

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Veterinarias

**“Caracterización de la infección con VLB en la tríada
calostro-madre-ternero”**

Tesis Doctoral

Marina Lomónaco

Buenos Aires
2017

Se presenta el siguiente trabajo de tesis “Caracterización de la infección con VLB en la tríada calostro-madre-ternero” para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Aspirante de tesis: Marina Lomónaco

Director de tesis: Dra. Karina G.Trono

Lugar de trabajo: Instituto de Virología Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
INTA Hurlingham Buenos Aires 2017

Agradecimientos

Hacer una lista de agradecimientos me resulta difícil porque no quiero dejar de mencionarlos, ya que todos y cada uno de los compañeros laborales han contribuido a que esta tesis sea realidad.

Al INTA que me permitió dar los primeros pasos en la actividad Veterinaria. A María Rosa y en ella la representación de todos los compañeros de INTA Balcarce, posteriormente a Irene y a todos los compañeros de INTA Castelar que marcaron una época y me iniciaron en la Virología. Pero más cerca en el tiempo a mi directora Karina que cuando exprese hace ya unos años mi intención de hacer algo más que me permitiera avanzar en el conocimiento y aporte, fue la única que se ofreció a dirigirme y acompañarme en este largo camino y a Fernando que colaboró directa e indirectamente para que esto se llevara a cabo. A Gerónimo e Irene primeros en la lista de mis colaboradores fundamentales y todos los chicos del equipo de Adventicios, de Leucosis y de Diagnóstico que me dieron su ayuda incondicional. A Osvaldo y todo el equipo de cultivos, en particular a Diego C. por estar siempre dispuesto a colaborar, desde las épocas “shudelianas”. A Diego F. por su trabajo de campo. A Darío por su aporte. A Betty la eterna secretaria y sus invalorable colaboradores.

En lo personal a mi amor y compañero de la vida Alejandro y toda su familia que siempre estuvieron presentes y me hicieron sentir como una hija más, a mi hermana Jorgelina, a mis sobrinos Fiamma, Enzo, Josué y mis cuñados, que me ofrecieron su apoyo y amor incondicional para compartir los lindos momentos de la vida y sobrellevar aquellos tan difíciles. A mi amiga y colega con la que compartí toda esa linda etapa de estudiante, Golo.

Dedicatoria: a mi compañero de la vida, Alejandro

A mi hermana Jorgelina

En memoria de mis padres y mi hermana Stella

Índice General

Índice de Tablas.....	III
Índice de Figuras.....	IV
Abreviaciones y Símbolos.....	VI
1. Introducción.....	1
1.1. Epidemiología e Impacto de la infección con el VLB.....	1
1.2. El VLB: estructura, organización genética y patrón de expresión.....	6
1.3. Patogenia y carga proviral.....	12
1.4. Persistencia viral y transmisión: Rol del calostro y de la leche.....	14
2. Hipótesis.....	18
3. Objetivo General y Particulares.....	18
4. Materiales y Métodos.....	19
4.1. Animales y muestras.....	19
4.2. Extracción de ADN genómico total.....	20
4.3. Cuantificación relativa de la carga proviral: PCR en tiempo real.....	20
4.4. Detección de provirus: Nested PCR (nPCR tax).....	23
4.5. Detección de anticuerpos.....	25
4.5.1. Elisa p24.....	25
4.5.2. Elisa virus completo (Elisa VC).....	26
4.5.3. Inhibición de Sincicios.....	26
4.6. Contaminación experimental del calostro con VLB y secado spray.....	30
4.7. Bioensayo en ovinos.....	33
4.8. Estadística y Software utilizado.....	34
5. Resultados.....	35
5.1. Relación entre la carga proviral en sangre y calostro de las madres.....	35
5.2. Relación entre el nivel de infección de la madre y el nivel de anticuerpos en sangre, calostro y ternero.....	38
5.3. Nivel de anticuerpos: Título versus Reactividad.....	45
5.4. Detección de anticuerpos Neutralizantes.....	46
5.4.1. Puesta a punto de las condiciones de co-cultivo celular.....	46
5.4.2. Puesta a punto del ensayo de detección de anticuerpos por Inhibición de Sincicios.....	48
5.5. Validación de la inactivación de VLB durante el proceso de secado spray en calostro.....	50

1. Discusión.....	53
2. Conclusiones.....	64
3. Referencias.....	65
4. Anexo.....	I
5. Información suplementaria.....	VIII

Índice de Tablas

Tabla 1.1	Impacto económico estimado de la Leucosis bovina en Argentina debido a la muerte por tumores y valores de referencia
Tabla 1.2	Situación en Argentina en los últimos 40 años
Tabla 1.3	Función de las principales proteínas virales
Tabla 4.1-	Número mínimo de muestras a analizar
Tabla 4.2.	Reactivos utilizados en la reacción de PCR en tiempo Real VLB-Pol
Tabla 4.3.	Reactivos utilizados en la reacción de PCR en tiempo Real VLB-18S
Tabla 4.4.	Nombre y secuencia de Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real (cuantificación relativa y absoluta)
Tabla 4.5	Oligonucleótidos utilizados en la Nested-PCR tax VLB
Tabla 4.6.	Volumen de reactivos para mezcla de primera ronda de nPCR tax
Tabla 4.7	Volumen de reactivos para la segunda ronda nPCR tax
Tabla 4.8	Cultivos utilizados en la puesta a punto del ensayo de formación de sincicios
Tabla 4.9.	Relación y concentración de los cultivos celulares utilizados en los ensayos de formación de sincicios
Tabla 4.10.	Dosis infecciosa individual y utilizada en los ensayos de contaminación experimental de calostros y proceso de secado spray
Tabla 4.11	Nivel de confianza considerado para el análisis estadístico
Tabla 5.1	Muestras positivas según ensayo y tipo de muestra en los animales en estudio
Tabla 5.2	Detección de provirus (nPCR) en muestras de calostro y sangre de las madres
Tabla 5.3	Detección de provirus (nPCR) y carga proviral relativa en calostro
Tabla 5.4	Carga proviral relativa en muestras de sangre de la madre y calostro
Tabla 5.5	Animales con resultados discordantes de anticuerpos en sangre madre, ternero y calostro
Tabla 5.6	Rango de anticuerpos p24 y virus completos en los 3 subgrupos en estudio
Tabla 5.7	Distribución de anticuerpos en el triplete madre/calostro/ternero
Tabla 5.8	Terneros con provirus detectable en sangre
Tabla 5.9.	Correlación Reactividad vs Título de anticuerpos entre distintos tipos de muestras
Tabla 5.10	Formación de sincicios en las diferentes condiciones de co-cultivo. 24 h de co-cultivo
Tabla 5.11	Número de sincicios totales por dilución en ensayos de inhibición del efecto

sincial en muestras de sueros de animales infectados (seropositivos) y no infectados (seronegativos).

Tabla 5.12	Ensayo de infectividad después del proceso de secado spray del calostro contaminado experimentalmente con VLB
Tabla 5.13	Titulación de anticuerpos en calostro con anticuerpos (Pool 3) pre y post-secado

Índice de Figuras

- Figura 1.1 Situación mundial de la leucosis bovina enzoótica
- Figura 1.2 Prevalencia individual de seroreactores en Sudamérica
- Figura 1.3 Prevalencia de animales infectados con virus de la leucosis bovina en tambos de la zona de Rafaela, provincia de Santa Fe
- Figura 1.4 Estructura esquemática del genoma del virus de la leucosis bovina (a) y de la partícula viral (b)
- Figura 1.5 Estructura del provirus VLB: genes, transcriptos RNA y proteínas virales
- Figura 1.6 Repeticiones terminales (LTRs) de la forma proviral de VLB y las secuencias regulatorias propias del LTR 5' y LTR 3'
- Figura 1.7 Patogenia de VLB
- Figura 4.1. Representación gráfica del ensayo de formación/inhibición de sincicios en ausencia/presencia de anticuerpos
- Figura 4.2 Ensayo Clearance VLB con tratamiento secado spray en calostro
- Figura 4.3 Diagrama de flujo de una planta de secado Spray
- Figura 4.4 Ensayo Clearance VLB sin tratamiento secado spray en calostro
- Figura 5.1 Carga proviral en sangre y calostro de las madres en estudio
- Figura 5.2 Carga proviral de las vacas en distintas categorías de calostros con provirus detectable y no detectable por nPCR (a) y por PCR en tiempo real (b)
- Figura 5.3 Título de anticuerpos por Elisa p24 y ELISA VC, en la sangre de las madres, calostro y sangre de los terneros
- Figura 5.4 Correlaciones. Spearman test
- Figura 5.5 Distribución de anticuerpos VC en calostro pertenecientes a las madres en estudio
- Figura 5.6 Distribución de anticuerpos p24 en calostro pertenecientes a las madres en estudio
- Figura 5.7 Título de Anticuerpos VC en calostro, carga proviral de la madre (a) y del calostro (b)
- Figura 5.8 Ensayos de co-cultivo de las líneas efectoras e indicadoras y sus correspondientes combinaciones
- Figura 5.9 Observación de sincicios en co-cultivos de células FLK y CC81 en

presencia de a-sueros de animales Infectados (Positivos) y b- No Infectados (Negativos)

Figura 5.10 Serología (Elisa VC) de los corderos inoculados con calostros sometidos a tratamiento Secado spray

Figura 5.11 Serología (Elisa VC) de los corderos inoculados con calostros sin el tratamiento Secado spray.

Abreviaciones y Símbolos

ADN	Acido desoxirribonucleico
AL	aleucémico
AP-1	factor activador uno
AP-4	factor activador cuatro
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BVDV 1 a	Virus de la diarrea bovina serotipo 1a (bovine viral diarrhea virus serotype 1a)
BLV	Virus de la Leucosis Bovina (bovine leukemia virus)
BRV	Rotavirus bovino (bovine rotavirus)
B/T	relación linfocitos T/B
CC81	línea de células fibroblásticas de riñón felino transformadas con el virus del sarcoma murino
°C	grados Celsius
CD4 ⁺	linfocito T CD4 ⁺
CD8 ⁺	linfocito T CD8 ⁺
cel.	células
células B	linfocitos B
CPV	carga proviral
col.	colaboradores
com.per.	comunicación personal
CREB 1	factor de transcripción uno (Activating Transcription Factor 1)
CREB 2	factor de transcripción cuatro (ATF4 Activating Transcription Factor 4)
CT	umbral del ciclo (cycle treshold)
DNAsa	desoxirribonucleasa/s
DO	densidad óptica
18 S	coeficiente de sedimentación de la subunidad menor ribosomal
ELISA	enzima inmuno ensayo (Enzyme linked immunosorbent assay)
env	envoltura viral (envelope)
FLK	Células de riñón fetal ovino (Fetal Lamb Kidney cells)
FLK-VLB	FLK infectadas persistentemente con el VLB
g	unidad la aceleración de la gravedad
G4	RNA mensajero que codifica proteína viral p11

gag	gen que codifica para la capsida (group-associated antigen)
γ/δ	gamma/delta
gp 30	glicoproteína de transmembrana
gp 51	glicoproteína de la envoltura viral
°C	grado/s centígrados
HeLa	células de carcinoma de cuello uterino humano (Henrietta Lacks)
h	hora/s
Hepes	solución tampón 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HTLV	virus linfotrópico de células T Humanas (Human T-cell lymphotropic virus)
ID	identificación
IDGA	inmunodifusión en gel de agar
ICTV	Comité Internacional sobre taxonomía de virus (International Committee on Taxonomy of Viruses)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IN	integrasa
IFN- γ	interferón gamma
IRES	sitio interno de entrada al ribosoma (internal ribosome entry site)
kb	Kilopares de bases
log.	Logaritmo
LP	Linfocitosis persistente
LTR	repetición terminal larga (Long terminal repeats)
LBE	Leucosis bovina enzoótica
Max.	Máximo
μ l	microlitro/s
ml	mililitro/s
min	minuto/s
miR	promotor RNA (RNA polymerase III promoters)
MEM-D	medio de cultivo D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
MEM-E	medio de cultivo MEM-E (Minimum Essential Medium Eagle)
N	número total de muestras
n.º	número/s
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activas) (nuclear factor kB)
nm	nanómetro/s

nPCR	PCR anidada (nested PCR)
nPCR tax	PCR anidada del gen tax
OIE	Organización mundial de sanidad animal (Office international des épizooties)
p	nivel de significancia
p12	proteína de la nucleocápside
p14	proteasa
p15	proteína de la matriz
p24	proteína de la cápside
pb	pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfato (Phosphate buffered salt)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
pol	polimerasa (polymerase)
pool	palabra inglesa (verbo transitivo) por juntar, agrupar
pos.	positivo
neg.	negativo
pro	gen que codifican para proteasa viral
Px	región genómica Px
R	ratio
R	sistema estadístico R
r	coeficiente de correlación
R3	RNA mensajero tres
react.	reactividad
rex	gen regulatorio
RNAsa	ribonucleasa/s
RO	riñón ovino
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute medium)
RT	enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa
RT PCR	PCR en tiempo real
STLV	Virus de la leucemia de células T de los simios (Simian-T-lymphotropic viruses)
SNE	suero normal equino
T	tiempo
T25	frasco para cultivo celular 25 cm ²
tax	gen regulatorio

TA	temperatura ambiente
TAE	solución tampón tris-acetato-EDTA
TATA box	caja TATA (Goldberg-Hogness box)
TAX	gen del retrovirus involucrado en la transactivación (transactivator from the X-gene region)
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidina
TxRE	Elemento de respuesta a Tax
U3-R- U5	segmento de la región del LTR
USD	Dólar/es estadounidense
UI	Unidad/es internacional
UV	ultravioleta
V	Volts
VC	Virus completo
Vero	células epiteliales del riñón de un mono verde africano
VLB	virus de la Leucosis bovina
VLB-pol	gen pol del VLB
VRA	valor de recupero
WAHIS	Sistema Mundial de Información de Salud Animal (World Animal Health Information System)
Zona R	región R del LTR

1. Introducción

1.1. Epidemiología e Impacto de la infección con el virus de la leucosis bovina

El virus de la leucosis bovina (VLB) es el agente causal de la leucosis bovina enzoótica (LBE), una enfermedad neoplásica frecuente del ganado vacuno. El VLB infecta naturalmente a los bovinos (Bovidae): *Bos Taurus* (bovino doméstico), *Bos indicus* (cebú) y *Bubalus bubalis* (búfalo de agua) y puede ser transmitido experimentalmente a ovinos, (Ferrer y col., 1981; Florins y col., 2008; Kenyon y col., 1982; Poli y col., 1982, Straub 1983b) caprinos (Kettmann y col., 1984; Mammerickx y col., 1987) y conejos (Onuma y col., 1990).

Las primeras evidencias de neoplasias provocadas por VLB datan de Alemania en el año 1871, en un bovino con bazo agrandado (Leisering, 1871). En 1874 se describe la LBE como una entidad clínica definida (Bollinger, 1874). En 1969, Miller y colaboradores, fueron los primeros en observar y reportar la presencia de partículas virales en cultivos linfocitarios provenientes de animales infectados con linfocitosis persistente (LP). Investigaciones posteriores permitieron identificar y caracterizar el virus, designando al VLB como al agente causal asociado a la LBE.

En los años posteriores a la Segunda Guerra Mundial se incrementaron los casos de enfermedad con tumores en Alemania y otros países del este de Europa, lo que originó la profundización de las investigaciones en esta zona. La exportación de bovinos infectados desde las costas del Mar Báltico hacia Estados Unidos, provocó la llegada de la infección al continente americano, expandiéndose por Estados Unidos y Canadá, principalmente en el ganado lechero, donde actualmente se encuentra muy extendida (Bauermann y col, 2017). Los demás países de América probablemente la adquirieron a través de importaciones para mejorar la calidad genética de los rodeos (Baruta y col., 2011; Johnson y Kaneene, 1992).

Actualmente, según la prevalencia de animales infectados con VLB a nivel internacional, se detectan 2 subconjuntos de países. En un extremo, países en los cuales la infección es endémica y se caracteriza como clínica en el 5-10 % de animales, que mueren con tumores linfoides. En este grupo, con niveles de prevalencia del 30 % o superior, se encuentran los países de América, Asia, África y Europa Oriental (WAHIS Interface, OIE. <http://web.oie.int/wahis/public.php>). En el otro extremo, países que han realizado intervenciones de control y han erradicado la infección o

muestran niveles de prevalencia muy bajos (entre 0,1 y 5 %), como los países de Europa Occidental. (OIE WAHIS Interface) (Figura 1). En Australia y Nueva Zelanda se iniciaron intentos similares a los realizados en Europa Occidental por erradicar la infección a mediados de los noventa, logrando que el ganado lechero de Australia sea libre desde 2012 y una baja prevalencia en ganado bovino de carne (Hayes y col., 1998).

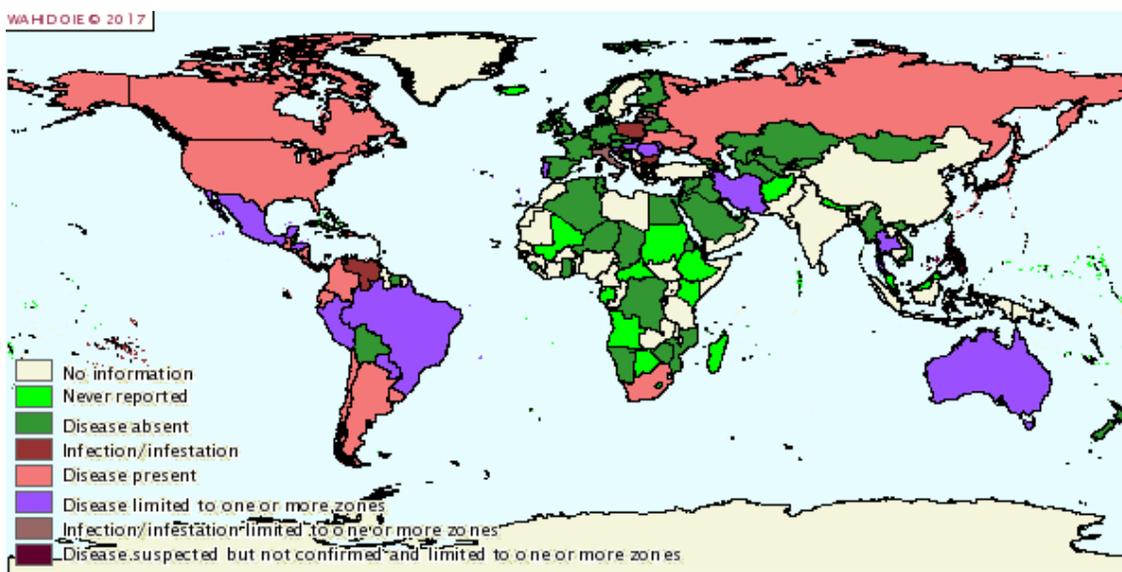
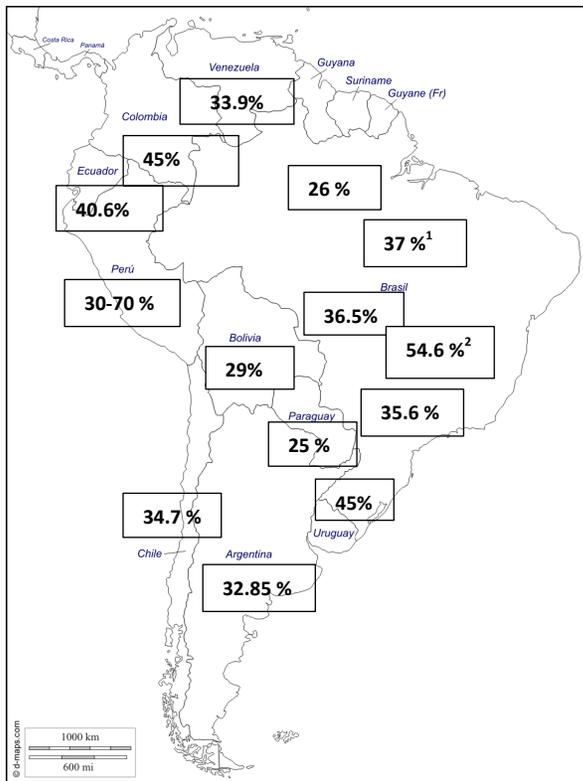


Figura 1.1 Situación mundial de la leucosis bovina enzoótica. Base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHIS Interface) <https://www.oie.int/wahis>

La leucosis bovina está ampliamente distribuida en toda Sudamérica, con alta prevalencia de seroreactores en los rodeos lecheros y ganado bajo condiciones de manejo intensivo (Figura 2). En ningún país de la región se implementan programas oficiales de control, así como no existen mecanismos de compensación por el saneamiento. Sin embargo, existen requerimientos específicos para la importación y exportación entre países, lo que provoca un impacto directo en la comercialización de animales en pie y subproductos como semen.



Argentina	Trono y col. 2001 Alejo y col. 2000 Maradei com. Per.
Bolivia	López y col. 2010
Brasil	1 Fernádes y col. 2009 2 Camargos y col. 2002 Molnár y col. 1999 Moraes y col. 1996 Andrade y col. 1991 Alencar Filho y col. 1979
Chile	Grau y Monti 2010
Colombia	Hernández-Herrera 2011
Ecuador	World Animal Health 2004
Paraguay	Rodriguez y col. 2010
Perú	Guinnet 2010 S.Ortiz com. per.
Uruguay	Rama y col. 2012 Núñez com. Per.
Venezuela	Nava y col. 2011

Figura 1.2 Prevalencia individual de seroreactores en Sudamérica.

En nuestro país más del 80 % de los establecimientos de tambo están infectados con altos niveles de prevalencia individual (Trono y col., 2001) con una endemidad de más del 80 % en las zonas de intensa producción (Gutiérrez y col., 2012). Los análisis más recientes de prevalencia individual en distintas edades (figura 1.3) en tambos de alta producción de la provincia de Santa Fe, área de Rafaela, en el período 2010-2016, muestran que existe una alta prevalencia en animales adultos, y una prevalencia individual de alrededor del 50 % en animales antes de la primer parición, lo que sugiere que el virus circula con una dinámica activa durante los primeros meses de vida (Merlini y col., 2016; Lomónaco y col., 2014).

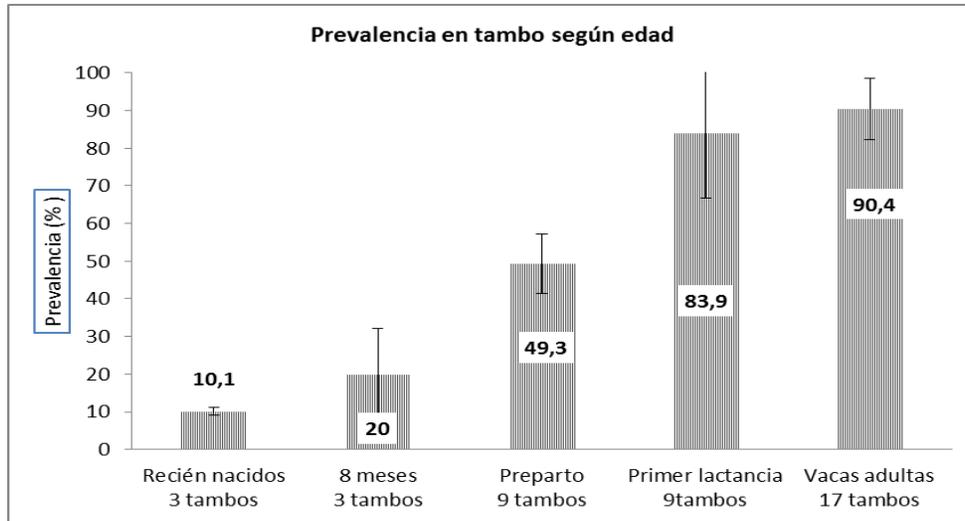


Figura 1.3 Prevalencia de animales infectados con virus de la leucosis bovina en tambos de la zona de Rafaela, provincia de Santa Fe. Datos 2010-2016, (establecimientos de 200-300 animales cada uno) obtenidos en el Instituto de Virología-CICVyA-INTA

No existe ningún sistema de prevención o tratamiento disponible hasta el momento. Entre los animales infectados, entre el 5 y 10 % muere cada año como consecuencia de lesiones neoplásicas del sistema linfático, lo que impacta negativamente en el sistema productivo lechero, provocando un lucro cesante de alrededor de 5.300 dólares por vaca muerta con linfosarcoma (Castellano y Goizueta, 2014). El impacto radica en la limitación que generan los ingresos no percibidos, que se componen básicamente de los siguientes 4 rubros: (1) Reposición del Animal: corresponde al costo económico en que incurre el empresario lechero por la reposición de la vaca en producción debido a su deceso con tumores, (2) Ternero no Nacido, considera el ingreso económico no percibido por la obtención potencial de la cría de la vaca muerta con tumores, (3) Leche no Producida: refiere al ingreso económico no percibido por la leche potencialmente producida por la vaca víctima de tumores y comercializada a la industria, y (4) Valor de Recupero del Animal (VRA), que corresponde al ingreso económico no percibido por la comercialización de la vaca con destino de carne al final de su vida útil productiva (Tabla 1.1).

Lucro cesante por animal (USD)	
1. Leche no producida	2940
2. Reposición post-muerte	1800
3. Ausencia de ingresos por comercialización en matadero al fin del ciclo de lactancia	520
4. Falta de nacimientos de nuevos terneros	120
Total	5380

Valores de referencia (promedio)	
Prevalencia individual	40 %
Mortalidad	5 %
Lactancias (n.º ciclos)	3,7
Producción de leche por ciclo (litros/año)	5000
Tasa de reposición	27 %

Tabla 1.1 Impacto económico estimado de la Leucosis bovina en Argentina debido a la muerte por tumores y valores de referencia.

En el caso de Argentina, tomando como referencia un valor promedio de prevalencia individual de 40 %, 5 % de mortalidad por linfosarcoma, y un rodeo lechero de aproximadamente 2,1 millones de cabezas, y expresando el valor en dólares estadounidenses con el propósito de homogeneizar la comparación a una moneda única, el valor total de beneficios sociales que el país deja de percibir a causa de la muerte por linfosarcomas asciende a 301 millones anuales. Existen otros beneficios que podrían devenir de las consecuencias indirectas de la extinción de la infección. En el eslabón primario de la cadena láctea, sería correcto suponer que en el mediano plazo, la reducción de la tasa de mortandad de parte del rodeo de bovinos para lácteos implicaría una mayor tasa de reproducción del rodeo total y por ende, de mayores niveles de producción de leche. En el eslabón secundario, la mayor cantidad de leche a ser captada por las usinas lácteas, ante niveles de consumo per cápita estables de productos lácteos en el mercado doméstico produciría un remanente que podría tener como destino el mercado externo, y que podría ser capitalizado con la comercialización de leche en polvo entera y descremada.

En ausencia de alternativas de intervención y políticas sanitarias de control, el aumento de la incidencia de infección en nuestro país ha sido notorio en las últimas décadas desde la primera descripción de linfosarcomas en 1973 (Ciprian y col., 1973) (tabla 1.2).

Año	Prevalencia	Fuente
1973	Primer hallazgo, linfosarcoma por VLB	Ciprian y col., 1973
1987	5 % rodeos lecheros infectados - 10-28 % animales infectados	Sanz y col., 1987
2001	80-86 % rodeos lecheros infectados - 25-32 % animales infectados	Trono y col., 2001 Alejo y col., 2000
2014	100 % rodeos lecheros infectados - 90 % animales infectados	Lomónaco y col., 2014

Tabla 1.2 Situación en Argentina en los últimos 40 años

1.2 El VLB: estructura, organización genética y patrón de expresión

El VLB pertenece al género *Deltaretrovirus* dentro de la familia Retroviridae, junto con el virus de células T humano (HTLV) y de los simios (STLV) (ICTV. <http://www.ictvonline.org/>), con quienes comparte características genéticas y algunos rasgos de patogenicidad (Aida y col., 2013; Lairmore, 2014). La partícula viral es envuelta, de simetría icosaédrica, y posee un tamaño que oscila entre 60 y 125 nm (Miller y col., 1969). Está conformada por una doble envoltura lipoproteica, originada en el proceso de gemación de la célula infectada. Sobre la envoltura se insertan la proteína principal de superficie gp51 y la proteína de transmembrana gp30 (Figura 4.b).

Las dos proteínas de superficie participan en forma activa en la infectividad y replicación viral (de Brogniez y col., 2016; Rizzo y col., 2016)(Tabla 1.3). La gp51, formada por 268 aminoácidos, es la proteína más abundante de la envoltura viral. Juega un rol importante en el ciclo viral y en la entrada a la célula (Callebaut y col., 1993; Johnston y col., 2000) y es el blanco de los anticuerpos neutralizantes (Johnston y col., 2000; Mamoun y col., 1990). Cuenta con 8 determinantes antigénicos identificados por anticuerpos monoclonales (sitios A al H) (Bruck y col., 1982). La mitad N-terminal contiene tres epítopos conformacionales, F, G y H (Bruck y col., 1984), que intervienen en la infectividad y la formación de sincicios (Bai y col., 2015; Callebaut y col., 1993; Portetelle y col., 1989;). La región C terminal contiene los epítopos lineales A, B, D y E (Bruck y col., 1982; Mamoun y col., 1990;). La región codificante de gp51 ha sido utilizada para los estudios filogenéticos que permitieron clasificar 8 genotipos de VLB (Camargos y col., 2002; Moratorio y col., 2010), a los que se agregó recientemente el genotipo 9 (Polat y col., 2016 y 2017; Rodríguez y col., 2009). La gp30 es una proteína de transmembrana de 214 aminoácidos que muestra características estructurales típicas de las proteínas de transmembrana de los Retrovirus de tipo C (Burny y col., 1985) y se transforma en el soporte que fija la gp51 a la envoltura viral, conformando así un complejo gp30/gp51, involucrado en el reconocimiento del virus por las células blanco (Tabla 1.3).

La cápside o core viral, incluye la proteína principal p24, la proteína de matriz p15, y la proteína de nucleocápside p12. La p24, moderadamente hidrofóbica, es la más importante del core del VLB. Está formada por 642 aminoácidos y presenta dos epitopes identificados por anticuerpos monoclonales (Burny y col., 1985).

Tanto las proteínas que conforman el complejo gp30/gp51 como la proteína estructural p24 son altamente inmunogénicas y capaces de generar una potente respuesta inmune en el hospedador infectado, (Gutiérrez y col., 2012 y 2009; Monti y col., 2005; Van der Maaten y Miller, 1990).

