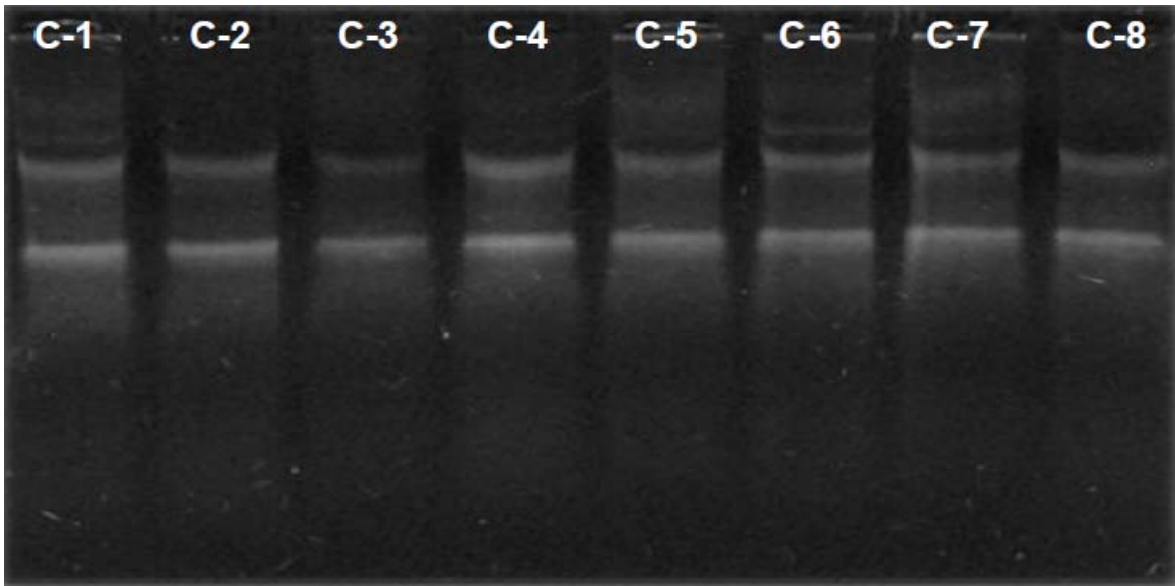


Fig. 6. Visualización de ARN total en gel de Agarosa al 2% (C-1 a C-8 carriles con muestras ARN)

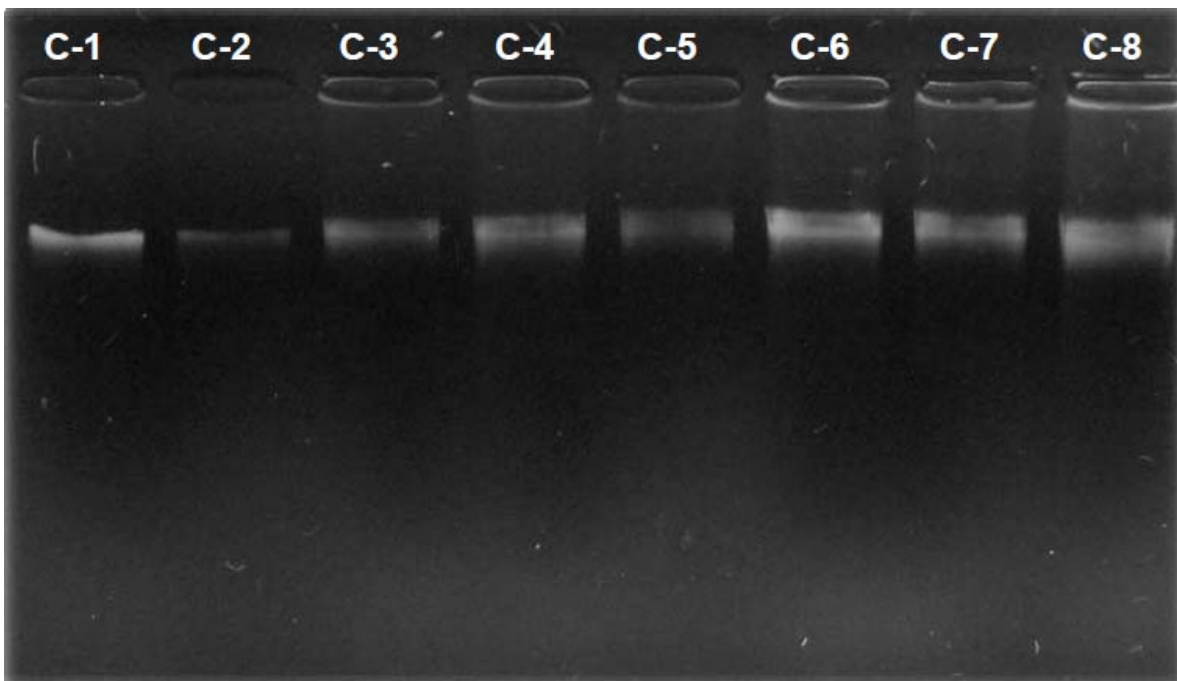


Fig. 7. Visualización de ADNc producto de la retrotranscripción en gel de Agarosa al 2%. (C-1 a C-8 carriles con muestras con ADNc).

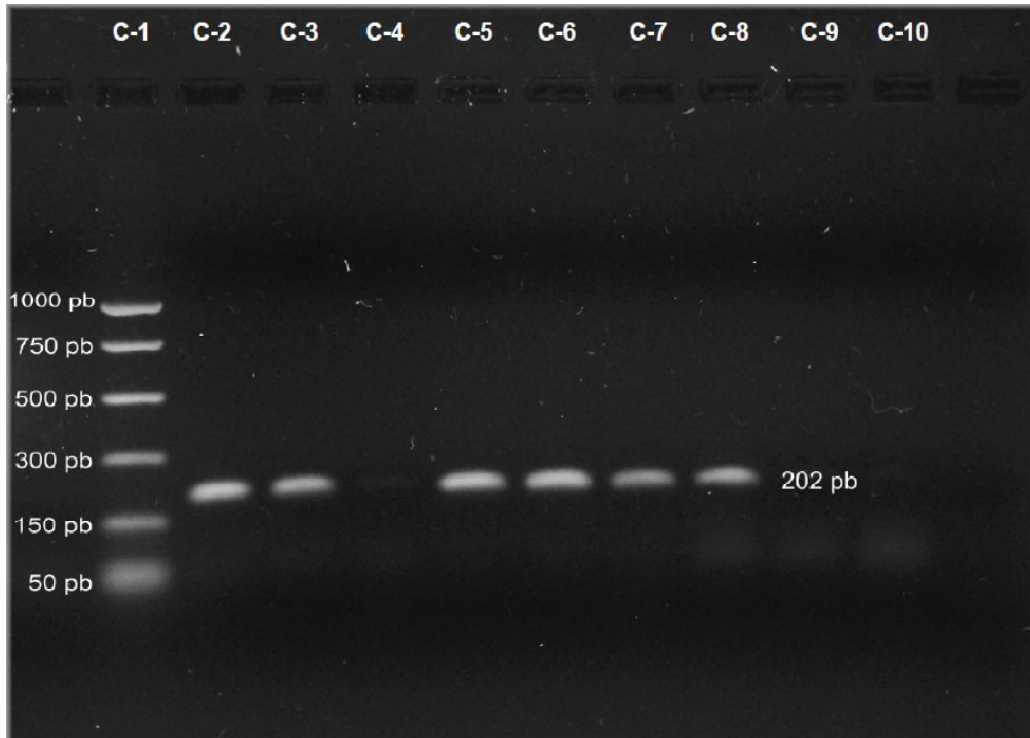


Figura 8. Visualización del amplificado de 202 pb del vLEB (C-1 carril con el marcador de peso molecular, C-2 y C-3 testigo positivo de vLEB C-4 a C8 carriles muestras positivas por ELISA; C-9 y C-10 testigos negativos)

		PCR	
		+	(-)
E L I S A	+	21	6
	(-)	0	20

Fig. 9. Cuadro de Contingencia 2X2 en el cual se definieron los grupos evaluados en las demás pruebas.

