



Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Antibody Decrease During the Peripartum Period: its Impact on Enzootic Bovine Leukosis Diagnosis

Rama, G.^{1,2}, Pritsch, O.^{2,3}, Adrien, M.L.^{1,4}, Moratorio, G.^{2,5}, Meikle, A.¹

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti-VLB durante el período de periparto en vacas Holando en producción. Para ello se realizó el diagnóstico serológico de LEB a un grupo de vacas preñadas mediante un ELISA comercial. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron tres grupos de cinco vacas cada uno caracterizados como negativo, positivo leve y positivo fuerte. Los animales se sangraron cada 20 días desde el día -50 al +50 (0=parto). Las muestras fueron procesadas por ELISA y las densidades ópticas se analizaron por ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. El grupo positivo fuerte permaneció con diagnóstico positivo en todas las observaciones del ensayo. El grupo negativo también permaneció negativo. Sin embargo, en el grupo de positivos leves las densidades ópticas del ELISA descendieron entre 40% y 60% de los niveles iniciales y todos los animales pasaron de un diagnóstico positivo en el preparto a negativo alrededor del parto. Se demostró la existencia de un descenso en los anticuerpos específicos anti-VLB alrededor del parto, que en el grupo de positivos leves implicó falsos negativos desde el día -20 al +60, indicando que debe evitarse tomar muestras para diagnóstico serológico de LEB en este período.

Palabras clave: Leucosis Enzoótica Bovina, diagnóstico, ELISA, anticuerpo, periparto

SUMMARY

The goal of this work was to characterize the evolution of specific anti-BLV antibody titers during the peripartum period in dairy Holstein cows. The experimental design involved 3 groups of 5 cows each characterized as negative, slight positive and strong positive. All animals were bled every 20 days, from -50 to +50 days (0 = calving), and serum samples were analyzed by a commercial ELISA test. The strong positive group remained with a positive diagnosis along all test observations, as the negative group remained as negative. However, in the slight positive group the ELISA optical densities decreased between 40% and 60% of the initial levels and all the animals that were initially positive became negative in the peripartum period. Overall these results show that in the peripartum the physiological decrease in specific anti-BLV antibodies in the slight positive group may produce false negative results from day -20 to +60, indicating that sample extraction should be avoided for serologic diagnosis of EBL during this period.

Key words: Enzootic Bovine Leukosis, diagnosis, ELISA, antibody, peripartum

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa de carácter crónico producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Este virus es un miembro oncogénico del género Deltaretrovirus de la familia Retroviridae, infecta preferencialmente a los linfocitos B y causa una transformación maligna que puede concluir en una leucemia crónica o linfosarcoma (Ferrer, 1980). La mayoría de los animales infectados (60%) no presentan signos de infección y se vuelven portadores asintomáticos del virus de por vida. Aproximadamente un tercio de los bovinos infectados desarrolla una linfocitosis persistente caracterizada por una expansión policlonal no maligna de los linfocitos B y sólo entre 5% a 10% de los animales infectados desarrolla linfoma o linfosarcoma maligno (Kettmann y col., 1994; Burny y col., 1988; Llamas y col., 2001).

La LEB tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico, la alteración del sistema inmune provo-

cado por la infección viral puede aumentar la incidencia de otras patologías afectando a la producción de leche y originando pérdidas directas por mortandad (Trainin y col., 2005). En ausencia de vacunas efectivas, numerosos países han implementado campañas de control y/o erradicación de esta enfermedad. Por ejemplo, la Unión Europea luego de muchos años ha logrado que 12 de los 15 países originales del bloque se encuentren actualmente libres de LEB (Rodríguez y col., 2011). Asimismo, puede detectarse el ADN proviral integrado en el genoma de linfocitos infectados con VLB en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer y col., 2006), por lo que la exigencia libre de Leucosis para la exportación de ganado en pie establecida por algunos mercados podría potencialmente extenderse a estos productos.

La detección de anticuerpos (Ac) específicos contra las proteínas virales gp51 y p24 en suero bovino, mediante inmunodifusión en gel agar (IDGA) y más recientemente por ensayo por

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.:6223106
Correo electrónico: ramosum@pasteur.edu.uy.

