



**“Estudio del efecto del uso de anticuerpos
específicos contra el virus de la leucosis bovina
como suplemento dietario en terneros”**

**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro
de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
(CICVyA), Instituto de Virología (IV)**

Aspirante: Lic. Natalia Gabriela Porta

Directora: Dra. Karina Gabriela Trono

Codirectora: Dra. Irene Alvarez

2018

A Juan, mi compañero

A mis padres

Agradecimientos

A mi directora, Karina, gracias por guiarme y darme la oportunidad de emprender este camino.

A mi codirectora, Irene, gracias por tu gran ayuda y paciencia en el día a día.

A mis compañeros de laboratorio que me acompañaron los últimos años y sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo; Vane, Romi, Marian, Jor, Marina, Lautaro, Marcos, Juan y Hugo. También a aquellos que tomaron otras rutas pero me enseñaron mucho; Gero, Vicky, Cintia, Luciana y Ceci.

A mis compañeros del instituto, gracias por estos años compartidos; Ana, Gabi, Ceci, Chicha, Aldana, Andre, Lu, Ezequiel, Vane y a todo el resto.

A las chicas de la sala de lavado, por brindar todos los materiales necesarios.

Al INTA y al Instituto de Virología por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis.

Al personal del laboratorio de sanidad animal y de los tambos de la EEA Rafaela, en especial a Guille.

A INCUINTA y BIOINNOVO, principalmente a Andrés, Celina, Alejandro, Gustavo y Marina.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, por permitirme que hiciera mi doctorado en esta casa de estudios.

Al CONICET, por haberme entregado la beca y confiado en este proyecto.

A la gente de cultivo de tejidos, por haber proporcionado las células necesarias para los experimentos.

A mis amigas y hermanas de la vida, por acompañarme en todo momento.

A mi familia y en especial a mis padres, por haberme brindado el apoyo y la educación que me llevó en este camino.

A Juan, por ser mi compañero y consejero, y por ayudarme durante la tesis.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen.....	4
Abstract	6
1. Introducción.....	8
1.1 Generalidades de la leucosis bovina enzoótica: Agente etiológico, epidemiología e impacto.....	9
1.2 El virus de la leucosis bovina	12
1.3 Replicación viral, patogenia e inmunidad	14
1.4 Diagnóstico	16
1.5 Modelos animales de infección experimental.....	16
1.6 Transmisión y dinámica de la infección.....	18
1.6.1 Transmisión oral por consumo de secreciones lácteas	20
1.7 Inmunoglobulinas de yema de huevo: IgY	22
1.7.1 Uso de las IgY en la inmunidad pasiva	24
2. Hipótesis.....	26
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos particulares.....	29
4. Materiales y métodos	30
4.1 Establecimiento y bovinos utilizados en el estudio.....	31
4.1.1 Caracterización de vacas en ordeño del rodeo en estudio.....	32
4.1.2 Caracterización de terneros recién nacidos en el rodeo en estudio	32
4.2 Detección de anticuerpos en sangre y leche.....	32
4.2.1 ELISA Leukofast	32
4.3 Detección y cuantificación de material genético de BLV	33
4.3.1 Extracción de ADN	33
4.3.2 Extracción de ARN	34
4.3.3 Obtención de ADNc	34
4.3.4 Detección de provirus/virus de BLV por nested PCR (n-PCR)	34
4.3.5 Cuantificación de provirus: PCR en tiempo real (qPCR)	35
4.4 Producción y caracterización de anticuerpos IgY específicos anti BLV.....	36

4.4.1 Producción de virus completo concentrado (BLVc)	36
4.4.2 Optimización de la producción de BLVc: valproato y trehalosa	36
4.4.3 Caracterización de BLVc	38
4.4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de BLVc.....	38
4.4.3.2 Microscopia electrónica de transmisión.....	41
4.4.3.3 Detección de antígenos: ELISA de antígeno BLV	41
4.4.4 Inmunización de gallinas con BLVc y producción del polvo de huevo.....	42
4.4.5 Producción de lote concentrado de IgY para caracterización	43
4.4.6 Ensayo <i>in vitro</i> de neutralización viral: Inhibición de la formación de sincicios	44
4.4.7 Detección <i>in vivo</i> de anticuerpos neutralizantes: Bioensayo en corderos	47
4.4.7.1 Obtención de virus y provirus	47
4.4.7.2 Ensayo de infección experimental: Dosis mínima	48
4.4.7.3 Ensayo de neutralización viral <i>in vivo</i>	49
4.5 Ensayo controlado de eficacia a campo	50
4.5.1 Monitoreo de la infección	53
4.6 Análisis estadístico	53
5. Resultados	54
5.1 Niveles de anticuerpos y virus/provirus en sangre y leche de vacas en estudio.....	55
5.2 Anticuerpos y provirus en los terneros recién nacidos en estudio.....	60
5.3. Producción y caracterización de anticuerpos IgY anti BLV	61
5.3.1 Producción virus completo concentrado (BLVc).....	61
5.3.1.1 Optimización del Rendimiento	61
5.3.2 Caracterización de BLVc: detección de partículas y proteínas virales. Reconocimiento específico de anticuerpos.....	63
5.4.1 Ensayo de neutralización <i>in vitro</i> : Inhibición de la formación de sincicios	71
5.4.4 Detección <i>in vivo</i> de anticuerpos neutralizantes: Bioensayo en corderos	73
5.5 Ensayo controlado de eficacia a campo	75
6. Discusión	78
7. Conclusiones	92
8. Bibliografía	95
Anexo I: Reactivos y soluciones	106
Anexo II: Información suplementaria.....	108

Índice de Tablas

Tabla 1	Prueba de optimización de concentración y estabilidad de BLVc utilizando valproato y/o trehalosa como conservante, activador o activador + conservante.
Tabla 2	Anticuerpos utilizados en ensayo de inmunodetección.
Tabla 3	Relación y concentración de los cultivos celulares de células efectoras e indicadoras utilizados en los ensayos de formación de sincicios.
Tabla 4	Diseño de los inóculos utilizados en el ensayo de dosis mínima.
Tabla 5	Diseño de los inóculos utilizados en el ensayo de neutralización.
Tabla 6	Tamaño de muestra para detectar diferencias significativas entre dos proporciones ($\alpha = 0,05$), ($\beta=0,20$).
Tabla 7	Distribución de la carga proviral en sangre y leches individuales.
Tabla 8	Distribución de la carga proviral pareada en sangre y leche.
Tabla 9	Detalle de lotes 1-7 del polvo de huevo entero.
Tabla 10	Dosis respuesta de virus BLV en ovinos receptores (virus y células).
Tabla 11	Resultados del ensayo de neutralización de anticuerpos en ovinos receptores.
Tabla 12	Progresión del ensayo controlado de eficacia a campo.
Tabla 13	Detalle de unidades experimentales y prevalencia en los distintos grupos.
Tabla A1	Composición de reactivos para 2 geles de SDS-PAGE.
Tabla A2	Resultados crudos de las muestras de terneros recién nacidos, analizadas mediante ELISA Leukofast y qPCR.

- Tabla A3 Tabla A3: Detalle de la progresión de la infección en el ensayo de dosis mínima. Resultados de ELISA Leukofast y n-PCR TAX en los distintos tiempos de muestreo.
- Tabla A4 Detalle de la progresión de la infección en el ensayo de neutralización. Resultados de ELISA Leukofast y n-PCR TAX en los distintos tiempos de muestreo.
- Tabla A5 Resultados obtenidos grupo control.
- Tabla A6 Resultados obtenidos grupo tratado.

Índice de Figuras

- Figura 1 Situación de BLV (a) en el mundo y (b) en Sudamérica según la OIE.
- Figura 2 Esquema de la estructura de (a) la partícula viral y (b) del genoma de BLV.
- Figura 3 Transferencia de las IgY a la yema de huevo.
- Figura 4 Inmunidad pasiva adquirida.
- Figura 5 Elisa de antígeno BLV. (a) Esquema del ensayo, (b) Esquema de sensibilización y controles en la placa de ELISA.
- Figura 6 Representación gráfica del ensayo de formación / inhibición de sincicios en ausencia/presencia de anticuerpos neutralizantes.
- Figura 7 Título de anticuerpos específicos anti BLV en sangre y leche.
- Figura 8 Carga proviral en muestras de sangre y leches individuales.
- Figura 9 Prevalencia de (a) anticuerpos y (b) provirus en madres, leches individuales, leches de tanque y terneros.
- Figura 10 Correlación entre (a) carga proviral y anticuerpos en sangre, (b) carga proviral en sangre y anticuerpos en leche, (c) anticuerpos en leche y anticuerpos en sangre.
- Figura 11 Comparación de la distribución de la carga proviral en sangre con sus respectivas leches con y sin provirus detectable.
- Figura 12 Correlación de la carga proviral en leche, sangre y el nivel de anticuerpos. (a) Carga proviral en leche individual y carga proviral en sangre, (b) carga proviral en leche individual y el nivel de anticuerpos en leche individual.
- Figura 13 Título de anticuerpos y detección de provirus en (a) leches individuales y de (b) leche tanque.

- Figura 14 Detección de antígenos de BLV en células FLK con el agregado de valproato y trehalosa por ELISA de captura en cultivos de FLK con el agregado de valproato y trehalosa.
- Figura 15 Detección de antígenos de BLV en cultivos FLK con agregado de trehalosa como potencial estabilizante en el medio de mantenimiento celular por ELISA de captura.
- Figura 16 Gel de poliacrilamida teñido con colorante de *Coomassie*. 1: BLV concentrado, 2: Marcador de peso molecular.
- Figura 17 Ensayo de inmunodetección con el BLV concentrado. 1: MAB anti BLV conformacional, 2: MAB anti BLV lineal, 3: MAB anti p24, 4: Suero control positivo, 5: Suero control negativo.
- Figura 18 Ensayo de inmunodetección con el BLV concentrado. 6: IgY anti BLV, 7: IgY anti p24, 8: IgY no relacionada (pool INCUINTA).
- Figura 19 Ensayo de inmunodetección con el antígeno de ELISA Leukofast. 1: MAB anti BLV conformacional, 2: MAB anti BLV lineal, 3: MAB anti p24, 4: Suero control positivo, 5: Suero control negativo, 6: IgY anti BLV, 7: IgY no relacionada (pool INCUINTA).
- Figura 20 Fotografía de microscopía electrónica de un preparado de BLVc. La flecha indica una partícula compatible con una estructura viral de BLV.
- Figura 21 Producción de polvo de huevo entero anti BLV: (a) Inóculo BLVc, (b) gallinas inoculadas en BIOINNOVO, (c) y (d) baldes de polvo de huevo entero.
- Figura 22 Títulos de anticuerpos totales anti BLV de los sueros de las gallinas inoculadas en distintos tiempos.
- Figura 23 Producción de polvo de huevo con IgY anti BLV.
- Figura 24 Microscopía óptica de células (a) FLK-BLV y células (b) CC81.
- Figura 25 Microscopía óptica de co-cultivo de células efectoras FLK-BLV (2.5×10^4 cél/ml) con células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml).