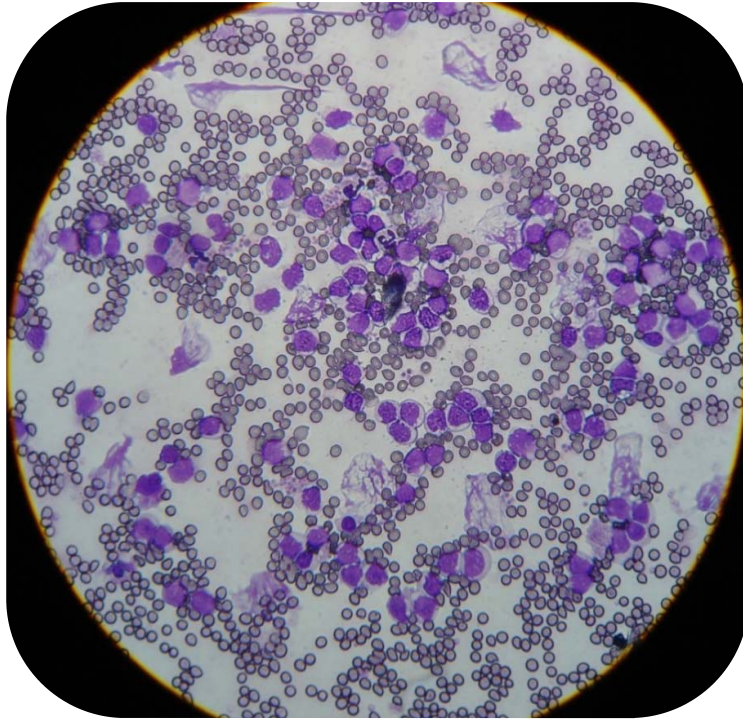


Figura 10. Revisión de extendidos a 400x para la determinación de linfocitosis persistente

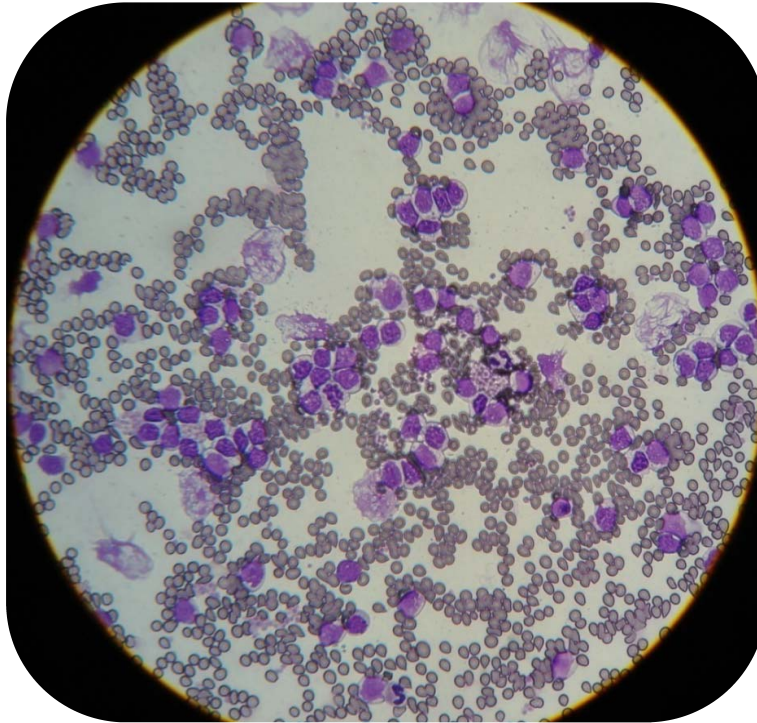


Figura 11. Revisión de extendidos a 400x para la determinación de linfocitosis persistente.

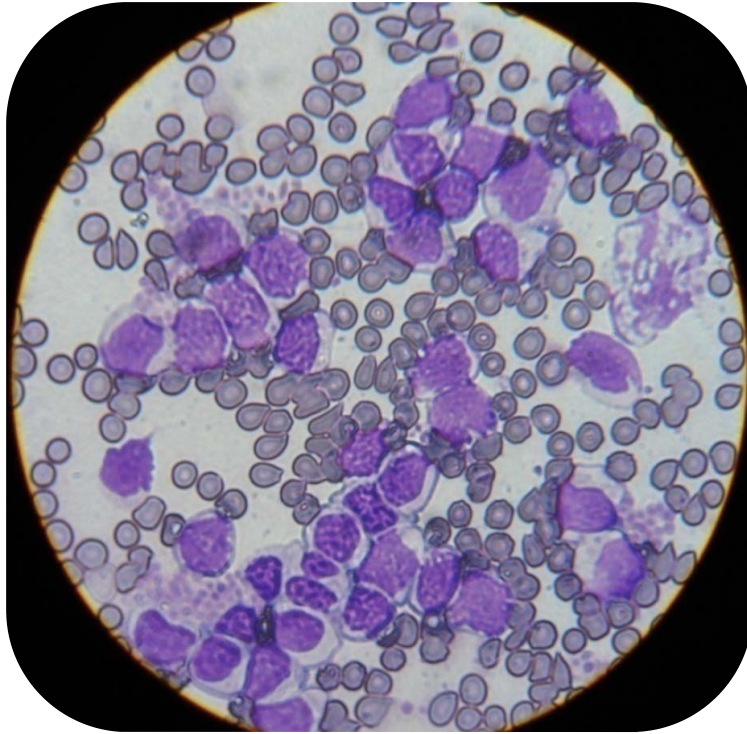


Figura 12. Revisión de extendidos a 1000x para la determinación de linfocitosis persistente

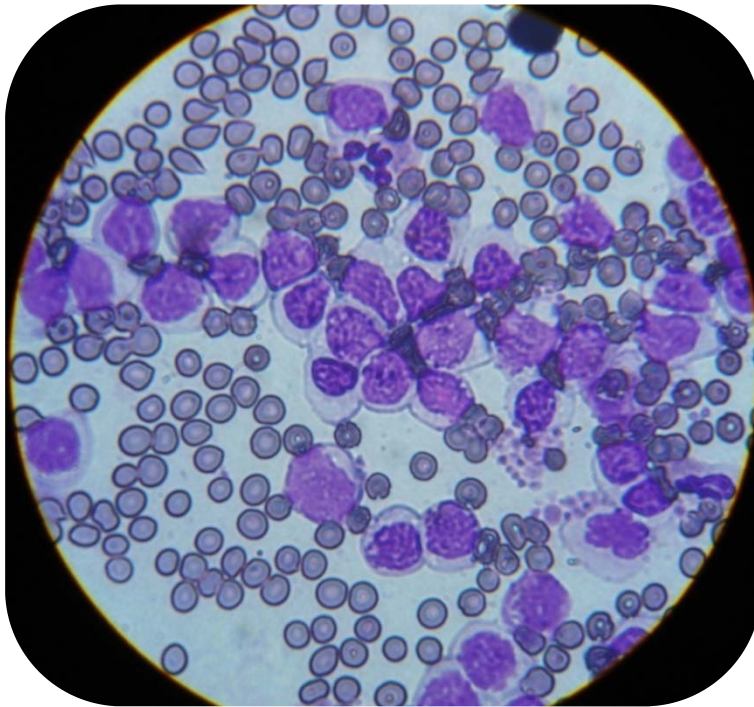


Figura 13. Revisión de extendidos a 1000x para la determinación de linfocitosis persistente