²Unidad Biofísica de Proteínas, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Departamento Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

⁵Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Recibido: 18/11/11 Aprobado: 31/1/12

inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), constituyen los procedimientos de rutina más utilizados para la identificación de animales infectados asintomáticos (Martin y col., 2000; Tro- noy col., 2001; Rola y Kuzmak, 2002; Gutierrez y col., 2009). Recientemente hemos demostrado que el IDGA detecta 72 % de los positivos detectados por ELISA (Rama y col., 2010). En tanto, existen metodologías más sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque implican mayor equipamiento y son más laboriosas (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2000; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007; Rama y col. 2010).

Generalmente, los métodos diagnósticos serológicos comerciales utilizan una única dilución de suero y frecuentemente no contemplan, al momento de extraer la muestra, las variaciones de la concentración total de Ac circulantes relacionada con el estado fisiológico o reproductivo del animal. En el modelo bovino, se conoce desde hace más de 50 años que los niveles de varias globulinas séricas disminuyen en sangre durante el parto (Larson y Kendall, 1957). En particular, durante la calostrogénesis existe un descenso en la concentración de inmunoglobulinas (Ig) totales (principalmente IgG) en la sangre circulante materna, ya que la mayoría de las inmunoglobulinas presentes en el calostro no son sintetizadas en la glándula mamaria sino que provienen directamente de la sangre materna (Larson, 1958). Este descenso de la concentración de Ac totales podría aumentar la presencia de falsos negativos en el periparto (Ferrer, 1979, Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Erverman y Jackson, 1997).

Por otro lado, los Ac maternos presentes en el calostro atraviesan el epitelio intestinal del ternero pasando directamente a su circulación sanguínea, por lo que el diagnóstico dentro de los primeros 6 meses de edad puede aumentar la detección de falsos positivos y sobreestimar la transmisión viral por vía vertical (Thurmond y col., 1982; Johnson y col., 1987, Lazausset y col., 1990).

La investigación respecto de la dinámica de los títulos de Ac contra VLB en el periparto es escasa. Se ha reportado la detección de un mayor porcentaje de falsos negativos utilizando IDGA como método de diagnóstico en vacas que se encuentran cercanas al parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Tekes 1994), por lo que se ha propuesto que para el diagnóstico de la infección por VLB se utilicen métodos serológicos en un período comprendido entre 2 semanas antes y un mes después del parto. Tekes (1994) reportó que esto no ocurre cuando el ELISA es utilizado como método de diagnóstico.

La hipótesis de trabajo plantea que en el periparto el descenso de la concentración total de Ac en la sangre materna podría llevar al diagnóstico de falsos negativos en animales infectados, aún utilizando un *kit* de diagnóstico de ELISA comercial (VMRD) aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y que es utilizado en nuestro país. Para testear la hipótesis, nos proponemos como objetivo analizar la concentración de Ac específicos anti-VLB en función del tiempo durante el período de parto en vacas Holando en producción con diagnósticos positivos y negativos realizados en el parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un primer diagnóstico serológico de LEB a un grupo de 60 vacas de raza Holando pertenecientes a un tambo del departamento de Paysandú mediante el uso de un *kit* de ELISA comercial diseñado para detectar Ac específicos anti-VLB. De acuerdo a lo recomendado por el fabricante del *kit*, el punto de corte entre resultados negativos y positivos se determinó para cada placa mediante el análisis por triplicado de la densidad óptica (D.O.) de un control positivo diluido y estandarizado para tal fin.

De este grupo se seleccionaron cinco vacas serológicamente negativas (con valores de D.O. por debajo del punto de corte), cinco vacas positivas fuertes (con valores de D.O. mayores al doble del punto de corte) y cinco vacas positivas leves (con valores de D.O. menores al doble del punto de corte). Por otro lado, estas 15 vacas también fueron seleccionadas según fecha de parto prevista (otoño 2009).

A este grupo de 15 vacas se les extrajo sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) cada 20 días, se abarcó un rango desde el día 50 previo al parto hasta el día 50 posterior al parto. Las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C y se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm antes de las 48 h de la colecta. El suero se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. El total de las muestras (n=90) correspondientes a los 15 animales se analizaron en una misma placa de ELISA perteneciente a un *kit* comercial para Ac contra VLB para suero bovino.