Figura 26 Microscopía óptica de co-cultivo de células efectoras FLK-BLV (2.5×10^4 cél/ml) con células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml) y de cultivo de células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml) a las 24, 30, 48 y 72 hs de cultivo.

Abreviaturas

AcOH: Ácido acético

Acs: Anticuerpos

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

BLV: *Bovine leukaemia virus* (virus de la leucosis bovina)

BLV1: Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de envoltura (gp51) BLV conformacional

BLV2: Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de envoltura (gp51) BLV lineal

BLV3: Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de cápside (p24) BLV

BLVc: BLV concentrado

CC81: Fibroblastos de riñón felino transformadas con virus del sarcoma murino

Cél: Células

CD: Del inglés *Cluster of Differentiation*

CIMg: Cloruro de magnesio

CT: Del inglés *threshold cycle*.

Csp: Cantidad suficiente para

DAB: *3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DNAsa: desoxirribonucleasa/s

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DS: Desvío estándar

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

ELISA: Del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*

env: Envoltura viral

FLK: *Fetal lamb kidney* (riñón fetal ovino)

FLK-BLV: FLK persistentemente infectadas con BLV

G4: ARN mensajero que codifica proteína viral p11

g: Unidad la aceleración de la gravedad

gr: Gramos

gp30: Glicoproteína de transmembrana

gp51: Glicoproteína de la envoltura viral

gag: Gen que codifica para la capsida

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

H₂S₀₄: Ácido sulfúrico

HCl: Ácido clorhídrico

Hs: Horas

HTLV-1: Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

HTLV-2: Virus linfotrópico humano de células T tipo

ID: Identificación

IDGA: Inmunodifusión en gel de agar

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IgY: Inmunoglobulina de yema de huevo

IgY BLV: Anticuerpo policlonal IgY contra BLV completo

IgY p24: Anticuerpo policlonal IgY contra p24 de BLV

IgY NR.: Anticuerpo policlonal IgY no relacionado

kDA: KiloDalton

Kg: Kilogramos

Km: Kilómetros

LBE: Leucosis Enzoótica Bovina

LKF: Leukofast

LTRs: Repeticiones terminales idénticas

M: Molar

mM: Micromolar

MAB: Anticuerpo monoclonal

MeOH: Metanol

Min: Minutos

ml: Mililitros

mM: Micrómetros

n: número total de muestras

N°: Número

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

nPCR: Nested PCR (PCR anidada)

OD: Densidad óptica

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

p: Nivel de significancia

p24: Proteína de la cápside

p53: Proteína principal de superficie

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PL: Del inglés *persistent lymphocytosis* (linfocitosis persistente)

pol: Gen que codifican para la transcriptasa reversa

pro: Gen que codifica para proteasa viral

PVDF: del inglés *polyvinilidene difluoride*

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

R3: ARN mensajero tres

Rex: gen regulatorio

Rpm: Revoluciones por minuto

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute (Roswell Park Memorial Institute medium)

RVA: *Bovine rotavirus group A* (rotavirus bovino del grupo A)

RT: Enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa

SC +: Suero de campo positivo

SC -: Suero de campo negativo

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Seg: Segundo

SO₄(NH₄)₂: Sulfato de amonio

Sn: Sobrenadante

SNM: Sistema Nacional de Microscopía

T: Tiempo

Tax: Gen regulatorio

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina

TEMED: Tetrametiletilendiamina

U: Unidades

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

v/v: Volumen a volumen

µg: Microgramos

µl: Microlitro

µM: Micrometros

°C: Grados Celsius

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto del uso de anticuerpos de yema de huevo (IgY) anti BLV específicos como suplemento en la leche de consumo de terneros durante todo el período de cría, monitoreando a los animales desde el nacimiento hasta los 9 meses de vida. El objetivo central fue obtener evidencia que el consumo de leche pueda ser una vía de transmisión del virus y si así fuera, proponer una alternativa para interferir con el desafío natural de infección por BLV por consumo de leche.

Como objetivo complementario, se realizaron infecciones experimentales en ovinos en las que se determinó la dosis mínima infectiva tanto de virus asociado a células FLK-BLV como de virus libre en sobrenadante celular de FLK-BLV. También se analizó la capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en suero de un animal infectado con BLV. Cabe destacar que previamente al uso de animales se intentó poner a punto un ensayo *in vitro*.

Se realizó la caracterización del rodeo donde se desarrolló la experiencia con terneros. Se observó una prevalencia individual de anticuerpos del 96% en las muestras de sangre, y de un 90% en las muestras de leche. Los títulos de anticuerpos en sangre fueron significativamente más altos que los encontrados en leche. Se detectó la presencia de provirus en el 82% de las muestras de sangre y 59% de las muestras individuales de leche. La carga proviral en leche fue significativamente menor que en sangre. En la leche de tanque del ordeño diario, se encontraron anticuerpos con un título de 1:32 en todas las muestras, mientras que en las muestras de leches individuales el rango de títulos de anticuerpos variaba entre <1:16 y >1:64. Al comparar las leches individuales con un título de 1:32 con las leches de tanque que poseen el mismo título, se pudo observar que el 90% de las leches de tanque evidencian cargas provirales detectables, mientras que solo el 60% de esas leches individuales evidencian carga proviral detectable. Se detectaron anticuerpos anti BLV en el 95,5% de los terneros recién nacidos, lo que demostraría un correcto calostrado de los animales, de los cuales el 13% de los terneros nacieron infectados (detección de provirus en sangre).

En el bioensayo de ovinos, se observó que fueron necesarias 5.000 células FLK-BLV por inóculo para generar la infección en los dos corderos inoculados, mientras que el virus libre en sobrenadante celular FLK-BLV resultó infectivo hasta la dilución 1/1.000. El suero bovino positivo a BLV impidió la infección en los corderos inoculados con el virus libre de células, mientras que todos los ovinos se infectaron cuando se inocularon con virus libre de células en presencia de suero bovino negativo a BLV.

Se produjo la cantidad necesaria de un preparado de polvo de huevo con anticuerpos específicos anti BLV para el ensayo controlado de eficacia a campo. La preparación fue caracterizada por ELISA y por infección experimental en corderos. Todos los corderos resultaron infectados cuando fueron inoculados con virus libre de células FLK-BLV previamente incubado con la preparación de IgY concentrada anti BLV y con la preparación de polvo de huevo anti BLV, no demostrando la capacidad de las IgY anti BLV de neutralizar el virus presente en el sobrenadante de células FLK-BLV. Si bien el ensayo *in vivo* fue una alternativa para el ensayo *in vitro* con el objeto de analizar la capacidad neutralizante de los anticuerpos IgYs, y aunque no se obtuvieron los resultados esperados, su realización ha resultado beneficiosa para el grupo de trabajo, como una herramienta nueva y válida para realizar distintos estudios.

Este polvo fue suministrado a los terneros en cada toma de leche durante la cría. Paralelamente en un grupo control, no se les ofreció ningún suplemento en las tomas diarias de leche. En los primeros días de vida de los terneros se observó tanto en el grupo control como en el grupo tratado, anticuerpos en el 93% de las muestras. Estos valores concuerdan con lo previamente reportado para infecciones en terneros recién nacidos. Los siguientes muestreos se realizaron hasta completar el seguimiento a los 9 meses de los terneros en donde se observó una prevalencia del 6.6% en el grupo tratado y del 7.7% en el grupo control.

Este trabajo de tesis aportó datos sobre la epidemiología natural de la infección, que deberían ser utilizados para el diseño y prosecución de una estrategia de control. En un contexto de infección natural francamente endémica, la estrategia de uso de anticuerpos como complemento en la toma diaria de leche podría ser valiosa para la reducción de la dinámica en la edad temprana.

Palabras claves: Leucosis bovina enzoótica, BLV, ELISA, nPCR, IgY, transmisión, neutralización, medidas de control, leche.

Abstract

In this work we studied the effect of the use of anti-BLV specific egg yolk antibodies (IgY) as a supplement in the milk of calves during the whole breeding period, monitoring the animals from birth to 9 months of age. The main objective was to obtain evidence that milk consumption could be a route of transmission of the virus and if so, to propose an alternative to interfere with the natural challenge of BLV infection due to milk consumption.

As a complementary objective, experimental infections were carried out in sheep in which the minimum infectious dose was determined both of FLK-BLV cell-associated virus and of free virus in FLK-BLV cell supernatant. The neutralizing capacity of the antibodies present in the serum of an animal infected with BLV was also analyzed. It should be noted that prior to the use of animals an attempt was made to develop an *in vitro* assay.

The characterization of the herd where the experience with calves was developed was carried out. An individual antibody prevalence of 96% was observed in blood samples and 90% in milk samples. The antibody titers in blood were significantly higher than those found in milk. The presence of provirus was detected in 82% of the blood samples and 59% of the individual milk samples. The proviral load in milk was significantly lower than in blood. In the milk of the milking tank, antibodies were found with a titer of 1:32 in all the samples, whereas in the samples of individual milks the range of antibody titers varied between <1:16 and > 1:64. When comparing the individual milks with a titer of 1:32 with the tank milks that possess the same title, it could be observed that 90% of the tank milks show detectable proviral loads, while only 60% of those individual milks evidence detectable proviral load. Anti-BLV antibodies were detected in 95.5% of the newborn calves, showing a correct colostrum intake, where 13% of the calves were born infected (detection of provirus in blood).

