1. RESUMEN

La importancia de las infecciones retrovirales en los últimos años ha aumentado considerablemente tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Los retrovirus poseen la capacidad de integrarse y permanecer en el ADN de las células que infectan, de tal forma que el individuo que adquiere la infección permanece así durante toda su vida. El Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es un retrovirus linfotrópico que infecta en condiciones naturales a los bovinos, en los cuales se le ha asociado con detrimentos en la productividad y sobrevivencia a pesar de que la mayoría de los infectados permanecen asintomáticos y sólo una baja proporción manifiestan sintomatología clínica "maligna" conocida como Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LBE). El virus se encuentra distribuido en la población bovina del mundo, sobretodo la destinada a la producción lechera; en México se ha reportado la infección pero no se tienen datos de la frecuencia y distribución. Las pérdidas asociadas a la presencia del VLB en hatos afectados justifican los estudios tendientes a conocer la seroprevalencia de esta infección y en base a estos datos aplicar estrategias de control y erradicación, por lo que el presente estudio se realizó con el fin de conocer la frecuencia serológica del VLB en bovinos del noreste de México, comparar tres métodos serológicos para el diagnóstico de la infección y detectar antígenos y provirus de este retrovirus en animales de hatos seropositivos.

Durante 22 meses (mayo'92-marzo'94) se obtuvieron 2638 sueros, de los cuales 1353 (51.2%) pertenecían a bovinos destinados a la producción lechera (BpL), mientras que 1285 (48.7%) procedían de productores de carne (BpC). Para determinar la seroprevalencia se empleó la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) utilizándose el antígeno glicoprotéico (Gp_{51}) del VLB. La seroprevalencia general encontrada fue de 20.8 % (548/2638); sin embargo, acorde con el tipo de producción los BpL resultaron más afectados ($p<0.05$) con

39.8% (539/1353 que los BpC con 0.7% (9/1285). De los BpL la raza holstein fue la única afectada (41.3%, 539/1305), mientras que de los BpC se encontraron positivos en las razas Beffmaster (3/92, 3.3%), Sta. Gertrudis (2/120,1.7%) y cruzas de Cebú (4/690, 0.6%). De acuerdo a la procedencia, de los 22 municipios estudiados, la seroprevalencia varió desde 0 hasta 65.2% ubicándose la mayoría de los hatos seropositivos (principalmente lecheros) en Pesquería, Marín, Galeana y Escobedo, N.L., además Saltillo y Torreón Coah. De los BpL solamente se analizó un hato de la raza Guersey (en General Cepeda, Coah.) resultando éste el único seronegativo de los hatos de BpL. Una gran proporción de los seropositivos se ubicó en edades de entre 2-4 y 6-8 años pero no fué estadísticamente significante ($p>0.05$)

Por otra parte, empleando el mismo antígeno, se estandarizó y comparó los procedimientos de ELISA e Inmunoelectrotransferencia (WB) con la IDAG en sueros previamente recolectados de 3 hatos (2BpL y 1BpC) que habian presentado elevada, baja y nula prevalencia de anticuerpos contra VLB por IDAG. ELISA y WB concordaron en un 95% y resultaron mas sensibles que IDAG ($p<0.05$).

Tambien se detectaron, mediante fijación de complemento, antigenos del VLB en cultivos de linfocitos de vacas seropositivas y seronegativas a IDAG, evidenciándose reacciones (WB) contra diversas proteínas estructurales y precursores proteicos del Virus.

Así mismo, mediante el uso de Dot Blot, se detectó el "provirus" del VLB en linfocitos cultivados de vacas seropositivas y seronegativas al VLB en un hato con elevada seroprevalencia (determinada por IDAG), con lo que se evidenció que IDAG falla para detectar una grán proporción de bovinos positivos al virus.

Los cultivos de Mononucleares Sanguineos Perifericos (MSP) de dos vacas seropositivas al VLB, analizados con microscopia electrónica de transmision, presentaron particulas virales similares al tipo "C".

El monitoreo serológico del presente estudio revela parámetros similares a lo reportado en otros países; sin embargo, dadas las características de las infecciones retrovirales, es necesario no solo realizar estas pruebas serológicas, ELISA, WB e IDAG sino tambien detectar al provirus y sus antígenos para con ello tener un parámetro más preciso de la distribución del VLB en la población bovina.

2. INTRODUCCION

Los análisis epizootiológicos de las afecciones en los animales domésticos son de gran importancia, puesto que con éstos se pueden determinar la presencia y frecuencia de agentes infecciosos que inciden directa ó indirectamente en la producción pecuaria. Así, con los datos obtenidos de los análisis se pueden establecer medidas para controlarlos y/o erradicarlos.

De los agentes infecciosos, los virus constituyen un grupo, que en virtud de sus características biológicas, tal vez sean más dificiles de prevenir, detectar y erradicar. En este grupo, los retrovirus han atraído considerable atención por su importancia tanto para la medicina humana como veterinaria, el comportamiento en la naturaleza de tales agentes es un tanto complejo, ya que pueden inducir tumores o alteraciones inmunológicas que culminan con infecciones oportunistas en los animales afectados. Estos virus poseen un genoma diploide de RNA con polaridad positiva, además de la enzima transcriptasa reversa, que le permite la integración del ácido nucléico viral en el acido desoxirribonucleico de la cromatina celular del hospedero; así que al infectar a un organismo, éste permanece con el retrovirus durante toda su vida.

El Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es un oncornavirus ubicado en la familia retroviridae y es el causante de la neoplasia más maligna y común de los bovinos, tal enfermedad fue reconocida por primera vez en 1876, sin embargo, no fue hasta en 1969 en que se logró aislar el virus, hecho que marcó la pauta para un mejor conocimiento de la infección y de la interrelación que guarda ésta con la producción bovina, de hecho, la enfermedad se caracteriza por la inducción de tumores clonales, derivados de linfocitos B, después de un gran período latente que avanza progresivamente y conduce a la muerte ó desecho prematuro del animal afectado.

Existen aún controversias acerca de la importancia de la infección por VLB para la producción bovina, especialmente en el ganado lechero que se ha

demostrado como el más afectado; no obstante lo anterior, en Europa se realizan esfuerzos importantes para controlar y/o erradicarla ya que como se ha observado es económicamente muy importante (sobretodo los hatos que mantienen prevalencias de hasta 90%) debido a la pérdida de mercados que solicitan animales libres del VLB, así como a los costos que se realizan para el diagnóstico y tratamiento del linfosarcoma, desecho prematuro o muerte del ganado (especialmente los de registro) y el decomiso de las canales al sacrificio, entre otros.

En la actualidad en la zona Noreste de México la epidemiología del VLB no está completamente entendida, por lo que la descripción o el hallazgo de la infección en ciertas poblaciones de bovinos nos proporcionarán información útil; y así, mientras más datos de este tipo se obtengan se podrán implementar métodos para controlar y/o erradicar la enfermedad.

2.1 Objetivos

A).- Determinar la frecuencia serológica del Virus de la Leucosis Bovina en hatos del noreste de México.

B).- Correlacionar la positividad con la raza y el tipo de producción.

C).- Comparar la sensibilidad de los métodos serológicos de ELISA, Inmunoelectrotranferencia (WB) e IDAG en el diagnóstico de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina.

D).- Detectar antígenos Virus de la Leucosis Bovina en cultivos de linfocitos de vacas seropositivas o seronegativas en IDAG.

E).- Detectar el provirus en vacas seropositivas y seronegativas.

2.2 Hipótesis

Dadas las características de las infecciones retrovirales, en particular el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es posible que el comportamiento epizootiológico de éste virus en el área noreste de México sea similar a lo reportado en otros países, además es factible detectar bovinos seronegativos pero infectados con éste virus (portadores del provirus).

3. ANTECEDENTES

3.1. Historia del Linfosarcoma/VLB en Bovinos.

El Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) fue descrito por primera vez en 1817 por Leisering en Alemania, posteriormente otras descripciones las realizaron Siedmagrotzky y Johne en los años 1878 y 1879 respectivamente (1).

A principios de siglo se sugirió la etiología viral del linfosarcoma y leucemia bovina, la cual ocurriría con alta incidencia en hatos de ciertas zonas geográficas (enzoóticamente) y en cierta familias dentro de las mismas (31,86).

La naturaleza contagiosa asociada al movimiento de bovinos fue demostrada en 1917 por Knuth y cols. (1). Estudios ulteriores de transmisión natural y experimental indicaban que el LEB es ocasionado por un agente infeccioso transmitido por sangre, lo cual, fue posteriormente apoyado por observaciones realizadas en hatos lecheros Suizos en donde ocurrió una alta frecuencia de linfocitosis y leucosis posterior a la vacunación contra babesiosis usando sangre completa de bovino (35,47).

De 1955 a 1963, en Dinamarca, Bendixen encontró una relación entre el Linfosarcoma Enzoótico Bovino y la linfocitosis persistente, y separa éstas de las formas esporádicas de Linfosarcoma (1,36).

Los primeros intentos para controlar el linfosarcoma bovino se llevaron a cabo en Europa del este, particularmente en Dinamarca, en donde se comenzó un programa de erradicación intensivo en 1959 con la examinación de hatos en donde originalmente se reportaron casos de leucosis y hacia 1968 efectuaron un estudio hematológico sistemático en todo el ganado mayor de 2 años, con intervalos de 3 meses, con el propósito de encontrar animales con Linfocitosis Persistente; todos los bovinos de los hatos reportados como infectados fueron enviados al sacrifico sin importar su estatus hematológico individual (107), con

esta estrategia y a la luz de los conocimientos actuales, se llegó a la conclusión que se redujo la prevalencia de leucosis pero no se erradicó (36,107).

En base a las características clínicas patológicas y epidemiológicas, el linfosarcoma en bovinos se clasificó en 4 tipos (66,86)

Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) (forma adulta).

Linfosarcoma del Timo (forma tímica).

Linfosarcoma del Becerro (forma juvenil).

Linfosarcoma de la Piel (forma cutánea).

Los últimos tres, aún no se ha demostrado que sean causados por algún agente infeccioso, mientras que para el LEB desde 1969 se conoce que es causado por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), ya que en este año se logró su aislamiento de una vaca linfosarcomatosa en los Estados Unidos de América (68).

Tal hallazgo condujo al desarrollo de técnicas serológicas (10,27,32,33,34,37,40,41,50,70,71,81,109) y moleculares (2,78,80,83,97) para diagnosticar la infección por el VLB y se evidenció que está ampliamente distribuido en la población bovina, principalmente en la destinada a la producción de leche (6,13,25,44,65,92,100,101,115).

En 1974 se demostró que los viriones del VLB contienen actividad de transcriptasa reversa, clasificándose como un oncornavirus de la familia retroviridae (79).

