# 5. RESULTADOS

## 5.1. Total de muestras, tipo de producción y procedencia.

Se obtuvieron un total de 2638 muestras, de las cuales el 51.2% 1353/2638) correspondió al ganado productor de leche y el 48.7% (1285/2638) a productores de carne (Cuadro I y II).

El total de los municipios de los cuales procedían los animales fueron 23, perteneciendo 14 de éstos al estado de Nuevo León, 5 al estado de Coahuila y 3 al de Tamaulipas (Cuadro II).

### 5.1.1. Edad y razas de los animales.

Se encontró que los rangos y promedios de edad de los animales varían de acuerdo por tipo de producción, observándose para los destinados a la producción de carne un rango de 1 a 6 años con promedio relativamente bajo de 2.5, mientras que para los productores de leche el rango fue mayor con 1 a 12 años y un promedio de 7.4 años.

El total de razas observadas al muestreo fueron 9 (un grupo de 35 animales no se identificaron), resultando frecuencias mayores en la Holstein con 1305 (49.5%) y las cruzas de Cebú con 690 (26.1%), el resto de las razas tuvieron frecuencias bajas (Cuadro V).

## 5.2. Seropositividad y prevalencia.

La seroprevalencia general determinada en el presente estudio fue de 20.8% (548/2638) (Cuadro II).

La distribución de los animales seropositivos de acuerdo al municipio de procedencia se observa en el Cuadro I. Los municipios con mayor porcentaje de bovinos productores de leche seropositivos fueron: Pesquería, N.L. (65.2%, 73/112), Marín, N.L. (55.2%, 58/105), Torreón, Coah. (49.6%, 62/125), Galeana, N.L. (46.4%, 89/192), Escobedo, N.L. 38.3%, 161/4420) y Saltillo, Coah.

(31.2%, 54/173); mientras que en bovinos productores de carne, que resultaron con bajos porcentajes, se encontraron positivos en Montemorelos, N.L. (2.4%, 3/127) y Anáhuac, N.L.(2.1, 2/97), entre otros.

De acuerdo al tipo de explotación se observó una diferencia altamente significante ($p < 0.01$) dado que 539 bovinos productores de leche resultaron positivos obteniéndose un 39.8% de seroprevalencia en este grupo, mientras que para los productores de carne se registraron 9 positivos estimándose para ellos una seroprevalencia de 0.7% (Cuadro I y II).

**Cuadro I. Localización, tipo de producción y seropositividad de los hatos muestreados en el noreste de México para detectar al Virus de la Leucosis Bovina (VLB).**

| Estado | Municipio | Muestras | | Positivos (%) | | Total analizados |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | BpC | BpL | BpC | BpL | |
| Nuevo León | Galeana | 16 | 192 | 0 (0) | 89 (46.4) | 208 |
| | Pesquería | 0 | 112 | 0 (0) | 73 (65.2) | 112 |
| | Marín | 22 | 105 | 0 (0) | 58 (55.2) | 127 |
| | Anáhuac | 97 | 0 | 2 (2.1) | 0 (0) | 97 |
| | Linares | 65 | 0 | 1 (1.5) | 0 (0) | 65 |
| | China | 83 | 0 | 1 (1.2) | 0 (0) | 83 |
| | Gral. Bravo | 61 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 61 |
| | Cadereyta | 56 | 37 | 0 (0) | 6 (16.2) | 93 |
| | V. Santiago | 0 | 43 | 0 (0) | 13 (30.2) | 43 |
| | Escobedo | 16 | 420 | 0 (0) | 161 (38.3) | 436 |
| | Montemorelos | 127 | 10 | 3 (2.4) | 0 (0) | 137 |
| | Allende | 84 | 0 | 1 (1.2) | 0 (0) | 84 |
| | Agualeguas | 43 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 43 |
| | Apodaca | 48 | 88 | 0 (0) | 23 (26.1) | 136 |
| Coahuila | Saltillo | 0 | 173 | 0 (0) | 54 (31.2) | 173 |
| | Torreón | 0 | 125 | 0 (0) | 62 (49.6) | 125 |
| | Gral. Cepeda | 0 | 48 | 0 (0) | 0 (0) | 48 |
| | Piedras Negras | 93 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 93 |
| | Nueva Rosita | 106 | 0 | 1 (0.9) | 0 (0) | 106 |
| Tamaulipas | Soto la Marina | 250 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 250 |
| | Cd. Mier | 63 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 63 |
| | Cd. Victoria | 55 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 55 |
| **Total** | | **1285** | **1353** | **9 (0.7)** | **539 (39.8)** | **2638** |

**Cuadro II. Seropositividad contra el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos del Noreste de México, de acuerdo a la función zootécnica.**

| Función zootécnica | Muestreado | % del | Positivos | Seropositividad (%) |
|---|---|---|---|---|
| **Producción de carne** | 1285 | 48.7 | 9 | 0.7 |
| **Producción de leche** | 1353 | 51.3 | 539 | 39.8 |
| **Total** | 2638 | 100.0 | 548 | 20.8 |

La seropositividad de acuerdo a la edad, determinada en 638 bovinos destinados a la producción de leche, se observa en el Cuadro IV, se aprecia que todos los intervalos de edades resultaron positivos, sin embargo, los porcentajes más altos se observaron en las edades de 6 a 8 y 2 a 4 años con 36.5% (19/52) y 17.5% (45/263), respectivamente.

Por otra parte, de los 9 BpC seropositivos 8 resultaron con edad aproximadas de 6 años y solamente 1 con 2 años.

**Cuadro III. Seropositividad contra el VLB en bovinos de diferentes edades de algunos hatos lecheros del noreste de México.**

| Edad | Analizados | Positivos | % Seroprevalencia |
|---|---|---|---|
| 1-2 | 105 | 4 | 3.8 |
| 2-4 | 263 | 45 | 17.5 |
| 4-6 | 185 | 8 | 4.3 |
| 6-8 | 52 | 19 | 36.5 |
| 8 o más | 33 | 3 | 9.0 |

Con respecto a la raza del animal o sus cruzas (Cuadro IV), las razas muestreadas de los bovinos productores de leche fueron la Holstein y la Jersey reaccionando únicamente la primera con 539 de 1305 animales (41.3% de seroprevalencia para esta raza) en tanto que para las razas destinadas a producir carne, las que resultaron mayormente afectadas en base al porcentaje de seropositividad fueron la Beefmaster con 3.26 (3/92), la Santa Gertrudis con 1.67% (2/120) y las cruzas de Cebú con 0.58% (4/690), el resto de las razas permanecieron negativas a la prueba de inmunodifusión.

De las razas estudiadas, la Holstein tiene una mayor predisposición a la seropositividad contra VLB y ésta es altamente significante cuando se compara con otras razas que también resultaron seropositivas ($p < 0.01$).

**Cuadro IV. Distribución de bovinos seropositivos al Virus de la Leucosis Bovina acuerdo a la raza y función zootécnica.**

| Raza | Función Zootécnica | No. | % del Total | Positivos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | No. | % Raza | % Prod. | % Total |
| Cebú | BpC | 690 | 26.1 | 4 | 0.58 | 0.31 | 0.15 |
| Sta. Gertrudis | BpC | 120 | 4.5 | 2 | 1.67 | 0.16 | 0.08 |
| Beefmaster | BpC | 92 | 3.5 | 3 | 3.26 | 0.23 | 0.11 |
| Charolais | BpC | 117 | 4.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Simmental | BpC | 78 | 3.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hereford | BpC | 64 | 2.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pardo Suizo | BpC | 89 | 3.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Criollo | BpC | 35 | 1.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Holstein | BpL | 1305 | 49.5 | 539 | 413 | 39.8 | 20.4 |
| Jersey | BpL | 48 | 1.8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | | 2638 | | 548 | | | 20.8 |

## 5.3. Comparación entre ELISA, Western blot e IDAG para detectar anticuerpos contra VLB en hatos con diferente seroprevalencia.

La sensibilidad para detectar anticuerpos anti-VLB se comparó en tres hatos con elevada, baja y nula seropositividad determinada con IDAG.

Las metodologías Inmunoenzimáticas, resultaron más sensibles puesto que IDAG sólo detectó el 55% de positivos del hato con alta seroprevalencia, mientras que ELISA y Western blot detectaron el 72.5% y 77.9% respectivamente, así mismo, en el hato considerado con baja seroprevalencia, IDAG detectó 12.1% de seropositividad pero ELISA y Western Blot 27.3% y 21.2% respectivamente. Por otra parte, de un hato de BpC seronegativo en IDAG, un suero reaccionó tanto a ELISA como en Western blot resultando para este hato 5.5% de seropositividad (Cuadro VII).

Los tres métodos concordaron en el 75% (22 positivos y 8 negativos) de los 40 sueros analizados del hato con elevada seroprevalencia, no obstante en el mismo hato las pruebas inmunoenzimáticas concordaron en un 90% (28 positivas y 8 negativas).

En el hato con baja seroprevalencia, las técnicas serológicas empleadas concordaron en un 84.8% (24 negativos y 4 positivos) de los 33 sueros analizados, mientras que considerando únicamente a las pruebas inmunoenzimáticas, éstas concordaron en un 93.9% (24 negativos y 7 positivos).

**Cuadro V. Comparación entre ELISA, Western Blot e IDAG para detectar anticuerpos séricos contra VLB en tres hatos bovinos con diferentes seroprevalencias.**

| Función Zootécnica | Analizados | ELISA | | Western blot | | IDAG | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + | % | + | % | + | % |
| Prod. Leche (A) | 40 | 29 | 72.5 | 31 | 77.9 | 22 | 55 |
| Prod. Leche (B) | 33 | 9 | 27.3 | 7 | 21.1 | 4 | 12.1 |
| Prod. Carne | 18 | 1 | 5.5 | 1 | 5.5 | 0 | 0 |
| Total | 91 | 39 | 42.9 | 39 | 42.9 | 26 | 28.6 |

## 5.4. Detección de antígenos del VLB en MSP.

A partir del extracto protéico obtenido de los MSP cultivados se obtuvieron diferentes patrones de reactividad contra VLB en el Westernblot .