Dentro de la partícula se empaquetan además, las enzimas virales transcriptasa inversa (RT), proteasa (p14) e integrasa (IN), necesarias para la replicación viral. (Figura 1.4).

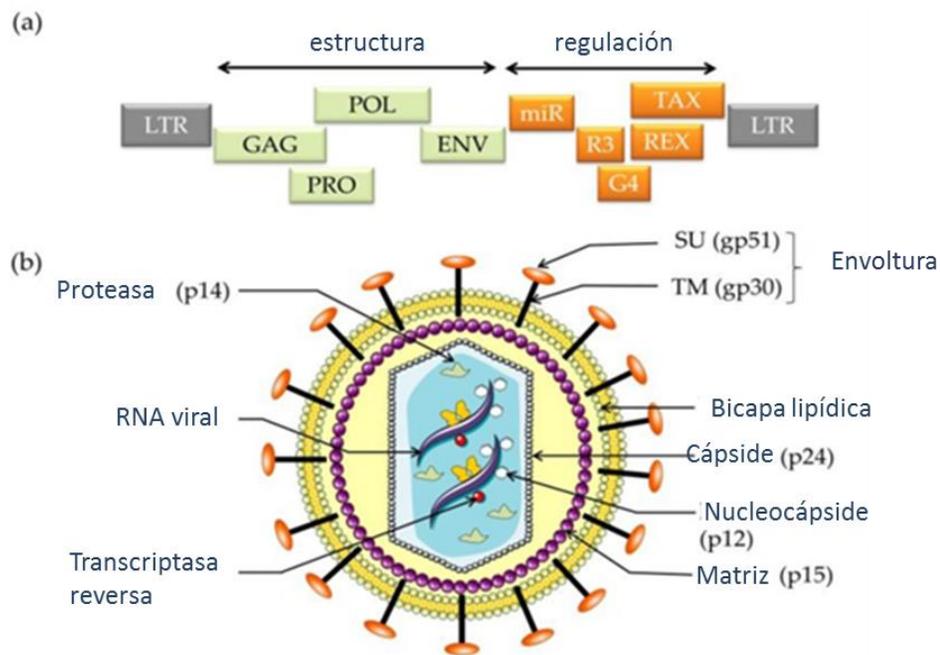


Figura 1.4 Estructura esquemática del genoma del virus de la leucosis bovina (a) y de la partícula viral (b). Adaptado de Barez y col., 2015

El genoma viral está formado por dos cadenas idénticas de ARN monocatenario de sentido positivo, no complementarias, que se replican a través de una forma intermedia de ADN bicatenario sintetizada mediante la enzima viral transcriptasa inversa. El ADN viral se inserta al azar en el genoma de la célula hospedadora, se denomina provirus, y consiste en 8714 nucleótidos (Sagata y col. 1985). Ambas cadenas de ARN están asociadas a la proteína estructural interna no glicosilada

de la nucleocápside (p12) y a varias copias de la enzima viral transcriptasa inversa (Gillet y col. 2007) (Fig. 4b).

El genoma proviral porta los genes estructurales clásicos retrovirales: *gag*, *pro*, *pol* y *env* que se requieren para un ciclo viral completo, generación, liberación del virión, entrada a la célula blanco, transcripción reversa e integración en el cromosoma de la célula huésped (Burny y col. 1980 y 1978). Estas regiones codifican para proteínas estructurales de la cápside (*gag*), proteasa viral (*pro*) transcriptasa reversa (*pol*) y glicoproteínas de la envoltura del virión (*env*), como puede verse en la figura 4.a donde también se esquematiza el patrón de transcripción y expresión de proteínas a partir del genoma viral.

Flanqueando los genes estructurales hay dos regiones idénticas a cada lado del genoma proviral, denominadas repeticiones terminales o LTR. En estas regiones se encuentran las señales regulatorias de la expresión viral así como secuencias de unión a factores de transcripción y otras proteínas celulares y virales (Figura 1.5). Las regiones LTR están organizadas en tres zonas llamadas U3-R-U5, en sentido 5' a 3'. En U3 se encuentra el promotor único o TATA box que dirige la transcripción de todos los genes virales. Ubicada a la izquierda del promotor viral, se encuentra una secuencia identificada como "enhancer" o "elemento de respuesta a tax" (TxRE) (Rosen y col., 1986; Willems y col., 1987). Esta región es reconocida específicamente por la proteína viral Tax y también es sitio de unión a factores de transcripción celulares que controlan la expresión de genes involucrados en la activación de la proliferación y maduración de células B como AP-1, AP-4, CREB1 y CREB2 (Adam y col. 1996; Katoh y col. 1989; Kettmann y col., 1982;) y NF- κ B (Brooks y col. 1995). En la zona R se encuentran el sitio de iniciación de transcripción, la señal de poliadenilación, el sitio de poliadenilación, un sitio IRES de entrada al ribosoma, el sitio dador de splicing para los genes estructurales, tax, rex y R3 y el sitio dador de splicing para el gen G4. También en esta región se describe un "elemento de respuesta a Rex", de actividad conformacional, que funciona a nivel post-transcripcional, como zona de unión a la proteína viral Rex, encargada de la regulación del fenómeno de splicing alternativo de los ARN mensajeros y procesamiento de los extremos terminales en 3' (Derse, 1987). Además, LTR de VLB contienen otras secuencias regulatorias de importancia en la interacción virus-hospedador, principalmente a nivel inmunomodulador y de activación de la transcripción (Xiao, 1998) (Figura 6). Aunque ambos LTR son idénticos, durante la transcripción del genoma de VLB, el LTR 5' tiene actividad de promotor y la adición de polyA ocurre en el LTR del extremo 3' (Derse, 1987).

Existe en el genoma proviral, una región complementaria denominada pX, entre el gen *env* y el LTR 3', que codifica para 4 proteínas con marcos de lectura superpuestos denominadas Tax, Rex, R3 y G4 (Figura 1.5 Tabla 1.3). Estas proteínas están involucradas en asociación con secuencias presentes en las LTR, en la regulación de la expresión viral a nivel transcripcional y post-transcripcional (Alexandersen y col., 1993; Kerkhofs y col., 1998). Asimismo, poseen efecto sobre la infectividad viral y la carga proviral (Willems y col. 1994, Florins y col., 2007 b) y también interactúan con la célula huésped (Sagata y col., 1984) Tax y G4 poseen además, potencial oncogénico, ya que se ha demostrado su capacidad de inmortalizar células en cultivos in vitro (Tanaka y col., 1990; Willems y col., 1990; Kerkhofs y col., 1998; Willems y col., 1992; Lefebvre y col., 2002), siempre en interacción con proteínas celulares.

Hace pocos años se describió en la zona pX una región localizada en el extremo 3' del gen *env* que expresa microRNA que mimetizan el oncomir de los linfocitos B (Kincaid, 2012) bajo el control de un promotor de RNA polimerasa III (*miR*) (figura 1.4) independientemente de Pol II. De modo similar a lo que sucede con HTLV-1, los microRNA del VLB se expresan en los linfosarcomas inducidos por el virus de forma natural y experimental, donde representan el 40 % de todos los microRNA (Rosewick y col., 2013), sugiriendo un rol importante en la transformación celular. Su función y actividad biológica se encuentran en estudio (Durkin y col, 2016). La presencia de esta región contradice el dogma que dice que los virus RNA no codifican microRNA para evitar el clivaje de sus genomas, aunque aún no está claro su rol en la replicación, persistencia y mantenimiento de la infección. (Gillet y col., 2016; Barez y col., 2015).

La iniciación de la síntesis de ARN a partir del genoma proviral involucra la activación del promotor en el LTR 5' y la supresión del promotor en el LTR 3' (Luciw y Leung, 1994). Procesos similares ocurren con la señal de poliadenilación, pero a la inversa. El ARN genómico transcrito sirve de templado para la expresión de ARN mensajeros (ARNm) precursores. Durante la replicación y expresión de proteínas del VLB intervienen al menos cuatro ARN mensajeros, productos del fenómeno de splicing post-transcripcional: los mensajeros *env*, *tax/rex*, R3 y G4 (Figura 4). A partir del transcripto primario de 8.5kb se expresan las proteínas de los genes *gag* y *pol*, y también se produce la progenie viral (ARN genómico) (Haas, 1992). El transcripto primario sufre fenómenos de splicing simple y doble y madura en dos ARNm subgenómicos, que son utilizados para la expresión del gen *env* y de los genes de regulación *tax* y *rex*, respectivamente (Alexandersen y col., 1993). Otros 2 mensajeros subgenómicos producto de splicing doble y simple

son los mensajeros de R3 y G4 (Alexandersen, 1993; Rovnak, 1999) (figura 1.4). Los productos traducidos a partir de cada RNA mensajero subgenómico puede observarse en la Figura 1.5.

Proteína viral	Principales funciones	Referencia
Gp51	Ingreso a la célula. Principal proteína inmunogénica junto con p24. Infectividad. Formación de sincicios	Rizzo y col, 2016; de Brogniez y col., 2016 Kettmann y col., 1994 Johnston ER y col., 2000 Callebaut I. y col., 1993 Mamoun R.Z. y col., 1990 Portetelle D. y col., 1989 Bai L y col., 2015 Bruck y col., 1982
Gp 30	Ingreso a la célula y responsable del proceso de fusión.	de Brogniez y col., 2016 Inabe K. y col., 1999 Johnston ER. y col., 2000
P24	Principal del core viral. Alta inmunogenicidad junto con gp51.	Burny y col., 1985a
Tax	Activador transcripcional de la expresión viral	Derse, 1987 Willems y col., 1987 Katoch y col., 1989
	Potencial oncogénico	Willems y col., 1990
	Activación de NF-kappa B camino (NF-kB)	Szynal y col., 2003 Klener y col., 2006
Rex	Salida del núcleo del RNAm. Regula el splicing alternativo	Felber y col., 1989
G4	Mantenimiento de la carga viral	Willems y col., 1994 Florins y col., 2007a
	Potencial oncogénico	Kerkhofs y col., 1998 Lefebvre y col., 2002
R3	Mantenimiento de la carga viral	Willems y col., 1994 Florins y col., 2007a

Tabla 1.3 Función de las principales proteínas virales.

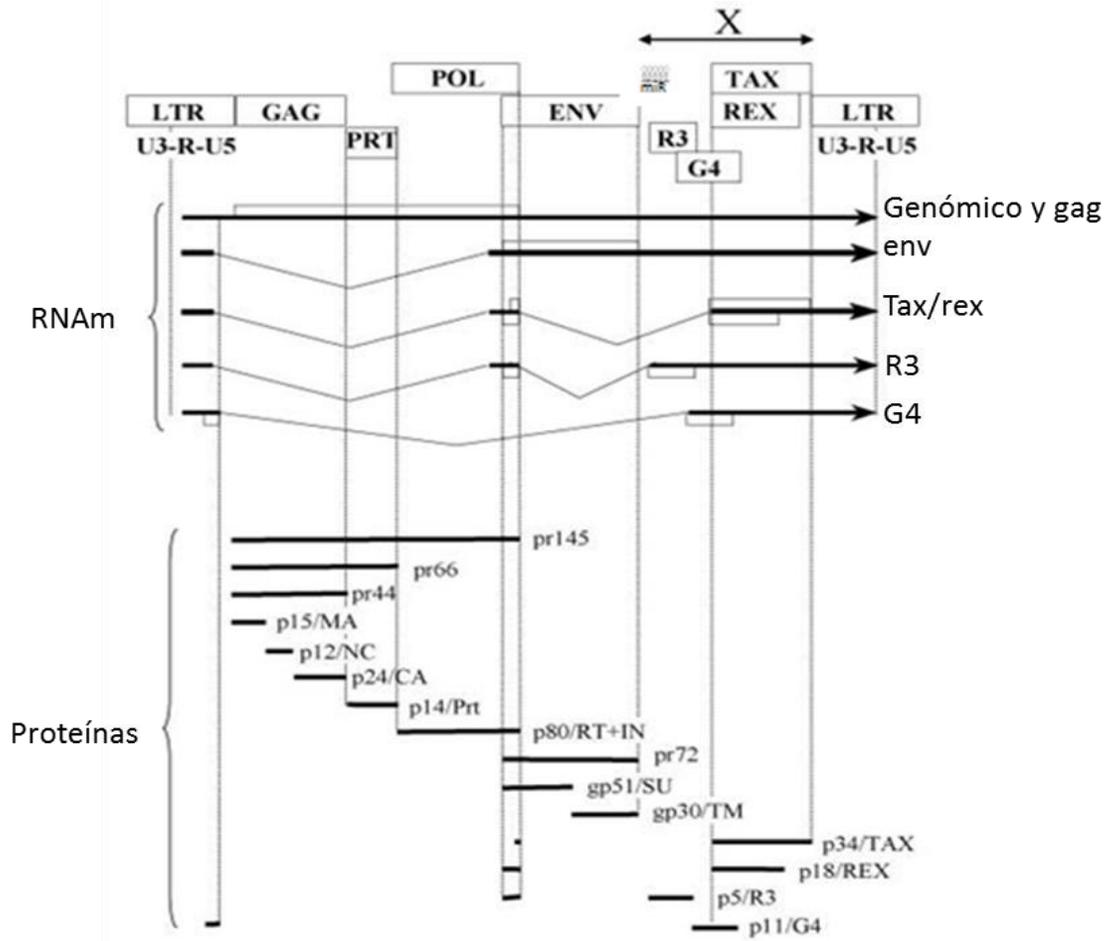


Figura 1.5 Estructura del provirus VLB: genes, transcritos RNA y proteínas virales. Adaptado de Gillet y col., 2007

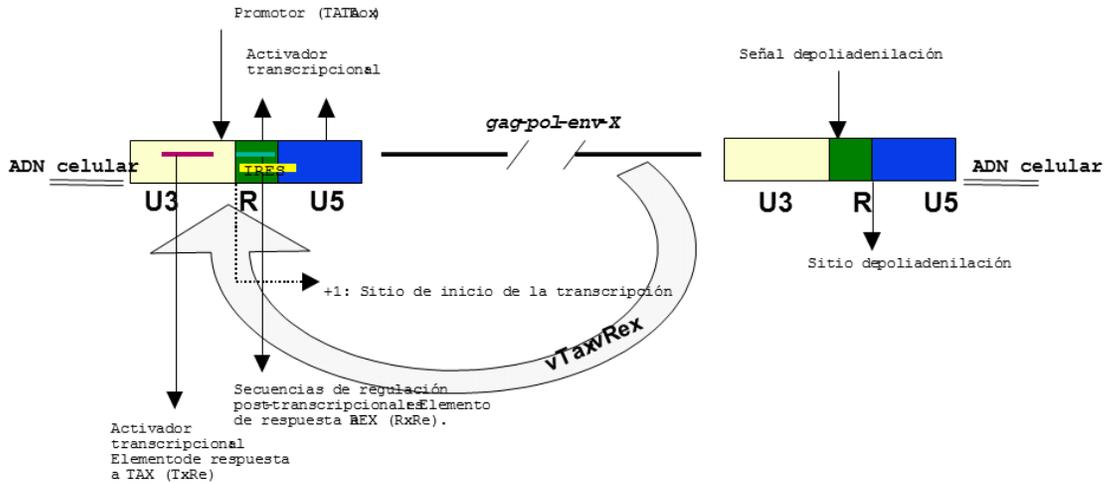


Figura 1.6 Repeticiones terminales (*LTRs*) de la forma proviral de VLB y las secuencias regulatorias propias del *LTR 5'* y *LTR 3'*. Modificado de *The Retroviridae, 1994, Plenum, p19-105*.

1.3. Patogenia y carga proviral

El VLB es un retrovirus oncogénico con tropismo preferencial por los linfocitos B maduros, aunque se ha demostrado la presencia de ADN proviral en otras células blancas circulantes, como linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y γ/δ , monocitos y granulocitos de bovinos (Stott y col., 1991; Schwartz y col., 1994; Mirsky y col., 1996; Wu y col., 1996; Williams y col., 1988; Panei y col., 2013). Durante la primera infección, luego del ingreso al hospedador susceptible por contacto con sangre, secreciones o excreciones de un animal infectado, el VLB replica activamente e infecta una variada población de células blancas. El aumento de los linfocitos T CD4⁺ se correlaciona con el aumento de leucocitos totales, título viral y carga proviral esto regula negativamente la producción de IFN- γ lo cual se puede caracterizar como un mecanismo de supresión inmune que facilita la infección (Suzuki y col., 2013). Este primer periodo o ciclo replicativo, se caracteriza por la detección de virus en sangre durante las primeras semanas post-infección y por la presencia de un pico de carga proviral que perdura entre 3 y 8 meses en los bovinos infectados (Gillet y col., 2013). Después de este primer ciclo replicativo, la infección se mantiene por división mitótica de los clones infectados subsistentes, que poseen uno a cinco copias de provirus integrados (Avidan, 2002; Debac y col., 2004; Kettmann y col., 1976; Kettman y col., 1982; Moules y col., 2005).

La persistencia del VLB está caracterizada por un recambio celular muy dinámico que es inusual en otras infecciones crónicas. La infección se mantiene por división mitótica de los clones infectados, la

mayoría de los cuales son previos a la aparición de la respuesta inmune. Durante la primo-infección o ciclo replicativo, la integración se observa en regiones transcripcionalmente activas del genoma. Sin embargo, el 97 % de los clones es depletado en presencia de la respuesta inmune. Dos fuerzas opuestas operan durante la infección primaria: la integración inicial en el genoma y la selección negativa del huésped que desfavorece la localización del provirus cerca de las regiones con actividad transcripcional (Barez y col., 2015).

La mayoría de los animales infectados permanece en estado de aleucémico (AL, 70 %), con menos de 1 % de los linfocitos infectados con VLB (revisado en Hopkins y Di Giacomo, 1997) y sin alteraciones en el recuento linfocitario. La expresión viral in vivo se encuentra silenciada, por lo que no es posible detectar evidencia de partículas virales y/o proteínas circulantes. La única manera de reconocer la infección es mediante la evaluación serológica que detecta anticuerpos específicos contra el virus, producto de la respuesta inmune humoral persistente y/o por la detección de provirus circulante (Burny y col., 1988; Kettmann y col., 1994). Estos animales padecen la infección en forma inaparente y pueden permanecer en este estado de por vida. La carga proviral (número de copias de provirus integrado en células) es extremadamente baja o aún indetectable, lo que genera un bajo nivel de riesgo de transmisión (Juliarena y col., 2016; Lomónaco, Sowul y col., 2016).

El 30 % de los bovinos infectados presenta una proliferación policlonal de linfocitos B o *Linfocitosis Persistente*. La linfocitosis rara vez aparece antes de los dos años de vida del animal. Estos animales no manifiestan síntomas clínicos, pero a nivel hematológico se puede observar un recuento elevado de glóbulos blancos circulantes, como consecuencia de un aumento de células B. El número de linfocitos T también aumenta, pero en menor medida (Williams y col., 1988) y se detecta una inversión del ratio B/T (Burny, 1988; Ferrer y col., 1978, Ferrer y col., 1979; Kenyon, 1977; Lewin y col., 1988). Está descrito que alrededor del 25-50 % de los linfocitos circulantes poseen el virus integrado (revisado en Hopkins y Di Giacomo, 1997), por lo cual los animales en esta condición son los que poseen mayor capacidad de transmisión (Lomónaco, Sowul y col., 2016). La linfocitosis persistente se caracteriza por una disminución de la muerte celular y un reducido nivel de la proliferación (Debacq y col., 2003). La carga proviral es significativamente mayor en este caso que en el estado aleucémico (Aida y col., 2013; Álvarez y col., 2013). Lo más frecuente es que esta condición permanezca estable por largos periodos y persista de por vida a partir de su aparición, convirtiendo a los animales en propagadores asintomáticos crónicos (Ferrer y col., 1978; Willems y col., 2000). Sin embargo, también se ha descrito su desaparición abrupta, con

restauración de valores normales del recuento linfocitario (Burny y col., 1988; Ferrer y col., 1978; Toma y col., 1990; Willems y col., 2000).

El 1-10 % de los bovinos infectados desarrollan linfomas de células B en linfonódulos o linfosarcomas en distintos órganos después de un periodo de latencia que en general no es menor a los 3 años (Florins y col. 2008; Schwartz y col. 1994). Se desconocen los mecanismos involucrados en la génesis tumoral debido a que el genoma viral no codifica para un oncogén y la integración del provirus sucede al azar en el genoma de la célula huésped (Gillet y col. 2013; Miyasaka y col., 2015). En consecuencia, el efecto de tumorigénesis no es resultado de mecanismos de mutagénesis insercional, de la activación de la expresión de un oncogén celular próximo y/o de la desregulación directa de genes involucrados en el ciclo celular (Altanerova y col., 1989; Schwartz y col., 1994). La transformación maligna conduce a linfomas con una proliferación de tipo monoclonal (Aida y col., 2013).

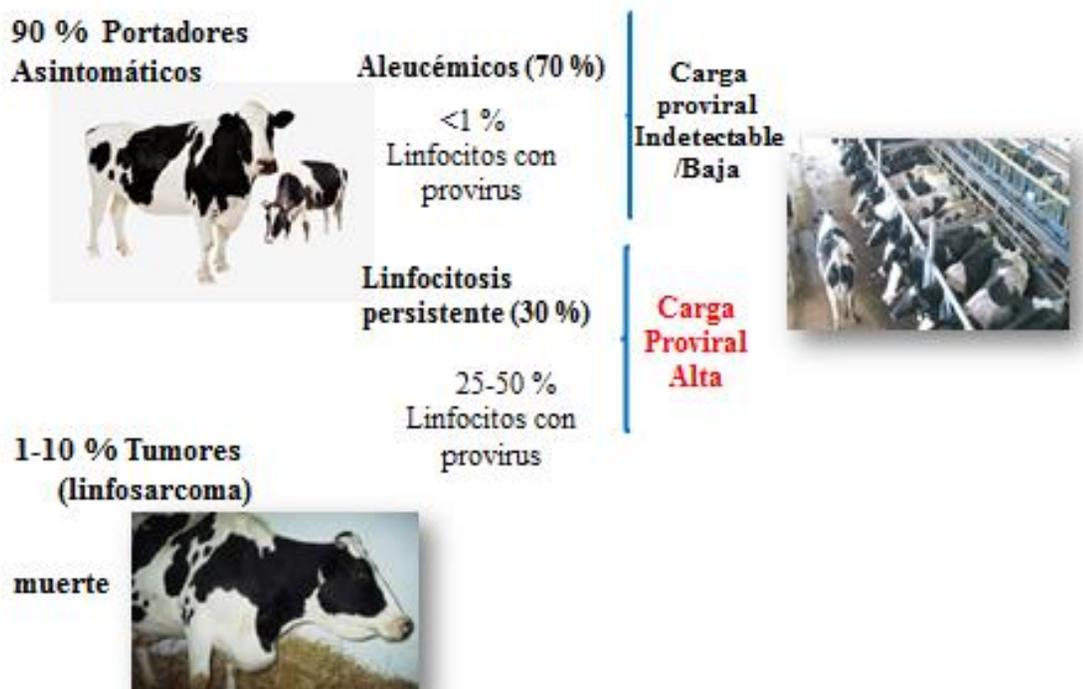


Fig.1.7 Patogenia de VLB.

Los estudios realizados por nuestro equipo de trabajo sobre la dinámica de la infección muestran que la carga proviral permanece estable en las infecciones de campo, donde se observa alrededor del 40 % de animales con altos niveles de provirus circulante (Gutiérrez y col., 2011). Asimismo, las infecciones perinatales progresan indefectiblemente y en pocos meses hacia la alta carga, sugiriendo que la respuesta del hospedador no es capaz de regular activamente la progresión de la infección cuando ésta sucede en edad temprana (Gutiérrez y col., 2011).

1.4. Persistencia viral y transmisión: Rol del calostro y de la leche.

La infección con VLB es persistente a pesar de la presencia constante de anticuerpos y de una potente respuesta celular específica (Debacq y col., 2004; Florins y col., 2007a; Gillet y col. 2007; Kabeya y col., 2001). El genoma viral se encuentra altamente conservado, con menos del 6 % de variabilidad en las regiones de reconocimiento celular e inmunogénicas (Dube y col., 2000; Gillet y col., 2007; Licursi y col., 2003; Moratorio y col., 2010; Polat y col., 2016; Rodríguez y col., 2009;) lo que se traduce en la ausencia de variantes virales genéticas o antigénicas.

La hipótesis actual sobre la persistencia del virus en el hospedador considera que la infección se perpetúa debido al fenómeno de mitosis linfocítica (Florins y col., 2007a; Wattel y col. 1996) Una pequeña población de células infectadas ofrecería al organismo el estímulo antigénico por expresión viral activa y estimulación del sistema inmune celular y humoral, mientras el resto de los clones infectados permanecerían silentes (Gillet y col., 2007). Las razones de causa y equilibrio de este fenómeno se desconocen hasta el momento, y genera un desafío a la hora del diseño eficaz de vacunas. La protección conferida por distintas vacunas ensayadas es de corta duración y no resulta eficaz (Cherney y col., 1996; Fukuyama y col., 1993; Gutiérrez y col., 2014a; Kono y col., 1986; Von Beust y col., 1999). Por estas razones las alternativas de profilaxis deberían enfocarse en la formación de rodeos de baja carga proviral, donde la transmisión se encuentre disminuida y el rodeo progrese lentamente hacia la extinción de la infección. Entre estas alternativas, se pueden considerar tres grandes opciones: la selección de animales con genotipos compatibles con una infección de baja carga proviral (Juliarena y col., 2016), el uso de una estrategia de análisis y manejo selectivo de rodeo donde se seleccionen los animales de baja carga proviral natural (Gutiérrez y col., 2011), y/o el uso de una cepa atenuada que provoque la baja carga proviral (Gutiérrez y col., 2014a; Gutiérrez y col., 2015b).

Si bien hay reportes que describen la disfunción inmune en los animales infectados (Blagitz y col., 2017; Della Libera y col., 2015; Florins y col., 2007a ; Sousa y col., 2012;) así como la merma en producción de leche (Barrios y col., 2014; Erskine y col., 2012; Ott y col., 2003), esta información pareciera contrastar con la realidad del sector primario, donde la infección es de alta endemicidad y se presenta en vacas de alta producción, sin manifestaciones indirectas de alteraciones en la respuesta a otros patógenos.

La transmisión del VLB ocurre por contacto con sangre, secreciones y/o excreciones contaminadas con células infectadas, mayoritariamente linfocitos B maduros (Bech-Nielsen y col., 1978; Ferrer y Diglio, 1976; Piper y col., 1975). Está demostrado que menos del 20 % de los terneros nacidos de vacas infectadas se infectan *in-útero*, por transmisión intra-placentaria (Ferrer y col., 1975; Piper y col., 1979). Actualmente, la incidencia de la infección durante la edad temprana, y la observación de que alrededor del 50 % de las vaquillonas preparto ya se encuentran infectadas, aún antes de ingresar al sistema de lactancia, cuando se reúnen con el rodeo adulto con altos niveles de infección, permite suponer que la transmisión por ingestión de células de leche y calostro de madres infectadas, podría tener un papel importante (Lomónaco y col., 2014; Thurmond y col., 1983). Teniendo en cuenta este concepto, la transmisión pre-lactancia podría ser controlada si la estrategia de prevención se enfoca en el manejo preventivo de las etapas de calostrado y crianza, además del clásico control de transferencia de sangre en distintos procedimientos productivos, sugerido por los programas de control.

El rol de la leche y calostro en la transmisión del VLB por vía natural no es claro y ha sido sujeto de múltiples estudios y variadas especulaciones. Según los primeros reportes que refieren a este tema, si la transmisión por vía oral ocurre, sería menos frecuente que la transmisión por contacto (Ferrer, Piper 1981b y 1978). Varios autores, incluyendo nuestro grupo de trabajo, describen la presencia de VLB proviral y de virus infeccioso en leche y calostro en la mayoría de las vacas sero-positivas (Burny y col., 1978; Ferrer y col., 1981; Straub, 1983a, Gutiérrez y col., 2015c). Sin embargo, se desconoce si para evitar la infección se debe recomendar o no el suministro a los terneros, en virtud de que se ha reportado su capacidad potencial de protección (Ferrer y Piper, 1981; Lassauzet y col., 1989; Nagy y col., 2007) pero también de infección. Se ha demostrado el potencial infeccioso de ambas secreciones en ensayos experimentales de ovinos y bovinos por consumo oral, pero en condiciones extremas de dosis infecciosa y de susceptibilidad del hospedador, que no representan la situación natural de las secreciones y/o las características del ternero de tambo (Kanno y col., 2014; Meas y col., 2002; Miller y col., 1985; Van Der Maaten y col., 1981).

Existen reportes que intentan relacionar la infección con VLB por vía oral, en terneros recién nacidos, con el número de células infectadas y con la presencia de anticuerpos calostrales (Ferrer y Piper, 1981a, Ferrer y col., 1981b; Van der Maaten y Miller, 1978; Van Der Maaten y col., 1981). Si bien estos experimentos muestran evidencia sobre la infección en la edad temprana y también sobre la capacidad protectora natural de los anticuerpos pasivos, no enfocan sobre la cantidad de anticuerpos y virus/provirus en leche/calostro de animales infectados naturalmente y su relación con la presencia de anticuerpos/provirus en sus terneros y/o en su leche/calostro.

Nuestros estudios muestran una prevalencia de alrededor del 50 % en animales de 20-27 meses de edad, antes del primer parto y antes del contacto con animales adultos infectados (Merlini y col., 2016). Considerando que en nuestros rodeos lecheros alrededor del 8-10 % de los terneros recién nacidos presentan infección perinatal (Lomónaco y col., 2014), interpretamos que el aumento de la prevalencia durante los primeros 2 años de vida sería consecuencia de un contagio activo. Las nuevas infecciones podrían establecerse (1) por consumo de calostro, (2) por contacto con los animales nacidos infectados y/o (3) por consumo de leche durante el período de cría.

Los terneros de tambo recién nacidos calostran naturalmente al pie de su propia madre, con la cual conviven durante 48-72h. Durante esta etapa obtienen inmunidad pasiva. En este proceso también pueden recibir provirus integrado en las células del calostro y/o virus libre de células que se encuentre presente en esta secreción. (Gutiérrez y col, 2014; Lomónaco y col, 2014b). En este contexto, el conocimiento de la situación natural resulta importante a la hora de implementar un plan de control que incluya el asesoramiento sobre las mejores prácticas. Teniendo en cuenta el manejo del tambo en nuestro país, se podrían introducir estrategias válidas para disminuir la transmisión de la infección desde la edad temprana. Esta tesis doctoral permitió obtener información sobre el calostro de vacas infectadas y su relación con la infección sistémica y con el ternero recién nacido. Asimismo, se indagó la capacidad de inactivación viral del tratamiento de secado spray del calostro, con el fin de proponer una alternativa válida para la formulación de sustituto y evitar así, el contagio a través del consumo oral durante el proceso de calostrado.