La Comunidad Económica Europea aprobó el uso de la inmunodifusión en agar gel (IDAG), como prueba oficial en los programas de detección de la enfermedad (43,53).

En la Unión Americana al menos 20% de la población lechera adulta posee anticuerpos contra VLB (13,28,44,73), pero dado que se considera que la infección persiste de por vida en el animal (4,12,18), la enfermedad puede llegar a ocasionar fuertes pérdidas económicas al no implementarse programas de control (8,32,42,52,54,92,98,103,111,112).

Los decomisos por Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) en los E.U.A. varían de 10 a 15 canales por cada 10,000 animales sacrificados anualmente (104,107), tal número de casos en un tiempo relativamente corto no reflejan la situación real, ya que el porciento de animales que desarrollan LEB no es más del 5% y más del 60% del ganado infectado son portadores clínicamente normales (31,36).

En México se reportó la enfermedad en 1967 (4) y al igual como sucede en E.U.A. no todos los casos de LEB son diagnosticados; además, existe un gran número de rastros clandestinos y no es obligación reportar a las autoridades sanitarias el hallazgo de LEB (49).

Serológicamente, el VLB ha sido diagnosticado en ciertas regiones del país fluctuando la prevalencia serológica desde 0% hasta 32% (6,25,57,77,105,115).

A principios de la década de los 80´s se descubrió una estrecha relación en la organización genómica, patología y forma de transmisión entre el VLB y el Virus de la leucemia de las células T de humanos (HTLV) (11,12,95).

3.2. Genética, morfología y análisis fisicoquímico.

El Virus de la Leucosis Bovina es un retrovirus exógeno competente con la replicación y recientemente propuesto por Sagata y col. (94), junto con el virus de la Leucemia T de Humanos (HTLV) y el virus de la Leucemia T de simios (STLV), como miembro de un nuevo grupo de oncornavirus designado como: "E".

La secuencia nucleotídica completa del genoma integrado de VLB consta de 8714 nucleotidos y se representa en la forma:

5'LTR-gag-pol-env-pX_{BL}-3'LTR. (94,95).

El Provirus de VLB presenta los genes virales flanqueados por Terminaciones Largamente Repetidas (LTR's, "Long Terminal Repeat"), los cuales se unen covalentemente al ADN celular cuando el provirus se integra en el

genoma del hospedero celular (11,12), están constituidos por las regiones U_3-R-U_5 y poseen 530 pares de bases (94) flanqueados por 6 pares de bases repetidos de DNA celular (20). Estos juegan un papel importante en la replicación, incrementando el volumen basal de RNA mensajero y en la integración del DNA viral, así como en los procesos de transformación celular cuyas acciones son ejercidas por los elementos promotores y "Enhancer´s" que incrementan la eficiencia trascripcional de los genes virales y celulares (12,39,113).

El gen gag es el primer marco de lectura abierta (Open reading frame, ORF), está constituido por 1178 pares de bases y se extiende desde el nucleotido 628 hasta el 1806, éste da origen a un precursor de proteínas de 45 kilodaltons, [$Pr45^{gag}$], con el orden secuencial de NH_2-p_{15}-p_{24}-p_{12}-COOH y comienza con el primer triplete ATG que aparece " río abajo " del 5'LTR (12). Por procesamiento postraduccional da lugar a las proteínas estructurales internas que constituyen el core, las proteínas p_{15} y p_{24} de 190 y 215 aminoácidos respectivamente, y a la p_{12} de 69 aminoácidos que se une al ácido nucleico.

La proteasa del virus de la Leucemia Bovina (BLVPR) (PM 14 Kd) es codificada por un segmento del ARN viral localizado entre el gen gag y el gen pol, sin embargo, el marco de lectura es diferente a estos dos últimos genes, la terminación 5' del ORF del BLV PR se extiende 38 codones "río arriba" del primer codón (NH_2 terminal) de la proteína madura y traslapa el ORF de gag por 7 codones, la terminación 3' del BLV PR se extiende 26 codones "río abajo" del codón de terminación (COOH terminal) de la proteinasa madura y se traslapa 8 codones con el ORF del gen pol, el cual se encuentra ubicado a 509 nucleotidos "río abajo" del gen gag y presenta un traslape de 55 bases con el gen de envoltura (113). El gen pol, que tiene el más grande marco de lectura abierta se extiende desde los nucleotidos 2318 al 4876, codifica para un precursor que da origen a la transcriptasa reversa, este precursor es una poliproteína que contiene

determinantes de los genes de gag y pol, pesa 95 Kd, da origen a la transcriptasa reversa de 70 Kd y a una endonucleasa de 32 kilodaltons (17,38).

El gen env se extiende del nucleotido 428 al 6368 y codifica para 515 aminoácidos que dan origen a dos proteínas glicosiladas de envoltura, la Gp_{51} y la Gp_{30} (12,63). La primera es una glicoproteína de superficie de 268 aminoácidos que contiene 8 sitios parcialmente glicosilados y es la más comúnmente utilizada en las pruebas serológicas, mientras que la segunda es una glicoproteína transmembranal de 214 aminoácidos que contiene dos sitios hidrofóbicos y dos secuencias altamente glicosiladas (12,38,79).

El gen Px está localizado entre el gen env y el LTR 3' y contiene 1817 nucleotidos, dentro de esta región están codificados 3 marcos de lectura (ORF= "Open Reading Frame") denominadas X-I, XII, y XIII (20); en células infectadas se ha identificado un ARNm subgenómico que contiene los marcos de lectura abiertas X-I y XII traslapados, este ARNm es generado por un doble proceso de maduración en la cual se unen tres regiones genéticas, la primera es de 100 nucleotidos y está ubicada en la región "R" de la terminación 5' LTR, la segunda un exón de 220 bp inmediato a la terminación 5' del gen env y la última corresponde a 1360 nucleotidos contenidos en la terminación 3' del ARN genómico; la traducción de ARN subgenómico produce las proteínas p_{38} (proteína Tax), derivada del ORF X-I y p_{18} (proteína Rex) originada del X-II; ambas son proteínas nucleares no estructurales y tienen un efecto "in trans" sobre las secuencias reguladoras del VLB (63,79). La p_{18} es una fosfoproteína nuclear que se requiere para la acumulación del RNA viral, actúa post-trascripcionalmente para promover la expresión citoplasmática de RNAm virales que codifican proteínas estructurales y enzimas del VLB (48).

Los viriones del VLB, vistos con el microscopio electrónico, son esféricos con un nucleoide electrodenso y rodeado por una membrana que forma la envoltura externa (15,68,79). El diámetro total varía de 90 a 120 nm, mientras

que la nucleocápside presenta diámetros de 60 a 90 nm. (15,68). Los viriones poseen 2 moléculas idénticas de RNA de cadena sencilla con coeficiente de sedimentación (S) de 60 a 70S, una transcriptasa inversa y proteínas estructurales glicosiladas y no glicosiladas (48); las partículas virales intactas presentan un gradiente de densidad de 1.15-1.18 g/ml.(48,79).

La desnaturalización del ARN 60-70S produce subunidades que contienen poly(A), sedimentan a 38S y migran como un solo componente de 8.8 kb (38).

El DNA no integrado y los provirus del VLB son de 9.4kb (18,39).

De acuerdo al análisis químico de las partículas virales el 60% corresponde a proteína, 35% a lípidos, 2.2% a ácidos nucleicos (entre éstos 0.04% de ADN) y 0.5% a carbohidratos (79).

Mediante análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida, estudios de filtración en presencia de hidrocloruro de guanidina y de inmunoprecipitación se han encontrado en los viriones del VLB poseen seis proteínas, cuatro no glicosiladas (p_{10}, p_{12},p_{15} y p_{24}) y dos glicosiladas Gp_{30} y Gp_{51} (12,63). Las primeras se encuentran en la parte interna del virión y las últimas están hacia la parte externa insertadas en la membrana viral (12,38).

La p_{24} es la proteína principal del core y fue la primer proteína estructural detectada en el VLB, es un proteína neutra, moderadamente hidrofóbica y químicamente diferente a las proteínas principales del core de otros retrovirus, sin embargo se ha encontrado fuerte homología con la p_{24} del Virus de la Leucemia de las células T de Humanos, esta proteína , también denominada inicialmente como "antígeno éter-resistente" (83), puede extraerse de los viriones con tratamientos con éter, detergentes no iónicos o por congelación-descongelación. Los animales leucémicos infectados natural o experimentalmente producen anticuerpos precipitantes y fijadores de complemento contra esta proteína (33,34).

Los precursores intracelulares de estas proteínas se han detectado por inmunoprecipitación con suero de especificidad definida contra extractos de

células infectadas con BLV con estos métodos se han encontrado dos polipéptidos de peso molecular de 70,000 (Pr_{70} gag) y 45,000 (Pr_{45} gag) los cuales son los precursores de la p_{24},p_{15},p_{12} y p_{10}; al parecer tanto la Pr_{70} y Pr_{45} son sintetizadas independientemente. (38,39,63).

Las glicoproteínas 51 y 30 (Gp_{51} y Gp_{30}) se presentan en la envoltura del BLV, la primera es una glicoproteína de superficie, blanco de anticuerpos neutralizantes y de efecto citolítico en células infectadas (9,38), mientras que la última es transmembranal e induce la fusión de membranas (48,79), ambas se encuentran asociadas en relación 1:1 por uniones de disulfuro y se derivan de un mismo precursor de 72,000 daltons (gPr_{72} env) (38,63).

Se han producido anticuerpos monoclonales contra la Gp_{51} y por ensayos de competición de unión anticuerpo se ha encontrado que éstos identifican ocho epítopes (A hasta H) independientes contra la Gp_{51}. Tres de esos epítopes, los llamados F, G y H, están involucrados en la infectividad y en la formación de sincitios de células productoras de VLB así mismo el epitope H es el blanco para la citotoxicidad dependiente de complemento mediada por anticuerpos. La integridad de estos epítopes depende de la integridad del carbohidrato unido, dado que la remoción de las cadenas de carbohidratos por tratamientos con glicosidasas específicas eliminan la unión de anticuerpos séricos de animales infectados con esta proteína. Así mismo, el tratamiento de las células FLK-VLB con tunicamisina producen el precursor de la Gp_{51} y se reconoce en él los sitios antigénicos de la A hasta la E pero no los epítopes F,G y H. (9,38).

La transcriptasa reversa del BLV (TR-VLB) posee un peso aproximado de 70kD es una polimerasa de DNA dependiente tanto de RNA como de DNA y tiene una fuerte preferencia sobre el ión magnesio como catión divalente. Un posible precursor de esta proteína es un producto de 145,000 daltons se ha detectado en células infectadas con BLV (38). La TR-VLB es antigénicamente

distinta de las trascriptasas reversas de los retrovirus del sarcoma del simio, leucemia murina y mieloblastosis aviar (48).