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

ELISA.

Se utilizó un *kit* comercial para la detección de Ac contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA), aprobado por el USDA. Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron los tres controles positivos del *kit* comercial por placa, que poseen una baja concentración de Ac contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus D.O.

Análisis estadístico

Los datos de D.O. se procesaron con un análisis de medidas repetidas en el tiempo (procedimiento mixto, software SAS, SAS Institute Inc. 2000, Cary, NC, USA). El período se incluyó como variable categórica y se definieron períodos respecto al parto con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70). El modelo estadístico incluyó como efectos

fijos el período, la categoría (positivos fuertes, positivos leves y negativos) y sus interacciones. Se consideró $P < 0.05$ como significativo y valores entre $P > 0.05$ y $P < 0.10$ como tendencia.

RESULTADOS

En la Figura 1 se observan los valores de absorbancia de los cinco animales de cada grupo normalizados mediante el cociente de la D.O. con el valor establecido como línea de corte para esa placa de ELISA.

Por otro lado, se determinó por ELISA la variación de la D.O. en función de la concentración de Ac específicos anti-VLB a partir de dos diluciones seriadas de un suero positivo fuerte. En la Figura 2 se representa la curva de titulación obtenida en la cual la D.O. disminuye de forma logarítmica en relación a la dilución del suero.

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

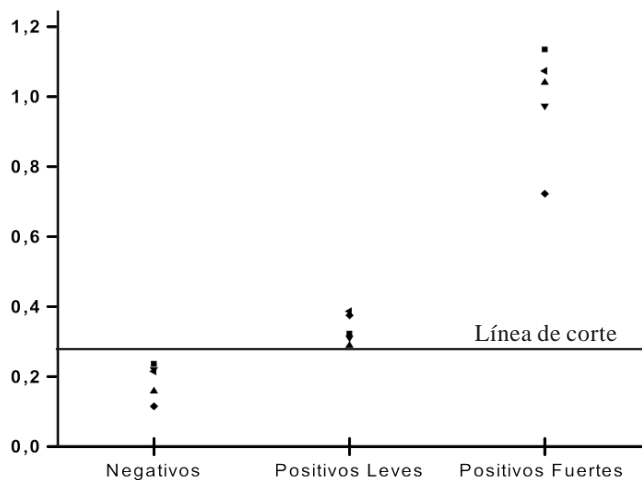


Figura 1. Caracterización serológica por ELISA de cada uno de los grupos de animales: Negativos, Positivos Leves, Positivos Fuertes. En el eje de la izquierda se expresan los valores de absorbancia obtenidos por medida espectrofotométrica de las placas de ELISA, y en el eje de la derecha como Unidades Arbitrarias que corresponden al cociente de la absorbancia para cada una de las muestras, dividida la absorbancia de los controles positivos utilizados por el kit para determinar el punto de corte que discrimina entre positivos y negativos.

mas diferencias entre los demás días. En el Cuadro 1 se muestran los resultados de D.O. normalizados de cada animal perteneciente a los tres grupos en los distintos períodos relativos al parto.

En la Figura 4 se muestran los resultados individuales para cada uno de los cinco animales que integraban el grupo de positivos leves. La D.O. de los mismos disminuyó a medida que se acerca el momento del parto. Es importante destacar que en este descenso del título de Ac específicos para VLB cercano al parto, los animales positivos leves presentaron valores por debajo