In the sheep bioassay, it was observed that 5,000 FLK-BLV cells were enough to generate the infection in the two lambs inoculated, while the free virus in FLK-BLV cell supernatant was infective until dilution 1/1000. BLV-positive bovine serum prevented infection in lambs inoculated with cell-free virus, whereas all sheep were infected when inoculated with cell-free virus in the presence of BLV-negative bovine serum.

The necessary amount of an egg powder with specific anti-BLV antibodies was produced for the controlled field efficacy test. The preparation was characterized by ELISA and by experimental infection in lambs. All lambs were infected when they were inoculated with

FLK-BLV cell-free virus previously incubated with the concentrated anti-BLV IgY preparation and with the BLV egg powder, not demonstrating the ability of the anti-BLV IgY to neutralize the virus present in the supernatant of FLK-BLV cells. Although the *in vivo* test was an alternative for the *in vitro* test in order to analyze the neutralizing capacity of the IgYs antibodies, and although the expected results were not obtained, it has been beneficial for the group, as a new and valid tool to carry out different studies.

This powder was supplied to the calves in each milk intake during breeding. In parallel in a control group, no supplement was offered in the daily milk intakes. In the first days of life of the calves, 93% of the samples contained antibodies both in the control group and in the treated group. These values agree with what was previously reported for infections in newborn calves. The following samplings were carried out until the 9-month follow-up of the calves was completed, where a prevalence of 6.6% and 7.7% was observed in the treated and in the control group, respectively.

This thesis provided data on the natural epidemiology of the infection, which should be used to design and pursue a control strategy. In a context of endemic natural infection, the strategy of using antibodies as an adjunct in the daily milk intake could be valuable for the reduction of the dynamics in the early age.

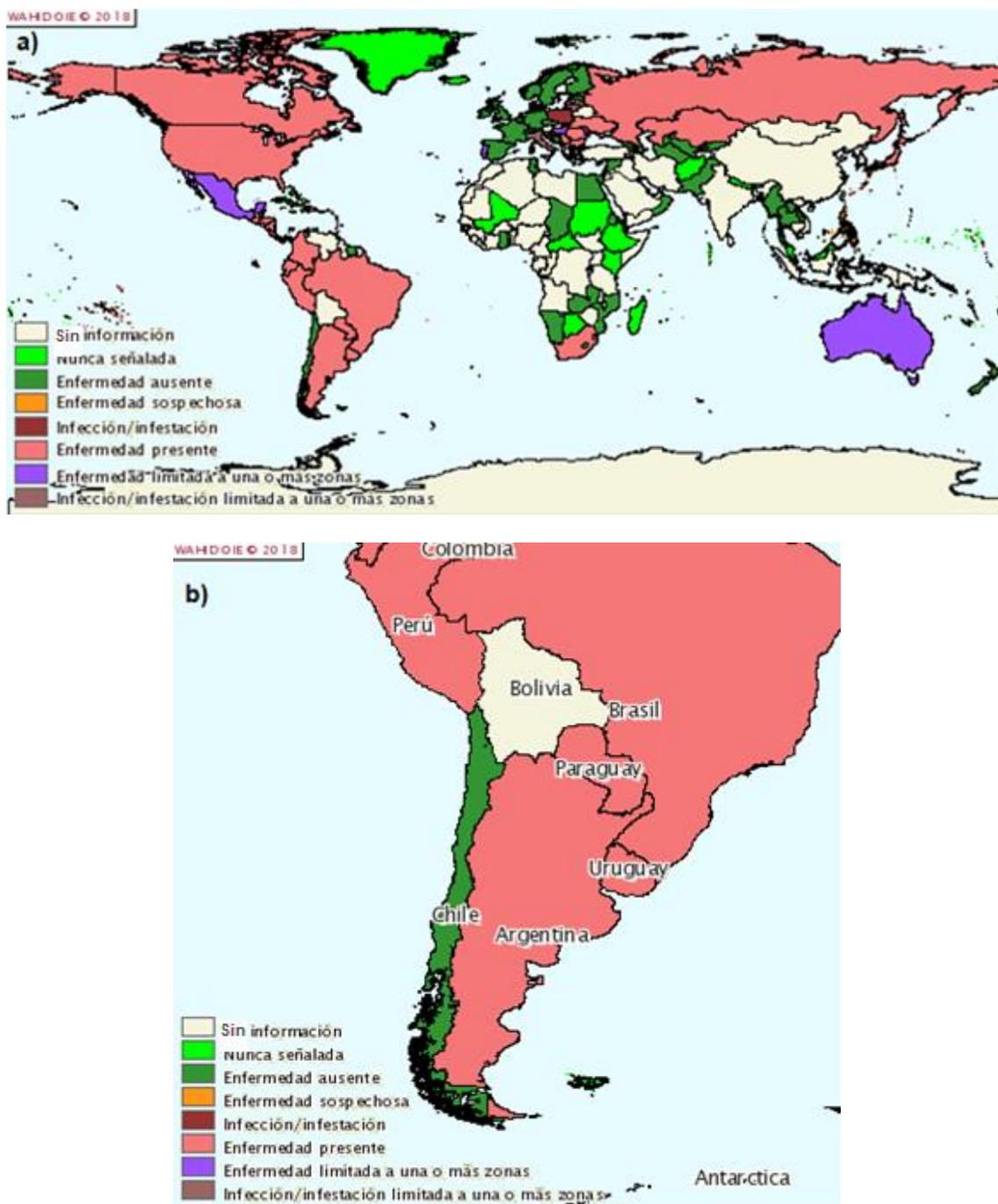
Key words: Enzootic bovine leukaemia, BLV, ELISA, nPCR, IgY, transmission, neutralization, control measures, milk.

1. Introducción

1.1 Generalidades de la leucosis bovina enzoótica: Agente etiológico, epidemiología e impacto

El virus de la leucosis bovina (*bovine leukaemia virus*, BLV) es el agente causal de la leucosis bovina enzoótica (LBE), una enfermedad crónica y contagiosa que afecta naturalmente al ganado bovino y al búfalo de agua (Kettmann y col., 1976; Aida y col., 2013). La infección está instalada en el ganado de todo el mundo y la prevalencia individual varía entre países. En la comunidad europea se han tomado medidas de control y erradicación, lo que favoreció la eliminación de la infección en la mayoría de los países Europa occidental (Nuotio y col., 2003; Acaite y col., 2007; Maresca y col., 2015). Algo similar sucedió en Nueva Zelanda y Australia, que son actualmente libres de la infección desde los años 2008 y 2013, respectivamente (European Panel on Animal Health and Welfare, 2015). En toda América la infección es endémica. En Argentina la prevalencia individual es superior al 30%, mientras que la prevalencia predial en tambos supera el 80% (Trono y col., 2001). Estudios recientes muestran una prevalencia individual superior al 80% en las zonas de intensa producción lechera (Lomónaco y col., 2014) (**Figura 1**), lo que concuerda con las observaciones de Trono y col. (2001), en donde se discutía un notorio incremento en la prevalencia de la infección desde los primeros reportes en nuestro país con una tendencia de continuar aumentando en caso de no proponerse medidas de control.

Figura 1: Situación de BLV (a) en el mundo y (b) en Sudamérica según la OIE.



Mapa de la distribución de las enfermedades terrestres de la OIE, en el período comprendido entre Enero y Junio de 2018 (World Animal Health Information Database, OIE).

El ganado bovino lechero es el que presenta mayores índices de prevalencia comparado con el ganado destinado a la cría y engorde, lo que estaría relacionado con las prácticas de manejo productivo y no con la susceptibilidad genética y/o de género o raza (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

La mayoría de los animales infectados cursa la infección sin sintomatología clínica como portadores inaparentes, pero alrededor del 5-10% muere cada año como consecuencia de lesiones neoplásicas del sistema linfático (linfosarcomas), lo que impacta negativamente en el sistema productivo lechero, provocando un lucro cesante de alrededor de 5.300 dólares por vaca muerta con esta problemática (Castellano y Goizueta, 2014). Debido a que la mayoría de las infecciones cursa en forma asintomática, el BLV genera pérdidas indirectas debido a las restricciones comerciales en el intercambio de animales en pie y material genético. En este sentido, las normativas que imponen los países para el comercio incluyen, en general, la ausencia de virus/provirus en el material de intercambio, lo que provoca una pérdida de venta en aquellos casos con detecciones positivas, como discuten Rossich y col. para semen (Rossich y col., 2007). También hay análisis de riesgo que vinculan al BLV con la reducción de la capacidad inmune y/o con la producción de leche, aunque en el contexto actual de extremos índices de prevalencia, es difícil validarlo en situación productiva (Bartlett y col., 2014; Nekouei y col., 2016; Norby y col., 2016).

Si bien se han reportado distintos intentos por desarrollar vacunas eficaces para poder controlar la infección, ninguno resultó ser eficiente, y por el momento no existe una vacuna comercial disponible (Manual de la OIE, 2012). Sumado a la ausencia de tratamiento, el único método para controlar la infección consiste en la erradicación y/o segregación de los animales infectados, algo económicamente prohibitivo en países productores con alta prevalencia como Argentina. Los experimentos para generar vacunas utilizando BLV inactivado, células FLK-BLV (Miller y Van Der Maaten, 1978; Miller y col., 1983) y la glicoproteína gp51 purificada han conferido protección a corto plazo. Asimismo, se probaron vacunas recombinantes de virus vaccinia con gp51 sola o con gp51 y gp30 combinadas utilizando ovinos y bovinos, pero solo los ovinos resultaron protegidos (Daniel y col., 1993).