3.3. Manifestaciones clínicas en bovinos positivos a VLB.

La transmisión horizontal en condiciones naturales es la principal vía de infección en los bovinos susceptibles, una vez que el animal adquiere el virus se considera que permanece con él de por vida (22,107) y aunque no se detecten viriones en circulación existe una fuerte reacción serológica contra las proteínas estructurales del VLB (27,53), la mayoría de los animales infectados permanecen clínicamente sanos y no existen indicios marcados de baja en la eficiencia productiva (principalmente en los primeros meses), no obstante se reconoce que el virus provoca tres síndromes (35,66) conocidos como:

1) Portador Sano Asintomático (PSA)
2) Linfocitosis Persistente (LP)
3) Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB)

Algunos estudios señalan que la presentación de los tres síndromes anteriores dependen de ciertos factores, entre los cuales se incluyen genéticos y ambientales (36,61).

El LEB se considera la forma maligna de la enfermedad y se estima que ocurre en alrededor del 0.1 a 10 % de animales portadores del virus (31,73), esta condición presenta un pico de incidencia en animales con edades entre 4 y 8 años (36,49), presentando alteraciones clínicas diversas que dependen del órgano o tejidos afectados por la infiltración linfoide (1,2,16,50,90,111), de esta forma, si los nódulos linfoides externos (sublumbares, e inguinales internos, principalmente) son los afectados el diagnóstico clínico se facilita, sin embargo, éste se torna difícil si el desarrollo del tumor se ubica en nódulos, órganos ó tejidos internos; de estos últimos los frecuentemente afectados son el corazón, abomaso, útero, riñones, canal espinal y la región retroorbital (2,16). El LEB a

menudo invade el tracto gastrointestinal, principalmente el abomaso, provoca obstrucción y ulceración que originan anorexia y pérdida de peso (4,49). La infiltración linfoide en el cordón espinal y miocardio, inducen a alteraciones neurológicas y cardíacas, respectivamente (50). El desarrollo de tumores en la región retrobulbar también se han reportado, aunque éstos se presentan con baja frecuencia, (menos del 17%) en los animales con LEB generalizado (90).

La frecuencia de los signos clínicos reportados por Reed (91) en estudios de campo de 1100 bovinos afectados por LEB incluyen: pérdida de peso, baja en la producción de leche, linfoadenopatía interna, paresis posterior, fiebre, signos respiratorios, exoftalmo bilateral, diarrea, constipación y signos cardiovasculares.

Los animales con linfoma presentan alteraciones inmunológicas celulares y humorales (26,47), en el primer caso existe un descenso en el número relativo de linfocitos T con una pobre respuesta a la estimulación con varios mitógenos mientras que en el segundo, las concentraciones de IgM están reducidas o no se evidencian y la afinidad de los anticuerpos está muy reducida (47).

Por otra parte, el estado de LP se considera una respuesta benigna y se presenta en alrededor de un 30% a un 70% de los animales afectados por el virus, esta condición se caracteriza por un aumento en las cuentas de linfocitos B (26,36) y se define como un aumento prolongado en el número de linfocitos absolutos al menos tres desviaciones estándar por arriba del promedio normal, de acuerdo a la edad y raza (47). Esta condición debe persistir por lo menos tres meses consecutivos y los animales no manifiestán alteraciones clínicas de sugestivas de linfoproliferación.(36,50). Las implicaciones económicas de esta condición clínica no están bien establecidas, no obstante se ha observado que animales seropositivos tienen un promedio de vida más corto, tienen menor producción láctea y por consecuencia son desechados prematuramente del hato que los animales seronegativos al VLB (9,97).

Varios antígenos de linfocitos bovinos (BoLA), determinan en cierta medida la resistencia o susceptibilidad para el desarrollo de LP, Lewin y Bernoco, emplearon alloantisueros para determinar asociación entre haplotipos y fenotipos de BoLA en animales infectados con VLB sin LP y con LP (61). Los animales BoLA-w8 tienen mayor probabilidad de estar seropositivos, mientras que los animales con BoLA-DA7 seropositivos son resistentes a desarrollar LP, mas no así los BoLA-DA12.3 que tienden ser más susceptibles a presentar LP.

3.4. Epizootiología.

Los estudios epizootiológicos deben de diferenciar la distribución de LEB a la distribución de infección por VLB, el primero describe la incidencia del tumor y la última la del virus (50). Antes del aislamiento del VLB y del desarrollo de técnicas serológicas sensibles para detectar la infección, los estudios epizootiológicos se apoyaban en los índices leucocitarios y presencia de linfosarcoma en los animales sospechosos, sin embargo, tales parámetros resultaban ser un deficiente indicador de la infección por VLB (31,36).

El LEB es el segundo tumor más común de los que afectan al bovino, sin embargo, es la neoplasia hemolinfática más frecuente (47). Esta frecuencia es difícil de determinar, lo cual se refleja en la variabilidad de los reportes de incidencia en diferentes zonas. Los rangos de incidencia de linfoma reportados para los Estados Unidos de América varían de 20 a 84 por cada 100,000 bovinos sacrificados (36,50,73,104).

El desarrollo de LEB, LP y PSA en los animales infectados está influenciado por factores virológicos, serológicos e inmunológicos, además de existir cierta predisposición genética para el desarrollo del linfoma y linfocitosis persistente (37,61).

Los estudios serológicos realizados en los diversos continentes revelan que la infección por VLB está ampliamente difundida (8,13,16,25,28,65,101).

Sin embargo, la seroprevalencia varía acorde a la zona, el tipo de producción, edad, e historia previa de linfosarcoma en el hato (31,35,36).

Europa es el continente con mayor interés en erradicar la infección por VLB y así, se han realizado diversos estudios para ubicar la distribución de este virus. En países como Francia, Italia, Alemania, se han reportado prevalencias relativamente moderadas mientras que en Suiza, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Portugal, la prevalencia es baja (100).

En América también se han realizado estudios epizootiológicos de la infección por el VLB (8,13,25,28,60,65,77,92,105,115). Una investigación serológica realizada en Canadá en 1978 demostró que el 40% de los hatos lecheros y el 11% de los hatos productores de carne están infectados, no obstante en este mismo trabajo se encontraron anticuerpos en el 9.3% de las vacas destinadas a la producción láctea y sólo 0.5% en el ganado productor de carne (51,91), por otra parte, el porciento de hatos infectados en la provincia de este país varió desde 0 hasta 60% y alrededor de 90% en los estados de la zona central (21).

Se calcula que la prevalencia de infección en los E.U.A. fluctúan entre 10% y 48% en los bovinos lecheros, no obstante, se estima que del 60% al 92% de los hatos destinados a la producción de leche se encuentran infectados y el ganado productor de carne presenta seropositividad desde el 0.5% a 19%, permaneciendo infectados el 14% de estos hatos (13,21,44,45).

Aunque a finales de los 60's el Linfosarcoma Enzoótico Bovino se diagnosticó por primera vez en la república Mexicana (4), los estudios seroepidemiológicos hasta la fecha han sido escasos; en 1983 Suzan y col. (101) muestrearon ganado lechero y de carne en varios estados de la república, determinaron que el 36% de los lecheros y el 4% de los productores de carne están infectados, estudios similares realizados por Monroy y col. en Tamaulipas y Puebla reportan prevalencias elevadas con 54% y 18% respectivamente (77), en

este mismo año Larios y col. al estudiar una población de bovinos de carne y sus cruzas en una zona subtropical, encontraron una seroprevalencia general de 17%, determinando mayor índice de positivos en la raza pardo suizo, seguido de la Indobrasil (57), por otra parte, Espada y col. en 1986, buscaron anticuerpos contra VLB en bovinos lecheros sacrificados en el rastro de Baja California detectando 32% de seropositividad (25). En el noreste de México, previamente se determinó una seroprevalencia general de 3.19% (105) y una alta frecuencia serológica en hatos lecheros cercanos a zonas urbanas (115). Al igual que los anteriores estudios se evidenció que de acuerdo al tipo de explotación los bovinos lecheros son los más afectados.

Se ha determinado que la prevalencia de infección del virus de la leucosis bovina aumenta conforme se incrementa la edad (13,14,30,44), presentando mayor índice de seropositivos los animales con edades de 2 a 3 años comparados con los animales de 1 a 2 años, no obstante que después de 3 años la infección permanece relativamente estable según el manejo del ganado (21).

El tamaño y antecedentes previos de linfosarcoma en el hato, determinan en cierta medida los porcentajes de seropositividad ya que hatos con baja población tienden a tener altas proporciones de seropositivos (44,115), mientras que en poblaciones con antecedentes de la forma maligna de la enfermedad, la probabilidad de encontrar seropositivos es mayor que en los hatos en donde no existen antecedentes de presentación de la enfermedad (31,73,86).

La transmisión horizontal es la principal causa de infección por VLB en la población bovina , el virión aún no se ha podido detectar "in vivo" y se asume que el ganado se infecta al entrar en contacto con linfocitos que portan el provirus; de esta forma, cualquier medio, ya sea natural o artificial, que resulte en la transferencia de linfocitos entre la población bovina resulta importante para que el virus se transmita. (21,22).

En condiciones naturales, la transmisión por contacto es la principal vía a través de la cual el VLB se difunde (21,58), no obstante, la infección in utero es de frecuencia baja (1.2-1.6%) y la probabilidad de infección está asociada con la prevalencia del VLB en el hato (60), a las prácticas de manejo (59), la función zootécnica (21) y probablemente a la estación y presencia de insectos (22,51).

3.5. Diagnóstico serológico de la infección por VLB.

El diagnóstico de la infección por VLB, es uno de los factores principales para el control y la erradicación del virus (21,50,52,54). Una vez que el animal se infecta permanece así de por vida, produce anticuerpos contra varias proteínas estructurales del virus (38,41) y contra antígenos asociados a tumor en células linfosarcomatosas (3).

Actualmente, la detección serológica del VLB es la manera más práctica para evidenciar la infección, en vez de encontrar estados linfocíticos o linfosarcomatosos, y existen varios procedimientos para este propósito (27,50).

Las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico del VLB incluyen la Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), Fijación de Complemento (FC), Radioinmunoensayo (RIA), Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA) y Virus Neutralización (VN) (27,32,34,37,40,70,71).

La prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), empleando como antígeno la Gp_{51} del VLB es comúnmente empleada dada su sensibilidad, simplicidad, reproducibilidad, fácil ejecución y bajo costo (70), de hecho, es la prueba oficialmente aceptada por los países de la Comunidad Económica Europea para el diagnóstico de VLB (43). La IDAG resulta ser un indicador confiable de la infección por VLB (54,75) y se correlaciona bien con la infección con un alto grado de especificidad (debido en parte a la estabilidad genética del virus)(17,72). Variaciones en algunos elementos (pH, Molaridad y tipo de Buffer, tiempo de incubación, tinción de complejos precipitantes, etc...) que involucran la prueba de

IDAG no aumentan la sensibilidad cuando se comparan con los ensayos inmunoenzimáticos, de los cuales se han empleado las técnicas de ELISA (40) y Western Blot (41).

Con ELISA se pueden analizar eficientemente un gran número de animales, además es segura, rápida y sensible. Esta prueba se ha estandarizado a través del método indirecto (recomendado para serología), para detectar anticuerpos tanto en suero (37,40) como en leche (10,14) , utilizando para ello una variedad de antígenos (en diferentes cantidades) del virus dentro de los cuales destaca la Gp_{51} purificada ya sea a partir de sobrenadantes de cultivos celulares (FLK-BLV(49), BL-BLV(110) o de viriones purificados (40). Generalmente se ha empleado como anticuerpo secundario anti-IgG bovina inducida en conejo y marcada con peroxidasa y las variaciones se han ubicado en el tipo de Buffer, Bloqueador o número de lavadas (40,76,81).

Los grupos de Investigadores que han comparado la sensibilidad entre ELISA e IDAG han determinado que la primera es superior como se muestra a continuación.

Ressang y col. examinaron un total de 2784 sueros y encontraron una diferencia de 0.5% entre ELISA e IDAG (110).

Graves y col. compararon la sensibilidad de ELISA con el ensayo de inhibición de la policariocitosis temprana (AIPT) y con al IDAG-Gp_{51}, determinaron 96.2% de concordancia entre los resultados de las pruebas sin embargo la AIPT detectó el mayor número de positivos seguido de ELISA e IDAG (40).

Por otra parte, Floret en 1988 (37) y Nguyen y col. en 1993 (81) utilizando Gp_{51} purificada a partir del VLB, lograron la detección de anticuerpos en leche y/o en suero, de animales infectados. El primer autor encontró con ELISA entre 10% y 30 % más animales positivos que con IDAG, , mientras que los últimos, detectaron 25 sueros positivos de 45 y 15 muestras de leche de 30

animales con signos de leucosis que previamente resultaron negativas para IDAG.

Por otra parte, el método de Inmunoelectrotransferencia (WB) también se ha empleado para detectar anticuerpos anti-VLB (41,109). Walker y col. (109) aplicaron esta metodología y detectaron anticuerpos contra todas las proteínas de los viriones de VLB y contra antígenos de pesos moleculares aproximados de 55,100,y 150 Kd obtenidos a partir de concentrados de células infectadas con VLB. El WB claramente evidenció reacciones contra la P_{24} en 21 sueros de bovinos que anteriormente resultaron dudosos en la IDAG-Gp_{51}.

También, Grover y Guillemain (1992)(41) encontraron similares resultados usando viriones purificados y suero de referencia positivos a IDAG, ELISA y RIA. Al comparar las pruebas de IDAG, ELISA e IET, éstas presentaron concordancia en 49 sueros (31 negativos y 18 positivos), sin embargo, 21 sueros resultaron positivos por IET y negativos para ELISA e IDAG.

Con estos resultados se indica que la IET es más sensible que otras pruebas serológicas, además, con la ventaja de poder definir tanto la intensidad como la especificidad de la reacción.

Una de las aplicaciones prácticas de estas metodologías inmunoenzimáticas radica tal vez en que la presencia del virus puede detectarse a partir de leche, la cual es relativamente mas rápida y sencilla de obtener que el suero.

3.6. Detección del provirus del VLB.

El uso de pruebas de detección de acidos nucleicos virales específicos como la amplificación selectiva de un segmento genómico (PCR) o hibridación a una sonda de ácido nucleico marcada, se ha incrementado notablemente como el medio preferido para un rápido diagnóstico. Los métodos para el diagnóstico (Serología, Microscopía electrónica, Aislamiento viral) no solo de VLB sino de la

mayoría de las infecciones retrovirales carecen de sensibilidad para detectar el virus en etapas muy tempranas de la infección (29).

Los procedimientos que se han reportado para detectar al ácido nucleico del VLB son la Hibridación in situ, el Southern blot, el Dot blot y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (2,7,18,48,74,80,83,88,97).

Con el uso de la hidridación *in situ* con sondas biotiniladas o radioactivas se ha logrado detectar transcritos de RNA del VLB en linfocitos sanguíneos periféricos, estimulados con concanavalina A ó phytohemaglutinina y en células linfosarcomatosas (83,89).

Con la técnica de Southern blot se ha logrado determinar provirus "integrado" del VLB en el DNA genómico de tejido linfosarcomatoso de ovejas infectadas (82); así como en linfocitos T ayudadores y citotóxicos/supresores de bovinos linfocíticos (99).

Sin embargo, el uso de sondas moleculares para detectar al VLB por medio de Southern blot o Dot blot tiene un éxito parcial, debido al bajo límite de detección por ambos métodos en situaciones de campo (1célula infectada por 10 a 100 linfocitos) (2), de tal forma que la técnica de PCR se ha empleado con mayor éxito para la detección temprana de la infección por VLB (2,7).

Con el propósito de aplicar el PCR para la detección temprana del VLB en animales (ovejas) infectados, Brandon y col. amplificaron una región del gen ENV (desde nucleotido 5099-5120, 5'-3' hasta 5521-5542, 3'-5'), en su experimento cuatro de seis animales resultaron positivos una semana después de la infección, y lograron detectar el provirus en 10 pg de DNA en la muestra (7).

Murtaugh y col. (97), también aplicaron esta metodología para detectar el VLB en el DNA de células mononucleares sanguíneas de animales seropositivos y seronegativos, utilizaron como "primers" regiones conservadas de los genes GAG, (1109-1128, 5'-3'y 1315-1335, 3'-5'), POL (5042-5061,5'-3' y 5457-5476,3'5') y

ENV (2791-2812, 5'-3' y 3367-3387, 3'5') con un sistema de amplificación suficiente para detectar un genoma viral en 100,000 células.

Sherman y col. diseñaron "primers" que amplificaron regiones de los genes pol y pX-VLB; los "primers" detectaron hasta 10 copias de DNA-VLB contenido en plásmidos mezclados con 1μg de ADN humano o bovino. Estos autores, encontraron una concordancia entre el resultado serológico con Radioinmunoensayo y el PCR realizado con ADN obtenido de mononucleares sanguíneos de vacas infectadas y no infectadas (97).

Kelly y col. compararon la detección temprana de la infección por el VLB con las metodologías de PCR e IDAG. Estos investigadores diseñaron oligonucleotidos para amplificar una región de 375bp del gen gag, encontraron positividad 7 días después de inocular a los animales y concluyeron que el PCR puede no ser útil para propósitos de detección rutinaria, pero que es recomendable realizarla en aquellas situaciones en que se desea detectar animales seronegativos pero infectados (55).

Recientemente, algunos investigadores han medido la eficacia del PCR bajo situaciones de campo (2,78), concluyendo que esta técnica tiene aplicabilidad práctica para detectar becerros infectados, a pesar de la presencia o ausencia de anticuerpos calostrales, permitiendo esta observación remover inmediatamente la fuente de infección para el hato.

3.7. Importancia económica de la infección por VLB.

Las consecuencias económicas de la infección por el virus de la leucosis bovina son difíciles de estimar; sin embargo, para evaluar su impacto es necesario tener en cuenta factores como la prevalencia viral, susceptibilidad genética del animal para desarrollar la forma maligna, decomiso en el rastro, restricciones para exportar animales procedentes de zonas positivas, así como capacidad productiva y reproductiva de los animales infectados (8,45,46, 54, 56, 61,92).

Thurmond et.al. (103) al analizar la edad (2-7 años) en que las vacas lecheras seropositivas o seronegativas son desechadas en un hato de 200 en producción encontraron que los animales seronegativos sobrevivían más de 3.5 años, de esta forma el aumento en el período de permanencia en el hato puede influenciar en la eficacia económica del mismo. Estos mismos investigadores sugieren que la infección por VLB incrementa la probabilidad de desecho debido a un efecto adverso sobre la productividad, causado por alteración de los procesos fisiológicos y a la presencia de cantidades subclínicas de tejido neoplásico. No obstante existen controversias de la influencia del VLB en la economía del hato lechero, en una investigación realizada en Chile, se determinó que la Leucosis Bovina Enzoótica no interviene de manera importante para que se presenten problemas de mastitis, abortos o infertilidad; sin embargo, la producción láctea sufre una pérdida promedio de 156 kg corregida al 3.5% de grasa por cada lactancia en el animal (8).

Por otra parte, estudios realizados en E.U.A. en diferentes hatos; encontraron que vacas positivas o negativas en producción no presentaron diferencias promedio significantes, en parámetros como producción láctea y eficiencia reproductiva (56); así también, Huber et. al. (45) encontraron tendencias no significantes en los promedios de producción y variables reproductivas entre vacas seropositivas o seronegativas, así como en el riesgo relativo para desarrollar mastitis o en la sobrevivencia 3 durante años.

Wu et. al. (111), compararon la producción de leche y grasa en leche en vacas agrupadas de acuerdo al estado subclínico de infección por VLB (LP-seropositivos, PSA-seropositivo y normal-seronegativo) y encontraron que la producción de leche fue más alta en vacas seropositivas con LP que su potencial genético, mas no así la producción de grasa en leche, al sugerir que la infección temprana con VLB se asocia positivamente con la producción de leche es

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Ubicación de las zonas muestreadas

Los Municipios muestreados de la zona Noreste, la función zootécnica y la cantidad de animales estudiados se presenta en el Cuadro I, mientras que la distribución relativa de las zonas muestreadas en los Estados se ubican en la Figura 1.

Figura 1. Distribución relativa de las zonas muestreadas (□) en el noreste de México para detectar anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en suero de bovinos.

4.2. Toma de muestras, separación de suero y mononucleares sanguíneos periféricos (MSP).

De los bovinos se extrajo sangre venosa a partir de las venas coccigeas ó yugular, empleando tubos al vacío (13 x 100) y agujas tipo "Vacutainer" (calibre 21 x 38 [21 x 1 $^{1/2}$]).