2. Hipótesis

La relación entre la capacidad neutralizante e infectiva del calostro es heterogénea y particular de cada tríada calostro/madre/ternero, lo que provocaría distintas situaciones resultantes dependientes de esta relación.

3. Objetivos

General

Conocer la relación de virus/provirus/anticuerpos en la tríada calostro-madre-ternero y analizar sus posibles implicancias y efectos en la capacidad infectiva/protectiva del calostrado natural.

Objetivos particulares

3.1 Conocer la relación entre carga proviral en sangre de la madre y calostro.

3.2 Conocer la relación entre cantidad de anticuerpos en calostro, cantidad de anticuerpos pasivos en el ternero y carga proviral en calostro.

3.3 Validación de la inactivación de VLB durante el proceso de secado spray en calostro.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales y Muestras

Se trabajó con un establecimiento comercial de producción lechera ubicado en la ciudad de San Andrés de Giles, Provincia de Buenos Aires, que posee animales de la raza Holando Argentino. Este establecimiento contaba con alrededor de 300 vacas en ordeño. Se trabajó dentro de la rutina productiva normal. Después del nacimiento, los terneros fueron calostrados por su propia madre y trasladados a la zona de crianza, donde se ubicaron en estacas individuales, de 48-72 h post-parto. Durante el período de crianza artificial se mantuvieron en un sector denominado guachera, con consumo de leche fresca del propio tambo y alimento balanceado iniciador durante 60 días, cuando fueron trasladados a un piquete de recría. El establecimiento fue seleccionado porque presentaba la infección con VLB de modo endémico según datos preliminares. Al inicio del estudio la prevalencia individual de anticuerpos en el rodeo era del 91,5 % en vacas adultas.

El número de muestras (Tabla 4.1) se calculó según la metodología de muestreo simple aleatorio en base a una prevalencia esperada de infección en madres de 60 % o superior, 8 % o más de infección perinatal y 40 % o más de infecciones de alta carga proviral, según los datos históricos obtenidos en nuestro laboratorio (Gutiérrez y col., 2011; Álvarez y col., 2011). El nivel de confianza utilizado fue del 90 %. Se utilizó el programa R, disponible en <http://www.r-project.org/>

Tipo de análisis	Madres	Calostro	Ternero
Anticuerpos	23	23	16
Carga proviral	12	12	20

Tabla 4.1- Número mínimo de muestras a analizar

Se tomaron 28 muestras de la tríada sangre madre/calostro/sangre ternero en forma simultánea hasta 12h post-parto. Todas las muestras fueron colectadas durante un período de 30 días consecutivos, por lo que se trató de casi todas las pariciones ocurridas durante 1 mes en el establecimiento en estudio, donde los nacimientos son continuos.

Las muestras de sangre entera fueron tomadas por punción yugular en jeringas estériles con anticoagulante heparina. Las muestras de calostro fueron tomadas por extracción manual en pool de los cuatro cuartos. Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio refrigeradas el mismo día de la extracción. Una fracción fue centrifugada a 4000 x g durante 15 min a 4 °C para obtención de

plasma, y otra fracción fue congelada a -20 °C para extracción posterior de ADN genómico total. El plasma fue congelado a -20 °C hasta la realización de los ensayos de serología.

Una fracción de 50 ml de calostro fresco fue centrifugada a 4000 x g durante 15 min a 4 °C. Se retiró manualmente con espátula la capa de grasa superior y se cosechó con pipeta el suero de calostro. El pellet celular se sometió 2 veces al lavado con PBS recuperando las células por centrifugado a 4000 x g durante 15 min a 4 °C. El pellet se resuspendió en 500ul de PBS 1X y se congeló a -20 °C, junto a una alícuota de suero de calostro.

4.2. Extracción de ADN genómico total

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de 200 µl de sangre entera y 200 µl de pellet de calostro resuspendido utilizando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche) según las recomendaciones del fabricante.

La concentración de ADN (A 260 nm) y la presencia de proteínas y otros contaminantes (A260/A280) fue analizada por espectrofotometría en un equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Como controles de extracción se utilizaron muestras de sangre entera de un bovino infectado con VLB y un bovino no infectado; estas mismas muestras se utilizaron como controles de amplificación de todas las reacciones de PCR descritas en este trabajo.

4.3. Cuantificación relativa de la carga proviral: PCR en tiempo real

Se cuantificó la carga proviral relativa en sangre entera y calostro por PCR en tiempo real según el protocolo reportado por Gutiérrez y col. (2011). Se amplificó y cuantificó un fragmento del genoma proviral de VLB perteneciente a la región denominada pol, utilizando la tecnología SYBR Green y los oligonucleótidos reportados en Lew y col. (2004).

Se amplificó un fragmento del gen constitutivo bovino que codifica para la unidad 18S de RNA ribosomal para relativizar la calidad del ADN de todas las muestras utilizadas como templado. El calibrador de la reacción fue construido con células de la línea FLK (células de riñón fetal ovino

infectadas en forma persistente con VLB) preparadas en una concentración de 1 % en glóbulos blancos de un bovino no infectado.

La cuantificación relativa se realizó teniendo en cuenta el CT obtenido por el calibrador y su relación con el CT obtenido por cada muestra, en ambas reacciones de PCR, VLB-pol y 18S, utilizando la ecuación descrita por Pfaffl y col. en 2001, donde también interviene la eficiencia de las 2 reacciones. Los resultados se expresaron como ratio (R) en referencia al calibrador o control FLK-VLB 1 % (RATIO=1), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{RATIO} = \frac{e_{\text{BLV-pol}}^{(\Delta\text{Ct BLV-pol})}}{e_{18\text{S}}^{(\Delta\text{Ct 18S})}}$$

$$\Delta\text{Ct BLV-pol} = \text{Ct}_{\text{BLV-pol control de amplificación}} - \text{Ct}_{\text{BLV-pol muestra}}$$

$$\Delta\text{Ct 18S} = \text{Ct}_{18\text{s control de amplificación}} - \text{Ct}_{18\text{s muestra}}$$

$$e_{\text{BLV-pol}} = \text{Eficiencia de BLV-pol} = \mathbf{2.06}$$

$$e_{18\text{S}} = \text{Eficiencia de 18S} = \mathbf{1.95}$$

Según nuestro propio criterio, y debido a que el calibrador fue construido asumiendo que un animal en fase aleucémica posee siempre una concentración de células infectadas en sangre menor al 1 %, un ratio mayor/igual a 1 (calibrador) fue considerado como Carga proviral *Alta*. En cambio, un R menor a 1 fue considerado como carga proviral *Baja* y correspondería a animales en fase aleucémica, según fue reportado por Hopkins y col., (1997). A la vez, se declaró con carga proviral *Indetectable* a aquellas muestras a las cuales el equipo no asigna valor de CT en la reacción de amplificación específica de VLBpol.

En cada reacción se amplificaron en forma paralela el gen pol de VLB y el gen constitutivo 18S por duplicado en un volumen final de 25 μl . El ADN templado fue diluido en agua libre de RNAsas y DNAsas a una concentración de 10 ng/ μl . Se utilizaron 5 μl de ADN por reacción. En todos los ensayos se incluyó un control positivo (ADN genómico perteneciente a un animal infectado), un control negativo (ADN genómico perteneciente a un animal no infectado) y un control sin templado, para verificar la falta de amplificación en la mezcla de reactivos sin ningún otro agregado. El límite de detección de este ensayo fue de una célula infectada/10 000 células no infectadas.

Las mezclas para las 2 reacciones de amplificación (VLB-pol y 18S) y las secuencias de oligonucleótidos utilizados pueden observarse en las tablas 4.2, 4.3 y 4.4.

REACTIVO (solución stock)	CONCENTRACION FINAL	Volumen x 1 REACCION (µl)
Master Mix SYBR 2X (Roche)*	1X	12,5
BLVMGB.F (10 µM)	400 nM	1
BLVMGB.R (10 µM)	400 nM	1
Agua	-	5,5
ADN genómico	10 ng/µl	5
VOLUMEN TOTAL		25

Tabla 4.2. Reactivos utilizados en la reacción de PCR en tiempo Real VLB-Pol

* Fast Start universal SYBR Green Master. Roche

REACTIVO (solución stock)	CONCENTRACION FINAL	Volumen x 1 REACCION (µl)
Master Mix SYBR 2X (Roche)*	1X	12,5
18S.F (2.5 µM)	200 nM	2
18S.R (2.5 µM)	200 nM	2
Agua	-	3,5
ADN genómico	10 ng/µl	5
VOLUMEN TOTAL		25

Tabla 4.3. Reactivos utilizados en la reacción de PCR en tiempo Real VLB-18S

* Fast Start universal SYBR Green Master. Roche

Nombre	Secuencia (5´- 3´)	Gen
BLVMGB.F	GAA ACT CCA GAG CAA TGG CAT AA	<i>pol VLB</i>
BLVMGB.R	GGT TCG GCC ATC GAG ACA	<i>pol VLB</i>
18S.F	GAA ACT CCA GAG CAA TGG CAT AA	18S rDNA bovino
18S.R	GGT TCG GCC ATC GAG ACA	18S rDNA bovino
BLVpol5F	CCT CAA TTC CCT TTA AAC TA	Pol VLB
BLVpol3R	GTA CCG GGA AGA CTG GAT TA	Pol VLB

Tabla 4.4. Nombre y secuencia de Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real (cuantificación relativa y absoluta)

Las reacciones se realizaron utilizando el termociclador de PCR en tiempo real (AB Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System). El perfil térmico utilizado fue el siguiente:

1 ciclo de 50 °C 2 min,
 1 ciclo de 95 °C 10 min,
 y 35 repeticiones de 95 °C 15 s y 60 °C 1 min

4.4. Detección de provirus: Nested PCR (nPCR tax)

La presencia del ADN proviral del VLB fue detectada por amplificación de un segmento de 279 pares de bases perteneciente al gen tax por nested PCR (nPCR *tax*) (Wu y col., 2003). Se utilizaron los pares de oligonucleótidos 7781F/8083R y 7802/8062R, en la primera y segunda ronda, respectivamente (Tabla 4.5) utilizando las condiciones enunciadas en las tabla 4.6 y 4.7a continuación.

Gen	Tamaño del Producto (pares de bases)	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Región del genoma de VLB*
Tax	321	7781 F	CAG·ACA·CCA·GGG·GAG·CCA·TA	7781-7800
Tax		8083 R	CTG CTA GCA ACC AAT TTC GGA	8083-8102
Tax	279	7802 F	AGC CAT ACG TTA TCT CTC CA	7802-7821
Tax		8062 R	CAG GTT AGC GTA GGG TCA TG	8062-8081

Tabla 4.5 Oligonucleótidos utilizados en la Nested-PCR tax VLB. * GenBank N° K02120 (Sagata y col., 1985)

Reactivo	Volumen x 1 reacción (µl)
Agua libre de RNAsas y DNAsas	10,25
Green GoTaq Buffer 5X (Promega)	5,0
ClMg (25 mM) (Promega)	1,5
dNTPs (5 mM) (c/u)	1
Oligonucleótido TAX 7781F (100ng/µl)	1
Oligonucleótido TAX 8083R (100ng/µl)	1
Taq pol 2.5 U/µl	0,25
ADN (≥10 ng/l)	5,0
Volumen Total	25

Tabla 4.6 Volúmen de reactivos para mezcla de primera ronda de nPCR tax.

A la mezcla de primera ronda se le agregaron 5 μl ($\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) de ADN templado y posteriormente se realizó el siguiente programa de ciclado:

- * 1 ciclo de 94 °C 5 min
- * 35 ciclos de: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min
- * 1 ciclo de 72 °C 2 min

Una vez finalizada la primera ronda, se preparó la mezcla de segunda ronda (Tabla 4.8), y se agregó 1 μl del producto de primera ronda.

Reactivo	Volumen x 1 reacción (μl)
Agua libre de RNAsas y DNAsas	14,25
Green GoTaq Buffer 5X (Promega)	5,0
ClMg (25 mM) (Promega)	1,5
dNTPs (5 mM) (c/u)	1
Oligonucleótido TAX 7802F (100ng/ μl)	1
Oligonucleótido TAX 8062R (100ng/ μl)	1
Taq pol 2.5U/ μl	0,25
Amplificado primer reacción	1
Volumen Total	25

Tabla 4.7 Volumen de reactivos para la segunda ronda nPCR tax.

Se utilizó el siguiente programa de ciclado:

- * 1 ciclo de 94 °C 5 min
- * 30 ciclos de: 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s
- * 1 ciclo de 72 °C 2 min, 4 °C 99 h 59 min

La presencia del producto de amplificación se visualizó por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1,5 % en buffer TAE 1X. A 100 V durante 15-20 min. Los productos se observaron en transiluminador UV (Fotodyne Inc.).

En todos los ensayos se incluyó un control positivo (ADN genómico perteneciente a un bovino infectado), un control negativo (ADN genómico perteneciente a un bovino no infectado) y un control sin templado, para verificar la falta de amplificación en la mezcla de reactivos sin ningún otro agregado. El límite de detección fue de 1 célula infectada/ 10 000 células no infectadas.

4.5. Detección de anticuerpos

4.5.1 Elisa p24

Se detectaron anticuerpos anti-p24 de VLB utilizando la técnica de ELISA (ELISA-p24), un ensayo indirecto que fue desarrollado y validado en nuestro laboratorio (Gutiérrez y col., 2009). Se sensibilizaron placas de ELISA Polysorp *Nunc* con 100 µl por pocillo de una dilución adecuada de antígeno p24 recombinante en solución de pegado (Carbonato-Bicarbonato pH 9,6) durante toda la noche a 4 °C. Se descartó el líquido, se lavó tres veces con una solución de lavado (PBS 1X-Tween 20 0,05 %), y se bloqueó con solución de bloqueo y dilución (PBS + SNE (suero normal equino) 10 % + Tween 20 0,2 %) y se incubó durante 2 h a 37 °C.

A partir de una dilución inicial 1:25 de la muestra (plasma o suero de calostro) se realizaron diluciones seriadas en base doble en solución de bloqueo y dilución, que fueron agregadas a la placa bloqueada junto con un suero control positivo, un suero control positivo débil (+1/7) y un suero control negativo de placa, todos previamente diluidos 1:25. Se incubó durante 30 minutos a Temperatura ambiente (TA, 18-25 °C). Se lavaron las placas con solución de lavado y se colocaron 100 µl por pocillo de la dilución adecuada de conjugado (anti-inmunoglobulinas G bovinas marcadas con peroxidasa) en solución de bloqueo y dilución. Se incubó nuevamente durante 30 minutos a TA. Se lavó y se reveló la placa agregando 100 µl por pocillo de la solución de revelado (agua destilada + Buffer acetato 1,1 M pH 5,0 + TMB stock (6mg/ml) y H₂O₂ 3 %). Se incubó durante 15-20 minutos en oscuridad y se frenó la reacción con el agregado de solución de frenado (H₂SO₄ 11 %). Se leyó la absorbancia (DO) a 450 nm y se registraron los datos. El resultado se expresó como porcentaje de reactividad y se obtuvo por relación de absorbancia obtenida por la muestra con respecto al control positivo débil y al control negativo de placa, utilizando la siguiente ecuación:

Porcentaje de reactividad de la muestra = $[(DO \text{ muestra} - DO \text{ Control-}) / (DO \text{ Control} +1/7 - DO \text{ Control -})] \times 100$

Todos los sueros con reactividad igual o superior a 25 % fueron declarados positivos, tal como había sido definido durante la puesta a punto y validación. (Gutiérrez y col., 2009). El título fue designado como la recíproca de la última dilución que obtuvo resultado positivo.

4.5.2. Elisa virus completo (Elisa VC)

Se detectaron anticuerpos contra la partícula viral completa utilizando un ensayo de ELISA indirecto que fue desarrollado y validado en nuestro laboratorio (Trono y col., 2001), que utiliza como antígeno una preparación de VLB concentrado y purificado a partir del sobrenadante de células FLK, persistentemente infectadas. Se sensibilizaron previamente las placas de ELISA Immulon 1B con 100 µl por pocillo de una dilución adecuada de antígeno en solución de pegado (Buffer Carbonato-Bicarbonato pH 9,6) durante toda la noche a 4 °C. Se descartó el líquido y se lavó con una solución de lavado (PBS 1X-Tween 20 0,05 %), se bloqueó con solución de bloqueo y dilución (PBS + SNE 10 % + Tween 20 0,2 %) incubando la placa durante 90 minutos a 37 °C.

A partir de una dilución inicial 1:40 de las muestras (plasma y suero de calostro) se realizaron diluciones seriadas en base doble en solución de bloqueo, que fueron agregadas a la placa bloqueada junto con un control positivo, un control positivo débil y un control negativo de placa, todos previamente diluidos 1:40 (los mismos controles que para el ensayo ELISAp24). Se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron las placas con solución de lavado y se colocaron 100 µl por pocillo de la dilución adecuada de conjugado (anti-inmunoglobulinas G bovinas marcadas con peroxidasa) en solución de bloqueo y dilución. Se incubó nuevamente durante 1 hora a 37 °C. Se lavó, se reveló y se analizó de la misma manera que en el ensayo de ELISAp24.

4.5.3. Inhibición de sincicios

Se realizó la detección de anticuerpos por su capacidad de inhibir la formación de sincicios en células indicadoras cultivadas en presencia de células infectadas con VLB. La presencia de sincicios se analizó por tinción del co-cultivo con la coloración de May Grünwald-Giemsa. Los sincicios se observaron en el cocultivo como células gigantes multinucleadas con más de 10 núcleos. Este

ensayo de inhibición de sincicios ha sido utilizado para demostrar la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos en infecciones naturales durante la década del 80 (Greig y col., 1978; Kono y col., 1983). Actualmente no se realiza de rutina en los laboratorios de diagnóstico, por lo cual fue necesario realizar el ajuste del co-cultivo así como de las condiciones de ensayo en presencia de sueros positivos y negativos. La representación gráfica del ensayo de formación e inhibición de sincicios en presencia de anticuerpos se puede observar en la Figura 4.1.

Para la puesta a punto se realizaron co-cultivos de células FLK productoras de VLB (cultivo efector) con células de las líneas CC81, HeLa y VERO como células indicadoras (cultivo indicador). Como control negativo de cultivo efector se utilizaron células de riñón ovino primario (RO) (Tabla 4.9).

Función en el co-cultivo	Cultivo celular	Primario/ Línea celular	Observaciones	Referencia
Efectoras	FLK	Línea	Riñón fetal ovino infectadas persistentemente con VLB	Van der Maaten y Miller, 1975.
Control negativo	RO	Primario	Riñón fetal ovino primario	Diglio y Ferrer, 1976
Indicadoras	Vero	Línea	Epiteliales de riñón de mono	Greig y col., 1978
Indicadoras	CC-81	Línea	Fibroblastos de Riñón felino transformadas con virus sarcoma murino	Guillemain y col., 1978.
Indicadoras	HeLa	Línea	Carcinoma de cuello uterino humano	Kazunori y col.,1998

Tabla 4.8 Cultivos utilizados en la puesta a punto del ensayo de formación de sincicios.

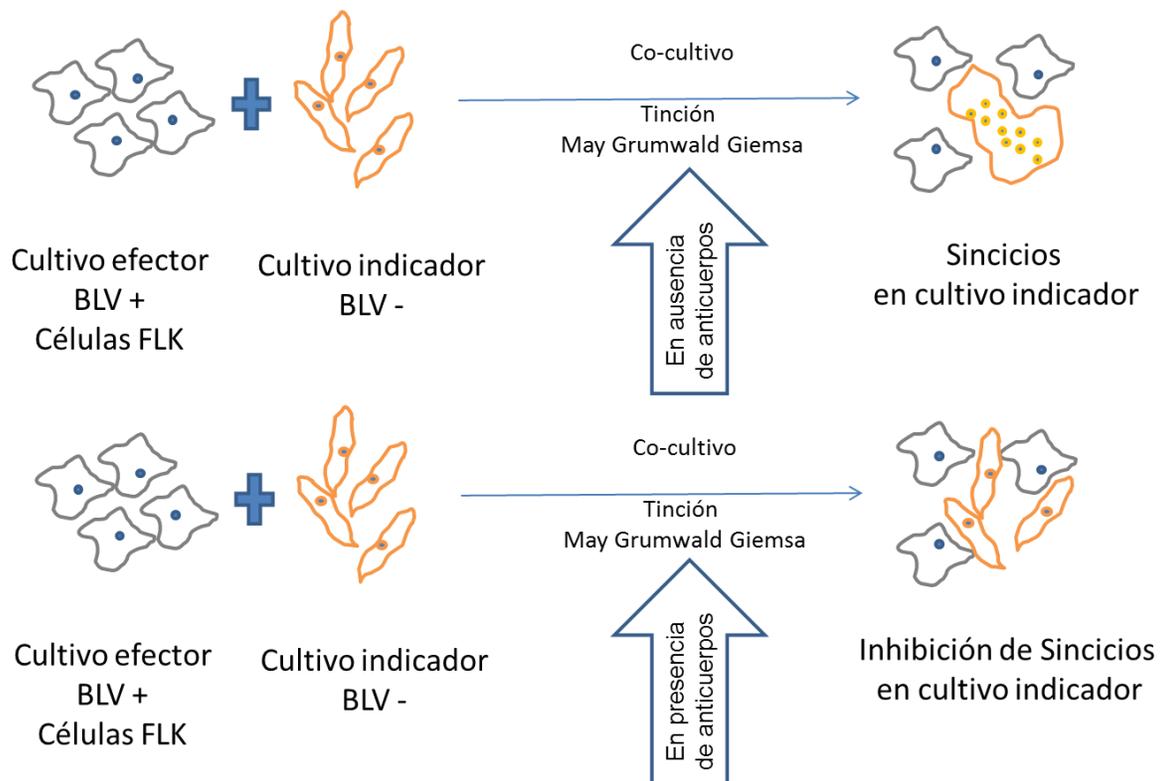


Figura 4.1. Representación gráfica del ensayo de formación/inhibición de sincicios en ausencia/presencia de anticuerpos

El ajuste del efecto sincicial se llevó a cabo realizando co-cultivos de la línea efectora FLK con las líneas indicadoras en distintas relaciones y concentraciones (Tabla 4.9), tiempos de cultivo (24 y 48 hs) y tipo de placa (24 y 96 pocillos).

Relación células efectoras/indicadoras	Concentración células efectoras/indicadoras
1:1	$1 \times 10^5 / 1 \times 10^5$
	$2 \times 10^5 / 2 \times 10^5$
	$5 \times 10^5 / 5 \times 10^5$
1:5	$2 \times 10^4 / 1 \times 10^5$
	$4 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
	$8 \times 10^4 / 4 \times 10^5$
1:10	$1 \times 10^4 / 1 \times 10^5$
	$2 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
	$4 \times 10^4 / 4 \times 10^5$

Tabla 4.9. Relación y concentración de los cultivos celulares utilizados en los ensayos de formación de sincicios

Las células de las líneas CC81 y FLK fueron cedidas gentilmente por el Dr. Luc Willems de la Universidad de Liege, Bélgica. Las células HeLa y VERO provienen del Banco Argentino de células. El cultivo primario de riñón ovino fue realizado en la sección de Cultivos Celulares de

nuestro Instituto. Las suspensiones celulares para realizar los ensayos se prepararon utilizando monocapas confluentes. Las células FLK se cultivaron en medio de cultivo RPMI con el agregado de Piruvato de Na (1 %) y Hepes (2,5 %). Para la línea CC81 se utilizó medio RPMI, mientras que para los cultivos de RO, HeLa y VERO se utilizó una mezcla de medios de cultivo MEM-D y MEM-E en partes iguales. En todos los casos el medio de cultivo fue suplementado con antibióticos (penicilina 2 gramos /litro, estreptomicina 3×10^6 UI/litro, gentamicina 5 gramos /litro) y antimicótico (Amphotericina B 250U /ml). Durante el crecimiento celular el medio fue suplementado con 10% de Suero fetal bovino irradiado (SFB). Se mantuvieron los cultivos a 37 °C con 5 % de CO₂, en frascos de 75 cm², repicando con tripsina cada 5 o 7 días o según la confluencia de la monocapa.

En el momento del ensayo se tripsinaron los cultivos y se prepararon las suspensiones celulares en el medio de cultivo correspondiente. Además del co-cultivo se cultivaron controles de la línea celular efectora (FLK) y de las líneas indicadoras (Vero, HeLa, CC81 y RO) en forma independiente en pocillos aparte. Una vez finalizado el tiempo de cultivo (24 y 48 h) se tiñeron las monocapas con la coloración de May Grünwald-Giemsa para evidenciar la presencia de sincicios. Para ello se descartó el medio de cultivo y sin lavar se cubrió la monocapa con solución de May Grünwald pura (Merck) y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Sin descartar el colorante se agregó el mismo volumen de agua destilada, se mezcló por vaivén e incubó durante 1 minuto. Se descartó y sin lavar, se agregó solución de Giemsa (300 µl de Giemsa Biopur puro más 10 ml de agua destilada) se incubó durante 15 minutos. Se descartó y se lavó con agua destilada hasta que el agua estuviera transparente, en el último lavado se descartó dejando un volumen suficiente como para cubrir el pocillo. Se observó al microscopio con objetivo 4 y 40X.

La puesta a punto del ensayo de detección de anticuerpos se realizó utilizando muestras de suero pertenecientes a bovinos infectados naturales (n=19) y no infectados (n=19), previamente caracterizados por ELISA y/o Inmunodifusión en gel de agar. Se realizó el ensayo utilizando las muestras en diluciones seriadas en base 2 en medio de cultivo. La suspensión de células efectoras FLK (50 µl) se incubó durante 2 h con 50 µl de la muestra a 37 °C con 5 % de CO₂. Finalizada la incubación se agregaron 100 µl de la suspensión celular CC81 a todos los pocillos. Los co-cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 h, luego de las cuales fueron teñidos con May Grünwald-Giemsa. En cada ensayo se dejaron pocillos con las líneas celulares en forma independiente y en co-cultivo, sin agregado del suero, como controles de los cultivos y de la formación de sincicios, respectivamente.

4.6. Contaminación experimental del calostro con VLB y secado spray

Se realizaron en forma independiente 2 procesos de secado spray a escala de laboratorio utilizando como material original 10 litros de calostro en cada proceso. Cada proceso se realizó con un pool de calostro conformado con colectas individuales procedentes de vacas no infectadas dentro de un establecimiento libre, a los cuales se les realizó el ensayo de ELISA y nPCR para confirmar la ausencia de anticuerpos y provirus previamente. Todos los calostros se mantuvieron congelados a -20 °C desde que ingresaron al laboratorio y hasta el momento de su utilización.

Ambas fracciones de 10 litros fueron contaminadas experimentalmente y de manera independiente con 10^9 células viables infectadas con VLB, células FLK en suspensión (Pool 1) y con 600 ml de sobrenadante fresco de células FLK conteniendo virus VLB libre de células (Pool 2) (Tabla 4.10).

Para la contaminación experimental se amplificaron células FLK en frascos de cultivo celular roller de 1 litro con Medio de cultivo celular RPMI con el agregado de Piruvato de Na (1 %) y Hepes (2,5 %) y 10 % de Suero fetal bovino irradiado (SFB). Se mantuvieron los cultivos a 37 °C con 5 % de CO₂, repicando el cultivo con tripsina 0,25 % cada 5 o 7 días o según confluencia de monocapa al 80-100 %.

La dosis utilizada para la contaminación experimental, tanto de células como virus libre de células fue más de 10 veces la necesaria para provocar una infección experimental en corderos o terneros, de acuerdo con datos previamente obtenidos en nuestro laboratorio en los ensayos de infección experimental en el modelo ovino (Tabla 4.10).

Inóculo	Dosis infectiva individual	Ensayo Clearance VLB con tratamiento secado spray	Ensayo Clearance VLB sin tratamiento
Células FLK (infectadas con VLB)	1 T25 monocapa confluyente 250.000-500.000 células totales	1×10^9 células / 10 litros calostro	3 T25 con monocapa confluyente/150ml calostro
Virus libre de células (sobrenadante de cultivo FLK puro)	Colecta de 1 T25 en monocapa confluyente 3-5 ml	600 ml / 10 litros calostro	Sobrenadante de 3 T25 (9-12ml) con monocapa confluyente/150 ml calostro

Tabla 4.10. Dosis infecciosa individual y utilizada en los ensayos de contaminación experimental de calostros y proceso de secado spray

Ensayo Clearance VLB con tratamiento secado spray

Células FLK (infectadas con VLB)

1 x 10⁹
celulas /
10 litros
calostro



Sobrenadante
600 ml / 10
litros calostro



SECADO SPRAY 180-80 ° C
RECONSTITUCION X 10 LITROS

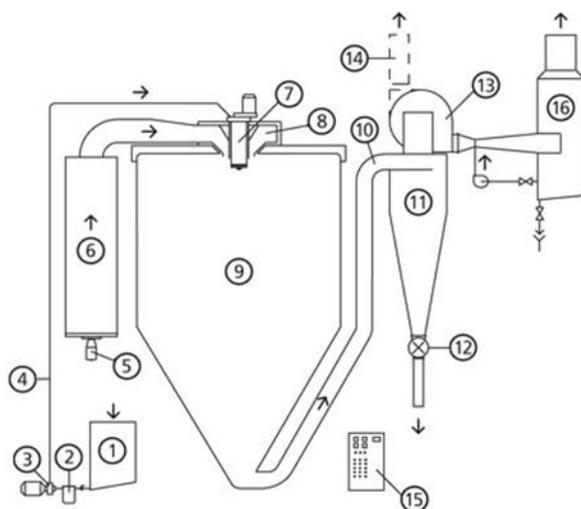


SECADO SPRAY 180-80 ° C
RECONSTITUCION X 10 LITROS



Figura 4.2 Ensayo Clearance VLB con tratamiento secado spray en calostro

Se realizó el proceso de secado spray o por atomización a escala de laboratorio. El proceso fue realizado en la empresa Galaxie de Argentina, en un equipo Galaxie 1612 siguiendo las recomendaciones del personal idóneo. La carga de calostro se realizó a 180 °C y la aspersion a 80 °C, con el objeto de preservar los anticuerpos. El diagrama de flujo del proceso junto con una breve descripción del mismo se puede observar en la Figura 4.3. Una vez realizado el secado, el polvo de calostro fue conservado a temperatura ambiente.



