



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LEUCOSIS
ENZOÓTICA BOVINA EN LÍQUIDO SEMINAL POR
MEDIO DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

FERNANDO GARCÍA GONZÁLEZ

ASESOR: Dr. HUMBERTO ALEJANDRO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

COASESOR: MVZ. RUPERTO JAVIER HERNÁNDEZ BALDERAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2011



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa 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 de anticuerpos contra leucosis enzoótica bovina en
líquido seminal por medio de la prueba de ELISA indirecta

Que presenta el pasante Fernando García González

Con número de cuenta: 094050017 para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 03 de noviembre de 2010

PRESIDENTE	<u>Dr. Fernando Osnaya Gallardo</u>	
VOCAL	<u>Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Miguel Ángel Pérez Ortega</u>	
1er SUPLENTE	<u>MVZ. Raúl García Tinajero</u>	
2º SUPLENTE	<u>MVZ. Gustavo Díaz Manríquez</u>	

AGRADECIMIENTOS.

En toda la experiencia universitaria y la conclusión del trabajo de tesis, ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo.

A mis padres José Luis y Juana, les agradezco que me dieran la vida, su guía y su confianza, su comprensión y su apoyo incondicional, por darme una carrera y por creer en mí. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación. Soy afortunado por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo. Esta tesis es suya.

Angeles, muchas gracias por todos los años de conocernos y en los cuales hemos compartido tantas cosas. Quiero darte las gracias por todo el apoyo que me has dado para continuar, al darme la fuerza necesaria para no desistir y por seguir compartiendo mi camino, gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí.

Carlos Alexander, ojala algún día puedas leer esto, te quiero agradecer por todos los momentos de felicidad que me has brindado hasta el momento, esperando que puedan ser muchos más y espero poder proporcionarte, todo lo necesario para tu desarrollo en todos los aspectos. Gracias por ser el motor que me da fuerzas para seguir adelante.

A mis hermanos Sonia y Fredy, gracias por todos los momentos que compartimos juntos, buenos o malos, pero todos nos dejan alguna experiencia, gracias por su apoyo y ojala sepan que cuentan con mi apoyo en cualquier momento.

Perla y Nancy, por ser amigas increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre recordare. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y alegría, les he pedido que compartan mis momentos felices y en los difíciles me han apoyado incondicionalmente.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno (sin estricto orden), Karina, Valeria, Laura, Victor Hugo, Sergio, Ramón, Alma, Guadalupe Azuzena, Ingrid, Ileana, Pilar, Angeles, Clara, Jehieli, Guadalupe Ugalde, Mónica Alejandra, Liliana, Alicia del Carmen y todas las personas

que han dejado huella en mi vida; en fin la lista es grande, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos donde hemos pasado momentos alegres y difíciles, me han dejado muchas experiencias, he aprendido de muchos de ustedes y he contado con su apoyo para emprender los retos que se nos presentan en la vida.

A mis asesores Javier Hernández y Alejandro Martínez, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su apoyo a pesar de mi inconsistencia debido a múltiples circunstancias y por alentarme a seguir adelante para concluir este ciclo de mi vida. También agradezco a Ernesto y Alejandro Buendía por su apoyo para realizar esta tesis.

A todos mis profesores no sólo de la carrera si no de toda la vida, mil gracias por compartir conmigo sus conocimientos, por su apoyo, paciencia y porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.

*En dos palabras puedo resumir cuanto he aprendido acerca de la vida:
Sigue adelante.
(Robert Frost)*

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. ENFERMEDADES DE LOS BOVINOS.....	5
2.2. LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA.....	6
2.2.1. SINONIMIAS.....	6
2.2.2. DISTRIBUCIÓN.....	7
2.2.3. ETIOLOGÍA.....	7
2.2.4. EPIZOOTIOLOGÍA.....	10
2.2.4.1. ESPECIES SUSCEPTIBLES.....	10
2.2.4.2. PERIODO DE INCUBACIÓN.....	11
2.2.4.3. TRANSMISIÓN.....	11
2.2.5. PATÓGENIA.....	14
2.2.6. SIGNOS CLÍNICOS.....	15
2.2.7. DIAGNÓSTICO.....	16
2.2.7.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.....	17
2.2.7.1.1. HEMATOLOGÍA.....	17
2.2.7.1.2. INMUNODIFUSIÓN AGAR GEL.....	18
2.2.7.1.3. ELISA.....	18
2.2.7.1.4. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).....	21
2.2.7.1.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	21
2.2.7.1.6. PCR.....	21
2.2.7.2. NECROPSIA.....	22
2.2.8. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	23
2.2.9. TRATAMIENTO.....	24
2.2.10. SALUD PÚBLICA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. OBJETIVO GENERAL:.....	26
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:.....	26
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	27
4.2. OBTENCIÓN DE LÍQUIDO SEMINAL.....	27
4.3. PROCEDIMIENTO DE ELISA INDIRECTA.....	27
4.4. PREPARACIÓN DE FROTIS.....	28
4.5. TINCIÓN WRIGHT.....	29
4.6. TINCIÓN PAPANICOLAUO.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. INTERPRETACIÓN VISUAL.....	30
5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DENSIDAD ÓPTICA.....	30
5.3. FROTIS.....	32
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
APÉNDICES.....	44

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Sistemas de producción.	3
Figura 2. Estructura del genoma del virus de Leucosis Enzoótica Bovina.	8
Figura 3. Estructura del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina	9
Figura 4. Ciclo de replicación del vLEB	10
Figura 5. Mecanismos de transmisión de Leucosis Enzoótica Bovina	13
Figura 6. Placa para prueba de ELISA	19
Figura 7. PCR	22
Figura 8. Resultado de la placa de ELISA.....	30
Figura 9. Porcentaje serológico de líquido seminal de toros negativos, sospechosos y positivos.	32
Figura 10. D.O. obtenida mediante Elisometro.	45
Figura 11. Cantidad de muestras por diagnóstico, según su procedencia.	47
Figura 12. Porcentaje de muestras con células epiteliales y su procedencia.	47
Figura 13. Célula epitelial en muestra 18 con tinción papanicolaou.....	48
Figura 14. Célula epitelial en muestra 9 con tinción papanicolaou.....	48

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Riesgo de transmisión de enfermedades del bovino en inseminación artificial	4
Cuadro 2. Enfermedades de los bovinos	5
Cuadro 3. Clasificación de los retrovirus	8
Cuadro 4. Hallazgos en animales afectados por Leucosis Enzoótica Bovina.	16
Cuadro 5. Interpretación de linfocitos por el método de Bendixen	17
Cuadro 6. Requerimiento para dilución, de semen bovino para inseminación.	34
Cuadro 7. Resultados de densidad óptica (DO) en Elisometro.	44
Cuadro 8. Información de procedencia y resultados obtenidos en las muestras	46

RESUMEN.

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad neoplásica infecciosa de prolongada incubación, curso crónico e inaparente y mortal de los bovinos adultos. Se manifiesta clínicamente con mayor frecuencia en las razas especializadas en la producción de leche y en vacas de más de 5 años de edad ⁽¹⁾, que afecta al bovino de todas las razas ⁽²⁾; es una enfermedad causada por el virus de la LEB (vLEB) ⁽³⁾.

El presente estudio se realizó en el laboratorio de virología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde se procesaron muestras de semen (pajillas) de diferentes empresas distribuidoras de semen, conformando el estudio con 45 muestras. Las muestras obtenidas se procesaron para obtener el líquido seminal, y se analizaron por medio de la prueba de ELISA indirecta; corriendo las pruebas por duplicado para cada muestra, utilizando el kit comercial: Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit, ELISA, desarrollado por laboratorios VMRD, para detectar anticuerpos contra el virus de Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB), el proceso de la prueba se realizó según las instrucciones del fabricante.

Se realizó una centrifugación de las muestras para obtener el líquido seminal, para posteriormente realizar una dilución 1:25. En el análisis de la prueba de ELISA se observó que de las 45 muestras analizadas 22 resultaron negativas (49%), 21 sospechosas (47%) y 2 positivas (4%).

También se les realizó la tinción de Papanicolaou; que consiste en una impronta con tinción nuclear de hematoxilina y se contratiñe con una mezcla de naranja G y eosina, con la finalidad de encontrar células de defensa. A la observación por medio del microscopio óptico solo se encontraron células epiteliales en los frotis de las muestras procesadas, resultando negativas a la tinción

1. INTRODUCCIÓN.

La ganadería bovina productora de leche es considerada como prioritaria dentro de los programas de fomento con el objetivo de incentivar su producción debido a que la leche de bovino es uno de los alimentos más completos, considerándose a nivel mundial como un alimento ideal y necesario para la alimentación humana. A pesar de que existen dichos programas la ganadería bovina no ha logrado desarrollarse lo suficiente para poder satisfacer la demanda nacional, por lo que se tiene que recurrir a la importación sobre todo de leche en polvo ⁽⁴⁾.

Existen factores importantes que influyen en la cantidad de leche que se importa a nuestro país los cuales incluyen: problemas de competencia desleal, situaciones relacionadas con la cantidad o proporción de importaciones frente a la producción interna, esta última afectada por diversos problemas, como la falta de apoyos en el sector agropecuario y múltiples problemas sanitarios ⁽⁵⁾.

La producción nacional de leche no satisface la demanda interna, por lo que continúa presentando un alto nivel de dependencia de la importación de leche en polvo, este hecho convierte a México en el principal país importador del mundo, en 2001 se importaron 149 846 toneladas de leche en polvo ^(5,6). México, a diferencia de otros países, enfrenta problemas derivados del estancamiento, la deuda externa y políticas de ajuste estructural basadas en la apertura del mercado interno, las privatizaciones y la desregulación de las actividades económicas ⁽⁷⁾.

La producción de leche se desarrolla en condiciones muy heterogéneas, tanto desde el punto de vista tecnológico y socioeconómico, como por la localización de las explotaciones contando con cuatro sistemas de producción (ver Figura 1): especializado, semiespecializado, familiar y de doble propósito ⁽⁸⁾.

Los estándares de las industrias que buscan cumplir las expectativas de calidad de los clientes, llevó a que una parte del sector productivo primario a enfrentar: el reto de superarse para

mantenerse como proveedor, problemas de comercialización y rentabilidad, situación que los orilló a la reducción de sus hatos e inclusive a su retiro de la producción por no reunir las condiciones de calidad exigidos por la industria y por sus elevados costos de producción ⁽⁵⁾. Si bien la evolución de la producción de leche ha presentado tendencias al crecimiento, se ha enfrentado al fenómeno de una demanda mayor que la oferta ⁽⁹⁾.

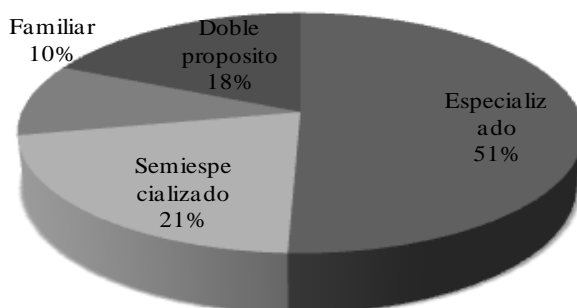


Figura 1. Sistemas de producción. ⁽⁸⁾.

En México, la importancia del sector lechero y la industria de lácteos está determinada por alrededor de 70,000 empresas en la actividad primaria, y más de 11 000 en la actividad industrial, las cuales generan aproximadamente 400 000 empleos permanentes. El valor de la producción primaria de leche representa casi la cuarta parte del valor total de la producción ganadera y la industria de lácteos es la tercera industria alimentaria más importante en el país, después de la del maíz y de la carne ⁽¹⁰⁾.

La situación actual de la ganadería exige a los productores máxima eficiencia para garantizar el retorno económico. En este contexto, la optimización de la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar las ganancias adoptando la inseminación artificial (IA) como un medio para lograr esa eficiencia reproductiva ⁽¹¹⁾. La IA es la técnica que tiene por objetivo acelerar el mejoramiento genético, así como el control de enfermedades venéreas. Tiene como ventaja sobre la monta natural que existe un mayor aprovechamiento del macho, se ocupan toros mejoradores, mayor vida reproductiva; pero también tiene desventajas: se necesita personal especializado y tecnología adecuada ⁽¹²⁾.

Sin embargo la técnica no está exenta de riesgos, pues puede convertirse en vía de diseminación o en fuente de propagación de enfermedades infecciosas a nivel nacional e internacional.

El semen criopreservado es un excelente mecanismo de control sanitario si se tienen en cuenta las siguientes consideraciones:

- Es necesario determinar el estado sanitario de los sementales utilizados como donadores.
- El semen puede vehicular bacterias, virus, hongos patógenos u oportunistas.
- La mayoría de estos microorganismos sobreviven al proceso de congelación y a los antibióticos que se añaden al diluyente.
- Es posible controlar el eyaculado previo y a posterior de la congelación, para determinar la presencia de gérmenes citados anteriormente.
- De un eyaculado se obtienen generalmente muchas dosis de semen, por lo que el riesgo de diseminación de enfermedades en diferentes hatos es elevado.
- En IA el semen es depositado en útero, por lo tanto, no es expuesto a los efectos bactericidas de las secreciones del cuello uterino y de la vagina durante el estro ⁽¹³⁾.

El confinamiento de animales, junto con la frecuente rotación de los mismos, trae consigo un aumento de posibles infecciones. Al inicio de una infección un patógeno puede transmitirse a través del semen, sin que esta se reconozca clínicamente (ver Cuadro 1). Si este semen se distribuye, se pueden infectar gran parte de la población bovina; hasta 300 vacas se podrían inseminar con un solo eyaculado ⁽¹⁴⁾.