Para obtener el suero, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se almacenó en refrigeración hasta la llegada al laboratorio, en donde se separó

por centrifugación a 2,000 rpm. durante 10 minutos, el suero se succionó con pipetas pasteur depositándose aproximadamente 2 ml. en viales de vidrio y previa etiquetación se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para la obtención de MSP, se extrajeron 3 ml de sangre en tubos al vacío con EDTA de cada animal seleccionado. La sangre se mantuvo en refrigeración (no más de 8 h) hasta que fue centrifugada a 1500 rpm durante 30 m. Después de la centrifugación, se removió la capa leucocitaria y se resuspendió en 1 o 2 ml. de SSF.

La suspensión se depositó cuidadosamente en 4 ml de Ficoll-Paque y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 m. a 22°C, los MSP se aspiraron, ubicados en la interfase entre el Ficoll y la SSF, y se lavaron 2 veces en 30 ml de SSF estéril, centrifugándose a 1000 rpm durante 10 y 5 minutos sucesivamente; al final se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.2 ml de medio RPMI con SFB al 10% y antibióticos, se determinó la cantidad de MSP por método de exclusión con azul tripano y se ajustó a una concentración de 5×10^6 por ml.

4.3. Cultivo celular y obtención de antígenos.

4.3.1. Cultivo de Mononucleares sanguíneos periféricos (MSP) y obtención de antígenos en sobrenadante celular (ASC).

Los MSP ajustados a 5×10^6 por ml en medio RPMI con SFB al 10%, concanavalina A 5µg/ml y antibióticos y se incubaron durante 48 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 y 80% humedad. Después de este período, los MSP y el sobrenadante se separaron por centrifugación, los primeros se almacenaron para posteriormente extraer el DNA celular, mientras que el último se colectó en viales y se mezcló con una suspensión formalinizada al 1% de la cepa Cowan de *Staphyloccocus aureus* durante 18 horas a 4°C, después se eliminaron las bacterias por centrifugación (3000 rpm x 10 minutos) y las

proteínas del sobrenadante (ASC) se precipitaron con polietilenglicol al 8% para su empleo posterior en el Inmunoblot.

4.3.2. Cultivo de células de riñón de cordero persistentemente infectadas con VLB (FLK-VLB) y producción de antígenos solubles.

Las células persistentemente infectadas con el virus de la leucemia bovina (FLK-VLB), en el pase 79, se cultivaron a 37.5°C, con 5% de CO_2 y 80% de humedad relativa en cajas de 25 cm^2 con medio esencial mínimo, antibiótico (Penicilina-Estreptomicina) y suero fetal de bovino al 8% (medio de mantenimiento, ver Apéndice), hasta obtener aproximadamente 95% de confluencia celular.

A partir de una caja confluente se realizaron subcultivos a razón de 1:4, usando versenato de sodio al 0.05% como disgregador celular, distribuyéndose en cajas del mismo tamaño y se incubaron en las mismas condiciones. Cuando se obtuvo una confluencia cercana al 80%, tres de las cajas se disgregaron y se resembraron individualmente en cajas de 175 cm^2, mientras que la cuarta caja se procesó para conservarse en congelación. A las cajas de 175cm^2 se les permitió llegar a confluencia, tiempo en el cual se les disminuyó la concentración de SFB a 5% (medio para producción de antígenos, Apéndice) dejándose en estas condiciones durante 4 días, se recolectó el sobrenadante y se subcultivó (1:2) dejándose con la misma concentración de SFB y así sucesivamente hasta que se obtuvo aproximadamente 3 litros de sobrenadante, mismo que se almacenó a -20°C hasta su uso en la etapa de purificación.

4.3.2.1. Purificación de la Glicoproteína 51 (Gp_{51}) del VLB.

El sobrenadante se descongeló y se clarificó por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. Las proteínas en suspensión se precipitaron con sulfato de amonio a razón de 30% durante 72 h. a 4°C.

Las proteínas precipitadas se dejaron sedimentar y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 m. (desechándose el sobrenadante), el sedimento resultante se resuspendió en PBS hasta aproximadamente 1/10 del volumen originalmente precipitado, esta suspension se dejó toda la noche a 4°C y el precipitado formado durante este período se eliminó por centrifugación a 2500 rpm. x 30 minutos.

El sobrenadante recolectado se dejó fluir a través de una columna conteniendo Sepharosa-Con A (Apéndice) con 8 ml de volumen de cama y se eluyó con PBS hasta no detectar absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Posteriormente, las glicoproteínas y azúcares unidos a la matriz de Sepharosa-Con A, se desprendieron con 0.1 M de Alfa-metil-D-Manosidasa y se recolectaron en viales de 1 ml.

Los viales se almacenaron a 4°C y después se determinó la presencia de la Gp_{51} con antisueros positivos y negativos de referencia empleando la técnica de IDAG.

4.4. Detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB).

4.4.1. Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG).

Se empleó agarosa disuelta al 0.8% en Tris-HCl 0.05 M. con 8.5% de NaCl (pH 7.2). La agarosa se fundió con calor y se vaciaron 8 ml en cajas de petri de plástico de 80 mm de diámetro, una vez solidificada, a temperatura ambiente durante 1 hora, se realizaron hoyos de 8 mm de diámetro sobre el gel, procurando una distancia entre cada pozo de 2.5 mm. en un patrón de siete hoyos (Figura 2).

El antígeno (Gp_{51} del Virus de la Leucosis Bovina) se colocó en el orificio central mientras que los sueros de referencia (positivos y negativos) y los sueros a probar se distribuyeron alternadamente.

La caja de petri se incubó a temperatura ambiente, en una cámara humedecida con 2% de formol, durante 48 horas. Se consideraron como positivos aquéllos que presentaban línea de continuidad con los controles positivos.

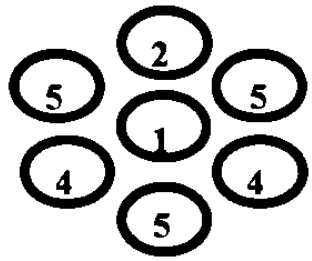


Figura 2. Patrón utilizado en la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel.

1. Antígeno glicoprotéico 2. Suero de referencia positivo 3. Suero de referencia positivo débil positivo
4. Suero de referencia negativo 5. Sueros sospechosos

4.4.2. Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA).

La glicoproteína, previamente obtenida en la etapa de purificación, se ajustó a una concentración de 1μg x 100μl.

La sensibilización de las microplacas de ELISA, se efectuó al depositar 100μl de la solución de glicoproteína a cada pozo y permitiendo adsorber toda la noche a temperatura ambiente. Después de este período se extrajo la solución y se almacenó en refrigeración. El bloqueo se llevó a cabo agregando a cada pozo 110μl de solución bloqueadora (Tris-HCl+ 0.15% de Tween 20 a pH 7.2) y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente, después, las placas se enjuagaron 2 veces con el Buffer de lavado (Tris-HCl + 0.05% de Tween 20) y se sacudieron para quitar el exceso de buffer.

Finalmente, las placas se cubrieron, etiquetaron y almacenaron a 4°C y se usaron en un período no mayor a 45 días.

Para la determinación de Anticuerpos contra VLB en el suero del animal, cada muestra se diluyó 1:10 en Buffer de dilución (Tris-HCl, 0.15% de tween 20, 0.5% de Albumina de Huevo, pH 7.5) y se colocaron 50μl por duplicado, durante

dos horas a temperatura ambiente, después cada pozo se lavó 4 veces con Buffer de lavado.

El anticuerpo anti-IgG bovina marcado con fosfatasa alcalina, diluído 1:5000 en Buffer de lavado, se agregó (100µl) a cada pozo, se incubó 1 hr. a temperatura ambiente, después se retiró el conjugado y se lavó 4 veces, después de la última lavada se le agregó a cada pozo una solución recién preparada de NPP (5mg/5ml de Buffer de Diethanolamina-HCl 0.1M pH 9.8 + 1_mM $MgCl_2$), se dejó incubando durante 1 hr. y se registró la absorbancia a 405 nm. Las lecturas se repitieron cada hora en tres ocasiones.

La distribución de los "blancos", sueros controles (+/-), el suero fetal y los sospechosos se observa en la figura 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bco	Bco										
B	Bco	Bco										
C	+	+										
D	Pol	Pol										
E	SFB	SFB										
F	-	-										
G	*											
H	**											

Figura 3. Esquema de distribución de los sueros sospechosos y controles negativos y/o positivos al Virus de la Leucosis Bovina en la microplaca de ELISA.

Bco = Blanco, pozo con el mismo proceso pero sin agregar suero

POL Mezcla de 10 sueros (1 ml c/u) de bovinos lecheros positivos a IDAG

** Pozo con antígeno pero sin agregar el anticuerpo marcado

SSB =Suero Fetal Bovino

- = Suero control negativo (donado por Van Der Maaten) USDA,NADC

☐ Suero sospechoso

+ = Suero control positivo (Leukoassay, Pitman Moore)

* Pozo sin antígeno y tratado con el mismo proceso

▒ Duplicado de suero sospechoso

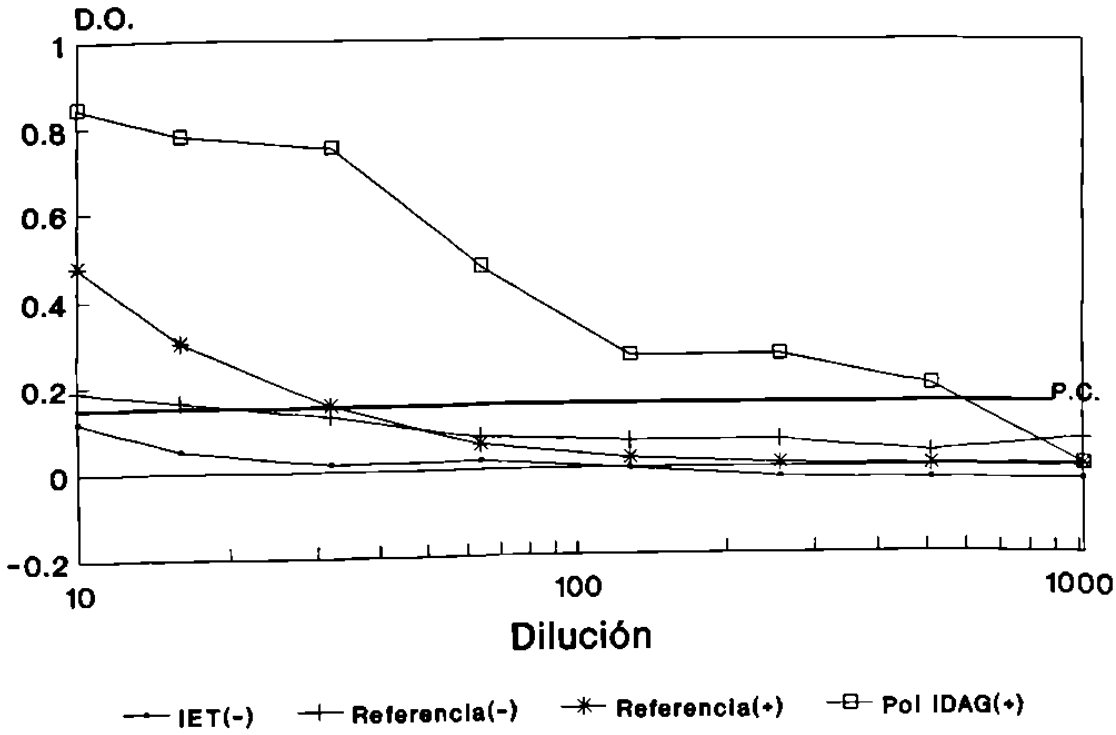


Figura 4. Curva de referencia y punto de corte obtenida con los sueros controles en la prueba de ELISA.