Componentes Secador Spray

- 1) Tanque de Alimentación.
- 2) Filtro de Producto.
- 3) Bomba Dosificadora.
- 4) Conjuntos de Cañerías, Válvulas y Accesorios.
- 5) Quemador Completo.
- 6) Generador de Gases Calientes Directo.
- 7) Atomizador Completo.
- 8) Dispensor de Aire Caliente.
- 9) Cámara de Secado con Puerta y Mirillas.
- 10) Conductos de Interconexión.
- 11) Ciclón de Salida de Producto.
- 12) Válvula Rotativa.
- 13) Ventilador de Aspiración.
- 14) Chimenea.
- 15) Tablero de Control y Comando.
- 16) Lavador de Gases Efluentes.

Figura 4.3 Diagrama de flujo de una planta de secado Spray. www.galaxie.com.ar. Brevemente, el proceso de secado comienza con la carga del calostro en el tanque de alimentación (1), desde donde es impulsado a través de una bomba (3) hasta el atomizador (7), pasando previamente por un filtro. En el atomizador, recibe una corriente uniforme de aire caliente y se pulveriza. El secado (9) se produce en forma casi instantánea debido al tamaño de la gota. Finalmente, se separa el aire residual del polvo (11) y finaliza el proceso como polvo seco de calostro.

Una fracción de 150 ml de calostro contaminada con células y otra fracción de 150 ml contaminada con VLB libre de células (9 ml sobrenadante de FLK) permanecieron sin tratamiento de secado para verificar la capacidad infectiva del material sin tratamiento. Estas preparaciones se realizaron inmediatamente antes de realizar el ensayo de infectividad en ovinos (Tabla 4.10 y Figura 4.4).

Ensayo Clearance VLB sin tratamiento

Células FLK (infectadas con VLB)

3 T25
monocapa
confluente
de FLK



Sobrenadante
de 3 T25 con
monocapa
confluente



SIN SECADO
TRASLADO AL CAMPO EL MISMO DÍA



SIN SECADO
TRASLADO AL CAMPO EL MISMO DÍA

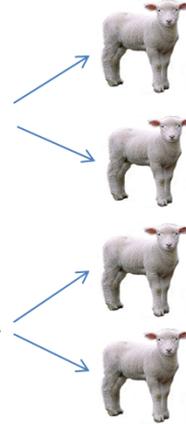


Figura 4.4 Ensayo Clearance VLB sin tratamiento secado spray en calostro

Como control de la acción del proceso sobre los anticuerpos presentes en el calostro original, se realizó un tercer proceso de secado en un pool de calostros pertenecientes a vacas infectadas naturales, con anticuerpos detectables frente al VLB. Virus de la diarrea viral bovina y Rotavirus bovino (Pool 3).

4.7. Bioensayo en ovinos

Para los ensayos de infectividad, el calostro en polvo fue resuspendido en su volumen original con agua destilada estéril. El volumen de reconstitución fue ajustado teniendo como referencia la concentración de sólidos totales en el calostro previo al secado, cuantificada por refractometría. Se inocularon 2 corderos jóvenes susceptibles por muestra en estudio. Los corderos, de 6-12 meses de edad, fueron analizados al momento de iniciar la experiencia para confirmar la ausencia de anticuerpos específicos. Las muestras inoculadas fueron las siguientes:

1. Calostro contaminado con VLB libre de células secado.
2. Calostro contaminado con células infectadas con VLB secado.
3. Calostro contaminado con VLB libre de células no secado.
4. Calostro contaminado con células infectadas con VLB no secado.

El volumen de inoculación fue de 50 ml por cordero, que se aplicaron por vía subcutánea en 4 puntos distintos. Las muestras de calostro contaminadas y no tratadas se inocularon sin ninguna manipulación previa (50 ml/cordero). Se realizó el seguimiento de la infección durante 60 días por serología y PCR.

4.8. Estadística y Software utilizados

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los siguientes sistemas de software:

Sistema estadístico R. Te R Fundación for Statistical Computing Co Institute for Statistics and Mathematics Wirtschaftsuniversität Wien Welthandelsplatz 1 1020 Vienna, Austria.

GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

MedCalc para Windows, versión 15.0. MedCalc Software, Ostend, Bélgica.

El análisis de comparación de medias pareadas en muestras dependientes se realizó mediante la prueba de Wilcoxon. El análisis de correlación fue realizado mediante la prueba de Spearman. El nivel de confianza para los análisis fue asignado en el 95 %. Los valores de p mayores a 0,05 fueron considerados como no significativos (Tabla 4.11).

P	Nivel de significancia
< 0,001	Extremadamente significativo
0,001-0,01	Muy significativo
0,01-0,05	Significativo
> 0,05	No significativo

Tabla 4.11 Nivel de confianza considerado para el análisis estadístico.

5. Resultados

5.1. Relación entre la carga proviral en sangre y calostro de las madres

Con el propósito de estimar si los calostros de todas las vacas infectadas tienen un potencial infeccioso similar y/o si el nivel de infección está asociado a la carga proviral en sangre, se detectó y cuantificó provirus VLB en muestras individuales de calostro pertenecientes a 28 vacas durante las primeras 12 horas post-parto, de un tambo naturalmente infectado. Además de detectar provirus y cuantificar la carga proviral relativa del calostro, se analizó su relación con la carga proviral en sangre.

La Tabla 5.1 muestra las prevalencias individuales de anticuerpos y provirus en las distintas muestras analizadas. Entre las 28 madres en estudio, hubo 23 (23/28= 82,1 %) que fueron declaradas como infectadas con VLB debido a la presencia de ambos tipos de anticuerpos específicos en calostro. Hubo 3 vacas (4038, 4039, 4032) en las cuales se observó una reacción positiva en el ensayo de ELISA para un solo tipo de anticuerpos en calostro (p24 ó VC), y no se detectó la presencia de anticuerpos ni provirus en sangre, por lo cual no se pudo definir su situación sanitaria. En el Anexo, bajo el título Resultados crudos, se muestra la tabla completa con los resultados individuales de todas las muestras analizadas.

	ELISA virus completo		ELISA p24		nPCR		Real Time PCR	
	POSITIVOS		POSITIVOS		POSITIVOS		CUANTIFICABLES	
	N	%	N	%	N	%	N	%
CALOSTROS	26	92,8	27	96,4	19	67,8	9	32,2
SANGRE MADRES	23	82,1	20	71,4	21	75	19	67,8
SANGRE TERNEROS	25	89,2	24	85,7	3	10,7	2	7,1

Tabla 5.1 Muestras positivas según ensayo y tipo de muestra en los animales en estudio, n=28 de todas las muestras, pariciones totales de un mes

Se detectó provirus por nPCR en el **67,8 %** de los calostros (19/28) y en el **75 %** de las sangres (21/28) de las madres en estudio. Todos los calostros con provirus detectable pertenecían a vacas con provirus detectable en sangre. Hubo 2 vacas (3800, 3832) en las cuales se detectó provirus en sangre pero no en calostro. La concordancia entre ambas muestras fue del 92,8 % (26/28) (Tabla 5.2).

		CALOSTRO		
		nPCR Positivo	nPCR Negativo	Total
SANGRE MADRE	nPCR Positivo	19	2	21
	nPCR Negativo	0	7	7
Total		19	9	28

Tabla 5.2 Detección de provirus (nPCR) en muestras de calostro y sangre de las madres.

Se logró cuantificar provirus por PCR en tiempo real en el **32,3 %** de los calostros, correspondientes a 9 muestras de las 19 declaradas como positivas por nPCR (Tabla 5.3) Entre ambas técnicas hubo una concordancia de 64 % (18/28). El menor nivel de detección por PCR en tiempo real en comparación con nPCR se observó también en sangre, con una menor diferencia (Tabla 5.1), de 75 % vs 67,8 %.

		CALOSTRO		
		nPCR Positivo	nPCR Negativo	Total
CALOSTRO	Real time PCR Positivo	9	0	9
	Real time PCR Negativo	10	9	19
Total		19	9	28

Tabla 5.3 Detección de provirus (nPCR) y carga proviral relativa en calostro.

La carga proviral relativa fue cuantificable en la sangre de **19** madres (19/28= 67,8 %). Entre ellas, el 25 % (7/28) presentó una carga proviral circulante alta, correspondiente a más del 1 % de PBMCs infectados con VLB, situación compatible con la linfocitosis persistente. El resto fue clasificado en el estatus de animales aleucémicos, el 42,8 % (12/28) con carga proviral baja y el 32,1 % (9/28) indetectable (Tabla 5.4).

Carga proviral			CALOSTRO			
			Indetectable (n)	Baja (n)	Alta (n)	nPCR Positivo (n)
SANGRE MADRE	Indetectable (n)	9 (32,1 %)	9	0	0	0
	Baja (n)	12 (42,8 %)	7	5	0	12
	Alta (n)	7 (25 %)	3	4	0	7
Total		28	19 (67,8 %)	9 (32,2 %)	0 (0 %)	19 (67,8 %)

Tabla 5.4 Carga proviral relativa en muestras de sangre de la madre y calostro.

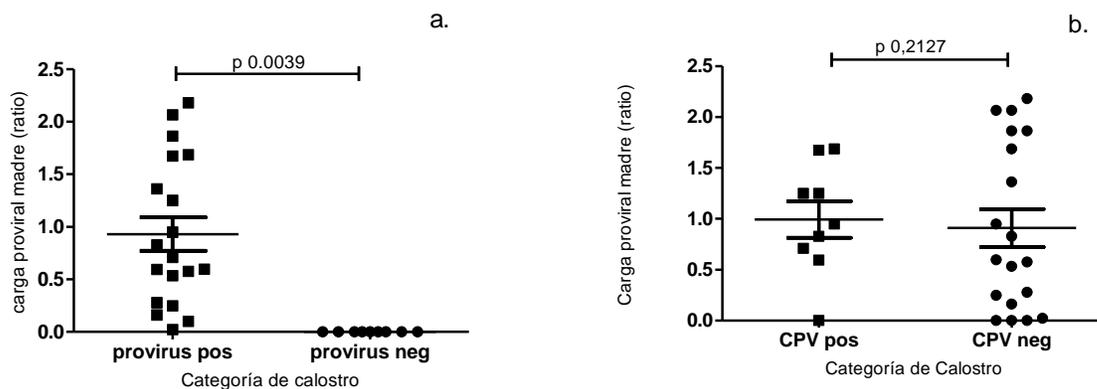


Fig. 5.2 Carga proviral de las vacas en distintas categorías de calostros con provirus detectable y no detectable por nPCR (a) y por PCR en tiempo real (b). CPV: carga proviral. Prueba de Wilcoxon

El análisis de Spearman mostró un alto nivel de correlación entre la presencia de provirus en calostro y la carga proviral en sangre de la madre ($r= 0,82$, $p < 0.0001$), similar a la obtenida con los niveles de anticuerpos en sangre descrita en el punto 5.2. Si bien moderado, también se observó una correlación positiva con la carga proviral del calostro ($r= 0,46$, $p= 0,013$) (Figura 5.4). Los resultados crudos de todas las correlaciones se pueden ver en el Anexo, Correlaciones.

Como dato interesante podemos decir que los 3 calostros (#3863, #3869, #4010) con mayores valores de carga proviral (ratio) (0,037- 0,030- 0,025) correspondían a animales con baja carga proviral en sangre (0,7- 0,5- 0,5, respectivamente). Asimismo, el animal con la mayor carga proviral en sangre (#4027, ratio= 2,18) tenía una carga proviral en calostro muy baja (ratio= 0,008).

5.2. Relación entre el nivel de infección de la madre y el nivel de anticuerpos en sangre, calostro y ternero

Con el propósito de estimar si todas las vacas tienen el mismo potencial de transferencia de inmunidad y/o si este potencial está asociado al nivel de infección en sangre se cuantificó el nivel de anticuerpos específicos en sangre y calostro de madres en el período periparto y en sangre de sus propios terneros. De forma complementaria, se analizó la relación entre la carga proviral del calostro y su nivel de anticuerpos.

Como se puede observar en la Tabla 5.1, la prevalencia de anticuerpos en calostro fue superior que en sangre, en los dos ensayos de ELISA. El 25 % (7/28) de las madres mostró anticuerpos p24 en

calostro pero no en sangre. Con los anticuerpos contra virus completo el hallazgo fue similar pero el porcentaje fue menor (3/28= 10,7 %). Entre las 7 madres sin anticuerpos p24 en sangre, pero con anticuerpos en calostro, 5 (#3832, #3940, #4055, #4062, #4107) presentaron anticuerpos frente a virus completo en calostro. En el caso de las 3 madres sin anticuerpos contra virus completo en sangre pero sí en calostro, 2 tenían anticuerpos contra p24 en calostro (#4062 y #4107). Entre los terneros nacidos de estas madres con anticuerpos en calostro pero no en sangre, se observó la presencia de anticuerpos p24 en 5/7 (#3832, #3940, #4038, #4039, #4062) y contra virus completo en 1/3 (#4062) (Tabla 5.5). En todas estas madres, el nivel de provirus en sangre fue indetectable, y solamente en 1 (#3832) se detectó provirus por nPCR. Estos hallazgos evidencian una transferencia de anticuerpos de sangre al calostro, y sugieren que el descenso de los niveles de anticuerpos en sangre hasta límites indetectables está relacionado con el bajo nivel de provirus en sangre (Tabla 5.5).

ID	Anticuerpos						Provirus		
	Calostro	Madre	Ternero	Calostro	Madre	Ternero	Calostro	Madre	Madre carga proviral
	Elisa p24			Elisa VC			nPCR		
3832	Pos	neg	Pos	Pos	Pos	Pos	neg	Pos	0
3940	Pos	neg	Pos	Pos	Pos	Pos	neg	neg	0
4038	Pos	neg	Pos	neg	Neg	Pos	neg	neg	0
4039	Pos	neg	Pos	neg	Neg	Pos	neg	neg	0
4055	Pos	neg	neg	Pos	Pos	Pos	neg	neg	0
4062	Pos	neg	Pos	Pos	Neg	Pos	neg	neg	0
4107	Pos	neg	neg	Pos	Neg	Neg	neg	neg	0
4032	Neg	neg	neg	Pos	Neg	Neg	neg	neg	0

Tabla 5.5 Animales con resultados discordantes de anticuerpos en sangre madre, ternero y calostro. Las celdas grises indican vacas con anticuerpos en calostro pero no en sangre. ID: identificación, VC: virus completo

El título de anticuerpos p24 y anti virus completo en calostro mostró una media significativamente más alta que la de la sangre de las madres y los terneros (Tabla 5.6, Figura 5.3).

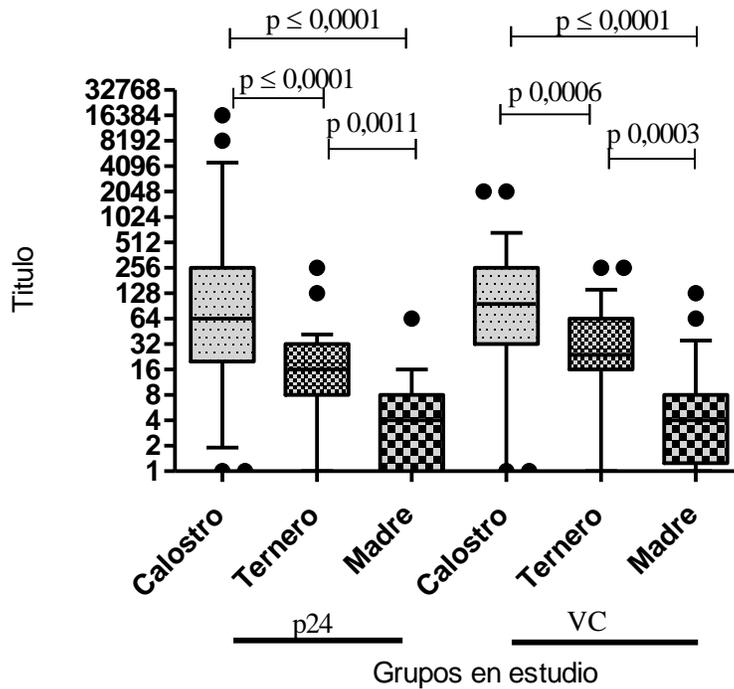


Fig. 5.3 Título de anticuerpos por Elisa p24 y ELISA VC, en la sangre de las madres, calostro y sangre de los terneros. Wilcoxon test VC= virus completo

Los valores máximos de título de anticuerpos (p24 y VC) fueron obtenidos por el calostro, significativamente superiores a los títulos en sangre de los terneros y sangre de las madres (Figura 5.3, Tabla 5.6). Los casos más extremos fueron observados en calostro con un título de 1:16384 de anticuerpos p24 (#3758) y un título de 1:2048 de anticuerpos contra virus completo (#4027). Los títulos más bajos se observaron en la sangre materna (Tabla 5.6).

	Anticuerpos p24		Anticuerpos Virus completo	
	React máx	Título máximo	React máx	Título máximo
Calostro	432	1/16384	194	1/2048
Sangre madre	207	1/64	225	1/128
Sangre ternero	289	1/256	245	1/256

Tabla 5. 6 Rango de anticuerpos p24 y virus completos en los 3 subgrupos en estudio

Más del 40 % de las madres presentó bajos niveles (menor a 8) de ambos tipos de anticuerpos en sangre (Tabla 5.7). Sin embargo la proporción de terneros y calostros con bajos niveles de ambos tipos de anticuerpos fue muy baja, siempre inferior al 9 %. Estos hallazgos evidencian un buen proceso de calostrado y de transferencia pasiva, con niveles significativamente superiores en los terneros que en sus madres (Figura 5.3). Los 4 terneros sin evidencia de anticuerpos p24 nacieron

de madres sin anticuerpos en calostro (2/4, IDs# 4032, #4107) o con bajo título y reactividad (ID # 3800, #4055).

Condición	Anticuerpos p24			Anticuerpos VC		
	Calostro	Ternero	Madre	Calostro	Ternero	Madre
Baja reactividad (<100%)	11,5 % 3/26	0 % 0/24	31,6 % 6/19	20 % 5/25	12 % 3/25	34,7 % 8/23
Bajo título (<8)	7,7 % 2/26	8,3 % 2/24	52,6 % 10/19	8 % 2/25	4 % 1/25	47,8 % 11/23

Tabla 5.7 Distribución de anticuerpos en el triplete madre/calostro/ternero

Se observó una correlación positiva entre el nivel de anticuerpos en sangre y la carga proviral ($r=0,70$ y $0,75$ p24 y VC) o presencia de provirus ($r=0,73$ y $0,76$ p24 y VC) en sangre de las madres (Figura 5.4 y Anexo Correlaciones) similar a la reportada en otros establecimientos por nuestro grupo de trabajo. La situación de la infección materna también mostró estar reflejada en el calostro. Las correlaciones más robustas fueron las obtenidas entre la presencia de provirus en calostro y los niveles de anticuerpos en sangre ($r=0,82$ para ambos), similares a los obtenidos cuando se hizo el análisis con la carga proviral en sangre descripto anteriormente en el punto 5.1 ($r=0,82$). También se verificó una correlación positiva significativa entre el nivel de anticuerpos en sangre de la madre y el calostro, similar para anticuerpos p24 ($r=0,73$) y contra virus completo ($r=0,76$) (Figura 5.4), mejor que entre la carga proviral en sangre y el nivel de anticuerpos en calostro ($r=0,58$ p24 y $0,61$ VC) (Figura 5.4).

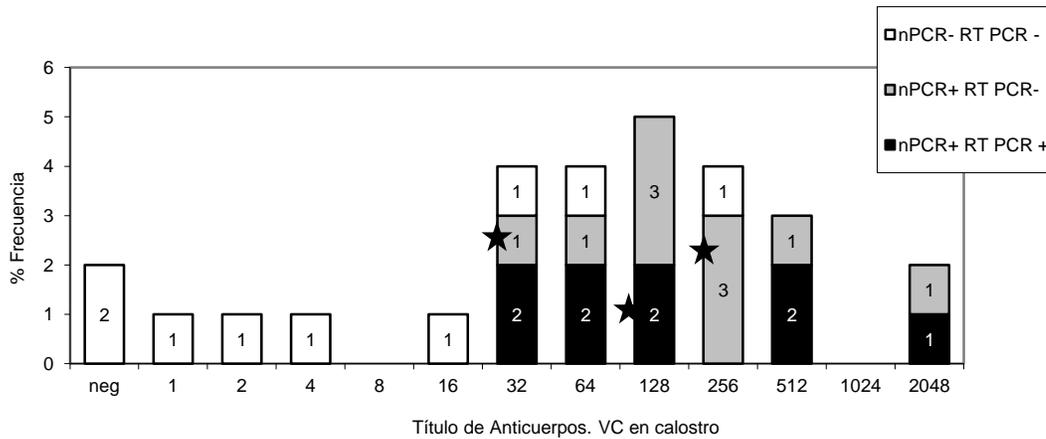


Figura 5.5 Distribución de anticuerpos VC en calostro pertenecientes a las madres en estudio. nPCR: nested PCR, RT PCR: PCR en tiempo real. Estrellas negras indican el título del calostro correspondiente a una vaca de la cual nació un ternero infectado (nPCR positivo).

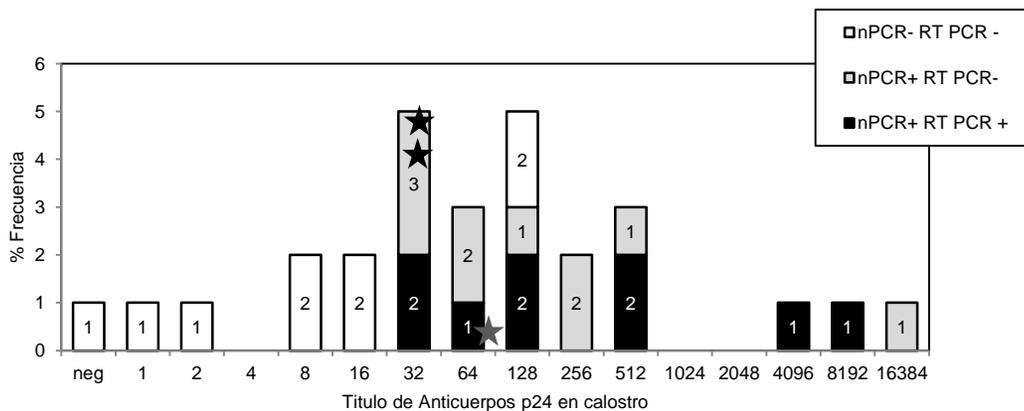


Figura 5.6 Distribución de anticuerpos p24 en calostro pertenecientes a las madres en estudio. nPCR: nested PCR, RT PCR: PCR en tiempo real. Estrellas indican el título del calostro correspondiente a una vaca de la cual nació un ternero infectado (nPCR positivos).

En base a la distribución del título de anticuerpos, se declararon 3 categorías de calostros con niveles bajos, medios o altos. La carga proviral de las madres con bajos títulos de anticuerpos en calostro fue significativamente más baja que la carga proviral de las madres con títulos medianos o altos. En cambio no hubo diferencias entre títulos medios y altos (Figura 5.7a). Complementando este hallazgo, se observó que los calostros con mayores cargas provirales se ubicaban en la categoría media de anticuerpos (Figura 5.7b).

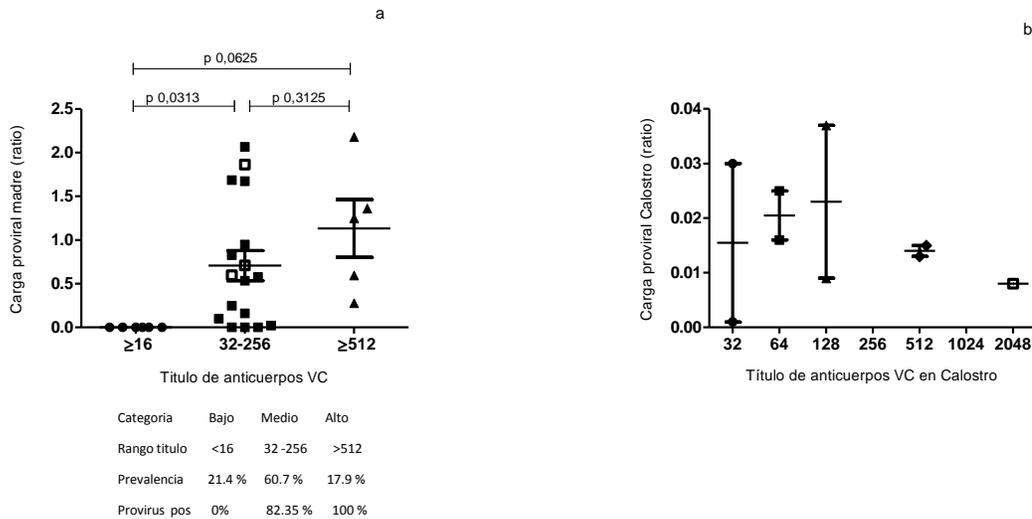


Fig. 5.7 Título de Anticuerpos VC en calostro, carga proviral de la madre(a) y del calostro(b). VC virus completo.

□ indican el título del calostro correspondiente a una vaca de la cual nació un ternero infectado.

Las madres que dieron lugar a terneros nacidos infectados (#4020, #3863, #3663) presentaban títulos medios de anticuerpos en calostro como se puede observar en las Figuras 5.5, 5.6 y 5.7 y en la Tabla 5.8. Entre los terneros nacidos en el periodo en estudio, se observó la presencia de provirus en sangre en el 10.7 % (3/28) Se detectó provirus por nPCR en la sangre y calostro de las madres de estos 3 terneros, 1 de ellas (3663) con alta carga proviral y 2 (3863, 4020) con baja carga proviral (Figura 5.7). Ninguna de las vacas con provirus indetectable en sangre dio lugar al nacimiento de un ternero con provirus. El análisis de correlación entre presencia de provirus en calostro y en sangre del ternero fue no significativo (Figura 5.4, Anexo Correlaciones).

ID	Ternero		Madre		Calostro			
	nPCR	Carga proviral	nPCR	Carga proviral	nPCR	Carga proviral	Anticuerpos VC	Anticuerpos p24
3663	Pos	Indetectable	Pos	1,8 (alta)	Pos	Indetectable	256	32
3863	Pos	0,004	Pos	0,7 (baja)	Pos	0,03	64	128
4020	Pos	0,05	Pos	0,59 (baja)	Pos	Indetectable	32	32

Tabla 5.8 Terneros con provirus detectable en sangre.

5.3 Nivel de anticuerpos: Título versus Reactividad

Los análisis de correlación entre reactividad y título de anticuerpos detectados por ELISA, mostraron una relación significativa muy robusta en el caso de la sangre de las madres ($r= 0,95$ y $r= 0,92$ para p24 y VC respectivamente, $p<0,0001$), menos robusta con la sangre de los terneros ($r= 0,56$ y $r= 0,61$) y aún no significativa para anticuerpos contra virus completo ($r= 0,50$ y $r= 0,24$) en el caso de los calostros, por lo cual el análisis integral de resultados se realizó utilizando los títulos.

En el análisis de correlación entre distintos tipos de muestra, se observaron mejores resultados con el título para ambos tipos de anticuerpos (ver Anexo, correlaciones), excepto para la correlación entre anticuerpos en sangre de la madre y la presencia de provirus en calostro (Tabla 5.9). Estos resultados hablan a favor de utilizar el título con respecto a la reactividad, aun cuando ésta resulta útil para la estimación pronóstica de la carga proviral individual en animales adultos infectados según datos previamente publicados (Gutiérrez y col., 2012), confirmados asimismo en este estudio ($r= 0,67^{***}$ y $0,66^{***}$, correlación entre la carga proviral de la madre y la reactividad de anticuerpos p24 y contra virus completo, respectivamente, y $r= 0,70^{***}$ y $0,75^{***}$ para el título).

Correlación	Reactividad (p24-VC)	Título (p24-VC)
Anticuerpos calostro - Anticuerpos madre	0,52**,-0,52**	0,73***,-0,76***
Anticuerpos madre - carga proviral madre	0,67***,-0,66***	0,70***,-0,75***
Anticuerpos madre - nPCR calostro	0,80***,-0,80***	0,82***,-0,82***
Anticuerpos calostro - nPCR calostro	0,53**,-0,52**	0,63***,-0,63***

Tabla 5.9. Correlación Reactividad vs título de anticuerpos entre distintos tipos de muestras. Nivel de significancia: *** $p<0,0001$, ** $p 0,0001-0,001$, * $p 0,001-0,05$.

Los niveles de reactividad media de anticuerpos difieren significativamente entre madres y terneros, aunque no se diferencian significativamente entre calostros y terneros (Anexo, Comparación de medias).

Con la reactividad de los anticuerpos p24 el valor máximo también fue obtenido por el calostro, seguido por los terneros y las madres (Tabla 5.6). Con la reactividad de los anticuerpos contra virus completo el valor máximo fue alcanzado por los terneros.

5.4 Detección de anticuerpos neutralizantes

5.4.1. Puesta a punto de las condiciones de co-cultivo celular

Entre las líneas celulares indicadores utilizadas en co-cultivo con las células efectoras FLK productoras de VLB, las únicas que mostraron formación de sincicios con la presencia de células multinucleadas de más de 10 núcleos fueron las células de la línea CC81 (Tabla 5.10 Figura 5.8).

Se observaron diferencias de confluencia en las monocapas celulares dependiendo de la relación y concentración celular utilizada (Tabla 5.10). Las relaciones de células 1:10 y 1:5 en las concentraciones $4 \times 10^4 / 4 \times 10^5$ (Fig. 5.8) y $8 \times 10^4 / 4 \times 10^5$ células/ml, permitieron generar co-cultivos con un 50-60 % de confluencia en placas de 24 pocillos, y 70-80 % de confluencia en placas de 96 pocillos. La relación 1:1 y las concentraciones menores presentaron monocapas de menor confluencia con sincicios presentes en forma heterogénea en la periferia o en el centro del pocillo (Tabla 5.10). La relación 1/10 entre FLK y CC81 en concentraciones finales de $4 \times 10^4 / 4 \times 10^5$ células/ml, (fig. 5.8) en placas de 96 pocillos fue considerada la óptima. En estas condiciones se observaron de 9 a 14 sincicios por campo (objetivo 10X). El número de sincicios observados a las 24 y 48 horas fue similar. La conservación de las suspensiones celulares a $6 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3$, durante 24 h, antes del co-cultivo no modificó la capacidad de formación de sincicios en comparación con la utilización de suspensiones celulares recién preparadas.