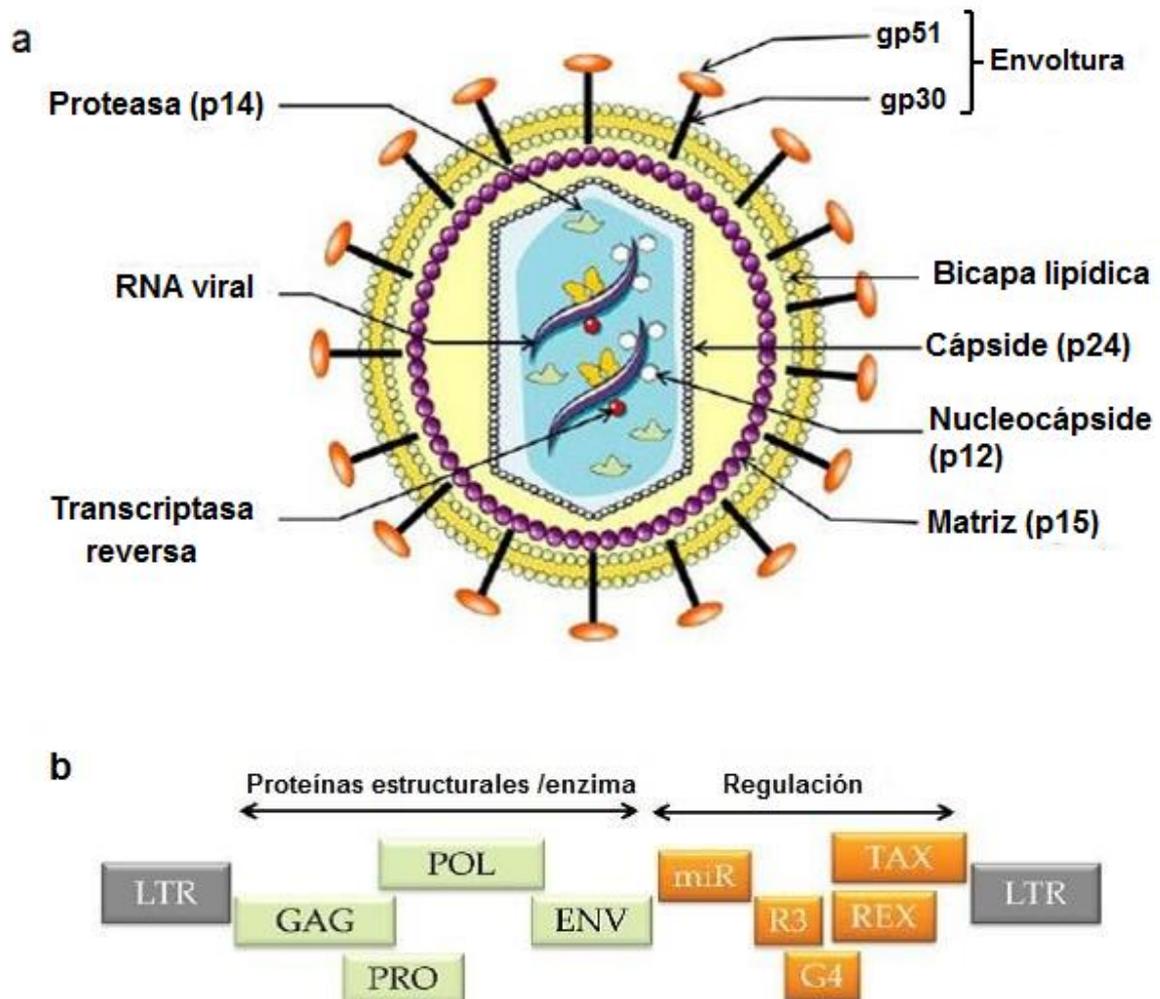
Nuestro grupo de trabajo, en colaboración con el laboratorio del Dr. Luc Willems de la Universidad de Liege, Bélgica, ha desarrollado y ensaya actualmente una estrategia de profilaxis basada en la utilización de una cepa atenuada de BLV. Esta última posee la capacidad para infectar y montar una respuesta inmune protectora, pero de baja replicación *in vivo* y bajo potencial de transmisión, por lo cual se espera contar en un futuro mediato con una herramienta efectiva de control (Gutiérrez y col., 2014a; Barez y col., 2015).

1.2 El virus de la leucosis bovina

El BLV pertenece al género Deltaretrovirus de la familia *Retroviridae*, posee dos hebras idénticas de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple y polaridad positiva, y se replica a través de una forma intermedia de ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario que se inserta aleatoriamente en el genoma de la célula huésped, donde se denomina provirus. El BLV se agrupa junto al virus linfotrópico humano tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II), con el cual comparte no solamente características genéticas sino patogénicas, ya que ambos producen linfosarcomas después de un largo período sin sintomatología.

El genoma de BLV proviral consiste en 8714 nucleótidos, que contiene dos repeticiones terminales idénticas (LTRs) en los extremos y todos los genes esenciales (*gag*, *pro*, *pol* y *env*) para completar el ciclo viral (Polat y col., 2016). Estos genes codifican para las proteínas internas estructurales del virión, la proteasa viral, la transcriptasa reversa y glicoproteínas de la envoltura del virión, respectivamente (Aida y col., 2013) (**Figura 2**). Además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, requeridos para la síntesis de la partícula viral, el genoma BLV contiene una región X localizada entre las regiones *env* y LTR3' (Polat y col., 2016). Las proteínas regulatorias Tax, Rex, R3 y G4 son codificadas en la región X (Aida y col., 2013) y modulan la expresión viral y/o celular. En esta misma región el provirus de BLV codifica para micro ARNs cuya función se encuentra actualmente en estudio (Barez y col., 2015).

Figura 2: Esquema de la estructura de (a) la partícula viral y (b) del genoma de BLV.



Adaptado de Barez y col., 2015.

Dentro del subgrupo de BLV, la divergencia de secuencia está por debajo del 6% en los genes estructurales *pol* y *env*, indicando un alto grado de conservación entre las diferentes variantes geográficas. Aunque las razones son desconocidas, esta estabilidad genómica podría resultar de una mayor fidelidad de la transcripción inversa o de estrictas restricciones de replicación (Gillet y col., 2007). Estudios filogenéticos recientes de la región *env* en cepas virales aisladas alrededor del mundo han demostrado que BLV se puede clasificar en al menos 10 genotipos (Marawan y col., 2017), serológicamente indistinguibles.

La proteína p24, mayoritaria en la cápside viral, es el blanco de la respuesta inmune junto con la proteína principal de superficie gp51, razón por la cual ambas se utilizan en la mayoría de los ensayos actuales de diagnóstico (Gillet y col., 2007).

1.3 Replicación viral, patogenia e inmunidad

El virus posee tropismo preferencial por los linfocitos B, aunque posee capacidad para infectar distintas células del sistema inmune, característica que lo convierte en un patógeno de transmisión sanguínea (Rodríguez y col., 2011; Aida y col., 2013).

La expresión viral activa sucede durante la primo-infección, después de la cual el virus permanece en estado silente en el hospedador integrado permanentemente en el genoma celular como provirus ADN, provocando una respuesta inmune persistente sin evidencia de circulación viral activa (Florins y col., 2007). Este estado de falta de expresión es denominado latencia por algunos autores, aunque no es análogo al concepto clásico de latencia provocada por infecciones por virus de la familia *Herpesviridae* (Florins y col., 2007; Aida y col., 2013; Kulkarni y Bangham, 2018), sino que se refiere al mantenimiento del provirus circulante a pesar de la ausencia de viriones libres y de síntomas clínicos.

Al ingresar el virus al hospedador comienza una etapa de replicación activa intracelular y el virus se transmite de célula a célula. Durante esta etapa, conocida como ciclo infeccioso, el virus se puede detectar en sangre (detección de ARN viral) y comienza el primer ciclo de expansión clonal que dura de 3 a 8 meses post-infección. Después de este período, y en presencia de una respuesta inmune vigorosa, comienza la segunda fase de expansión donde aparecen clones de células con el provirus insertado que se mantienen por división mitótica (Gillet y col., 2013). La mayoría de estos clones se conforman previo al comienzo de una respuesta inmune eficiente, cuando el 97% de los clones primarios es depletado (Barez y col., 2015), y en presencia de una estricta regulación de la expresión viral *in vivo*, la progenie de BLV proviral es mantenida por división de las células blanco (Gillet y col., 2013). Una vez establecida la infección, no es posible detectar evidencia de partículas virales y/o proteínas circulantes. Solo se puede evidenciar la infección a través de la detección de 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 Burny, 1994).

Un alto porcentaje de los bovinos infectados son portadores asintomáticos y su recuento leucocitario se mantiene normal, pudiendo permanecer en este estado de por vida y siendo de bajo riesgo de transmisión, ya que la carga proviral de los mismos es baja o

indetectable (Juliarena y col., 2016); encontrándose menos del 1% de las células de la sangre periférica infectadas por el virus (Gillet y col., 2007).

Entre el 20 y 30% de los animales infectados desarrollan linfocitosis persistente (*Persistent lymphocytosis*, PL), que consiste en una acumulación permanente, relativamente estable y benigna de linfocitos B infectados (Barez y col., 2015; Gillet y col., 2007). Como consecuencia, la relación de células B / T se modifica al mismo tiempo que aumenta el número total de linfocitos circulantes. Se considera que un animal tiene PL cuando su recuento de linfocitos totales excede significativamente el valor reconocido como normal para los animales de su clase y edad en al menos 2 análisis de sangre sucesivos (Burny y col., 1988). Debido a que la concentración de células infectadas con BLV juega un papel importante en el éxito o el fracaso de la transmisión de BLV, los animales con PL son la principal fuente de infección dentro del rodeo (Burny y col., 1988), ya que su carga proviral puede ser de hasta el 50% de los linfocitos infectados.

Luego de un largo período asintomático no menor a 3 años, algunos animales (5-10%) desarrollan tumores del sistema linfático (linfosarcoma); los mismos se desarrollan por proliferación de células B que llevan a la muerte del animal infectado (Ferrer y col., 1978; Florins y col. 2008). Estos tumores, también infiltran otros tejidos como el hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y nódulos linfáticos (Gillet y col., 2007). Generalmente los tumores son encontrados en animales de 4-5 años de vida (Ferrer y col., 1978; Florins y col. 2008). Los retrovirus animales, pertenecientes a los géneros *Alpharetrovirus* y *Gammaretrovirus* inducen tumores por dos mecanismos conocidos, ya sea por la activación del oncogén viral o por activación insercional de un gen celular como un proto-oncogen. Por contraste, el BLV no posee un oncogén conocido y no se integra a sitios preferenciales en el genoma de la célula huésped. Esto último, se relaciona con la ruptura del gen del huésped pero no con la supresión de la expresión de genes virales (Aida y col., 2013).