4.4.2.1. Curva de referencia y establecimiento del punto de corte en ELISA.

Se emplearon tres repeticiones para obtener la curva de referencia y el punto de corte (0.2 D.O.), para discriminar los seropositivos de los seronegativos (Figura 4), empleando controles positivos y negativos de referencia, además de un suero negativo a Inmunoblot y una mezcla de 10 sueros positivos en IDAG.

4.4.3. Inmunoelectrotransferencia (WB)

Para la detección de anticuerpos anti-Gp_{51} y anti-P_{24} del VLB en vacas sospechosas, se emplearon los antígenos glicoprotéico, "dual" y el sobrenadante de MSP cultivados de algunas vacas que previamente resultaron positivas. Los antígenos se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida. Los antígenos se ajustaron a 1 mg/ml, se calentaron a 100°C durante 3-5 m. en buffer de muestra y después se inocularon en el gel, aplicándoseles 100V de corriente eléctrica para permitir la separación.

Los antígenos separados en el gel de poliacrilamida se transfirieron durante toda la noche a una membrana de nitrocelulosa con la ayuda del aparato de electrotransferencia.

Se verificó la transferencia hacia la membrana, tiñendo ésta con rojo Posieu al 2%. Posteriormente la membrana fue cortada en tiras que se bloquearon con leche descremada al 25% (en buffer de bloqueo) durante 1 h., después, las tiras se lavaron 4 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El suero de los animales sospechosos y de los controles positivos y negativos se diluyeron 1:200 para incubarse separadamente con las tiras durante una hora a temperatura ambiente, corrido este tiempo, se realizaron varias lavadas y después de éstas, se les agregó un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG bovina, diluída 1:5000, se incubó durante una hora y se repitieron los lavados. La reacción positiva se evidenció al agregar BCIP+NBTE como substrato de la enzima. La figura 5 muestra la serorreacción obtenida en donde se aprecian reacciones de variable intensidad contra la Gp_{51} y P_{24} del VLB.

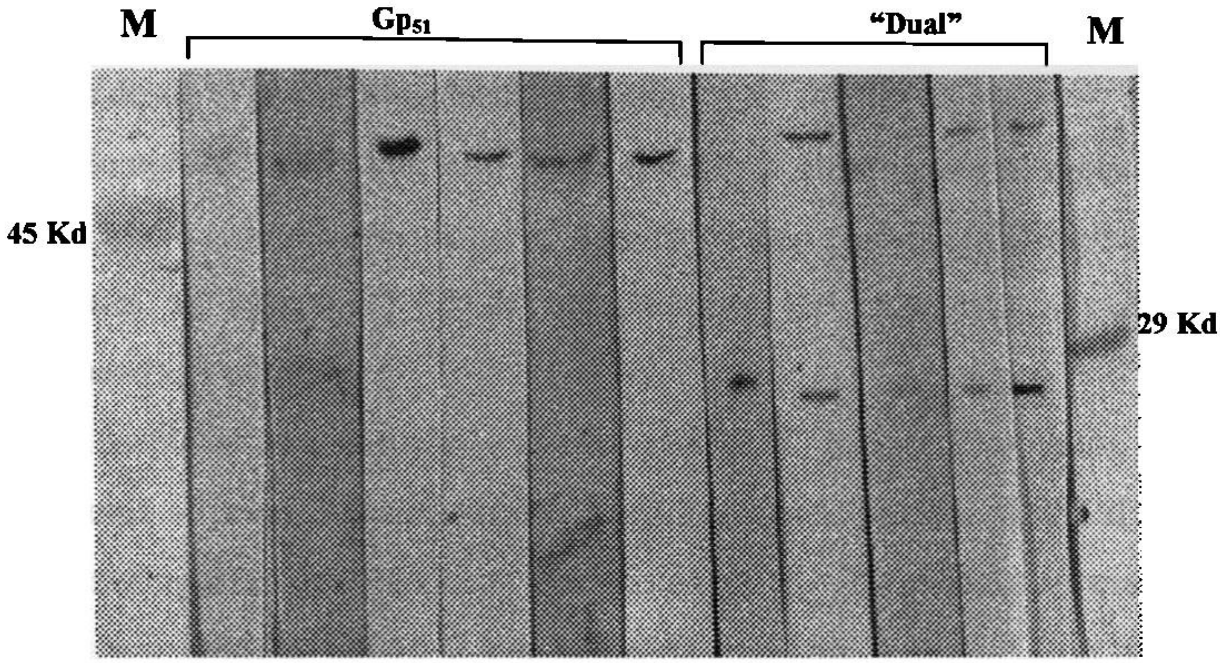


Figura 5. Reactividad obtenida en la Inmunoelectrotransferencia con el suero de vacas seropositivas y seronegativas (IDAG) contra las proteínas estructurales Gp_{51} y P_{24} del VLB.

4.5. Detección de antígenos del Virus de la Leucosis Bovina

4.5.1. Fijación de complemento.

Se preparó una suspensión estándar de eritrocitos de carnero (SEEC), para lo cual se diluyeron 10 ml de sangre de carnero con un volumen igual de SSF y se centrifugaron a 2500 rpm durante10 minutos, se removieron el sobrenadante y la capa leucocitaria, repitiéndose esta operación 3 veces, en la última etapa, los eritrocitos lavados se resuspendieron en tubos graduados de 15 ml y se centrifugaron exactamente a 1500 g por 10 minutos para ajustarse finalmente al 3%.

Para los ensayos se emplearon microplacas de ELISA, depositándose 50 µl de suero positivo (vaca fuertemente seropositiva a IDAG y con evidencia clínica de linfosarcoma) en el primer pozo de cada línea, los pozos se cubrieron con cinta adhesiva y se inactivó el suero colocando la microplaca en baño maría a

56°C durante 1 h., después la cinta se removió y se colocaron 25µl de diluyente del segundo al doceavo pozo de cada línea, se realizaron diluciones dobles seriadas desde el primer pozo hasta el último.

Se agregaron 25 µl de ASC desde el tercer al último pozo, al segundo pozo de cada hilera se le adicionó 25 µl de diluyente como control anticomplementario y después se agregó 25 µl de complemento (50 unidades) a cada pozo exceptuando el primero.

Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, durante este tiempo se preparó la suspensión de eritrocitos sensibilizada (SES) al mezclar volúmenes iguales de SEEC con hemolisina (1:8), esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 15 m. con agitación constante.

Después de la etapa de incubación, a las microplacas se les agregó 25 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados a cada pozo, exceptuando el primero. La placa se cubrió de nuevo y se incubó a 37 °C por 30 minutos con agitacion constante. La placa se mantuvo en refrigeración durante 2 horas para la sedimentacion de los eritrocitos, y el sobrenadante de cada pozo se obtuvo por aspiración y se depositó en un tubo eppendorf para leer la absorbancia (densidad óptica) en un espectrofotómetro a 540 nm.

4.5.2. Inmunoelectrotransferencia (WB)

Las proteínas del sobrenadante (SCC) obtenido de los cultivos de MSP, previo tratamiento con la cepa Cowan de *S. Aureus*, se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida. El sobrenadante se ajustó a una concentración protéica de 1mg/ml, se calentó a 100°C durante 3-5 minutos en buffer de muestra y después para separar los antígenos se inocularon muestras en el gel de poliacrilamida y se aplicó corriente eléctrica de 100V hasta que la banda del colorante llegó al límite del gel. Los antígenos separados se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se constató

la transferencia (tiñéndola con rojo Posieu) y después la membrana se bloqueo con leche descremada al 25% (buffer de bloqueo) durante 1 h., posteriormente, la membrana se lavó 4 veces (buffer de lavado), se dejó secar a temperatura ambiente y fue cortada en tiras. El suero de animales fuertemente seropositivos a IDAG, los sueros controles positivos y negativos y las muestras a probar se diluyeron 1:200 para incubarse separadamente con las membranas durante una hora a temperatura ambiente, corrido este tiempo se realizaron varias lavadas y después de éstas se les agregó un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG bovina, diluida 1:5000, se incubó durante una hora y se repitieron los lavados. La reacción positiva se evidenció al agregar BCIP+NBTE como substrato de la enzima. La figura 6 muestra la serorreacción obtenida, aquí se aprecian reacciones de variable intensidad contra la Gp51, P24 y otras proteínas de diferente peso molecular.