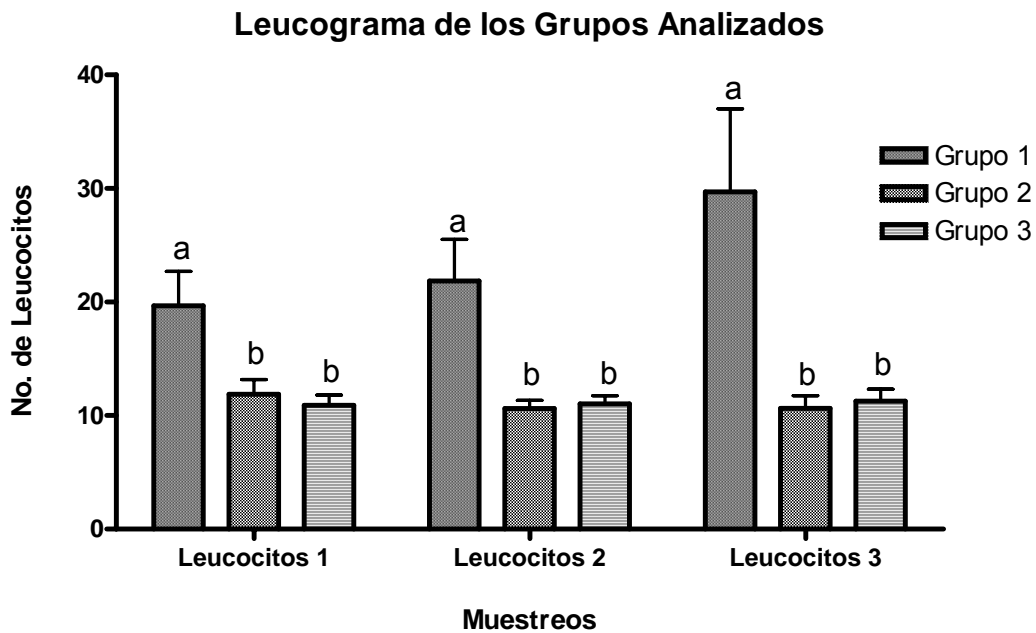


Fig. 14. Valores de los conteos leucocitarios de los tres grupos durante los tres muestreos. (Literales diferentes señalan diferencia estadística significativa).

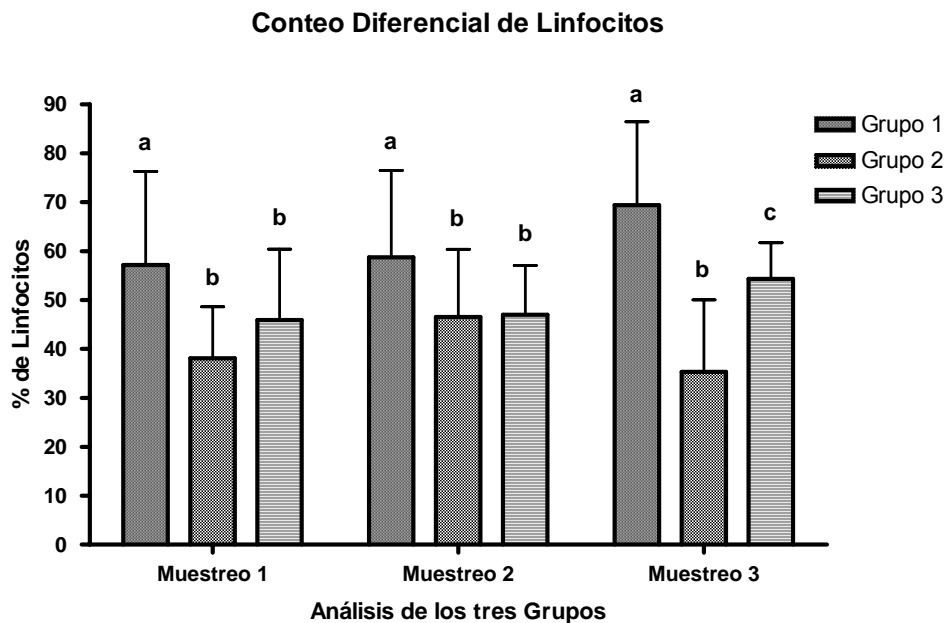


Fig. 15. Valores del porcentaje linfocitario de los tres grupos durante los tres muestreos. (Literales diferentes muestran diferencia estadística significativa).