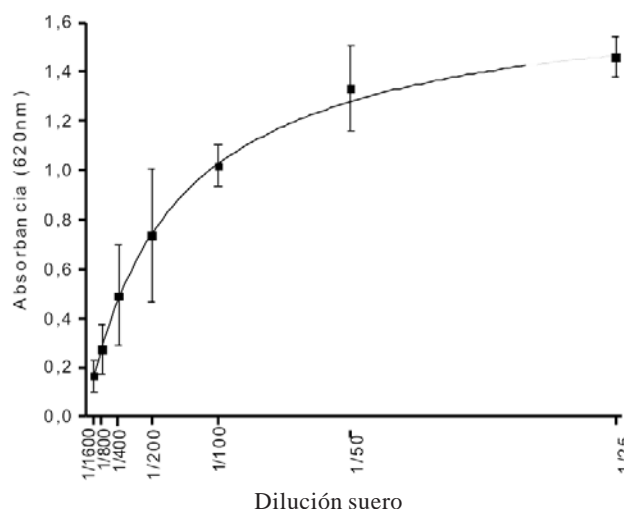


Figura 2. Valores de absorbancia promedio en función de dos curvas de dilución seriada de un mismo suero positivo a VLB (el valor 0,04 corresponde a una dilución del suero 1/25, las diluciones consecutivas se hacen en una relación 1:2.; rango de dilución 1/25 – 1/1600).

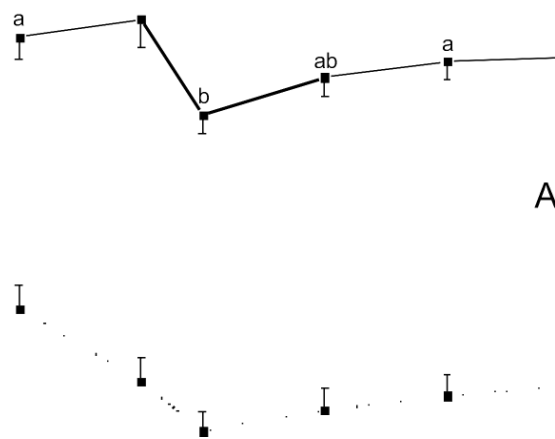


Figura 3. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para el promedio del período del grupo positivo fuerte (A) y positivo leve (B). (a vs b vs $cP < 0.05$, x vs y $P < 0.1$) En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia (\pm SEM) y en abscisas Días, siendo 0 el día del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

Cuadro 1. Densidades ópticas normalizadas al control positivo del *kit* VMRD para el diagnóstico de la Leucosis Enzootica Bovina durante el parto, para todos los animales del ensayo (negativos, positivos leves y positivos). Los períodos se definieron con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70).

Grupo	Identificación	Períodos respecto al parto					
		-40	-20	-10	10	30	50
Negativos	543	0,789	0,416	0,488	0,605	0,628	0,580
Negativos	319	0,564	0,443	0,435	0,445	0,492	0,424
Negativos	324	0,768	0,713	0,778	0,375	0,451	0,571
Negativos	526	0,411	0,712	0,490	0,563	0,486	0,643
Negativos	353	0,844	0,457	0,683	0,587	0,834	0,407
Positivos Leves	139	1,381	1,100	0,846	0,912	0,990	1,152
Positivos Leves	259	1,152	0,568	0,624	0,640	0,765	0,731
Positivos Leves	264	1,032	0,661	0,662	0,761	0,852	0,731
Positivos Leves	350	1,111	0,584	0,454	0,706	0,744	0,881
Positivos Leves	223	1,339	0,857	0,681	0,818	0,815	0,821
Positivos	221	2,580	2,844	3,241	3,466	3,420	3,407
Positivos	328	3,477	3,881	3,819	3,898	3,676	4,015
Positivos	416	3,833	3,941	3,771	3,927	4,063	4,036
Positivos	505	4,052	4,006	3,410	3,879	3,460	4,156
Positivos	529	3,717	3,792	3,327	4,047	3,775	3,645

del punto de corte fijado para este ensayo. Por lo tanto, pasaron de un diagnóstico serológico positivo a un resultado negativo. La caída de la D.O. alrededor del parto varió entre un rango de disminución del 40 al 60 %. Solo uno (# 139) de los cinco animales positivos leves presentó D.O. comparables a un diagnóstico positivo al mes posparto, el resto mantuvo D.O. negativas hasta aprox. los 50 días posparto (Figura 4).