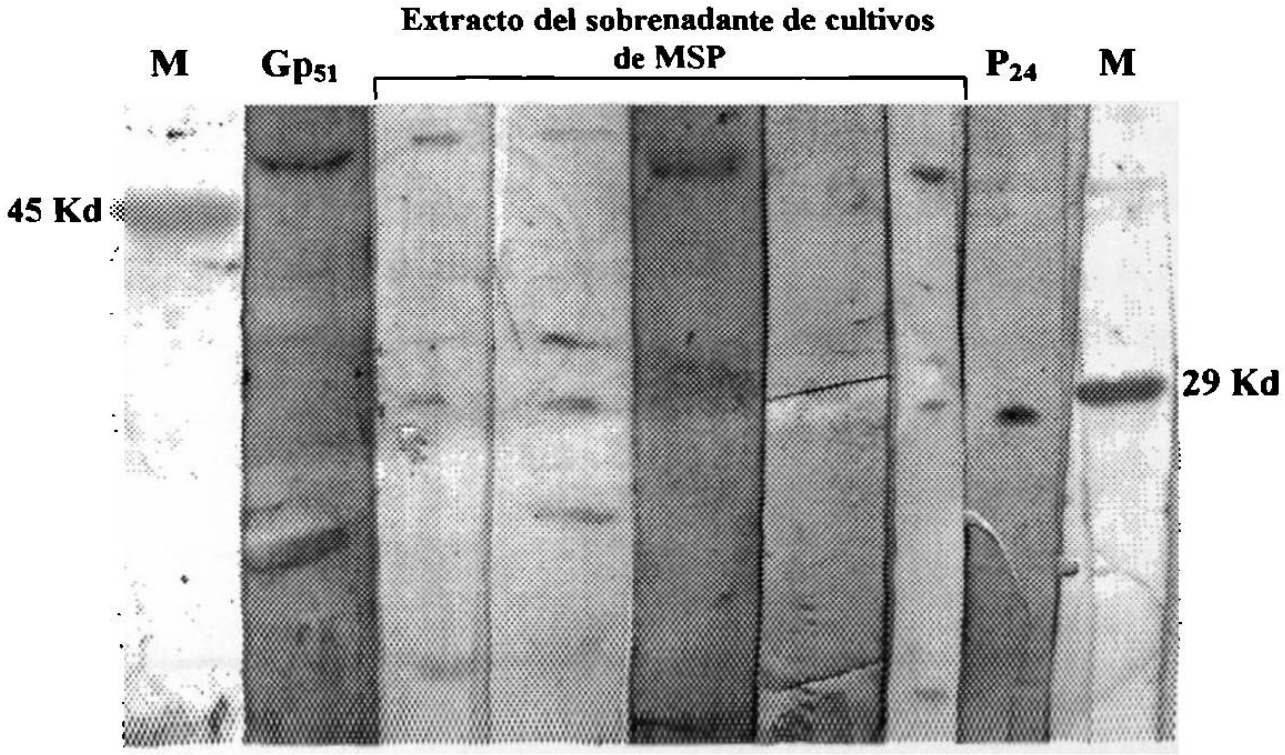


Figura 6. Serorreactividad obtenida contra Gp51, P24 y otras proteínas del sobrenadante de cultivos de linfocitos de vacas seropositivas o negativas a VLB.

4.6. Detección del "Provirus" del VLB

4.6.1 Amplificación y Purificación del plásmido pUC-VLB.

Se utilizó la cepa HD5α de *Escherichia coli* para la transformación con el plásmido Tax,Rex, "X"-VLB; y sus características se presentan en la figura 7.

Se crearon bacterias calcio competentes, para lo cual, se inocularon 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con bacterias y se dejaron multiplicar durante toda la noche, un ml del cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB nuevo incubándose a 37°C con agitación vigorosa a 200 rpm. hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 de absorbancia a 550 nm, inmediatamente después el crecimiento se interrumpió enfriando el caldo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó para obtener el paquete bacteriano, una vez decantado el sobrenadante, que se resuspendió en una solución hipotónica de $CaCl_2$ al 0.1 M, se separaron en alicuotas para usarse el mismo día o congelarse para su uso posterior.

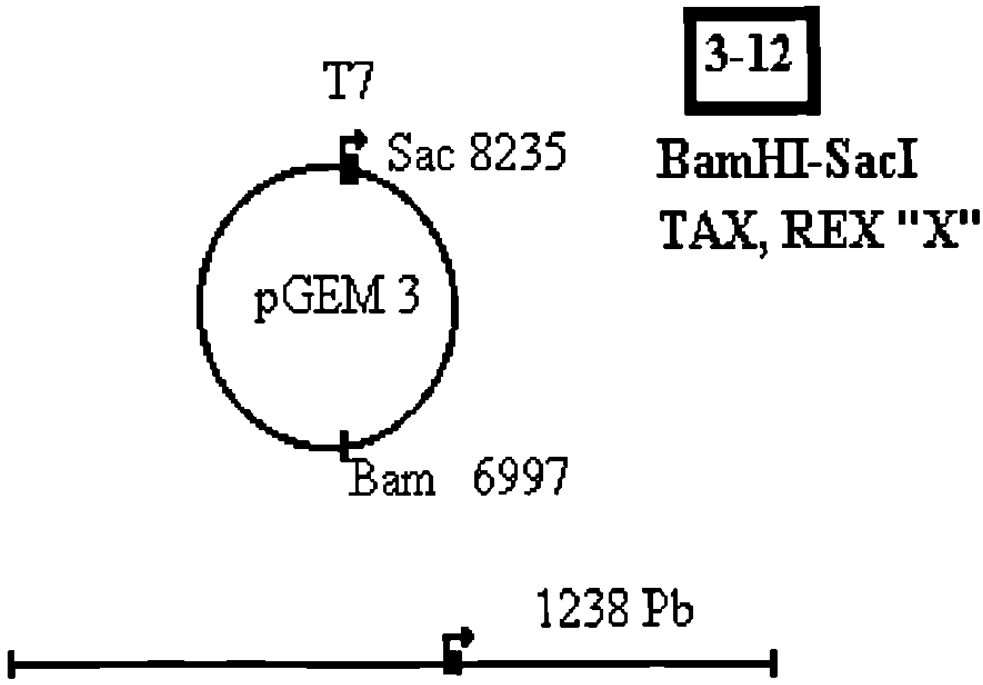


Figura 7. Mapa genético del plásmido pGEM3-Tax,Rex, "X"-VLB, empleado para detectar el genoma proviral del VLB.

Para llevar a cabo la Transformación se preparó una mezcla de 7µl de una solución de plásmidos en buffer TE (Tris-HCl[10mM]-EDTA[1mM]) a una concentración de 1 µg/ml y 20 µl de bacterias calcio competentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se incubó en hielo por 1 hora con agitación suave, posteriormente se produjo un shock de calor a 37°C por un minuto, se adicionó 200 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó por 20 minutos a 37°C para permitir la recuperación de los esferoplastos y la expresión del plásmido, posteriormente la preparación se vació en una caja de petri con agar LB y antibiótico (100 µg/ml de ampicilina) para incubarse toda la noche a 37°C.

Para verificar la transformación de *E.coli* se realizó la minipreparación de acuerdo a la técnica descrita por Maniantis (64). Las bacterias se multiplicaron en caldo LB con antibiótico, la suspensión se centrifugó y las bacterias se lisaron con SDS al 3% pH 12.3, calentando esta solución a 50°C durante 20 minutos, después la extracción de DNA se realizó con fenol-cloroformo.

Una vez corroborada la presencia de plásmidos en las bacterias, éstos se multiplicaron a gran escala, permitiendo primero, la multiplicación de las bacterias en 20 ml de cultivo durante toda la noche y posteriormente transferidos a un litro de medio LB con antibiótico, incubándose a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 600 nm, tiempo en el cual se le añadió 250 mg de cloramfenicol y se continuó con la incubación 14 horas más. De aquí en adelante los siguientes pasos se realizaron en frío. El cultivo fue centrifugado y el paquete celular lisado con una solución de 0.2 mg/ml de lisozima con agitación suave y hielo durante 5 minutos, posteriormente se le adicionó EDTA y tritón.

Las células lisadas se centrifugaron y el sobrenadante se aforó a 30 ml con buffer TE, se le adicionó 0.95 gr./ml de $CsCl_2$ y 1ml de bromuro de etidio, esta solución se colocó en tubos de polipropileno y centrifugada a 230,000 x g por 12 horas a 25°C, el plásmido fue recuperado con la ayuda de una lámpara de luz

ultravioleta y depositado en tubos eppendorf para la eliminación de bromuro de etidio.

Los plásmidos recuperados se separaron por electroforésis en geles de agarosa al 0.8% en buffer de acetatos a 70 volts constantes, el "corrimiento" electroforético se aprecia en la Figura 8.

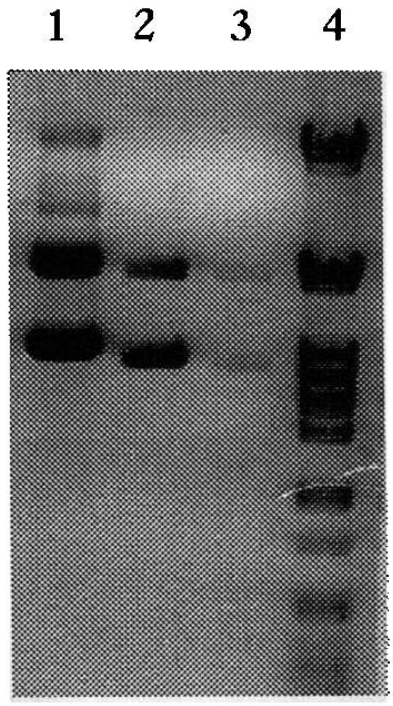


Figura 8. Corrimiento electroforético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-BLV.
Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.
1. Plásmido 5-6 (HIND II-BAMH I Tax-Rex-X-BLV)
2. Plásmido 8-44 (BAMH I-HIND II integrasa + Gp_{60})
3. Plásmido 2-6 (SAC I-BAMH I gag + 2/3 proteasa)
4. Marcador de peso molecular = fago Lambda digerido con Pst I

4.6.2. Extracción de DNA de MSP cultivados.

Los linfocitos cultivados se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500µl de buffer de lisis (10 mM de tris-HCl, pH 8, 10 mM de NaCl y 10 mM de EDTA), 10 µl de proteinasa K, 50 µl de SDS al 20% y 50 µl de EDTA 500 mM, las células fueron incubadas toda la noche a 55°C, al término de éste período se realizó la extracción de DNA adicionando 500µl de fenol saturado, se agitó suavemente y se centrifugó 4 minutos en la

microcentrífuga. La solución acuosa se removió lenta y cuidadosamente y se depositó en otro tubo nuevo, se repitió este proceso dos veces más y posteriormente a la fase acuosa se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se dejó incubar toda la noche a -20°C, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seca la pastilla se resuspendió con buffer TE. Para determinar la cantidad e integridad del DNA, éste se "corrió" en geles de agarosa al 0.8% a 70 voltios constantes (figura 9).

