

Tesis de Maestría en Biotecnología



Universidad de la República

Lic. Gonzalo Rama

Orientador: Dra.PhD. Ana Meikle

Co – Orientador: Dr. PhD. Otto Pritsch

Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria
Universidad de la República



Unidad de Biofísica de Proteínas
Instituto Pasteur de Montevideo



Financiación:



Contacto: E-mail: ramosum@pasteur.edu.uy

TABLA DE CONTENIDOS

1- RESUMEN	5
2- ANTECEDENTES	7
2.1. Definición de la enfermedad	7
2.2. Impacto económico de la enfermedad y situación en Uruguay	7
2.3. Descripción del virus VLB	8
2.4. Transmisión	10
2.5. Etiopatogenia y sintomatología clínica	10
2.6. Diagnóstico de laboratorio de la LEB y su evolución	12
2.7. Prevención y control	17
2.8. Caracterización del Problema	17
3- HIPOTESIS	19
4- OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos específicos	19
5- METODOLOGIA	19
5.1. Experimento 1	20
5.1.1. ELISA	20
5.1.2. Análisis estadístico	21
5.2. Experimento 2	21
5.2.1. Muestras	21
5.2.2. Diagnóstico por test serológicos y <i>nested</i> PCR	22
5.2.2.1. Extracción de ADN	22
5.2.2.2. <i>Nested</i> PCR	23
5.2.3. Amplificación de fragmentos del gen gp51 por PCR en tiempo real	24
5.2.4. Análisis de datos	26
6- RESULTADOS	27
6.1. Experimento 1	27
6.2. Experimento 2	30
6.2.1. Desarrollo de la PCR en tiempo real	30
6.2.2. Análisis comparativo de metodologías para el diagnóstico de VLB	34
7- DISCUSIÓN	34
8- CONCLUSIONES	40
9- BIBLIOGRAFÍA	41

Desarrollo y análisis comparativo de una nueva herramienta para el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina; Impacto del descenso de AC anti-VLB circulantes en el periparto para el diagnóstico serológico

1- RESUMEN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que afecta principalmente a bovinos de leche vinculados a sistemas productivos intensivos. Dicha enfermedad tiene un impacto económico significativo y en nuestro país, estudios realizados en el año 2003 en rodeos lecheros, encuentran una prevalencia de aprox. 70%. El 65% de los animales infectados son portadores asintomáticos del virus, siendo posible detectar la presencia de anticuerpos circulantes anti-VLB, o la presencia de ADN proviral en los linfocitos afectados. El hecho que VLB permanezca integrado de por vida al genoma del bovino infectado, la falta de vacunas efectivas y las dificultades de implementar un programa de erradicación de la LEB, hacen que el diagnóstico sea esencial para el control de la infección. Esta maestría tuvo como objetivos estudiar el cambio fisiológico de la inmunodepresión del parto sobre el diagnóstico serológico de LEB por ELISA y desarrollar una nueva metodología rápida, específica y sensible que permita además cuantificar ADN genómico proviral.

Para cumplir con el primer objetivo se clasificaron vacas Holando (n=15) dos meses antes del parto en tres grupos acorde a los títulos de anticuerpos anti-VLB en: negativo (con densidades ópticas (DO) por debajo del control positivo leve incluido en el kit), positivos fuerte y leve (con DO superiores o inferiores al doble de las del control positivo respectivamente). Los animales se sangraron cada 20 días desde los días -50 al +50 (0=parto). Los sueros obtenidos fueron analizados por ELISA y las densidades ópticas se analizaron por ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. Los títulos de anticuerpos disminuyeron alrededor del parto. Para el grupo positivo leve las disminuciones de DO fueron

entre 40% y 60% de los niveles iniciales, e implicó en todos los casos pasar de un diagnóstico positivo a negativo (falsos negativos desde el día -20 al +50). Se concluye que la inmunosupresión afecta los títulos de anticuerpo anti-VLB dando lugar a falsos negativos y que se debe evitar extraer la muestra de sangre en este período para realizar el diagnóstico serológico de LEB.

Para el desarrollo de una nueva metodología para el diagnóstico de LEB se optimizó una PCR en tiempo real a partir del diseño de varios juegos de *primers* y de la construcción de una curva estándar a partir de la dilución de un plásmido con una sola copia del gen gp51 en ADN ovino negativo. El análisis comparativo (n=45) comprendió el cálculo de sensibilidad, especificidad, eficiencia y valor predictivo positivo y negativo con los métodos IDGA, ELISA y *nested* PCR. La sensibilidad del ensayo fue de 2500 copias de gp51/μg ADN y pudo detectar 18% y 27% más positivos que ELISA e IDGA respectivamente. La especificidad fue de 94 % y la eficiencia de 88%, el resultado tuvo alta concordancia con la *nested* PCR. La metodología demostró ser una herramienta simple, de bajo costo, capaz de detectar y cuantificar VLB en muestras de ADN bovino y de gran utilidad para detectar animales positivos en rodeos de alta prevalencia principalmente.

2- ANTECEDENTES

2.1. Definición de la enfermedad

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que infecta preferencialmente a los linfocitos B de bovinos y afecta en mayor medida a los sistemas de producción intensivos como los tambos (de la Sota, 2004). La infección del VLB se caracteriza por un largo período de incubación, por la falta de sitios definidos de integración al genoma de la célula huésped, y la evolución oncogénica en una pequeña proporción de los individuos infectados (Kettmann et al. 1994). La mayoría de los animales infectados (60%) son portadores asintomáticos del virus, siendo posible detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra antígenos virales, o la presencia de ADN proviral en los linfocitos afectados (animales aleucémicos). Aproximadamente entre un 30 y 35% de los animales infectados presentan una linfocitosis persistente (LP) caracterizada por una expansión policlonal de linfocitos B CD5+. Finalmente, entre un 5 y 10 % de los bovinos infectados desarrollan un linfosarcoma, que se caracteriza clínicamente por la presencia de tumores (Burny et al. 1988, Kettmann et al. 1994).

2.2. Impacto económico de la enfermedad y situación en Uruguay

En particular la LEB afecta principalmente al ganado lechero. En Uruguay, el sector lácteo es responsable del 15% del producto bruto agropecuario. La incorporación de tecnología llevó a pasar de 1.695 a 3.388 litros por vaca en producción en los últimos 15 años, y hoy, más del 50% del área lechera tiene pasturas mejoradas (Bonifacino, 2008). Nuestro país se ha transformado en una nación exportadora de lácteos, al extremo de que más del 63% de la producción se destina a mercados internacionales (DIEA-MGAP, 2012). Los productos que se exportan son, fundamentalmente, leche en polvo, quesos (pasta dura y blanda), leche UHT, manteca, dulce de leche y suero de queso concentrado (DIEA- MGAP, 2012).

La LEB tiene un impacto significativo desde un punto de vista económico en el descenso de la productividad doméstica y la pérdida de mercados internacionales, relacionado con: a) la mortalidad causada directamente por la patología tumoral; b) la alteración del sistema inmune del ganado infectado y el aumento concomitante de otras patologías infecciosas; c) en el aumento en el uso de medicamentos veterinarios; d) la restricción de la exportación de ganado en pie, semen y embriones infectados. Asimismo, pueden detectarse rastros de linfocitos infectados con VLB (ADN proviral) en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer et al. 2006), por lo que las restricciones podrían potencialmente extenderse a la exportación de estos productos.

En un trabajo realizado en 1996 en el Noreste del Uruguay, se analizaron 400 animales pertenecientes a 30 establecimientos lecheros; la prevalencia de la LEB determinada por ELISA fue de un 20%, mientras que el 77 % de los predios presentó algún caso positivo al virus (Mederos e Irigoyen, 1998). En un plan piloto de monitoreo de salud animal realizado en 1998 por la Facultad de Veterinaria se determinó un 46,6 % de seroprevalencia en 53 establecimientos muestreados en el departamento de Florida (Gil et al. 1998, Com. Pers.). En el año 2003, la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77 %, 72 % y 57 %, respectivamente (Zaffaroni et al. 2007). Se sugirió que la falta de programas de control de esta enfermedad y la aplicación del programa de vacunación contra la fiebre aftosa en el 2001, podrían explicar el aumento de la prevalencia de LEB en Uruguay en la última década (Zaffaroni et al. 2007). Además, la exigencia de libre de Leucosis Bovina por los mercados internacionales para la exportación nacional de ganado en pie, genera concentración de animales positivos en nuestros rodeos (Acta 84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, CONAHSA, 2005).

2.3. Descripción del virus VLB

El VLB es un retrovirus exógeno que junto al virus T-linfotrópico humano (HTLV) y el virus T-linfotrópico de simios (STLV) pertenecen al género deltavirus de la familia *Retroviridae*. Estos retrovirus exhiben *in vivo*

linfotropismo y son capaces de regular la expresión de sus genes, con proteínas expresadas a partir de su propio genoma, en particular, la proteína viral reguladora denominada Tax, puede transactivar tanto genes virales como celulares (Poiesz, 1995).

El genoma viral consta de una región interna con tres genes estructurales (gag, pol y env), de dos regiones externas iguales ubicadas en los extremos 5' y 3' (genes LTRs), y de una región llamada X o pX. Esta región se ubica entre el gen env y el LTR del extremo 3' y codifica al menos para 4 genes; Tax, Rex, RIII y GIV, los cuales están involucrados en la regulación de la expresión viral (Alexandersen, 1993; Kerkhofs, 1998).

La partícula viral consiste principalmente en dos moléculas de ARN simple hebra, estabilizados mediante interacción con la nucleoproteína p12 (nucleocápside). Este complejo a su vez está rodeado por una estructura denominada cápside, formado por el autoensamblado de la proteína p24. Rodeando a la cápside se encuentra una malla de proteínas de matriz las cuales entran en contacto directo con una membrana celular formada por una bicapa lipídica. Esta incluye a la glicoproteína de envoltura Env que se cliva por proteólisis en gp30 transmembrana y en la glicoproteína de superficie gp51. El genoma viral codifica también para las enzimas transcriptasa reversa y proteasa, y para las proteínas reguladoras Tax y Rex.

La fase inicial de la infección del VLB involucra el reconocimiento específico de las proteínas externas de la envoltura viral por parte de la célula huésped, y la penetración, a través del mecanismo de fusión (Brasseur, 1988). En el citoplasma se sintetiza una copia de ADN complementario a partir del ARN viral utilizando la enzima transcriptasa reversa. La nueva molécula de ADN penetra al núcleo celular, se integra al azar al genoma celular en forma de provirus y permanece integrado de por vida en la célula infectada (Luciw y Leung, 1994).

Los primeros estudios sobre variabilidad genética de VLB mostraron muy poca variación entre las diferentes estirpes analizadas (Coulston et al. 1990). La baja heterogeneidad genética de VLB se fundamenta en su relativamente lenta tasa de sustitución nucleotídica (Willems et al. 1993). Sin embargo, estudios sobre la variabilidad genética y modo de evolución del virus, revelaron que VLB presenta un modo de evolución y una epidemiología molecular más compleja de la anteriormente prevista. Distintos estudios permitieron clasificar al virus en

distintos grupos genéticos, los mismos se denominaron según la ubicación geográfica en donde se aislaron, Bélgica, Australia y Japón (Beier et al. 2001), Chile (Felmer et al. 2005), Brasil y Argentina (Camargos et al. 2007; Monti et al. 2005). Recientemente nuestro grupo ha analizado la variabilidad de las estirpes de VLB circulantes en América del Sur (incluyendo Uruguay) demostrando la circulación en la región de los 7 genotipos descritos previamente (Moratorio et al. 2010). Asimismo, se han caracterizado en detalle 3 genomas virales completos de VLB obtenidos a partir de linfosarcomas, encontrando un conjunto pequeño de mutaciones que podrían relacionarse con una supresión de la expresión de proteínas virales que a su vez podría constituir una estrategia viral para escapar a la respuesta inmune del hospedero (Moratorio et al, 2012 en prensa).