En la figura 8 se muestran algunas reacciones contra las proteínas estructurales $Gp_{51}$, $P_{24}$, además de otras proteínas con PM similar a las proteínas $Gp_{30}$, $P_{15}$, $P_{10-12}$ y una banda de precipitación arriba de PM 51 (probablemente esta última corresponde al producto de traducción del gen gag $Pr70^{gag}$ ).

Por otra parte, los antígenos del VLB también se evidenciaron con la prueba de fijación de complemento. Para obtener las diluciones óptimas de trabajo, primero se determinaron la densidades ópticas del extracto protéico del sobrenadante del cultivo de MSP diluido 1:50 y 1:100 contra diluciones 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 de un suero de bovino fuertemente seropositivo a IDAG.

Los valores de estas densidades se presentan en el Cuadro VIII, así mismo la curva de absorbancia obtenida con las diferentes diluciones se muestra en la Figura 10. Los valores de densidad óptica en las diluciones 1:50 y 1:100 resultaron similares, sin embargo, se escogió la primera dilución para determinar la presencia de antígenos del VLB.

**Cuadro VI. Densidad óptica obtenida en la prueba de fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en cultivo de MSP de vacas positivas a IDAG.**

| Muestra | Dilución de antígeno | Dilución del suero (+) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| **FLK-VLB** | 1:50 | 0.018 | 0.26 | 0.26 | 0.272 |
| | 1:100 | 0.017 | 0.125 | 0.261 | 0.281 |
| **Paloma** | 1:50 | 0.020 | 0.051 | 0.271 | 0.271 |
| | 1:100 | 0.011 | 0.112 | 0.271 | 0.271 |
| **242** | 1:50 | 0.011 | 0.021 | 0.18 | 0.23 |
| | 1:100 | 0.01 | 0.021 | 0.214 | 0.25 |

Control anticomplementario = 0.292 FLK-VLB control 1:50 = 0.309 Paloma s/antígeno (control) = 0.309
242 s/antígeno (control) = 0.302 Eritrocitos lisados (Control s/antígeno y s/ anticuerpos).= 0.28

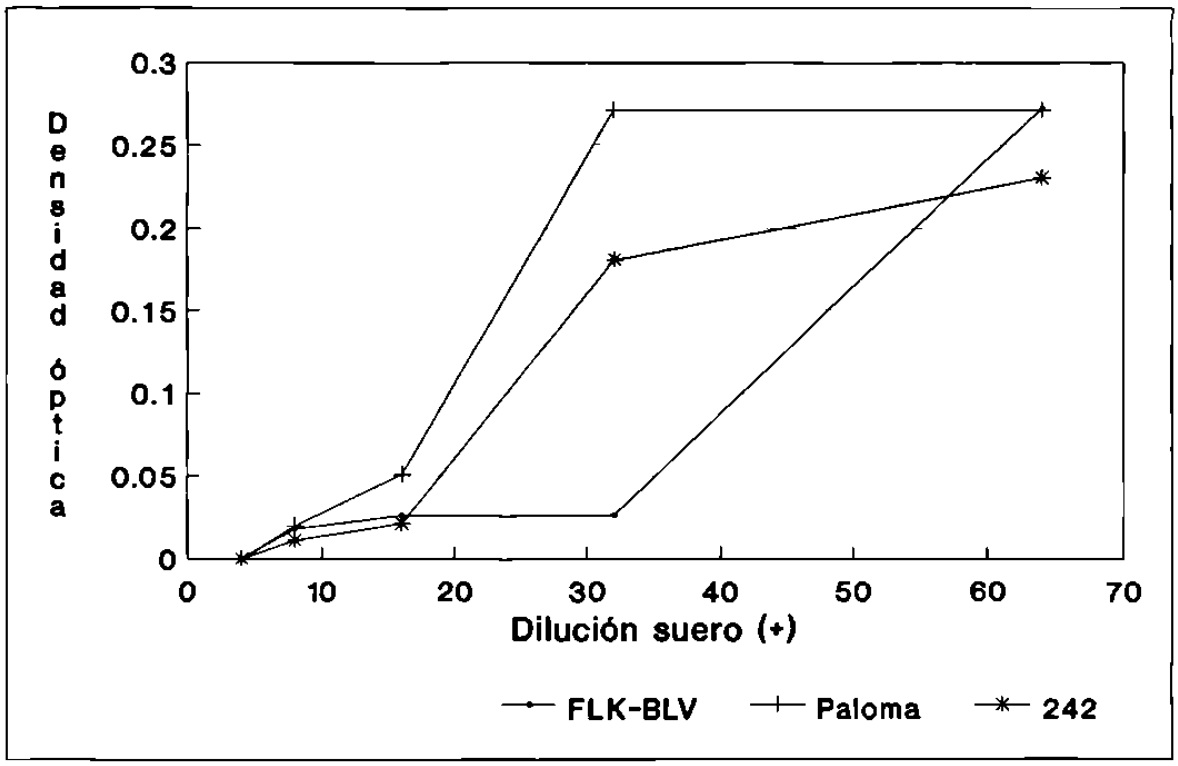



**Figura 10. Absorbancia obtenida con el sobrenadante de cultivo de linfocitos en la prueba de fijación de complemento.**

## 5.5. Comparación entre Western blot y FC para la detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP.

Al comparar la concordancia en los resultados de las pruebas de Westernblot y Fijación de Complemento para detectar antígenos en un hato, ésta resultó en un 100%, sin embargo con el Westernblot fue posible distinguir que los animales de un mismo hato presentan diferentes reacciones de seropositividad contra antígenos estructurales del VLB (Cuadro IX).

**Cuadro VII. Comparación entre el Westerblot y Fijación de Complemento para la detección de antígenos del VLB en linfocitos de vacas positivas o negativas a IDAG.**

| No. | Reacción a IDAG * | | Proteína reactiva | Detección de Antígeno | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1a | 2a | | FC / D.O. | W.B. |
| 263 | + | + | p24 | +/0.018 | + |
| 605 | + | + | p24 | +0.021 | + |
| 717 | + | - | - | -/0.28 | - |
| 734 | + | + | p24, Gp51 | +/0.015 | + |
| 800 | + | + | p24, Gp51 | +/0.011 | + |
| 836 | + | + | p24 | +/0.028 | + |
| 853 | + | + | p24 | +/0.023 | + |
| 860 | + | + | p24 | +/0.018 | + |
| 878 | - | - | - | -/0.26 | - |
| 896 | - | - | - | -/0.30 | - |
| 1065 | - | - | - | -/0.30 | - |
| 1049 | - | - | - | -/0.28 | - |
| 1072 | - | - | - | -/0.27 | - |
| 1076 | - | + | Gp51 | +/0.023 | + |
| 1079 | - | - | - | -/0.26 | - |

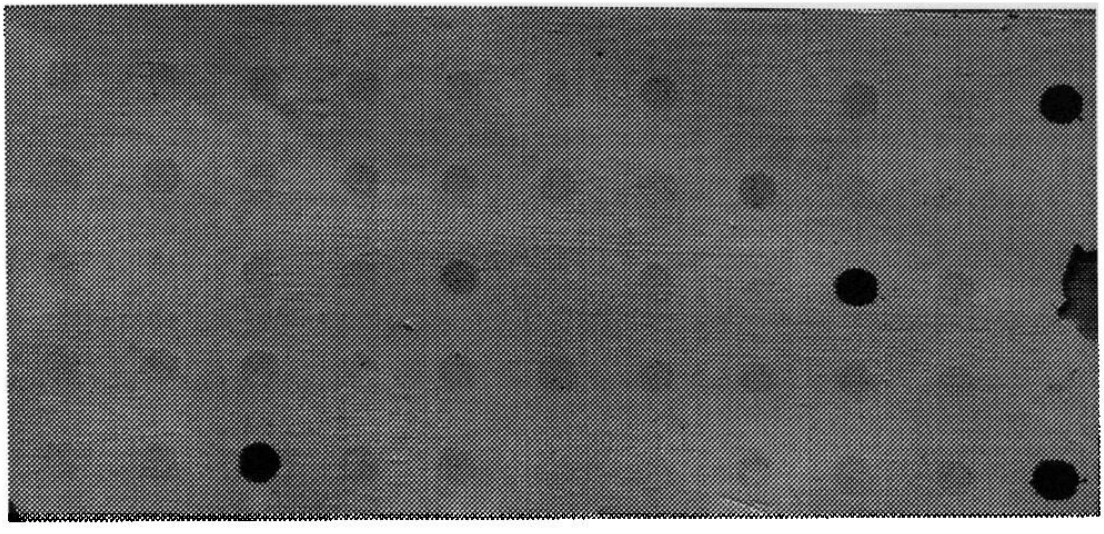
* La IDAG se realizó con intervalo de 6 meses. / FC.= Fijación de Complemento
D.O.= Densidad Optica. / WB= Westernblot

## 5.6. Detección del provirus del VLB en DNA de MSP cultivados y comparación con las pruebas serológicas para detectar la infección por VLB.

La presencia del provirus del VLB en el ADN de MSP cultivados se determinó por una prueba de hibridación "Dot blot" utilizando como "sonda" el segmento genético Tax, Rex, "X" del VLB (Figura 7) portado en un plásmido (pGEM3-Tax,Rex,"X"-VLB).