Categoría	Enfermedad	Presencia del agente	Lista de enfermedades OIE
1	Enfermedades de bajo riesgo de transmisión		
	Lengua azul	+	A
	Leucemia bovina	+	B
	Fiebre efímera bovina	NR	-
	Virus Akabane	+	-
	Leptospirosis	+	B

Cuadro 1. Riesgo de transmisión de enfermedades del bovino en inseminación artificial ⁽¹³⁾.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ENFERMEDADES DE LOS BOVINOS.

Los problemas sanitarios, provocan enfermedades infecciosas que causan baja en la producción (ver Cuadro 2) aunque sean imperceptibles debido a que en algunos casos no se manifiestan clínicamente ⁽⁵⁾.

Enfermedades de los bovinos
Anaplasmosis bovina
Babesiosis bovina
Campilobacteriosis genital bovina
Dermatosis nodular contagiosa
Diarrea viral bovina
Encefalopatía espongiiforme bovina
Leucosis Enzoótica Bovina
Perineumonía contagiosa bovina
Rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa
Septicemia hemorrágica
Teileriosis
Tricomonosis
Tripanosomosis (transmitida por tsetse)
Tuberculosis bovina

Cuadro 2. Enfermedades de los bovinos ⁽¹⁵⁾.

En la producción animal existen ciertas enfermedades que, a pesar de estar presentes, pasan casi inadvertidas para el hombre aunque no para sus bolsillos. Esto se debe a que no provocan signos clínicos muy manifiestos o a que éstos sólo aparecen en unos pocos animales del total del hato afectado, a pesar del “bajo perfil” de dichas enfermedades, éstas repercuten negativamente sobre la productividad y la eficiencia reproductiva del hato ocasionando pérdidas económicas ⁽¹⁶⁾.

Como ejemplo de lo anterior tenemos a la Leucosis Enzoótica Bovina, es una enfermedad viral del ganado bovino, caracterizada por producir una linfocitosis persistente o un linfosarcoma, o incluso ambas ⁽¹⁷⁾.

2.2. LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA.

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) Es una enfermedad neoplásica infecciosa de prolongada incubación, curso crónico e inaparente y mortal de los bovinos adultos, que se manifiesta clínicamente con mayor frecuencia en las razas especializadas en la producción de leche y en vacas de más de 5 años de edad ⁽¹⁸⁾, caracterizada por, proliferación y agregación de linfocitos neoplásicos, tumores linforreticulares en los nódulos linfáticos y casi todos los órganos se ven afectados, presentando síntomas que reflejan el sitio del tumor y casi siempre mueren repentinamente o semanas después del inicio de los signos clínicos ⁽¹⁹⁾; que induce a la producción de inmunidad humoral y celular. A menudo este contagio solamente causa una reacción serológica de producción de anticuerpos específicos contra vLEB que se inicia 6-8 semanas más tarde y permanece clínicamente inaparente de por vida ⁽²⁰⁾.

En la Leucosis Enzoótica Bovina se distinguen tres fases típicas en el curso de la enfermedad:

- Fase inaparente: se inicia con la presencia de anticuerpos humorales contra los antígenos estructurales del virus de la LEB y se caracteriza por la existencia a la vez de un persistente contenido de provirus en los linfocitos.
- linfocitosis persistente: en un 30% aproximadamente de los bóvinos infectados se producen en la edad comprendida entre los 3 y 6 años. En estas dos primeras fases los animales aparentan estar sanos ⁽²¹⁾.
- Enfermedad tumoral, se presenta en un 30% de estos animales y en una fracción de los bóvinos sin linfocitosis ⁽²²⁾.

El virus de la LEB (vLEB) fue aislado por primera vez en a partir de linfocitos infectados de un bovino en 1969 en Alemania ^{(23),(24)}.

2.2.1. SINONIMIAS.

Otros términos que suelen usarse como sinónimos son: leucosis (refiriéndose al aumento de leucocitos sanguíneos) ⁽²⁵⁾, linfosarcoma, linfoma maligno del ganado, hemoblastosis,

leucemia bovina ⁽¹⁶⁾, linfoblastoma, linfadenosis, linfomatosis bovina, linfoma maligno, linfocitoma, leucosis viral bovina, complejo viral leucosis linfosarcoma ⁽²⁶⁾.

2.2.2. DISTRIBUCIÓN.

La LEB se describió por primera vez en Alemania en 1871. Tras la segunda guerra mundial se hicieron frecuentes las comunicaciones relativas a esta enfermedad, que afectaba a casi todos los países en los que se cría ganado bovino ⁽²⁷⁾. En la actualidad, la infección presenta una distribución mundial y es frecuente en Canadá, Estados Unidos y muchos países de Europa y América del sur ⁽²⁸⁾. 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 setenta que se desarrolló una prueba capaz de identificarlo ^{(27, (29)}.

En México, los conocimientos relativos a la LEB datan de 1967 ⁽³⁰⁾. Tiempo después, se diagnosticaron clínicamente nueve casos en un total de 22, 669 animales sacrificados en el rastro de Ferrería ⁽³¹⁾.

2.2.3. ETIOLOGÍA.

El agente causal de la LEB es un virus linfotrópico de células B denominado virus de Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB), que pertenece a la familia retroviridae (ver Cuadro 3), provistos de transcriptasa reversa en la región pol del genoma del virus ⁽²⁰⁾. La enzima transcriptasa inversa realiza una cadena de DNA complementaria ⁽³²⁾. Con esto es posible que el DNA complementario pueda estructurarse en el DNA celular en forma de provirus ⁽³³⁾. Cabe señalar la capacidad que poseen los retrovirus en el genoma celular permaneciendo en estado latente hasta que un factor ambiental ponga en peligro la célula y lo despierte ⁽³⁴⁾. Este mecanismo se traduce en la infección de por vida hacia el hospedador, permitiendo que la proteína vírica se replique cuando se repliquen las células del hospedador, sin embargo inhiben la liberación de viriones hacia la circulación por lo cual no hay viremia ⁽³⁵⁾.

Género	Especie de interés clínico
Alfarretrovirus	Virus del sarcoma y leucemia de aves (AVL)
Betarretrovirus	Virus de tumor mamario de ratón (MMTV)
Gammarretrovirus	Virus relacionado con leucemia de ratón (Mo-MLV)
<u>Deltarretrovirus</u>	<u>Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (v LEB)</u>
Epsilonretrovirus	Wally dermal sarcoma virus
Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
Espumavirus	Espumavirus humano (HFV)

Cuadro 3. Clasificación de los retrovirus ⁽³⁶⁾.

Las partículas virales son pleomorfas y tienen un diámetro de 100 a 120 μm . En la superficie exhiben estructuras botoniformes. Es lábil frente a las influencias exteriores. Las radiaciones ultravioletas, la congelación y descongelación repetidas así mismo el calentamiento a 56° C durante 30 minutos son factores que inactivan al virus. Su genoma está integrado por tres genes principales, *gag*, *pol* y *env* (ver Figura 2) que codifican las proteínas internas, enzimas y las proteínas de envoltura ⁽³⁷⁾.

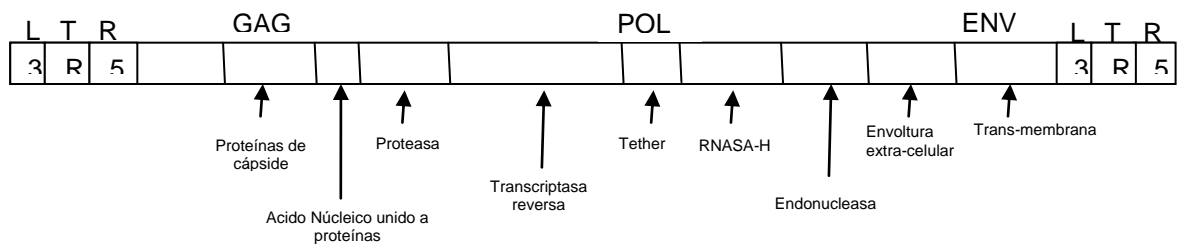


Figura 2. Estructura del genoma del virus de Leucosis Enzoótica Bovina. ⁽³⁸⁾

Desde el punto de vista inmunológico según su genoma característico las proteínas más importantes del virus son: la mayor de las nucleoproteínas, la p24 (en región Pr65 gag) con peso molecular de 24 000 Daltons y las proteínas de membrana gp30 y gp51 (ver Figura 3) con peso molecular de 51 000 Daltons ⁽³⁹⁾. Según se plantea la más relevante desde el punto de vista del diagnóstico es la gp51, por estar relacionada además con el reconocimiento de receptores en las células blanco ⁽⁴⁰⁾.

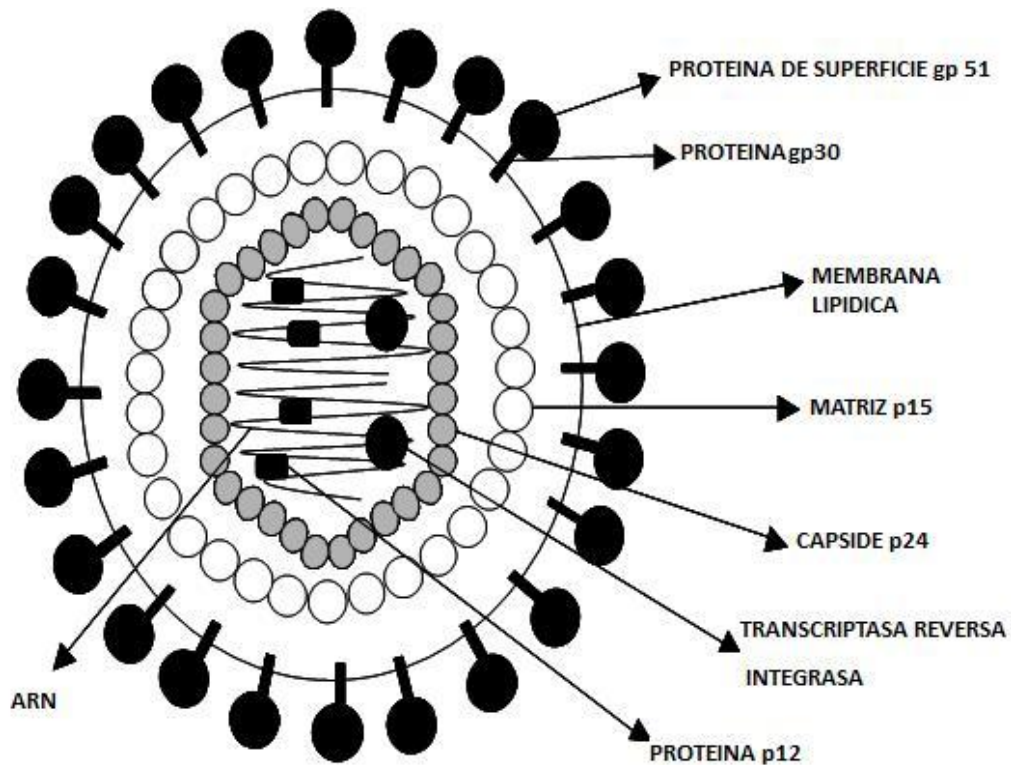


Figura 3. Estructura del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina ⁽⁴¹⁾.

Modelo para la replicación del virus de Leucosis Enzoótica Bovina:

1. El DNA se transcribe del RNA viral y entonces se replica para formar un DNA de doble cadena, la cual se transporta al núcleo de la célula huésped ⁽⁴²⁾.
2. Una o dos moléculas de DNA se integran en el genoma huésped.
3. El DNA viral integrado se transcribe por las RNA polimerasas de la célula huésped ⁽³³⁾.
4. Las proteínas virales incluyen: la transcriptasa inversa y las proteínas estructurales, migran a las áreas específicas de la membrana de la célula huésped, en donde las glucoproteínas virales se han incorporado en la membrana celular.
5. El ensamble del RNA, las enzimas virales y las proteínas estructurales, ocurren en la membrana celular y el virus se libera por gemación de la membrana (ver Figura 4) ⁽³⁷⁾.

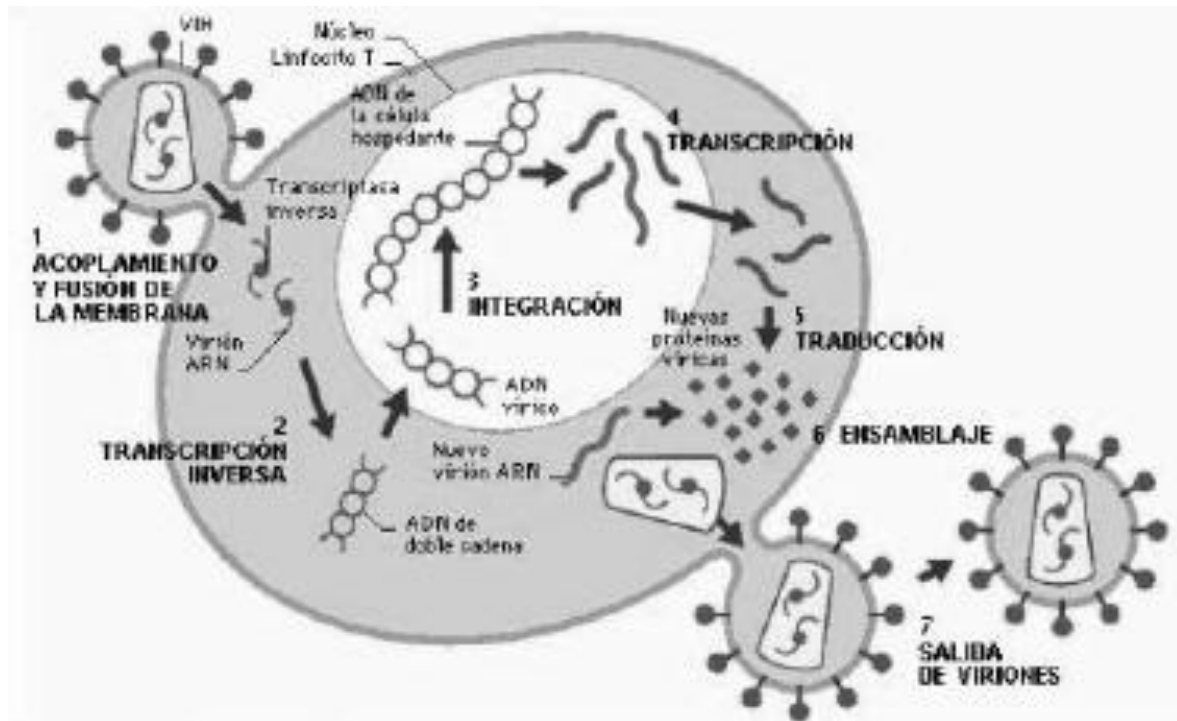


Figura 4. Ciclo de replicación del vLEB ⁽⁴³⁾.