2.4. Transmisión

La transmisión del VLB puede ser horizontal o vertical. La transmisión horizontal es considerada la más importante y generalmente ocurre por malas prácticas de manejo (iatrogenia), por contacto con sangre, mucosas, remanentes de tejidos infectados y por insectos hematófagos (Mammerickx et al. 1987; de la Sota, 2004). La transmisión vertical (hasta un 15 %), ocurre ya sea vía transplacentaria o vía células presentes en calostro hacia la progenie (Hopkins y DiGiacomo, 1997). Dado que el VLB se encuentra integrado al genoma de los linfocitos B, siendo raro encontrarlo en forma de partículas virales libres (Johnson y Kaneene, 1992), los materiales o muestras biológicas que puedan contener éste tipo de célula representan un potencial riesgo de infección. Además, la transmisión natural en rodeos lecheros se produce más rápidamente en establecimientos con alta prevalencia de la infección que en aquellos con baja o moderada prevalencia (Dimmock et al. 1991).

2.5. Etiopatogenia y sintomatología clínica

Después de la entrada del virus en el organismo del hospedador, el VLB tiene tropismo preferencialmente por los linfocitos B CD5+ en estado maduro (Aida

et al. 1989). Durante la infección inicial, el ADN viral codificado (provirus) puede producir viriones verdaderos, escapar de las células hospederas e infectar otras células. Entre 10 y 12 días post-infección existe una respuesta inmune humoral y celular donde se producen anticuerpos contra las proteínas estructurales de la cápsula viral que reprimirían eficientemente la replicación del VLB (Garcia et al. 1995; Leite et al. 2004). Florins et al. (2007), propusieron que la represión de la expresión viral sería efectiva solo en una proporción de las células infectadas, mientras que la respuesta inmune eliminaría aquellas células con una transcripción viral activa, permitiendo solo una expansión mitótica de las células que portan el provirus. A pesar de estos trastornos hematológicos, la evolución de la enfermedad en el comienzo es asintomática (65% de los bovinos infectados) por un tiempo prolongado, incluso esta situación puede mantenerse de por vida. (Cockrell y Reyes, 2000; Willems et al. 2000). Esta fase de la infección es caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-VLB, en donde menos de 5% de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) poseen el provirus. Aproximadamente el 30% de los animales infectados desarrollan una proliferación benigna policlonal de células B maduras o Linfocitosis Persistente (LP), en un período de 2 a 3 años post-infección (Ferrer et al. 1978; Alexandersen, 1993; Schwartz y Levy, 1994) en donde se invierte la relación normal de linfocitos B/linfocitos T (Lewin, 1988). La minoría de los animales infectados (1 a 5%) después de 3 a 8 años de la infección, desarrolla un proceso neoplásico que puede dar lugar a un linfosarcoma o linfoma maligno de origen clonal, involucrando ganglios linfáticos principalmente pudiendo llegar a afectar el abomaso, corazón, hígado, bazo, riñones y útero (Heeney, 1992; Kettman, 1994). La sintomatología presentada por el animal depende de la localización de la masa tumoral y del grado de afección del órgano (Toma et al. 1990), llevando al animal a la muerte en un período de 1 a 6 meses desde el inicio de la sintomatología (Willems et al. 2000; de la Sota, 2004; Florins et al. 2007). En la mayoría de los casos los síntomas son inespecíficos y variables, ya que dependen de la localización del proceso neoplásico y del grado de afección de órganos de importancia vital. El signo más específico y frecuente es el agrandamiento bilateral más o menos simétrico de los ganglios linfáticos.

La alta incidencia de esta enfermedad en rodeos lecheros se asocia a las exigencias metabólicas a la que se ha llegado por una selección genética por grandes volúmenes de leche. La transición del estado preñada no lactante al no preñado lactante es un período de cambios dramáticos para la vaca, la cual debe adaptar su metabolismo a las fuertes exigencias que le demanda la producción. A la alta demanda metabólica por producción de leche se le suma la disminución (~30%) del consumo previo al parto (Grummer, 1995) que promueve la movilización de reservas corporales, es decir, el balance energético negativo. En este marco biológico, la actividad del sistema inmune de la vaca está fuertemente deprimida alrededor del parto. La capacidad de los linfocitos para responder y la producción de anticuerpos está también afectada alrededor del parto (Kehrli et al. 1989). Además existe una disminución dramática de los niveles séricos totales de IgG e IgM en el período entre la semana 8 previa al parto y la cuarta semana postparto (Herr et al. 2011). Esta es la base conceptual que explica la alta incidencia de afecciones de diversa índole en este período (Meikle et al. 2012). Al momento de realizar esta tesis no existían reportes que estudiaran si la inmunodepresión afectaba los títulos de anticuerpos específicos anti-VLB.

2.6. Diagnóstico de laboratorio de la LEB y su evolución

Los animales que presentan linfoma pueden ser detectados mediante diagnóstico clínico, pero aquellos infectados asintomáticos y/o con LP requieren de pruebas de laboratorio para realizar el diagnóstico. Las manifestaciones clínicas de LEB comienzan después de los dos años de edad, aunque el período de mayor frecuencia es de 5 a 8 años.

Los primeros estudios realizados para intentar establecer formas de diagnóstico y también del control de la enfermedad fueron realizados en el continente europeo (Knuth y Volkmann, 1916). Las alteraciones hemáticas fueron consideradas como fase pretumoral de LEB utilizando las claves leucométricas que facilitaron el diagnóstico de la LEB y posibilitaron el control de la enfermedad en países como Alemania y Dinamarca (Gotze et al. 1954; Bendixen, 1961; Tolle, 1965). Existen trabajos donde se reporta una

variabilidad de 30% a 70% de animales infectados que presentan linfocitosis persistente (Felmer et al. 2006). A nivel nacional Sienra et al. (1989), mostraron que del conjunto de animales que presentaban leucocitosis, la mayor proporción eran VLB positivos por ELISA. Además, determinaron que los animales seropositivos tienen mayor promedio de leucocitos y linfocitos circulantes que los seronegativos, mientras que no encontraron diferencias significativas promedio con respecto a neutrófilos, eosinófilos y monocitos. Por otro lado, Collazo et al. (2002) mostraron que la frecuencia de muestras con recuento de leucocitos totales aumentado es significativamente mayor en vacas seropositivas con respecto a sus congéneres seronegativos. De acuerdo con estos resultados, se reportó que el 92 % de los animales VLB negativos presentaron valores normales de linfocitos, mientras que el 66 % de los positivos presentaron niveles patológicamente aumentados (Rama et al. 2010). Con el desarrollo e introducción de IDGA, se pudieron evidenciar importantes limitaciones de sensibilidad y especificidad de las claves hematológicas, perdiéndose el interés por las alteraciones hematológicas como herramienta de diagnóstico, epidemiología y control de la LBE.

El hecho de que Miller et al. (1969) aislaran por primera vez el VLB, permitió aumentar los estudios en relación a la producción de anticuerpos bovinos específicos dirigidos contra proteínas virales estructurales como p24 y gp51. Esto permitió el desarrollo de técnicas diagnósticas indirectas, que detectan la respuesta inmune específica anti-VLB. En 1972 se comprobó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra VLB en suero de bovinos con tumores linfoides utilizando el ensayo de inmunofluorescencia (Miller y Olson, 1972). Posteriormente se desarrolló la inmunodifusión en gel agar (IDGA) (Miller y Olson, 1972), la seroneutralización (Ferrer et al. 1976), el radio-inmunoensayo (McDonald y Ferrer, 1976) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima ELISA (Altaner et al. 1982) como métodos diagnósticos del VLB. Los métodos más comúnmente usados capaces de detectar la presencia de anticuerpos específicos principalmente dirigidos contra la glicoproteína gp51 a nivel de suero, plasma o leche son el IDGA y el ELISA (Martín et al. 2000; González et al. 2001).

El test de IDGA que utiliza como antígeno a gp51 fue difundido en todo el mundo después de la década de los 80 con la finalidad de realizar estudios epidemiológicos y de control de la enfermedad (Johnson y Kaneene, 1992) por ser un método específico, más sensible y práctico que las claves hematológicas, y que se puede realizar a campo, sin necesidad de contar con mucha infraestructura. Si bien la prueba de IDGA es un método simple de realizar y tiene un alto nivel de especificidad (Monke et al. 1992), hay que considerar que la sensibilidad puede ser baja (hasta un 75%), y que su interpretación es subjetiva, en particular en el caso de reacciones débiles, y depende de la experiencia del operador que realiza la lectura (Klintevall et al. 1991). Varios trabajos que comparan metodologías diagnósticas han reportado que IDGA presenta menos sensibilidad que ELISA (Fechner et al. 1996; Martín et al. 2001; Trono et al. 2001; Felmer et al. 2006; Camargos et al. 2007). En nuestro país Rama et al (2010), reportaron que el IDGA tiene una sensibilidad de 72% comparado con el ELISA, lo que concuerda con estos trabajos. Además el ELISA permite obtener un resultado más objetivo y requiere de menos tiempo de incubación de la muestra, por lo que es más rápido que el IDGA en el procesamiento (Kaja et al. 1984; Portetelle y Mammerickx, 1986). Hoy en día la Organización Mundial de la Salud Animal (Beier, 2008) reconoce a la IDGA y al ELISA como métodos diagnósticos de la LEB y recomienda a los gobiernos la utilización del ELISA como método oficial de diagnóstico. Los anticuerpos séricos contra las proteínas estructurales gp51 y p24 persisten durante toda la vida, aunque su título puede sufrir fluctuaciones, y llegar a no ser detectables por las pruebas serológicas de rutina, como IDGA y ELISA (Ferrer et al. 1977; Agresti et al. 1993).

Por otra parte se han desarrollado métodos directos los cuales son capaces detectar ADN del VLB proviral en células bovinas de distintas procedencias. El método directo que ha sido más utilizado es el ensayo de inducción de sincicios, que se basa en la propiedad del VLB de inducir la formación de células multinucleadas cuando se co-infectan células permisivas al VLB (CC81, Raji) con los linfocitos de un individuo infectado (Ferrer et al. 1981; Johnson et al. 1998).

Una relevante revolución metodológica fue el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método diagnóstico directo, capaz de

detectar y amplificar fragmentos conservados y específicos del ADN del VLB que integra el genoma de las células provenientes del animal infectado (Ballagi-Pordany et al. 1992; Felmer et al. 2006). Se ha detectado ADN proviral en ADN extraído de PBMC, tejidos, leche y semen por medio de PCR tradicional lo que implica una diferencia con los métodos serológicos (Naif et al. 1990; Murtaugh et al. 1991; Kelly et al. 1993; Eaves et al. 1994; Klintevall et al. 1994; Tajima et al. 1998, Reichert y Stec, 1999).

Las modificaciones de la PCR tradicional, *nested* PCR, PCR duplex, PCR-EIA y PCR-ISH fueron utilizadas con éxito para detectar directamente el genoma del VLB (Kubis et al. 2007). Distintas regiones del genoma viral fueron utilizadas en el desarrollo de la detección del ARN del VLB o del ADN proviral por PCR, como son los genes gp51-env, gag-p24, pol, y px (Brandon et al. 1991; Murtaugh et al. 1991; Sherman et al. 1992; Poon et al. 1993).

La PCR tradicional permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica, animales cursando un período prolongado de latencia o animales con una baja carga de exposición del virus, así como la detección del virus en terneros infectados que recibieron calostro de madres seropositivas (Kaaden et al. 1982). Además podría detectar ADN proviral en animales inmunotolerantes a VLB que son serológicamente negativos (Fechner et al. 1997; Monti et al. 2005). Por otro lado, Fechner et al. (1997) proponen que ciertas variantes en la secuencia del VLB podrían ser menos inmunogénicas que otras generando, por lo tanto, resultados serológicos negativos en animales infectados. Sin embargo, otros estudios no logran determinar una correlación entre el genotipo del VLB y el estado serológico de los animales infectados, y proponen que las diferentes respuestas antivirales podrían estar relacionadas con el estado de la infección y otros factores del hospedador (Licursi et al. 2003). En particular, la expresión del gen BoLA DRB3.2 ha sido asociada a la susceptibilidad o resistencia del hospedador al aumento de la carga viral (Juliarena et al. 2008).