Se emplearon 50 BpL obtenidos aleatoriamente de un hato previamente caracterizado por IDAG como de elevada seroprevalencia (58%, 29/50)

De los 50 animales, 29 (58%) y 36 (72%) se identificaron como seropositivos en IDAG y ELISA respectivamente, mientras que con Dotblot (Figura 11) reaccionaron 38, representando un 76% de las muestras estudiadas (Tabla X).



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 23 (+) | 33 (+) | 13b (+) | 31 (+) | b6 (+) | b2 (+) | 6 (+) | 1018 (-) | 1011 (+) | 34 (+) | Control + |
| B | 16 (+) | b12 (+) | 339 (+) | 11 (+) | 1006 (+) | 24 (+) | 51 (+) | 25 (+) | 5 (-) | 1024 (-) | Control - |
| C | b1 (-) | 9 (-) | b17 (+) | b3 (+) | 989 (+) | 19 (-) | 990 (-) | 6 (-) | jolina(+) | 331 (+) | Control - |
| D | 3b (+) | 32 (+) | 1003 (+) | 17 (+) | b4 (+) | 14b (+) | 13 (+) | 33 (+) | 22 (+) | 97 (+) | Control - |
| E | 1 (-) | 4 (-) | mora (+) | 19 (+) | b11 (+) | 15 (-) | 344 (-) | 19 (+) | 333 (+) | b18 (+) | Control + |

**Figura 11. Reactividad obtenida en la membrana de nitrocelulosa con el DNA de MSP cultivados para detectar al provirus del VLB en vacas seropositivas o seronegativas a IDAG**

Diagrama inferior ubica los controles positivos, el número o nombre del animal y la reactividad.

**Cuadro VIII. Comparación entre ELISA, Dot blot é IDAG para detectar la infección Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en un hato lechero con elevada seroprevalencia.**

| Número de muestras analizadas | IDAG | | ELISA | | Dot blot | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | + | % | + | % | + | % |
| 50 | 29 | 58 | 36 | 72 | 38 | 76 |

## 5.7. Detección de Viriones del VLB.

Se detectaron partículas virales Tipo "C" en MSP, cultivados durante 48 horas, de vacas seropositivas al VLB. Las partículas fueron escasas y se encontraron tanto dentro de vesículas en el citoplasma como adheridas a la membrana de los mononucleares. Cada partícula viral estuvo compuesta de un "nucleoide" central rodeado por una membrana claramente definida (Figura 12).

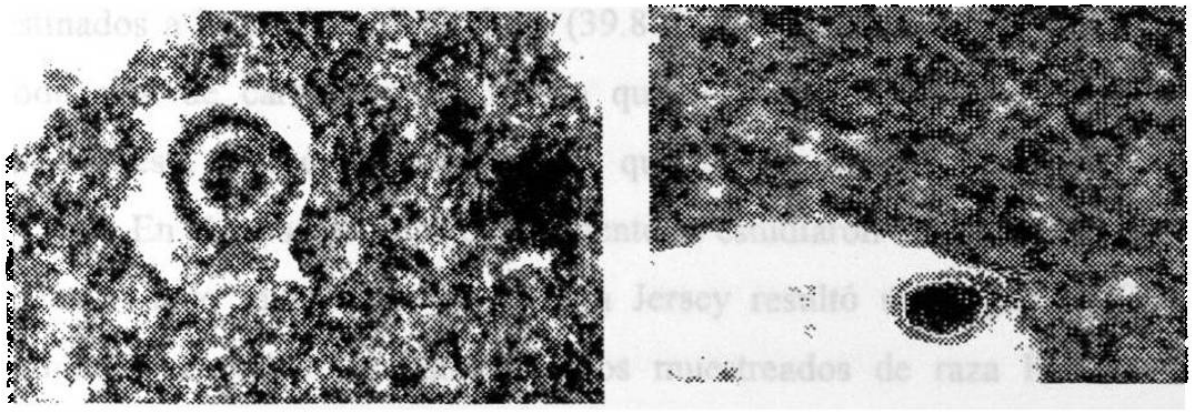


**Figura 12. Partículas virales tipo "C" observadas en mononuclares sanguíneos, estimulados con Concanavalina A, obtenidos a partir de vacas seropositivas al VLB.**

# 6. DISCUSIÓN

En otros países la prevalencia de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos está ampliamente documentada (17,23,37,53,61,67,78, 108,120), sin embargo los estudios a nivel nacional son escasos y solamente se han realizado este tipo de investigaciones en ciertas zonas (8,34,60, 70,91,121,125,137) por lo que la epizootiología del Virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en México se conoce pobremente.

La seroprevalencia general de 20.8% obtenida en el presente trabajo es más alta a la reportada anteriormente por nosotros Trejo y col. y Avalos y col. en la misma zona (8,125).

Se determinó que de acuerdo al tipo de explotación existe una mayor prevalencia de anticuerpos altamente significante ($p < 0.01$) en los bovinos productores de leche. Al respecto, se ha indicado que existen algunos factores de riesgo que influyen en esta observación entre los que destacan el manejo, predisposición genética, tamaño del hato, época del año y edad del animal (55,56,61,63), de esta manera la alta seroprevalencia observada en los bovinos destinados a la producción lechera (39.8%) comparada con los destinados a la producción de carne (0.7%), refleja que los primeros son más propensos a adquirir esta infección, observación que se ha documentado anteriormente (17,40). En el presente trabajo, solamente se estudiaron dos razas de BpL, de las cuales el hato muestreado de la raza Jersey resultó seronegativo (Cadro V), mientras que todos los hatos bovinos muestreados de raza Holstein fueron seropositivos; este resultado tal vez esté influenciado por el relativo "aislamiento" de los bovinos Jersey analizados en este estudio, dado que este hato en particular ha permanecido 7 años cerrado a la introducción de BpL de otras fuentes, mientras que en el caso de los hatos con bovinos Holstein, el intercambio de ganado de una explotación a otra es una práctica común en la zona y además el manejo empleado prácticamente en todos estos hatos del área

permite la continua transmisión del virus entre los animales. Lo anterior contrasta con las observaciones realizadas por Burridge y col. quienes determinaron una prevalencia de anticuerpos, altamente significante ($p < 0.0001$), contra VLB en bovinos de raza Jersey que en otras razas lecheras (Holstein, Guersey y Pardo Suizo) de Florida U.S.A. (17).

En los bovinos productores de carne (BpC) la seroprevalencia serológica fue de 0.7% y por razas solamente 3 (Cebú 0.15%, Beefmaster 0.11% y Santa Gertrudis 0.08%) de las 8 muestreadas resultaron seropositivas, estos resultados concuerdan con la mayoría de los estudios seroepizootiológicos realizados en otras partes del mundo (10,19,23,37,53,61,67, 108,120), con excepción de los datos obtenidos por Marín y col. quienes encontraron en 14 razas de BpC frecuencias serológicas muy altas de 11% hasta 100%. En E.U.A. y otras regiones de México también se ha reportado alta frecuencia serológica contra VLB en BpC (17,71,92).

Con excepción del hato muestreado de Galeana N.L., los hatos lecheros con mayor índice de seropositivos se encontraron ubicados cerca de zonas urbanas relativamente grandes (Cuadro VI), esto concuerda con lo reportado por Zapata y cols. (137). Esta frecuencia se debe tal vez al intercambio de bovinos entre estos productores, a la similitud de manejo en estas áreas o a la introducción de ganado infectado procedentes de otras áreas, no obstante, es necesario destacar esta tendencia de la alta seroprevalencia contra VLB (16.2 - 65.2%) en zonas con alta densidad de población humana.

Con respecto a la seropositividad (en los hatos en los cuales se encontró al menos un animal positivo) observada en los bovinos productores de carne indican que las condiciones de manejo en estos hatos favorecen la transmisión de linfocitos que portan el provirus del VLB, no obstante la baja seropositividad observada tal vez esté relacionada con el período de vida de estos animales ya que éstos son enviados al sacrificio más tempranamente que los BpL.

Anteriormente se ha establecido que en BpL mayores de seis meses de edad la prevalencia de anticuerpos anti-VLB incrementa conforme aumenta la edad (17,37,100). De acuerdo a los resultados en el Cuadro IV, la alta seroprevalencia de VLB en bovinos con edades entre 6 a 8 años de edad, está de acuerdo con observaciones realizadas por Brenner y col. en 1989, quienes encontraron un decremento en la población de bovinos lecheros con esta edad en varios hatos seropositivos, este hallazgo está relacionado con la baja productividad en este grupo de animales, de tal manera que el productor decide enviarlos al rastro (12), así mismo, Thurmond y col. demostraron que cuando una vaca resulta seropositiva tiene una probabilidad mayor a ser desechada, encontrando a la mayoría de estos animales en edades de 5.5 a 6.5 años (123).

Los estudios epidemiológicos, realizados en diversas partes del mundo, se han favorecido por la fuerte respuesta serológica persistente contra VLB por los animales portadores (5,18,30,41,50,61,94,122) y debido a esta característica se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la sensibilidad y especificidad de algunas pruebas serológicas (9,18,42,43,46,49,51,54,83,86,91), dentro de las más sobresalientes han destacado la Prueba de Radioinmunoensayo (41,51,83), ELISA (14,46,68,96,109) e Inmunoelectrotransferencia (50,76), no obstante, tales pruebas son costosas y algo laboriosas por lo que para situaciones de campo en las que se requiera identificar hatos o grupos de animales portadores del VLB la IDAG continua siendo ampliamente usada (85,90). Inclusive hasta la fecha es la única prueba serológica aceptada oficialmente por la Oficina Internacional de Epizootias y por la Comunidad Económica Europea para el movimiento de animales de un país a otro (54). En el presente trabajo, empleando la prueba de IDAG, se seleccionaron arbitrariamente tres hatos en base al índice de seropositividad contra el VLB (elevada, baja y nula seroprevalencia) en cada uno de ellos (Cuadro VII); el procedimiento de IDAG resultó menos sensible que las técnicas de ELISA e Inmunoelectrotransferencia

(55% vs 72.5% y 77.9%, respectivamente) (Cuadro VII), similarmente fue menos efectiva para encontrar animales infectados cuando se comparó con las pruebas de ELISA y Dot blot en un hato con elevada seroprevalencia (Cuadro X). No obstante, la utilidad de IDAG se ha demostrado previamente en estudios epizootiológicos y de control. Monke y col. (91) estimaron una sensibilidad de 98.5% de esta técnica al analizar 1296 muestras, y además, se ha demostrado la eficiencia de la IDAG para erradicar y controlar al VLB en hatos lecheros con altos índices de infección (76,118).