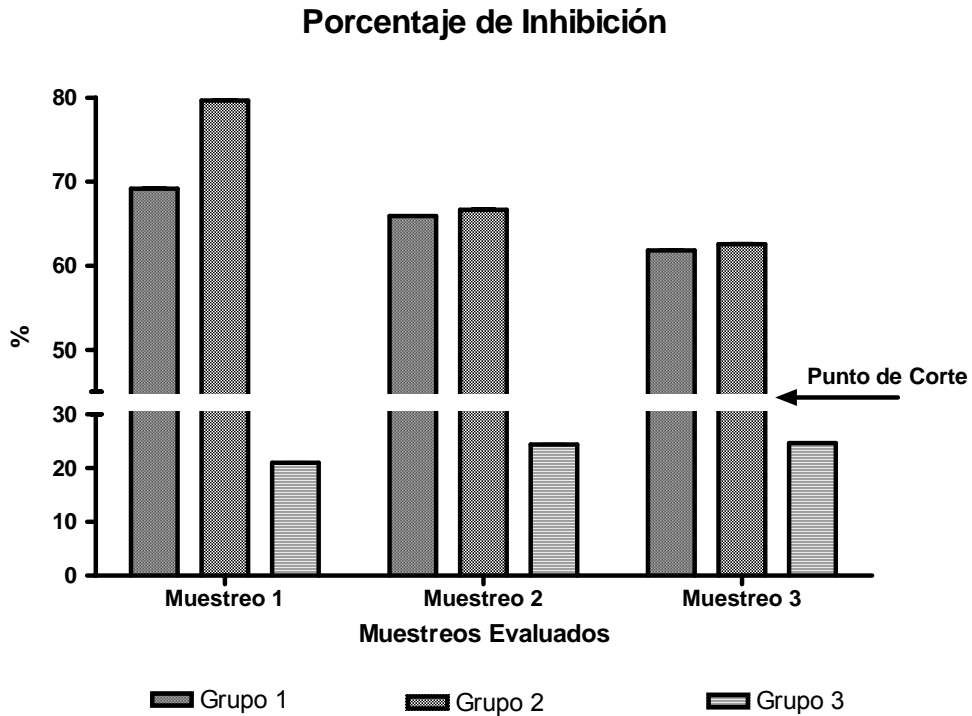


Fig. 16. Evaluación del punto de corte en los tres grupos conformados

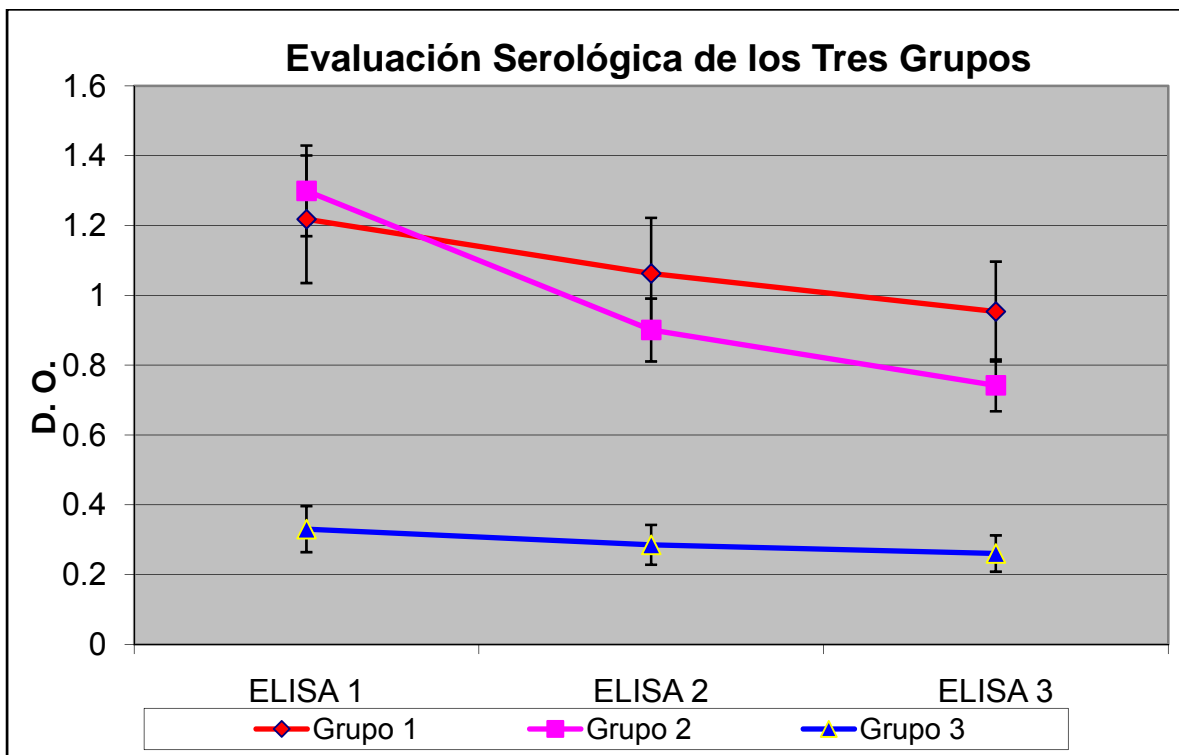


Fig. 17. Resultados de prueba de ELISA indirecta, muestra la media de densidad óptica de los tres grupos en los tres muestreos.

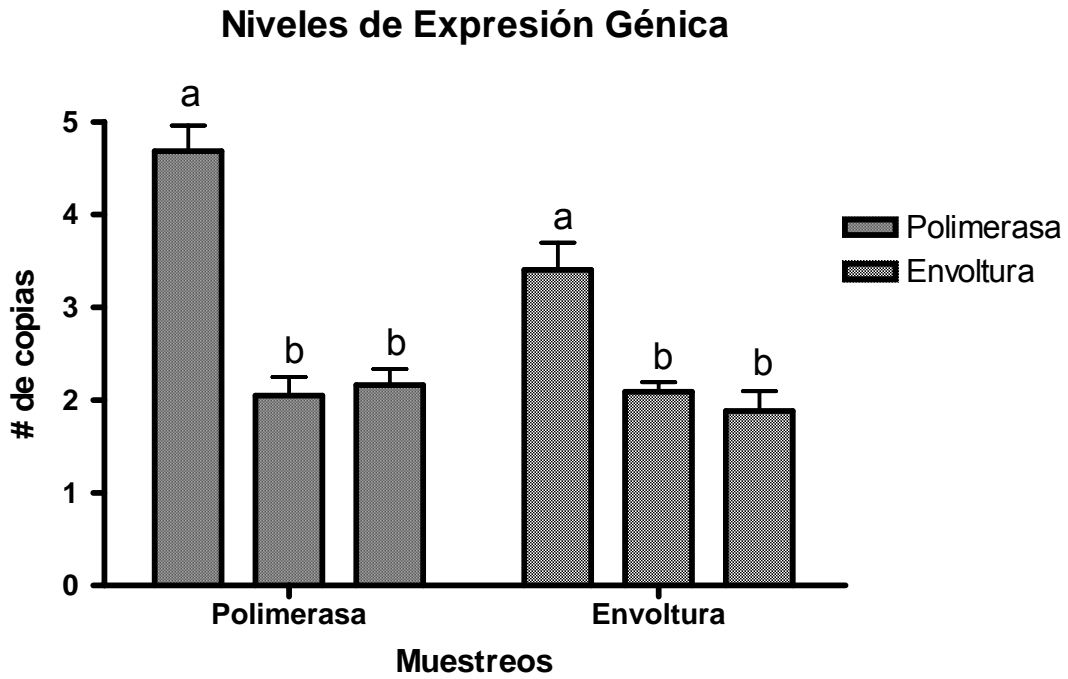


Fig. 18. Niveles de expresión entre los genes en los tres muestreos (Literales diferentes muestran diferencia estadística significativa).

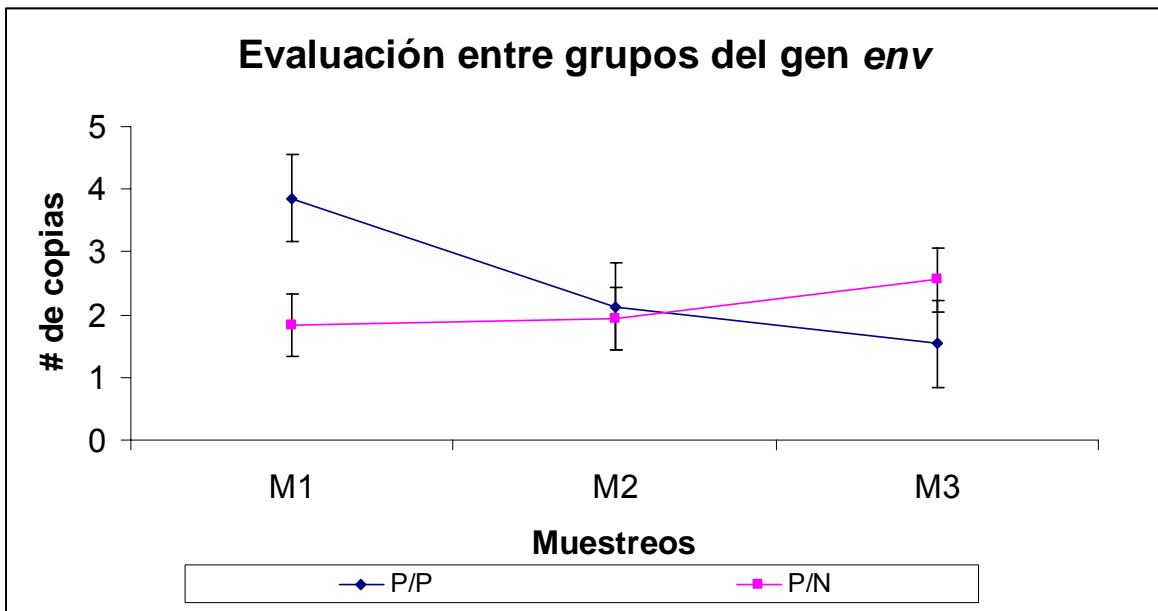


Fig. 19. Cuantificación del gen *env* del grupo 1 y 2 en los tres muestreos.