La sensibilidad de la técnica dependerá de la carga proviral que posea el animal, es decir del número de células infectadas con VLB en circulación, y de la eficiencia del método de extracción de ADN o ARN utilizado. La utilización de

PCRs anidadas (*nested PCR*) aumenta significativamente la sensibilidad del ensayo (Kuckleburg et al. 2003; Lew et al. 2004), pero presenta la desventaja de requerir un laboratorio apropiado con infraestructura necesaria para disminuir la probabilidad de contaminación cruzada, muy frecuente en la operativa de este método. La *nested PCR* es aceptada actualmente por la OIE como prueba de diagnóstico de VLB, aunque en forma alternativa como prueba confirmatoria de las pruebas serológicas mencionadas (Beier, 2008).

Ha sido reportado en publicaciones internacionales que el PCR es más sensible que ELISA e IDGA, siendo esta última la que detecta menor número de animales positivos (Fechner et al. 1996; Martín et al. 2001; Trono et al. 2001; Felmer et al. 2006; Camargos et al. 2007). Estos trabajos concuerdan con un estudio comparativo de métodos realizado en nuestro país, en donde la *nested PCR* detectó 18% y 27% más positivos que IDGA y ELISA respectivamente (Rama et al. 2010).

En los últimos años se ha incorporado el uso de la PCR en tiempo real o real-time PCR al diagnóstico de VLB (Kuckleburg et al. 2003; Lew et al. 2004) utilizando sondas TaqMan. Esta técnica permite cuantificar la carga proviral, expresar el número de copias de ADN proviral en circulación sanguínea, por masa de ADN en la reacción o volumen de sangre (Achachi et al. 2005). Además presenta las ventajas comparativas, frente a la *nested PCR*, de evitar la utilización de geles de agarosa, reducir la probabilidad de obtener contaminación cruzada y tener la capacidad de analizar un alto número de muestras de forma automática.

Hasta el momento de la realización de esta tesis no existían reportes científicos del diagnóstico de PCR tiempo real sin la necesidad de la utilización de sondas. Lee et al. (2004) y Mehta et al. (2009) desarrollaron una PCR en tiempo real usando SYBR Green para detectar y cuantificar al HTLV y HIV, virus que están funcional y estructuralmente emparentados al VLB. La utilización de la PCR en tiempo real con SYBR Green tiene el beneficio de eliminar el diseño de la sonda, reducir el costo por reacción y simplifica el procedimiento.

2.7. Prevención y control

En ausencia de vacunas efectivas, numerosos países han implementado campañas de control y/o erradicación de esta enfermedad. Por ejemplo, la Unión Europea luego de muchos años ha logrado que 12 de los 15 países originales del bloque se encuentren actualmente libres de LEB (Rodríguez et al. 2011).

Los programas de erradicación exitosos realizados en Europa, implicaron la puesta en marcha de: a)- cambios en la práctica veterinaria para evitar la transmisión viral; b)- diagnóstico rutinario (3 veces al año) de la totalidad del rodeo bovino; c)- separación física de los animales positivos de los negativos.

Por lo antedicho, la puesta en marcha de un Programa de Erradicación de Leucosis en Uruguay, requerirá de un conjunto de tecnologías de bajo costo, sensibles y específicas, que permitan realizar el diagnóstico de un alto número de muestras.

2.8. Caracterización del Problema

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa y crónica que al ingresar al bovino integra definitivamente el genoma del mismo. Afecta a los bovinos en general principalmente a las producciones intensivas como los tambos. Se estima que Uruguay tiene una prevalencia superior al 70%, y se ha sugerido que falta de programas de control de esta enfermedad, así como la exigencia de libre de Leucosis Bovina para la exportación animal, llevó a un aumento de su prevalencia en nuestro país. (Acta 84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, CONAHSA, 2005).

Actualmente en Uruguay los métodos diagnósticos más frecuentemente utilizado son *kits* de ELISA e IDGA. Sin embargo, existen animales que estando infectados por el VLB no desarrollan una respuesta efectiva de anticuerpos dando resultados falsos negativos (Fechner et al. 1997; Juliarena et al. 2008). Además, los métodos diagnósticos serológicos comerciales utilizan una única dilución de suero y frecuentemente no contemplan las variaciones de la concentración total de Ac circulantes relacionada con el estado fisiológico o reproductivo del animal. En el modelo bovino, se conoce desde hace más de

50 años que los niveles de varias globulinas séricas disminuyen en sangre durante el parto (Larson y Kendall, 1957). En particular, durante la calostrogénesis existe un descenso en la concentración de inmunoglobulinas (Ig) totales (principalmente IgG) en la sangre circulante materna, ya que la mayoría de las inmunoglobulinas presentes en el calostro no son sintetizadas en la glándula mamaria sino que provienen directamente de la sangre materna (Larson, 1958). Este descenso de la concentración de Ac totales podría aumentar la presencia de falsos negativos en el parto (Ferrer, 1980; BurrIDGE et al. 1982; Hübner et al. 1996, Erverman y Jackson, 1997). La investigación respecto de la dinámica de los títulos de Ac contra VLB en el parto es escasa. Se ha reportado la detección de un mayor porcentaje de falsos negativos utilizando IDGA como método de diagnóstico en vacas que se encuentran cercanas al parto (BurrIDGE et al. 1982; Hübner et al. 1996), mientras que esto no ocurre cuando el ELISA es utilizado como método de diagnóstico (Tekes 1994). No se han encontrado otros estudios al respecto.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la determinación directa del ADN proviral superaría el inconveniente de la fluctuación de anticuerpos anti-VLB. La *nested* PCR aceptada actualmente por la OIE como prueba de diagnóstico de VLB, es una herramienta sensible y específica, sin embargo, es laboriosa, requiere de tiempo y presenta una alta probabilidad de contaminación cruzada. En los últimos años se ha incorporado el uso de la PCR en tiempo real al diagnóstico de VLB (Kuckleburg et al. 2003; Lew et al. 2004) utilizando sondas TaqMan. Aunque la utilización de la sonda significa un aumento en el costo por reacción, la técnica permite cuantificar el número de copias de ADN proviral en circulación sanguínea o carga proviral.

La instrumentación de un Programa de Erradicación de Leucosis en Uruguay, requerirá de un conjunto de tecnologías que permitan realizar a bajo costo, alta sensibilidad y especificidad el diagnóstico de LEB.

3- HIPOTESIS

La inmunodepresión fisiológica que ocurre alrededor del parto en vacas lecheras Holando podría modificar los títulos de anticuerpos contra VLB y aumentar la presencia de falsos negativos por ELISA.

La PCR en tiempo real utilizando SYBR Green es una metodología útil, rápida, sensible y específica para detectar y cuantificar la carga proviral del VLB en bovinos.

4- OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Aportar al conocimiento de la LEB; estudiar el efecto inmuno-fisiológico del parto sobre el diagnóstico serológico por ELISA y desarrollar una nueva metodología sensible y específica para la detección y cuantificación del Virus de la Leucosis Bovina en bovinos en producción.

4.2. Objetivos específicos

- a) Cuantificar el título de Ac específicos contra VLB durante el periparto en grupos de animales con diferentes títulos de anticuerpos en sangre circulante en el preparto lejano.
- b) Desarrollar un método directo de diagnóstico de LEB mediante PCR en tiempo real con SYBR Green.
- c) Determinar y comparar la sensibilidad y especificidad de los métodos de IDGA, ELISA, *nested* PCR y PCR *real time* para la detección de VLB.

5- METODOLOGIA

Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo a las pautas de experimentación animal de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República.

5.1. Experimento 1

Este experimento se realizó para cumplir con el primer objetivo: cuantificar el título de Ac específicos contra VLB durante el periparto en grupos de animales con diferentes títulos de anticuerpos en el preparto. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) para extraer el suero. Se realizó el diagnóstico serológico de LEB a un grupo de 60 vacas de raza Holando de entre 3 y 8 años de edad (Lactancias de 1 a 5), pertenecientes a un tambo del departamento de Paysandú mediante el uso de un *kit* de ELISA comercial (ver debajo). De acuerdo a lo recomendado por el fabricante del *kit*, el punto de corte entre resultados negativos y positivos se determinó para cada placa mediante la determinación por triplicado de la densidad óptica (D.O.) de un control positivo diluido y estandarizado para tal fin.

De este grupo se seleccionaron 5 vacas serológicamente negativas (con valores de D.O. por debajo del punto de corte), 5 vacas positivas fuertes (con valores de D.O. mayores al doble del punto de corte) y 5 vacas positivas leves (con valores de D.O. menores al doble del punto de corte). Por otro lado, estas 15 vacas también fueron seleccionadas según fecha de parto prevista buscando partos concentrados en la estación de otoño.

A este grupo de 15 vacas se les extrajo sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) cada 20 días, se abarcó un rango desde el día 50 previo al parto hasta el día 50 posterior al parto. El total de las muestras (n=90) correspondientes a los 15 animales se analizaron en una misma placa de ELISA perteneciente a un *kit* comercial para Ac contra VLB para suero bovino.

Para estudiar el efecto en la D.O. en función de la variación de la concentración de Ac específicos contra VLB se realizaron diluciones seriadas (relación 1:2) de un suero positivo fuerte (con alta D.O.) a partir de la dilución 1/25 hasta 1/1600.

5.1.1. ELISA

Se utilizó un *kit* comercial para la detección de Ac contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA), aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las

indicaciones del fabricante, utilizando 50 μ L de suero diluido a 1/25. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa incluidos en el *kit*, que poseen una baja concentración de Ac contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus D.O. Este *kit* fue utilizado previamente por el grupo de investigación (Rama et al. 2010).

5.1.2. Análisis estadístico

Los datos de D.O. se procesaron con un análisis de medidas repetidas en el tiempo (procedimiento mixto, software SAS, SAS Institute Inc. 2000, Cary, NC, USA). El período se incluyó como variable categórica y se definieron períodos respecto al parto con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70). El modelo estadístico incluyó como efectos fijos el período, la categoría (positivos fuertes, positivos leves y negativos) y sus interacciones. Se consideró $P < 0.05$ como significativo y valores entre $P > 0.05$ y $P < 0.10$ como tendencia.

5.2. Experimento 2

Este experimento se realizó para cumplir con los restantes objetivos que fueron desarrollar un método directo de diagnóstico de LEB mediante PCR en tiempo real con SYBR Green y comparar la sensibilidad y especificidad con otros métodos de diagnóstico.

5.2.1. Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 45 vacas de raza Holando de entre 3 a 7 años de edad, pertenecientes a un tambo localizado en el Departamento de Paysandú, Uruguay mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) con y sin anticoagulante (K2 EDTA) para extraer ADN y suero respectivamente. Las muestras de sangre se almacenaron de 24 a 36 hs a -4°C hasta ser procesadas. Las muestras de sueros se obtuvieron por centrifugación durante 10 min a 2000 rpm y luego se

almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. La muestra de sangre ovina fue colectada de un Ovino VLB negativo de raza Corriedale de 6 meses de edad del campo experimental de URBE perteneciente a la Facultad de Medicina (UdelaR) por venopunción de la vena yugular con vacutainer. En nuestro laboratorio disponemos de células FLK (en inglés, Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con VLB las cuales fueron utilizadas como control positivo. Se ha descrito que esta línea celular contiene 4 copias provirales de VLB integradas en su genoma (Van der Maaten y Miller, 1976). Un segundo control positivo FLK 1% se obtuvo a partir de la extracción de ADN genómico de una mezcla células con la siguiente proporción células FLK : PBMC bovinas no infectadas = 1 : 99.