2.2.4. EPIZOOTIOLOGÍA.

2.2.4.1. ESPECIES SUSCEPTIBLES.

El ganado bovino (*Bos Taurus* y *Bos Indicus*), es considerado como el hospedador primario y principal de la LEB ⁽⁴⁴⁾. Todas las razas de bovinos son susceptibles, pero la raza Holstein es la más frecuentemente afectada. También se ha observado que es más frecuente en los hatos numerosos y en el ganado lechero ⁽²⁾. Afecta generalmente a bovinos adultos, aunque la infección puede producirse en animales jóvenes, estando las hembras más expuestas a padecer las formas más severas de la enfermedad ⁽⁴⁵⁾.

La vaca es la única especie que se infecta de forma natural, si bien es posible lograr la infección experimental de ovejas y cabras. El vLEB *in vitro* tiene poder infectante en células de ovino, caprino, cánido, murciélago, simio y humano ⁽⁴⁶⁾. La infección no se propaga de las vacas a las ovejas que conviven juntas, ni de las ovejas infectadas experimentalmente a las

demás. Sin embargo, existe una forma de transmisión horizontal de un linfosarcoma natural de la oveja causado por un virus antigénicamente similar al vLEB ⁽⁴⁷⁾.

2.2.4.2. PERIODO DE INCUBACIÓN.

El periodo de incubación habitual es de 4-5 años y la mayor parte de los casos ocurren 4-5 años después de la introducción del primer caso. Esta forma es rara en animales menores de 2 años y su máxima frecuencia ocurre en el grupo de edad de 4 a 8 años. Muchas vacas permanecen en estado preclínico durante años, a menudo durante toda su vida productiva, sin disminución aparente de su rendimiento ⁽⁴⁸⁾.

En el 5 a 10% de los casos clínicos, la evolución es sobreaguda y los animales afectados mueren repentinamente sin mostrar signos previos de la enfermedad ⁽⁴⁹⁾.

2.2.4.3. TRANSMISIÓN.

Según algunos autores existen causas predisponentes tales como factores ambientales y en ciertas estirpes de ganado se ha observado cierta susceptibilidad hereditaria ⁽²⁾.

Para la transmisión del virus se requiere la convivencia permanente entre bovinos. La transmisión se efectúa por la transferencia de células infectadas y por medio de sangre infectada en vehículos y vectores ⁽⁵⁰⁾ puede ser realizada principalmente por insectos hematófagos, el uso de agujas hipodérmicas, y en menor medida por contacto (ver Figura 5) ⁽⁴⁵⁾.

El virus es capaz de atravesar la barrera placentaria en el bovino, lo que ocurre aproximadamente 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 vLEB ⁽⁵¹⁾.

Los contagios postnatales se producen de forma variable. Debido a que la leche y el calostro contienen linfocitos el vLEB también puede transmitirse por vía oral; pero en la práctica a pesar del contenido frecuentemente alto de vLEB en el calostro, estos contagios sólo en raras ocasiones provocan la enfermedad, debido al simultáneo contenido de anticuerpos ⁽⁵²⁾; esto ocurre solamente en menos del 5 % de todos los casos de LEB ⁽⁵³⁾. Se ha demostrado que linfocitos infectados con vLEB son capaces de sobrevivir su paso por los estómagos de los rumiantes y atravesar la pared intestinal e infectar los órganos del neonato ⁽⁵⁴⁾.

Una significativa fracción de animales sufren infecciones por contacto, siguiendo la vía de contagio iatrógena. A este respecto se parte del hecho de que estas infecciones sólo se desarrollan cuando existen uno o varios animales infectados en la población, en el rebaño o en el establo, esto es, si existen portadores de virus infectados ⁽⁵⁵⁾.

El subsiguiente grado de difusión depende de las distintas formas de manejo, características tecnológicas y medidas zootécnicas y de medicina veterinaria puestas en práctica. Estas últimas son de múltiples efectos, ya que las concentraciones de animales, la explotación individualizada o en grupos, la amplitud y naturaleza de las diversas medidas (vacunaciones profilácticas, análisis diagnósticos, descornado, castraciones, aplicación de marcas en las orejas, tatuajes, tactos rectales, prácticas quirúrgicas y terapéuticas) ⁽⁵⁶⁾ y los principios organizativos (manejo de los animales atados, establos con parques, neoformación de grupos de animales, luchas por el liderato del grupo) actúan de manera variable ⁽⁵⁷⁾.

Los contagios a través de saliva, orina y secreción ocular son raros ⁽⁵⁸⁾. En cuanto al semen, sí se ha identificado el virus en muestras recolectadas por masaje de la uretra y de las glándulas accesorias del donante a través del recto, procedimiento con el cual el semen se contamina con sangre. Aunque no se ha demostrado la transmisión por IA, es posible que los linfocitos B infectados contenidos en el semen puedan actuar como un foco de transmisión del virus. Por tanto, los toros de los centros de IA deben ser serológicamente negativos para el vLEB ⁽⁵⁹⁾.

Debido a que el virus puede estar presente en la sangre, la leche, la orina, el semen y los exudados vaginales las temporadas de partos son un factor predisponente para que se transmita la enfermedad ⁽⁶⁰⁾.

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 ⁽⁶¹⁾.

Los contagios por insectos hematófagos se han demostrado posibles en el terreno experimental, si bien en condiciones naturales resultan de importancia secundaria ⁽⁶²⁾.

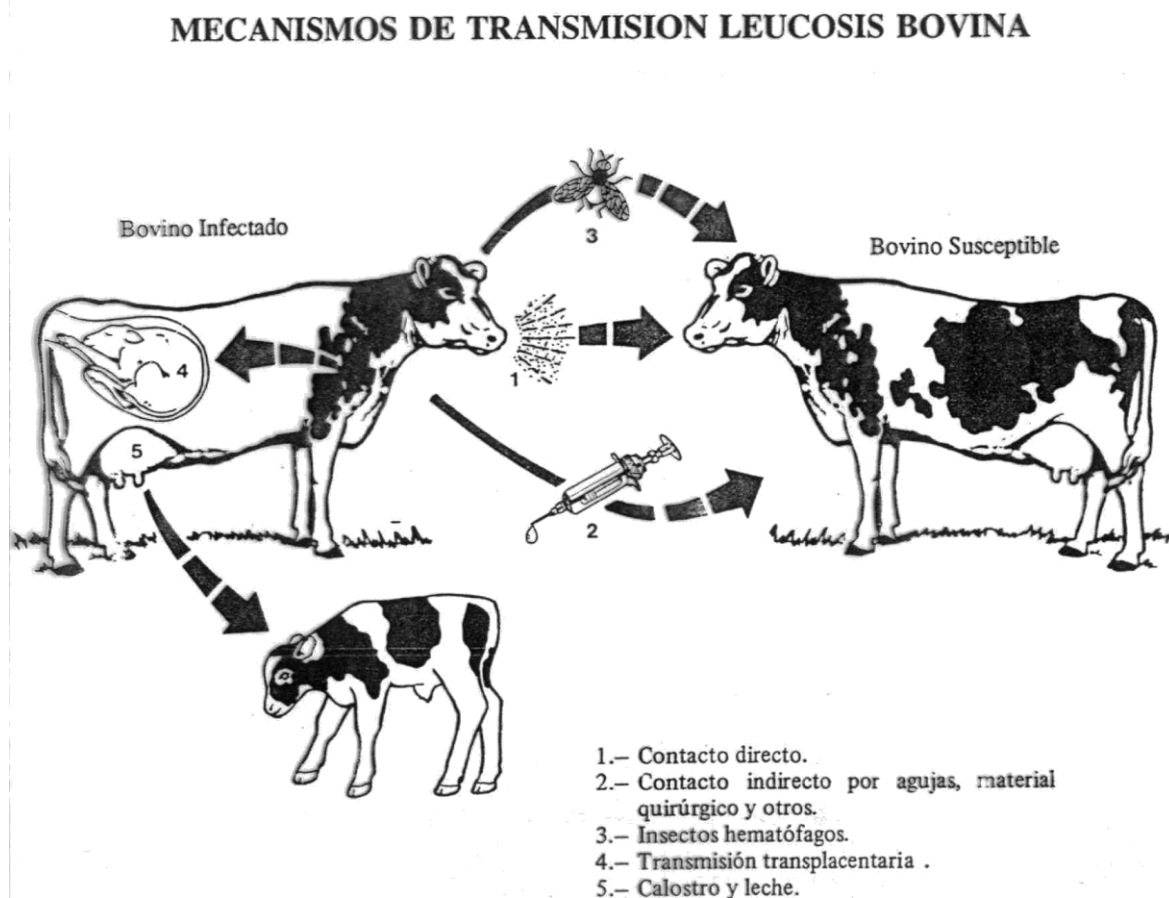


Figura 5. Mecanismos de transmisión de Leucosis Enzootica Bovina ⁽⁶³⁾.

2.2.5. PATÓGENIA.

La exposición de una animal a vLEB no significa necesariamente que el animal se infecte, e incluso, en este último caso, que desarrolle sintomatología clínica ⁽⁶⁴⁾. Existen cuatro resultados finales posibles tras la exposición de una vaca al vLEB:

- ▲ Que el animal no se infecte, probablemente gracias a su resistencia genética.
- ▲ Que permanezca una infección permanente con desarrollo de niveles detectables de anticuerpos (animales portadores latentes de la infección).
- ▲ Que aparezca una infección permanente, el animal se hace seropositivo y, además, desarrolla una linfocitosis persistente, es decir, un proceso linfoproliferativo benigno. No es una fase preclínica del linfosarcoma.
- ▲ Que los animales infectados seropositivos, habiendo pasado o no por la fase de linfocitosis persistente, desarrollen tumores de tipo linfosarcoma ⁽⁵⁹⁾.

El virus provoca una infección persistente en una sub población de linfocitos B por integración del ADN proviral en el ADN celular del huésped ⁽²⁷⁾. Infecta fundamentalmente a los linfocitos B, pero otras células, tales como linfocitos T o células de la estirpe monocito/macrófago también pueden ser infectadas. Además, hay ligeras evidencias sobre la infección de células endoteliales y de granulocitos ⁽⁶⁵⁾. También se ha comprobado que el vLEB es capaz de infectar y expresar antígenos víricos (p24) en el epitelio de la glándula mamaria en vacas infectadas ⁽⁶⁶⁾. En la linfocitosis persistente, la proliferación de las células es policlonal, ya que en un mismo animal el virus se integra en diferentes localizaciones del genoma del hospedador. Sin embargo, los linfosarcomas surgen por una expansión mono u ologoclonal de los linfocitos B. Su acción tumorigénica se sospecha que depende de la proteína reguladora tax, que puede activar protooncogenes celulares ⁽⁶⁶⁾.

En cuanto al receptor de vLEB, éste ha sido clonado y caracterizado por Ban ⁽⁶⁷⁾; al que han denominado BLVRcp1. No se ha descrito una función fisiológica para el mismo, pero los autores apuntan que su amplia distribución en las células de mamíferos y su secuencia

fuertemente conservada, sugiere que la molécula que reacciona con gp51 de vLEB juega un papel primordial en la fisiología de muchos tipos celulares ⁽⁶⁷⁾.

Los monocitos/macrófagos infectados pueden inducir una respuesta inmune frente a p24 y gp51 tras su inoculación en especies susceptibles, lo que indica que expresan activamente los antígenos víricos in vivo ⁽⁶⁸⁾.

Las vacas infectadas presentan una reducción en las células productoras de IgM en el bazo y los nódulos linfáticos por lo tanto valores más bajos de IgM en sangre lo cual podría asociarse a cierto estado de inmunosupresión. Estos niveles bajos de inmunoglobulinas podrían deberse a alteraciones en las relaciones entre linfocitos T y B, ya que los primeros participan en la diferenciación de los linfocitos B y en la producción de inmunoglobulinas ⁽⁶⁹⁾.

2.2.6. SIGNOS CLÍNICOS.

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de múltiples casos de linfosarcomas multicéntricos en los animales adultos, en los que los tumores se desarrollan con rapidez en diversas localizaciones; y dependiendo de cuál sea el órgano más afectado, se observan diferentes síndromes clínicos (ver Cuadro 4); que requieren de una diferenciación cuidadosa, debido a que se puede disfrazar con un gran número de enfermedades inflamatorias o debilitantes de las vacas; casi todos los órganos pueden ser blanco de lesiones pero los más afectados y detectables clínicamente son el abomaso, útero, corazón y nódulos linfáticos viscerales, bazo e hígado ⁽⁴⁶⁾.