Por lo que IDAG puede emplearse exitosamente en este tipo de estudios, dado que para detectar hatos infectados o segregar animales seropositivos, esta técnica puede resultar más práctica, sencilla de interpretar y de fácil ejecución. Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo, en aquellos casos en los cuales sea necesario detectar específicamente qué animales están infectados o cuando los animales posean títulos bajos de anticuerpos, esta prueba puede subestimar la seroprevalencia dada la baja sensibilidad con respecto a ELISA, Inmunoelectrotransferencia y Dot blot.

Otros investigadores han utilizado la técnica de ELISA para detectar anticuerpos anti-VLB (9,14,46,49), el presente trabajo, con respecto a los anteriores, presenta variaciones menores en los parámetros de tiempos de incubación (tanto para la adhesión del antígeno a la placa de poliestireno como en la reacción antígeno-anticuerpo), dilución del suero sospechoso, bloqueador y en el empleo de conjugado anti-IgG de bovino marcado con fosfatasa, en lugar de peroxidasa. A pesar de esto, los valores de sensibilidad y concordancia obtenidos, al compararse con IDAG, no fueron diferentes en gran medida con los valores observados previamente por estos autores.

Con la técnica de ELISA, al igual que otros procedimientos serológicos, la probabilidad de diagnosticar correctamente a animales con infecciones virales depende de las propiedades del antígeno empleado (concentración, pureza y

antigenicidad) (14,46) y de las características de la respuesta serológica contra el virus (38,69). En el presente trabajo se pretendió detectar anticuerpos anti-$Gp_{51}$ dado que existe una fuerte respuesta serológica contra este antígeno y además se ha demostrado anteriormente que el hallazgo de estos anticuerpos es un buen indicador de la infección por VLB (69,97). De hecho, la prueba de ELISA y Dot blot al compararse para detectar el porcentaje de infección en un hato con elevada seroprevalencia, presentaron valores muy similares de 72 y 76% respectivamente (Tabla X).

El procedimiento empleado para purificar la $Gp_{51}$ del VLB se ha empleado con éxito por otros investigadores (49,84), además, este antígeno una vez purificado reaccionó fuertemente en IDAG contra antisueros control específico contra VLB (Proporcionado por el Dr.Van Der Maaten, Ames Iowa) y previamente se ha reportado que los valores de absorbancia generados por este antígeno en la prueba de ELISA son superiores que cuando se usa en combinación con otros antígenos del VLB (49).

Por otra parte, se ha determinado que las FLK-VLB están contaminadas con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), (comunicación personal del Van Der Maaten, Ames Iowa) por lo que éste es otro factor que se debe de tomar en cuenta al obtener la $Gp_{51}$ de las FLK-VLB, en este trabajo se comprobó la pureza de la $Gp_{51}$ mediante electroforésis y la confrontación de este antígeno contra antisueros específicos contra VLB y VDVB, así que la posibilidad de contaminación con proteínas del VDVB, con este procedimiento es nula y es muy baja la probabilidad de que los resultados ELISA-positivos lo sean por detectar anticuerpos anti-VDVB.

La mayor sensibilidad de las pruebas inmunoenzimáticas para detectar animales con anticuerpos contra VLB comparadas con la IDAG, pudo deberse a que estas pruebas tal vez detectaron algunas subclases de Inmunoglobulina G, las cuales no precipitaron en el gel de la IDAG, esta observación se apoya en el

reporte de Nguyen y Mes (97) quienes encontraron vacas con signos clínicos de infección por VLB positivas con ELISA que resultaron seronegativos a IDAG. Situación, que similarmente fue observada en el presente estudio al comparar la eficacia de IDAG, ELISA y Dot Blot, un hato con elevada seroprevalencia (Cuadro X) y a la comparación de las pruebas serológicas (IDAG, ELISA e Inmunoelectrotransferencia) para detectar la infección en hatos con diferente seroprevalencia (Cuadro VII).

Las pruebas inmunoenzimáticas presentaron una concordancia general del 100% (Cuadro VIII), no obstante se encontraron discrepancias en tres sueros de cada hato lechero analizado (sueros 11,17 y 38 del hato con alta seroprevalencia, Tabla 1 de Apéndice; y sueros 10,16 y 29 del hato con baja seroprevalencia, Tabla 2 de Apéndice) y éstas pudieron ocasionarse tal vez a errores en el proceso de ambas técnicas o a fallas en la interpretación de cada prueba.

No obstante lo anterior, ELISA puede llegar a establecerse como una prueba rutinaria para diagnosticar la infección por VLB, dado que los resultados se producen en menor tiempo que IDAG e Inmunoelectrotransferencia, se pueden cuantificar e interpretar fácilmente (una vez estandarizada) y además una vez sensibilizadas las placas (ver material y métodos) se pueden almacenar por un período razonable sin pérdida de la actividad antigénica de la $Gp_{51}$ y se puede adaptar esta técnica para detectar anticuerpos presentes en leche o calostro de animales dado que es una prueba más sensible que IDAG (69,97).

Walker y col. describieron un procedimiento de Inmunoelectrotransferencia para detectar anticuerpos anti-$p_{24}$ en ganado bovino y ovino infectado experimentalmente con el virus de la leucosis bovina mientras que Grover y Guilleman describieron el proceso por el mismo método para detectar simultáneamente anticuerpos anti-p24 y anti-$Gp_{51}$, en muestras de suero provenientes de animales infectados con VLB con diferentes condiciones clínicas ( Linfosarcoma adulto, Linfocitosis persistente, leucémicos y aleucémicos). En

ambos estudios el IET demostró más especificidad y sensibilidad al compararse con las metodologías de ELISA e IDAG. En el presente trabajo, con los resultados de la seropositividad a IDAG se seleccionaron tres hatos con diferentes grados de seroprevalencia contra VLB, observándose que las pruebas inmunoenzimáticas ELISA e IET, al considerar el total de la población estudiada, detectaron el mismo porcentaje general de muestras positivas y fueron más sensibles que IDAG (Cuadro VII). No obstante, en el hato con alta seropositividad a IDAG (22/40,55%, hato A), la Inmunoelectrotransferencia detectó el 77.9% (31/40) de las muestras, mientras que ELISA detectó el 72.5% (29/40) de los estudiados, esta situación no fue igual en el hato con baja seropositividad (12.1%, 4/33; IDAG, hato B) dado que IET detectó como positivos al 21.1% (7/33) y ELISA al 27.3% (9/33) de las muestras, (Cuadro VII y Tabla 1 y 2 de Apéndice). Un estudio previo realizado por Zanoni y col. compararon la sensibilidad de ELISA e IET para detectar anticuerpos contra el virus de Artritis Encefalitis Caprina y determinaron que todas las muestras positivas por ELISA también lo fueron por IET y además un grupo de muestras con resultados dudosos en ELISA fueron claramente resueltos por IET .

Las discrepancias observadas en nuestro estudio, tal vez se deban en parte a que las lecturas de Densidad Optica en la prueba de ELISA, particularmente en las muestras 11,12,17 y 38 del hato A y las muestras 10 , 16 y 29 del hato B, se encontraron cercanas al punto de corte (0. 2 D.O.) y probablemente este se encuentre subestimado. O bien que la menor estabilidad de la enzima fosfatasa utilizada para ELISA con respecto a la peroxidasa empleada para IET influya en estos resultados.

Por lo que tomando en cuenta lo anterior es evidente que nuestro estudio confirma los resultados que indican que IET es más sensible que otras pruebas rutinarias, particularmente IDAG, empleadas para el diagnóstico de VLB, además

con IET se determina específicamente contra cuál (es) antígeno (s) reacciona (n) el (los) anticuerpo (s).

Los viriones y antígenos del VLB no pueden ser demostrados en linfocitos de vacas seropositivas a menos que éstos sean cultivados y de hecho la expresión " in vitro" del VLB se puede detectar a las tres horas de incubación pero tienen su máxima producción a las 18-24 horas (25). La detección de antígenos del VLB a partir de linfocitos cultivados se ha realizado por varios grupos de investigadores en otros países, con el propósito de correlacionar el nivel de expresión del virus con el número de linfocitos infectados (y así la infectividad de un animal), en nuestro trabajo se empleó esta metodología y la de fijación de complemento para demostrar la presencia de antígenos en sobrenadante de cultivo de linfocitos en animales con serología positiva o negativa, como se demuestra en el Cuadro IX, hubo una correlación de 100% entre estas dos pruebas para detectar los antígenos del Virus, no obstante con la IET fue posible distinguir serorreacciones contra diferentes proteínas estructurales y no estructurales (Figura 8). La detección de antígenos del VLB en cultivo de Mononucleares se ha llevado a cabo por diferentes pruebas serológicas como Inmunofluorescencia, Inmunodifusión e Inmunodifusión radial (25,70), sin embargo, estas pruebas (como se observa con la Prueba de Fijación de Complemento realizada en el presente estudio) no detectan qué o cuáles proteínas virales son expresadas por el VLB como fue posible resolver con la IET. En estudios subsecuentes de infectividad la metodología de FC, tal vez nos puede permitir la detección de vacas con MSP con altos niveles de expresión in vitro, y mediante ello favorecer la detección temprana de animales "altamente infecciosos" para separarlos del hato, independientemente de su serológico contra VLB, y evitar la difusión del VLB. No obstante, como es observado aquí sería necesario la confirmación de la infección con IET. Anteriormente Weber y col (116) propusieron que la detección de viriones y/o antígenos virales en cultivos de linfocitos formen la

base para desechar animales "altamente infecciosos". No obstante es importante conocer si existen diferencias en los niveles de MSP infectados en los diferentes estados fisiológicos en los cuales se encuentran las vacas en un hato lechero.