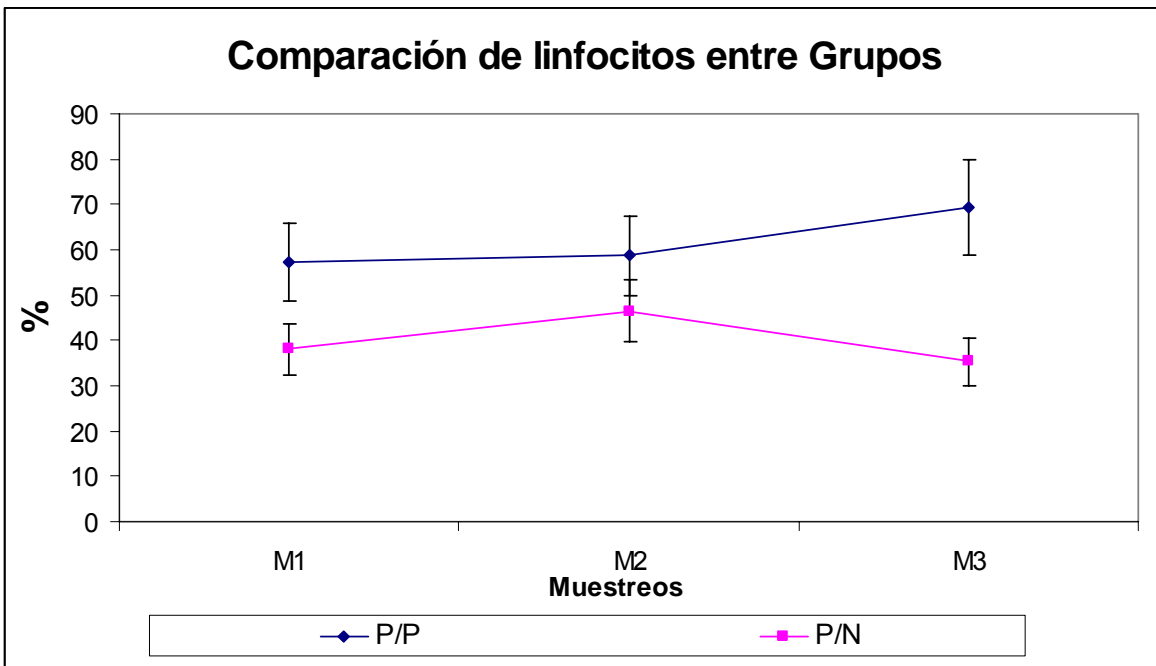
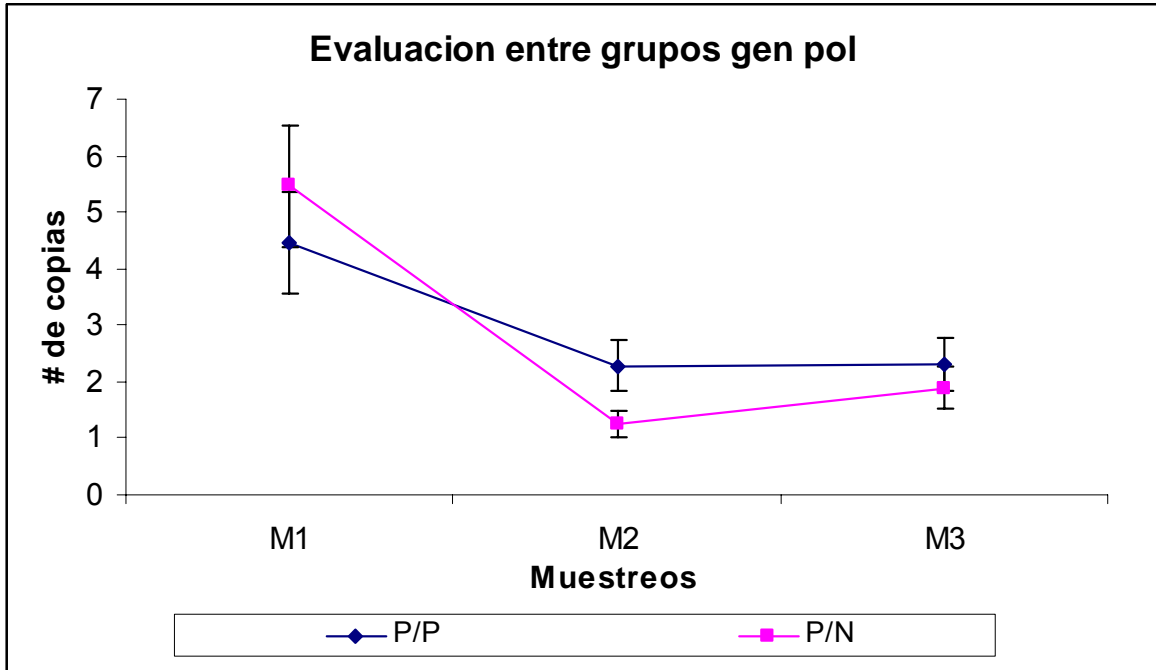


Fig. 20. Cuantificación de la carga viral por el gen *pol* y comparación con conteos linfocitarios en los grupos 1 y 2 durante los tres muestreos.

DISCUSIÓN

Los resultados del tamizaje inicial (80 sueros) revelaron una alta seroprevalencia (66%) en el hato. Lo anterior, está relacionado con la elevada proporción de casos detectados con linfoma en diferentes localizaciones tanto en las necropsias realizadas en el CAIT (Santa Cruz, *et al.*, 2008) como en el estudio preliminar realizado por Hernández, *et al* (2006) en el mismo centro de producción. Estos hallazgos concuerdan con el informe actual del Seguimiento Nacional de Salud Animal realizado en Estados Unidos, en el que se encontró una seroprevalencia de 80% (Erskine y Sordillo 2009). En Canadá, la prueba de ELISA indirecta ha presentado mayor sensibilidad y especificidad que la IDAG. Por tal motivo esta prueba, se ha propuesto a la ELISA indirecta como prueba oficial para el diagnóstico de la enfermedad en hatos lecheros (Simard, *et al.*, 2000). Las técnicas moleculares para la amplificación de vLEB se consideran pruebas sensibles para la determinación del estado de infección viral. De hecho, el manual diagnóstico de la OIE recomienda detectar ADN proviral por métodos de PCR anidado, basados en secuencias del gen *env*, para determinar la situación de la infección por el vLEB (OIE, 2004) además la cuantificación de la carga viral por PCRq ha mostrado una sensibilidad comparable con los métodos anidados, principalmente mediante el uso de secuencias de iniciadores del gen *pol* (Kuckleburg, *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos indican que la prueba de ELISA y RT-PCR punto final, fueron estadísticamente comparables, por prueba de J^2 y coeficiente de Cramer, en el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, en 6 casos no hubo

concordancia entre las pruebas. La sensibilidad de la prueba de ELISA es muy alta, con frecuencia suele presentar reacciones cruzadas (Nagy, 2007; VMRD 2009), por lo que se considera la posibilidad de que estas discrepancias correspondan a falsos positivos, como se ha informado anteriormente en la detección de provirus. Por otro lado, también existe la posibilidad de que estos casos fueran falsos negativos en PCR por tratarse de infecciones tempranas (Jacobs, *et al.*, 1992) o por ausencia de viremia, debido a que en ocasiones esta se presenta de manera intermitente (Dus Santos, *et al.*, 2007; Yeon Choi, *et al.*, 2002). Los resultados de la PCRq, basada en secuencias del gen *pol*, confirmaron la presencia de falsos negativos debido a la mayor sensibilidad de la prueba (Kuckleburg, *et al.*, 2003). Lo anterior condujo a una concordancia perfecta de la PCRq con la prueba de ELISA indirecta. De este modo, la implementación de la prueba de ELISA es una opción viable para el seguimiento de vacas infectadas en el CAIT, y los protocolos de RT-PCR anidada serían de elección para el seguimiento en becerras, ya que es económicamente más accesible y presenta una sensibilidad comparable con la PCRq.

La linfocitosis persistente que se desarrolla en bovinos infectados por el vLEB representa el hallazgo de laboratorio más consistente, previo a la manifestación clínica de la enfermedad (Casal, *et al.*, 1990, Batmaz, *et al.*, 1995, Dušinský, *et al.*, 2000). Es importante señalar que el hallazgo más temprano de linfocitosis persistente es la presencia de altos porcentajes de linfocitos con formas atípicas en los extendidos, aun sin incrementos absolutos de linfocitos circulantes. Por dicho efecto, se consideraron los valores de referencia citados en la literatura (Cockerell & Reyes, 2000). En este marco, los valores de LP del grupo 1 (conteos

leucocitarios y/o altos porcentajes de linfocitos con presencia de atipias celulares) y el incremento gradual observado en el transcurso del estudio, demostraron que se trataba de casos consistentes de LP, con base a los criterios descritos de evaluación hematológica repetida, en intervalos de por lo menos tres meses (Batmaz, *et al.*, 1995; Cockerell & Reyes, 2000). Estos valores fueron significativamente más altos ($P < 0.05$) que los del grupo 2 y 3 (Fig. 12 y 13, respectivamente) los cuales permanecieron sin LP durante todo el estudio. Lo anterior coincide con los valores informados por Batmaz, *et al.*, (1995) para vacas seropositivas con LP (Leucocitos totales x mm³ de 12, 464 +/- 1102, y Linfocitos del 78-82 %), incluso los conteos fueron superiores en el grupo 1. Lo anterior puede estar relacionado con la seroprevalencia de la enfermedad puesto que en dicho estudio el porcentaje de vacas seropositivas fue marcadamente inferior (9.15%) a los observados en el presente trabajo. Es importante señalar que en animales seropositivos (Grupo 2 y Grupo ELISA +/-sin LP), la ausencia consistente de LP, misma que fue significativamente menor en el grupo seronegativo en el tercer muestreo, puede indicar elementos de resistencia en dichos animales, considerando que pertenecen a un hato con alta prevalencia.