Cuando está involucrado el aparato digestivo se puede observar apetito pervertido, diarrea persistente, melenas secundarias ⁽⁷¹⁾ y en ocasiones con sangre procedente de úlceras del abomaso ⁽⁴⁶⁾, meteorismo moderado crónico, alcalosis hipoclorémica ⁽⁵³⁾. Las lesiones provocan insuficiencia congestiva cardiaca derecha ⁽⁷¹⁾, hidropericardio, hidrotórax, congestión de las venas yugulares y edema del pecho ⁽⁴⁸⁾.

Afección	Frecuencia %
Agrandamiento de más de un nódulo linfático accesible.	58
Indigestión (úlceras y tumoraciones abomasales)	62
Tumores en útero, vagina y región perivaginal.	33
Tumoraciones en corazón	50
Exoftalmos	9
Parálisis de los miembros posteriores.	16
Tumores en bazo	9
Timpanismo con reflujo abomasal	19
Leucemia.	64
Anémia por pérdida de sangre.	57

Cuadro 4. Hallazgos en animales afectados por Leucosis Enzoótica Bovina ⁽⁷²⁾.

También el sistema nervioso se puede ver afectado que suele manifestarse parálisis posterior durante semanas ⁽⁷³⁾, dificultad para levantarse, hiperestesia. La leucosis del pulmón es extremadamente rara, menos del 5 % de los casos tumorales; y en general no tiene tanta gravedad como para comprometer la respiración ⁽⁷⁴⁾. En la piel se produce un engrosamiento intradérmico debido a la acumulación de linfocitos neoplásicos. ⁽²⁷⁾. La leucosis del bazo (menos del 25 %) puede alcanzar dimensiones extremas, produciendo el desgarramiento de la cápsula del bazo, terminando con hemorragia cavitaria. Con menor frecuencia se observan lesiones en el tejido periorbitario, con profusión de los globos oculares, edema conjuntival, xeroftalmía, panoftalmía ⁽⁴⁸⁾,

La participación del útero se manifiesta a veces por agrandamiento nodular múltiple al examen rectal. En bovinos no gestantes pueden causar esterilidad, metritis o ulceración de la mucosa vaginal. Los toros con tumores leucóticos en testículos, epidídimos, canales deferentes o vesículas seminales tienen baja calidad seminal o son infértiles ⁽⁵³⁾.

2.2.7. DIAGNÓSTICO.

La identificación precisa de los animales infectados con vLEB resulta la base del éxito en un programa de control y erradicación. En ciertos casos esto es grave, por ejemplo cuando no se detectan anticuerpos en animales de exportación ⁽⁷⁵⁾. El diagnóstico de los animales con

linfosarcoma es relativamente fácil para los veterinarios clínicos, pero el diagnóstico de los animales con Linfocitosis Persistente y de infectados pero asintomáticos, se requiere de pruebas de laboratorio. Existen varias pruebas de laboratorio que utilizan equipos especiales y que son altamente sensibles y específicas; sueroneutralización, o radioinmuno análisis las pruebas utilizadas son tanto de detección de anticuerpos (IDGA y ELISA) o detección del virus PCR. Sin embargo la prueba tamiz o de campo más recomendable es la técnica de inmunodifusión en gel de agar, ya que es sencilla y con buen porcentaje de confiabilidad para la detección de la Leucosis Enzoótica Bovina ⁽⁷⁶⁾. Existen varias técnicas de diagnóstico y es importante seleccionar la más adecuada ⁽²⁷⁾.

2.2.7.1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

2.2.7.1.1. HEMATOLOGÍA.

Consiste principalmente en la evaluación cuantitativa y cualitativa de los linfocitos y las células sanguíneas ⁽⁷⁷⁾. Detectar la enfermedad clínica causada por vLEB en animales viejos puede ser difícil. El diagnóstico presuntivo se realiza mediante biometría hemática cuando el estadio de la enfermedad es avanzado las pruebas de sangre revelan un aumento importante en el recuento de glóbulos blancos ⁽⁷⁸⁾.

El porcentaje de linfocitos B en animales normales varía de 18 a 28 %. En vacas infectadas con vLEB y linfocitosis persistente ese porcentaje se ve aumentado hasta 70 % ⁽⁷⁹⁾. La interpretación del conteo de linfocitos se lleva a cabo por medio de la utilización del cuadro de Bendixen (ver Cuadro 5) ⁽⁸⁰⁾.

Edad en años	Normal Linfocitos / μ l de sangre.	Sospechoso	Positivo
0-1	< 10.000	10.000-12.000	> 12.000
1-2	< 9.000	9.000-11.000	>11.000
2-3	< 7.500	7.500-9.500	>9.500
3-4	<6.500	6.500-8.500	>8.500
4	<5.000	5.000-7.000	>7.000

Cuadro 5. Interpretación de linfocitos por el método de Bendixen ⁽⁸⁰⁾.

2.2.7.1.2. INMUNODIFUSIÓN AGAR GEL.

Agar inmunodifusión de gel (AGID) es una prueba diagnóstica que determina si un animal está infectado con vLEB. Separa anticuerpos dentro del suero de un animal sobre la base de la difusión por gel de agar. Si el anticuerpo del interés está presente dentro del suero se combina con antígeno en el gel y causa una reacción que puede ser visualizada. Esta prueba puede detectar anticuerpos específicos contra antígenos virales p15, p24, gp51; siendo más sensible a este último ⁽⁷⁹⁾.

La prueba tiene limitaciones:

- ❖ Detecta la presencia de anticuerpos como mínimo seis semanas después de la infección.
- ❖ No debe ser utilizada para detección de anticuerpos un mes antes del parto.
- ❖ Utilizarla después de los seis meses de edad (antes revela anticuerpos maternos).
- ❖ Se necesitan 48 horas para obtener el resultado ⁽⁶³⁾.

2.2.7.1.3. ELISA.

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) es un método inmunoenzimático que puede ser usada a partir de secreciones ⁽⁷⁹⁾. Se basa en la detección antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac), inmovilizado sobre una fase sólida (ver Figura 6) y mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, la prueba recurre al empleo de inmunógenos ó anticuerpos marcados con una enzima cuyo producto colorido, puede ser medido espectrofotométricamente ⁽⁸¹⁾. Puede detectar anticuerpos en hatos con una incidencia menor al 1 %. Cuando se evalúa leche, ELISA puede ser usada en muestras de animales individuales o muestras de grupo de un tanque. La prueba en grandes cantidades de muestra con ELISA es un método económicamente útil porque es muy sensible. ELISA es una manera rápida para monitorear hatos negativos al vLEB ⁽⁸²⁾.

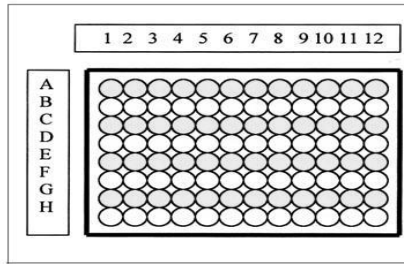


Figura 6. Placa para prueba de ELISA ⁽⁸³⁾.

ELISA Indirecta.

Este tipo de ELISA se utiliza para detectar anticuerpos antiviral pegando estos o virus, respectivamente, en pocillos de plástico (poliestireno o polivinilo principalmente). Se utilizan cromógenos solubles para detectar las enzimas.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio.
- Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte.
- Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos.
- Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado ⁽⁸¹⁾.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie.

Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 μ l tienen la ventaja de poder procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa. Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetibilidad de resultados ⁽⁸¹⁾.

La enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro a un precio razonable y tener un sustrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación. Las enzimas más utilizadas son fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano y β -galactosidasa; a continuación se muestra una tabla con las ventajas y desventajas de cada una así como los sustratos que se emplean con cada una de ellas ⁽⁸¹⁾.

La búsqueda de la concentración óptima de uso depende ligeramente del tipo de ELISA empleado; para cualquier ELISA que utilice anti-anticuerpos conjugados, se suele probar diferentes diluciones del conjugado (desde 1:100 hasta 1:2000) frente a sucesivas diluciones de antisuero en placas tapizadas con antígeno a concentración idónea. Aquella dilución del conjugado que produzca menor reacción inespecífica (menor color de fondo o “background”) con muestras negativas e implique una clara distinción de las muestras positivas, será la óptima. La elección de una concentración de conjugado óptima va completamente ligada a planteamientos económicos en los que se ha de procurar el mayor ahorro del conjugado aún a costa de aumentar el tapizado ⁽⁸³⁾.

La elección del sustrato es de gran importancia para la estandarización del método ELISA y hay que tener varios factores en cuenta, como son sensibilidad, especificidad, repetibilidad, facilidad de lectura y complejidad de preparación, así como estabilidad después de la parada de la reacción ⁽⁸³⁾.

Se ha demostrado que en infección experimental en terneros la seroconversión se detecta de 4 a 5 semanas. 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 ⁽²⁹⁾.

ELISA ha sido utilizada en programas de erradicación satisfactorios en varios países de Europa ⁽⁷⁹⁾.

2.2.7.1.4. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

Su exactitud lo hace idóneo para el estudio individual de los animales. Existen varias versiones, de las que la preferida es la que utiliza el antígeno gp51 o p25 del virión ⁽³⁾. Es una de las pruebas más sensibles y útiles para la detección de los anticuerpos anti-vLEB en las vacas expuestas hasta 2 semanas antes, en las muestras de leche, y en las de suero de las parturientas ⁽²⁷⁾. Es superior a las pruebas de inmunodifusión, sobre todo cuando las muestras séricas contienen bajos niveles de anticuerpos; en estos casos la prueba de inmunodifusión en agar gel falla en detectar entre un 28 y un 35 % de reactores positivos a RIA ⁽³⁾.

2.2.7.1.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Partículas virales del vLEB pueden ser detectadas por microscopía electrónica en cultivos de linfocitos de animales infectados ^{(79),(84)}.

2.2.7.1.6. PCR.

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es otro método sumamente sensible para identificar a animales infectados con vLEB. Esta técnica permite detectar la presencia del provirus en células de la sangre, con anterioridad a la detección de anticuerpos ⁽⁶³⁾. Una ventaja de PCR es que no requiere anticuerpos séricos ⁽⁸⁵⁾. Es más sensible que AGID y que el ELISA en cuanto a la detección de terneros infectados cuando la prevalencia de la infección es inferior al 5 %. Permite identificar el provirus del vLEB en los linfocitos de los terneros

recién nacidos hijos de vacas infectadas ⁽²⁷⁾. Esto hace PCR exacto para detectar animales recientemente expuestos al vLEB antes de que los anticuerpos sean producidos (ver Figura 7). Identificar el ácido nucleico viral también hace PCR capaz diferenciar entre terneros infectados y éstos que tienen anticuerpos circulantes debido a la transferencia pasiva del calostro de sus madres. PCR se puede realizar sobre muestras de tejido también ⁽⁸⁶⁾.



Figura 7. PCR ⁽⁸⁶⁾

2.2.7.2. NECROPSIA.

Linfosarcoma no se desarrolla hasta 4 a 5 años post infección. Tumores que resultan de linfocitos malignos que pueden causar síntomas no patognomonicos que son fácilmente confundidos con los de otras enfermedades ⁽⁸⁵⁾. La única manera definitiva de diagnosticar linfosarcoma es el examen histopatológico de un corte del tumor procedente de una biopsia o necropsia siguiente ⁽²⁷⁾.

A la necropsia los órganos afectados están agrandados y pierden importancia. Las lesiones en animales jóvenes generalmente se encuentran en el riñón, el timo, bazo, hígado, y nódulos linfáticos periféricos. Los tumores son encontrados generalmente en orden descendente en nódulos linfáticos, el atrio derecho, abomaso, riñón y uréteres, grasa epidural, útero y cérvix, médula espinal, intestinos, hígado, músculos esqueléticos, bazo, vejiga, rumen, retículo, omaso y vesícula biliar de animales más viejos. El examen de histopatológico de estos órganos muestra linfocitos densamente agrupados dentro del tejido afectado. Los tumores son identificados a menudo en órganos y nudos linfáticos internos vía palpación de rectal. Otras señales clínicas podrían incluir agrandamiento del nódulo linfático periférico, parálisis de miembro trasero, fiebre, pulso de yugular, constipación o diarrea ⁽³⁾.

2.2.8. PREVENCIÓN Y CONTROL.

La prevención depende casi exclusivamente de la detección temprana de la enfermedad. Descubrimiento de los animales infectados, mediante repetidos análisis serológicos a intervalos de 3-5 meses ⁽⁸⁷⁾. Si se considera que para que el vLEB estimule la producción de anticuerpos en el organismo se requieren cuando menos 2 semanas a partir del contacto con el virus, resulta ineficiente un solo muestreo para la detección de la totalidad de los animales infectados en un hato, por esta razón, para la exclusión absoluta de la infección es necesario hacer 2 muestreos con resultados negativos con un intervalo de 3 meses ⁽⁴⁶⁾. La prevalencia de la infección es probablemente la primera consideración en un programa de control pero también es necesario considerar los aspectos económicos, prácticas de manejo, movimiento de ganado y políticos ⁽⁷⁹⁾.