La prueba de Dot blot fue más sensible que las pruebas serológicas IDAG y ELISA para detectar la infección por VLB en un 61.4% y 5.2% respectivamente y se detectó el provirus en el 100% de los animales seropositivos, estos resultados nos indican que un alto número de animales con serología negativa por IDAG están infectados con el virus. Las pruebas serológicas son una buena herramienta para detectar hatos infectados con VLB, sin embargo, como es observado en el Cuadro X, éstas no siempre son capaces de determinar la infección en casos individuales, lo anterior es apoyado por estudios en los cuales han determinado que las metodologías serológicas para detectar VLB, particularmente IDAG, no detectan infecciones tempranas; por otro lado, sus resultados dependieron de la concentración de anticuerpos presentes en la muestra. Anteriormente también se ha reportado que los métodos serológicos pueden no detectar anticuerpos anti-VLB en animales coinfectados con el Virus de la Leucosis Bovina y el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), probablemente debido al efecto inmunosupresor de este último en animales infectados.

Por otra parte, se ha documentado que hembras de bovinos cercanos al parto presentan un descenso en el título de anticuerpo contra algunas infecciones, incluyendo VLB, por lo que el bajo índice de seropositivos encontrado comparado con el Dot blot, tal vez refleje que estos animales se encontraban en este estado fisiológico.

El alto número de animales detectados como positivos con Dot blot en nuestro estudio contrasta con lo reportado por otros autores (99) quienes empleando Southerblot en MSP no pudieron detectar al provirus en el 50% de la población afectada con VLB.

# 7. CONCLUSIONES

La seroprevalencia contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en Bovinos de la zona noreste de México es de 20.8%.

Los bovinos destinados a la producción de leche resultaron más afectados ($p < 0.01$) con 39.8% (539/1353) que los destinados a la producción de carne (0.7%, 9/1285).

La seroprevalencia por hatos de cada municipio estudiado varió desde 0 hasta 21.7%.

La Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG) subestima la prevalencia real de la linfección por el Virus de la Leucosis Bovina Enzootica.

Las pruebas Inmunoenzimáticas (ELISA e IET) son más sensibles que la IDAG para detectar serológicamente la infección por VLB.

El provirus (viriones) del Virus de la Leucosis Bovina Enzoótica circula con alta frecuencia en vacas lecheras del Noreste de México.

Los mononucleares sanguíneos periféricos de vacas seropositivas expresan niveles de antigenos del VLB detectables por Fijación de Complemento e Inmunmoelectrotransferencia.

En el Noreste de México existen vacas serológicamente (IDAG) negativas pero infectadas con el VLB; lo cual, aunado a las prácticas de manejo y al intercambio de ganado en la zona, mantienen la infección por VLB en esta área.

## 8. LITERATURA CITADA


1.-Abramova, E.N., V.S.Kondratev and I.A. Stinstkii (1979). The biochemistry of leucosis in cattle. *The Veterinary Bulletin.* **44**:689-704.

2.-Agresti, A., W. Ponti, M. Rocchi, R. Marozzi, D. Cavalleri, E. Peri, E Ginelli. (1993). Use of polimerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infections in calves at birth. *Am. J.Vet. Res.* **54**:373-378.

3.-Aida,Y. M.Onuma, N.Kasai, H.Izawa. (1987). Use of viable-cell ELISA for detection of monoclonal antibodies recognizing tumor-associated antigens on bovine lymphosarcoma. *Am.J.Vet. Res.* **48**:1319-1324.

4.-Aline,A. y A.Uruchurtu (1969) Linfosarcoma (Leucemia) en Bovinos. *Bol.Col.Nal. de Med. Vet.Zoot.* **3**:18-22.

5.-Astier, T., R. Mamoun, B. Guilleman, A.L. Parodi and J.F. Duplan. (1978). Characterization of antibodies responsible for the inhibition of blv induced early polycaryocy. *Ann. Rech. Vet.* **9**:699-708.

6.-Avalos,R.R., P. Zapata, L.Trejo, V. García. (1992). Seroprevalencia del Virus de la Leucosis Bovina (VLB), en bovinos sacrificados en el rastro de Monterrey, N.L. *XVII Congreso Nacional de Buiatria* Cd. Guadalupe, N.L. Oct. de 1992.

7.-Ban, J., E. Gieciova, O.Orlik, C. Altaner. (1990). Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *Journal of Virological Methods.* **30**:79-88.

8.-Brandon, R.B., H. Naif, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin. (1991). Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science.* **50**:89-94.

9.-Brenner, J., M. Van Haam, D. Savir and Z. Trainin (1989). The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a Dairy Cow. *Vet. Immun. and Inmunopath.* **22**: 299-305.

10.-Bruck, C. S. Mathot, D. Portetelle, C. Berte, J. Franssen, P. Herion, A.Burny. (1982). Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51.*Virology* **122**:342-252.

11.-Boer,G.F., H.M. Boerrigter, J.P.W.M. Akkermans, J.Brenner. (1989). Use of milk samples and monoclonal antibodies directed against BLV-p24 to identify attle infected with bovine leukemia virus (BLV). *Vet.Immun. and Immunopath.* **22**: 283-292.

12.-Burny, A., C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gregoire, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle.1985. Bovine Leukemia Virus. A New Mode of Leukemogenesis. *Advances in Viral Oncology.* **5**: 35-55.

13.-Burny, A., C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gregoire, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, L. Willems. (1985). Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogens effects in various animals species. *Cancer Research (suppl.) Cancer Research* **45**:4578s-4582s

14.-Burridge, M.J., Puhr, M.D., Hennemann, J.M. (1981). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Infection in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **179**:704-707.

15.-Burridge, M.J., Thurmond, M.C., Miller, J.M., Schmerr, M.J.F., Van Deer Maaten, M.J. (1982). Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am. J. Vet. Res.* **43**(10): 1866-1867.

16.-Calafat,J., A.A.Resang. (1977). Morphogenesis of bovine leukemia virus. *Virology.* **80**:42-53.

17.-Cerqueira, L.R., Modena, C.M., Moreira, E.C., Abreu, J.J. (1984). Evolucao Clínica de Leucose Enzootica Bovina. *Arq.Bras.Med.Vet.Zoot.* **36**: 47-57.

18.-Coulston J., H. Naif, R.Brandon, S.Kumar, S. Khan, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin. (1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovien leukemia virus DNA: comparison with other isolates. *Journal of General Virology.* **71**:1737-1746.

19.-Coulston, J., R.C.Daniel, M.F. Lavin. (1991). Integration of bovine leukemia virus at all stages of enzootic bovine leukosis. *Arch. Virol.* **119**:13-23.

20.-Cowley, J.A., J.B. Molloy, C.K. Dimmock, P.J. Walker, A.G. Bruyeres, W.H. Hard. (1992). Infectivity of bovine leukemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in in vitro cultured lymphocytes. *Vet. Microbiol.* **30**:137-150.

21.-Derse, D., S.J. Caradonna, J.W. Casey. (1985). Bovine Leukemia Virus long terminal repeats: a cell type specific promoter. *Science* **227**: 317-320.

22.-DiGiacomo, R.F. (1992). The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Medicine.* **87**:248-256.

23.-DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmision of the bovine leukemia virus. *Veterinary Medicine.* **87**:263-271.

24.-DiGiacomo, R.F., Studer, E., Evermann, J.F., Evered, J. (1986). Embryo transfer and transmission of bovine leukosis virus in dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **188**: 827-828.

25.-Driscoll, D.M., C. Olson. (1977). Bovine leukemia virus-associated antigens in lymphocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* **38**:1897-1898

26.-Espada,R., A.Flogio, F.Gurría, G.López, J.López, H.Meixueiro, J.Pérez, V.Yáñez, O.Hernández, D.Beymer, H.Riemann. (1986). Prevalencia de anticuerpos contra las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino de Baja California. *Vet. Mex.* **17**: 23-29.

27.-Esteban, E.N., R.M.Thorn, J.F. Ferrer. (1985). Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus. *Cancer Research.* **45**: 3225-3230.

28.-Evermann,J.F.(1992) A Look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. *Comp. Cont.Med. Ed.* **14**:272-278.

29.- Everman,J., R. DiGiacomo, N. Hubber. (1980). Prevalence of bovine leukemia virus antibody in seven herds of Holstein-Friesian cattle. *JAVMA* **177**:549-550.

30.-Fenner, J.F., E.P.J.Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott,M.J.Studdert, D.O. White. (1993). *Veterinary Virology.* Academic Press Inc. USA.

31.-Ferdinand, G.A.A; Langston, A.; Ruppanner, R.; Drlica, S.; Thellen, G.H. and Behymer, D.E. (1987). Antibodies to bovine leukemia virus in a leukosis dairy herd and suggestions for control of the Infection. *Can. J. Comp. Med.* **43**: 173-179.

32.-Ferrer, J.F. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *J.A.V.M.A.* **175**: 1281-1286.