Los datos en la literatura refieren que el gen ***pol*** es altamente conservado en los retrovirus mientras que el gen ***env*** puede tener múltiples cambios en varios pares de bases (Gillet, *et al.*, 2007). Los datos del PCRq revelaron una mayor expresión del gen ***pol*** que del gen ***env***. Lo anterior coincide con Kuckleburg *et al.* (2003), donde la comparación de diferentes genes constitutivos del vLEB (***gag***, ***env*** y ***pol***) mostró una mayor consistencia en los resultados obtenidos para el gen ***pol*** con base al uso de señalizadores moleculares (molecular beacons) e

iniciadores para PCR anidado. Como se mencionó anteriormente, los protocolos de PCRq para ambos genes (*env* y *pol*) amplificaron todos los casos en los diferentes muestreos del grupo 2, demostrando la mayor sensibilidad en la detección por PCR en tiempo real, tal como lo refiere Kuckleburg, *et al.* (2003), debido a que las muestras se normalizan con controles endógenos y se consideran las variaciones en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de la transcripción reversa de los templados (Bustin, 2000).

Se ha descrito que los animales que desarrollan LP presentan mayores cargas virales (50 copias de provirus/ μ g de ADN), determinadas por la detección de provirus y expresión del gen *pol*, que aquellos sin LP (Juliarena, *et al.*, 2007). Lo anterior coincide con los resultados del presente trabajo, ya que se encontró una disminución de la carga viral por expresión del gen *pol* en el segundo muestreo en vacas positivas del grupo 2, mismas que no desarrollaron LP mientras que los animales del grupo 1, con cargas mayores, presentaron una diferencia significativa en el grado de LP (Fig. 20). De hecho la asociación entre la presencia de LP y la carga viral por detección del gen *pol* presentó una fuerte correlación por prueba de Pearson.

Con respecto a la respuesta serológica en este estudio, evaluada por prueba de ELISA, los valores de densidad óptica presentaron una disminución gradual en ambos grupos, siendo más notoria en el grupo 2, sin embargo dichos hallazgos no fueron estadísticamente significativos. Lo anterior contrasta con los hallazgos de Gutiérrez, *et al.*, (2001) que encontraron alta carga viral en animales con LP y bajos títulos de anticuerpos en los mismos. Es probable que en el presente estudio, el rango estrecho de DO que valida la prueba de ELISA indirecta

con punto de corte > 0.7 y por debajo de 2.0, puesto que valores mayores invalidan la determinación (VMRD, 2005) y no permite establecer la relación estadística entre la serología y los valores de LP y carga viral. Lo anterior puede ser solventado mediante la titulación de anticuerpos con los sueros obtenidos en un esquema similar al descrito por Gutiérrez, *et al.*, (2001). Otros factores que posiblemente estén incidiendo en la falta de correlación entre la respuesta serológica y la carga viral sean la edad y el estado fisiológico de las vacas. En vacas, los linfocitos declinan gradualmente con el paso de los años (Kramer, 2000) y por este motivo los criterios de diagnóstico de LP, se ajustan de acuerdo a la edad (Messich y Calderwood Mays, 2000), la respuesta inmune celular y humoral declina conforme avanza la edad (Tizard, 2000). De este modo, en estudios posteriores se podría determinar la relación entre la respuesta inmune humoral y la carga de vLEB agrupando la población experimental con base a la edad y una forma práctica de realizarlo sería considerando el número de partos por vaca.

Con respecto al estado fisiológico, la producción láctea constituye un considerable factor de estrés. Esto conduce a una inmunosupresión mediada por corticosteroides ya que tienen un efecto sobre la circulación de leucocitos disminuyendo la migración y suprimiendo la capacidad citotóxica y fagocítica. Adicionalmente, suprimen mecanismos efectores de la inmunidad al disminuir la capacidad de síntesis de la mayoría de citocinas por parte de los linfocitos T (Tizard, 2000). De igual modo, en trabajos futuros, la población experimental podría conformarse con base a la curva de lactación para considerar los efectos del estrés sobre los parámetros evaluados. Por último, es evidente con base a los resultados, que hay factores que inciden en la carga viral entre los grupos, y la

literatura refiere en su mayoría a la participación inmunológica. Amills, *et al.*, (2002) encontraron una disminución en la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4 en animales con LP lo cual sugiere una alteración en la respuesta inmune de linfocitos T CD4 y Murakami, *et al.*, (2004) comprobaron que la participación del IFN- γ en ganado infectado, podría controlar la infección, ya que observaron un incremento en la células $\gamma\delta$ limitando el desarrollo de animales con LP. Debido a que este tipo celular funciona como puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa celular se sugiere que la participación de este tipo celular limita la expresión génica de la polimerasa del virus circulante durante la replicación viral. De este modo, la evaluación de la respuesta inmune celular en estudios posteriores, podría proporcionar datos relevantes sobre los factores de resistencia involucrados en la infección por el vLEB.

CONCLUSIONES

- La prueba de ELISA indirecta sería la prueba de elección en el seguimiento de LEB ya que es económica, sencilla y presenta un alto valor diagnóstico.
- La utilización de la RT-PCR permitió la identificación del virus de LEB en sangre, pero los casos negativos deben ser corroborados por técnicas más sensibles como la PCR anidada o PCRq.
- Las secuencias basadas en el gen ***PoI*** del vLEB son de mayor utilidad para la determinación de la carga viral, debido a su mayor consistencia en la expresión génica.
- La determinación de linfocitosis persistente fue diferente entre los grupos positivos y correlaciona fuertemente con la carga viral de vLEB, determinada por expresión del gen ***PoI***.
- Los métodos serológicos que determinen los títulos reales de anticuerpos probablemente determinen la correlación de perfiles serológicos con la carga de vLEB y el desarrollo de linfocitosis persistente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agresti, A; Ponti, W; Rocchi, M; Meneveri, R; Marozzi, A; Cavalleri, D; Peri, E; Poli, G; Ginelli, E. 1993. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res.* 54: 373-378.
2. Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. 2003. *Molecular biology of the cell.* 4th edn. New York: Garland Science.
3. Alexander, A. N; Constable, P. D; Meier, W. A; French, R. A; Morin, D. E; Lowry, J. E; Hoffman, W. E. 1996. Clinical and Immunohistochemical characterization of thymic lymphosarcoma in a heifer. *J Vet Intern Med.* 10: 275-278.
4. Amills M; Norimene J; Olmstead CA; Lewin HA. 2004. Cytokine mRNA expression in Bcells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine,* 28: 25-28.
5. Angel, K. L; Stott, J; Tyler, W; Groth, A. H. 1991. Metastatic thymic lymphosarcoma in a calf. *J. Am Vet Med Assoc.* 198: 1771-1773.
6. Ballagi, P. A; Klintevall, K; Merza, M; Klingeborn, B; Belák, S. 1992. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polimerase chain reaction. *J Vet Med B.* 39: 69-77.
7. Barrientos, P. R. 2002. Revisión bibliográfica, de la red y recopilación de imágenes en video de la enfermedad "Leucosis Enzoótica Bovina". Tesis de Licenciatura. UNAM. FESC. Estado de México.
8. Batmaz, H; Carli, K. T; Kahraman, M; Cetin, C; Kennerman, E. 1995. Serological and hematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet Rec.* 136: 42-44.
9. Biancifiori, F; Cenci, G. 1982. ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis. *Symposium on Bovine Leukosis.* Orlando, USA. 167-172.
10. Blankenstein, P; Bondzio, H; Fechner, H; Beier, D; Marquardt, O; Looman, A. C; Ebner, D. 2000. A nucleotide deletion causing a translational stop in the protease reading frame of bovine leukaemia virus (BLV) results in modified protein expression and loss of infectivity. *J Vet Med B.* 47: 361-371.