5.2.2. Diagnóstico por test serológicos y *nested* PCR

La infección del virus de la leucemia bovina determinada por PCR en tiempo real fue analizada mediante un estudio comparativo con IDGA, ELISA y *nested* PCR. El test de IDGA utilizado fue un *kit* comercial, gentilmente cedido por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata (FCV-UNLP) – Argentina (aprobado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agrolimentaria, SENASA, Argentina, Exp. 41.285/87). Se utilizó una solución de agar al 1% en buffer Tris-HCl con 8.5% de NaCl pH 8, se sembraron 35 µL de cada muestra y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda hasta su lectura final a las 72 hs. Se utilizó un control positivo, incluido en el *kit*, por cada dos muestras problema. El *kit* de ELISA utilizado fue el mismo que en el Experimento 1. Estos dos tests serológicos utilizados están incluidos en Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (OIE) (Beier, 2008).

5.2.2.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló utilizando una modificación del protocolo tomado de Miller et al. (1988), utilizando muestras de sangre no coagulada. El primer paso fue lisar las membranas (buffer de lisis), y se digirieron con proteinasa K, luego se agregó sal (NaCl) para separar las proteínas celulares del ADN. Después se centrifugó y las proteínas formaron un pellet y el ADN fue trasladado a un tubo con alcohol absoluto para que precipite. Por último, el ADN se transfirió con

una pipeta a otro tubo con buffer TE para ser conservado a - 20 °C, hasta ser procesado.

5.2.2.2. Nested PCR

Se realizó una PCR anidada para amplificar una región altamente conservada del gen env que codifica para la gp51 de la envoltura viral del VLB. Para la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores: 5'-ATG CCY AAA GAACGA CGG-3' (sentido) y 5'- CGA CGG GAC TAG GTC TGA CCC -3' (antisentido). El programa de termociclado utilizado fue: 2 min a 95 °C, y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 58 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C, y se obtuvo un producto de amplificación correspondiente a un fragmento de 903 pares de bases (pb) (Moratorio et al. 2010). A partir de 5 µL del producto de esta primera amplificación se realizó una segunda ronda de PCR (amplificación anidada), utilizando los cebadores 5'-CTT TGT GTG CCA AGTCTC CCA GAT ACA-3' (sentido) y 5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3' (antisentido). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 95 °C y 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 57 °C y 1 min a 72 °C. El tamaño del fragmento obtenido fue de 440 pb (Ballagi-Pordani et al. 1992). En ambas reacciones se trabajó con un volumen final de 50 µL compuesto por: 100 ng de ADN genómico (primera ronda) o 5 µL del primer producto de amplificación (segunda ronda), 1x buffer (20 mM Tris HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 200 nM de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, USA). Los ciclados se realizaron en un termociclador Multigene (Corbett, modelo CG1-96) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (Syngene, Synoptics, Ltd.) luego de su electroforesis en gel de agarosa al 2 % y posterior tinción con bromuro de etidio (EtBr). Los productos fueron comparados con aquellos visualizados al utilizar el 100 bp DNA ladder (Invitrogen, CA, USA) como marcador de peso molecular. En todos los ensayos se utilizó como control positivo ADN de células FLK y FLK 1%. Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb del gen GAPDH para cada muestra (Tiscornia et al. 2004). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico.

5.2.3. Amplificación de fragmentos del gen gp51 por PCR en tiempo real

Se extrajo ADN genómico Bovino y Ovino desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y de células persistentemente infectadas con el virus (FLK) mediante el método de salting out acorde con Miller et al. (1988). La calidad del DNA fue verificada por espectrofotometría utilizando nanodrop (Thermo, Scientific). Se amplificó por PCR tradicional un fragmento de 400 pb del gen constitutivo GAPDH como control sistémico y para descartar la presencia de inhibidores en las muestras de ADN (Tiscornia et al. 2004).

Varios sets de primers fueron diseñados basados en regiones conservadas del gen viral gp51-env a partir de alineamientos utilizados en Moratorio et al (2010), en donde se analizó la variabilidad del gen gp51 en cepas virales del VLB circulantes en Uruguay (Tabla 1). Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas usando el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) utilizando todas las secuencias del gen de gp51-env disponibles en la base de datos de GenBank. Los oligos fueron diseñados teniendo en cuenta posibles variantes de una sola base nucleotídica entre las distintas cepas virales y tratando de eliminar la formación de dímeros de primers. Las secuencias de estos primers mostraron alta identidad con las 7 cepas de referencia descritas recientemente (Rodriguez et al. 2009; Moratorio et al. 2010).

Se realizó un análisis inicial de especificidad y sensibilidad con todos los oligos diseñados para seleccionar los que pudieron amplificar el producto deseado. Se realizaron varios experimentos para optimizar la amplificación de ADN proviral por el método de PCR en tiempo real utilizando los primers seleccionados (Tabla 1). Se modificaron las concentraciones de los reactivos, las temperaturas de ciclado de la reacción, se utilizaron distintas concentraciones de primers, de ADN, así como distintos número de ciclos y distintas temperaturas de hibridación. El equipo utilizado para llevar a cabo la reacción fue un RotorGene 3000 real time detection system (Corbett Research, Australia). Los parámetros de ciclado de la reacción fueron, 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 3 seg a 95 °C, 40 seg de 60 °C y 5 seg 72 °C. El volumen óptimo de reacción se determinó en 20 µL por cada tubo de reacción; 10 µL KAPA SYBR FAST qPCR Kit (SYBR Green, DNA polymerase, MgCl₂, dNTPs, reaction buffer, USA), 0.4 µL de cada oligo (10 µM), 8.5 µL de agua destilada y 100 ng de ADN. En la optimización de *real time* PCR utilizamos

como estándar a un plásmido con una inserto con una sola copia del gen gp51 completo (pGP51) como para cuantificar la carga proviral del VLB (Moratorio et al. 2010).

Primer ID	Gen	Secuencia	Ubicación en el genoma	Longitud del amplicon (bp)
Nested PCR				
1 st Round				
env-gp51F	gp51	5'-ATGCCYAAAGAACGACGG-3'	4825-4843	915
env-gp51R		3'-CCCAGTCTGGATCAGGGCAGC-5'	5729-5740	
2 nd round				
env-gp51F	gp51	5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCAGATACA-3'	5029-5056	440
env-gp51R		3'-CGGTCATCTAGAATGCTATCGGTAATGTC-5'	5442-5469	
GapDH-F	GapDH	5'-CTGAGAACGGGAAGCTTGTC-3'		400
GapDH-R		5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'		
Real time PCR				
env-gp51F	gp51	5'-GCCATGGTCACATATGATTGC-3'	5134-5155	268
env-gp51R2		3'-CAGTCACTGTTACAGC-5'	5382-5402	
env-gp51F3	gp51	5'-CCTGCATCTYAAACAATGTCATGG-3'	5106-5132	139
env-gp51R3		3'-GGTACTTGCTCACTGACCCAAG-5'	5219-5245	
env-gp51F2	gp51	5'-GCCATGGTCACATATGATTGC-3'	5453-5479	110
env-gp51R2		3'-CGTAGARTTTGTTACAGTACC-5'	5537-5563	
env-gp51F1	gp51	5'-ACYAACAATGGATGACARCA-3'	5247-5270	57
env-gp51R1		3'-GTYAGTGGAAAGACASGGTY-5'	5281-5304	

Tabla 1. Primers utilizados, ubicación en el genoma y longitud del amplicón de los mismos.

La sensibilidad del método se calculó a partir de diluciones en base 10 seriadas (10^9 a 10^{-1}) de pGP51 DNA en ADN ovino BLV-negativo por duplicado. El número de copias de gp51 pertenecientes a pGP51 se determinó calculando el peso molecular del plásmido y las diluciones teniendo en cuenta que la longitud total del plásmido era de 3900 bp y la relación, 660 dalton por cada base, 1 mol

= 6×10^{23} moléculas) (Lew et al. 2004). Los productos de amplificación de la curva estándar con pGP51 fueron analizados por electroforesis. La Muestra de ADN extraído de las células FLK fueron analizadas como control positivo interno asumiendo que contenían 4 copias del genoma proviral por célula y también incluimos una dilución del FLK al 1% en PBMCs purificadas de un bovino no infectado, como describe Gutierrez et al. (2011). Las curvas de disociación fueron generadas después del último ciclo de amplificación para confirmar la amplificación de un solo producto específico y comparar la temperatura de disociación con un cálculo teórico según la siguiente fórmula ($T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$), en donde w, x, y, y z son el número de bases correspondientes a A, T, G y C. Además, los productos de amplificación fueron analizados por secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo.

5.2.4. Análisis de datos

El análisis incluyó análisis comparativo de Sensibilidad, Especificidad, Eficiencia, Valor Predictivo positivo, Valor Predictivo Negativo como define Crowther (2009) tomando la *nested* PCR como método de referencia. Los parámetros se calcularon con las siguientes fórmulas: Sensibilidad = $(VP / (VP + FN)) \times 100$, Especificidad = $(VN / (VN + FP)) \times 100$, Valor Predictivo Positivo = $[VP / (VP + FP)] \times 100$, Valor Predictivo Negativo = $[VN / (VN + FN)] \times 100$, Eficiencia = $[(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)] \times 100$, donde VP: Verdadero Positivo, VN: Verdadero Negativo, FP: Falso Positivo y FN: Falso Negativo.

6- RESULTADOS

6.1. Experimento 1

Se determinó por ELISA la variación de la D.O. en función de diluciones seriadas de Ac específicos anti-VLB a partir de un suero positivo fuerte. En la Figura 1 se representa la curva de titulación obtenida en la cual la D.O. disminuye de forma logarítmica en relación a la dilución del suero.

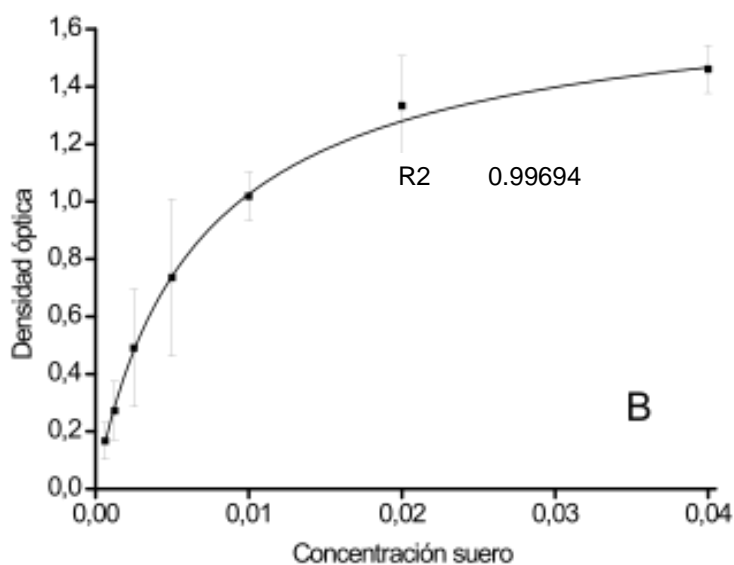


Figura 1. Valores de D.O. en función de la dilución seriada de un mismo suero positivo a VLB (el valor 0,04 corresponde a una dilución del suero 1/25, las diluciones consecutivas se hacen en una relación 1:2.; rango de dilución 1/25 – 1/1600)

En la Figura 2 se observan los valores de absorbancia de los cinco animales de cada grupo normalizados mediante el cociente de la D.O. con el valor establecido como línea de corte para esa placa de ELISA.