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que demuestra que en el período alrededor del parto los títulos de Ac específicos anti-VLB determinados por el *kit* ELISA VMRD (utilizado en nuestro país), se modifican en forma importante. Los animales con altos títulos de Ac anti-VLB mostraron una tendencia a disminuir sus títulos en el parto pero continuaron siendo positivos. Sin embargo, aquellos animales que fueron diagnosticados por ELISA como positivos leves, presentando títulos bajos de Ac específicos anti-VLB, resultaron seronegativos por ELISA en el período del parto. Estos resultados concuerdan con lo que se observa en la curva de titulación en donde la misma variación en la concentración de Ac específicos anti-VLB en un animal positivo fuerte y uno leve no significa el mismo valor en términos de D.O. Los animales positivos fuertes presentan concentraciones de Ac (D.O. cercanos a uno) que se encuentran sobre o próximas a los valores de saturación del sistema. En los animales positivos leves, la disminución en la concentración de Ac debido al parto, representó un mayor descenso del valor de D.O. que los

positivos fuertes, y en estos ejemplos alcanzó valores por debajo de la línea de corte establecida por el *kit*.

La producción eficiente de leche requiere que la vaca lechera pase por una gestación y un parto cada año. La transición desde el estado de preñez sin lactancia al estado de no-preñez con lactancia involucra un cambio dramático para la vaca (Goff y Horst, 1997). Usualmente las vacas se secan al séptimo mes de gestación, lo cual genera una involución de la glándula mamaria donde el epitelio secretorio mamario sufre apoptosis y la glándula es remodelada y renovada preparándose para un nuevo ciclo de lactancia (Strange y col., 1995).

La actividad del sistema inmune de la vaca está fuertemente deprimida alrededor del parto. Se ha descrito la existencia de una leucopenia transitoria después del parto causado por un importante pasaje de neutrófilos hacia el tracto reproductivo. Estos neutrófilos presentan una capacidad fagocítica anti-bacteriana aumentada pero una actividad bactericida (estallido respiratorio) disminuida (Kehrl y col., 1989a; Detilleux y col., 1995). La capacidad de los linfocitos para responder a mitógenos y la producción de Ac se ve también afectada alrededor del parto (Kehrl y col., 1989b). Aún desconocemos el mecanismo fino que determina la depresión del sistema inmunológico en el parto pero se acepta que factores endócrinos y nutricionales estarían fuertemente involucrados (Goff y Horst, 1997; Vangroenweghe y col., 2005; Lamote y col., 2006). Por otro lado, también ha sido demostrado que el tratamiento con corticoides y prolactina en combinación con insulina estimula la expresión

Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto

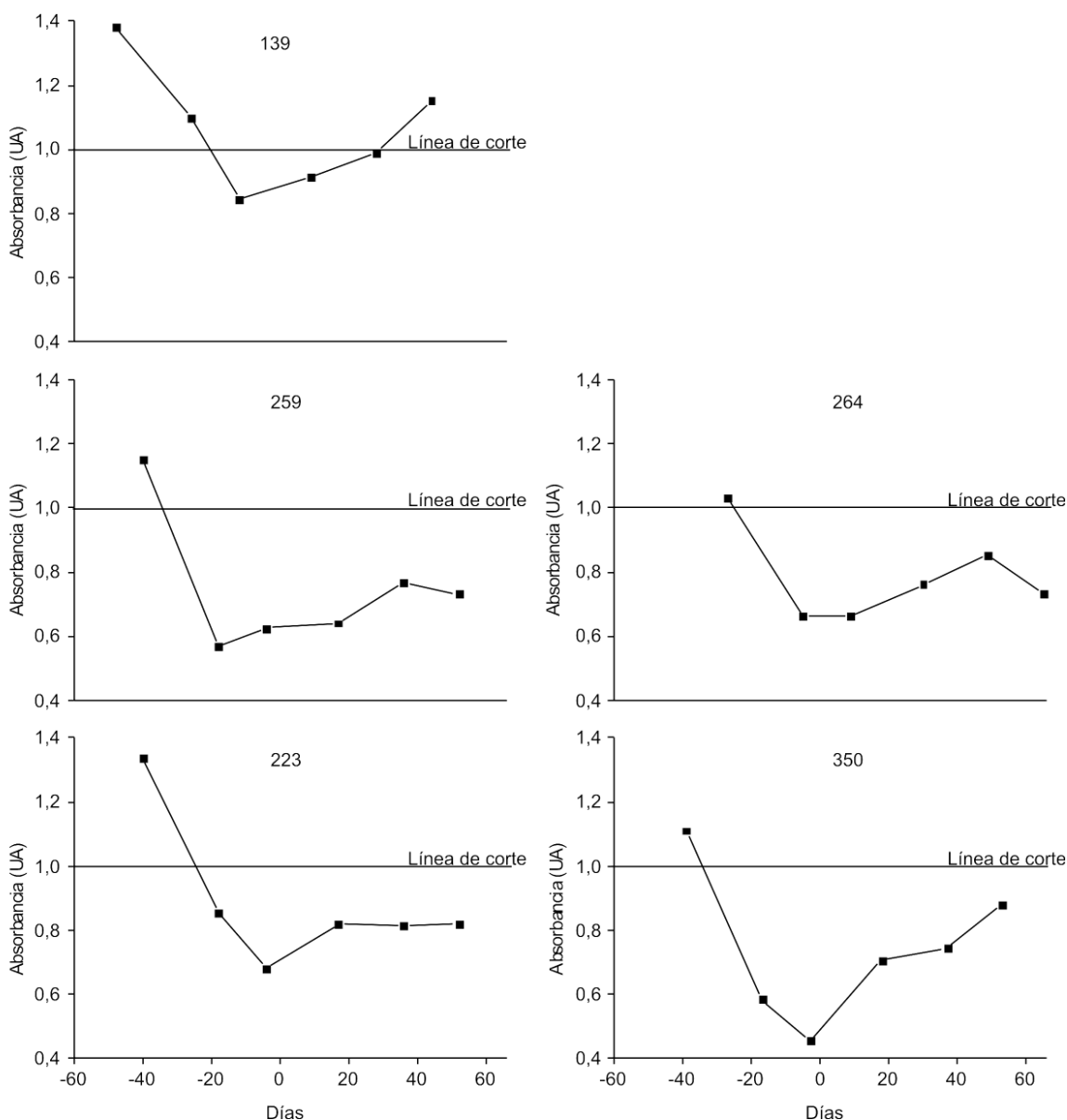


Figura 4. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para cada uno de los animales caracterizados como positivos leves: 139, 259, 264, 223 y 350. En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

de VLB en ensayos con líneas celulares en cultivo (Niermann y Buehring, 1997) y ambas hormonas aumentan alrededor del parto.

Asimismo, también ha sido demostrado que los niveles de IgG e IgM totales en el suero caen alrededor del parto y que la concentración presente en el calostro, es equivalente a la concentración que desaparece de la sangre circulante en el momento de la calostrogénesis (Dixon, y col., 1961; Larson, 1958). En un trabajo reciente Herr y col (2011) han reportado una disminución dramática de los niveles séricos totales de IgG e IgM en el período entre la semana 8 previa al parto y la cuarta semana post-

parto. El nivel de IgG se recuperó en la cuarta semana posterior al parto y el grado de reducción de la IgG sérica total se correlacionó significativamente con secreción de IgG en el calostro. Por otra parte, una correlación directa entre los niveles de IgG y el recuento de linfocitos también fue detectada. Esto podría explicar también la alta incidencia de enfermedades infecciosas durante este período (Herr y col., 2011). La disminución de los títulos de Ac específicos anti-VLB se podría explicar entonces por el pasaje de los mismos desde la sangre hacia el calostro, y/o por el estado de inmunosupresión generado en la vaca en el período del periparto.

En un trabajo reciente, Gutiérrez y col. (2011) analizan la progresión de la infección por VLB desde el nacimiento hasta la primera lactancia en un rodeo con más de 85% de prevalencia. Reportan que aun realizando medidas para evitar la transmisión vía sanguínea no encontraron cambios en la prevalencia después de 3 años. Esto indicaría que otras vías de transmisión podrían jugar un rol en condiciones naturales. En particular encuentran que la población pasa de aproximadamente 10% de prevalencia antes del primer parto a más de 60% posterior al mismo. Estos resultados permitirían plantear que la inmunosupresión generada en el periparto podría activar infecciones virales controladas por los animales y no detectadas por los métodos diagnósticos usualmente empleados.