33.-Ferrer, J.F. (1982). Eradication of bovine leukemia virus infection form a high-prevalence herd, using radioinmunoassay for indentification of efected animals. *J.Am.Vet. Med. Assoc..* **180**:890-893.

34.-Ferrer, J.F., Bhatt, D.M., Abt, D.A., Marshak, R.R., Baliga, V.L.; (1975). Serological diagnosis of infection with putative bovine leukemia virus. *Cornell Vet.* **65**:527-542.

35.-Ferrer, J.F., C.E. Piper, D.A. Abt, R.R. Marshak. (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.

36.-Ferrer, J.F., R.R. Marshak, D.A. Abt, S. Kenyon. (1978). Persistent Lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9:851-857.

37.-Ferrer, J.F., Marshak, R.R., Abt, D.A. Kenyon, S.J. (1979).Relationship between Lymphosarcoma and Persistent Lymphocytosis in Cattle: A Review. *J.Am. Vet. Assoc.*, **175**:705-707.

38.-Florent, G. (1988). An ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *Veterinary Record.* **123**:570-571.

39.-Ghysdael,J.,C.Bruck,R.Kettmann and A.Burny. (1984) Bovine Leukemia Virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **112**:1-19.

40.-Ghysdael, J., R.Kettmann, A. Burny. (1978). Translation of bovine leukemia virus genome information in heterologous protein synthesizing systems programmed with virion RNA and in cell-lines persistently infected by BLV. *Ann. Rech. Vet.* 9:627-634.

41.-Graves,D.C., M.McQuade, K.Weibel. (1982).Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with an early polykaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J.Vet. Res.* **43**:960-966.

42.-Grover, Y.P., B.Guillemain. (1992). An immunoblotting procedure for detection of antibodies against bovine leukemia virus in cattle. *J.Vet. Med. B.* **39**:48-52.

43.-Gupta, P., J.F.Ferrer. (1978). A critical comparison of the virus neutralization radioimmunoprecipitacion and immunodiffusion tests for the serological diagnosis of BLV infection. *Ann. Rech. Vet.* 9:683-688.

44.-Henry, E. T., J. F. Levine, L. Coggins. (1987). Rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle and sheep. Am. J.Vet. Res. **48**:634-636.

45.-Hoof-Jørgensen, R. (1989). An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leucosis: Suggestions for

International standardization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **22**:293-297.

46.-House, C., J.A., Househand F.L. Glover, (1977). Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus and the cattle population of five states. *Cornell Vet.* **67**: 510-522.

47.- Huber, N.L., DiGiacomo, R.F.;Evermann, J.F.; Studer, E.(1981). Bovine leukemia virus infection in a large Hoistein herd:prospective Comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody- positive cows. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 1477-1481.

48.-Huber, N.L., DiGiacomo, R.F.;Evermann, J.F.; Studer, E.(1981). Bovine leukemia virus infection in a large Hoistein herd: Cohort analysis of the prevalence af antibody-positive cows. *Am.J.Vet. Res.* **42**:1474-1476.

49.-Jacobs, R.M. (1983). Bovine Lymphoma. *In Comparative Pathobiology of Viral Diseases*. **II**:21-51.

50.-Jacobs, R. M., Z. Song, H. Poon, J.L. Heeney, J.A. Taylor, B. Jefferson, W. Vernau, V. E.O. Valli. (1992). Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle with lymphoma. *Can. J. Vet. Res.* **56**:339-348.

51.-Jaramillo, B. J. (1975) "El Linforsarcoma de Bovinos en la Cuenca Lechera del Valle de México". Tesis FMVZ/UNAM, México, D.F.

52.-Johnson,R.; J.B.Kaneene. (1991) Bovine Leukemia Virus. Part I. Descriptive Epidemiology,Clinical Manifestations, and Diagnostic Test. *Comp.Cont.Ed* **13**:315-327.

53.-Johnson,R.; J.B.Kaneene. (1991) Bovine Leukemia Virus. Part II. Risk factor of transmision. *Comp.Cont.Ed.* 13:681-691.

54.-Johnson,R. C.D.Gibson, J.B. Kaneene. (1985).Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Preventive Veterinary Medicine*. **3**:339-349.

55.-Kaaden, O. and J.R. Stephenson(1978). Report of the second session Detection of BLV infection: serological methods). *Ann. Res. Vét.* **9**:604-605.

56.-Kaja, R.W.; Olson, C.; Rowe, R.F.; Stauffacher, R.H.; Strozinsky, L. L.; Hardie, A.R.; Bause, I. (1984). Establishment of bovine leukosis virus-free dairy herd. *J.Am.Vet. Med. Assoc.* **184**: 184-185.

57.-Kelly, E.J., M. Jackson, G. Marsolais, J.D. Morrey, R.J. Callan. (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am.J.Vet. Res.* **54**:205-209.

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

59.-Langston, A.; Ferdinand, G.A.A.; Ruppanner, R.; Theilen, G.H.; Drlica, S.; Behymer, D. (1987). Comparison of production variables of bovine leukemia virus antibody-negative and antibody-positive cows in two California dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* **39**: 1093-1096.

60.-Larios, G.F., B. Madewell y B. L. Monroy. (1985). Complejo Leucosis Lymphosarcoma estudio epidemiológico en bovinos Pardo Suizo, *Reunión de Invest. Pec. en México.* pag. 85.

61.-Larson, V.L., D.K. Sorensen, R.K.Andersen, V.Perman. (1970). Epizootiologic studies on the natural transmission of bovine leukemia. *Am. J.Vet. Res.* **31**:1533-1538.

62.-Lassauzet, M. G., M.C. Thurmond, W.O.Johnson, F. Stevens, J. P. Picanso. (1990). Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Can J.Vet. Res.* **54**:184-189.

63.-Lassauzet, M. G., M.C. Thurmond, W.O.Johnson, F. Stevens, J. P. Picanso. (1991). Factor associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *American Journal of Epidemiology*. **133**:164-176.

64.-Lewin, H.A., D. Bernoco. (1986). Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *Anim. Genet.* **17**:197-207.

65.-Mammerickx, M.; Cormann, A.; Burny, A.; Dekeger, D. and Portetelle, D. (1978). Eradication of enzootic bovine Leukosis based on the detection of the diseases by the Gp immunodifusion test. *Ann. Rech. Vet.* **9**(4) 885-894.

66.-Mamoun, R.Z., T. Astier, B. Guilleman, J.F. Duplan. 1983. Bovine Lymphosarcoma: Processing of bovine leukaemia virus-coded proteins. *J.Gen. Virol.* **64**:2791-2795.

67.-Maniatis, T., E.F.Fritsch, y J.Sambrock. (1982). Molecular cloning : A Laboratory Manual. "Cold spring harbor laboratory Press", New York, USA.

68.-Marín, C; N.M. López; L. Alvarez; O. Lozano; W. Espinoza;H. Castaños, A. León. (1978). Epidemiology of Bovine Leukemia in Venezuela. *Ann Rec. Vet.* **9**:743-746.

69.-Medina, C. M. (1988). Leucosis bovina. *Vet. Mex.* **19**:151-159.

70.-Miller, J.M. (1988). Cultivation methods for production of bovine leukemia virus and soluble viral antigens. *Journal of Tissue Culture Methods.* **11**:65- 7.

71.-Miller, J.M., L.D. Miller, C. Olson and K. G. Gillete. (1969). Virus like particules in Phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lynphosarcoma. *J. Nat. Canc. Inst.* **43**: 1297-1305.

72.-Miller, J.M., M.J. F. Schmerr, M.J. Van Der Maaten (1981). Comparison of Four Serologic Test for the detection of Antibodies to Bovine Leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* **42**:5-8.

73.-Miller,J.M., M.J. VanDer Maaten. (1976). Serologic detection of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Microbiology.* **1**:195-202.

74.-Miller,J.M., M.J. VanDer Maaten. (1977). Use of Glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer* **13**:1369-1375.

75.-Miller,J.M. and M.J. Van Der Maaten. (1978). A Complement- Fixation test for the Bovine Leukemia (C-type) Virus. *J. Natl. Canc. Inst.* **53**:1699-1707. 76.-Miller,J.M. and M.J. Van Der Maaten. (1979). Infectivity test of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**: 425-428.

77.-Miller, J.M., M.J. Van Der Maaten. (1982). Bovine Leukosis- It's importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.* **65**: 2194- 2203.

78.-Mirsky, M.L., Y. Da, H.A. Lewin. (1993). Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. *PCR Methods and Applications.* **2**:333-340.

79.-Monke,D.R., R.F.Rhode, W.D. Hueston, R.J.Milburn. (1992). Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). *J.A.V.M.A.* **200**:2001-2004.

80.-Monroy, B. J. Trigo, F., A. S. Aluja, R.M. García. (1993). Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusion en el diagnóstico de la leucosis enzootica bovina. *Vet.Mex.* **24**:21-25.

81.-Monroy, B. J. Trigo, F. Larios, G.F. Fajardo, M.R., Marquez. (1985) Estudio Seroepidemiológico de Leucosis Bovina en México. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.* Mex. D.F. p. 84.

82.-Murtaugh, M.P., G.F. Lin, D.L. Haggard, A.F.Weber, J.C. Meiske. (1991). Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J.Virol. Meth.* **33**:73-85.

83.-Mussgay, M., O-R. Kaaden. (1978)..Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **79**:43-72.

84.-Naif, H.M., R.C.W. Daniel, W.G. Cougle, M.F.Lavin. (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. of Clin. Microbiol.* **30**:675-679.

85.-Nguyen, V.K., R.F. Maes. (1993). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *Journal of Clinical Microbiology.* **31**:979-981.

86.-Ohshima, K., Y. Aida, J.Kim, K. Okada, T. Chiba, K. Murakami, Y. Ikawa. (1991). Histopathology and distribution of cells harboring bovine leukemia virus (BLV) proviral sequences in ovine lymphosarcoma induced by BLV inoculation. *J. Vet. Med. Sci.* **53**:191-199.