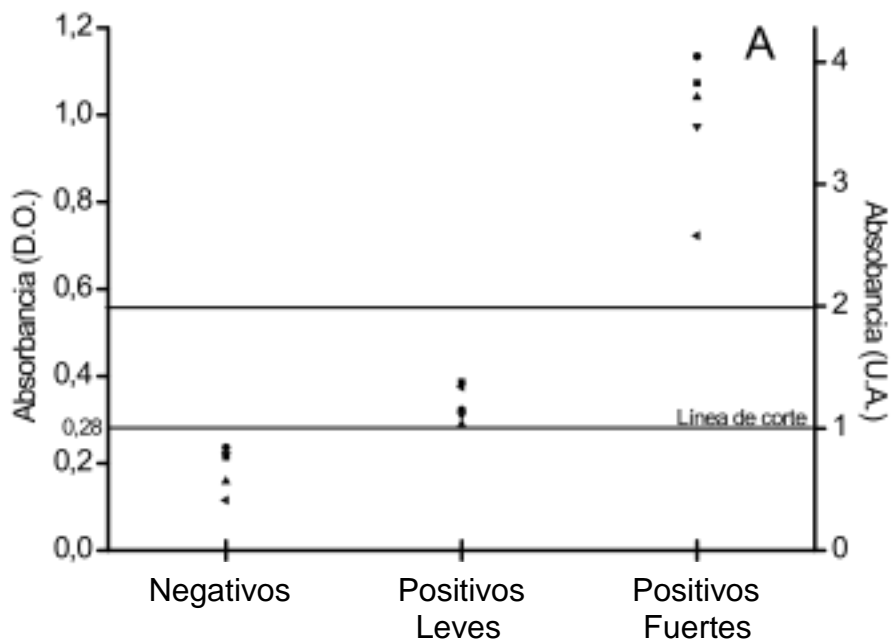


Figura 2. Caracterización serológica por ELISA de cada uno de los grupos de animales: Negativos, Positivos Leves, Positivos Fuertes. En el eje de la izquierda se expresan los valores de absorbancia obtenidos por medida espectrofotométrica de las placas de ELISA, y en el eje de la derecha como Unidades Arbitrarias que corresponden al cociente de la absorbancia promedio para cada una de las muestras, dividida por el promedio de los controles positivos utilizados por el kit para determinar el punto de corte que discrimina entre positivos y negativos.

Se analizaron por ELISA los sueros provenientes de los tres grupos de animales durante el periparto (Figura 3). El grupo y el período afectaron la D.O. ($P < 0.001$ ambos). Para los animales positivos fuertes los valores de D.O. disminuyeron del día -40 y -20 al día -10, previos al parto ($P < 0.01$, Figura 3A); la D.O. aumentó del día -10 al 30 y 50 posparto ($P < 0.05$). Para los animales positivos leves se detecta una disminución de la D.O. desde el día -40 que no es recuperada en todo en ensayo. Se observó una tendencia a disminuir entre el día -20 al -10 ($P = 0.10$) y una tendencia al aumento del día -10 al 50 posparto, aunque no a niveles comparables al día -40 (Figura 3B).

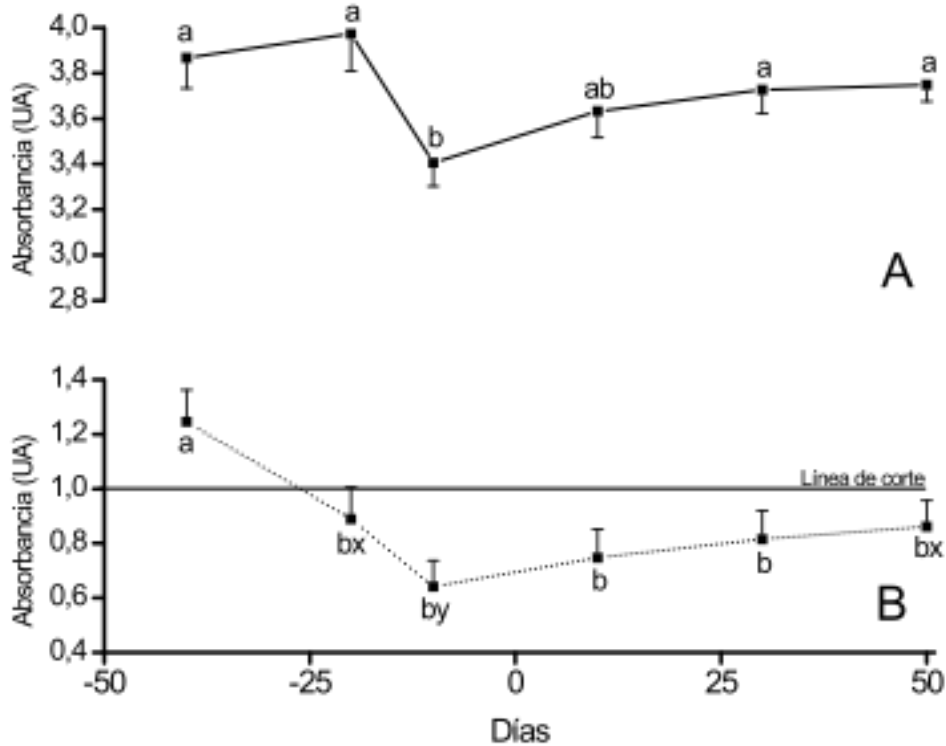


Figura 3. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para el promedio del grupo positivo fuerte (A) y positivo leve (B). (a vs b vs c $P \leq 0.05$, x vs y $P \leq 0.1$) En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia (\pm SEM) y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

En la Figura 4 se muestran los resultados individuales para cada uno de los cinco animales que integraban el grupo de positivos leves. La D.O. de los mismos disminuyó a medida que se acercaba el momento del parto. Es importante destacar que en este descenso del título de Ac específicos para VLB cercano al parto, los animales positivos leves presentaron valores por debajo del punto de corte fijado para este ensayo. Por lo tanto, pasaron de un diagnóstico serológico positivo a un resultado negativo. La caída de la D.O. alrededor del parto varió entre un rango de disminución del 40 al 60 %. Solo uno (# 139) de los cinco animales positivos leves presentó D.O. comparables a un diagnóstico positivo al mes posparto, el resto mantuvo D.O. negativa hasta aproximadamente los 50 días posparto (Figura 4).

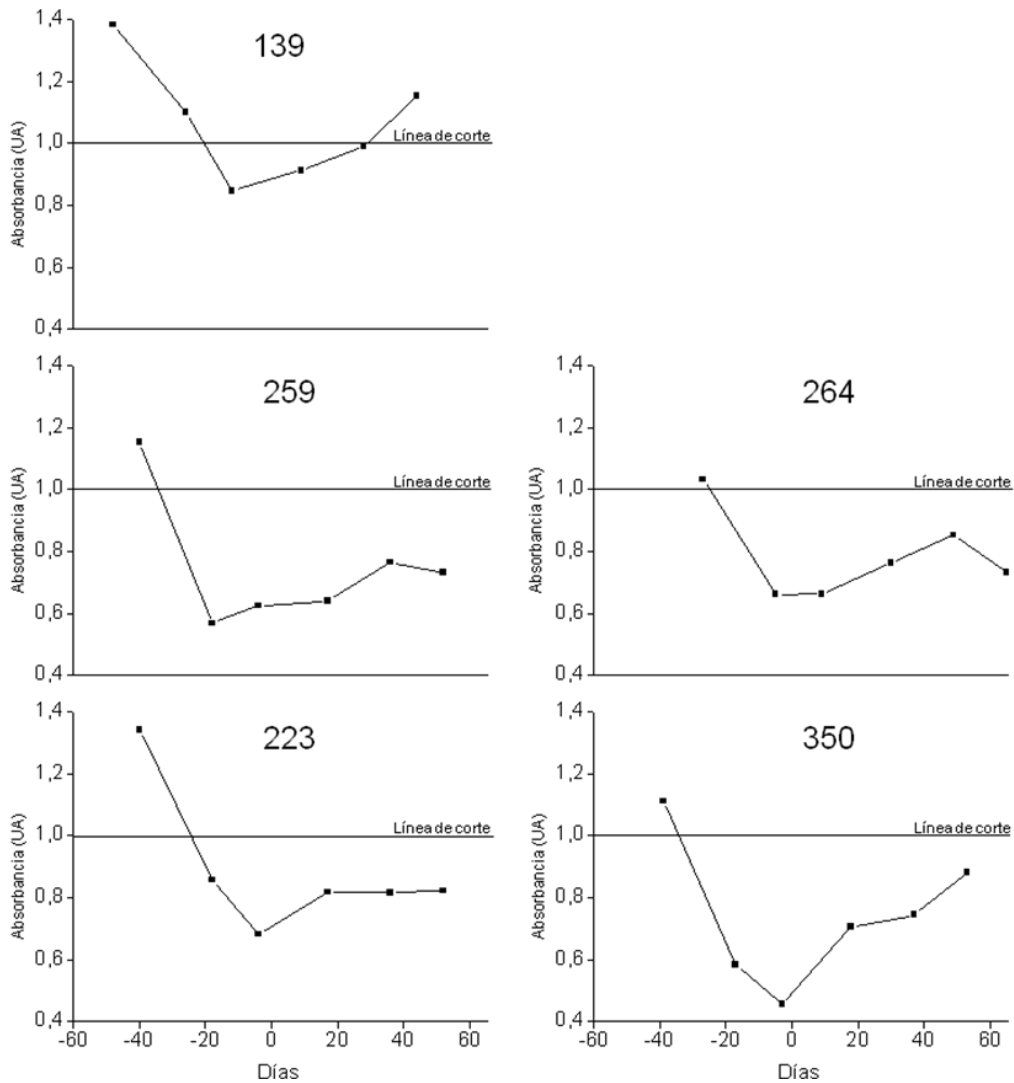


Figura 4. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para cada uno de los animales caracterizados como positivos leves: 139, 259, 264, 223 y 350. En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

6.2. Experimento 2

6.2.1. Desarrollo de la PCR en tiempo real

La fluorescencia normalizada de las diluciones seriadas del estándar pGP51 en un rango de concentración de 10^9 a 10^3 copias de gp51/ μ g de ADN genómico fue asociado a la concentración de ADN. Cada dilución se procesó en duplicado y el umbral de fluorescencia que determina el Ct (En inglés, *Cycle*

Threshold) fue establecido manualmente en 0.25 unidades de fluorescencia de forma de obtener la mejor regresión lineal posible.