La respuesta inmune humoral ante BLV es del tipo persistente (Kono y col., 1986), por lo tanto cuando la infección se encuentra establecida se puede evidenciar a través de la detección constante de anticuerpos específicos (Burny y col., 1988; Kettmann y col., 1994). Durante el período periparto (2 a 6 semanas antes del parto y 1 a 2 semanas después del parto), el nivel de anticuerpos en sangre puede estar reducido hasta niveles

indetectables, debido a la transferencia desde el sistema circulatorio a la glándula mamaria y al calostro (Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE, 2012). Asimismo, los terneros nacidos de madres infectadas poseen anticuerpos pasivos circulantes hasta los 6-9 meses de edad, por lo cual el diagnóstico se debe realizar por detección de provirus en sangre, igual que lo que sucede con las madres en el periodo periparto (Gutiérrez y col., 2011). Si bien existen reportes sobre inmunidad celular específica, esta temática no ha sido extensamente estudiada. Hasta el momento, no se ha relacionado ningún aspecto del comportamiento de la infección con alguna particularidad de la inmunidad celular (Kabeya y col., 2001).

1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la infección persistente se realiza, según el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE (2012), mediante pruebas serológicas como el ensayo de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), IDGA (inmunodifusión en gel de agar) o la detección de provirus integrado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *nested PCR*; *PCR real time*). Las pruebas serológicas son muy útiles ya que la infección por BLV, al ser de por vida, genera una respuesta persistente de anticuerpos, los cuales se detectan por primera vez entre las 3 a 16 semanas post-infección. Los anticuerpos que se detectan en infecciones naturales son los dirigidos contra las proteínas estructurales principales gp51 y p24. La mayor parte de las pruebas séricas disponibles detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, ya que esta última es de aparición temprana.

1.5 Modelos animales de infección experimental

El huésped natural del virus es el bovino, aunque también se ha registrado la infección natural en búfalos acuáticos (OIE, 2012). Experimentalmente, el BLV se puede transmitir a ovinos (Djilali y col., 1987; Djilali y Parodi, 1989), caprinos (Olson y col., 1981), conejos (Wyatt y col., 1989; Onuma y col., 1990), gallinas (Altanerova y col., 1990), cerdos (Mammerickx y col., 1981) y ratas (Altanerova y col., 1989). El uso de modelos animales es importante, ya que permite estudiar distintos aspectos de la infección por BLV como el estudio de la patogenicidad, infectividad viral, etc.

Los resultados de la infección en los distintos hospedadores experimentales son variados. Las cabras desarrollan anticuerpos persistentes anti BLV y son resistentes al desarrollo tumoral, aunque después de un largo período de tiempo (8 años), la muerte por linfoma se puede observar en algunos casos (Mammerickx y col., 1981; Olson y col., 1981). En los conejos, en la mayoría de los casos, la infección se evidencia por la manifestación de anticuerpos específicos circulantes y la presencia del genoma BLV. En algunos conejos, también se puede observar una disminución de la respuesta de células T a la estimulación de fitolectina y signos de enfermedad clínica, como conjuntivitis, rinitis, pérdida de peso grave y muerte inesperada (Wyatt y col., 1989; Onuma y col., 1990). En gallinas, se pueden encontrar anticuerpos anti BLV en todos los animales inoculados experimentalmente (Martinez y col., 2014), pero solo una pequeña proporción de ellos desarrolla leucemia (Altanerova y col., 1990). En cerdos y ratas, la infección experimental solo provoca la presencia de anticuerpos anti BLV ya que el virus no produce efectos patogénicos (Altanerova y col., 1989; Mammerickx y col., 1981).

Entre los modelos animales descritos, las ovejas presentan características biológicas interesantes para la obtención de información concerniente a la inmunidad, persistencia viral y patogénesis, ya que presentan varias diferencias sobre el hospedador natural. La mayoría de las ovejas infectadas con BLV desarrollan tumores fatales, con un tiempo de incubación más rápido que el hospedador natural, que en general no supera los 12 meses post-infección (Mammerickx y col., 1981; Olson y col., 1981). Las células de tumores bovinos exhiben, en su mayoría, el fenotipo CD5⁺. Por el contrario, en los ovinos, la molécula CD5 no se encuentra comúnmente expresada en las células neoplásicas. Según los reportes relacionados con este hallazgo, el crecimiento favorecido de células CD5⁺ podría ser resultado de una diferencia en la susceptibilidad a la apoptosis entre ambas especies en presencia del BLV. Asimismo, se puede observar que en aproximadamente la mitad de los tumores sólidos inducidos por BLV en bovinos se encuentra mutado el gen de la proteína p53, con muy pocas mutaciones en células B preneoplásicas. En ovinos no se encuentran mutaciones del gen de p53 en ninguna etapa de la enfermedad (Gillet y col., 2007). Como hallazgo más frecuente, se observa que la mayoría de las ovejas infectadas experimentalmente desarrolla una linfocitosis persistente de células B, a diferencia de los bovinos, que no suelen superar el 30% (Djilali y col., 1987).

La infección experimental con BLV en ovejas se ha realizado con éxito utilizando sangre de bovinos infectados con BLV, clones moleculares infecciosos de BLV, células

derivadas de tumores de ganado infectado (Olson y Baumgartener, 1976; Mammerickx y col., 1981; Pomier y col., 2008) y células FLK-BLV (Kono y col., 1986). A estas importantes ventajas se suma que el ganado ovino posee un menor costo operativo y un manejo más fácil con respecto al hospedador bovino (Barez y col., 2015).

1.6 Transmisión y dinámica de la infección

El BLV posee una intensa dinámica de transmisión, según se puede observar en la prevalencia en infecciones naturales en distintas edades (Lomónaco y col., 2014). Mammerickx y col. (1987) observaron que la alta infectividad de un donante estaba relacionada con la presencia de linfocitosis persistente y altos títulos de anticuerpos. Asimismo, Dimmock y col. (1991) pudieron demostrar que el pasaje de 0,1 µl de sangre de un bovino con PL es suficiente para infectar un ovino mediante inoculación experimental. Estas evidencias, junto a reportes actuales de carga proviral heterogénea en infecciones naturales (Gutiérrez y col., 2011; Merlini y col., 2016) permiten concluir que todas las prácticas que se realicen sin respetar las medidas higiénicas, como la extracción de sangre, vacunación, castración, descorne, inyección de medicamentos, palpación rectal, tatuaje, etc., son potenciales vías de contagio, y que los animales con mayores niveles de provirus en sangre son los que representan un mayor riesgo de contagio (Buxton y Schultz, 1984; Mammerickx y col., 1987). Asociado a esta línea de razonamiento, Juliarena y col. (2016) publicaron recientemente que los animales con baja carga proviral, cuando son insertados en un rodeo libre de BLV, no son capaces de transmitir la infección.

Si bien la transmisión sanguínea ha sido reportada desde que se describe esta infección, los hallazgos de estudios epidemiológicos realizados en nuestro grupo de trabajo en establecimientos infectados en forma natural con alta prevalencia y que controlan la iatrogenia, sugieren que éste no sería el único modo de contagio y, probablemente, tampoco el más significativo.

También se ha documentado la transmisión a través de insectos hematófagos de la familia de los tabánidos (Oshima y col., 1981), pero no se conoce con exactitud su importancia en la transmisión en condiciones naturales (Hopkins y Digiacomo, 1997).

Se han demostrado las infecciones *in utero* bajo condiciones de campo, al analizar muestras de terneros recién nacidos tomadas antes de la alimentación con calostro, y se observó que entre el 4 y 18% de las mismas eran positivas (Piper y col., 1979; Thurmond y col., 1983; Lassaurzet y col., 1991; Agresti y col., 1993; Mekata y col., 2014). Se ha encontrado que esta vía de infección es independiente de la raza (Thurmond y col., 1983; Mekata y col., 2014), la edad de la madre y el tiempo de infección con BLV de la madre (Piper y col., 1979), pero se ha asociado la linfocitosis materna (Lassaurzet y col., 1991; Agresti y col., 1993), linfoma maligno (Lassaurzet y col., 1991) y cargas virales maternas (Mekata y col., 2014) con un mayor riesgo para los terneros. Asimismo, se observó que las madres de los terneros que nacían infectados tenían cargas provirales más altas que el promedio de los animales positivos (Gutiérrez y col., 2011).

Bajo condiciones experimentales, también se han demostrado las infecciones *in utero* detectando terneros seropositivos al momento del nacimiento (Van Der Maaten y col., 1981a). Recientemente, Sajiki y col. (2017) informaron la evidencia directa de infección intrauterina en dos madres preñadas con alta carga proviral. Estos autores detectaron el ADN de BLV en ambos recién nacidos, que nacieron mediante cesárea. También detectaron el provirus BLV en la sangre de la placenta y del cordón umbilical, pero no en el líquido amniótico, lo que sugiere que la sangre de la placenta y del cordón umbilical podría ser vía de transmisión vertical del BLV.