11. Brenner, J; Van-Haam, M; Savird, T. 1989. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet Immunol Immunopathol.* 22: 299-305.
12. Buczinski, S. Couture, Y. Hélie, P. Francoz D. 2006. Cutaneous T cell lymphoma in a heifer seropositive for bovine leukosis virus. *Vet Rec.* 158, 665-667.
13. Bustin, A. S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J of Mol Endocrinology.* 25: 169–193.
14. Casal, J; Learte, P; Torre, E. 1990. A path model of factors influencing bovine leukemia virus transmission between cattle herds. *Prev Vet Med.* 10: 47-61.
15. Cockerell, G.L. Reyes, R.A. 2000. Bovine Leukemia virus- Associated Lymphoproliferative Disorders. In Schalm's Veterinary Hematology. Ed. Feldman B.F. Zinkl, J.G. Jain, N.C. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 614-619.
16. Código Sanitario para los Animales Terrestres. 2004. (Citado en Diciembre de 2005). Disponible en la página electrónica de la OIE. www.oie.int/
17. Correa, G. P. 2002. Enfermedades virales de los animales domésticos, poligástricos. Vol. II. 7^a edición. Ed Técnica en Impresión. México. 111–118 p.
18. Dausset J. 1958. Iso-leuco-antianticorps *Acta Haematologica.* 20(1-4), 156-66.
19. de la Sota, M. D. 2004. Manual de Procedimientos, Leucosis Enzoótica Bovina. Marzo 2004. Dirección Nacional de Sanidad animal. SENASA. Buenos Aires (Citado en Diciembre de 2008). Disponible en: http://www.senasa.gov.ar/sanidad/pdf/09_leuco.pdf
20. Dettloux, J. C; Freeman, A. E; Miller, L. D. 1991. Comparison of natural transmission of bovine leukemia virus in Holstein cows of two genetic lines selected for high and average milk production. *Am J Vet Res.* 52: 1551-1555.
21. Detrick, B. Hamilton, R. Rose, N. R. 2005. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 7th edition. ASM Press, Washinton DC.
22. Dimmock, C. K; Rogers, R. J; Chung, Y. S; McKenzie, A. R; Waugh, P. D. 1986. Differences in the lymphoproliferative response of cattle and sheep to bovine leukosis virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 11: 325-331.
23. Dimmock, C. K; Chung, Y. S; MacKenzie, A. R. 1991. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust Vet J.* 68: 230-233.

24. Dinter, Z; Morein, B. 1990. Virus infections of ruminants. 1st edition. Ed. Elsevier. Netherlands. 419-429.
25. Divers, T. J; Bartholomew, R. C; Galligan, D; Littel, C. 1995. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial herd. *Prev Vet Med.* 23: 133-141.
26. Doménech, A; Viana, M; Gomez-Lucia, E. 1999. Nuevas aportaciones al conocimiento de la patogenia por el virus de la leucosis enzoótica bovina. (BLV). *Vet Med.* 16: 10-20.
27. Dus Santos MJ, Trono K, Lager I, Wigdorovitz A. 2007. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet Microbiol.* 119:10-18.
28. Dušinský, R; Bardotti, M; Ponti, W. 2000. Decreased expression of L – Selectin (CD62L) on lymphocytes in Enzootic Bovine Leukaemia. *J Vet Med B.* 47: 127-132.
29. Eaves, F. W; Molloy, J. B; Dimmock, C. K; Eaves, L. E. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol.* 39: 313-321.
30. Emanuelson, U; Scherling, K; Pettersson, H. 1992. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med.* 12: 121-131.
31. Fechner, H; Kurg, A; Geue, L; Blankenstein, P; Mewes, G; Ebner, D; Beir, D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med B.* 43: 621-630.
32. Fenner, F; Bachman, P. A; Gibbs, E. P. J; Murphy, F. A; Studdert, M. J; White, D. O. 1987. *Veterinary virology.* Academic Press. London.
33. Fenner, F. 1992. *Virología veterinaria.* 1^a edición. Ed. Acribia, España. 586–587 p.
34. Ferrer, J. F; Marshak, R. R; Donald, A; Kenyon, S. J. 1979. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175: 705-708.
35. Gibbons, W. J. 1984. *Medicina y cirugía de los bovinos.* Ed. La prensa mexicana. México. 559-571.
36. Gillet, N Florins, A Boxus, M Burteau, C Nigro, A Vandermeers, F Amel-Baya, Bouzar H B, Defoiche, J Burny, A Reichert, M Kettmann R Willems L. 2007.

- Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4:18.
37. Gilliespie, B. E. Jayarao, B. M. Dowlen, H. H. Oliver S. P. 1999. Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Jersey Cows. *J Dairy Sci*. 82: 2049-2053.
 38. Gorodezky, C. 2008. Memorias del 27° Curso Teórico-Práctico de Inmunogenética, Impartido en el departamento de Inmunología e inmunogenética del INdRE del 28 de Julio al 1 de Agosto de 2008.
 39. Grimshaw, W. T; Wiseman, A; Petrie, L; Selman, I. E. 1979. Bovine leucosis (lymphosarcoma): a clinical study of 60 pathologically confirmed cases. *Vet Rec*. 105: 267-72.
 40. Gutiérrez, E.S. Dolcini, G.L. Arroyo, G. H. Rodríguez D.C. Ferrer, J. E. Esteban, E.N. 2001. Development and evaluation of highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res*. 62: 1571- 1577.
 41. Hernández, B. R. J; Mar, C. R. A; Zavaleta, H. J. N; Barrientos, P. R; Leyva, G. V. H; Fausto, R. E. 2006. Leucosis enzoótica bovina. *Revista de Ciencia, Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria AGROPECUS*. 3: 14–36.
 42. Holmes, L. A; Scott, P. R; Aldridge, B. M. 1990. Thymic lymphosarcoma with metastases causing spinal cord compression and pelvic limb paresis in a heifer. *Br Vet J*. 146: 91-92.
 43. Hopkins, S. G; DiGiacomo, R. F; Everman, J. F; Christensen, J. D; Deitelhoff, D. P; Mickelsen, W. D. 1991. Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 199: 1035-1038.
 44. Jacobs, R. M; Song, Z; Poon, H; Heeney, J. L; Taylor, J.A; Jefferson, B; Vernau, W; Valli, V. E. O. 1992. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus – exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can J Vet Res*. 56: 339-348.
 45. Johnson, R; Kaneene, J. B; Anderson, S. M. 1987. Bovine leukemia virus: duration of BLV calostrual antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev Vet Med*. 4: 371-376.
 46. Juliarena M.A., Gutierrez S.E. & Ceriani C. (2007) Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res* 68(11), 1220–1225.

47. Kahrs, R. F. 1985. Enfermedades víricas del ganado vacuno. Ed. Acribia. España. 97-108 p.
48. Klintevall, K; Ballagi-Pordány, A; Näslund, K; Belák, S. 1994. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol.* 42: 191-204.
49. Klintevall, K; Fuxler, L; Fossum, C. 1997. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 20: 119-130.
50. Kozaczyńska B. 1999. Diagnostic value of different ELISA kits for the determination of antibodies against bovine leukemia virus (BLV). *Bull Vet Inst Pulawy.* 43: 133-138.
51. Kramer, J. W. 2000. Normal haematology of cattle, sheep, and goats, *Tn Schalm's Veterinary Hematology.* Ed. Feldman B.F. Zinkl, J.G. Jain, N.C. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 1075-1084.
52. Kuckleburg, C J. Chase, C C. Nelson, E A. E. Marras, S A. Dammen, M A Christopher-Hennings J. 2003. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest* 15:72–76.
53. Kuźmak, J; Kozaczyńska, B; Bicka, L. 1999. Diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in newborn calves by use of PCR. *Bull Vet Inst Pulawy.* 43: 125-131.
54. Lassauzet, M-L; Johnson, W. O; Thurmond, M. C; Picanso, J. P. 1990. Factors associated with decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus. *Prev Vet Med.* 9: 45-58.
55. Lewin, H. A. 1989. Disease Resistance and Immune Response Genes in Cattle: Strategies for Their Detection and Evidence of Their Existence. *J Dairy Sci.* 72: 1334-1348.
56. Lewin, H. A. 1994. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. *Anim. Biotechnol.* 5:183-191.
57. Lucas, M. H; Roberts, D. H; Banks, J. 1993. Shedding of bovine leucosis virus in nasal secretions of infected animals. *Vet Rec.* 132: 276-278.
58. Manet, G; Guilbert, X; Roux, A; Vuillaume, A; Parodi, A. L. 1989. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabaids (*Tabanus* spp.). *Vet Immunol Immunopathol.* 22: 255-264.