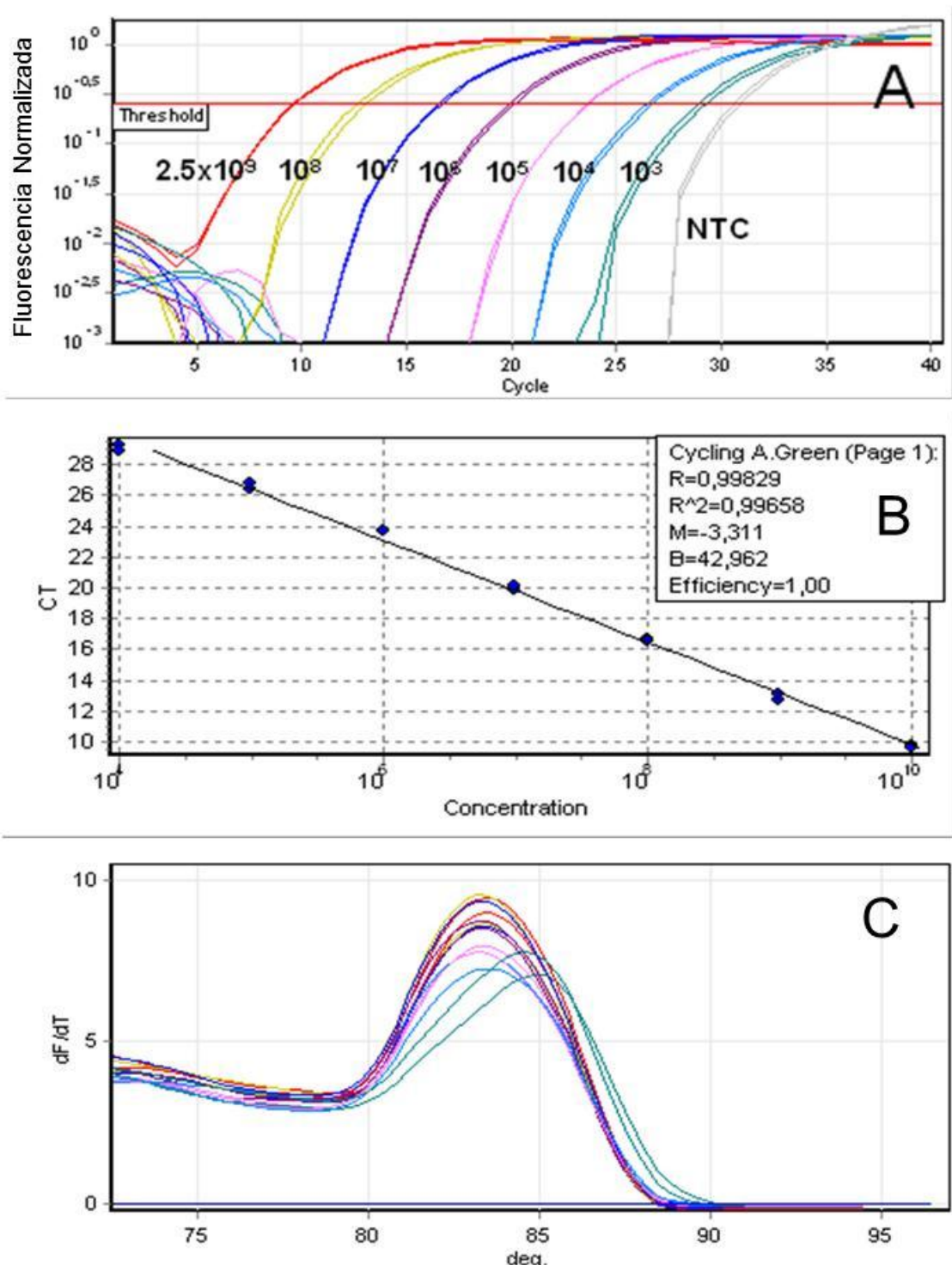


Figura 5. A) Amplificación de las diluciones de pGP51ADN en ADN ovino negativo por PCR en tiempo real con SYBR Green. Rango lineal de amplificación, 2.5×10^9 – 2.5×10^3 copias de gp51/ μ g de ADN y el control negativo (NTC). Fluorescencia normalizada de amplificación con el umbral establecido manualmente para obtener la mejor

regresión lineal (0.25). B) Regresión lineal de la curva estándar obtenida por PCR en tiempo real. El gráfico representa los Ct obtenidos de los duplicados de cada punto de dilución de la curva estándar. En el cuadrado se muestra el R^2 y la pendiente obtenidos. C) Curvas de disociación obtenidas de los productos de amplificación de la curva estándar (Las curvas con T_m de 63°C corresponden a 268 pb). El código de colores es el mismo en el cuadro A y en el C.

El coeficiente de regresión (R^2), la pendiente y la eficiencia obtenida del gráfico de los puntos de dilución vs. concentración de ADN fue 0.996, -3.311, y 1.00 respectivamente (Figura 5B). El límite de detección mínimo alcanzado en la serie de diluciones fue de 2500 copias de gp51/ μ g de ADN genómico. El límite del rango lineal de amplificación fue determinado a un Ct de 29.3, mientras que los Ct de los controles FLK, FLK 1% y NTC fueron de 18.7, 25.3 y 30.7 respectivamente (Tabla 2).

Muestra	Ct	DesvEst
10 ⁹ copias de gp51/ μ g de ADN	9.67	0.07
10 ⁸ copias de gp51/ μ g de ADN	12.89	0.31
10 ⁷ copias de gp51/ μ g de ADN	16.61	0.09
10 ⁶ copias de gp51/ μ g de ADN	20.02	0.16
10 ⁵ copias de gp51/ μ g de ADN	23.65	0.01
10 ⁴ copias de gp51/ μ g de ADN	26.60	0.20
10 ³ copias de gp51/ μ g de ADN	29.08	0.26
ADN Positivo	21.41	0.00
ADN FLK	18.74	0.06
ADN FLK 1%	25.34	0.05
ADN negativo	29.36	0.08
NTC	30.74	0.18

Tabla 2. Valores de Ct (\pm desvío estándar) de la curva estándar con el plásmido, de los controles positivos FLK, FLK 1%, de una muestra de ADN bovino positiva y una negativa (determinada por ELISA y por nested PCR), y del control negativo (NTC).

La especificidad de la amplificación del gen gp51-env fue analizada por medio del estudio de la curva de *melting*, una vez terminado los ciclos de amplificación de la PCR. Los productos de amplificación del PCR pertenecientes a las primeras 6 diluciones del pGP51 tuvieron una temperatura de disociación de 83.35 ± 0.14 °C determinada por el software (Figura 5C), mientras que el cálculo de Tm utilizando la formula teórica se estableció en 83 °C. Mediante electroforesis en gel de agar se observó que en las primeras seis diluciones existe una única banda de 260 pb, y que en la dilución 6 hasta la 11 (10^4 a 10^{-1}) se observa una banda inespecífica de 350 pb. No se observó ninguna banda en el producto del control negativo (NTC) sin ADN (Fig. 6).

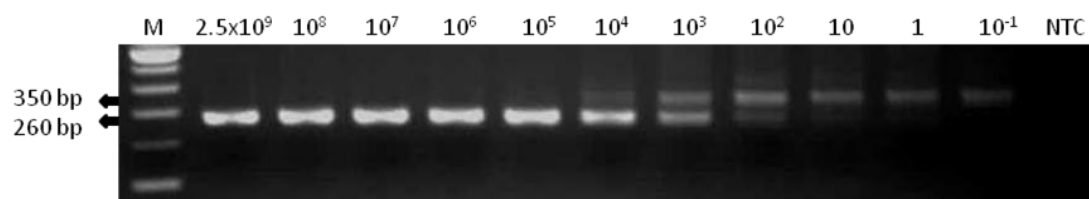


Figura 6. Gel de agar obtenido por electroforesis de los productos de la curva estándar. En donde, M: Marcador de 100 pb, NTC: control negativo sin ADN, diluciones seriadas en el rango de concentraciones de 10^9 hasta 10^{-1} copias de gp51 de la curva. La amplificación inespecífica comienza en el punto 6 de dilución (10^4) y se pierde el rango lineal de cuantificación.

Por lo tanto, se confirma por el análisis de la curva de *melting* que el método resultó específico, el gen de gp51 es únicamente detectado en vacas naturalmente infectadas, no detectándose ADN proviral en animales determinados como negativos por *nested* PCR.

6.2.2. Análisis comparativo de metodologías para el diagnóstico de VLB

Todas las muestras positivas por IDGA fueron positivas por ELISA, pero tres muestras negativas por IDGA fueron positivas por ELISA. Por otro lado, todas las muestras positivas por ELISA fueron positivas por *nested* PCR. La *nested* PCR detectó 11 muestras positivas que fueron negativas por ELISA, mientras que la PCR en tiempo real pudo detectar ADN proviral en 8 muestras seronegativas. Además, solo un animal positivo por *real time* PCR fue negativo por *nested* PCR. En la tabla 3 se muestra la Sensibilidad, Especificidad y eficiencia, valor predictivo positivo y negativo de los métodos de IDGA, ELISA y PCR en tiempo real calculados tomando a la *nested* PCR como método de referencia. PCR en tiempo real fue 22 % más sensible, 10% más eficiente que el ELISA y 6% menos específico que los métodos serológicos.

	IDGA	ELISA	PCR tiempo real
Sensibilidad	50	64	86
Especificidad	100	100	94
Eficiencia	69	78	88
Valor Predictivo Negativo	55	62	80
Valor Predictivo Positivo	100	100	96

Tabla 3. Sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo positivo y negativo (%) calculados para IDGA, ELISA y PCR en tiempo real utilizando la *nested* PCR como método de referencia.

7- DISCUSIÓN

En la primer parte de este trabajo se pudo cumplir con el primer objetivo específico el cual se centró en cuantificar el título de Ac anti-VLB durante el periparto utilizando un *kit* de ELISA comercial (VMRD) aprobado por el USDA.

Los animales con altos títulos de Ac anti-VLB mostraron una tendencia a disminuir sus títulos en el periparto pero continuaron siendo positivos. Sin embargo, aquellos animales que fueron diagnosticados por ELISA como positivos leves, presentando títulos bajos de Ac específicos anti-VLB, resultaron seronegativos por ELISA en el período del periparto.

Los animales positivos fuertes presentan concentraciones de Ac (D.O. cercanos a uno) que se encuentran sobre o próximas a los valores de saturación del sistema. En los animales positivos leves, la disminución en la concentración de Ac debido al parto, representó un mayor descenso del valor de D.O. que los positivos fuertes, y en estos ejemplos alcanzó valores por debajo de la línea de corte establecida por el *kit*. Nuestros resultados son contrarios a los reportados por Tekes (1994) quien reportó que la inmunodepresión no afecta el diagnóstico de ELISA, pero si puede modificar el resultado del diagnóstico de positivo a negativo por la IDGA.

La disminución de los títulos de Ac específicos anti-VLB se podría explicar entonces por el pasaje de los mismos desde la sangre hacia el calostro, y/o por el estado de inmunosupresión generado en la vaca en el período del parto. En ese sentido, se ha descrito la existencia de una leucopenia transitoria después del parto causado por un importante pasaje de neutrófilos hacia el tracto reproductivo. Estos neutrófilos presentan una capacidad fagocítica antibacteriana aumentada pero una actividad bactericida (estallido respiratorio) disminuída (Kehrli et al. 1989; Detilleux et al. 1995). La capacidad de los linfocitos para responder a mitógenos y la producción de Ac se ve también afectada alrededor del parto (Kehrli et al. 1989).

Aún desconocemos el mecanismo fino que determina la depresión del sistema inmunológico en el parto pero se acepta que factores endócrinos y nutricionales estarían fuertemente involucrados (Goff y Horst, 1997; Vangroenweghe et al. 2005; Lamote et al. 2006). Asimismo, también ha sido demostrado que los niveles de IgG e IgM totales en el suero caen alrededor del parto y que la concentración presente en el calostro, es equivalente a la concentración que desaparece de la sangre circulante en el momento de la calostrogénesis (Larson, 1958; Dixon et al. 1961). En un trabajo reciente Herr et al. (2011) han reportado una disminución dramática de los niveles séricos totales de IgG e IgM en el período entre la semana 8 previa al parto y la cuarta semana posparto. El nivel de IgG se recuperó en la cuarta semana posterior al parto y el grado de reducción de la IgG sérica total se correlacionó significativamente con secreción de IgG en el calostro. Por otra parte, una correlación directa entre los niveles de IgG y el recuento de linfocitos también fue detectada. Esto podría explicar también la alta incidencia de enfermedades

infecciosas durante este período (Herr et al. 2011). Esta inmunosupresión es especialmente marcada en la vaca lechera. La fuerte selección genética para aumentar el volumen de producción de leche, ha forzado a que el período de transición (preñez sin lactancia al estado de no preñez con lactancia) implique un cambio metabólico dramático para la vaca (Goff y Horst, 1997). Del equilibrio con que la vaca resuelva este proceso dependerá la capacidad de maximizar la producción de leche, evitar enfermedades metabólicas y asegurar la siguiente preñez (Grummer 1995).