No se ha encontrado BLV en óvulos y embriones provenientes de vacas infectadas. Numerosos estudios han demostrado que no hay riesgo de infección en terneros nacidos luego de que se transfieran embriones de vacas infectadas a otra receptora no infectada (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Con respecto al rol de otros fluidos corporales, se considera en general que el semen de animales infectados no contiene normalmente BLV, salvo que este contaminado con linfocitos infectados (Hopkins y DiGiacomo, 1997). Sin embargo, el provirus es detectable en semen fresco y pajuelas comerciales, que no son aceptadas para el comercio internacional, lo que cuestiona su potencial infeccioso aun cuando este no ha sido demostrado (Rossich y col., 2007). Asimismo, se demostró que el semen de toros seropositivos no resultó infectivo en ensayos de inoculaciones experimentales en ovejas ni en procedimientos de inseminación artificial en vacas (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

También se analizó la infectividad en distintas secreciones y excreciones tales como saliva, secreciones del tracto respiratorio bajo, fluidos uterinos, secreciones nasales orina y heces mediante la inoculación experimental de ovejas. Las detecciones fueron intermitentes y no se pudo probar la infectividad de muchos de estos fluidos. Los casos en los que se observó infectividad fueron aquellos en los que se utilizó el fluido sin procesar o la suspensión celular, pero no al utilizar el sobrenadante libre de células. La conclusión de todos estos experimentos es que la infectividad de los fluidos / secreciones / excreciones dependerá de virus asociado a células y el recuento de linfocitos en el fluido. El recuento de linfocitos podría aumentar si existe un proceso inflamatorio o la muestra se contamina con sangre (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

1.6.1 Transmisión oral por consumo de secreciones lácteas

La información disponible referida a la efectividad del contagio por vía oral por consumo de secreciones lácteas, así como las conclusiones a las cuales llegan los autores de los trabajos publicados, son controvertidas. Se ha demostrado la presencia de BLV tanto en calostro como en leche de vacas infectadas (Ferrer y col., 1981; Gutiérrez y col., 2011; Gutiérrez y col., 2015). La infectividad de ambas secreciones ha sido demostrada únicamente bajo condiciones experimentales por inoculación parenteral o administración oral a ovejas (Hopkins y Digiacomo, 1997) y terneros, 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 (Miller y col., 1979; Van Der Maaten y col., 1981b; Meas y col., 2002; Kanno y col., 2014).

La transmisión a través de la leche ha sido reportada en terneros nacidos de madres no infectadas con BLV, que fueron alimentados con leche de vacas infectadas con BLV (Romero y col., 1981), así como en terneros alimentados con calostro y leche de sus madres BLV-positivas desde el nacimiento y luego criados en aislamiento total o parcial de animales infectados del rodeo (Ferrer y Piper, 1978; Ferrer y Piper, 1981). Otro estudio realizado en rodeos lecheros mostró que casi todas las nuevas infecciones por BLV ocurrieron en terneros nacidos de vacas no infectadas. En el mismo estudio, cuando se detuvo la alimentación con leche de tanque y los terneros comenzaron a alimentarse con leche de vacas libres de BLV, no se detectaron nuevas infecciones (Dimmock y col., 1991).

Los análisis publicados relacionados con el riesgo de infección por leche o calostro son también discordantes. Algunos autores relacionan la infectividad perinatal del BLV a través de la leche indirectamente con la edad del ternero (mayor edad, menor infectividad) (Van Der Maaten y Miller, 1978) mientras que otros concluyen lo contrario (Lassauzet y col., 1990). El primer resultado podría explicarse debido a la reducción de la oferta de virus/provirus en relación con el tiempo de lactancia y/o con la permisividad del tracto digestivo (Takezaki y col., 1997; Martin-Latil y col., 2012), y el segundo, podría estar relacionado con la reducción del efecto neutralizante conferido por los anticuerpos calostrales. Los resultados obtenidos en distintos estudios demostraron que una manera de reducir la transmisión de la infección a temprana edad sería mediante la ingesta de calostro de madres positivas, es decir, con anticuerpos anti BLV (Van der Maaten y col, 1981b; Lassauzet y col, 1989; Nagy y col, 2007) seguida de una alimentación con leche de vacas negativas a BLV o suplemento lácteo (Ferrer y Piper, 1981; Lassauzet, 1989; Dimmock y col, 1991).

El rol protector del calostro ha sido reportado por diferentes grupos de trabajo, entre ellos el de Van der Maaten y col. (1981b). Estos autores realizaron un estudio experimental con terneros recién nacidos a los que suministraron para consumo oral 10^6 a 10^9 linfocitos infectados con BLV, tanto en calostro libre de anticuerpos anti BLV o calostro de vacas infectadas con BLV. Como resultado, pudieron observar que los terneros que recibieron calostro con anti BLV no se infectaron, por lo cual le asignaron un rol protector. Lassauzet y col. (1989) encontraron resultados similares en un estudio prospectivo de tres años en un rodeo lechero donde los terneros fueron alojados en jaulas individuales. Observaron que el número de terneros que no habían recibido anticuerpos calostrales anti BLV y resultaron infectados fue significativamente mayor que el de los terneros que habían recibido anticuerpos calostrales anti BLV. De manera similar, Nagy y col. (2007) informaron que la incidencia de infección por BLV era más alta en terneros privados de calostro y sugirieron que la administración de calostro BLV-positivo reduciría el riesgo de infección en comparación con la carencia de calostro.

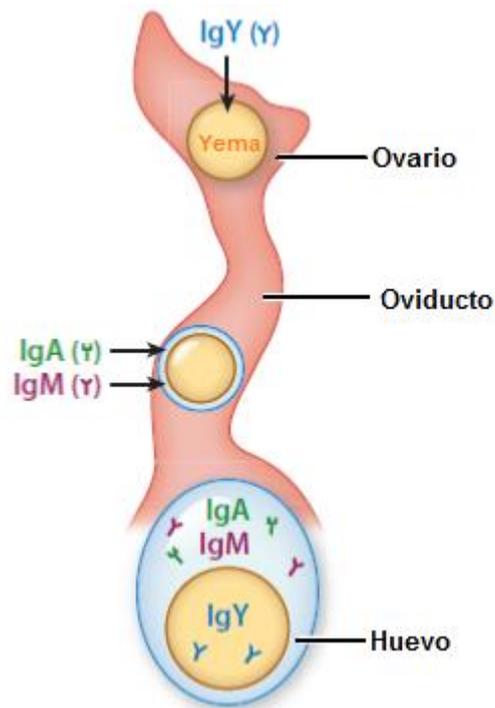
Lo descrito anteriormente permite concluir que la transmisión de BLV por medio de leche o calostro en condiciones naturales es poco clara. Esto se debe en parte a la dificultad de realizar estudios de campo bien controlados en los que los terneros libres de BLV estén protegidos de otras fuentes de infección (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Al estudiar la dinámica de la infección en nuestro laboratorio hemos observado que aproximadamente el 10% de los terneros nacen infectados, con cargas provirales altas (Lomónaco y col., 2014). A partir de entonces los niveles de infección se incrementan continuamente, llegando a un 50% de prevalencia antes del primer parto, alrededor de los 27-30 meses de edad (Gutiérrez y col., 2011; Merlini y col., 2016). Finalmente, la prevalencia llega a ser mayor a un 90% en vacas adultas (con más de un parto). En concordancia, hemos observado que en el tambo experimental de INTA en la EEA Rafaela, donde se realizan gran parte de los ensayos con animales de este trabajo de tesis, la prevalencia de BLV en terneros recién nacidos es levemente superior al 10%, mientras que al año de vida la misma es de alrededor del 30%.

1.7 Inmunoglobulinas de yema de huevo: IgY

Las inmunoglobulinas de yema de huevo, conocidas como IgY, son los equivalentes funcionales a las IgG de mamíferos. Las mismas son transferidas pasivamente desde el suero de la gallina a la yema para proteger el embrión en desarrollo. Los anticuerpos IgY son los únicos que se encuentran en la yema de huevo, ya que durante la formación del huevo en la gallina la IgY del suero es selectivamente transferida a la yema, mientras que la IgA y la IgM son depositadas en la clara del huevo (**Figura 3**) (Kovacs-Nolan y Mine, 2012).

Figura 3: Transferencia de las IgY a la yema de huevo,



Durante la formación del huevo, la IgY (celeste) es transferida desde la sangre a la yema a través de receptores específicos para su translocación. Más tarde, la IgA (verde) y la IgM (violeta) son depositadas en la clara del huevo en el oviducto (Kovacs-Nolan y Mine, 2012).

Los anticuerpos IgY presentan muchas ventajas por sobre las inmunoglobulinas de tipo G de mamíferos. Entre otras, no cruzan con antígenos de los mamíferos ya que reconocen distintos epitopes, no activan el complemento, no generan resistencia, son altamente específicos y proveen una alternativa económica a la producción de anticuerpos policlonales, ya que la cantidad de inmunoglobulinas que pueden obtenerse a partir de la yema de huevo es similar a la producida por animales grandes, mientras que el costo de mantenimiento de una gallina es similar al de un animal pequeño. Además, a diferencia de la extracción de anticuerpos a partir de sangre, la obtención de anticuerpos IgY no es invasiva ya que solo requiere la colecta diaria de huevos. Otra ventaja es que se necesita mucha menos cantidad de antígeno para generar una respuesta inmune eficiente comparado con la cantidad requerida para inmunización de un mamífero (Revisado por Kovacs-Nolan and Mine, 2012).

1.7.1 Uso de las IgY en la inmunidad pasiva

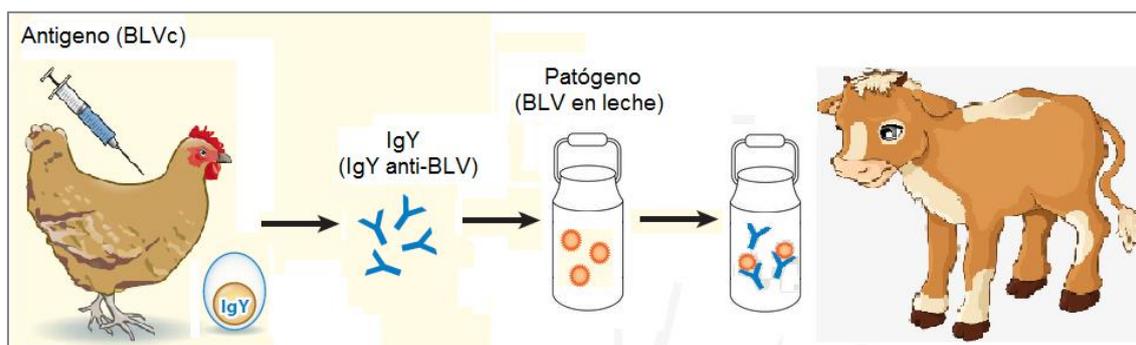
La inmunidad activa es el proceso por el cual se expone un individuo a un antígeno para generar la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta tarda entre días y semanas en desarrollarse, pero es muy duradera. La inmunidad pasiva es el proceso de adquirir anticuerpos preformados para proteger al individuo contra la infección y provee una protección inmediata de corto plazo. La respuesta pasiva natural ocurre cuando los anticuerpos de la madre son transferidos desde el calostro hacia el epitelio intestinal y luego a circulación, siempre que hayan sido adquiridos antes de la clausura intestinal, alrededor de 24 horas después de nacidos en el caso de los terneros. Por otro lado, la respuesta pasiva adquirida consta en obtener anticuerpos específicos de otras fuentes y administrarlo para proteger individuos susceptibles. Estos anticuerpos tienen una vida corta, por lo cual es necesario que la administración de los mismos sea continua y en grandes cantidades, sobre todo si son utilizados de forma oral (revisado por Kovacs-Nolan y Mine, 2012).