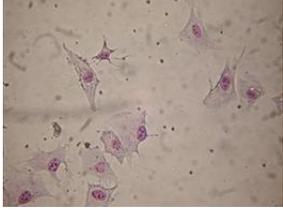
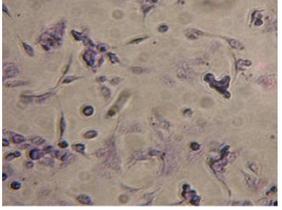
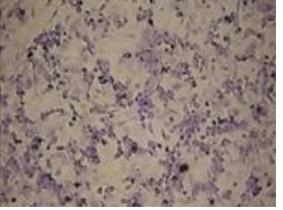
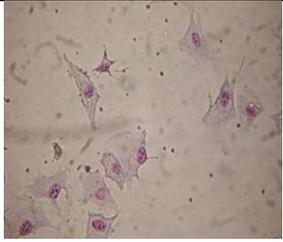
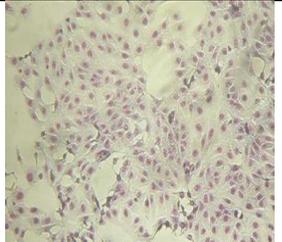
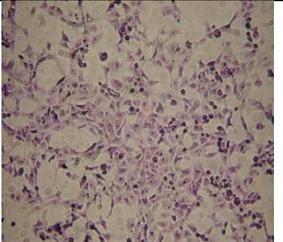
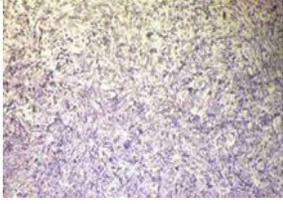
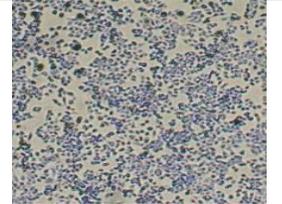
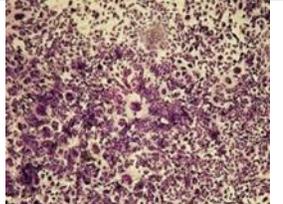
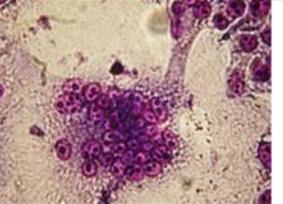
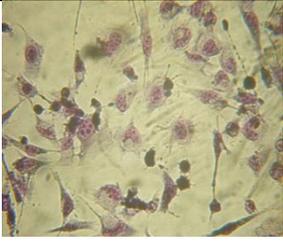
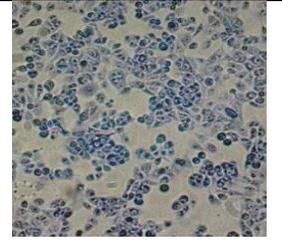
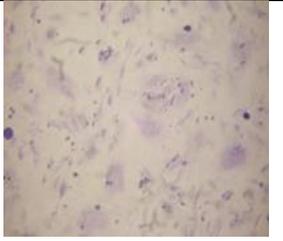
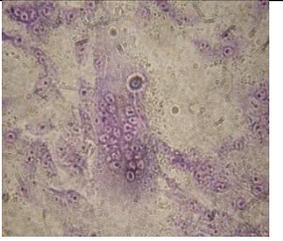
Célula Efectora	Célula Indicadora	Cocultivo	
FLK 2×10^5 cel./ml 20X	Hela 2×10^5 cel./ml 10X	Sin Sincicios 10X	
			
FLK 2×10^5 cel./ml 20X	VERO 2×10^5 cel./ml 4X	Sin Sincicios 10X	
			
FLK 8×10^4 cel./ml 4X	CC81 4×10^5 cel./ml 4X	Sincicios 4X	Sincicios 40X
			
FLK 4×10^4 cel./ml 20 X	CC81 4×10^5 cel./ml 10X	Sincicios 4X	Sincicios 40X
			

Figura 5.8. Ensayos de co-cultivo de las líneas efectoras e indicadoras y sus correspondientes combinaciones. Tinción May Grünwald-Giemsa. X indica el objetivo utilizado para la observación al microscopio.

Co-cultivo (células)	Relación en el co-cultivo	Tipo de placa	Cantidad de células/ml Formación de sincicios y % confluencia		
FLK/CC81	1:1	24	1 x 10 ⁵ / 1 x 10 ⁵ NEGATIVO 30-40%	2 x 10 ⁵ / 2 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%	5 x 10 ⁵ / 5 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%
	1:5		2 x 10 ⁴ / 1 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%	4 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%	8 x 10 ⁴ / 4 x 10 ⁵ SINCICIOS 50-60%
	1:10		1 x 10 ⁴ / 1 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%	2 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵ SINCICIOS 30-40%	4 x 10 ⁴ / 4 x 10 ⁵ SINCICIOS 50-60%
	1:5	96	n/a	4 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵ SINCICIOS 50-60 %	8 x 10 ⁴ / 4 x 10 ⁵ SINCICIOS 70-80 %
	1:10		2 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵ SINCICIOS 50-60 %	4 x 10 ⁴ / 4 x 10 ⁵ SINCICIOS 70-80 %	
FLK/Vero	1:1	24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:5		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:10		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
FLK/Hela	1:1	24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:5		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:10		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Riñón ovino/CC81	1:1	24	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:5		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	1:10		NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla 5.10 Formación de sincicios en las diferentes condiciones de co-cultivo. 24 h de co-cultivo. El porcentaje indica confluencia de la monocapa. La celda coloreada indica la concentración elegida para realizar los ensayos

5.4.2. Puesta a punto del ensayo de detección de anticuerpos por Inhibición de Sincicios

Los ensayos de cocultivo de células FLK y CC81 sin el agregado de suero, realizados en concentraciones finales de $4 \times 10^4 / 4 \times 10^5$ en placas de 96 pocillos, mostraron la presencia de sincicios en forma consistente, con una media de 8,6 sincicios por campo (desvío estándar: 2,44, coeficiente de variación: 28,45 %) en 8 repeticiones realizadas en 2 ensayos diferentes.

Sin embargo, los sueros analizados durante la puesta a punto del ensayo de inhibición de la formación de sincicios, no se comportaron como estaba previsto. En presencia de sueros de animales no infectados, previamente caracterizados como negativos por ELISA y/o IDGA, se observó una mayor frecuencia de co-cultivos sin efecto sincicial (Figura 5.9.b) en todas las diluciones ensayadas excepto en 1/16. En la dilución 1/16, 11 muestras de 19 (57,9 %) provocaron el efecto sincicial en el co-cultivo. (Figura 5.9.b). Este hallazgo fue inverso al esperado, ya que debido a la falta de anticuerpos neutralizantes específicos, deberían haberse formado los sincicios en el sistema celular. El número máximo de sincicios por campo, considerando el total de muestras

ensayadas, se observó en la dilución 1/4 para los seronegativos, que mostró un coeficiente de variación extremadamente alto (Tabla 5.11).

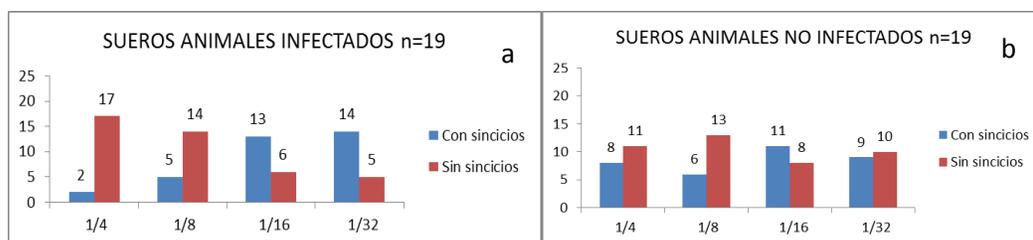


Figura 5.9. Observación de sincicios en cocultivos de células FLK y CC81 en presencia de a-sueros de animales Infectados (Positivos) y b- No Infectados (Negativos). El número indica el número de muestras con y sin efecto sincicial en cada dilución.

INFECTADOS (Seropositivos)					NO INFECTADOS (Seronegativos)				
Dilución	1/4	1/8	1/16	1/32	Dilución	1/4	1/8	1/16	1/32
N	19	19	19	19	n	19	19	19	19
número total de sincicios	2	7	25	34	número total de sincicios	26	6	18	12
promedio	0,11	0,37	1,32	1,79	promedio	1,37	0,32	0,95	0,63
coeficiente de variación	299,54	185,65	98,29	82,42	coeficiente de variación	142,48	151,23	108,30	131,53
varianza	0,10	0,47	1,67	2,18	varianza	3,80	0,23	1,05	0,69
desvío	0,32	0,68	1,29	1,47	desvío	1,95	0,48	1,03	0,83
máximo	1	2	5	5	máximo	5	1	3	3
mínimo	0	0	0	0	mínimo	0	0	0	0

Tabla 5.11 Número de sincicios totales por dilución en ensayos de inhibición del efecto sincicial en muestras de sueros de animales infectados (seropositivos) y no infectados (seronegativos).

En el cocultivo de células FLK y CC81 en presencia de sueros pertenecientes a animales infectados, previamente caracterizados como seropositivos por ELISA y AGID, las primeras 2 diluciones analizadas mostraron menor frecuencia de actividad sincicial, similar a lo que sucedió con los sueros negativos (Figura 5.9a). Las últimas 2 diluciones mostraron el efecto inverso. El número mínimo de sincicios se observó en la dilución 1/4, con un coeficiente de variación extremadamente alto.

Estos hallazgos considerados en su totalidad, permitieron concluir que el ensayo no mostraba una buena performance diagnóstica para detectar anticuerpos específicos, aun cuando había sido descrito como apto para tal fin. Por esta razón no se prosiguió con el análisis de los sueros pertenecientes a las muestras en estudio.

5.5. Validación de la inactivación de VLB durante el proceso de secado spray en calostro

Con el propósito de analizar la capacidad de inactivar la infectividad viral durante el proceso de secado de calostro que actualmente se utiliza en la industria para la elaboración de sustituto, se realizó el secado en escala de laboratorio en muestras de calostro contaminados experimentalmente con células infectadas con VLB y con Virus libre de células, de manera independiente.

Las muestras de calostro contaminado con células y virus libre de células no secadas resultaron infectivas para los corderos susceptibles receptores, mostrando que la viabilidad de la infección no es afectada en presencia de calostro libre de anticuerpos específicos por razones inherentes al tipo de matriz. En cambio, los calostros contaminados con ambos tipos de inóculo y secados, posteriormente reconstituidos en su volumen original e inoculados en los corderos susceptibles receptores, no mostraron ser infectivos, mostrando la capacidad de inactivación viral del proceso (Tabla 5.12 y Figura 5.10).

Fracción en estudio	Secado spray	Infectividad						
		ID Cordero	T0		T30		T60	
			Provirus en sangre	ELISA VC	Provirus en sangre	ELISA VC	Provirus en sangre	ELISA VC
Calostro + células FLK	Si	1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Calostro + sobrenadante células FLK		3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
		4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Calostro + células FLK	No	5	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
		6	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
Calostro + sobrenadante células FLK		7	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
		8	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos

Tabla 5.12 Ensayo de infectividad después del proceso de secado spray del calostro contaminado experimentalmente con VLB T: tiempo post inoculación.

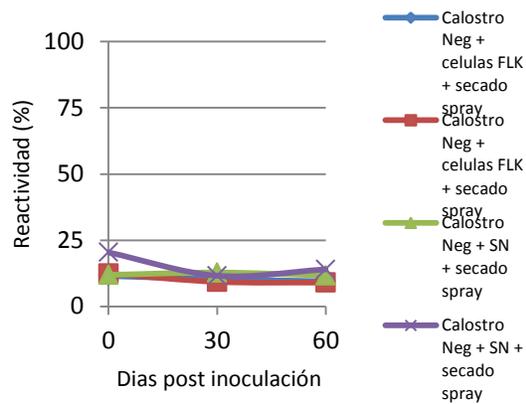


Figura 5.10 Serología (Elisa VC) de los corderos inoculados con calostros sometidos a tratamiento Secado spray.

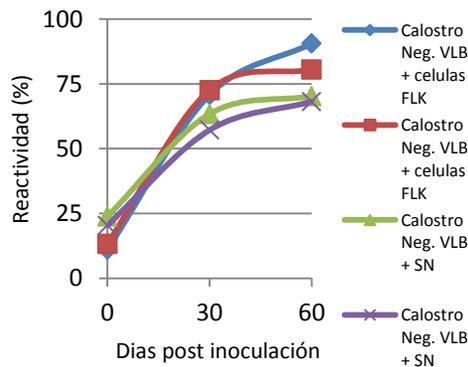


Figura 5.11 Serología (Elisa VC) de los corderos inoculados con calostros sin tratamiento Secado spray.

Por último, el calostro secado con anticuerpos, mostró una leve reducción del título posterior a su reconstitución, no solamente cuando se analizaron los anticuerpos anti VLB, sino también los anticuerpos anti VDV y RVB, mostrando la capacidad de preservación del proceso.

		VLB Elisa VC		BVDV 1a Seroneutralización		BRV Elisa	
		Título pre- secado	Título post secado	Título pre- secado	Título post secado	Título pre- secado	Título post secado
Pool 3	Con anticuerpos naturales anti VLB, BVDV y BRV	1/128 1/128 1/128	1/64 1/32 1/64	3	2,5	65536	16384

Tabla 5.13 Titulación de anticuerpos en calostro con anticuerpos (Pool 3) pre y post-secado. El Elisa VC VLB se hizo por triplicado. BVDV 1 a: Virus de la diarrea bovina serotipo 1a. BRV: Rotavirus bovino.

6. Discusión

Debido a la capacidad de integrarse en forma persistente al genoma de los linfocitos B circulantes, el virus de la leucosis bovina es considerado un patógeno sanguíneo, por lo cual los estudios de transmisión han estado dirigidos mayoritariamente hacia el traspaso de sangre de un animal infectado a otro susceptible, identificando a la iatrogenia como la vía más importante en el contagio. Sin embargo, junto con la vía sanguínea, se han indagado e identificado como posibles y/o probables otras opciones como la transmisión in útero, el contagio por contacto directo, la acción de los insectos hematófagos y la transmisión por consumo de leche y/o calostro (revisado en Hopkins y DiGiacomo, 1997).

El rol de las secreciones lácteas en la transmisión del VLB por vía natural no es claro y ha sido sujeto de múltiples estudios y variadas especulaciones. Según los primeros análisis de riesgo publicados, la transmisión por vía oral, si ocurriera, sería menos frecuente que la transmisión por contacto (Ferrer y Piper 1981 y 1978). Varios autores, incluyendo nuestro grupo de trabajo, describen la presencia de VLB proviral y de virus infeccioso en leche o calostro en la mayoría de las vacas sero-positivas (Burny y col., 1978; Ferrer y col., 1981; Gutiérrez y col., 2015c; Straub, 1983a). Sin embargo, se desconoce si para evitar la infección se debe recomendar o no el suministro a los terneros, en virtud de que se ha reportado su capacidad potencial de protección pero también de infección (Ferrer y Piper, 1981; Lassauzet y col., 1989; Nagy y col., 2007).

Actualmente, la incidencia observada de la infección natural en los primeros 2 años de edad y la observación de que alrededor del 50 % de las vaquillonas parto ya se encuentran infectadas, aún antes de ingresar al sistema de lactancia, cuando se reúnen con el rodeo adulto con altos niveles de infección, permiten suponer que la transmisión por ingestión de células de leche y calostro de madres infectadas, podría tener un papel importante (Lomónaco y col., 2014; Merlini y col., 2016; Thurmond y col., 1983). De hecho, se ha demostrado el potencial infeccioso de ambas secreciones en ensayos experimentales de ovinos y bovinos por consumo oral, aunque en condiciones extremas de dosis infecciosa y de susceptibilidad del hospedador, que no representan la situación natural de las secreciones y/o las características de los terneros de tambo (Kanno y col., 2014; Meas y col., 2002; Miller y col., 1985; Van Der Maaten y col., 1981).

Teniendo en cuenta estos conceptos, y considerando que la vía oral de contagio podría ser viable en condiciones naturales, ya sea a través de células infectadas o virus libre presente en las secreciones lácteas, la transmisión en la edad temprana podría ser controlada si la estrategia de prevención se enfocara en el manejo preventivo de las etapas de calostrado y crianza, además del clásico control de transferencia de sangre en distintos procedimientos productivos, sugerido por los programas

clásicos de profilaxis. En este contexto, y con el propósito final de avanzar en el conocimiento de la infección natural y participar en la construcción de estrategias de control e interrupción del ciclo epidemiológico de transmisión, el objetivo general de esta tesis fue conocer la relación de provirus/anticuerpos en la tríada calostro-madre-ternero y analizar las posibles implicancias del calostrado natural en la progresión de la infección en los rodeos lecheros de nuestro país. La hipótesis sobre la cual se llevó adelante este trabajo consistió en asumir que la relación entre la capacidad protectora e infectiva del calostro es heterogénea y particular de cada tríada calostro/madre/ternero, lo que provocaría distintas situaciones resultantes dependientes de esta relación.

Se analizaron los niveles de anticuerpos y provirus naturalmente presentes en la sangre de las madres, en sus calostros y en sus terneros recién nacidos calostrados en forma natural. Se analizó la relación de anticuerpos y provirus entre las madres y los calostros/terneros para identificar las posibles combinaciones naturales. Finalmente, y con el objetivo de ofrecer a la producción tambora una alternativa en la alimentación de sus terneras que impida la propagación de la infección, se indagó la efectividad del procedimiento de secado spray para inactivar la infectividad del VLB presente en calostro.

La población elegida fue un establecimiento de tambo, de alta prevalencia individual de la infección, asumiendo, que los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser reproducibles en rodeos lecheros de características similares. Trabajamos con un subgrupo de 28 animales, que implicaron alrededor del 10 % del total de animales del establecimiento, porcentaje que cumple con el número de muestras elegibles para sacar conclusiones significativas. Debido a que las pariciones no son estacionadas, se tomaron muestras del triplete madre/calostro/ternero durante 1 mes consecutivo, asumiendo que el triplete sería representativo del comportamiento anual de la infección.

Con el propósito de estimar si los calostros de todas las vacas infectadas tienen un potencial infeccioso similar y/o si el nivel de infección está asociado a la carga proviral circulante, se detectó y cuantificó provirus VLB en muestras individuales de calostro y se analizó su relación con la carga proviral en sangre. La prevalencia individual de provirus en sangre y calostro por nPCR entre las vacas infectadas, fue similar a lo reportado previamente en nuestro grupo de trabajo y por otros autores (Delano, 2009; Gutiérrez y col., 2011). Lo novedoso consistió en la observación de que todos los calostros con provirus detectable por nPCR provenían de madres con provirus detectable en sangre, con una concordancia entre muestras superior al 90 % (Tabla 5.2). Los calostros con provirus detectable provenían de vacas con alta (7/19) y baja (12/19) carga proviral en sangre, con una correlación robusta y significativa entre los niveles de provirus circulante en sangre y la

presencia de provirus en calostro (Tabla 5.4 Figura 5.2). El análisis de comparación de medias confirmó que la probabilidad de que el calostro presente provirus es mayor cuando la vaca posee mayor carga proviral. Esto, junto con la relación también robusta y significativa entre la presencia de provirus en sangre y calostro, nos permite concluir que la aparición de provirus en calostro es un reflejo de los niveles de provirus circulante, y sugiere que las vacas con menores niveles de infección serían de menor riesgo para sus terneros considerando una probable transmisión durante el proceso de calostrado. Teniendo en cuenta estos resultados, se podría considerar la opción de calstrar artificialmente a los teneros con un banco de calostro perteneciente a vacas de carga proviral indetectable. Los hallazgos también sugieren que no existiría una localización viral compartimentalizada en la glándula mamaria, como algunos autores sugieren (Buehring y col., 1994). Aun cuando la carga proviral de los calostros es extremadamente baja, muy inferior a la que se encuentra en sangre (Figura 5.1) los análisis de infectividad han mostrado que el calostro fresco de vacas infectadas resulta infectivo para hospedadores susceptibles por vía experimental (Kanno y col., 2014, Trono y col., comunicación personal).

La detección de provirus en calostro por nPCR (67,8 %), que no alcanzó a ser cuantificable por PCR en tiempo Real (solamente 32,2 %) fue llamativa, así como el consecuente reducido nivel de concordancia entre la prevalencia de detección en sangre y calostro (Tabla 5.2 y 5.3). Para confirmar la validez de estos resultados se realizó un análisis de sensibilidad analítica comparativa entre ambos ensayos de PCR con 16 muestras no relacionadas de sangre y calostro, utilizando como templado el ADN genómico total en diluciones seriadas decrecientes en base 2 (Ver Anexo: Información Suplementaria). Los resultados sugieren que los niveles reducidos de provirus integrado al genoma que se utiliza como templado en la reacción de PCR son detectados con diferente eficiencia por ambas reacciones de PCR, viéndose favorecida la performance diagnóstica de la reacción de nested PCR, y sugiriendo que no se trata de una interferencia de los componentes específicos del calostro sino de una consecuencia de los bajos niveles de provirus integrado. Según nuestro punto de vista, debido a que las sangres poseen un nivel de provirus significativamente superior a los calostros, la sensibilidad diagnóstica se ve menos afectada cuando se utiliza esta matriz. Complementariamente, las 28 muestras de sangre y calostro pertenecientes a este trabajo de tesis, fueron sometidas a otro ensayo de PCR en tiempo real que se utiliza en el laboratorio para la cuantificación absoluta. En este caso, también se observó una reducida prevalencia de detección en calostro ($16/28= 57,1\%$) con respecto a la sangre ($22/27= 81,5\%$) lo que permitió validar nuestro hallazgo original (no mostrado).

Estos resultados muestran que el nivel de provirus en los calostros de los animales infectados naturalmente con VLB es heterogéneo, algo nunca antes reportado. Como consecuencia, habría

algunos calostros con mayor potencial infectivo que otros, como ha sido reportado en sangre, donde se ha demostrado que los animales con menores niveles de infección circulante son menos eficientes para provocar una transmisión experimental a bovinos receptores susceptibles, aún en ensayos de suministro oral (Mammerickx y col., 1983). En la misma línea de razonamiento, se ha reportado el aumento del riesgo en la transmisión de HTLV y HIV durante el proceso de calostrado natural de madres infectadas, riesgo que aumenta a medida que aumenta el tiempo de consumo posterior de leche (Mallampati y col. 2015; Wiktor y col., 1997). Nuestros resultados sugieren que si bien el potencial infectivo del calostro sería reducido con respecto al de la sangre, deberían tomarse medidas para evitar el consumo de calostro fresco, tanto para el calostrado natural como para la provisión artificial. Si bien no se conocen los mecanismos que utiliza el virus para infectar por la vía oral, la infección podría ser consecuencia del ingreso de células del calostro infectadas a la circulación del ternero (antes del cierre de la gotera esofágica), pero también el virus podría expresarse a partir de estas células e ingresar a través de la mucosa intestinal. De ahí en adelante, varios caminos podrían ser posibles, entre ellos, progresar hacia la integración, ser clarificado inmediatamente por el sistema inmune innato y/o por la interferencia con anticuerpos pasivos calostrales, o “escondarse” en ciertas regiones anatómicas donde podría permanecer protegido hasta el descenso de la vigilancia inmunológica, como sucede con el virus de la inmunodeficiencia humana (Siliciano y col. 2011).

Debido a la correlación del nivel de infección sanguíneo y la presencia de provirus en calostro, las madres infectadas con carga proviral indetectable en sangre serían una fuente de calostro “seguro”, que podría utilizarse para la formación de un banco de calostro y ser utilizado en remplazo del calostrado natural para terneros nacidos de madres de alta carga proviral (en este establecimiento el 25 %). Construir un banco de calostro proveniente de vacas con un nivel de infección indetectable podría ser una solución aplicable a nuestra realidad considerando que representan alrededor del 30 % del rodeo. Este dato podría resultar interesante a nivel productivo, ya que una de las posibles intervenciones de manejo referidas en la literatura y en los manuales sanitarios, consiste en constituir un banco de calostro procedente de animales no infectados. En caso de optar por esta propuesta, lo óptimo sería analizar la presencia de provirus en cada colecta individual que sea utilizada para la conformación del banco de calostro, esto obligaría a tener las colectas en cuarentena hasta conocer el resultado para poder conformar el banco seguro de calostro. Una opción alternativa, sería optar por el diagnóstico materno, en un ensayo periparto inmediato, ya que como vimos durante este trabajo, los niveles de carga proviral y los niveles de anticuerpos circulantes son indicadores de la presencia de VLB en calostro (Fig.5.5; 5.6; 5.7a y 5.7b). Con esta metodología debemos tener en cuenta que aun estamos corriendo riesgo ya que la correlación no es total y que

además, debido a que la fuente de infección también son los linfocitos y/o otras células presentes en esta secreción, sería muy oportuno estudiar el perfil dinámico de detección de provirus en calostro, con el objeto de descartar una posible excreción transitoria aún en animales con bajos niveles de provirus en sangre.

Las vacas con provirus indetectable también serían deseables en una estrategia de producción de terneros “limpios”. En este trabajo observamos que ninguna de las vacas con provirus indetectable en sangre dio lugar al nacimiento de un ternero con provirus detectable en el primer día de vida (Anexo, Resultados crudos). Lo mismo se observó en un trabajo previo en nuestro laboratorio, con rodeos de características similares (Gutiérrez y col., 2017; Gutiérrez y col., 2011; Merlini y col.2016). De hecho, aunque no es posible conocer la fuente de infección de los tres terneros detectados como infectados en este estudio, una de las opciones es que hayan adquirido la infección por el consumo de calostro de sus madres durante el proceso de calostrado natural. Los 3 consumieron calostro con provirus detectable, y los 3 nacieron de madres con carga proviral con un ratio de 0,5 o superior (Tabla 5.8). Si bien no contamos con la metodología para detectar la trazabilidad de la infección, consideramos que el contagio de su propia madre podría deberse al consumo de calostro, así como también a la transmisión in útero, como ha sido previamente descrito (Straub y col., 1982).

Como conclusión general del objetivo 1, podemos decir que, así como sucede con la sangre, los niveles de provirus son heterogéneos en los distintos calostros individuales, y estos niveles están relacionados con el nivel de infección sistémico. En consecuencia, no todas las vacas infectadas tendrían un mismo potencial infeccioso en el caso de que la transmisión natural por consumo de calostro fuera demostrada.

Con el propósito de estimar si todas las vacas tienen el mismo potencial de transferencia de inmunidad pasiva y/o si este potencial está asociado al nivel de infección en sangre, el segundo objetivo de este trabajo de tesis consistió en cuantificar el nivel de anticuerpos específicos en sangre y calostro de madres en el período periparto y en sangre de sus propios terneros. De forma complementaria, se analizó la relación entre la carga proviral y la presencia de provirus en calostro y el nivel de anticuerpos en calostro y sangre.

En ensayos previos a esta tesis, nuestro equipo de trabajo indagó la respuesta de anticuerpos IgM, IgG1 e IgG2 en animales infectados naturales, con la finalidad de discriminar por isotipos. Las muestras de campo mostraron un perfil de reactividad extremadamente bajo con respecto a la reactividad de IgG totales (no publicado). En este contexto, la validación de los ensayos de ELISA para detectar anticuerpos, se realizó utilizando como anticuerpo secundario anti Inmunoglobulinas G bovinas totales, debido a que se trata del isotipo predominante en sangre y secreciones lácteas en

infecciones con VLB, siendo la mayoría del subtipo IgG1 (Burny y col., 1980; Gatei y col., 1990). Buscando también la distinción de isotipos en la respuesta inmune específica, Heeney y col. (1988), mostraron que la respuesta contra las proteínas virales principales gp51 y p24 en infecciones naturales es mayormente de tipo IgG1 e IgM, sin diferencias significativas entre ambas en cursos no tumorales. El isotipo IgM es raramente encontrado en casos de linfosarcoma, mientras que IgG2 e IgA son detectable en algunos casos con sintomatología tumoral, pero en forma rara e infrecuente en suero de animales con infecciones subclínicas.

En secreciones lácteas, Burny y col. (1980), describieron que el subtipo específico dominante en infecciones con VLB es la IgG1, por lo cual Mammerickx y col., en una publicación de 1985, aconsejaron el uso de este isotipo, postulando que mejoraría la sensibilidad con respecto al uso de ensayos que detecten inmunoglobulinas IgG totales, por lo que el interrogante sobre la reactividad diferencial por isotipos, permanece aún abierto. Sin embargo, todos los ensayos indirectos de ELISA con fines diagnósticos reportados hasta el momento utilizan anti IgG totales, y su uso se encuentra validado por el Manual de las enfermedades de los animales terrestres de la OIE (2018).

Como había sido reportado previamente (Burrige y col., 1982; Gutiérrez y col., 2009; Rama y col., 2012), se detectaron vacas sin reactividad serológica en sangre pero con anticuerpos en calostro, más marcado para los anticuerpos p24 (25 %) que para los anticuerpos contra virus completo (10,7 %) (Tabla 5.1). Debido a que estas vacas eran de carga proviral indetectable en sangre, los resultados sugieren que contenían bajos niveles de anticuerpos en el momento periparto, y que debido a la situación fisiológica natural de transferencia hacia la glándula mamaria, el nivel sistémico cayó por debajo del límite detectable. La ausencia de anticuerpos en sangre muestra que se podrían declarar resultados falsos negativos si se realiza el diagnóstico de la infección por serología individual durante el periparto, sobre todo si se detectan anticuerpos p24, mostrando a la vez que los anticuerpos contra virus completo son un mejor indicador en este período. Asimismo, los resultados muestran que la técnica de nPCR no complementa el diagnóstico serológico en este momento fisiológico, ya que entre estas madres, solamente se detectó provirus en una (#3832). Esta evidencia sugiere que el periparto representa un período crítico no solamente para la transmisión, debido a la reducción de los anticuerpos en sangre junto a la exposición a las vacas adultas del rodeo con altos niveles de infección, sino también para el diagnóstico.