En un trabajo reciente, Gutiérrez et al. (2011) analizan la progresión de la infección por VLB desde el nacimiento hasta la primera lactancia en un rodeo con más de 85% de prevalencia. Reportan que aún aplicando medidas para evitar la transmisión vía sanguínea no encontraron cambios en la prevalencia después de 3 años. Esto indicaría que otras vías de transmisión podrían jugar un rol en condiciones naturales. En particular encuentran que la población pasa de aproximadamente 10% de prevalencia antes del primer parto a más de 60% posterior al mismo. Estos resultados sugieren que la inmunosupresión generada en el parto podría activar infecciones virales controladas por los animales y no detectadas por los métodos diagnósticos usualmente empleados. Desde el punto de vista del virus, se ha demostrado que el tratamiento con corticoides y prolactina estimula la expresión del VLB en ensayos con líneas celulares en cultivo (Niermann y Buehring, 1997) y ambas hormonas aumentan alrededor del parto.

En suma, el diagnóstico de VLB por ELISA debe realizarse teniendo en cuenta el estado reproductivo del animal en el momento de obtener la muestra. El diagnóstico en los momentos cercanos al parto aumenta la probabilidad de falsos negativos y por este motivo algunos autores proponen no utilizar métodos serológicos en un período comprendido entre dos semanas antes y un mes después del parto (Burrige et al. 1982; Hübner et al. 1996). Acorde a nuestros resultados este intervalo al menos para este *kit* comercial debe ser mayor, ya que no deberían realizarse diagnósticos para LEB desde los 40 días antes del parto, hasta los 50 días posparto, o incluso más, debido a que cuatro de los cinco animales positivos leves no habían recuperado los niveles de D.O. a los casi dos meses posparto. Esto es de especial importancia si se tiene en cuenta que a nivel nacional, la planificación de la sanidad de los tambos implica

momentos puntuales o únicos en la toma de muestra para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a todo el rodeo. Como el manejo reproductivo de los rodeos lecheros en nuestro país (partos todo el año), productores y técnicos frecuentemente no visualizan que un resultado negativo no implica que ese animal sea verdaderamente negativo. En este sentido el desarrollo de un método directo, sensible y capaz de cuantificar la carga proviral del VLB, no sólo tiene importancia del punto de vista diagnóstico, también permite investigar sobre la progresión de la infección y relacionarla con la respuesta antigénica específica a lo largo del ciclo productivo del animal.

En la segunda parte de este estudio se buscó desarrollar una PCR en tiempo real utilizando SYBR Green para detectar y cuantificar la carga proviral del VLB en células de PBMC bovinas. Se buscó obtener un método simple y útil, que no requiera de la utilización de una sonda para amplificar el ADN proviral. Aunque no se utilizaron sondas para amplificar el ADN proviral, esta PCR utilizando SYBR Green con primers dirigidos al gen gp51-env fue específica y sensible.

El análisis de sensibilidad con las diluciones del plásmido con una sola copia del gen gp51-env y el control positivo FLK, nos permitió establecer que el límite de detección fue de 2500 copias de gp51/ μ g de ADN. Por otro lado, ha sido reportado que la señal de amplificación de la PCR con SYBR Green es un Ct más sensible que cuando se utilizan sondas (Metha et al. 2009). Sin embargo, en un reporte reciente se desarrolló una PCR en tiempo real muy sensible, con la utilización de sonda, capaz de detectar entre 1-5 moléculas del VLB/ μ L acorde a Heeneman et al. (2012).

El control positivo de FLK 1% representa una infección natural de baja carga proviral (Gutiérrez et al. 2011) y en todos los ensayos fue determinado como positivo. Además, el Ct determinado para el control FLK 1% fue 4 ciclos menor que el límite de detección del rango lineal de amplificación de la curva estándar a partir del plásmido. Jimba et al. (2010), mostraron que la carga proviral está asociada al estado de progresión de la enfermedad; la carga proviral cuantificada por *real time* PCR en animales asintomáticos, con linfocitosis persistente y linfosarcoma fue de 2.5×10^3 , 12.5×10^3 , 25×10^3 copias/ 10^5 células, respectivamente. En tanto, nuestro método de PCR pudo detectar hasta 1.5×10^3 copias/ 10^5 células en animales infectados asintomáticos en los

cuales se encuentran infectados menos del 1% de los PBMCs y más del 10% de los linfocitos B circulantes (Heeneman et al. 2012).

Las muestras de ADN positivo y los controles positivos (FLK, pGP51) mostraron un único pico de amplificación a la temperatura esperada y los productos de amplificación de los controles fueron secuenciados revelando que fueron específicos de gp51. A pesar de que se conoce que la utilización de sondas mejora la especificidad del PCR (Paudel et al. 2011), el análisis de la curva de *melting* asegura la especificidad de este PCR en tiempo real con SYBR Green. Más aún, los métodos que utilizan sondas, como las TaqMan, pueden fallar al detectar el HIV en ADN de pacientes que contienen un solo cambio nucleotídico en el extremo 5' (Casabianca et al. 2007). Además, la diferencia de 6 Ct entre el control positivo FLK y FLK 1% fue consistente con la diferencia en la carga proviral esperada para estos controles. A parte de las diferencias de sensibilidad y especificidad entre el SYBR Green y las sondas Taqman en el PCR en tiempo Real, se debe tener en cuenta que la utilización de SYBR Green significa contar con las ventajas comparativas de ser un método más simple por no requerir el diseño de la sonda. Por otra parte, la extracción de ADN es la parte de la PCR con SYBR Green que más incrementa el costo total del ensayo, y una vez obtenida la muestra, puede ser utilizada para el diagnóstico molecular de otras patologías.

Los resultados del análisis comparativo revelaron una alta concordancia entre los métodos directos (*nested* y *real time* PCR); muestras positivas por *real time* PCR fueron también positivas por *nested* PCR. A pesar de que la PCR en tiempo real con SYBR Green no pudo detectar el ADN proviral en 4 muestras positivas por *nested* PCR, es necesario considerar que la *nested* PCR presenta 30 ciclos de amplificación más que la *real time* PCR. La utilización de la *real time* PCR cuenta con una serie de ventajas comparativas frente a la *nested* PCR como son: a) no requiere la utilización de geles de agarosa, b) reduce la probabilidad de contaminación cruzada y c) permite la automatización de la reacción por el uso de robots. d) se disminuye el costo diagnóstico por determinación. Además, reportes previos han mostrado diferencias de sensibilidad y eficiencia entre test serológicos, *real time* PCR y *nested* PCR similares a los encontrados en este trabajo (Felmer et al. 2006; Kuckleburg et al. 2003; Jimba et al. 2010; Heenemann et al. 2012). Lew et al. (2004)

detectaron muestras de ADN genómico que fueron negativas por ELISA y *nested* PCR pero fueron positivas por *real time* PCR con TaqMan, al igual que una muestra de nuestro estudio pero utilizando SYBR Green.

Si realizamos un análisis de costo aproximado considerando los precios en el mercado de los *kits* utilizados en este estudio, estimamos que el costo por determinación tanto por ELISA como por *nested* PCR es de 2 dólares americanos (USD) mientras que por *real time* PCR es de 0.4 USD. Esto es de relevancia debido a que para considerar un predio libre de Leucosis Bovina se requieren diagnósticos consecutivos de los animales, cuya frecuencia dependerá de si los predios presentan o no antecedentes de infección y de las normativas de cada país.

Por otro lado, la baja sensibilidad del ELISA con respecto a los métodos directos, y la dificultad de procesar altas cantidades de muestras por *nested* PCR, sugiere que con la utilización de estos métodos por separado dentro de un programa de erradicación, difícilmente se pueda controlar la enfermedad. El alto costo de importar los *kits* de ELISA comerciales no asegura la no ocurrencia de falsos negativos. Estos animales mantienen cierta carga proviral y son fuentes de infección del ganado libre de LEB luego de la separación del rodeo seropositivo.

En este sentido, el uso de esta herramienta es una solución simple y económica para asegurar la detección de animales positivos, más aun en rodeos con alto porcentaje de prevalencia como existen en la realidad nacional. Además, esta herramienta se puede complementar con la utilización de la *nested* o *real time* PCR con TaqMan para confirmar el diagnóstico de animales negativos o con baja carga proviral. La sensibilidad de la PCR en tiempo real con sonda reportada podría detectar ADN proviral en aquellas muestras que tienen una baja carga proviral y que son diagnosticadas como negativas por la PCR en tiempo real utilizando SYBR Green.

En este trabajo desarrollamos un método simple, rápido y reproducible para la detección y cuantificación de la carga proviral del VLB en vacas de producción lechera. Este método de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green es potencialmente utilizable como método de *screening*, práctico para monitorear

la progresión de la enfermedad y para implementar programas de segregación animal para minimizar la transmisión del VLB.

8- CONCLUSIONES

En este estudio se pudo cuantificar el descenso de anticuerpos específicos anti-VLB en el periparto, en grupos de vacas con distintos títulos de anticuerpos. Demostramos que todos los animales LEB-positivos sufren un descenso de los anticuerpos específicos anti-VLB en sangre y que los animales que presentan un título de anticuerpos cercanos a la línea de corte en 2 meses pre-parto, pueden tener un diagnóstico falso negativo en el periparto.

En este trabajo se desarrolló una PCR en tiempo real utilizando SYBR Green capaz de detectar y cuantificar la carga proviral del VLB en PBMC bovinas. El método resultó ser sensible, específico y presenta la ventaja de no requerir del diseño de una sonda. Esto lo hace una herramienta simple, que puede procesar un gran número de muestras de forma automática y económica. Por lo tanto, tiene un gran potencial para ser aplicada en un programa de erradicación del VLB, útil para diagnosticar rodeos con alta prevalencia.

Esta PCR en tiempo real mostró ser más sensible, más eficiente y con una especificidad similar, respecto de los métodos serológicos (IDGA y ELISA utilizados de rutina en nuestro país) cuando se tomó como método de referencia a la *nested* PCR.

9- BIBLIOGRAFÍA

Achachi A, Florins A, Gillet N, Debacq C, Urbain P, Foutsop GM, Vandermeers F, Jasik A, Reichert M, Kerkhofs P, Lagneaux L, Burny A, Kettmann R, Willems L. (2005). Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 102: 10309-10314.

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.

Aida Y, Miyasaka M, Okada K, Onuma M, Kogure S, Suzuky M, Minoprio P, Levy D, Ikawa Y. (1989). Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research.* 50:1946-1951.

Alexandersen S, Carpenter S, Christensen J, Storgaard T, Viuff B, Wannemuehler Y, Belousov J, Roth JA. (1993). Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol.* 67:39-52.

Altaner C, Zajac V, Ban JA. (1982). A simple and inexpensive method for detection of BLB infected cattle based on modified ELISA principal. *Zentralblatt für Veterinärmedizin,* 29(8):583-590.

Ballagi-Pordany A, Klintevall K, Merza M, Klingeborn B, Belak S. (1992). Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J Vet Med.* 39:69-77.

Beier D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. In: Vallat, B. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2^{da} ed. Ed. OIE, 723-738.

Beier D, Blankenstein P, Marquardt O, Kuzmak J. (2001). Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 114:252-256.

Bendixen HJ. (1961). Methoden and Eegebnisse der systematischen Bekämpfung der Rinderleukose in Danemark. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 68(3):100-104.

Brandon RB, Naif H, Daniel RC, Lavin MF. (1991). Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* 50:89-94.

Brasseur R, Cornet B, Burny A, Vandenbranden M, Ruyschaert JM. (1988). Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res. Hum Retroviruses.* 4:83-90.

Bonifacino J. (2008). Exportaciones de Lácteos de Uruguay. Informe mensual: Precios – Índices mayo.113: 26. [www. exportacionesUY.com](http://www.exportacionesUY.com).

Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med.* 32:149-170.

Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJF, Van Der Maaten MJ. (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can J comp Med.* 46:270-271.

Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*. 102:169-173.

Casabianca A, Gori C, Orlandi F, Forbici C, Perno F, Magnani M. (2007). Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real time PCR assay. *Mol Cell Probes*. 21:368-378.