59. Mascaró, L. 1975. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 1ª edición. Ed. Albatros, Buenos Aires, Argentina.
60. Medina, C. M. 1994. Medicina productiva en la crianza de becerras lecheras. 1ª edición. Ed. U.T.H.E.A. Noriega. México. 155-156.
61. Meischke, H. R. 1980. Isolation of bovine leukosis virus from cattle. Aust Vet J. 56: 301-306.
62. Miller L. D. 1980. Export testing for enzootic bovine leukosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 620-622.
63. Miller, L.D; Carpenter, S; Roth, J. A; Van der Maaten, M. J; Whetstone, C. A. 1989. Bovine immunodeficiency-like virus infection in cattle. Proceeding of the US Animal Health Association 93. E.U.A.
64. Mohanty, S. B; Dutta, S. K. 1981. Virología veterinaria. 1ª edición. Ed. Interamericana, México. 353-358.
65. Molnár, E. Molnár, I. Guedes, V. T. M. de Lima E. S. C. 2000. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. Vet Rec. 146: 705-706.
66. Monke, D. R; Rohde, R. F; Hueston, W. D; Milburn, R. J. 1992. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982 – 1989). J. Am. Vet. Med. Assoc. 200: 2001-2004.
67. Montaraz, C. J. A. 2002. Introducción a la Inmunología. 1ª reimpresión. UNAM. 61-64p.
68. Murphy, F. A. 1999. Veterinary Virology; Academic Press, E. U. A. 382 p.
69. Murakami K; Sentsui H; Inoshima Y; et Inumaru S: 2004 Increase in gamma delta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. Vet Immunol Immunopathol 101: 61-71.
70. Nagy, DW. 2003. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 222: 983-985.
71. Nuñez, L y Bouda J. 2007. Patología Clínica Veterinaria. 1ª ed. Ed. FMVZ, UNAM.
72. Okada, K; Yamaguchi, A; Ohshima, K; Numakunai, S; Itoh, H; Seimiya, Y; Koyama, H. 1989. Spontaneous regression of bovine cutaneous leukosis. Vet Pathol. 26: 136-143.

73. Onuma, M; Honma, T; Mikami, T; Ichijo, S; Konishi, T. 1979. Studies on the sporadic and enzootic forms of bovine leukosis. *J Comp Pathol.* 89: 159-167.
74. Perino, L. J; Wright, R. E; Hoppe K. L; Fulton, R. W. 1990. Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *Am J Vet Res.* 51: 1167-1169.
75. Pollari, F. L; Wangsuphachart, V. L; DiGiacomo, R. F; Everman, J. F. 1992. Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can J Vet Res.* 56: 289-295.
76. Pollari, F. L; Hopkins, S. G; DiGiacomo, R. F; Everman, J. F. 1993. Periparturient transmission of bovine leukosis virus in dairy cattle. *Vet Rec.* 132: 190-191.
77. Radostits, O. M; Gay, C. C; Blood, D. C; Hinchcliff, K. W. 2002. *Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* Vol. I, 9ª edición. Ed. McGraw-Hill. 1239-1254.
78. Rebhun, W C. 1999. *Enfermedades del Ganado vacuno lechero.* 1ª edición. Ed. Acribia, España. 626-635.
79. Reed, V. I. 1981. Enzootic bovine leukosis. *Can Vet J.* 22: 95-102.
80. Reinacher, M; Thurmond, M. C; Onuma, M; Portetelle, D; Picanso, J; Theilen, G. H. 1989. Immunohistological demonstration of virus and tumor associated antigens in tissues in experimental and spontaneous bovine leukemia virus (BLV) infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 22: 223-232.
81. Santa Cruz, A. M. B. Soto, C R. Vázquez, G. J. A. 2008. Principales causas de desecho en el CAIT. *Memorias del Curso Internacional de medicina interna en bovinos.* Hidalgo, México.
82. Sargeant, J. M; Kelton, D. F; Martin, S. W; Mann, E. D. 1997 a. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev Vet Med.* 31: 45-55.
83. Sargeant, J. M; Kelton, D. F; Martin, S. W; Mann, E. D. 1997 b. Evaluation of a bulk – milk ELISA test for the classification of herd – level bovine leukemia virus status. *Prev Vet Med.* 31: 223-230.
84. Simard, C; Richardson, S; Dixon, P; Komal, J. 2000 a. Agar gel immunodiffusion test for the detection of bovine leukemia virus antibodies: lack of trans-Atlantic standardization. *Can J Vet Res.* 64: 96-100.

85. Simard, C; Richardson, S; Dixon, P; Belanger, C; Maxwell, P. 2000 b. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res.* 64: 101-106.
86. Southwood, L. L; Parish, S. M; Tyler, J. W; Henry, C. J. 1996. Atypical lymphosarcoma in a cow. *Vet Rec.* 138: 260.
87. Thorp, K; Scott, P. R; Henshaw, J; Watt, J. N. 1994. Extensive anterior subcutaneous oedema associated with thymic lymphosarcoma in a 30-month-old heifer. *Vet Rec.* 135: 530-531.
88. Tizard, I. R. 2002. *Inmunología Veterinaria.* 6a ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 137-195.
89. Van Regenmortel V; Fauquet, C. M; Carstens, E; Estes, M; Lemon, S; Maniloff, J; Mayo, M; McGeoch, D, Pringle, C; Wickner, R. 2000. *Virus taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses.* Academic Press, E. U. A. 369-380.
90. Vernau, W; Valli, V. E. O; Dukes, W. T; Jacobs, R. M; Shoukri, M; Heeney, J. L. 1992. Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute working formulation for human Non – Hodgkin's Lymphomas. *Vet Pathol.* 29: 183-195.
91. Vernau, W; Jacobs, R. M; Valli, V. E. O; Heeney, J. L. 1997. The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. *Vet Pathol.* 34: 222-225.
92. VMRD 2009. BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIBODY TEST KIT Assay instructions for catalog numbers.
93. Voigt GL. 2000. *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians.* Ames (Ia): Iowa State University Press.
94. Ward, M. P. 1995. Serological studies of bovine leukaemia virus infection in Queensland beef cattle. *Aust Vet J.* 72: 71-72.
95. Wentink, G. H; van Oirschot, J. T; Pelgrim, W; Wensing, Th; Gruys, E. 1993. Experimental transmission of bovine leukosis virus by rectal palpation. *Vet Rec.* 132: 135-136.
96. Wilesmith, J W; Straub, O. C; Lorenz, R. J. 1980. Some observations on the epidemiology of bovine leukosis virus infection in a large dairy herd. *Res. Vet. Sci.* 28: 10-16.

97. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EMA, Lelenta M, Jeggo MH. 1993, Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 12: 435–450.
98. Xu, A. van Eijk, M J. T. Park, C Lewin H. A. 1993. Polymorphism in *BOLA-DRB3* Exon 2 Correlates with Resistance to Persistent Lymphocytosis Caused by Bovine Leukemia Virus. *J Immunol.* 153: 6977-6985.
99. Yeon Choi K, Don Monke, Stott JL. 2002. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *J Vet Diagn Invest.* 14:403–406.