Se ha demostrado que los anticuerpos IgY han sido exitosos en la prevención de infecciones que tienen por puerta de entrada la vía oral o fecal (Vega y col., 2011), siendo un producto eficiente para tratamiento tanto preventivo como terapéutico. Estos anticuerpos, cuando son generados frente a microorganismos completos o fracciones antigénicas inmunodominantes, han demostrado ser neutralizantes al desafío en forma natural y experimental. Un ejemplo de esto es el trabajo realizado con polvo de yema de huevo dirigido contra rotavirus bovino del grupo A (*bovine rotavirus group A*, RVA), en donde se observó que fue eficiente para proteger a terneros neonatos de la diarrea producida por RVA (Vega y col., 2011). Asimismo, se probó como tratamiento pasivo para tratar a terneros con diarrea y se observó una disminución de la expresión viral, duración de la diarrea y severidad de la misma (Vega y col., 2015). Si bien los anticuerpos IgY nunca se han ensayado para neutralizar BLV u otros retrovirus, la presente tesis contempla ensayos de producción y caracterización de estos anticuerpos a fin de evaluar su capacidad neutralizante.

En este contexto, se propone proporcionar IgY anti BLV por vía oral en la leche a terneros recién nacidos calostrados naturalmente, durante 60 días, correspondiente al período de cría en estaca.

Nuestra hipótesis sostiene que las IgY anti BLV son capaces de neutralizar al virus presente en la leche previo a su ingesta, complementando y aumentando la capacidad neutralizante otorgada por los anticuerpos naturales ya presentes, actuando así como una herramienta de control de la infección en este período crítico (**Figura 4**).

Figura 4: Inmunidad pasiva adquirida.



Se inoculara a las gallinas con un antígeno (BLV concentrado, BLVc) y se obtienen los anticuerpos de yema de huevo (IgY anti BLV). Mediante el secado del huevo completo se administra el polvo a la leche (que posee virus y provirus) de la cual se alimentarán los terneros (modificado de Kovacs-Nolan y Mine, 2012).

Considerando los antecedentes reportados, sumado a los datos de epidemiología natural obtenidos en nuestro laboratorio, creemos que uno de los potenciales momentos críticos de transmisión sería durante la crianza. En este momento, el ternero consume leche cruda del tambo, donde habría una oferta constante de virus/provirus en presencia de inmunidad pasiva calostrual decreciente. En este contexto, asumiendo que el BLV presente en leche es competente para infectar al entrar en contacto con la mucosa del tracto digestivo, la eficacia de la infección podría estar regulada por la cantidad de anticuerpos presentes en la leche, en concordancia con el nivel de anticuerpos circulantes en el ternero obtenido por consumo de calostro.

En el contexto epidemiológico natural sería muy útil reducir el número de animales infectados antes de la primera parición. Esto permitiría reducir la prevalencia de terneros recién nacidos infectados, y así aportar un mayor número de animales “limpios” a la cadena productiva. Con un circuito constante de reducción de animales infectados se podría reducir en el tiempo la prevalencia individual y progresar hacia la erradicación de la infección.

2. Hipótesis

El nivel de anticuerpos específicos contra BLV en la leche que se suministra a los terneros de rodeos lecheros, durante la crianza, impacta sobre la incidencia de la infección. Por lo tanto, la suplementación de esta leche con anticuerpos específicos en cantidades óptimas constituye una estrategia factible para interferir con el desafío natural por BLV.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Demostrar si la provisión de anticuerpos específicos en la leche suministrada a terneros durante el período de cría impacta sobre la incidencia de la infección por BLV en rodeos lecheros.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Análisis de los niveles de anticuerpos y virus/provirus de muestras de leche individual y leches de tanque, pertenecientes a un rodeo de tambo con alta prevalencia a la infección natural.

3.2.2 Análisis de los niveles de anticuerpos y virus/provirus de los terneros recién nacidos.

3.2.3 Producción y caracterización de anticuerpos específicos anti BLV.

3.2.4 Análisis del efecto de los anticuerpos en leche sobre la incidencia de la infección en un ensayo controlado de eficacia a campo.

4. Materiales y métodos

4.1 Establecimiento y bovinos utilizados en el estudio

Los bovinos utilizados en el presente trabajo de tesis pertenecían a un rodeo lechero de la Provincia de Santa Fe, ubicado en la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela de INTA (EEA RAFELA). Este tambo se encuentra en una de las zonas núcleo de producción de leche de la República Argentina. El rodeo cuenta con alrededor de 300 vacas en ordeño (8.000 kg / animal / año). Los terneros recién nacidos calostrian naturalmente al pie de su madre, se suplementan con sonda o mamadera de calostro fresco o congelado y son transferidos a la guachera o zona de cría a las 48-72 hs de vida. El sistema de cría consiste en la alimentación durante 60 días con 2 litros de leche fresca, proveniente del tanque de almacenamiento refrigerado, que tiene por destino la venta. La provisión de leche se realiza dos veces por día y durante este periodo se agrega paulatinamente alimento balanceado. En el caso de las hembras, la recría, la inseminación artificial (18-21 meses) y el período hasta la primera parición (27-30 meses) se realiza en el mismo establecimiento, mientras que los machos se trasladan a la localidad de Ceres, ubicada a 170 km, cuando alcanzan los 170 kg de peso.

El establecimiento disponía de instalaciones y personal que permitió las intervenciones, el seguimiento y la toma de muestras en tiempo y forma. La prevalencia de infección natural con BLV era superior al 80% (datos previos de nuestro laboratorio). El veterinario a cargo de la sanidad y el personal del área se comprometieron a participar del estudio y a colaborar no solamente con las intervenciones, sino también con el seguimiento establecido en el protocolo durante el tiempo total del estudio. Todas las categorías de animales bajo análisis se encontraban disponibles en el mismo establecimiento. Las características de la EEA Rafaela cumplen los criterios establecidos durante el diseño de los ensayos según el análisis epidemiológico realizado al inicio, cuando se elaboró la estrategia del ensayo controlado de eficacia a campo, tal como se describe más adelante.

En todos los casos, la extracción de sangre se realizó con anticoagulante heparina. Los ensayos de detección y cuantificación de provirus se realizaron con sangre o leche entera, mientras que los ensayos serológicos se realizaron con plasma sanguíneo y suero de leche, respectivamente. En ambos casos, las muestras permanecieron congeladas hasta el momento del uso.

4.1.1 Caracterización de vacas en ordeño del rodeo en estudio

Con el objetivo de conocer los niveles naturales de anticuerpos y provirus BLV en el rodeo seleccionado, se realizó un estudio transversal de prevalencia y cuantificación de anticuerpos y carga proviral utilizando técnicas de uso rutinario en el laboratorio.

Se tomaron muestras individuales de sangre con anticoagulante (heparina) y leche pertenecientes a 49 vacas en ordeño (pool de 4 cuartos) y 10 muestras de leche de tanque de sala de ordeño, tomadas durante 10 días consecutivos.

4.1.2 Caracterización de terneros recién nacidos en el rodeo en estudio

Con el propósito de conocer la situación inicial de los terneros que nacen en el rodeo seleccionado, se determinó el nivel de anticuerpos anti BLV y el nivel de provirus en sangre en los mismos. Para esto, se tomaron muestras de sangre entera con anticoagulante (heparina) de 45 terneros de entre 1-20 días de vida.

4.2 Detección de anticuerpos en sangre y leche

4.2.1 ELISA Leukofast

Se realizó la detección de anticuerpos específicos contra BLV mediante el uso de un ELISA indirecto de anticuerpos totales anti BLV previamente desarrollado y validado en nuestro laboratorio (ELISA Leukofast, Trono y col., 2001).

Brevemente, las placas (Immulon 1B, Nunc) se sensibilizaron con virus BLV completo obtenido del sobrenadante de células FLK-BLV y semipurificado por centrifugación en colchón de sacarosa.

La línea celular de riñón fetal ovino persistentemente infectada con BLV, conocida como FLK-BLV (*Fetal Lamb Kidney*, Van der Maaten y Miller, 1976), fue provista por el Dr. Luc Willems de la Universidad de Liege, Bélgica. La misma conforma una monocapa que secreta partículas virales al sobrenadante sin efecto citopático manifiesto, lo que permite

la obtención de grandes cantidades de virus con pocos *debris* celulares en el sobrenadante.

Las muestras fueron analizadas por duplicado. En el caso de plasma sanguíneo e IgY concentradas con sulfato de amonio, la dilución inicial de las muestras fue de 1:40. Para las muestras de leche, se centrifugó la muestra y se descartó la fase superior (grasa) y se trabajó con la fracción líquida acelular obtenida (suero de leche). Los sueros de leche y el polvo de huevo (diluido en agua destilada pura) se incubaron puros. La placa fue bloqueada en *buffer* de bloqueo para ELISA (**Anexo I**) y se incubaron las muestras diluidas en base 2 en el mismo *buffer*. Luego de la incubación y el lavado, se agregó a cada pocillo anti IgG bovinas conjugadas con peroxidasa. La reacción se reveló con 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB) y H₂O₂, se frenó utilizando H₂SO₄ y la absorbancia se determinó a 450 nm. Como control positivo fuerte se utilizó un suero de campo de un bovino infectado, mientras que en el caso del control positivo débil se usó el mismo suero diluido 1:7. Como control negativo se utilizó un suero de campo negativo. Los controles fueron tratados de la misma manera que las muestras.

Los títulos de anticuerpos se determinaron por el método de dilución de punto final. Las muestras con reactividad igual o superior al 25% fueron consideradas como seropositivas, como indica el procedimiento previamente validado.