Coulston J, Naif H, Brandon R, Kumar S, Khan S, Daniel RC, Lavin MF. (1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol*. 71:1737-1746.

Cockerell GL, Reyes RA. (2000). Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: SCHALM, O. W.; FELDMAM, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5: 614-619.

Collazo L, Sienna R, Irabuena O, Guarino H, Navarro M, Lavarello L. (2002). Estudio epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en Ganado lechero. *Jorn Urug Buiatría XXX*. Uruguay. 322-325.

Crowther JR. (2009). *The ELISA Handbook*. 2^{da} ed. Humana Press. 568.

Detilleux JC, Kehrli ME, Stabel JR, Freemad AE, Kelley DH. (2005). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 44:251-261.

De la Sota MD. (2004). Leucosis Bovina Enzoótica. En: *Manual de Procedimientos - Leucosis Bovina Enzoótica*. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. SENASA 9:1-34.

DIEA- MGAP (2012). Anuario estadístico agropecuario. www.mgap.gub.uy

Dimmock CK, Chung YS, MacKenzie AR. (1991). Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust Vet J.* 68:230-233.

Dixon FJ, Weingle WO, Vázquez JJ. (1961). Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Lab Invest.* 10:216-237.

Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol,* 39:313-321.

Evermann JF, Jackson MK. (1997). Laboratory diagnostic tests for retroviral infection in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 3:87-106.

Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology.* 237:261-269.

Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med.* 43:621-630.

Felmer R, Muñoz G, Zuñiga J, Recabal M. (2005). Molecular analysis of 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp 51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microb.* 108: 39–47.

Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet.* 38:137-141.

Ferrer J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv Vet Sc Comp Med.* 24:1-68.

Ferrer JF, Piper CE. (1981). Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 41:4906-4909.

Ferrer JF. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *JAVMA*,175:1281-1286.

Ferrer JF, Balica V, Diglio C. (1976). Recent studies on the characterization of the bovine leukemia virus (VLB); development of new methods for the diagnosis of BLV infection. *Veterinary Microbiology.* 2:159-184.

Ferrer JF, Piper CE, Abt DA, Marshak RR. (1977). Diagnosis of bovine leukemia virus infection: evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. *Am J Vet Res.* 38:1977-1981.

Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SJ. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet.* 9:851-857.

Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, Vandermeers F, Debacq C, Sanchez-Alcaraz MT, Schwartz-Cornil I, Kerkhofs P, Jean G, Théwis A, Hay J, Mortreux F, Wattel E, Reichert M., Burny A, Kettmann R, Bangham C, Willems L. (2007). Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci.* 12:1520-1531.

Garcia M, Bastos PA, Barros Filho IR, Libera AM, M. P. D, Coutinho SDA, Ramos MCC, Lourenco A. Silva MM. (1995). Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. *A Hora Veterinária.* 15(88):41-44.

Goff JP, Horst RL. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci.* 80:1260–1268.

González ET, Oliva GA, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID,

ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Revista Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.

Gotze R, Rosenberg G, Ziegenhagen G. (1954). Die Leukose des Rindes; ihre hamatologische und klinische Diagnosis. *Monatshefte für Veterinärmedizin*. 9:517-526.

Grummer RR. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci*. 73: 2820-2833.

Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 151:255-263.

Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. 3:1210-1248.

Heenemann K, Lapp S, Teifke JP, Fichtner D, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. (2012). Development of a Bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J Vet Diagn Invest*. 24(4):649-655.

Heeney JL, Valli PJ, Jacobs RM, Valli VE. (1992). Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab Invest*. 66:608-617.

Herr M, Bostedt H, Failing K. (2011). IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*. 75:377–385.

Hopkins SG, DiGiacomo RF. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract*. 13:107-128.

Hübner SO, Weiblen R, Tobias FL, Cancian N, Botton SA, Oliveira M, Zanini M. (1996). Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 16:87-90.

Jimba M, Takeshima SN, Matoba K, Endoh D, Aida Y. (2010). BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology*. 7:91.

Johnson R, Kaneene J. (1992). Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Veterinary Bulletin*. 62:287-312.

Johnson M, Rommel F, Moné J. (1998). Development of a syncytia inhibition assay for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in naturally infected cattle; comparison with Western blot and agar gel immunodiffusion. *J Virol Methods*. 70:177-182.

Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodríguez EM, Mariño B, Rodríguez-Dubra C, Esteban EN. (2008). Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet*. 39:432-438.

Kaaden OR, Lange S, Romanovsky W, Marré H, Pfeilsticker J, Roselius R (1982). Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zbl Vet Med*. 29:269-274.

Kaja RW, Olson C, Rowe RF, Stauffacher RH, Strozinski LL, Hardie AR, Bause I. (1984). Establishment of a bovine leukosis virus-free dairy herd. *J Am Vet Med Assoc*. 184:184-185.

Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989). Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res*. 50: 207-220.

Kelly EJ, Jackson MK, Marsolais G, Morrey JD, Callan RJ. (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res.* 54:205-209.

Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R, Willems L. (1998). In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J. Virol.* 72:2554-2559.

Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus, in: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*, Plenum Press. 39-81.

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.

Klintevall K, Naslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. (1991). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods.* 33: 319-333.

Knuth P, Volkman O. (1916). Untersuchungen über die limphozymotose des Rindes. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten Parasitärekrankheiten und Hygiene Haustiere.* 17: 393-467.

Kubiś P, Szczotka M, Kuźmak J. (2007). Detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in paraffin sections, tissue smears, and peripheral blood leukocytes by in situ PCR. *Bull Vet Inst Pulawy.* 51:337-342.

Kuckleburg C, Chase C, Nelson E, Marras S, Dammen M, 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.* 1:72-76.

Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*. 65:1082-1098.

Larson BL, Kendall KA. (1957). Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J Dairy Sci*. 40:659-666.

Larson BL. (1958). Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J Dairy Sci*. 41:1033-1044.

Lee T, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. (2004). Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Virolog*. 31:275-282.

Leite RC, Lobato ZIP, Camargos MF. (2004). Leucose Enzoótica Bovina. *Revista Conselho Federal Medicina Veterinária*. 31: 20-28.

Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. (2004). Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J Virol Methods*. 115(2):167-175.

Lewin HA, Wu MC, Nolan TJ, Stewart JA. (1988). Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *J Dairy Sci*. 71:2526-2534.

Luciw P, Leung N. (1994). Mechanisms of Retrovirus Replication. En: *The Retroviridae*. Plenum Press. 159-263.

Licursi M, Inoshima I, Wu D, Yokoyama T, Gonzalez ET, Sentsui H. (2003) Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet Microbiol*. 96:17-23.

Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res.* 11:353-358.

Martín D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez- Lucía E. (2000). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J Vet Med.* 48:97-106.

McDonald R, Ferrer JF. (1976). Detection, quantitation and characterization of the major internal virion of the bovine leukemia virus by radio immunoassay. *Journal of the National Cancer Institute.* 57(4):875-882.

Mederos A, Irigoyen D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina en predios lecheros del nordeste del Uruguay. *Jorn. Urug. Buiatría XXVI.* 19-20.

Mehta N, Trzmielina S, Nonyane BAS, Eliot MN, Lin R. (2009). Low-Cost HIV-1 Diagnosis and Quantification in Dried Blood Spots by Real Time PCR. *PLoS ONE*, 4(6):5819.

Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien L, Artegoitia V, Pereira I, Rupprechter G, Pessina P, Rama G, Fernandez A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilibroste P. (2012). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencias* (aceptado en prensa).

Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette K. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 43:1297-1305.

Miller J, Olson C. (1972). Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst.* 43:1459-1462.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 12:319-325.

Monke DR, Rohde RF, Hueston WD, Milburn RJ. (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.

Monti GE, Frankena K, Ángel K, Ángel B, Buist W, Tarabla HD, De Jong MC, (2005). Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest*. 17: 451-457.

Moratorio G, Fisher S, Bianchi S, Tome L, Rama G, Obal G, Carrion F, Pritsch O, Cristina J. (2012). A detailed molecular analysis of complete Bovine Leukemia Virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Veterinary Research*, (aceptado en prensa).

Moratorio G, Obal G, Dubra A, Correa A, Bianchi S, Buschiazzi A, Cristina J, Pritsch O. (2010). Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Vir*.155:481-489.

Murtaugh MP, Lin GF, Haggard DL, Weber AF, Meiske JC. (1991). Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 33:73-85.

Naif HM, Brandon RB, Daniel RC, Lavin MF. (1990). Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 25:117-129.

Niermann GL, Buehring GC. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239:249-258.

Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, Gibbons R, Chocejindachai W. (2011). Comparison of real time SYBR green dengue assay with real time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *N Am J Med Sci*, 3(10):478-485.

Poiesz BJ. (1995). Etiology of acute leukemia: Molecular genetics and viral oncology. *In* Neoplastic Diseases of the Blood (Wiernik, P.H.; Canellos, G.P.; Dutcher, J.P.; Kyle, R.A. Eds.). 3^{ra} Ed. 159-175.

Poon H, Jimenez E, Jacobs RM, Song Z, Jefferson B. (1993). Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. *J Virol Meth.* 41:101-112.

Portetelle D, Mammerickx M. (1986). ELISA: a highly sensitive and specific method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Enzootic bovine leukosis and bovine Leukemia Virus*. Edited by A. Burny and M. Mammerickx, Dordrecht, Netherlands. 2:201-217.

Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A, Pritsch O. (2010). Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*. 46:15-22.

Reichert M, Stec J.(1999). Simultaneous use of two primer pairs increases the efficiency of polymerase chain reaction assay in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J Vet Diagn Investig.* 11:543-547.

Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210-1248.

Rodriguez SM, Golemba MD, Campos RH, Trono K, Jones LR. (2009). Bovine Leukemia Virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two new clades. *J Gen Viro.* 90:2788-2797.

Schwartz I, Lévy D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res.* 25:521-536.

Sherman MP, Ehrlich GD, Ferrer JF, Sninsky JJ, Zandomeni R, Dock NL, Poiesz B. (1992). Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30:185-191.

Sienra R, Nuñez A, González A, Ceretta ME, Guarino H, Morón C. (1998). Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado Lechero. *Jorn Urug Buiatría XXVI.* 23-25.

Tajima S, Ikawa Y, Aida Y. (1998). Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J Virol.* 72(9):7569-7576.

Tekes L. (1994). Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta Vet Hung.* 42:57-67.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22:4673-4680.

Tiscornia AC, Cayota A, Landoni AI, Brito C, Oppezzo P, Vuillier F, Robillo C, Digiero G, Gabús R, Pritsch O. (2004). Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia.* 18(1): 48-56.

Trono KG, Pérez-Filguiera DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol.* 83:235-248.

Toma B, Eloit M, Savey M. (1990). Las enfermedades animales por retrovirus : leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev SciTech Off Int Epiz.* 9:1077-1119.

Tolle A. (1965). Zur Beurteilung quantitativer hämatologischer befunde im Rahmen der Leukose – Diagnostik. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B.*12(4):281-290.

Van der Maaten M, Miller J. (1976). Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture. *Bibl Haematol.* 43:360-362.

Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest Anim Endocrinol.* 29: 283-93.

Willems L, Burny A, Collete D, Dangoisse O, Dequiedt F, Gatot JS, Kerkhofs P, Lefèbvre L, Merezak C, Peremans T, Portetelle D, Twizere JC, Kettmann R. (2000). Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res. Hum Retroviruses.* 16:1787-1795.

Willems L, Thienpont E, Kerkhofs P, Burny A, Mammerickx M, Kettmann R. (1993). Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability. *J Virol.* 67:1086-1089.

Zaffaroni R, Piaggio J, Nuñez A, de Freitas J, Suanes A, Cernicchiaro N, Gil A. (2007). Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. *V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay.* 150-151.

¹www.mgap.gub.uy/dgsg/CONAHSA/ACTAS/Acta%2084.pdf