La correlación significativa entre el nivel de anticuerpos en sangre y calostro, y entre calostro y ternero (Figura 5.4), así como el nivel significativamente más alto de anticuerpos en calostros y terneros que en sangre materna (Figura 5.3), evidenciaron una buena transferencia de anticuerpos desde la sangre a la glándula mamaria y al calostro y posteriormente, la transferencia de inmunidad pasiva a los terneros. El rango de anticuerpos en animales naturalmente infectados en calostro no

había sido reportado hasta el momento así como tampoco su relación con la presencia y cantidad de provirus. Fue llamativa la observación de títulos extremadamente altos, nunca antes observados en sangre, como 1/16384 (p24) y 1/2048 (VC), mostrando la eficacia en la concentración de anticuerpos de la glándula mamaria bovina, como ya ha sido extensamente reportado (revisado en Hurley y Theil, 2011) Si bien la correlación entre el nivel de anticuerpos en calostro y la presencia de provirus fue significativa (Figura 5.4), los calostros con niveles altos de anticuerpos no fueron aquellos que mostraron mayores niveles de provirus (Figura 5.5 y 5.6). De hecho, los calostros con mayores niveles de provirus pertenecían a vacas con niveles medios de anticuerpos (Figura 5.7b) Asimismo, observamos que los tres terneros con provirus detectable en sangre, tuvieron acceso al calostro natural con títulos medios de anticuerpos lo que podría indicar que no habría sido suficiente con los niveles de anticuerpos consumidos junto con el provirus para detener el progreso de la infección. Según nuestro punto de vista, estas vacas plantearían el desafío más importante con respecto a su potencial de infección/protección a través del calostro.

La correlación robusta entre el nivel de anticuerpos en sangre materna y la presencia de provirus en calostro (Figura 5.4 Tabla 5.9), similar a la obtenida entre la carga proviral en sangre y la presencia de provirus en calostro mencionada en el Objetivo 1, muestran que el nivel de infección sistémico se ve reflejado en calostro con ambas variables sanguíneas (carga proviral y anticuerpos) de manera similar, mejor aún que con el nivel de anticuerpos en el propio calostro. Estos hallazgos permitirían la identificación y selección de las vacas que podrían ser donantes de calostro para formar un banco “seguro”, como se discutió anteriormente, con un ensayo de ELISA, considerablemente más económico, simple y rápido que un ensayo de PCR.

Teniendo en cuenta que la reactividad de los sueros en el ensayo de ELISA analizados en dilución única podría ser un indicador comparable con el título de anticuerpos, así como había sido definido previamente para los niveles de anticuerpos en sangre (Gutierrez y col., 2009), hicimos el análisis comparativo de ambas variables, y observamos que el título de anticuerpos es mejor que la reactividad para el análisis de los calostros provenientes de animales naturalmente infectados (Fig. 5.3). La única excepción la plantea la correlación entre anticuerpos en sangre de la madre y la presencia de provirus en calostro, comparable en intensidad y significancia con la correlación entre la carga proviral y el título de anticuerpos en el calostro (Tabla 5.9). Estos resultados muestran que la reactividad podría ser considerada para el análisis de screening en el momento de identificar donantes de calostro seguro, proponiendo una alternativa más económica y sencilla que la titulación. En este mismo contexto, intentando encontrar ensayos de aplicación factible, pudimos observar que ambos tipos de anticuerpos en sangre y calostro son indicadores de la presencia de provirus en calostro. Por lo cual se podría elegir el método de ELISA p24 a favor del ensayo de

ELISA VC, de metodología más económica y sencilla. A diferencia del antígeno utilizado en el ELISA de virus completo y/o en el ensayo de Inmunodifusión en gel de agar, el antígeno de ELISA p24 es producido en E.coli, lo que significa un menor costo de producción, menor riesgo biológico y mayor rendimiento, algo de importancia crítica en el contexto económico nacional.

La idea original de este trabajo de tesis, era evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes naturalmente en sangre y calostro. A tal fin se ajustaron las condiciones del cocultivo de células efectoras e indicadoras de VLB, con el fin de poner a punto un ensayo de Inhibición de sincicios por efecto específico de los anticuerpos presentes en la muestra, agregados al co-cultivo siguiendo las recomendaciones de las publicaciones que mencionaban este ensayo.. El efecto previsto consistía en la aparición de efecto sincicial en el cocultivo cuando no hubiera anticuerpos específicos en el sistema y por el contrario, en la inhibición del efecto sincicial en presencia de anticuerpos en la muestra en estudio. El cocultivo de células efectoras de FLK-VLB e indicadoras CC81, sin agregado de suero problema mostró la presencia franca de sincicios tal como se esperaba. Sin embargo, al utilizar sueros negativos de campo, pertenecientes a animales no infectados, previamente caracterizados en el tiempo por ELISA y/o IDGA, el cocultivo no mostró la presencia de sincicios cuando se analizó la muestra en la menor dilución posible, siguiendo lo reportado en las publicaciones. En la menor dilución, se observó la aparición de sincicios en menos de la mitad de las muestras (8 de 11). De modo interesante, con los sueros pertenecientes a animales infectados, únicamente 2 de 19 mostraron sincicios, lo que parecía ser alentador. La presencia de interferencia y/o toxicidad en las muestras en bajas diluciones suele ser un problema en los ensayos de neutralización viral, por lo cual se procedió a hacer los análisis en diluciones seriadas, esperando que apareciera mayor frecuencia de sincicios en las muestras negativas, mientras aumentaba o permanecía constante la frecuencia de muestras positivas que mostraban el efecto de inhibición. En la dilución 1/16 ambos tipos de muestras se comportaron de manera similar, con la mayoría de muestras que mostraban sincicios. Si bien el efecto fue alentador en los inicios, cuando este experimento se repitió con varias muestras y con distintas concentraciones celulares no se observó el efecto esperado. Intentando evaluar los niveles de expresión viral diferenciales entre las muestras serológicamente positivas y negativas, dejando de lado el fenotipo sincicial, ensayamos los sobrenadantes de los cocultivos utilizando un ELISA de captura que detecta y cuantifica los niveles de VLB activo en la muestra. Tampoco así pudimos observar resultados concluyentes a favor del efecto neutralizante de los sueros de bovinos infectados (no mostrado). Con estos resultados contradictorios, decidimos no seguir adelante con esta metodología. Según nuestro punto de vista, este ensayo resulta laborioso, consume mucho tiempo y necesita de condiciones celulares extremadamente repetibles, sin las cuales se podría ver afectado el efecto final esperable. Si bien se

utilizó durante los primeros años después del descubrimiento del VLB, ya no se utiliza en los laboratorios de diagnóstico y no hay publicaciones científicas que lo mencionen actualmente. Probablemente su ajuste depende de condiciones de alta astringencia que no son fáciles de lograr, lo que ha provocado la falta de uso cotidiano. Queda entonces pendiente, la demostración de la capacidad neutralizante versus la capacidad infectiva de calostros con distintas relaciones de anticuerpos y provirus. Debido a la falta de progresión del ensayo de inhibición de sincicios, esta evidencia se obtendrá realizando ensayos de neutralización in vivo en ovinos utilizando calostros con anticuerpos, contaminados experimentalmente con VLB como prueba de concepto, antes de avanzar hacia los ensayos de dosis/respuesta con muestras naturales.

Como conclusión del segundo objetivo podemos decir que al igual que la carga proviral de la madre, el nivel de anticuerpos en sangre y en calostro, resultan ser predictores de la presencia de provirus en calostro con el mismo nivel de confianza. Complementariamente terneros que consuman calostro con niveles medios de anticuerpos podrían ser los más expuestos al riesgo de infectarse por consumo oral.

Considerando la presencia de VLB en calostro, la estrategia para la creación de bancos de calostro libres de virus infeccioso resulta de importancia crítica. En este contexto, el tercer y último objetivo de este trabajo consistió en analizar la capacidad de inactivación viral del VLB durante el proceso de secado spray del calostro. Este tratamiento se utiliza para secar productos con alto grado de humedad de distintos orígenes, cuya finalidad es generalmente, ser parte de piensos animales o alimentos de consumo humano, como leche, huevo, plasma y gelatina de pescado entre otros, sin perder sus características organolépticas ni sus cualidades nutricionales. Sumado a estos beneficios, se agrega la conservación de los productos tratados a temperatura ambiente, lo que reduce el costo de traslado, y/o almacenamiento en espacios refrigerados. El secado spray o por atomización de gotas es utilizado en muchas otras aplicaciones industriales además del área alimentaria, como los sectores cerámico, químico y farmacéutico (Masters, 1991). Incluso se ha demostrado su capacidad para el mantenimiento de la calidad de formulaciones vacunales durante el almacenamiento (Kanojia y col., 2017; Li y col., 2015).

Una ventaja distintiva de este sistema de secado, es la conservación del producto mientras se preserva la funcionalidad de sus componentes, particularmente de las inmunoglobulinas (Gikanga y col., 2015; Niewold y col., 2007;), algo de vital importancia cuando se trata de productos que contienen anticuerpos que deben ser preservados, como suero, plasma, leche y calostro. En el caso del uso de una estrategia de sustitución y/o suplementación del calostrado natural por un calostrado artificial utilizando un producto libre de virus, resulta crítico evitar la reducción y/o degradación de las inmunoglobulinas, ya que a la vez que es importante proteger al ternero recién nacido de la

infección con VLB y otros patógenos, resulta asimismo de importancia crítica que éste adquiera inmunidad pasiva. Hoy en día, los tambos de nuestro país que utilizan bancos de calostro para suplementación o sustitución, preservan el calostro en freezer doméstico hasta el momento de su utilización. Algunos establecimientos han iniciado el proceso de tratamiento térmico por calentamiento a 60 °C previo al uso y/o congelado, con el propósito de garantizar la inactivación de patógenos sin reducir el contenido de inmunoglobulinas y evitando la coagulación de la secreción, aunque esto resulta técnicamente dificultoso durante el manejo diario a la vez que consume tiempo. En este contexto, el uso de calostro en polvo elaborado con el proceso de secado spray podría ser una estrategia factible. No habría que descongelar y/o tratar el calostro ante cada nuevo nacimiento sino que la maniobra se reduciría a rehidratar el polvo en el momento de uso y proceder a la administración.

La utilidad del tratamiento de secado spray de calostro protegiendo la funcionalidad de las inmunoglobulinas fue reportada (Chelack y col., 1993) y a partir de entonces ha sido utilizado en la fabricación de sustituto comercial de calostro que se consume actualmente en varios países para la sustitución y/o suplementación del calostrado natural. De hecho, se ha reportado la presencia de anticuerpos en terneros de cría del Reino Unido, donde la infección con VLB ha sido erradicada, debido al uso de un sustituto de calostro procedente de Estados Unidos, lo que confirma la capacidad de mantener intactas las inmunoglobulinas (Choudhury y col., 2013, 2015).

En Argentina no se produce calostro en polvo, aunque el tratamiento se utiliza para la producción de sustituto lácteo, elaborado en base a leche fluida. También se utiliza para la elaboración de suplementos dietarios en base a huevo en polvo que contienen anticuerpos específicos para combatir diarreas neonatales en el tambo. Es decir, que nuestro país cuenta con la capacidad instalada para realizar este tipo de productos, tanto a pequeña como a gran escala.

La capacidad de inactivación viral del tratamiento de secado spray fue reportada (Pujols y Segales, 2014), aunque no en particular para calostro y/o para el virus VLB. Los ensayos realizados en este estudio demostraron que el proceso de secado spray del calostro es capaz de inactivar la infectividad del VLB asociado a células o en forma de virus libre sin eliminar los anticuerpos específicos (Tabla 5.12 Figura 5.10). Con estos resultados es posible pensar en la provisión de calostro secado, que garantice el aporte de inmunidad pasiva en ausencia de peligro de infección y con la capacidad nutricional intacta.

Considerando los hallazgos de los objetivos 1, 2 y 3 en forma integral, creemos que la estrategia de calostrado de los animales que nacen en un establecimiento donde la prevalencia de VLB es alta y donde habrá una subpoblación de vacas con alta carga proviral y alto riesgo de transmisión, sería ofrecer la provisión de calostro libre de infectividad viral, que contenga anticuerpos en la mayor

cantidad posible, y simplificando además, las maniobras de manejo. Utilizando este tratamiento, todos los calostros podrían ser incluidos en el banco de calostro, aún aquellos provenientes de vacas de alta carga proviral y/o con presencia de provirus, que sería suministrado inmediatamente después del nacimiento, reduciendo de esta manera el riesgo de infectividad asociado al consumo, y manteniendo su potencial protectorio.

Actualmente, los bancos de calostro se preparan en cada establecimiento considerando únicamente la cantidad de proteínas totales con el propósito final de ofrecer un producto que permita adquirir inmunidad pasiva y resistir los primeros meses de vida mientras madura la respuesta inmune. Siguiendo este razonamiento, y sin interferir en el manejo actual, podríamos ofrecer al sistema un producto de mejores condiciones, donde se podría analizar y cuantificar no solamente la presencia de inmunoglobulinas totales y/o específicas, sino que su inocuidad estaría garantizada, además de una mayor facilidad de manejo durante las maniobras de provisión. Como un efecto colateral adicional, podría elevarse el nivel de anticuerpos pasivos en todas las terneras, con el objetivo final de que aquellas que nacen de madres con bajos niveles de anticuerpos, puedan enfrentar el desafío natural que plantea la infección durante todo el período de cría y recría, por consumo de calostro/leche y al contacto periódico con otros animales infectados.

Para finalizar, en un plan que incluya el asesoramiento sobre las mejores prácticas de manejo en el tambo, los datos que surgen de este trabajo de tesis resultan importantes, ya que podrían ser considerados en la construcción de estrategias válidas para disminuir la transmisión de la infección desde la edad temprana.

7. Conclusiones

- La aparición de provirus en calostro es un reflejo de los niveles de provirus circulante, y sugiere que las vacas con menores niveles de infección serían de menor riesgo para sus terneros considerando una probable transmisión durante el proceso de calostrado.
- Así como sucede con la sangre, los niveles de provirus son heterogéneos en los distintos calostros individuales, y estos niveles están relacionados con el nivel de infección sistémico. En consecuencia, no todas las vacas infectadas tendrían un mismo potencial infeccioso en el caso de que la transmisión natural por consumo de calostro fuera demostrada.
- Al igual que la carga proviral de la madre, el nivel de anticuerpos en sangre y en calostro, resultan ser predictores de la presencia de provirus en calostro. Complementariamente, los terneros que consuman calostro con niveles medios de anticuerpos podrían ser los más expuestos al riesgo de infectarse por consumo oral.
- El tratamiento de secado spray del calostro es válido para inactivar la infectividad del VLB y podría ser considerado para la elaboración de sustituto que garantice la provisión de nutrientes y anticuerpos en condiciones de inocuidad viral.

8. Referencias

- Aida, Y.; Murakami, H.; Takahashi, M.; Takeshima, S. (2013) Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.* 4: 328:1-11.
- Adam, E.; Kerkhofs, P.; Mammerickx, M.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (1996) The CREB, ATF-1, and ATF-2 transcription factors from bovine leukemia virus-infected B lymphocytes activate viral expression. *J. Virol.* 70: 1990-1999.
- Alencar Filho, R.; Mazanti, M.; Saad, A.A.; Pohl, R. (1979) Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (LLC) dos bovinos no estado de São Paulo. *Biológico, São Paulo.* 45 (3):47-54.
- Alejo, D.; Gutiérrez, S.; Dolcini, G.; Esteban, E.; Odeon, A.; Fernandez Sainz, I.; Casaro, A. (2000) Prevalencia de la infección por el virus de la Leucosis bovina (BLV) en tambos de los partidos de General Pueyrredón y Balcarce. *Revista Argentina de Producción Animal.* 20 (1):77-83.
- Alexandersen, S.; Carpenter, S.; Christensen, J.; Storgaard, T.; Viuff, B.; Wannemuehler, Y.; Belousov, J.; Roth, J. (1993) A Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol.* 67:39-52.
- Altanerova, V.; Portetelle, D.; Kettmann, R.; Altaner, C. (1989) Infection of rats with bovine leukaemia virus: establishment of a virus-producing rat cell line. *J. Gen. Virol.* 70 (7):1929-1932.
- Alvarez, I.; Gutiérrez, G.; Gammella, M.; Martínez, C.; Politzki, R.; González, C.; Caviglia, L.; Carignano, H.; Fondevila, N.; Poli, M.; Trono, K. (2013) Evaluation of total white blood cell count as a marker for proviral load of bovine leukemia virus in dairy cattle from herds with a high seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus. *Am J Vet Res.* 74 (5):744-9.
- Alvarez, I.; Gutiérrez, G.; Politzki, R.; González, C.; Martínez, C.; Gammella, M.; Trono, K. (2011) "Bovine leukemia virus proviral load in naturally-infected animals". 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses. Leuven, Bélgica.
- Andrade, J.; Almeida, M. (1991) Prevalencia da Leucose enzootica dos bovinos na bacia leiteira de Goiania Goiás. *A hora Vet.* 60:49-53.
- Avidan, O.; Meer, M.E.; Oz, I.; Hizi, A. (2002) The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. *Eur J Biochem.* 269:859-867.

- Bai, L.; Otsuki, H.; Sato, H.; Kohara, J.; Isogai, E.; Takeshima, S-N; Aida, Y. (2015) Identification and characterization of common B cell epitope in bovine leukemia virus via high-throughput peptide screening system in infected cattle. *Retrovirology*. 12 (1):106.
- Barez, P.Y.; de Brogniez, A.; Carpentier, A.; Gazon, H.; Gillet, N.; Gutiérrez, G.; Hamaidia, M.; Jacques, J.R.; Perike, S.; Neelature Sriramareddy, S.; Renotte, N.; Staumont, B.; Reichert, M.; Trono, K.; Willems, L. (2015) Recent Advances in BLV Research. Mansky L, ed. *Viruses*. 7 (11):6080-6088.
- Barrios, C.; Rensetti, D.; Esteban, E.; López-Villalobos, N.; Juliarena, M. (2014) Efecto de la infección por el virus de la leucosis bovina (BLV) en parámetros productivos y sanitarios. 37° Congreso Argentino de Producción Animal Asociación argentina de producción animal CABA UBA 20 al 22 de octubre de 2014.
- Baruta, D.A.; Ardonio, S.M.; Brandan, J.L.; Sosa, R.E.; Mariani, E.L.; Albretch, E.M. (2011) Leucosis bovina enzoótica. *Ciencia Veterinaria*. 13 (1):9-16.
- Blagitz, M.G.; Souza, F.N.; Batista, C.F.; Azevedo, L.F.; Sanchez, E.M.; Diniz, S.A.; Silva, M.X.; Haddad, J.P.; Della Libera, A.M. (2017) Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res. Vet. Sci*. 24 (114):109-116.
- Bech-Nielsen, S.; Piper, C. E.; Ferrer, J.F. (1978) Natural model of transmission of the bovine leukemia virus:role of blood-sucking insects. *Am.J.Vet.Res*. 39:1089-1092.
- Bollinger, O. Über Leukämie bei den Haustieren. (1874) *Virchows Arch*. 59:341-349.
- Brooks, P.A.; Nyborg, J.K.; Cockerell, G.L. (1995) Identification of an NF-kappa B binding site in the bovine leukemia virus promoter. *Journal of Virology*. 69 (10):6005-6009.
- Bruck, C.; Portetelle, D.; Mammerickx, M.; Mathot, S.; Burny, A. (1984) Epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51 recognized by sera of infected cattle and sheep. *Leuk Res*. 8 (3):315-21.
- Bruck, C.; Mathot, S.; Portetelle, D.; Berte, C.; Franssen, J.D.; Herion, P.; Burny, A. (1982) Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology*. 122:342-52.
- Buehring, G. C.; Kramme, P. M.; Schultz, R. D. (1994) Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab Invest*. 71 (3):359-65.
- Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portetelle, D.; Van den Broeke, A.; Willems, L.; Thomas, R. (1988) Bovine leukemia: Facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol*. 17 (3):197-218

- Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portatelle, D.; Van den Broeke, A.; Willems, L.; Thomas, R. (1988) Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32:149-70.
- Burny, A.; Bruck, C.; Cleuter, Y.; Couez, D.; Deschamps, J.; Ghysdael, J.; Gregoire, D.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portatelle, D.; Willems, L. (1985a) Bovine Leukemia Virus a Versatile Agent with Various Pathogenic Effects in Various Animal Species. *Cancer Research.* 45: 4578-4582
- Burny, A.; Bruck, C.; Cleuter, Y.; Couez, D.; Deschamps, J.; Gregoire, D.; Ghysdael, J.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G. D. Portatelle, D.; Willems, L. (1985b) Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res.* 52:133-144.
- Burny, A.; Bruck, C.; Chantrenne, H.; Cleuter, Y.; Dekegel, D.; Ghysdael, J.; Kettmann, R.; Leclercq, M.; Leunen, J.; Mammerickx, M. (1980) Bovine leukemia virus: Molecular biology and epidemiology. En: Klein, G. editor. *Viral Oncology.* Raven Press. New York. NY. USA. 231-289.
- Burny, A.; Bex, F.; Chantrenne, H.; Cleuter, Y.; Dekegel, D.; Ghysdael, J.; Kettmann, R.; Leclercq, M.; Leunen, J.; Mamerickx, M.; Portatelle, D. (1978) Bovine Leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv.Cancer Res.* 28:251-311.
- Burrige M.J., Thurmond M.C., Miller M.J., Schmerr M.J.F. and Van Der Maaten M.J. (1982) Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can J Comp Med.*; 46 (3): 270–271.
- Callebaut, I.; Voneche, V.; Mager, A.; Fumiere, O.; Krchnak, V.; Merza, M.; Zavada, J.; Mammerickx, M.; Burny, A.; Portatelle, D. (1993) Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol.* 67:5321-7.
- Camargos, M.F.; Stancek, D.; Rocha, M.A.; Lessa, L.M.; Reis, J.K.; Leite, R.C. (2002) Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49:325-31.
- Castellano, A y Goizueta, M. (2014) Valor agregado institucional: captación de valor económico de innovaciones tecnológicas Investigadores del Área de Economía y Sociología Rural. IV Congreso Regional de Economía Agraria y XLV Reunión anual de la AAEA Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. 21 al 23 de Octubre de 2014.
- Chelack, B.; Morley, P.; Haine, D. (1993) Evaluation of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. *Can. Vet. J.* 34:407-412.
- Cherney, T.M.; Schultz, R.D. (1996) Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines after challenge exposure with bovine leukemia virus-infected lymphocytes. *Am.J.Vet.Res.* 57 (6):812-818.

- Choudhury, B.; Finnegan, C.; Phillips, A.; Horigan, M.; Pollard T.; Steinbach, F. (2015) Detection of Bovine Leukaemia Virus Antibodies and Proviral DNA in Colostrum Replacers. *Transbound Emerg* 62 (5):60-1.
- Choudhury, B.; Finnegan, C.; Frossard, J.; Venables, C.; Steinbach, F. (2013) Colostrum replacer and bovine leukemia virus seropositivity in calves. *Emerg. Infect.* 19 (6):1027-8.
- Ciprian, F. (1973) Comprobación de la leucemia bovina en Argentina. *Rev. Medica Vet.* 54: 270-271.
- Debacq, C.; Asquith, B.; Kerkhofs, P.; Portetelle, D.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (2002) Increased cell proliferation, but not reduced cell death, induces lymphocytosis in bovine leukemia virus-infected sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10048-10053.
- Debacq, C.; Asquith, B.; Reichert, M.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (2003) Reduced cell turnover in bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle. *J. Virol.* 77:13073-13083.
- Debacq, C.; Sanchez Alcaraz, M.T.; Mortreux, F.; Kerkhofs, P.; Kettmann, R.; Willems, L. (2004) Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants. *Retrovirology.* 1:31.
- de Brogniez, A.; Mast J.; Willems, L. (2016) Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses.* 24 8 (4):88.
- de Brogniez, A.; Bouzar, A.B.; Jacques, J.R.; Cosse, J.P.; Gillet, N.; Callebaut, I.; Reichert, M.; Willems, L. (2015) Mutation of a single envelope N-linked glycosylation site enhances the pathogenicity of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 89:8945-8956.
- Defoiche, J.; Debacq, C.; Asquith, B.; Zhang, Y.; Burny, A.; Bron, D.; Lagneaux, L.; Macallan, D.; Willems, L. (2008) Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 143:240-247.
- Della Libera, A.M.; de Souza, F.N.; Batista, C.F.; Santos, B.P.; de Azevedo, L.F.; Sanchez, E.M.; Diniz, S.A.; Silva, M.X.; Haddad, J.P.; Blagitz, M.G. (2015) Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary Research.* 46:2.
- Delano, C.M.S. (2009) Bovine leukemia virus in colostrum cells from dairy cows. University of California. Davis. 100 pages; 1470230. Tesis Doctoral.
- De la Sota, M.D. (2004) Leucosis Bovina Enzoótica. En: Manual de Procedimientos -Leucosis Bovina Enzoótica. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. SENASA 9:1-34.

- Derse, D. (1987) Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by *cis*-acting response elements. *J. Virol.* 61:2462-2471.
- Diglio, C.A. and Ferrer, J.F. (1976) Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus. *J. Cancer research* 36:1056-1067.
- Dube S., Dolcini G., Abbott L., Mehta S., Dube D., Gutierrez S., Ceriani C., Esteban E., Ferrer J., Poiesz B. (2000) The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology* 277:379-386.
- Durkin, K.; Rosewick, N.; Artesi, M.; Hahaut, V.; Griebel, P.; Arsic, N.; Burny, A.; Georges, M.; Van den Broeke, A. (2016) Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*. 13:33.
- Erskine, R.; Bartlett, P.; Byrem, T.; Render, C.; Febvay, C.; Houseman, J. (2012) Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *Journal of Dairy Research*. 79 (4):445-450.
- Felber, B. K.; Derse, D.; Athanassopoulos, A.; Campbell, M.; Pavlakis, G. N. (1989). Cross-activation of the Rex proteins of HTLV-I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and nonreciprocal interactions with their RNA responsive elements. *New Biol.* 1 (3):318-328.
- Fernandes, C.; Melo, L.; Tenório, T.; Mendes, E.; Fernandes, A.; Ramalho, T.; Moura Sobrinho, P.; Mota, R. (2009) Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* 76:327-334.
- Ferrer, J.F. y Piper, C.E. (1981) Role of colostrum and milk of the natural transmission of the Bovine Leukemia Virus. *Cancer Res.* 41:4906-4909.
- Ferrer, J.F.; Kenyon, S.J.; Gupta, P. (1981) Milk of Dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science*. 213 (4511):1014-6.
- 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 Med Assoc.* 175:705-708.
- Ferrer, J.F. y Piper, C.E. (1978) An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Ann Rech Vet.* 9 (4): 803-7.
- Ferrer, J.F.; Marshak, R.R.; Abt, D.A.; Kenyon, S.J. (1978) Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9 (4): 851-857.
- Ferrer, J.F. y Diglio, C.A. (1976) Development of an *in vitro* infectivity assay for the C-type bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 36:1068-1073.

- Ferrer, J.F.; Piper, C.; Abt, D.; Marshak, R.; Bhatt, D. (1975) Natural mode of transmission of the bovine C type leukemia virus (BLV) *Bibl. Haematol.* 43:235-237.
- Ferrer, J.F.; Abt, D.A.; Bhatt, D.M.; Marshak, R.R. (1974) Study on the relationship between infection with Bovine C-type virus, leucemia and persistent lymphocytosis in cattle. *Cancer Research.* 34:893-900.
- Florins, A.; Boxus, M.; Vandermeers, F.; Verlaeten, O.; Bouzar, A.B.; Defoiche, J.; Hubaux, R.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (2008) Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 125 (1-2):1-7.
- Florins, A.; Gillet, N.; Asquith, B.; Boxus, M.; Burteau, C.; Twizere, J.C.; Urbain, P.; Vandermeers, F.; Debacq, C.; Sanchez-Alcaraz, M.T.; Schwartz-Cornil, I.; Kerkhofs, P.; Jean, G.; Théwis, A.; Hay, J.; Mortreux, F.; Wattel, E.; Reichert, M.; Burny, A.; Kettmann, R.; Bangham, C.; Willems, L. (2007a) Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front. Biosci.* 12:1520-1531.
- Florins, A.; Gillet, N.; Boxus, M.; Kerkhofs, P.; Kettmann, R.; Willems, L. (2007b) Even attenuated bovine leukemia virus proviruses can be pathogenic in sheep. *J. Virol.* 81 (18):195-200.
- Fukuyama, S.; Kodama, K.; Hirahara, T.; Nakajima, N.; Takamura, K.; Sasaki, O.; Imanishi, J. (1993) Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 55 (1):99-106.
- Gatei, M.H.; Lavin, M.F.; Daniel, R.C. (1990) *Zentralbl Veterinarmed B.* Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus. 37(8):575-80.
- Ghysdael, J.; Kettmann, R.; Burny, A. (1979) Translation of bovine leukemia virus virion RNAs in heterologous protein-synthesizing systems. *J Virol.* 29 (3): 1087–1098.
- Gikanga, B.; Chen, Y.; Stauch, O.B.; Maa, Y.F. (2015) Mixing monoclonal antibody formulations using bottom-mounted mixers: impact of mechanism and design on drug product quality. *J Pharm Sci Technol.* 69 (2):284-96.
- Gillet, N.; Hamaidia, M.; de Brogniez, A.; Gutiérrez, G.; Renotte, N.; Reichert, M.; Trono, K.; Willems, L. (2016) Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. *PLoS Pathog.* 12 (4).
- Gillet, N.; Gutiérrez, G.; Rodríguez SM, de Brogniez, A.; Renotte, N.; Alvarez, I.; Trono, K.; Willems, L. (2013) Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* 9 (10).