Algunas acciones son necesarias para lograr un hato libre de LEB son las siguientes:

- Adquisición de animales únicamente de hatos reconocidos como libres de la enfermedad ⁽⁴⁵⁾ y hay que asegurarse de que todos los animales que ingresan son seronegativos ⁽²⁷⁾.
- El monitoreo serológico regular al principio cada 3-6 meses y más tarde a intervalos anuales ⁽⁸⁸⁾.
- Esterilizar el material quirúrgico ^{(49),(27)}.
- Usar agujas y guantes de exploración rectal individuales para cada animal ⁽²⁷⁾.
- Intensificar el uso de inseminación artificial con semen de animales negativos ⁽²⁹⁾, así como implementar la transferencia de embriones Separar a los animales positivos de los animales negativos ⁽⁷⁹⁾.
- Efectuar el control de vectores biológicos ⁽³⁾.
- Los terneros deben ser alimentados con calostro y leche de vacas seronegativas ⁽²⁷⁾ y en caso de no haber otra alternativa pasteurizarla primero ⁽³⁾.

Vacunación.

Se ha explorado la posibilidad de producir una vacuna frente al vLEB. Sin embargo, por el momento las perspectivas no son buenas. Una vacuna frente al virus debería no ser infecciosa ni oncogénica, ni debería interferir con las pruebas serológicas utilizadas habitualmente para detectar la infección ⁽⁵⁹⁾. Se han realizado algunos intentos de producción de vacunas como el señalado por Miller y col. tratando al virus con etilenimina binaria, pero no lograron una completa inactivación viral. Se debe tener en cuenta que el uso del virus atenuado o células vivas como vacuna es peligroso particularmente trabajando con retrovirus, porque la información genética es insertada en el ADN celular ⁽⁸⁹⁾. También en un estudio realizado por Reichert y col. Proporcionan evidencia de que una vacuna basada en ADN con pro virus atenuado es capaz de proteger contra las infecciones de desafío ⁽⁹⁰⁾.

2.2.9. TRATAMIENTO.

No hay ningún tratamiento para esta enfermedad ⁽²⁷⁾. De manera experimental se han intentado tratamientos a base de quimioterapia utilizando adriamicina a dosis de 0.4 mg/kg de peso y una inmunoterapia que consiste en inocular preparados a base de el esqueleto de la pared celular de *Nocardia rubra* (inmunomodulador); pero ninguno se encuentra de manera comercial ^(91, 92).

2.2.10. SALUD PÚBLICA.

Respecto al riesgo de zoonosis, la Leucosis Enzoótica Bovina es una de las enfermedades neoplásicas malignas más frecuentemente diagnosticadas en ganado lechero, y el virus ha sido encontrado en la leche de vacas infectadas. Esta conclusión ha planteado la preocupación sobre el papel del vLEB en las enfermedades neoplásicas en seres humanos ⁽⁹³⁾. Esta enfermedad no representa peligro alguno para los seres humanos. Aunque, últimamente se ha encontrado una reacción cruzada con el virus de leucemia tipo I del humano y el virus de Leucosis Enzoótica Bovina, ya que comparten una estructura similar en la proteína interna p24 ⁽⁹⁴⁾.

Algunos estudios han mostrado que no hay ninguna asociación entre la leucemia linfática humana y vLEB. Un estudio determino La presencia del antígeno gp51 en el 7% de los casos de carcinoma canicular de seno, estos resultados sugieren que el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina tiene carácter zoonótico y confirman que el virus es capaz de infectar células humanas; sin embargo, el papel del virus en la patología o su grado de asociación no está claro aún ⁽⁹⁵⁾. Pero no se puede despejar en forma definitiva la incógnita de si el vLEB, que in vitro sí afecta células humanas, es capaz o no de inducir la infección en el hombre bajo condiciones naturales ⁽⁹⁶⁾.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de Leucosis Enzoótica Bovina (vLEB); en muestras de líquido seminal de semen procesado (pajillas de inseminación), recolectadas en establos de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Recolección de muestras de pajillas de semen, en establos de la cuenca lechera ubicada en Tizayuca Hidalgo.
- Obtener el líquido seminal, de las pajillas de semen recolectadas, por medio de una centrifugación.
- Demostrar la presencia de anticuerpos contra el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina, en líquido seminal, por medio de la prueba de ELISA indirecta.

4. METODOLOGÍA.

4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.

El presente estudio conformando con 45 muestras (pajillas) de semen procesado, recolectadas en 14 establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT); y se rotularon al momento de recolectarlas, con los datos del toro del cual procede la pajilla. Se recolectaron en un termo con nitrógeno líquido para una buena conservación del semen, hasta conseguir el total de las muestras, proceso que tardó un mes; una vez que se consiguieron las 45 muestras se trasladaron hacia el laboratorio de virología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

4.2. OBTENCIÓN DE LÍQUIDO SEMINAL.

Una vez trasladadas las muestras al laboratorio de virología, se realizó la limpieza y desinfección del material y equipo de laboratorio requerido para el procedimiento, aunado a la utilización de bata, cubre bocas, guantes, para evitar la contaminación de las muestras.

Se descongelaron a baño maría a 37 ° C, posteriormente se procedió a verter el contenido de la pajilla en tubos eppendorf estériles, los cuales se rotularon para su identificación y se sometieron a centrifugación a 1000 rpm durante 1 minuto para separar el líquido seminal del paquete celular; el sobrenadante se guardó en tubos eppendorf estériles a una temperatura de -80 ° C para posteriormente realizar 6 frotis de cada muestra. El líquido seminal se procesó para realizar la prueba de ELISA indirecta.

4.3. PROCEDIMIENTO DE ELISA INDIRECTA.

Para el análisis de las muestras (líquido seminal) se utilizó una prueba comercial: Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit, ELISA, desarrollado por laboratorios VMRD para detectar anticuerpos contra la glicoproteína gp51 del vLEB en bovinos. Los anticuerpos de las muestras de suero se unen a las moléculas gp51 del vLEB adheridas a las paredes de la microplaca, y se provoca una reacción con anticuerpos peroxidados y que son detectados por

la adición de la enzima sustrato y cuantificados por el desarrollo de un color azul. Y el proceso de la prueba se realizó según las instrucciones del fabricante:

- Realizar una dilución 1:25; (8 μ l del líquido seminal con 200 μ l de diluyente amortiguador de suero).
- Colocar 50 μ l de cada muestra en dos pozos (por duplicado) de la placa del antígeno.
- Los controles positivo y negativo se corrieron por triplicado colocándolos en extremos opuestos, también 50 μ l.
- Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar todos los pozos tres veces con la solución de lavado.
- Agregar 50 μ l del conjugado a todos los pozos
- Incubar el conjugado durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar todos los pozos tres veces con la solución de lavado.
- Agregar 50 μ l de la solución sustrato a todos los pozos.
- Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 50 μ l de solución de paro a todos los pozos.
- Realizar la lectura de los resultados en el Elisometro a una longitud de onda de 620-650 nm.

4.4. PREPARACIÓN DE FROTIS.

El sedimento; obtenido de la separación del líquido seminal y el paquete celular, se diluyó en 1ml de SSF y se homogeneizó con un vortex durante 1 minuto, para realizar 6 frotis de cada muestra (se rotularon con un lápiz con punta diamante para identificarlas) con el fin de identificar las células presente, se siguió el siguiente procedimiento:

- Colocar una pequeña gota de semen sobre un portaobjetos.
- Extender uniformemente sobre todo el portaobjetos.
- Fijar con alcohol metílico durante 3 a 5 minutos.
- Agregar acetona y se dejo secar.

4.5. TINCIÓN WRIGHT.

Una vez realizados los frotis se procedió a teñir las laminillas con el colorante de wright para poder observar al microscopio la presencia de células en las muestras, el procedimiento consiste en:

- ❖ Cubrir la muestra con colorante de wright durante 3 minutos.
- ❖ Cubrir gota a gota con buffer sin derramar el colorante durante 7 minutos.
- ❖ Enjuagar con agua destilada.
- ❖ Enjuagar con agua de la llave (corriente).
- ❖ Dejar secar la laminilla.
- ❖ Sumergir en Xilol para eliminar los residuos de agua.
- ❖ Montar (colocó un cubreobjetos) las laminillas, agregando unas gotas de resina.
- ❖ Observar al microscopio para detectar células presentes en el frotis.

4.6. TINCIÓN PAPANICOLAOU.

Aunado a la tinción de Wright se realizó la tinción de las laminillas con la técnica de Papanicolaou con la finalidad de observar la posible presencia de células tumorales en las muestras.

Los frotis se lavaron con agua corriente durante 3 minutos al chorro de agua, para después depositarlas en una caja de Coplin, lavar en agua destilada durante un minuto, aplicar el colorante hematoxilina sumergiendo las laminillas en un vaso de Coplin durante 1 minuto, lavar el exceso con agua corriente, realizar baños de alcohol de 96° en dos cajas de Coplin con duración de 5 minutos en cada caja, aplicar el segundo colorante que es el OG-6 sumergiendo las laminillas durante 5 minutos, dar baños en alcohol de 96° durante 5 minutos por caja (2 cajas), aplicar el colorante EA durante 8 minutos, posteriores baños de 5 minutos en alcohol de 96°, sumergir en alcohol absoluto más xilol, bañar en xilol con duración de 5 minutos cada uno, terminado este proceso se montaron las laminillas con resina.

5. RESULTADOS.

5.1. INTERPRETACIÓN VISUAL.

De acuerdo al fundamento de la prueba; obtuvimos que en la placa de ELISA, se presentaron cambios en la coloración; en los pozos: A4, A5, A6, A7, C4, C5, D1, D2, D10, D11, F7, F8, G1, G12, G13; mostrando diferente intensidad de color azul. Lo que nos sugiere la presencia de anticuerpos en las muestras correspondientes (ver Figura 8).

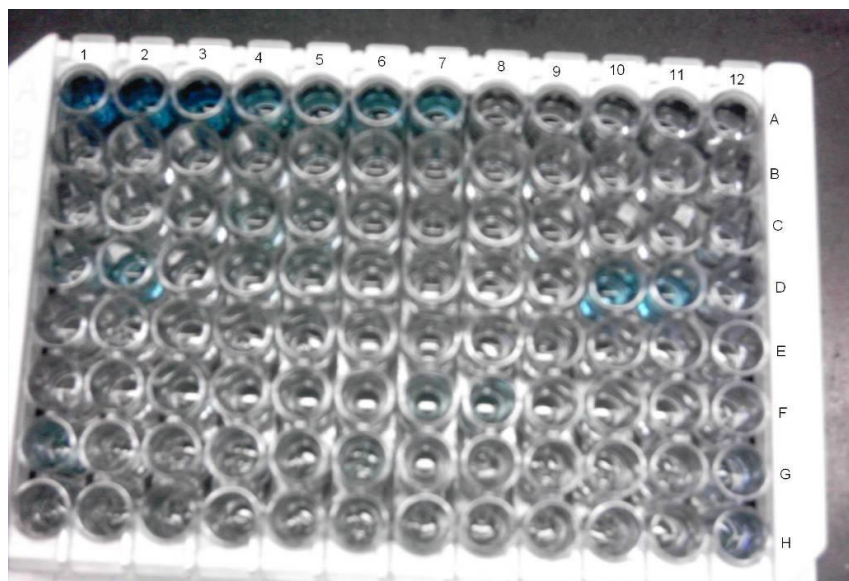


Figura 8. Resultado de la placa de ELISA.

5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DENSIDAD ÓPTICA.

Inmediatamente después de realizada toda la técnica de ELISA se realizó la lectura de los resultados con la ayuda de un Elisómetro a una longitud de onda de 620-650 nm, De acuerdo al fabricante el control positivo puede producir una Densidad Óptica (D.O.) media mayor o igual a 0.250 y menor a 2.0; mientras que el control negativo produce una D.O. media menor que 0.200. Los resultados que arrojó la lectura con el Elisómetro se muestran (ver Cuadro 7). Cada muestra se colocó en dos pozos (se probó por duplicado), y los controles positivo (CP) y negativo (CN) por triplicado; en el cuadro 7, la fila superior (en azul) nos indica el número de muestra que se colocó en el pozo indicado, y en la fila inferior el resultado de la D.O.

Para una representación gráfica se procedió a obtener el promedio de los dos pozos de cada muestra, el resultado se presenta en la Figura 10.

Prueba de validación.

Siguiendo las recomendaciones de la hoja técnica de kit nos indica que el control positivo puede dar una D.O. media igual o mayor a 0.250 y menor de 2.000; el control negativo puede dar una D.O media menor o igual a 0.200.

El control positivo arrojó una D.O. de 0.869 al promediar el resultado de los tres pozos en los cuales se colocó, mientras que el control negativo dio un promedio de 0.061 D.O., de acuerdo a estos resultados el criterio para determinar el diagnostico de las muestras fue el siguiente:

- ▲ Las muestras con resultado menor o igual a 0.061, (al obtener el promedio de los dos pozos en los que se analizaron); se consideraron negativas.
- ▲ Las muestras que dieron como resultado una D.O. entre 0.062 y 0.250 las consideramos como sospechosas.
- ▲ Las muestras que rebasaron el 0.250 de D.O. las diagnosticamos como positivas (ver Cuadro 8).

En base al criterio anterior obtuvimos que de las 45 muestras analizadas, 22 muestras se consideran negativas lo que corresponde al 49%, mientras que 21 muestras se encontraron dentro del rango que consideramos sospechosas lo que corresponde al 47% y 2 muestras rebasaron una densidad óptica de 0.250 por lo que se consideraron positivas resultando ser el 4% (ver Figura 9).

De las muestras de procedencia nacional 2 resultaron positivas, 20 negativas y 11 sospechosas. Mientras que las muestras de semen importadas ninguna fue positiva, 3 negativas y 9 sospechosas (ver Figura 11).