87.-Okada, K., Y. Hosokawa, Y. Aida, K. Ohshima. (1991). *In Situ* hibrydization for the demostration of bovine leukemia virus transcripts in lymphosarcoma cells using biotinylated probes. *J. Vet. Med. B.* **38**:707-713.

88.-Olivares, E. (1990). Diseños experimentales. Fac. de Agronomia de la U.A.N.L.

89.-Olson,C, R.Kaja, R. Stauffacher, E. Zehener. (1978). Development of Bovine Leukosis virus infection in cattle. A preliminary study. *Ann. Rech. Vet.* **9**:845- 849.

90.-Olson, C., J.M. Miller, L.D. Miller, K.G. Gillete (1970) C-type virus and lymphocytic Nuclear Projections in Bovine Lymphosarcoma. *JAVMA* **156**: 1880-1887.

91.-Onuma, M., C.Olson, L.E. Baumgartener, L. D. Pearson. (1975). An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia infection. *J. Natl. Cancer. Inst.* **55**:571.

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

93.-Portetelle,D.; C.Bruc; A.Burny; D.Dekegel; M.Mammerick and J.Urbain (1978) Detection of Complement-Dependent Lytic Antibodies in sera from bovine Leukemia Virus Infected Animals. *Ann.Rech.Vet.* **9**:667-674.

94.-Radke, K., T.J. Sigala, D. Grossman. (1992). Transcription of bovine leukemia virus in peripheral blood cells obtained during early infection *in vivo. Microbial. Pathogenesis* **12**:319-331.

95.-Rebhun, W.C., (1982). Orbital Lymphosarcoma in Cattle., *J.Am. Vet. Med. Assoc.* **180**:149-152.

96.-Reed, V.I. (1981) Enzootic Bovine Leukosis. *Can Vet. J.* **22**: 95-102.

97.-Reinhardt, G. V. Hochstein-Mintzel, S. Riedemann, H. Leal y M. Niedda (1988). Estudio serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina en un predio de la provincia de Valdivia y su relación a parámetros productivos y reproductivos. *J. Vet. Med. B.* **35**: 178-185.

98.-Ressang,A.A.; A.L.J.Gielkens; S.Quak; N.Mastenbroek; C.Tuppert and A.De Castro. (1978) Enzyme Linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine Leukosis Virus. *Ann. Rech. Vet.* **9**:663-666.

99.-Roberts, D.H., M.H. Lucas, G. Wibberley, D. Westcott. (1988). Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. *The Veterinary Record.* **122**: 293-296.

100.-Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa, Y. Ikawa.(1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:677-681.

101.-Sagata,N., T. Yasunaga, Y. Ogawa, J. Tsuzuku-Kawamura, Y. Ikawa. (1984). Bovine Leukemia Virus: Uniquestructural features of its long terminal and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 4741-4745.

102.-Sagata, N., J. Tsuzuku-Kamakura, M. Nagayoshi-Aida, F. Shimizu, K. Imagawa, Y. Ikawa. (1985).Identification and some biochemical propieties of the major XBL gene product of bovine leukemia virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **82**:7879-7883.

103.-Sherman, M.P., G. D.Ehrlich, J.F. Ferrer, J.J.Snisky, R. Zandomeni, N.L.Dock, B.J.Poiez. (1992). Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* **30**:185-191.

104.-Sprecher, D.J. , K.D. Pelzer, P. Lessard. (1991). Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *JAVMA.* **199**: 584-588.

105.-Stott, M.L., M.C. Thurmond, S.J.Dunn, B.I. Osburn, J.L. Stott. (1991). Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/ suppressor lymphocytes. *Journal of General Virology.* **72**:307-315.

106.-Straub,O.C., C.Olson. (1978). Report of the fourth session (Epidemiology of BLV). Third International Symposium on Bovine Leucosis. *Ann.Rech. Vét.* **9**:605.

107.-Suzan, V.M., M. Onuma, R. E. Aguilar and Y. Murakawi (1983). Prevalence of Bovine Herpesvirus-1, Parainfluenza-3, Bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine adenovirus-7, Bovine Leukemia Virus and Bluetongue virus antibodies in cattle in México. *Jpn. J. Vet. Res.* **31**: 125- 132.

108.-Thurmond, M.C., and Burridge, M.J., (1982). Application of research to control of bovine leukemia virus-free cattle and semen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **181**:1531-1534.

109.-Thurmond, M.C., C.B. Maden and R.L. Carter (1985), Cull rates of Dairy cattle with Antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Canc. Res.* **45**:1987-1989.

110.-Thurmond, M.C., G.R. Lapuz, T.B. Farver, G.C.Mondac. (1985). Retrospective study of four years of carcass condemnation rates for malignant lymphoma in California cows. *Am. J. Vet. Res.* **46**(6): 1383-1391.

111.-Trejo, A. L., P. Zapata, A. Beltrán, y R. Avalos, (1990). Reactividad serológica contra el virus de la leucemia bovina (VLB) en bovinos de la egión. *Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica.* Facultad de Medicina UANL., Monterrey, N.L., Mex.

112.-Uckert W., V. Wunderlich, J. Ghysdael, D.Portetelle, A.Burny. (1984). Bovine leukemia virus (BLV)- a structural model based on chemical crosslinking studies. *Virology.* **133**:386-392.

113.-Van Der Maaten, M.J. and Miller, J.W. (1979). Appraisal of ont rol Measures for bovine leukosis. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* **175**:1287-1290.

114.-Van Der Maaten, M.J.; Miller, J.M., Schmerr, M.J.F., (1981). Effect of Calostral Antibody on Bovine Leukemia Virus infection of Neonatal Calves; *Am. Vet. Res.* **42**:1498-1500.

115.-Walker, P.J., J.B. Molloy, B.J.Rodwell. (1987). Protein immunoblot test for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. *J. Virol. Meth.* **15**:201-211.

116.-Weber, A.F. et. al. (1987) In vitro viral expression as a criterion for development of control procedures for enzootic bovine leukosis. *Am. J. Vet. Res.* **48**:889-903.

117.-Wu, M., R.D.Shanks, H.A.Lewin. (1989). Milk fat production in dairy cattle influnced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 993-996.

118.-Yoshikawa, T., H. Yoshikawa, H. Koyawa and S. Tsubaki (1982). Preliminary attempts to Eradicate infection with Bovine leukemia virus from a stock farm in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**:831-834.

119.-Yoshinaka,Y., I.Katoh, T.D.Copeland, G.W. Smythers and S.Oroszlan. (1986). Bovine Leukemia Virus Protease: Purification, Chemical Analysis, and In Vitro Processing of gag Precursor Polyproteins. *Journal of Virology.* **57**:826-832.

120.- Zanoni, R., A. Krieg, E. Peterhans. (1989). Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immuno sorbent assay and immunoblotting. *J. of Clin. Microbiol.* **27**: 580-582.

121.-Zapata, B.P.; R. Avalos; M.A. Lara; R. Tamez y L. Trejo. (1992) Prevalence of VLB in neigboring areas to Monterrey, Saltillo and Torreón. *Reunión Internacional de Microbiología.* Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L

# APENDICE

Constitucion del medio FLK-BLV ( Mantenimiento )

| | |
|---|---|
| Medio Dulbeccos modificado | 100 ml. 2x |
| Suero fetal bovino | 16 ml |
| Penicilina-Estreptomicina ( 1% ) | 0.2 ml. |
| Bicarbonato de Sodio | 15 ml. |
| aforar con $H_2O$ tridestilada | 200 ml. |

**Medio para la Producción de Antígeno soluble**

| | |
|---|---|
| Dulbeccos modificado | 50 ml 2x |
| Suero Fetal Bovino | 5 ml |
| Penicilina-Estreptomicina | 0.1 ml. |
| Bicarbonato de Sodio | 10 ml. |
| Aforar con $H_2O$ tridestilada | 100 ml. |

**Buffer's**

PBS ph 7.4 0.05M

| soluto | cantidad 10lts | cantidad 1 lt |
|---|---|---|
| Na2 HPO4 | 16.7 gr | 1.67 gr |
| Na H2 PO4 | 5.7 gr | 0.57 gr |
| Na Cl | 85.0 gr | 8.50 gr |
| Na N3 | 100 mg | 10 mg |

Disolver en agua destilada aforar a 10 lts, checar el ph y almacenar a temperatura de cuarto.

**TRIS - HCl**

12.1 gr tris (hidroximethylamina)

1 M HCl

Disolver el tris en 800 ml y ajustar el ph a 7.4 usando 1 M de HCl aforar a 1 lt y almacenar a 4 grados centígrados.

**BUFFER DE DIETANOLAMINA 0.1 M, ph 9.8**

10.1 mg MgCl2

0.5 H20

Disolver en 60ml de agua destilada mas 19.4 ml de dietanolamina, mezclar muy bien y ajustar el ph a 9.8 con HCl concentrado y aforar a 100 ml agregar 20 mg de NaN3 y almacenar en frasco oscuro a 4 grados centigrados.

**Buffer´s empleados en el Dot blot**

A).- Buffer de bloqueo (almacenar entre 0-4°C)

50mM Trizma-HCl

1mM EDTA

0.3% Tween20

25% leche descremada

pH 7.5

B).- Buffer 1

100mM Trizma-HCl

1.0 M NaCl

2mM $MgCl_2$

0.05% Triton X-100

pH 7.5

C).- Buffer 2

100 mM Trizma-HCl

1.0 NaCl

5mM $MgCl_2$

pH 9.5

D).- Buffer 3

100 mM Trizma-HCl

100mM NaCl

5mM $MgCl_2$

pH 9.5

**Componentes incluidos en el juego comercial "SulfoPROBE"**

1.- Solución de Modificación A

2.- Solución de Modificación B

3.- Solución de DNA de esperma de salmón (0.5 mg/ml)

4.- Dna de Testiculo de salmón (0.3 mg/ml)

5.- Anticuerpos monoclonales contra DNA modificado (Anti-DNA)

6.- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina

7.- Azul de Tetrazolio (NBT)

8.-5-Bromo-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP) en dimetilformamida (50 mg/ml).