En suma, el diagnóstico de VLB por ELISA debe realizarse teniendo en cuenta el estado reproductivo del animal en el momento de obtener la muestra. El diagnóstico en los momentos cercanos al parto aumenta la probabilidad de falsos negativos y por este motivo algunos autores proponen no utilizar métodos serológicos en un período comprendido entre dos semanas antes y un mes después del parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996). Acorde a nuestros resultados este intervalo al menos para este *kit* comercial debe ser mayor, ya que no deberían realizarse diagnósticos para LEB desde los 40 días antes del parto, hasta los 50 días posparto, o incluso más, debido a

que cuatro de los cinco animales positivos leves no habían recuperado los niveles de D.O. a los casi dos meses posparto. Sin embargo, la realidad nacional marca que debido a la planificación de la sanidad de los tambos (momentos puntuales o únicos en la toma de muestra para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a todo el rodeo), como al manejo reproductivo de los rodeos lecheros en nuestro país (partos todo el año), productores y técnicos frecuentemente no visualizan que un resultado negativo no implica que ese animal sea verdaderamente negativo.

Como perspectiva consideramos que sería importante estudiar la evolución de la carga proviral de la madre durante el periparto, ya que debido a la inmunosupresión existente en este período el animal podría perder la capacidad de controlar al virus, reactivando la infección y originando como consecuencia un aumento de su carga proviral.

Agradecimientos

A Agustín Furtado del Instituto de Patobiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por su cooperación en el procesamiento de las muestras y a Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo, por su colaboración en la construcción de las figuras.

Referencias Bibliográficas

- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32:149-170.
- Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJF, Van Der Maaten MJ. (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. comp. Med.* 46:270-271.
- Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 102:169-173.
- Detilleux JC, Kehrli ME, Stabel JR, FreemadAE, Kelley DH. (2005). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 44:251-261.
- Dixon FJ, Weingle WO, Vázquez JJ. (1961). Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Lab Invest* 10:216-237.
- Evermann JF, Jackson MK. (1997). Laboratory diagnostic tests for retroviral infection in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 3:87-106.
- Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med* 43:621-630.
- Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet* 38:137-141.
- Ferrer J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv Vet Sc Comp Med* 24:1-68.
- Ferrer JF. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *JAVMA* 175:1281-1286.
- Goff JP, Horst RL. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80:1260-1268.
- Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, Politzki R, Lomónaco M, Rodríguez S, Dus Santos MJ, Trono K. (2009). Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol* 137: 224-234
- Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 151:255-263.
- Herr M, Bostedt H, Failing K. (2011). IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 75:377-385.
- Hübner SO, Weiblen R, Tobias FL, Cancian N, Botton SA, Oliveira M, Zanini M. (1996). Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 16:87-90.
- Johnson R, Kaneene JB, Anderson SM. (1987). Bovine leukemia virus: Duration of colostrum antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev Vet Med* 4:371-376.

- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989a). Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 207-214.
- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989b). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 215-220.
- Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus, in: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*, Plenum Press, New York, pp. 39-81.
- Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 65:1082-1098.
- Larson BL, Kendall KA. (1957). Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J Dairy Sci* 40:659-666.
- Larson BL. (1958). Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J Dairy Sci* 41: 1033-1044.
- Lassauzet ML, Johnson WO, Picanso JP. (1990). Factors associated with decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus. *Prev Vet Med* 9:45-58.
- Llames L, Goyache J, Doménech A, Arjona A, Suarez G, Gomez-Lucia E. (2001). Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39.
- Martín D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. (2000). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J Vet Med* 48: 97-106.
- Niermann GL, Buehring GC. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239:249-258.
- Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A, Pritsch O. (2010). Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*. 46:15-22.
- Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210-1248.
- Rola M, Kuzmak J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods* 99:33-40
- Strange R, Friis RR, Bemis LT, Geske FJ. (1995). Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 46:355-368.
- Tekes L. (1994). Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta Vet Hung* 42:57-67.
- Thurmond MC, Carter RL, Puhr DM, Burr ridge MJ. (1982). Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhoo d infection. *Am J Vet Res* 43:1152-1155.
- Trainin Z, Brenner J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J Vet Med* 60:94-105.
- Trono KG, Pérez-Filguiera DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83:235-248.
- Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest Anim Endocrinol* 29: 283-93.