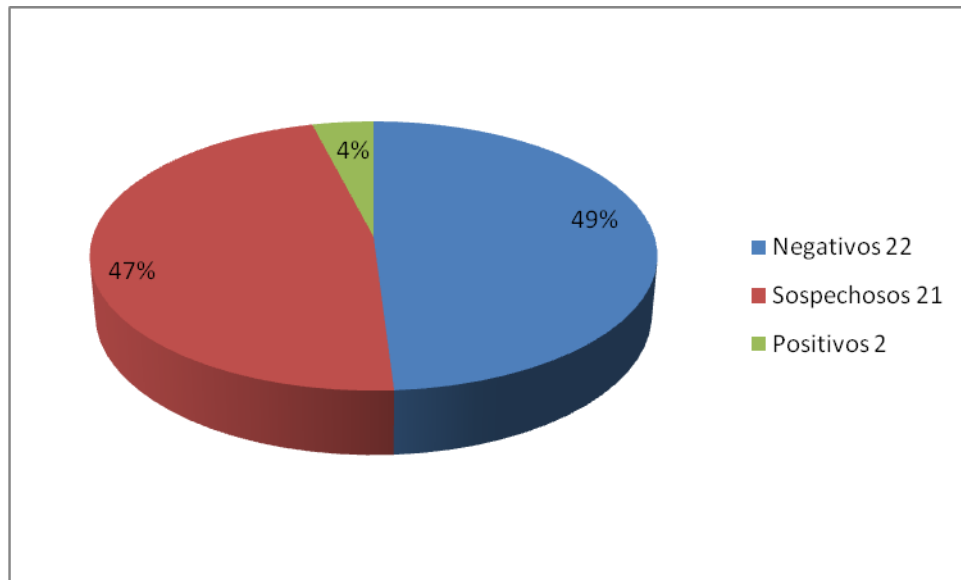


Figura 9. Porcentaje serológico de líquido seminal de toros negativos, sospechosos y positivos.

5.3. FROTIS.

Por otro lado al realizar el análisis de los frotis encontramos que en la mayoría de las laminillas, realizadas con las muestras estudiadas; presentan células epiteliales, haciendo una comparación entre las muestras nacionales y las provenientes del extranjero observamos que las nacionales presentan mayor porcentaje de células epiteliales que las importadas. No se encontraron células de otro tipo como linfocitos en ninguna de las muestras.

En las laminillas teñidas con la tinción de papanicolau se encontraron células epiteliales, que presentan un citoplasma color naranja, que como nos lo indica la técnica normalmente se tiñen en color azul, y en caso de presentar queratina se tiñen de color naranja, como en el caso del carcinoma epidermoide (ver Figura 12).

Por lo que no se observa presencia de células cancerígenas, ni de defensa en las muestras estudiadas.

6. DISCUSIÓN.

Existen pocos trabajos enfocados a diagnosticar la Leucosis Enzoótica Bovina en semen, según algunos autores reportan la ausencia del virus en muestras de semen por medio de pruebas de biología molecular como PCR, por lo que consideran seguro utilizar la IA en hatos libres de esta enfermedad ⁽⁹⁷⁾. A pesar de que muchos autores mencionen que no se puede transmitir la enfermedad por medio de la IA es necesario realizar un monitoreo rutinario del ganado pie de cría ya que como lo menciona Catena⁽¹³⁾, existe una probabilidad; aunque sea baja, de diseminar la infección por esta vía.

El presente trabajo, nos muestra que existe la posibilidad de encontrar el vLEB presente en semen, puesto que encontramos la presencia de anticuerpos contra la proteína gp51 del vLEB en el 4 % de las muestras procesadas, siendo estas, de origen nacional, mientras que ninguna de las muestras importadas resultó positiva.

Uno de los trabajos enfocados a la detección del vLEB, es el estudio realizado en Argentina por Dus Santos, el cual analiza el semen de 23 toros, en muestreos realizados en varias ocasiones, 20 de los toros muestreados resultaron positivos por PCR en semen, detectando el genoma viral en más de un muestreo y en forma alternada con periodos de ausencia de detección del provirus. Estos los resultados sugieren que el vLEB presenta dos patrones de excreción viral: ausencia de virus en semen y excreción intermitente del mismo. ⁽⁹⁸⁾, por lo que es necesario establecer un programa de control en el cual se realicen pruebas diagnosticas de la LEB ya que detectando la enfermedad en los pie de cría se puede disminuir el riesgo de diseminar la enfermedad a todo el hato.

La importancia de estos trabajos, radica en la rapidez con que se pudiera diseminar la enfermedad a través la inseminación artificial, al tener un semental positivo sin diagnosticar, esto es posible porque un semental puede producir suficientes espermatozoides para inseminar a miles de hembras al año, debido a que el semen al ser procesado; para su conservación y utilización en inseminación artificial, se diluye incrementando la cantidad de hembras que se pueden inseminar (hasta 300) ⁽¹⁴⁾ con un solo eyaculado (ver Cuadro 6).

Características del semen procesado en pajillas	Parámetro
Tiempo de almacenamiento años	>1
Dilución de 1 ml de semen	10-75
Dosis de inseminación (volumen)	0.2-1
Vacas inseminadas por eyaculado	300

Cuadro 6. Requerimiento para dilución, de semen bovino para inseminación. Modificado de Hafez⁽⁹⁹⁾

Existen trabajos sobre el diagnóstico de retrovirus en semen tal es el caso del trabajo realizado por Martínez ⁽¹⁰⁰⁾ aportan evidencia de la presencia de virus en el semen de los animales; ya que demostraron la presencia de antígeno viral, de la enfermedad de Artritis Encefalitis Caprina, en el aparato reproductor de machos caprinos; pero no detectaron evidencia de que los parámetros reproductivos se afecten en animales positivos al virus, lo que implica un riesgo en la diseminación de la enfermedad ya que se utilizan pensando que son libres de enfermedades.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo, se entregó a cada uno de los productores que nos dieron las facilidades para obtener las muestras para el estudio, las cuales se les entregó personalmente a sobre cerrado; para que tomen las consideraciones pertinentes de acuerdo a el resultado obtenido cada toro según la muestra analizada.

7. CONCLUSIONES.

El presente trabajo nos muestra que la prueba de ELISA indirecta, es una muy buena prueba para el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina, y muy eficiente por ser muy sensible y específica; por lo que puede considerarse como prueba de rutina en los establos de México para el diagnóstico de esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en este tipo de trabajos deberían ser tomados en cuenta por el sector oficial, para tomar conciencia de los posibles riesgos que pueden presentarse con las enfermedades del ganado y con esto, permitir a las autoridades, adecuar las normas oficiales relacionadas, en este caso, con la comercialización y movilización de semen en el país.

BIBLIOGRAFÍA.

- (1) BurrIDGE M.J,C.J Wilcox, J.M Hennemann. Influence of genetic factors on the susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection. *Europ. Journal Cancer* 1979, 15: 1395-1400.
- (2) Correa G. Enfermedades de los animales domésticos (poli gástricos). Vol II. 5ª Ed. Imprentei 1988: 111-118.
- (3) Medina M. Leucosis bovina. *Vet. Mex.* 1988; 19: 151-158.
- (4) Villamar L. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2004: URL : <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>.
- (5) Castro L, Sánchez R. Iruegas E. y G. Saucedo L. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. *FIRA Boletín Informativo* 2001. Volumen XXXIII. Núm. 317. 9a. Época. Año XXX. Septiembre. México, D.F.
- (6) SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México. *Claridades agropecuarias* 2010.
- (7) Del Valle M. La producción de leche en México en la encrucijada de la crisis y los acuerdos del TLCAN Preparado para ser presentado en la reunión de LASA 1997 en el Continental Plaza, Guadalajara, Jal. México, abril 17–19 de 1997: URL: <http://136.142.158.105/LASA97/delvrivalvarez.pdf>.
- (8) Monitoreo realizado en 1997 en las Delegaciones Estatales de la SAGARPA
- (9) Villamar L. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005: URL : <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495>
- (10) Frontera C. Soberanía, Globalización y Desarrollo Económico. México. 2002.
- (11) Cutia, Lucas. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF): una herramienta para el mejoramiento genético. Instituto de reproducción animal Córdoba; universidad católica de Córdoba 2006: 1-4.
- (12) Díaz P, Fonseca V, Martínez P, Rey A. Inseminación artificial en bovinos. Editorial del cardo. 2003: 1-7.
- (13) Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus* 1999,1(3): 18-31.

- (14) München Grub, curso de inseminación artificial agroindustria, 2006 de <http://www.agroaustria.com/shop/pdf/IA%20agroaustria.pdf>
- (15) World Organisation for Animal Health. Enfermedades de la lista de la OIE 2011, URL: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2011/>
- (16) González ET, Oliva GA, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. Leucosis Enzoótica Bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (id, elisa-i, wb, pcr) en bovinos inoculados experimentalmente. ANALECTA VETERINARIA 2001; 21, 2: 12-20
- (17) Chamizo P, Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión, Revista electrónica de veterinaria REDVET ISSN 1695-7504, Vol, VI No 7, Julio 2005
- (18) BurrIDGE M.J,C.J Wilcox, J.M Hennemann. Influence of genetic factors on the susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection. Europ. J. Cancer 1979, 15: 1395-1400.
- (19) Mohanty L, Dutta F. Virus de leucemia bovina (VLB). En: Virología Veterinaria mohanty L, Dutta F., 353-358. Interamericana, México, D.F., 1983.
- (20) Dirksen; Gründer; Stober Medicina Interna y Cirugía del bovino. Ed. Inter Medica, 1988: 125-130.
- (21) Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SL. Persistent lymphocytosis in cattle: Its cause, nature and relation to lymphosarcoma. Ann Rech Vet 1987, 9: 851-857.
- (22) Grimshaw W.T. , Wiseman A, Petrie L, Selman I.E. Bovine leucosis (lympho sarcoma): a clinical study of 60 pathologically confirmed cases. Vet. Rec. 1979, 105 (12): 267-272.
- (23) Medina M. Leucosis bovina. Vet. Mex. 1988; 19: 151-158.
- (24) Miller J M . Bovine leukemia virus infection. A growing concern. Norden News, Fall. 1981, 22: 22-26.
- (25) Mascaró L. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 1ª edición 1975. Ed. Albatros, Buenos Aires, Argentina.
- (26) Monroy J, Trigo FS de Aulaja A, García R. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. Vet. Méx. 1993, 24 (1): 21-25.

- (27) Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. Medicina Veterinaria Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol II. 9^a ed. España: McGraw-Hill 2002: 1239-1253.
- (28) Klintevall K. Bovine leukaemia virus: course of infection and means of detection. Thesis. SLU Info/repro, Uppsala, Sweden 1995: 1–38.
- (29) Hernandez RJ, Mar RA, Zabaleta JN, Barrientos R, Leyva VH, Fausto E. Leucosis Enzoótica bovina. Agropecus. Año III, Vol I, Num. 5 Enero-Junio 2005:14-33.
- (30) Aluja A. S. Linfosarcoma (leucemia) en bovinos. Vet. Méx., 3: 18-22; 1967.
- (31) Uruchurtu A. Incidencia de linfosarcoma en bovinos del D. F. Tesis de licenciatura. Esc. Nal. De Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1967
- (32) Teustsch M. R. and Lewis H. A. Aberrante expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1996. 53,
- (33) Orlik O., and Splitter G. A. Progression to persistent Lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV) infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4 T cell in response to gag and env encoded BLV proteins J Virol 1996. 70 (11),
- (34) Flint S, Enquist L, Racaniello V, Skalka A. Principles of virology molecular biology pathogenesis, and control of animal viruses. ASM Press 2004: 18, 835-837.
- (35) William C. Enfermedades del ganado vacuno lechero Ed. Acribia (626-635) 1999.
- (36) Murphy F, Fauquet C, Bishop D, et al. Virus Taxonomy: Six report of the International Committee on the Taxonomy of viruses. Nueva York: Springer Verlag 1995.
- (37) Bassani S. Características generales de los retrovirus humanos. AAMIC. 2001 URL: http://www.asociacionamic.com/areas-tematicas/documentos/TEMA_ABRIL_180401_01.pdf
- (38) Doolittle RF, Feng DF. Origins Tracing the origin of retroviruses. Current topics in Microbiology and Immunology 176. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg 1992: 195-209.
- (39) Porterfield J. Andrewes Viruses of vertebrates. 5^a ed. Bailliere Tindall. 1989.
- (40) Kenyon S. J. Bovine leukemia virus: Transmission and diagnostic test. Bov. Pract., 14: 137-139 (1979).

- (41) Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balo H, Bouzar A, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R and Willems L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 2007, 4:18doi:10.1186/1742-4690-4-18
- (42) Teustsch M. R. and Lewis H. A. Aberrante expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996. 53,
- (43) Overbaugh J, Miller A, Eiden M. Receptot and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol and Mol Biol Rev* 2001; 65: 371-89. 5.
- (44) Dinter Z, Morein B. *Virus infections of ruminants* 1st edition 1990. Ed. Elsevier. Netherlands: 419-429.
- (45) De la Sota M. *Manual de procedimientos. Leucosis bovina enzoótica*. Dirección Nacional de Sanidad Animal; Buenos Aires 2004: URL: http://www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/pdf/09_leuco.pdf.
- (46) Ferrer J. F. Bovine lymphosarcoma. *Comp. Cont. Edu.* 1980, 2 :235-242.
- (47) Laussaunet M.L.; Thurmond M.; Johnson W. Effect of Brucellosis Vaccination and Dehorning on Transmission of Bovine Leukemia Virus in Heifers on a California Dairy. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, 54, 184-189.
- (48) Rebhun W.C. *Enfermedades del Ganado vacuno lechero* 1^a edición. 1999. Ed. Acribia, España: 626-635.
- (49) Ferrer, J.F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979.175: 1281–1286.
- (50) Hutchinson L. Bovine leukosis. *Veterinary Science Information*. 2001.
- (51) Kono Y, et al. Serological methods to detect calves infected in utero with bovine leukemia virus. *Jpn, J. Vet. Sci.*, 45:453-461- 1983.
- (52) Piper C E, Ferrer JF. Abt, D. A, Marshak R R. Postnatal and prenatal transmissions of the bovine leukemia virus under natural condition. *J. Nati. Cancer Inst.* 1979, 62: 165-168.