**Procedimiento del juego comercial "SulfoPROBE"**

I.- Reacción de modificación

a).-Diluir el DNA (plásmido) a modificar en agua destilada (0.5mg/ml).

b).- Desnaturalizar el DNA en calentandolo por 10 minutos.

c).- Enfriar en hielo

d).- Agregar 50µl de la solución de modificación A a 0.1ml del DNA desnaturalizado, agitar y despues agregar 12.5µl de la solución de modificación B, agitar brevemente.

e).- Se incuba ésta mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente.

II.- Control de la reacción de modificación

a).- Se depósita 100µl de la solución del DNA de esperma de salmón.

b).- Se efectua la reacción de modificación como en la sección I.

III.- Se emplea el DNA del testiculo de salmon como agente bloqueador en la membrana durante la prehibridación. La actividad optima en la reacción de hibridación se obtiene si el DNA modificado (etapaI) se utiliza a una concentración de 1.0-10.0 µg/ml.

IV.- Visualización inmunologica de la hibridación (Hibrido).

a).- Se transfiere la membrana a una bolsa de plástico. Se agregan 50µl del Buffer de bloqueo por cada $cm^2$ , se sella la bolsa y se incuba durante 1hora a temperatura de cuarto agitandose durante este tiempo. Mientras tanto el anticuerpo anti-DNA se diluye 1:300 en Buffer de bloqueo. ( se prepara un volumen suficiente para 50 µl por $cm^2$.

b).- Se abre la bolsa, se desacarta el buffer de bloqueo y se agrega el anticuerpo anti-DNA recién diluido. se vuelve a sellar la bolsa y se incuba durante una hora a temperatura de cuarto con agitación constante.

c).- Se lava la membrana 3 veces en Buffer 1 (15 minutos por lavado usando 3 $ml/cm^2$ por cada lavado).

d).- Se coloca la membrana en una nueva bolsa de plástico. El anticuerpo anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina se diluye 1:300 en Buffer de bloqueo (50µl por $cm^2$ de membrana). se agrega el conjugado a la bolsa y se incuba 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

c).- Despues de la ultima incubación (etapa d) se lava 3 veces con el Buffer 1 al menos 20 minutos por lavado, despues 2 veces con el Buffer 2.

d).- Se deposita la membrana (lado no reactivo) en papel filtro durante 2 minutos.

e).- Mientras tanto, se prepara la solución de sustrato cromogénica a una concentración final de 0.3 mg/ml de NBT y 0.2 mg/ml BCIP en Buffer 3. (La solución cromogénica se debe de preparar inmediatamente antes de uso o almacenarse en pequeñas alicuotas a -20°C, estable por 1-2 semanas).

d).- Se transfiere la membrana lavada a una nueva bolsa de plástico. Se agregan 5 ml de la solución del substrato recién preparada. Se sella la bolsa y se incuba a temperatura de cuarto durante 10-30 minutos en la oscuridad ( si el color no es evidente se incuba una hora mas o hasta que se desarrolle el color. Se detiene la reacción sumergiendo la membrana en agua.

**MEDIO LURIA-BERTONI (L-B)**

Bacto-Triptona ..... 10 gr.

Extracto de Levadura .... 5 gr.

Cloruro de Sodio ..... 10 gr.

Aforara a..... 1000 ml

Ajustar pH a 7.5 con NaOH

**Soluciones para la prueba de Fijación de Complemento**

Diluyente Solución Sálina (0.85%)

Cloruro de Sodio ..... 0.85 gr.

Sol'n stock de iones de Calcio..... 0.1 ml.

Sol'n de Azida de sodio ..... 0.025 ml.

Agua bidestilada ..... 100 ml.

**Solución stock de iones de Calcio**

1 M Cloruro de Magnesio (9.5 gr. Cloruro de Magnesio anhidro)

0.3 M Cloruro de Calcio (3.7 gr. Cloruro de Calcio Anhidro)

Aforara a 100 ml. de agua bidestilada.

**Colecta y almacenamiento de eritrocitos de oveja**

Los eritricitos de oveja usados como indicador de hemolisis se obtuvieron a partir de la vena yugular de un ovino sulfok de 1 año de edad; previa depilación del área con una aguja y jeriga estéril la sangre se extrajo y se mezcló con Solución de Alsever contenida en un frasco del cual se fraccionaron en alicuotas de 5 ml. en condiciones de estérilidad, se almacenaron en refrigeración y se emplearon hasta despues de 5 dias de colectados.

**Solución de Alsever's**

Glucosa ..... 18.66 g

Cloruro de Sodio ..... 4.18 g

Citrato de Sodio ..... 8.00 g

Acido Citrico ..... 0.55 g

Agua bidestilada aforar a ... 1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 110 Libras de presión a durante 10 minutos.

**Lavado de los eritrocitos (realizarse el mismo dia de uso)**

1.- 10 ml de sangre almacenada en alsever's se mezclan con 40 ml del diluyente estos se _ a 1500 rpm. durante 10 m.

2.- El sedimento se mantiene y se remueve la capa de leucocitos junto con el sobrenadante.

3.- se le agregan de nuevo 40 ml. de diluyente y se repiten los pasos anteriores.

4.- despues se resuspenden en 10 ml de diluyente y se depositan en un tubo cónico graduado para 15 ml. estos se _ a 1500g x 10m
se anota la cantidad de sedimento y se remueve cuidadosamente el sobrenadante.

**Preparación de Complemento**

Se alimentaron 4 cobayos adultos _ con alfalfa verde durante 1 semana y 12 horas antes de sangrar se les quito la alimentación y se les mantuvo con agua.

La sangre se obtuvo directo del corazón y se depositaron en tubos limpios, el suero se obtuvo inmediatamente (no más de 1 hora) despues de formación del coagulo con _ del tubo a 2000 rpm

Tabla 1.-Concordancia entre las técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-VLB en un hato con elevada (IDAG) seroprevalencia

| Numero | ELISA/DO | Inmunoblot | IDAG |
|---|---|---|---|
| 1 | +/0.46 | + | + |
| 2 | +/0.38 | + | + |
| 3 | +/0.67 | + | + |
| 4 | +/0.35 | + | + |
| 5 | +/0.49 | + | + |
| 6 | +/0.33 | + | + |
| 7 | -/0.10 | - | - |
| 8 | -/0.08 | - | - |
| 9 | +/0.37 | + | + |
| 10 | +/0.42 | + | + |
| 11 | -/0.17 | + | - |
| 12 | -/0.17 | + | - |
| 13 | +/0.33 | + | + |
| 14 | +/0.49 | + | + |
| 15 | -/0.08 | - | - |
| 16 | -/0.08 | - | - |
| 17 | +/0.22 | - | - |
| 18 | +/0.43 | + | + |
| 19 | -/0.09 | - | - |
| 20 | -/0.08 | - | - |
| 21 | +/0.29 | + | - |
| 22 | +/0.30 | + | - |
| 23 | +/0.26 | + | - |
| 24 | +/0.38 | + | + |
| 25 | -/0.15 | - | - |
| 26 | +/0.28 | + | - |
| 27 | +/0.33 | + | - |
| 28 | +/0.38 | + | + |
| 29 | +/0.43 | + | + |
| 30 | +/0.45 | + | + |
| 31 | +/0.47 | + | + |
| 32 | +/0.43 | + | + |
| 33 | +/0.76 | + | + |
| 34 | +/0.47 | + | + |
| 35 | +/0.43 | + | + |
| 36 | +/0.28 | + | - |
| 37 | +/0.36 | + | + |
| 38 | -/0.17 | + | - |
| 39 | -/0.10 | - | - |
| 40 | +/0.38 | + | + |

Tabla 2.-Concordancia entre las técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-VLB en un hato con baja (IDAG) seroprevalencia.

| Numero | ELISA/DO | Inmunoblot | IDAG |
|---|---|---|---|
| 1 | -/0.10 | - | - |
| 2 | +/0.30 | + | + |
| 3 | +/0.38 | + | + |
| 4 | -/0.12 | - | - |
| 5 | -/0.10 | - | - |
| 6 | -/0.08 | - | - |
| 7 | -/0.02 | - | - |
| 8 | -/0.08 | - | - |
| 9 | -/0.08 | - | - |
| 10 | +/0.22 | - | - |
| 11 | -/0.15 | - | - |
| 12 | -/0.12 | - | - |
| 13 | -/0.10 | - | - |
| 14 | -/0.10 | - | - |
| 15 | +/0.30 | + | - |
| 16 | +/0.24 | - | - |
| 17 | -/0.17 | - | - |
| 18 | -/0.10 | - | - |
| 19 | -/0.08 | - | - |
| 20 | +/0.38 | + | - |
| 21 | -/0.10 | - | - |
| 22 | -/0.12 | - | - |
| 23 | -/0.16 | - | - |
| 24 | -/0.18 | - | - |
| 25 | -/0.10 | - | - |
| 26 | -/0.10 | - | - |
| 27 | -/0.12 | - | - |
| 28 | -/0.10 | - | - |
| 29 | -/0.18 | + | - |
| 30 | -/0.16 | - | - |
| 31 | +/0.48 | + | + |
| 32 | +/0.44 | + | + |
| 33 | -/0.12 | - | - |