- Gillet, N.; Florins, A.; Boxus, M.; Burteau, C.; Nigro, A.; Vandermeers, F.; Balon, H.; Bouza, A.; Defoiche, J.; Burny, A.; Reichert, M.; Kettmann, R.; Willems, L. (2007) Mechanisms of Leukemogenesis Induced by Bovine Leukemia Virus: Prospects for Novel Anti-Retroviral Therapies in Human. *Retrovirology*. 4:1-32.
- Guillemain, B.; Mamoun, R.; Astier, T.; Duplan, J.F.; Parodi, A.L. (1978) Early polykaryocytosis inhibition test: evaluation of its performance in a seroepidemiological survey of bovine leukemia virus induced antibodies in cattle. *Ann Rech Vet*. 9 (4):709-20.
- Grau, M.A.; Monti, G. (2010) Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile *Arch Med Vet* 42:87-91.
- Greig, A.; Chander, S.; Samagh, B.; Bouillant, A. (1978) A simple, rapid syncytial-inhibitor test for antibodies to bovine leukemia virus. *Can. J. comp. Med*. 42:446-451.
- Gutiérrez, G.; Rodríguez, S.; Vilor, A.; Gillet, N.; de Brogniez, A.; Trono, K.; Willems, L. (2015a) An efficient vaccine against bovine leukemia virus 17th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses Poster presentation open acces. Trois Ilets, Martinique. 18-21 June 2015.
- Gutiérrez, G.; Rodríguez S.; Vilor, A.; Gillet, N.; de Brogniez, A.; Trono, K.; Willems, L. (2015b) An efficient vaccine against bovine leukemia virus. *Retrovirology*. 12 (Suppl 1):P3.
- Gutiérrez, G.; Lomónaco, M.; Alvarez, I., Fernández, F., Trono, K. (2015c) Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Veterinary Microbiology*. 177:366-369.
- Gutiérrez, G.; Rodríguez, S.; de Brogniez, A.; Gillet, N.; Golime, R.; Burny, A.; Jaworski, J.; Alvarez, I.; Vagnoni, L.; Trono, K.; Willems, L. (2014a) Vaccination against δ -Retroviruses: The Bovine Leukemia Virus Paradigm. *Viruses*. 6 (6):2416-2427.
- Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Merlini, R.; Rondelli, F.; Trono, K. (2014b) Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*. 10:82.
- Gutierrez, G.; Alvarez, I.; Martinez, C.; Porta, N.; Politzki, R.; Gammella, M.; Lomónaco, M.; Carignano, H.; Fondevila, N.; Poli, M.; Trono, K. (2012) Bovine Leukemia Virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC Vet Res*. 8 (1):187.
- Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Politzki, R.; Lomónaco, M.; Dus Santos, M.; Rondelli, F.; Fondevila, N.; Trono, K. (2011) Natural progression of bovine leukemia virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 151:255-263.
- Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Lomónaco, M.; Dus Santos, M.; Rodríguez, S.; Trono, K. (2009) Accurate detection of BLV-specific antibodies using a recombinant-p24 ELISA. *Veterinary Microbiology*. 137:224-234.

- Haas, L.; Divers, T.; Casey, J. (1992) Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J. Virol.* 66:6223-6225.
- Hayes, D.; Burton, L. (1998) Enzootic bovine leucosis eradication scheme. *Surveillance.* 25:3-5.
- Heeney, J.; Valli, V.; Montesanti, J. (1988) *J. Gen. Virol.* 69(3):659-666.
- Hernández-Herrera, D.; Posso-Terranova, A.; Benavides, J.; Muñoz-Flórez, J.; Giovambattista, G.; Álvarez-Franco, L. (2011) Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agron.* 60 (4):312-318.
- Hopkins, S.G. y DiGiacomo, R.F. (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.* 13 (1):107-28.
- Hurley, W.L. y Theil, P.K. (2011) Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients.* 3 (4):442-74.
- Inabe, K; Nishizawa, M.; Tajima, S.; Ikuta, K.; Aida, Y. (1999) The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol.* 73:1293–301.
- Johnson, R. y Kaneene, J.B. (1992) Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leucosis. *Veterinary bulletin.* 62: 287-312.
- Johnston, E.R.; Radke, K. (2000) The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J Virol.* 74:2930-5.
- Juliarena, M.; Barrios, C.; Ceriani, M.; Esteban (2016) Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *Journal of Dairy Science.* 99 (6):4586 - 4589.
- Kabeya, H.; Ohashi, K.; Onuma, M. (2001) Host Immune Responses in the Course of Bovine Leukemia Virus Infection. *Journal of Veterinary Medical Science.* 63 (7):703-708.
- Kanno, T.; Ishihara, R.; Hatama, S.; Oue, Y.; Edamatsu, H.; Konno, Y.; Murakami, K.; Tachibana, S. (2014) Effect of Freezing Treatment on Colostrum to Prevent the Transmission of Bovine Leukemia Virus. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 76 (2):255-257.
- Kanojia, G.; Have, R.; Soema, P.; Frijlink, H.; Amorij, J-A.; Kersten, G. (2017) Developments in the formulation and delivery of spray dried vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 13 (10):2364-2378.
- Katoh, I.; Yoshinaka, Y.; Ikawa, Y. (1989) Bovine leukemia virus trans-activator p38tax activates heterologous promoters with a common sequence known as a cAMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF. *EMBO J.* 8:497-503.
- Kenyon, S.J.; Piper, C.E. (1977) Cellular basis of persistent lymphocytosis in cattle infected with bovine leukemia virus. *Infect Immun.* 16:891-897.

- Kenyon, S.J.; Gupta, P.; Ferrer, J. (1982) Presence of the bovine leukaemia virus in milk of naturally infected cows. *Curr Top Vet Med Anim Sci.* 15:289.
- Kerkhofs, P.; Heremans, H.; Burny, A.; Kettmann, R., Willems, L. (1998) In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J. Virol.* 72:2554-2559.
- Kettmann, R.; Burny, A. (1994) Bovine Leukemia Virus. En: Levy J.A. *The Retroviridae.* Plenum Press. New York. NY. USA 3:39-81.
- Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Portetelle, D., Grégoire, D.; Burny, A. (1984) Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information on the target cells. *Leuk Res.* 8 (6):937-44.
- Kettmann, R.; Deschamps, J.; Cleuter, Y.; Couez, D.; Burny, A., Marbaix, G. (1982) Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2465-2469.
- Kettmann, R.; Portetelle, D.; Mammerickx, M.; Cleuter, Y.; Dekegel, D.; Galoux, M.; Ghysdael, J.; Burny, A.; Chantrenne, H. (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73:1014-1018.
- Kincaid, R.P.; Burke, J.; Sullivan, C. (2012) RNA virus microRNA that mimics a B cell oncomiR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:3077-82.
- Klener, P.; Szynal, M.; Cleuter, Y.; Merimi, M.; Duvillier, H.; Lallemand, F.; Bagnis, C.; Griebel, P.; Sotiriou, C.; Burny, A.; Martiat, P.; Van den Broeke, A. (2006) Insights into Gene Expression Changes Impacting B-Cell Transformation: Cross-Species Microarray Analysis of Bovine Leukemia Virus Tax-Responsive Genes in Ovine B Cells. *Journal of Virology.* 80 (4):1922-1938.
- Kono, Y.; Arai, K.; Sentsui, H.; Matsukawa, S.; Itohara, S. (1986) Protection against bovine leukemia virus infection in sheep by active and passive immunization. *Jpn.J.Vet.Sci.* 48:117-125.
- Kono, Y.; Irishio, W.; Sentsui, H. (1983) Syncytium-induction inhibition test with complement for detection of antibodies against bovine leukemia virus. *Can J Comp Med* 47:328-331.
- Krcmar, P.; Rencova, E. (2003) Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *J Agric Food Chem.* 51 (26):7655-8.
- Lairmore, M.D. (2014) Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: insights in transmission and pathogenesis. *Annu Rev Anim Biosci.* 2:189-208.
- Lassauzet, M.; Johnson, W.; Thurmond, M.; Stevens, F. (1989) Protection of colostrum antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can J Vet Res.* 53 (4): 424-430.

- Lefebvre, L.; Vanderplassen, A.; Ciminale, V.; Heremans, H.; Dangoisse, O.; Jauniaux, J.; Toussaint, J.; Zelnik, V.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (2002) Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13(II) accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase. *J. Virol.* 76:1400-1414.
- Leisering A. (1871) Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. *Berl Vet West Kgr Sachsen.* 16:15-16.
- Lee, L.C.; Scarratt, W.; Buehring, G.; Saunders, G. (2012) Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. *Can.Vet.J.* 53:283-286.
- Lew, A.E.; Bock, R.E.; Molloy, J.B.; Minchin, C.M.; Robinson, S.J.; Steer, P.F. (2004) Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J. Virol. Methods.* 115 (2):167-75.
- Lewin, H.A.; Wu, M.C.; Nolan, T.J.; Stewart, J.A. (1988) Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *J. Dairy Sci.* 71 (9):2526-34.
- Licursi, M.; Inoshima, Y.; Wu, D.; Yokoyama, T.; González, E.T.; Sentsui, H. (2003) Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol.* 89(1):17-23.
- Lomónaco, M.; Alvarez, I.; Martínez, C.; Porta, N.; Merlini, R.; Carignano, H.; Gutiérrez, G.; Trono, K. (2014) Epidemiological features of BLV natural infection. *Retrovirology* 11 (Suppl 1):45.
- Lomónaco, M.; Sowul, M.; Gutiérrez, G.; Malacari, D.; Alvarez, I.; Vilor, A.; Porta, N.; Trono, K. (2016) Eficacia del tratamiento térmico de leche y calostro bovino para inactivar el virus de la leucosis bovina. *Jornada XXVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Virología Sociedad Argentina de Virología.*
- López, R.; Suzuki, K.; Gonzalez ET., Ruiz, G., Loza, A., Coca, C., Pereyza JAC., Pecoraro MR. Seroprevalence Against Bovine Leukaemia Virus in Dairy Cattle in Bolivia. *International Journal of Dairy Science* 5(4):271-275 April 2010
- Luciw, P. y Leung, N. (1994) Mechanisms of Retrovirus Replication. En: *The Retroviridae.* Plenum Press. 159-263.
- Mallampati, D.; MacLean, R.; Ciaranello, A. (2015) Revisiting Optimal Breast Feeding Durations: Modelling the impact of maternal ARV use and infant mortality. *World Health Organization.* Geneva, Switzerland October 21, 2015.

- Mammerickx, M.; Portetelle, D.; de Clercq, K.; Burny, A. (1987) Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res.* 11:353-358.
- Mammerickx, M.; Portetelle, D. and Burny, A., (1985). Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies individual or pooled bovine milk samples. *Zentralbl. Veterinaermed., Reihe B.* 32: 526-533.
- Mammerickx, M.; Brück, C.; Burny, A.; Kettmann, R.; Portetelle, D.; Leunen, J. (1983) Natural and Experimental Transmissions of Enzootic Bovine Leukosis Fifth International Symposium on Bovine Leukosis . A symposium in the CEC Programme of Coordination of Research on Animal Pathology, held at Tübingen, Federal Republic of Germany, October 1982.
- Mamoun, R.Z.; Morisson, M.; Rebeyrotte, N.; Busetta, B.; Couez, D.; Kettmann, R.; Hospital, M.; Guillemain, B. (1990) Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* 64:4180-8.
- Masters, K. (1991) *Spray Drying Handbook*. Burnt Mill, Harlow, Essex, England : Longman Scientific & Technical 5th ed
- Meas. S.; Usui, T.; Ohashi, K.; Sugimoto, C.; Onuma, M. (2002) Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Veterinary Microbiology.* 84:275-282.
- Merlini, R.; Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Jaworski, J.P.; Carignano, H.; Poli, M.; Willems, L.; Trono, K. (2016) Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. *Arch. Virol.* 161 (11):3215-7.
- Miller, L.D.; Miller, J.M.; Van der Maaten, M.; Schmerr, M. (1985) Blood from bovine leukemia virus-infected cattle: antigen production correlated with infectivity. *Am. J. Vet. Res.* 1985 46 (4):808-10.
- Miller, J.; Miller, L.; Olson, C.; Gillette, K. (1969) Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 43:1297-1305.
- Mirsky, M.; Olmstead, C.; Da, Y.; Lewin, H. (1996) The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of Virology.* 70 (4):2178-2183.
- Miyasaka, T.; Oguma, K.; Sentsui, H. (2015) Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. *Arch. Virol.* 160:39-46.

- Molnár, E.; Molnár, L.; Dias, H.; Silva, A.; Vale, W. (1999) Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 19:7-11.
- Monti, G.E.; Frankena, K.; Engel, B.; Buist, W.; Tarabla, H.D.; de Jong, M.C. (2005) Evaluation of a new antibody-based ELISA for the detection of Bovine Leukosis Virus infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17:451-457.
- Moraes, M.; Weiblen, R.; Flores, E.; Oliveira, J.; Rebelatto, M.; Zanini, M.; Rabuske, M.; Oliveira Hübner, S.; Pereira, N. (1996) Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural*. 26 (2):257-262.
- Moratorio, G.; Obal, G.; Dubra, A.; Correa, A.; Bianchi, S.; Buschiazzo, A.; Cristina, J.; Pritsch, O. (2010) Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch. Virol*. 155:481-9.
- Moriuchi, H.; Masuzaki, H.; Doi, H.; Katamine, S. (2013) Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 32:175-177.
- Moules, V.; Pomier, C.; Sibon, D.; Gabet, A.; Reichert, N.; Kerkhofs, P.; Willems, L.; Mortreux, F.; Wattel, E. (2005) Fate of premalignant clones during the asymptomatic phase preceding lymphoid malignancy. *Cancer Research*. 65:1234-1243.
- Nagy, D.W.; Tyler, J.W.; Kleiboeker, S.B. (2007) Decreased periparturient transmission of bovine leukemia virus in colostrum-fed calves *J Vet Intern Med*. 21 (5):1104-7.
- Nava, Z.; Obando, C.; Molina, M.; Bracamonte, M.; Tkachuk, O. (2011) Seroprevalencia de la leucosis enzoótica bovina y su asociación con signos clínicos y factores de riesgo en rebaños lecheros del estado Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Cienc. Vet*. 52.1.
- Niewold, T.A.; van Dijk, A.; Geenen P.; Roodink, H.; Margry, R.; van der Meulen, J. (2007) Dietary specific antibodies in spray-dried immune plasma prevent enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 (ETEC) post weaning diarrhoea in piglets. *Vet. Microbiol*. 6 124(3-4):362-9.
- OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Terrestrial Manual 7th Edition*, (2012) Volumes 1 and 2. Version adopted in May 2018.
- OIE. *World Animal Health Information Database (WAHID Interface) Version 1.4*. (2017). (<https://www.oie.int/wahis>)
- Ooshiro, M.; Konnai, S.; Katagiri, Y.; Afuso, M.; Arakaki, N.; Tsuha, O.; Murata, S.; Ohashi, K. (2013) Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet. Rec*. 173:527.
- Onuma, M.; Wada, M.; Yasutomi, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.; Kawakami, Y. (1990) Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Microbiol*. 25 131-141.

- Orlik, O., Ban J., Hlavaty J., Altaner C., Kettmann R., Portetelle D. and Splitter G.A. (1997) Apr. Polyclonal bovine sera but not virus-neutralizing monoclonal antibodies block bovine leukemia virus (BLV) gp51 binding to recombinant BLV receptor BLVRcp1. *Journal of Virol.* 71(4):3263-3267.
- Ott, S.; Johnson, R.; Wells, S. (2003) Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev. Vet. Med.* 12 61(4):249-62.
- Panei, C.J.; Takeshima, S.; Omori, T.; Nunoya, T.; Davis, W.C.; Ishizaki, H.; Matoba, K.; Aida, Y. (2013) Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Veterinary Research.* 9:95.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.
- Piper, C.E.; Ferrer J.F.; Abt D.; Marshak, R. (1979) Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl.Cancer Inst.* 62:165-168.
- Piper, C.E.; Abt D.; Ferrer J.; Marshak, R.(1975) Seroepidemiological evidence for horizontal transmission of bovine C-type. *Cancer Res.* 35:2714-2716.
- Polat, M.; Takeshima,S.; Hosomichi, K.; Kim, J.; Miyasaka,T.; Yamada,K.; Arainga,M.; Murakami, T.; Matsumoto, Y.; de la Barra Diaz,V.; Panei,C.; González,E.; Kanemaki, M.; Onuma,M.; Giovambattista,G.; Aida, Y. (2016) A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology.* 13:4.
- Polat, M.; Takeshima, S.; Aida, Y. (2017) Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol. J.* 14 (1):209.
- Portetelle, D.; Couez, D.; Bruck, C.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Van der Maaten, M.; Brasseur, R.; Burny, A. (1989) Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology.* 169:27-33.
- Pujols, J.; Rodríguez, C.; Navarro, N.; Pina-Pedrero, S.; Campbell, J.; Crenshaw, J.; Polo, J. (2014) No transmission of hepatitis E virus in pigs fed diets containing commercial spray-dried porcine plasma: a retrospective study of samples from several swine trials. *Virol. Journal.* 11:232.
- Pujols, J.; Segalés, J. (2014) Survivability of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in bovine plasma submitted to spray drying processing and held at different time by temperature storage conditions *Vet. Microbiol.* 5 174 (3-4):427-432.
- Rama, G.; Pritsch, O.; Adrien, M.; Moratorio, G.; Meikle, A. (2012) Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina.

Veterinaria. Montevideo. 48 (185):11-17.

-Rizzo, G.; Forti, K.; Serroni, A.; Cagiola, M.; Baglivo, S.; Scoccia, E.; De Giuseppe, A. (2016) Vet. Microbiol. Single N-glycosylation site of bovine leukemia virus SU is involved in conformation and viral escape. 25 (197):21-26.

-Rodriguez, A. (2010) Diagnostico Veterinario.CDIVEP. Paraguay.

-Rodriguez, S.M.; Golemba, M.; Campos, R.; Trono, K.; Jones, L. (2009) Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. J. Gen. Virol. 90:2788-97.

-Rosen, C.; Sodroski, J.; Willems, L.; Kettmann, R.; Campbell, K.; Zaya, R.; Burny, A.; Haseltine, W. (1986) The 3' region of bovine leukemia virus genome encodes a trans-activator protein. EMBO J. 5 (10):2585-9.

-Rosewick, N.; Momont, M.; Durkin, K.; Takeda, H.; Caiment, F.; Cleuter, Y.; Vernin, C.; Mortreux, F.; Wattel, E.; Burny, A.; Georges, M.; Van den Broeke, A. (2013) Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA. 110 (6):2306-11.

-Rovnak, J.; Casey, J. (1999) Assessment of bovine leukemia virus transcripts in vivo. J. Virol. 73:8890-8897.

-Sagata, N.; Yasunaga, T.; Tsuzuku-Kawamura, J.; Ohishi, K.; Ogawa, Y.; Ikawa, Y. (1985) Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (3):677-681.

-Sagata, N.; Yasunaga, T.; Ohishi, K.; Tsuzuku Kawamura, J.; Onuma, M.; Ikawa, Y. (1984) Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. EMBO J. 3:3231-7.

-Sanz, M.; Occhi, H.; Ghezzi, M.; Islas, S.; Estéban, E. (1987) Detección serológica y directa del virus de la leucosis bovina (BLV) en varios rodeos con casos clínicos de linfosarcoma. Revista de Medicina Veterinaria 68:288-294.

-Schwartz, I.; Bensaid, A.; Polack, B.; Perrin, B.; Berthelemy, M.; Levy, D. (1994) In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. J. Virol. 68 (7):4589-96.

-Siliciano, R.; Greene, W. (2011) HIV latency. Cold Spring Harb Perspect Med. 1(1).

-Souza, F.N.; Blagitz, M.G.; Latorre, A.O.; Ramos Sanchez, E.M.; Batista, C.F.; Weigel, R.A.; Renno, F.P.; Sucupira, M.C.; Della Libera, A.M. (2012) Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. J. Vet. Med. Sci. 74 (2):221-5.

- Stott, M.L.; Thurmond, M.C., Dunn, S.J.; Osburn, B.I.; Stott, J.L. (1991) Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 72 (2):307-15.
- Straub, O.C. (1983a) The Importance of the Seropositive Dam's state for the Transmission and Spread of Enzootic Bovine Leukosis. Fifth International Symposium on Bovine Leukosis. Tubingen, Alemania.
- Straub, O.C. (1983b) The role of Colostrum and milk in transmission of Enzootic Bovine Leukosis. Fifth International Symposium on Bovine Leukosis. Tubingen, Alemania
- Straub, O.C. (1982) Etiology of abortion in cattle. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1 95 (9):161-4.
- Suzuki, S.; Konnai, S.; Okagawa, T.; Ikebuchi, R.; Shirai, T.; Sunden, Y.; Mingala, C.N.; Murata, S.; Ohashi, K. (2013) Expression analysis of foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol. Immunol.* 57:600–604.
- Szynal, M.; Cleuter, Y.; Beskorwayne, T.; Bagnis, C.; Van Lint, C.; Kerkhofs, P.; Burny, A.; Martiat, P.; Griebel, P.; Van den Broeke, A. (2003) Disruption of B-cell homeostatic control mediated by the BLV-Tax oncoprotein: association with the upregulation of Bcl-2 and signaling through NF-kappaB. *Oncogene.* 17 22 (29):4531-42.
- Tanaka, A.; Takahashi, C.; Yamaoka, S.; Nosaka, T.; Maki, M.; Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1071–1075.
- The Retroviridae. (1994) Plenum Pres. New York. 19- 105.
- Thurmond, M.C.; Portier, K.; Pühr, D.; Burrige, M. (1983) A prospective investigation of bovine leukemia virus infection in young dairy cattle, using survival methods. *Am. J. Epidemiol.* 117 (5):621-631.
- Toma, B.; Eloit, M.; Savey, M. (1990) Las enfermedades animales por retrovirus : leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz.* 9:1077-1119.
- Trono, K.; Perez-Filgueira, D.; Duffy, S.; Borca, M.; Carrillo, C. (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. 2001 *Vet. Microbiol.* 6 83 (3):235-48.
- Uckert, W.; Wunderlich, V.; Ghysdael, J.; Portetelle, D.; Burny, A. (1984) Bovine leukemia virus (BLV) a structural model based on chemical crosslinking studies. *Virology.* 133 (2):386-92.

- Van Der Maaten, M.J. y Miller, J.M. (1990) Bovine Leucosis Virus. In: Dinter Z Morein B (Eds) Virus Infections of Rumiants. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. The Netherlands. 419-429.
- Van Der Maaten M.J.; Miller, J.; Schmerr, M. (1981) Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am.J.Vet. Res.* 42 (9):1498-1500.
- Van Der Maaten M.J. and Miller J.M. (1978) Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus by various routes of exposure. In: Bentvelzen, P., Hilgers, J., Yohn, D.S. eds. *Advances in Comparative Leukemia Research.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 29-32.
- Van Der Maaten, M.J.; Miller J.M. (1975) Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.* 43:360-2.
- Von Beust, B.R.; Brown, W.C.; Estes, D.M.; Zarlenga, D.S.; McElwain, T.F.; Palmer, G.H. (1999) Development and in vitro characterization of recombinant vaccinia viruses expressing bovine leukemia virus gp51 in combination with bovine IL4 or IL12. *Vaccine.* 17:384-395.
- Wahis Interface OIE. (<http://web.oie.int/wahis/public.php>). 2017.
- Wattel, E.; Cavrois, M.; Gessain, A.; Wain-Hobson, S. (1996) Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 13 (Suppl 1):92-9.
- Wiktor, S.Z.; Pate, E.J.; Rosenberg, P.S.; Barnett, M.; Palmer, P.; Medeiros, D.; Maloney, E.M.; Blattner, W.A. (1997) Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J Hum. Virol* 1:37-44.
- Willems, L.; Burny, A.; Collete, D.; Dangoisse, O.; Dequiedt, F.; Gatot, J.; Kerkhofs, P.; Lefèbvre, L.; Merezak, C.; Peremans, T.; Portetelle, D.; Twizere, J.; Kettmann, R. (2000) Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:1787-1795.
- Willems, L.; Kerkhofs, P.; Dequiedt, F.; Portetelle, D.; Mammerickx, M.; Burny, A.; Kettmann, R. (1994) Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11532-6.
- Willems, L.; Grimonpont, C.; Heremans, H.; Rebeyrotte, N.; Chen, G.; Portetelle, D.; Burny, A.; Kettmann, R. (1992) Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3957-3961.
- Willems, L.; Heremans, H.; Chen, G.; Portetelle, D.; Billiau, A.; Burny, A.; Kettmann, R. (1990) Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J.* 9:1577-1581.
- Willems, L.; Gegonne, A.; Chen, G.; Burny, A.; Kettmann, R.; Ghysdael, J. (1987) The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *EMBO J.* 6:3385-3389.

- Williams, D.L.; Amborski, G.F.; Davis, W.C. (1988) Enumeration of T and B lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle, using monoclonal antibodies. *Am J Vet Res.* 49 (7):1098-103.
- World Animal Health (2004) I. Actividades nuevas de los servicios veterinarios. *Ecuador* (1)133-138.
- Wu, D.; Murakami, K.; Morooka, A.; Jin, H.; Inoshima, Y.; Sentsui, H. (2003) In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Research.* 97:81-87.
- Wu, D.; Takahashi, K.; Murakami, K.; Tani, K.; Koguchi, A.; Asahina, M.; Goryo, M.; Aida, Y.; Okada, K. (1996) B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55 (1-3):63-72.
- Xiao, J.; Buehring, G. (1998) In Vivo Protein Binding and Functional Analysis of *cis*-Acting Elements in the U3 Region of the Bovine Leukemia Virus Long Terminal Repeat. *Journal of Virology.* 72 (7):5994-6003.

9. Anexos

Resultados crudos

RP	Ternero p24T	Ternero p24 R	Ternero VCT	Ternero VCR	Ternero nPCR	Ternero ratio	Calostro p24T	Calostro P24R	Calostro VCT	Calostro VCR	Calostro RATIO	Calostro Npcr	Madre P24T	Madre P24R	Madre VCT	Madre VCR	Madre RATIO	Madre nPCR
4032	0	-12	0	-1	0	0	0	10	4	45	0,000	0	0	-8	0	-11	0,000	0
4055	0	9	2	67	0	0	1	34	256	75	0,000	0	0	10	1	44	0,000	0
4039	16	133	16	163	0	0	2	55	0	-4	0,000	0	0	24	0	21	0,000	0
4107	0	9	0	18	0	0	8	122	2	54	0,000	0	0	-4	0	-1	0,000	0
3832	128	161	256	180	0	0	8	108	64	132	0,000	0	0	11	2	52	0,000	1
3800	0	-5	0	-4	0	0	16	102	32	165	0,000	0	1	42	2	89	0,000	1
4062	16	146	16	204	0	0	16	111	1	41	0,000	0	0	-5	0	9	0,000	0
3566	4	126	16	146	0	0	32	163	32	148	0,001	1	4	102	8	120	0,950	1
3869	8	217	32	217	0	0	32	340	32	162	0,030	1	1	56	4	127	0,576	1
4020	8	236	16	180	1	0,05	32	149	32	181	0,000	1	8	147	8	180	0,596	1
4046	16	142	8	133	0	0	32	113	64	154	0,000	1	4	96	4	92	0,102	1
3663	16	122	8	74	1	0	32	134	256	104	0,000	1	2	50	16	114	1,864	1
3863	8	160	16	188	1	0,004	64	432	128	146	0,037	1	4	120	8	169	0,709	1
3862	16	162	32	143	0	0	64	124	128	98	0,000	1	4	108	4	102	0,021	1
3369	32	163	64	163	0	0	64	179	128	134	0,000	1	2	55	4	101	2,065	1
3364	2	149	64	209	0	0	128	192	128	195	0,009	1	8	207	4	96	1,687	1
4038	16	143	64	208	0	0	128	158	0	-9	0,000	0	0	-3	0	19	0,000	0
4010	16	149	16	124	0	0	128	122	64	136	0,025	1	8	140	8	129	0,535	1
3822	16	157	16	123	0	0	128	127	128	128	0,000	1	4	104	8	110	0,162	1
3940	32	172	32	144	0	0	128	174	16	144	0,000	0	0	1	1	46	0,000	0
2945	16	151	32	139	0	0	256	86	256	83	0,000	1	2	87	4	97	0,828	1
3722	32	289	64	246	0	0	256	194	256	147	0,000	1	8	201	8	166	0,249	1
3674	16	170	64	126	0	0	512	124	512	111	0,015	1	8	118	8	116	0,278	1
3968	32	156	128	167	0	0	512	166	2048	171	0,000	1	64	163	128	181	1,362	1
4027	256	156	256	169	0	0	512	160	2048	131	0,008	1	16	165	32	139	2,180	1
3380	8	141	16	180	0	0	4096	120	512	114	0,013	1	16	144	64	226	1,251	1
3791	32	159	32	136	0	0	8192	136	64	172	0,016	1	4	99	4	87	1,673	1
3758	32	167	32	135	0	0	16384	257	512	177	0,000	1	8	142	8	123	0,594	1

Resultados crudos del total de muestras analizadas por ensayo y por tipo de muestra.