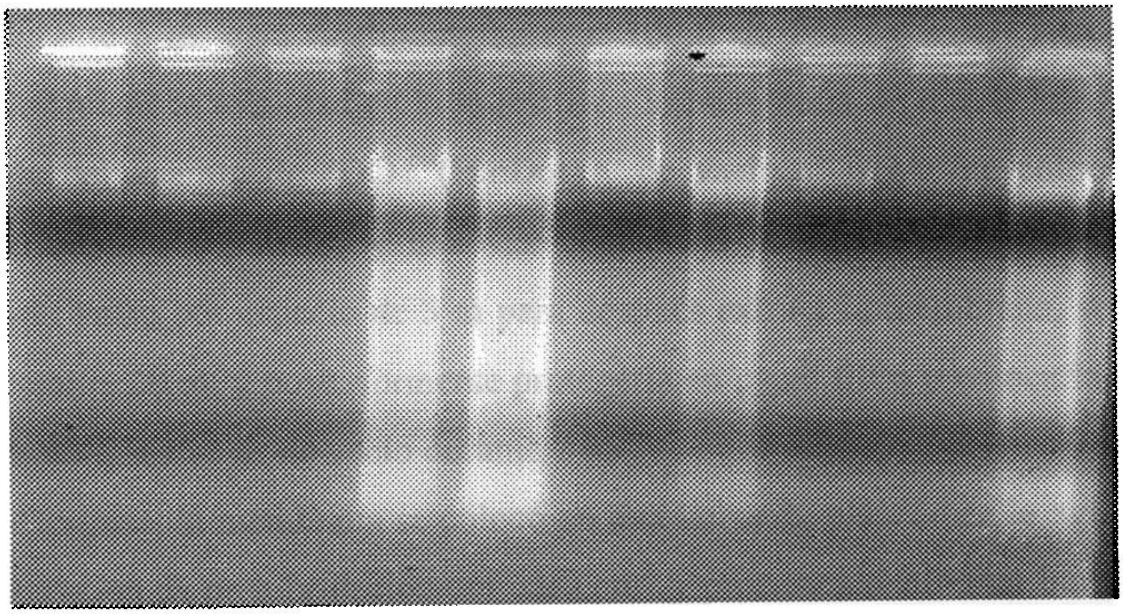


Figura 9. Corrimiento electroforético del DNA de mononucleares bovinos.

4.6.3. Dot Blot (Detección de Provirus del VLB).

El procedimiento empleado para detectar el provirus del VLB en el DNA de los MSP cultivados durante 48 horas fue el recomendado por el fabricante del

juego comercial "SulfoPROBE", el cual emplea un sistema no radiactivo para detectar sondas de DNA químicamente modificadas.

El plásmido pUC-BLV, previamente clonado, se ajustó a una concentración de 0.5mg/ml. Se calentaron 50 µl a 100°C durante 10 m. en un tubo eppendorf , después se enfriaron rápidamente en hielo y se mezclaron con 25 µl de la primer solucion de modificación, después al tubo se le agregó 6.25 µl de la segunda reacción de modificación se mezcló en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche, después se almacenó a -20°C antes de usarse. Se empleó DNA de esperma de salmón como control llevándose a cabo la misma reacción de modificación.

El DNA de los MSP se diluyó en agua bidestilada hasta una concentración de 1µg/ml, se calentó a 100°C durante 5 m y después se enfrió rápidamente en hielo durante 5 m. para finalmente agregar 100µl de SSC y agitar brevemente antes de aplicar la totalidad de la muestra en la membrana de nitrocelulosa. Con la ayuda del aparato de "DOT"(BioDot) y de vacío el DNA fue colocado en compartimientos separados y una vez depositada la última muestra se siguió aplicando vacío por espacio de 3 m para después extraer la membrana, secarla a 37°C durante 20 m y posteriormente protegerla en papel filtro y colocarla en una estufa a 80°C a 15 Lbs de vacío durante 2 h.

Despues, la membrana se colocó en una bolsa de plástico se le agregó 0.2 ml de solución de prehibridación por cada cm^2 y procurando eliminar burbujas se incubó durante 2 horas a 42°C , pasado este tiempo la bolsa se abrió y se le vació la sonda marcada (5µg/ml de solución de DNA modificado) para incubarse durante toda la noche a temperatura ambiente.

La membrana se colocó en una bolsa de plástico, sellable con calor, y se le agregó 50µl de buffer de bloqueo por cada de membrana. La bolsa se selló y se incubó con agitación constante durante 1 h. a temperatura de cuarto.

Paralelo a lo anterior, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNA modificado se diluyó 1:300 en buffer de bloqueo y una vez terminado el tiempo de incubación anterior se descartó el buffer de bloqueo y se le agregó la dilución anticuerpo anti-DNA, se reselló la bolsa y se repitió la incubación en las mismas condiciones, después, la membrana se enjuagó tres veces con buffer 1 de lavado (15 m por lavado con 3 ml/cm por cada lavado). Una vez lavada, la membrana se depositó en una bolsa de plástico nueva y se le aplicó el conjugado anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina diluído 1:300 en buffer de bloqueo (50µl por cada cm^2 de membrana) incubándose con agitación constante durante 1 h. a temperatura ambiente. Después de esta etapa de incubación, la membrana se lavó tres veces con buffer 1 de lavado (20 m por lavado) y 2 veces con buffer 2 de lavado (10 m por lavado).

Se colocó la membrana en un papel filtro durante dos minutos con el lado de la reacción hacia arriba y mientras tanto se preparó la solución substrato cromogénica (0.3mg/ml de azul de tetrazolio,0.2mg/ml 5-Bromo-4-cloro-3-Indol fosfato, en buffer de reacción.

La membrana se depositó en una bolsa de plástico nueva, se agregarón 5 ml de la solución cromogénica recién preparada, se cerró la bolsa y se incubó a temperatura ambiente durante 50 minutos en la oscuridad.

La reacción se detuvo al depositar la membrana en un contenedor con agua destilada.

4.7. Microscopía electrónica de linfocitos cultivados de vacas seropositivas al VLB.

Para evidenciar la presencia de viriones del Virus de la Leucosis Bovina, se realizó microscopía electrónica de transmisión a MSP, cultivados durante 48 h., procedentes de dos vacas seropositivas al VLB.

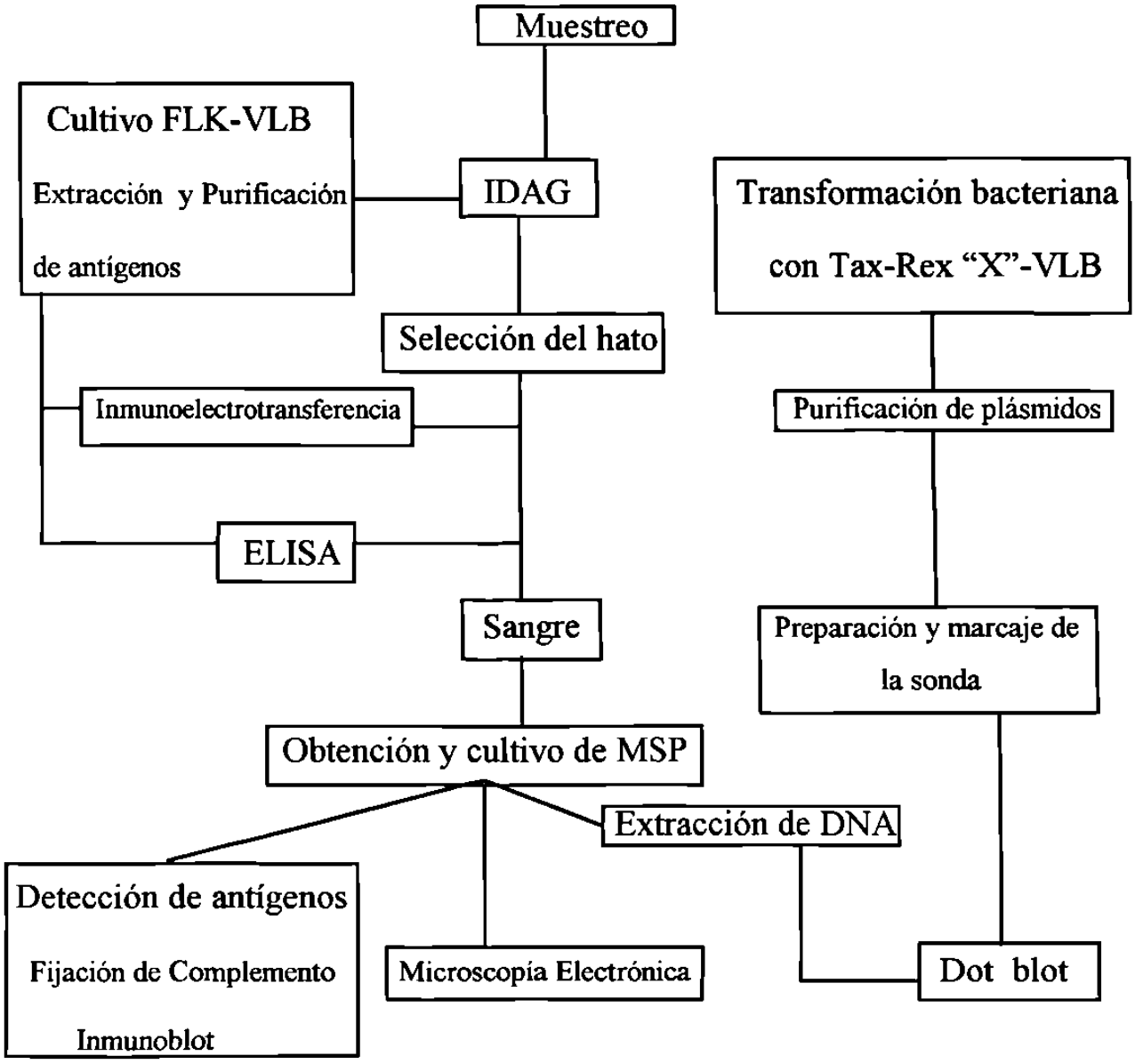
Los MSP se extrajeron del cultivo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó PBS estéril para efectuar el lavado y eliminar restos celulares, esta operación se repitió 4 veces. Los mononucleares se fijaron en glutaraldheido al 2.5%, en PBS al 0.1M, pH 7.3-7.4 durante toda la noche, se lavaron en buffer de fosfatos dos veces y posteriormente se depositaron en una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C. Los mononucleares se lavaron 3 veces con PBS y se deshidrataron con etanol al 60%, 70%, 80%, 90% y 100% durante 15 minutos cada concentración y posteriormente en oxido de propileno dos veces durante 15 minutos. Se realizó la preinclusión en óxido de propileno-resina plástica (Medcast) a razón de 3:1 durante 3 horas y 1:1 durante 12 h. La inclusión se realizó en la resina en moldes planos y se permitió la polimerización a 65°C durante 48 h. Finalmente se realizaron cortes semifinos y después cortes finos para después observarse en el microscopio electrónico (Zeiss 109) y fotografiarse posteriormente.

4.7. Obtención de datos y Análisis estadístico.

Para el análisis epizootiológico se registraron los datos de la raza, edad, sexo, función zootécnica y procedencia de cada uno de los animales; mientras que para el análisis comparativo entre las técnicas de IDAG, ELISA e Inmunoelectrotransferencia se registraron los datos de grado de seropositividad a IDAG y reactividad a cada una de las pruebas.

Las tasas de seroprevalencia se determinaron mediante la fórmula:

P= No. de seropositivos/No Total x 100.

Se aplicó la prueba de Ji-cuadrada (100) para determinar la asociación entre la seropositividad con la función zootécnica y con la raza.

4.8.Diagrama de Flujo