- (53) Dirksen G, Gründer H, Stöber M. Medicina Interna y cirugía del bovino. Vol. 1. 4ª edición. Ed Inter-medica 2005: 124-131.
- (54) Rubino M J, Donham K J. Inactivation of bovine leukemia virus infected lymphocytes in milk. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45: 1553-1556.
- (55) Casal J, Learte P, Torre E. A path model factors influencing bovine leukemia virus transmission between cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 10 :47-61, 1990.
- (56) Hopkins S G, DiGiacomo RF. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997 Mar;13(1):107-28.
- (57) Hopkins S G, et al. Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J.A. V. M. A.* 199 (8): 1035-1038, 1991.
- (58) Dimmock CK, Chung YS, MacKenzie AR. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust Vet J.* 1991 Jul; 68(7):230-233.
- (59) Johnson R, Kaneene J B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. *Vet. Bull,* 1992. 62: 287-312.
- (60) Pollari FL, Hopkins SG, DiGiacomo RF, Evermann JF. Periparturient transmission of bovine leukosis virus in dairy cattle. *Vet Rec.* 1993 Feb 20;132(8):190-1.
- (61) Buxton B A, Hinkie N C, Schuitz R D. Role of insects in the transmission of bovine leucosis virus: potential for transmission by stable flies, and tabanids. *Am. J. Vet. Res.* 1985, Jan;46 (1): 126-6.
- (62) Manet G. Guilbert X. Roux A.. Vuillaume A and Parodia A. L. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.) *Veterinary Immunology Immunopathology* Volume 22, Issue 3, October 1989, Pages 255-263
- (63) Castelli M, Mangold A, Maciel M, Abdala A. Leucosis bovina. Diagnostico, transmisión, control y prevención. *Infotarbo* 1999, 128 Septiembre: 68.
- (64) Kettmann R, et al. Bovine Leukemia virus. En "The Retroviridae , Volume 3" (J.A. Levy, ed) Plenum Press, New York, 1994; 39-81.
- (65) Radke K. Bovine Leukemia virus. En: *Encyclopedia of Virology.* Academic Press, 1994; 166-174.

- (66) Buehring GC, Kramme PM, Schultz RD. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab Invest* 1994; 71:359-365.
- (67) Ban J, Portetelle D, Altaner C, Horion B, Milan D, Krchnak V, Burny A and Kettmann R. Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. *J Virol.* 1993 February; 67(2): 1050-1057.
- (68) Doménech A, Llamas L., Goyache J., Suárez G' and. Gómez-Lucía E. Macrophages infected with bovine leukaemia virus (BLV) induce humoral response in rabbits *Veterinary Immunology and Immunopathology* Volume 58, Issues 3-4, 19 September 1997, Pages 309-320.
- (69) Meiron R, Brenner J, Gluckman A, Avraham R and Z. Trainin. Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with Bovine Leukemia Virus (BLV). *Veterinary Immunology and Immunopathology* Volume 9, Issue 2, June 1985, Pages 105-114.
- (70) Heidrich, H. D, Gruner J. *Manual de patología bovina.* 1976. Ed. Acribia. España. 222-223.
- (71) Correa G.P. *Enfermedades virales de los animales domésticos, poligástricos.* 2002. Vol II. 7ª edición. Ed Técnica en impresión. México.111-118.
- (72) Stober, M. The clinical picture of the enzootic and sporadic forms of bovine leukosis. *Bovine Practitioner*, 1981 v. 16: 119-129.
- (73) Oliver-Espinosa O, et al. Sporadic bovine leukosis associated with ataxia and tibiotarsal joint swelling: A case report. *Can J Vet Res.* 1994, 35 (12): 777-779.
- (74) Brenner J, Trainin Z. Enzootic and sporadic forms of bovine leukosis and lymphosarcoma-leukemia in cattle. *Isr J Vet Med* 1995; 50:105–108.
- (75) Trono K, Pacheco J, Lager I. Detección de la infección natural por el virus de la Leucosis Bovina utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista de Medicina Veterinaria.* 1997; 78 (6):393-395.
- (76) Gatti M. leucosis bovina, enfermedad de gran importancia y limitante para exportación de ganado en pie. *Laboratorios Santa Elena, Uruguay.* 2007: 4-5.

- (77) Batmaz H, Carli KT, Kahraman M, Cetin C, Kennerman E. Serological and hematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in turkey. *Vet. Rec.* 1995, 136 (1): 42-44.
- (78) Levkut M, plank L, Levkutova M, Korad V: Monoclonal cytoplasmic immunoglobulin and pathomorphological reaction in lymph nodes in spontaneous bovine leucemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993, 40: 163-170.
- (79) Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle.* Black weel science 2004: 693-699.
- (80) Andrews A.H. *Outline of Clinical Diagnosis in Catle.* Butterwoth & Co (175-182) E.U 1990.
- (81) Pérez J. M. Técnica de ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2009: 1-4.
- (82) Hudson L. C. Hay F. *Inmunología práctica.* España: Ed. Jims, 1979:
- (83) Malpica C, Donat's C. Estandarización de la prueba de ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus Phlebotomus fever Tesis (Químico Farmacéutico) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2001
- (84) Coroas L, et al. Detección del virus de leucosis bovina en muestras directas de sangre mediante la técnica de reacción en cadena en la polimerasa doble. *Salud Anim* 1997, 19 (3): 143-146.
- (85) Monod j.; Francois J. 1996, *Biología Molecular* décimo segunda edición Editorial Ciencia y Desarrollo México D.F. Pp 9-10
- (86) Fernandes M.; Stancek D.; Moreira L.; Pimenta J.; Andrade M.; Cerqueira R. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* vol.40 no.5 São Paulo 2003
- (87) Ollis G. W. *Enzootic bovine leucosis.* 2001. Disponible en: <http://www.agric.gob.ab.ca>
- (88) Agottani, J.V.B.^a, Oliveira, K.B.^a, Faysano, L.^b Warth, J.F.G. *Leucose Enzoótica Bovina: Diagnóstico, Prevenção e Controle.* Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária. Curitiba, Pr. 2009.
- (89) Miller J. M.; Van Der Maaten M. J. Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann. Rech. Vét.,* 1978, 9, (4), 871-877.

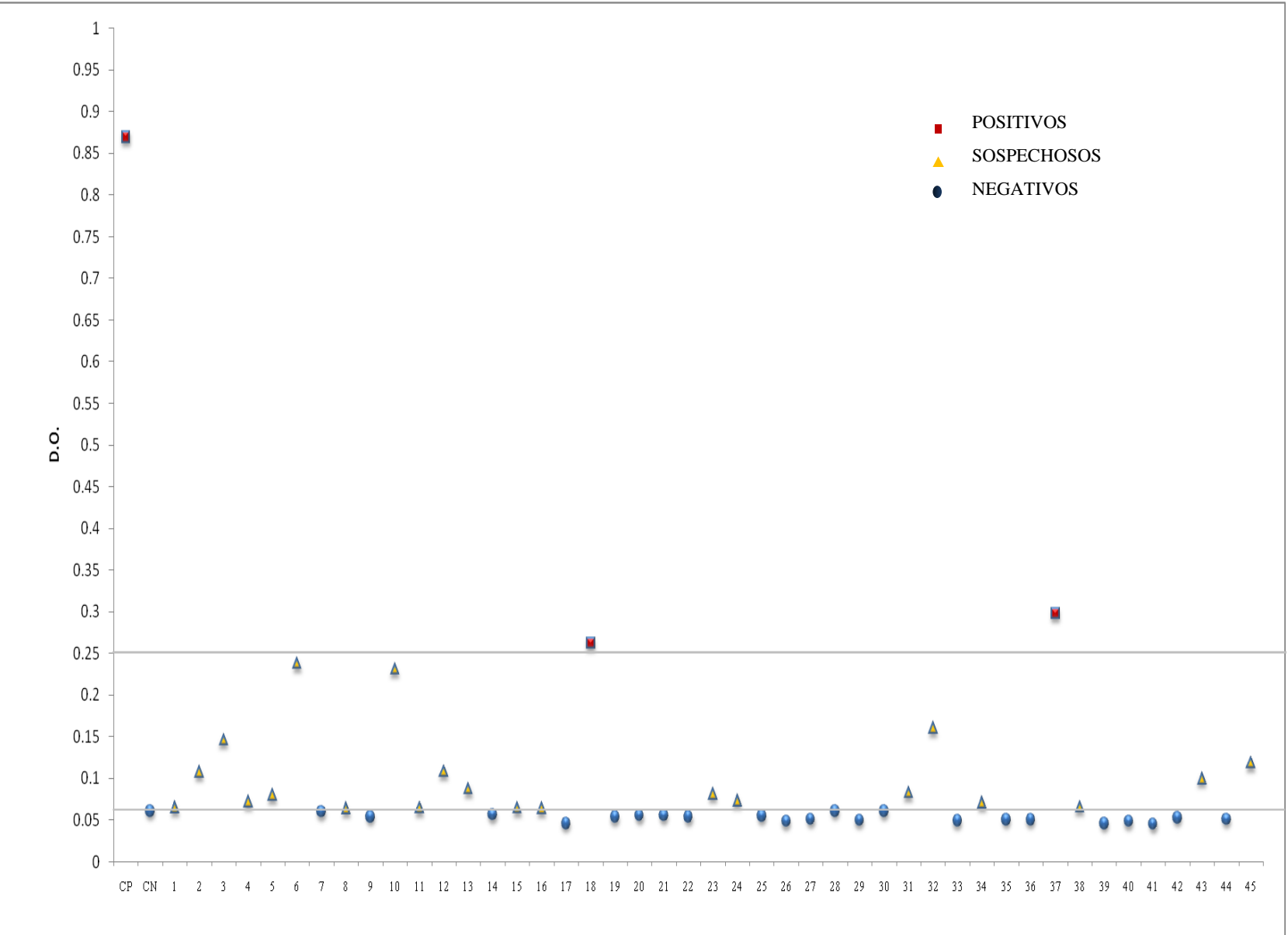
- (90) Reichert M.; Cantor G. H.; Willems L. and Kettmann R. Protective effects of a live attenuated bovine leukaemia virus vaccine with deletion in the R3 and G4 genes. *Journal of General Virology* (2000), 81, 965-969.
- (91) Onuma M, Yasutomi Y, Yamamoto M. Chemotherapy and immunotherapy of bovine leucosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1989 a. 22 (3): 245-254.
- (92) Onuma M, Yasutomi Y, Yamamoto M. Medical treatment of bovine leukosis 1989 b. *Folia Veter*, 33 (1): 33-44.
- (93) Miller J M, Van der Maaten M J. 1990. Bovine leukosis virus, In: Dinter Z, Morein B.(Eds). *Virus infections of ruminants*. Elsevier, Amsterdam: 572.
- (94) Murayama K, Fukushima T, Mochizuki S. Cross- reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 1989. 22 (3): 265-274.
- (95) Ochoa A., Uribe A., Gutierrez M. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum*, julio-diciembre, 2006. 11, número 002. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia: pp 31-40.
- (96) Olson C. Progress to control of bovine leucosis. *Bov. Pract.* 1979. 14: 115-120.
- (97) Choi K, Don Monke, StottJ. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *J Vet Diagn Invest* 2002, 14: 403–406.
- (98) Dus Santos M, Trono K, Lager I, Wigdorovitz A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Veterinary Microbiology* 2007, 119: 10–18.
- (99) Hafez E, Hafez B. reproducción e inseminación artificial en animales.7^a ed. South Carolina. McGraw-Hill, 2000: 447-451.
- (100) Martínez H, Ramírez H, Tórtora J, Aguilar A, Garrido G, Montaraz J. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Vet. Méx.* 2005, 36 (2): 159-175.

APÉNDICES.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CP	CP	CP	10	10	18	18	26	26	34	34	42
A	1.022	0.812	0.774	0.27	0.193	0.332	0.193	0.051	0.046	0.073	0.069	0.054
	1	4	4	11	11	19	19	27	27	35	35	42
B	0.062	0.062	0.082	0.064	0.065	0.053	0.054	0.052	0.05	0.049	0.052	0.052
	1	5	5	12	12	20	20	28	28	36	36	43
C	0.068	0.076	0.084	0.12	0.097	0.059	0.052	0.06	0.062	0.054	0.047	0.096
	2	6	6	13	13	21	21	29	29	37	37	43
D	0.162	0.233	0.243	0.077	0.098	0.058	0.053	0.05	0.05	0.3	0.296	0.104
	2	7	7	14	14	22	22	30	30	38	38	44
E	0.053	0.062	0.058	0.047	0.066	0.058	0.049	0.053	0.068	0.068	0.064	0.054
	3	8	8	15	15	23	23	31	31	39	39	44
F	0.052	0.052	0.076	0.062	0.067	0.053	0.11	0.12	0.046	0.047	0.045	0.048
	3	9	9	16	16	24	24	32	32	40	40	45
G	0.241	0.052	0.056	0.06	0.068	0.097	0.05	0.256	0.065	0.048	0.049	0.114
	CN	CN	CN	17	17	25	25	33	33	41	41	45
H	0.067	0.06	0.056	0.048	0.044	0.055	0.055	0.048	0.05	0.045	0.045	0.123

Cuadro 7. Resultados de densidad óptica (DO) en Elisometro.