T: Ternero, M: madre, C: calostro VCT: Título de anticuerpos Virus completo, VCR: Reactividad anticuerpos Virus completo P24T: Título de anticuerpos p24, p24R: Reactividad anticuerpos p24. En los ensayos de nPCR: 1=positivo, 0=negativo. RATIO: carga proviral relativa

Correlaciones Test de Spearman

		C_NPCR	C_P24R	C_p24T	C_RATIO	C_VCR	C_VCT	M_NPCR	M_P24R	M_p24T	M_RATIO	M_VCR	M_VCT	T_p24_R	T_p24T	T_ratio	T_VCR	T_VCT	Tnpr
C_NPCR	Correlation coefficient Significance Level P n		0.530 0.0037 28	0.634 0.0003 28	0.462 0.0133 28	0.525 0.0041 28	0.639 0.0003 28	0.839 -<0.0001 28	0.809 -<0.0001 28	0.823 -<0.0001 28	0.823 -<0.0001 28	0.800 -<0.0001 28	0.828 -<0.0001 28	0.450 0.0163 28	0.229 0.2401 28	0.191 0.3309 28	0.189 0.3342 28	0.304 0.1154 28	0.238 0.2218 28
C_P24R	Correlation coefficient Significance Level P n	0.530 0.0037 28		0.501 0.0066 28	0.352 0.0664 28	0.584 0.0011 28	0.242 0.2140 28	0.388 0.0413 28	0.520 0.0046 28	0.435 0.0208 28	0.526 0.0041 28	0.541 0.0029 28	0.451 0.0159 28	0.629 0.1240 28	0.298 0.1682 28	0.268 0.0003 28	0.533 0.0035 28	0.498 0.0070 28	0.236 0.2268 28
C_p24T	Correlation coefficient Significance Level P n	0.634 0.0003 28	0.501 0.0066 28		0.360 0.0597 28	0.365 0.0564 28	0.626 0.0004 28	0.499 0.0069 28	0.673 0.0001 28	0.730 -<0.0001 28	0.562 0.0012 28	0.564 0.0018 28	0.628 0.0003 28	0.484 0.0091 28	0.530 0.0037 28	0.530 0.6530 28	0.429 0.2413 28	0.585 0.0011 28	0.197 0.4877 28
C_RATIO	Correlation coefficient Significance Level P n	0.462 0.0133 28	0.352 0.0664 28	0.360 0.0597 28		0.306 0.1131 28	0.185 0.3472 28	0.388 0.0415 28	0.426 0.0239 28	0.422 0.0254 28	0.461 0.0136 28	0.442 0.0185 28	0.385 0.0428 28	0.163 0.4061 28	-0.118 0.3791 28	0.173 0.1990 28	0.250 0.28 28	0.156 0.4273 28	0.078 0.6949 28
C_VCR	Correlation coefficient Significance Level P n	0.525 0.0041 28	0.584 0.0011 28	0.365 0.0564 28	0.306 0.1131 28		0.249 0.2013 28	0.648 0.0002 28	0.616 0.0005 28	0.563 0.0018 28	0.473 0.0111 28	0.527 0.0040 28	0.462 0.0132 28	0.434 0.0211 28	0.121 0.5412 28	0.280 0.1490 28	0.196 0.3166 28	0.220 0.2611 28	0.150 0.4458 28
C_VCT	Correlation coefficient Significance Level P n	0.639 0.0003 28	0.242 0.2140 28	0.626 0.0004 28	0.185 0.3472 28	0.249 0.2013 28		0.607 0.0006 28	0.673 0.0001 28	0.711 -<0.0001 28	0.617 0.0005 28	0.646 0.0002 28	0.766 -<0.0001 28	0.260 0.1812 28	0.336 0.0806 28	-0.066 0.7395 28	-0.011 0.9550 28	0.384 0.0436 28	0.050 0.7989 28
M_NPCR	Correlation coefficient Significance Level P n	0.839 -<0.0001 28	0.388 0.0413 28	0.499 0.0069 28	0.388 0.0415 28	0.648 0.0002 28	0.607 0.0006 28		0.740 -<0.0001 28	0.731 -<0.0001 28	0.690 -<0.0001 28	0.750 -<0.0001 28	0.768 -<0.0001 28	0.414 0.1944 28	0.253 0.28 28	0.160 0.4160 28	0.133 0.0029 28	0.333 0.0029 28	0.200 0.3075 28
M_P24R	Correlation coefficient Significance Level P n	0.809 -<0.0001 28	0.520 0.0046 28	0.673 0.0001 28	0.426 0.0239 28	0.616 0.0005 28	0.673 0.0001 28	0.740 -<0.0001 28		0.954 -<0.0001 28	0.854 -<0.0001 28	0.672 -<0.0001 28	0.847 -<0.0001 28	0.822 0.0159 28	0.451 0.2412 28	0.229 0.1819 28	0.280 0.0738 28	0.343 0.0238 28	0.150 0.4458 28
M_p24T	Correlation coefficient Significance Level P n	0.823 -<0.0001 28	0.435 0.0208 28	0.730 -<0.0001 28	0.422 0.0254 28	0.563 0.0018 28	0.711 -<0.0001 28	0.731 -<0.0001 28	0.954 -<0.0001 28		0.702 -<0.0001 28	0.849 -<0.0001 28	0.881 -<0.0001 28	0.355 0.0634 28	0.243 0.2137 28	0.179 0.3615 28	0.201 0.3059 28	0.359 0.0606 28	0.110 0.5786 28
M_RATIO	Correlation coefficient Significance Level P n	0.823 -<0.0001 28	0.526 0.0041 28	0.582 0.0012 28	0.461 0.0136 28	0.473 0.0111 28	0.617 0.0005 28	0.690 -<0.0001 28	0.672 0.0001 28	0.702 -<0.0001 28	0.665 0.0001 28	0.756 -<0.0001 28	0.665 -<0.0001 28	0.236 0.2271 28	0.252 0.1962 28	0.139 0.4808 28	0.232 0.2343 28	0.365 0.0562 28	0.283 0.1438 28
M_VCR	Correlation coefficient Significance Level P n	0.800 -<0.0001 28	0.541 0.0029 28	0.564 0.0018 28	0.442 0.0185 28	0.527 0.0040 28	0.646 0.0002 28	0.750 -<0.0001 28	0.847 -<0.0001 28	0.849 -<0.0001 28	0.665 0.0001 28	0.924 -<0.0001 28	0.924 -<0.0001 28	0.467 0.0122 28	0.192 0.3278 28	0.378 0.0473 28	0.330 0.0863 28	0.294 0.1284 28	0.350 0.0677 28
M_VCT	Correlation coefficient Significance Level P n	0.828 -<0.0001 28	0.451 0.0159 28	0.628 0.0003 28	0.385 0.0428 28	0.462 0.0132 28	0.766 -<0.0001 28	0.768 -<0.0001 28	0.822 -<0.0001 28	0.881 -<0.0001 28	0.756 -<0.0001 28	0.924 -<0.0001 28	0.924 -<0.0001 28	0.315 0.1031 28	0.271 0.1628 28	0.211 0.2821 28	0.127 0.5208 28	0.268 0.0873 28	0.329 0.0873 28
T_p24_R	Correlation coefficient Significance Level P n	0.450 0.0163 28	0.629 0.0003 28	0.484 0.0091 28	0.163 0.4061 28	0.434 0.0211 28	0.260 0.1812 28	0.414 0.0286 28	0.451 0.0159 28	0.355 0.0634 28	0.236 0.2271 28	0.467 0.0122 28	0.315 0.1031 28	0.567 0.0017 28	0.287 0.1253 28	0.497 0.0071 28	0.497 0.0002 28	0.652 0.0002 28	0.107 0.5570 28
T_p24T	Correlation coefficient Significance Level P n	0.229 0.2401 28	0.298 0.1240 28	0.530 0.0037 28	-0.118 0.5495 28	0.121 0.5412 28	0.336 0.0806 28	0.253 0.1944 28	0.229 0.2412 28	0.243 0.2137 28	0.252 0.1962 28	0.192 0.3278 28	0.271 0.1628 28	0.567 0.0017 28	-0.212 0.2780 28	0.269 0.1669 28	0.719 -<0.0001 28	-0.162 0.4096 28	
T_ratio	Correlation coefficient Significance Level P n	0.191 0.3309 28	0.268 0.1682 28	-0.089 0.6530 28	0.173 0.3791 28	0.280 0.1490 28	-0.066 0.7395 28	0.160 0.4160 28	0.260 0.1819 28	0.179 0.3615 28	0.139 0.4808 28	0.378 0.0473 28	0.211 0.2821 28	0.297 0.1253 28	-0.212 0.2780 28	0.256 0.1880 28	-0.140 0.4772 28	0.800 -<0.0001 28	
T_VCR	Correlation coefficient Significance Level P n	0.189 0.3342 28	0.533 0.0035 28	0.229 0.2413 28	0.250 0.1990 28	0.196 0.3166 28	-0.011 0.9550 28	0.133 0.5004 28	0.343 0.0738 28	0.201 0.3059 28	0.232 0.2343 28	0.330 0.0863 28	0.5208 0.0071 28	0.497 0.0071 28	0.269 0.1669 28	0.256 0.1880 28	0.610 0.0006 28	0.079 0.8907 28	
T_VCT	Correlation coefficient Significance Level P n	0.304 0.1154 28	0.498 0.0070 28	0.585 0.0011 28	0.156 0.4273 28	0.220 0.2611 28	0.384 0.0436 28	0.333 0.0629 28	0.426 0.0238 28	0.359 0.0606 28	0.365 0.0562 28	0.294 0.1284 28	0.268 0.1680 28	0.652 0.0002 28	0.719 -<0.0001 28	-0.140 0.4772 28	0.610 0.0006 28	-0.248 0.2032 28	
Tnpr	Correlation coefficient Significance Level P n	0.238 0.2218 28	0.236 0.2268 28	-0.37 0.4577 28	0.078 0.6949 28	0.150 0.4458 28	0.050 0.7989 28	0.200 0.3075 28	0.250 0.4458 28	0.110 0.5786 28	0.283 0.1438 28	0.350 0.0677 28	0.329 0.0873 28	0.07 0.5870 28	-0.162 0.4096 28	0.800 -<0.0001 28	0.079 0.6907 28	-0.248 0.2032 28	

MedCalc version 17.5 – © 1993-2017 MedCalc Software bvba.

T: Ternero, M: madre, C: calostro VCT: Título de anticuerpos Virus completo, VCR: Reactividad anticuerpos Virus completo P24T: Título de anticuerpos p24, p24R: Reactividad anticuerpos p24. RATIO: carga proviral relativa

Correlograma

M_P24R		0,954	0,847	0,822	0,809	0,740	0,672	0,673	0,673	0,520	0,616	0,451	0,426	0,426	0,229	0,343	0,260	0,150
M_P24T	0,954		0,849	0,881	0,823	0,731	0,702	0,730	0,711	0,435	0,563	0,355	0,359	0,422	0,243	0,201	0,179	0,110
M_VCR	0,847	0,849		0,924	0,800	0,750	0,665	0,564	0,646	0,541	0,527	0,467	0,294	0,442	0,192	0,330	0,378	0,350
M_VCT	0,822	0,881	0,924		0,828	0,768	0,756	0,628	0,766	0,451	0,462	0,315	0,268	0,385	0,271	0,127	0,211	0,329
C_NPCR	0,809	0,823	0,800	0,828		0,839	0,823	0,634	0,639	0,530	0,525	0,450	0,304	0,462	0,229	0,189	0,191	0,238
M_NPCR	0,740	0,731	0,750	0,768	0,839		0,690	0,499	0,607	0,388	0,648	0,414	0,333	0,388	0,253	0,133	0,160	0,200
M_RATIO	0,672	0,702	0,665	0,756	0,823	0,690		0,582	0,617	0,526	0,473	0,236	0,365	0,461	0,252	0,232	0,139	0,283
C_p24T	0,673	0,730	0,564	0,628	0,634	0,499	0,582		0,626	0,501	0,365	0,484	0,585	0,360	0,530	0,229	-0,089	-0,137
C_VCT	0,673	0,711	0,646	0,766	0,639	0,607	0,617	0,626		0,242	0,249	0,260	0,384	0,185	0,336	-0,011	-0,066	0,050
C_P24R	0,520	0,435	0,541	0,451	0,530	0,388	0,526	0,501	0,242		0,584	0,629	0,498	0,352	0,298	0,533	0,268	0,236
C_VCR	0,616	0,563	0,527	0,462	0,525	0,648	0,473	0,365	0,249	0,584		0,434	0,220	0,306	0,121	0,196	0,280	0,150
T_p24_R	0,451	0,355	0,467	0,315	0,450	0,414	0,236	0,484	0,260	0,629	0,434		0,652	0,163	0,567	0,497	0,297	0,107
T_VCT	0,426	0,359	0,294	0,268	0,304	0,333	0,365	0,585	0,384	0,498	0,220	0,652		0,156	0,719	0,610	-0,140	-0,248
C_RATIO	0,426	0,422	0,442	0,385	0,462	0,388	0,461	0,360	0,185	0,352	0,306	0,163	0,156		-0,118	0,250	0,173	0,078
T_p24T	0,229	0,243	0,192	0,271	0,229	0,253	0,252	0,530	0,336	0,298	0,121	0,567	0,719	-0,118		0,269	-0,212	-0,162
T_VCR	0,343	0,201	0,330	0,127	0,189	0,133	0,232	0,229	-0,011	0,533	0,196	0,497	0,610	0,250	0,269		0,256	0,079
T_ratio	0,260	0,179	0,378	0,211	0,191	0,160	0,139	-0,089	-0,066	0,268	0,280	0,297	-0,140	0,173	-0,212	0,256		0,800
Tnpr	0,150	0,110	0,350	0,329	0,238	0,200	0,283	-0,137	0,050	0,236	0,150	0,107	-0,248	0,078	-0,162	0,079	0,800	
	M_P24R	M_P24T	M_VCR	M_VCT	C_NPCR	M_NPCR	M_RATIO	C_p24T	C_VCT	C_P24R	C_VCR	T_p24_R	T_VCT	C_RATIO	T_p24T	T_VCR	T_ratio	Tnpr

Prueba de correlación de Spearman. Se observan los coeficientes de correlación en cada casilla junto a su referencia de color. Rojo: muy bueno, Naranja-amarillo: bueno, moderado, verde: bajo, negativo. MedCalc version 17.5 – © 1993-2017 MedCalc Software bvba.

T: Ternero, M: madre, C: calostro. VCT: Título de anticuerpos Virus completo, VCR: Reactividad anticuerpos Virus completo. P24T: Título de anticuerpos p24, p24R: Reactividad anticuerpos p24. nPCR= nested PCR. RATIO=carga proviral relativa

P value	Nivel de significancia
< 0,001	Extremadamente significativo ***
0,001-0,01	Muy significativo **
0,01-0,05	Significativo *
> 0,05	No significativo ns

Comparación de muestras pareadas-test de Wilcoxon

Pair		n	Variable 1	Variable 2	Paired differences	
			Median	Median	Median	P ^a
C_NPCR	C_P24R	28	1,0000	130,5000	129,5000	<0,0001
C_NPCR	C_p24T	28	1,0000	64,0000	63,0000	<0,0001
C_NPCR	C_RATIO	28	1,0000	0,0000	-0,9860	<0,0001
C_NPCR	C_VCR	28	1,0000	133,0000	132,5000	<0,0001
C_NPCR	C_VCT	28	1,0000	96,0000	95,5000	<0,0001
C_NPCR	M_NPCR	28	1,0000	1,0000	0,0000	
C_NPCR	M_P24R	28	1,0000	97,5000	96,5000	<0,0001
C_NPCR	M_P24T	28	1,0000	4,0000	3,0000	<0,0001
C_NPCR	M_RATIO	28	1,0000	0,4065	0,0000	0,5949
C_NPCR	M_VCR	28	1,0000	101,5000	100,5000	<0,0001
C_NPCR	M_VCT	28	1,0000	4,0000	3,0000	<0,0001
C_NPCR	T_p24_R	28	1,0000	153,5000	152,5000	<0,0001
C_NPCR	T_p24T	28	1,0000	16,0000	15,0000	<0,0001
C_NPCR	T_ratio	28	1,0000	0,0000	-1,0000	<0,0001
C_NPCR	T_VCR	28	1,0000	145,0000	144,5000	<0,0001
C_NPCR	T_VCT	28	1,0000	24,0000	23,5000	<0,0001
C_NPCR	Tnpcr	28	1,0000	0,0000	-1,0000	<0,0001
C_P24R	C_p24T	28	130,5000	64,0000	-49,5000	0,6488
C_P24R	C_RATIO	28	130,5000	0,0000	-130,5000	<0,0001
C_P24R	C_VCR	28	130,5000	133,0000	-14,0000	0,0776
C_P24R	C_VCT	28	130,5000	96,0000	-50,0000	0,8913
C_P24R	M_NPCR	28	130,5000	1,0000	-129,5000	<0,0001
C_P24R	M_P24R	28	130,5000	97,5000	-27,5000	0,0002
C_P24R	M_P24T	28	130,5000	4,0000	-122,5000	<0,0001
C_P24R	M_RATIO	28	130,5000	0,4065	-129,4870	<0,0001
C_P24R	M_VCR	28	130,5000	101,5000	-25,0000	0,0005
C_P24R	M_VCT	28	130,5000	4,0000	-119,5000	<0,0001
C_P24R	T_p24_R	28	130,5000	153,5000	-3,0000	0,9455
C_P24R	T_p24T	28	130,5000	16,0000	-111,5000	<0,0001
C_P24R	T_ratio	28	130,5000	0,0000	-130,5000	<0,0001
C_P24R	T_VCR	28	130,5000	145,0000	2,0000	0,8101
C_P24R	T_VCT	28	130,5000	24,0000	-104,5000	0,0001
C_P24R	Tnpcr	28	130,5000	0,0000	-130,0000	<0,0001
C_p24T	C_RATIO	28	64,0000	0,0000	-64,0000	<0,0001
C_p24T	C_VCR	28	64,0000	133,0000	29,5000	0,7916
C_p24T	C_VCT	28	64,0000	96,0000	0,0000	0,8408
C_p24T	M_NPCR	28	64,0000	1,0000	-63,0000	<0,0001
C_p24T	M_P24R	28	64,0000	97,5000	-8,5000	0,1982
C_p24T	M_P24T	28	64,0000	4,0000	-61,0000	<0,0001
C_p24T	M_RATIO	28	64,0000	0,4065	-63,6350	<0,0001
C_p24T	M_VCR	28	64,0000	101,5000	-8,0000	0,3109
C_p24T	M_VCT	28	64,0000	4,0000	-60,0000	<0,0001
C_p24T	T_p24_R	28	64,0000	153,5000	25,0000	0,5692
C_p24T	T_p24T	28	64,0000	16,0000	-52,0000	0,0001
C_p24T	T_ratio	28	64,0000	0,0000	-64,0000	<0,0001
C_p24T	T_VCR	28	64,0000	145,0000	29,0000	0,7071
C_p24T	T_VCT	28	64,0000	24,0000	-40,0000	0,0003
C_p24T	Tnpcr	28	64,0000	0,0000	-64,0000	<0,0001
C_RATIO	C_VCR	28	0,0000	133,0000	133,0000	<0,0001
C_RATIO	C_VCT	28	0,0000	96,0000	95,9815	<0,0001
C_RATIO	M_NPCR	28	0,0000	1,0000	0,9915	0,0001
C_RATIO	M_P24R	28	0,0000	97,5000	97,4920	<0,0001

C_RATIO	M_P24T	28	0,0000	4,0000	3,9735	<0,0001
C_RATIO	M_RATIO	28	0,0000	0,4065	0,3865	<0,0001
C_RATIO	M_VCR	28	0,0000	101,5000	101,5000	<0,0001
C_RATIO	M_VCT	28	0,0000	4,0000	4,0000	<0,0001
C_RATIO	T_p24_R	28	0,0000	153,5000	153,4960	<0,0001
C_RATIO	T_p24T	28	0,0000	16,0000	16,0000	<0,0001
C_RATIO	T_ratio	28	0,0000	0,0000	0,0000	0,0840
C_RATIO	T_VCR	28	0,0000	145,0000	144,9995	<0,0001
C_RATIO	T_VCT	28	0,0000	24,0000	23,9850	<0,0001
C_RATIO	TnPCR	28	0,0000	0,0000	0,0000	0,8311
C_VCR	C_VCT	28	133,0000	96,0000	-12,0000	0,5971
C_VCR	M_NPCR	28	133,0000	1,0000	-132,0000	<0,0001
C_VCR	M_P24R	28	133,0000	97,5000	-34,5000	0,0036
C_VCR	M_P24T	28	133,0000	4,0000	-126,0000	<0,0001
C_VCR	M_RATIO	28	133,0000	0,4065	-131,9675	<0,0001
C_VCR	M_VCR	28	133,0000	101,5000	-23,0000	0,0264
C_VCR	M_VCT	28	133,0000	4,0000	-124,0000	<0,0001
C_VCR	T_p24_R	28	133,0000	153,5000	26,0000	0,0603
C_VCR	T_p24T	28	133,0000	16,0000	-109,0000	<0,0001
C_VCR	T_ratio	28	133,0000	0,0000	-133,0000	<0,0001
C_VCR	T_VCR	28	133,0000	145,0000	7,0000	0,1271
C_VCR	T_VCT	28	133,0000	24,0000	-89,5000	0,0004
C_VCR	TnPCR	28	133,0000	0,0000	-133,0000	<0,0001
C_VCT	M_NPCR	28	96,0000	1,0000	-95,0000	<0,0001
C_VCT	M_P24R	28	96,0000	97,5000	-13,5000	0,0685
C_VCT	M_P24T	28	96,0000	4,0000	-92,0000	<0,0001
C_VCT	M_RATIO	28	96,0000	0,4065	-94,9675	<0,0001
C_VCT	M_VCR	28	96,0000	101,5000	-13,5000	0,2104
C_VCT	M_VCT	28	96,0000	4,0000	-91,0000	<0,0001
C_VCT	T_p24_R	28	96,0000	153,5000	32,5000	0,8734
C_VCT	T_p24T	28	96,0000	16,0000	-72,0000	0,0001
C_VCT	T_ratio	28	96,0000	0,0000	-95,9980	<0,0001
C_VCT	T_VCR	28	96,0000	145,0000	25,5000	0,9094
C_VCT	T_VCT	28	96,0000	24,0000	-60,0000	0,0006
C_VCT	TnPCR	28	96,0000	0,0000	-95,5000	<0,0001
M_NPCR	M_P24R	28	1,0000	97,5000	96,5000	<0,0001
M_NPCR	M_P24T	28	1,0000	4,0000	3,0000	<0,0001
M_NPCR	M_RATIO	28	1,0000	0,4065	-0,02500	0,2891
M_NPCR	M_VCR	28	1,0000	101,5000	100,5000	<0,0001
M_NPCR	M_VCT	28	1,0000	4,0000	3,0000	<0,0001
M_NPCR	T_p24_R	28	1,0000	153,5000	152,5000	<0,0001
M_NPCR	T_p24T	28	1,0000	16,0000	15,0000	<0,0001
M_NPCR	T_ratio	28	1,0000	0,0000	-1,0000	0,0001
M_NPCR	T_VCR	28	1,0000	145,0000	144,5000	<0,0001
M_NPCR	T_VCT	28	1,0000	24,0000	23,5000	<0,0001
M_NPCR	TnPCR	28	1,0000	0,0000	-1,0000	<0,0001
M_P24R	M_P24T	28	97,5000	4,0000	-93,5000	<0,0001
M_P24R	M_RATIO	28	97,5000	0,4065	-96,6125	<0,0001
M_P24R	M_VCR	28	97,5000	101,5000	12,0000	0,0439
M_P24R	M_VCT	28	97,5000	4,0000	-81,5000	<0,0001
M_P24R	T_p24_R	28	97,5000	153,5000	52,5000	0,0003
M_P24R	T_p24T	28	97,5000	16,0000	-69,0000	0,0012
M_P24R	T_ratio	28	97,5000	0,0000	-97,5000	<0,0001
M_P24R	T_VCR	28	97,5000	145,0000	36,5000	0,0001
M_P24R	T_VCT	28	97,5000	24,0000	-48,0000	0,0075
M_P24R	TnPCR	28	97,5000	0,0000	-97,5000	<0,0001

M_P24T	M_RATIO	28	4,0000	0,4065	-2,6885	<0,0001
M_P24T	M_VCR	28	4,0000	101,5000	98,5000	<0,0001
M_P24T	M_VCT	28	4,0000	4,0000	0,5000	0,0020
M_P24T	T_p24_R	28	4,0000	153,5000	144,5000	<0,0001
M_P24T	T_p24T	28	4,0000	16,0000	12,0000	0,0011
M_P24T	T_ratio	28	4,0000	0,0000	-3,9980	<0,0001
M_P24T	T_VCR	28	4,0000	145,0000	140,5000	<0,0001
M_P24T	T_VCT	28	4,0000	24,0000	20,0000	<0,0001
M_P24T	TnPCR	28	4,0000	0,0000	-3,5000	<0,0001
M_RATIO	M_VCR	28	0,4065	101,5000	100,4570	<0,0001
M_RATIO	M_VCT	28	0,4065	4,0000	3,6610	<0,0001
M_RATIO	T_p24_R	28	0,4065	153,5000	151,9960	<0,0001
M_RATIO	T_p24T	28	0,4065	16,0000	15,7800	<0,0001
M_RATIO	T_ratio	28	0,4065	0,0000	-0,4065	<0,0001
M_RATIO	T_VCR	28	0,4065	145,0000	144,5250	<0,0001
M_RATIO	T_VCT	28	0,4065	24,0000	23,1635	<0,0001
M_RATIO	TnPCR	28	0,4065	0,0000	-0,2055	0,0003
M_VCR	M_VCT	28	101,5000	4,0000	-95,0000	<0,0001
M_VCR	T_p24_R	28	101,5000	153,5000	51,5000	0,0015
M_VCR	T_p24T	28	101,5000	16,0000	-87,5000	0,0003
M_VCR	T_ratio	28	101,5000	0,0000	-101,5000	<0,0001
M_VCR	T_VCR	28	101,5000	145,0000	28,0000	0,0014
M_VCR	T_VCT	28	101,5000	24,0000	-60,0000	0,0021
M_VCR	TnPCR	28	101,5000	0,0000	-101,5000	<0,0001
M_VCT	T_p24_R	28	4,0000	153,5000	145,5000	<0,0001
M_VCT	T_p24T	28	4,0000	16,0000	8,0000	0,0085
M_VCT	T_ratio	28	4,0000	0,0000	-4,0000	<0,0001
M_VCT	T_VCR	28	4,0000	145,0000	136,0000	<0,0001
M_VCT	T_VCT	28	4,0000	24,0000	16,0000	0,0003
M_VCT	TnPCR	28	4,0000	0,0000	-4,0000	<0,0001
T_p24_R	T_p24T	28	153,5000	16,0000	-130,5000	<0,0001
T_p24_R	T_ratio	28	153,5000	0,0000	-153,5000	<0,0001
T_p24_R	T_VCR	28	153,5000	145,0000	0,5000	0,8589
T_p24_R	T_VCT	28	153,5000	24,0000	-118,0000	<0,0001
T_p24_R	TnPCR	28	153,5000	0,0000	-153,5000	<0,0001
T_p24T	T_ratio	28	16,0000	0,0000	-16,0000	<0,0001
T_p24T	T_VCR	28	16,0000	145,0000	120,0000	<0,0001
T_p24T	T_VCT	28	16,0000	24,0000	5,0000	0,0004
T_p24T	TnPCR	28	16,0000	0,0000	-16,0000	<0,0001
T_ratio	T_VCR	28	0,0000	145,0000	145,0000	<0,0001
T_ratio	T_VCT	28	0,0000	24,0000	24,0000	<0,0001
T_ratio	TnPCR	28	0,0000	0,0000	0,0000	
T_VCR	T_VCT	28	145,0000	24,0000	-107,5000	<0,0001
T_VCR	TnPCR	28	145,0000	0,0000	-145,0000	<0,0001
T_VCT	TnPCR	28	24,0000	0,0000	-24,0000	<0,0001

T: Ternero, M: madre, C: calostro. VCT: Título de anticuerpos Virus completo, VCR: Reactividad anticuerpos Virus completo. P24T: Título de anticuerpos p24, p24R: Reactividad anticuerpos p24. nPCR= nested PCR. RATIO=carga proviral relativa

Inhibición de sincicios

ID Infectados (seropositivos)	Dilución				ID No infectados (seronegativos)	Dilución			
	1/4	1/8	1/16	1/32		1/4	1/8	1/16	1/32
887	0	0	1	1	889	1	1	0	1
886	0	0	0	0	894	0	1	2	0
861	0	1	5	5	903	0	0	1	0
804	0	0	0	0	912	3	0	1	0
805	0	0	0	0	924	3	1	2	1
875	0	0	2	2	946	1	0	1	1
850	0	2	2	2	951	5	1	3	1
737	0	2	2	2	958	5	0	2	1
713	0	0	0	0	978	5	0	1	1
977	0	0	1	3	987	0	1	1	1
922	0	0	1	3	993	0	0	0	2
913	0	0	1	1	r82	0	0	0	0
919	0	0	2	2	889	0	0	0	0
939	1	1	1	3	904	0	0	3	3
944	0	1	0	2	821	0	0	1	0
945	0	0	0	4	827	0	0	0	0
917	0	0	2	3	794	0	0	0	0
916	0	0	2	1	42	0	0	0	0
977 2	1	0	3	0	25	3	1	0	0
FLK/CC81	5	7	9	6	FLK/CC81	10	11	9	12

Los números corresponden al número de sincicios por campo en los ensayos de co-cultivo de células FLK y CC81 en presencia de sueros de animales infectados y no infectados en distintas diluciones

10. Información Suplementaria

Análisis comparativo entre nPCR y PCR en tiempo real

Se analizaron diluciones decrecientes en base 2 de ADN genómico total de 16 muestras con muy bajos niveles de carga proviral, entre Ratio 0,05 y niveles indetectables, 13 sangres y 3 calostros. Mientras que el calibrador FLK 1 % mostró el mismo nivel de sensibilidad analítica en ambos ensayos, no sucedió lo mismo con las muestras de campo. Cinco muestras con reacción indetectable en Real time PCR y 6 muestras caracterizadas como detectables pero no cuantificables en Real time PCR, reaccionaron como positivas en nPCR. Ninguna de ellas mostró igual límite de detección en ambos ensayos. En todos los casos la reacción de nPCR detectó reactores hasta diluciones mayores, 3 de ellas incluso superaban 1 log. Las muestras con resultado doble positivo disminuyeron a medida que se avanzó con la dilución ensayada. Las muestras que mostraron más diluciones con doble ensayo positivo fueron las correspondientes a las de mayor carga proviral relativa. Aún así, la muestra de calostro 3863 (ratio= 0,03) mostró mayor reactividad por real time PCR que la sangre 4020 (ratio= 0,05). Estos resultados estarían indicando que las diferencias en la detección se atribuyen más al nivel de provirus integrado en la totalidad del genoma que a los factores propios de la muestra.

Tipo de muestra	Carga proviral (ratio)	ID	Concentración DNA ensayada (ng/ul)													nPCR	Real time PCR	
			10	5	2,5	1,25	0,62	0,3	0,15	0,07	0,03	0,01	0,0005	0,0001				
sangre	0	3663															nPCR	Real time PCR
sangre	0	2155															nPCR	Real time PCR
sangre	0	10008															nPCR	Real time PCR
sangre	0	3541															nPCR	Real time PCR
sangre	0	2316															nPCR	Real time PCR
sangre	Nc	10141															nPCR	Real time PCR
Sangre	Nc	10066															nPCR	Real time PCR
sangre	Nc	10147															nPCR	Real time PCR
Sangre	Nc	2981															nPCR	Real time PCR
sangre	Nc	2845															nPCR	Real time PCR
sangre	Nc	10178															nPCR	Real time PCR
sangre	0,004	3863															nPCR	Real time PCR
calostro	0,025	4010															nPCR	Real time PCR

Calostro	0,03	3869													nPCR
															Real time PCR
Calostro	0,03	3863													nPCR
															Real time PCR
sangre	0,05	4020													nPCR
															Real time PCR
			11	3	3	3	1								DOBLE POSITIVAS (n)
-	1	FLK1%													nPCR

Límite de detección por las técnicas de nPCR y PCR en tiempo real.. En gris claro se identifican las reacciones POSITIVAS por nPCR, en gris oscuro se identifican las reacciones POSITIVAS por Real time PCR, sin color se identifican las reacciones negativas. NC: detectable no cuantificable.