Figura 10. D.O. obtenida mediante Elisometro.



# de muestra	RAZA	Procedencia		D.O	COLOR DE REACCION	RESULTADO			CELULAS PRESENTES			
		N	I			+	?	-	MΦ	NΦ	LT	EP
1	HOLSTEIN	*		0.065	BLANCO		*		-	-	+	+
2	HOLSTEIN		*	0.107	BLANCO		*		-	-	-	++
3	HOLSTEIN		*	0.146	BLANCO		*		-	-	-	-
4	PARDO S.		*	0.072	BLANCO		*		-	-	-	-
5	HOLSTEIN		*	0.080	BLANCO		*		-	-	-	-
6	HOLSTEIN	*		0.238	AZUL		*		-	-	-	+
7	HOLSTEIN		*	0.060	BLANCO			*	-	-	-	+
8	HOLSTEIN		*	0.064	BLANCO		*		-	-	-	-
9	HOLSTEIN	*		0.054	BLANCO			*	-	-	-	+++
10	HOLSTEIN		*	0.231	AZUL		*		-	-	-	-
11	HOLSTEIN		*	0.064	BLANCO		*		-	-	-	-
12	HOLSTEIN	*		0.108	BLANCO		*		-	-	-	+
13	HOLSTEIN		*	0.087	BLANCO		*		-	-	-	-
14	HOLSTEIN	*		0.056	BLANCO			*	-	-	-	+++
15	HOLSTEIN	*		0.064	BLANCO		*		-	-	-	+++
16	CEBU	*		0.064	BLANCO		*		-	-	-	+
17	HOLSTEIN	*		0.046	BLANCO			*	-	-	-	+++
18	HOLSTEIN	*		0.262	AZUL	*			-	-	-	+
19	HOLSTEIN	*		0.053	BLANCO			*	-	-	-	+
20	HOLSTEIN	*		0.055	BLANCO			*	-	-	-	+
21	HOLSTEIN	*		0.055	BLANCO			*	-	-	-	-
22	HOLSTEIN		*	0.053	BLANCO			*	-	-	-	+
23	HOLSTEIN	*		0.081	BLANCO		*		-	-	-	+
24	HOLSTEIN	*		0.073	BLANCO		*		-	-	-	-
25	HOLSTEIN	*		0.055	BLANCO			*	-	-	-	+
26	HOLSTEIN	*		0.048	BLANCO			*	-	-	-	++
27	HOLSTEIN	*		0.051	BLANCO			*	-	-	-	+
28	HOLSTEIN	*		0.061	BLANCO			*	-	-	-	-
29	HOLSTEIN	*		0.050	BLANCO			*	-	-	-	+
30	HOLSTEIN	*		0.060	BLANCO			*	-	-	-	+
31	HOLSTEIN	*		0.083	BLANCO		*		-	-	-	-
32	HOLSTEIN	*		0.160	BLANCO		*		-	-	-	+
33	HOLSTEIN	*		0.049	BLANCO			*	-	-	-	+
34	HOLSTEIN		*	0.071	BLANCO			*	-	-	-	+++
35	HOLSTEIN	*		0.051	BLANCO			*	-	-	-	-
36	HOLSTEIN	*		0.050	BLANCO			*	-	-	-	-
37	HOLSTEIN	*		0.298	AZUL	*			-	-	+	+++
38	HOLSTEIN	*		0.066	BLANCO		*		-	-	-	-
39	HOLSTEIN	*		0.046	BLANCO			*	-	-	-	+
40	HOLSTEIN	*		0.048	BLANCO			*	-	-	-	+
41	CEBU	*		0.045	BLANCO			*	-	-	-	+
42	HOLSTEIN	*		0.053	BLANCO			*	-	-	-	+
43	HOLSTEIN	*		0.100	BLANCO		*		-	-	-	-
44	HOLSTEIN	*		0.051	BLANCO			*	-	-	-	+
45	HOLSTEIN		*	0.118	BLANCO		*		-	-	-	-

Cuadro 8. Información de procedencia y resultados obtenidos en las muestras

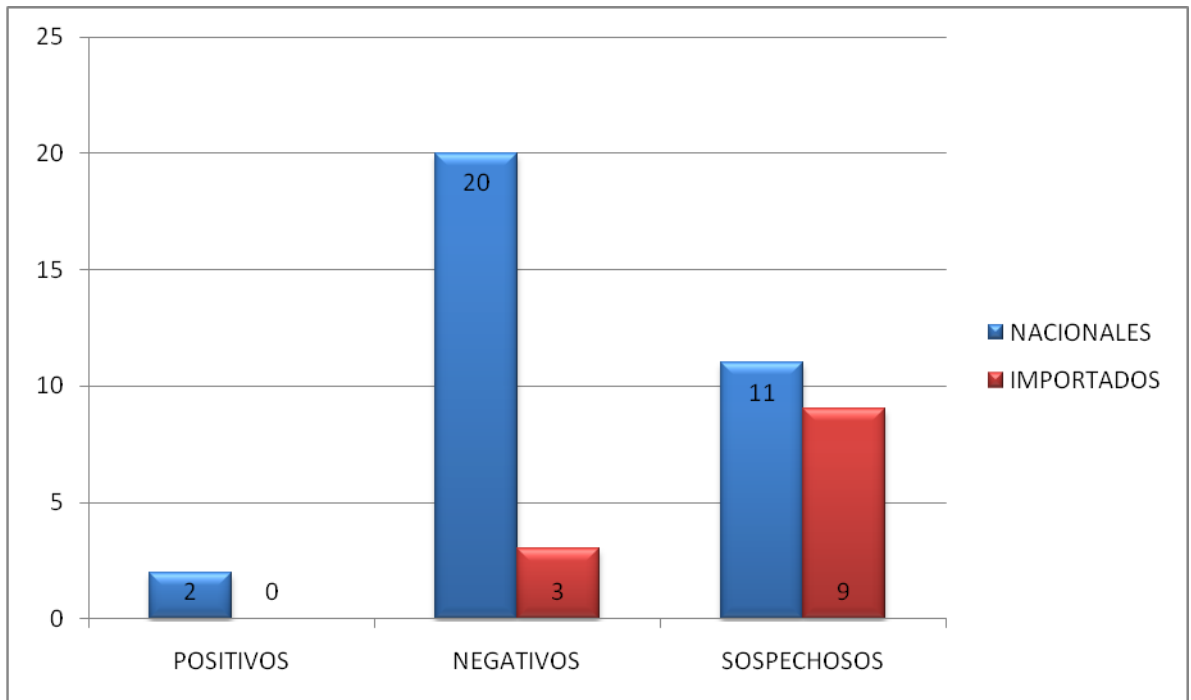


Figura 11. Cantidad de muestras por diagnóstico, según su procedencia.

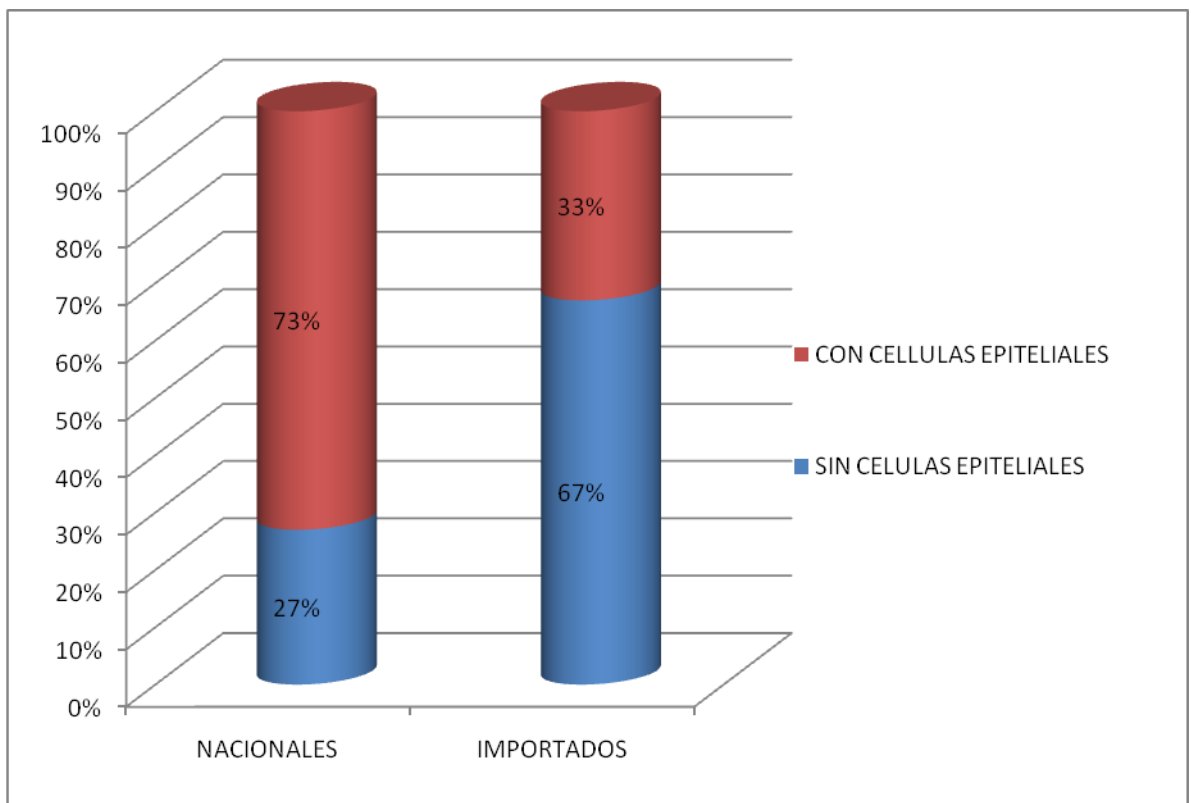


Figura 12. Porcentaje de muestras con células epiteliales y su procedencia.

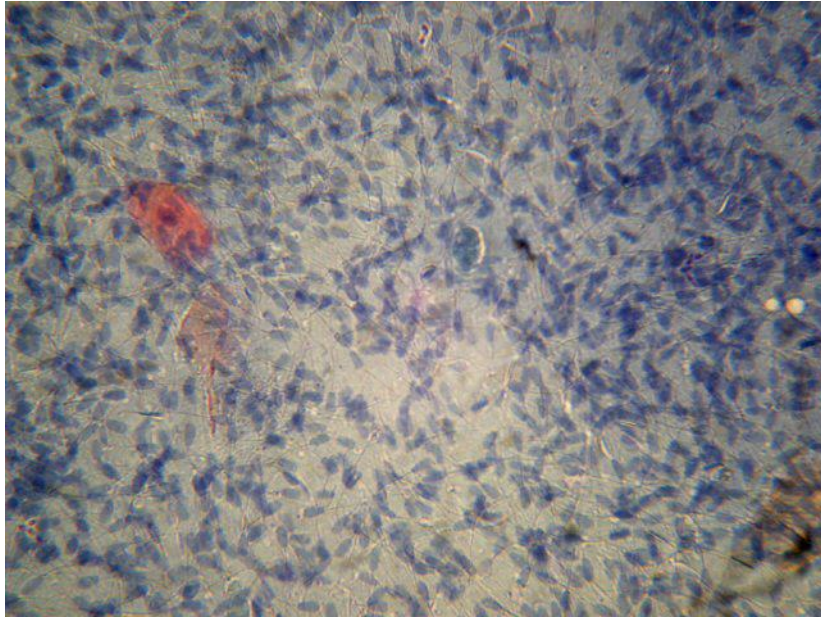


Figura 13. Célula epitelial en muestra 18 con tincion papanicolaou.

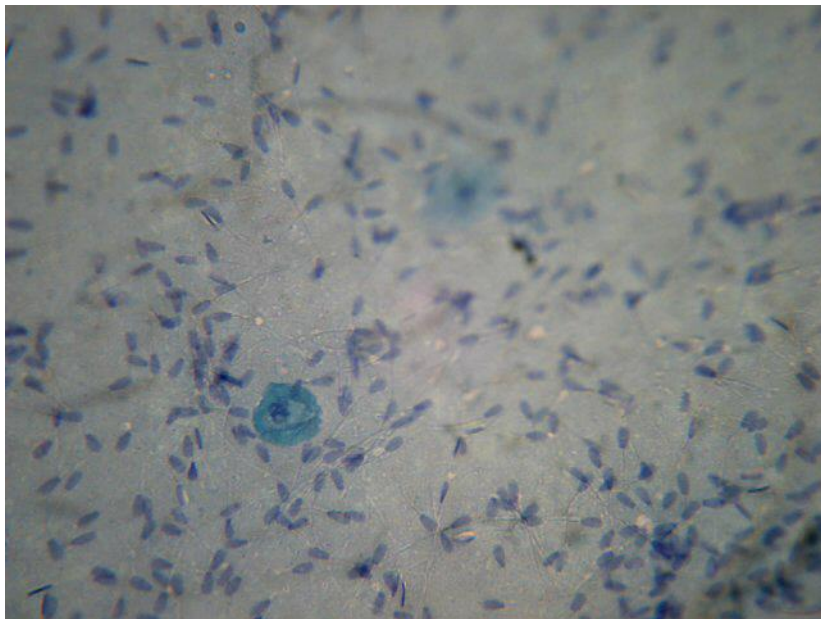


Figura 14. Célula epitelial en muestra 9 con tincion papanicolaou.