4.3 Detección y cuantificación de material genético de BLV

4.3.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico total de muestras de sangre entera, leche individual, pool de leche, sobrenadante de FLK-BLV y células FLK-BLV utilizando un kit comercial (High Pure PCR Template preparation Kit, Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se determinó la concentración y calidad obtenida mediante el uso de un espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific™).

4.3.2 Extracción de ARN

Se extrajo ARN de muestras de sangre entera, sobrenadante de FLK-BLV y células FLK-BLV utilizando un kit comercial (High Pure RNA Purification Kit, Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.3.3 Obtención de ADNc

El ARN obtenido se trató con DNAsa RQ1 (Promega) con el objetivo de eliminar el ADN contaminante y luego se utilizó como templado para la reacción de retrotranscripción (RT) y como control no-RT en la PCR. La reacción de RT contenía 0.02 µg/µl de Random hexámeros, 0,1 U/µl de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega), 0,2 mM de dNTPs, 2,4 U/µl de M-MLV (PROMEGA) y 5 µl de templado, totalizando un volumen final de 25 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 42°C por 60 min y 1 ciclo a 95°C por 5 min.

4.3.4 Detección de provirus/virus de BLV por nested PCR (n-PCR)

A partir de los templados (ADN y ADNc) se amplificó un fragmento de 279 pares de bases del gen TAX, de acuerdo a Wu y col. (2003). En la primer ronda, cada reacción contenía 1 mM de CIMg (Promega), 0,2 mM de dNTPs. 4 ng/µl de *primer forward* y 4 ng/µl de *primer reverse* (TAX 7781F: 5'-CAGACACCAGGGGAGCCATA -3'; TAX 8083R: 5'-CTGCTAGCAACCAATTTCGGA-3'), 0,05 U/µl de Taq pol (Promega) y 5 µl de templado con un volumen final de 25 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min y 1 ciclo a 72°C por 1 min.

En la segunda ronda, cada reacción contenía los mismos reactivos que en la primer ronda, 4 ng/µl de *primer forward*, 4 ng/µl de *primer reverse* (TAX 7802F: 5'-AGCCATACGTTATCTCTCCA -3'; TAX 8062R: 5'-CAGGTTAGCGTAGGGTCATG-3') y 1 µl de templado (producto de la primer ronda), totalizando un volumen final de 25 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 30 ciclos a

94°C por 30 seg, 62°C por 30 seg y 72°C por 30 seg y 1 ciclo a 72°C por 2 min. El producto de la amplificación final obtenido en este paso fue de 279 pb y fue visualizado por luz UV, luego de la corrida en un gel de agarosa al 2% con gel red (Biotium).

En cada amplificación se incluyeron controles positivos, negativos y sin templado. Las muestras fueron consideradas positivas si amplificaban una banda del mismo tamaño que la banda del control positivo. El límite de detección estimado de este ensayo fue de aproximadamente 1 célula infectada en 10.000 células no infectadas.

4.3.5 Cuantificación de provirus: PCR en tiempo real (qPCR)

La carga proviral absoluta se determinó por PCR en tiempo real (qPCR), de acuerdo a Jaworski y col., 2016. Se utilizó la química de SybrGreen, amplificando una región del gen *pol* de 120 pb. Cada reacción de qPCR contenía Fast Start universal SybrGreen Master Mix, 800 nM de *primers forward* y *reverse* (BLVpol5f: 5'-CCTCAATTCCCTTTAAACTA-3'; BLVpol3r: 5'-GTACCGGGAAGACTGGATTA-3') y 500 ng de ADN templado. La reacción se realizó en un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de ciclo fueron las siguientes: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg y 1 min a 60°C. Se confirmó la especificidad de cada reacción mediante el análisis de la curva de disociación. Para cuantificar se realizó una curva standard de plásmido pBLV1 (provisto por Jacek Kuzmak, National Veterinary Research Institute, Polonia), el cual contiene un fragmento de BLV *pol*. Se realizaron diluciones en base diez de este plásmido, partiendo de 1×10^6 hasta 1 copia/ μ l. En cada ensayo se incluyó un control positivo fuerte (bovino infectado natural con alta carga proviral), un control positivo débil (bovino infectado natural con baja carga proviral) y dos controles negativos (2 bovinos no infectados). El límite de detección de este ensayo fue de 5 copias de BLV por reacción (10 copias de BLV/ μ g de ADN). Según nuestro propio criterio previamente definido, la carga proviral fue declarada como alta cuando superó las 1500 copias/ μ g de ADN.

4.4 Producción y caracterización de anticuerpos IgY específicos anti BLV

Se produjeron anticuerpos de yema de huevo, IgY, específicos anti BLV por hiperinmunización de gallinas con BLV concentrado previamente caracterizado.

La producción de los anticuerpos específicos anti BLV de tipo IgY para la caracterización previa se realizó en el laboratorio, mientras que la producción a escala para el ensayo de campo se realizó en colaboración con la empresa *Bioinnovo*, en las instalaciones disponibles en el predio de INTA Castelar.

4.4.1 Producción de virus completo concentrado (BLVc)

Como fuente de virus se utilizó la línea celular FLK-BLV. Las células se cultivaron con medio de crecimiento hasta la formación de una monocapa confluyente, donde se cambió a medio de mantenimiento (**Anexo I**). A partir de las 48 hs, se colectó el sobrenadante en forma diaria reemplazando por medio de mantenimiento hasta que las células mostraron evidencia de sobrecrecimiento y fueron repicadas. El sobrenadante de cultivo con el virus BLV se conservó a $-65 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

Una vez obtenido el volumen de sobrenadante deseado (mínimo 1 litro) se centrifugó a 6000 rpm durante 30 min a 4°C (centrifuga Sorvall, rotor GS-3, ángulo fijo). Se descartó el pellet donde se encuentran residuos celulares grandes. Para la concentración viral, se centrifugó el sobrenadante del paso anterior a 14000 rpm durante 3 hs a 4°C (centrifuga Sorvall, rotor SS-34, ángulo fijo). Se descartó el sobrenadante, se secó el pellet con el tubo invertido sobre papel absorbente durante 1 min y se resuspendió en PBS 1 X (**Anexo I**). Finalmente, se conservó en alícuotas a $-65 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Todos estos pasos se realizaron en esterilidad en cabina de seguridad biológica tipo Bio 2 A.

4.4.2 Optimización de la producción de BLVc: valproato y trehalosa

Se evaluaron alternativas para optimizar la concentración y estabilidad de virus concentrado (BLVc) obtenido de células FLK-BLV, utilizando valproato de sodio y

trehalosa, los cuales fueron reportados como activador de la expresión viral y estabilizante de las partículas virales, respectivamente.

En ambos casos, se caracterizó el virus obtenido en condiciones clásicas y con el agregado de estos compuestos mediante un ELISA de antígeno BLV (ver sección 4.4.3.3), según Martínez y col., 2014.

Para evaluar el efecto del valproato, se cultivaron las células FLK-BLV de la misma forma que la descrita en la sección 4.4.1, con el agregado de valproato de sodio 5 mM (2-propylpentanoic acid sodium, Sigma-Aldrich) en el medio de mantenimiento (**Tabla 1**, activador). Diariamente se tomaron dos alícuotas de sobrenadante de cultivo, a una de las cuales se le agregó trehalosa al 15% como estabilizante post-cosecha (1,5 ml de sobrenadante + 0,5 ml de trehalosa 60%) (**Tabla 1**, activador + estabilizante PC), y ambas se conservaron a -20°C.

Como control se cultivaron células FLK-BLV sin el agregado de valproato al medio de mantenimiento y se tomaron dos alícuotas de sobrenadante de cultivo del mismo modo que se menciona anteriormente, a una de las cuales se le agregó trehalosa al 15% como estabilizante post-cosecha (1,5 ml sobrenadante + 0,5 ml de trehalosa 60%) (**Tabla 1**, estabilizante PC). Se mantuvieron las células durante 7-9 días, durante los cuales se colectó sobrenadante en ambas condiciones.

Para evaluar el efecto de la trehalosa en el medio de cultivo, se cultivaron las células FLK-BLV tal como que se describe en la sección 4.4.1, con el agregado de trehalosa en distintas concentraciones (1.5%, 5% y 10%) como estabilizante en el medio de mantenimiento (**Tabla 1**, estabilizante MM). Diariamente se tomó una alícuota del sobrenadante de cultivo y se conservó a -20°C.

Paralelamente como control, se cultivaron células FLK-BLV sin el agregado de trehalosa al medio de mantenimiento. Se mantuvieron las células durante 7-9 días, durante los cuales se colectó sobrenadante.

Tabla 1: Prueba de optimización de concentración y estabilidad de BLVc utilizando valproato y/o trehalosa como conservante, activador o activador + conservante.

Prueba	Medio de cultivo	Estabilizante
Control	Medio de mantenimiento	No
Estabilizante PC	Medio de mantenimiento	Trehalosa 15%
Activador	Medio de mantenimiento + valproato 5mM	No
Activador + Estabilizante	Medio de mantenimiento + valproato 5mM	Trehalosa 15%
Estabilizante MM	Medio de mantenimiento + trehalosa 1.5%, 5% y 10%	No

Agregado: PC: Post-cosecha, MM: Medio de mantenimiento.

4.4.3 Caracterización de BLVc

El BLVc se caracterizó por: (1) electroforesis en gel de poliacrilamida, (2) inmunodetección, (3) microscopía electrónica de transmisión y (4) ELISA de antígeno BLV.

4.4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de BLVc

El BLVc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del agente desnaturante dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) teñidos con colorante *Coomasie blue* y por transferencia a membranas de *polyvinilidene difluoride* (PVDF) (inmunodetección) de acuerdo a procedimientos estándar. En el primer caso se utilizó un gel de calles, mientras que en el segundo se utilizó un gel preparativo.

Para el SDS-PAGE, se utilizó una concentración de acrilamida de 12% y 4% en los geles de separación y de concentración, respectivamente. La mezcla de reacción así como la composición de los reactivos mencionados, se encuentra descrita en el **Anexo I**. Se utilizó el equipo *Mini-protean gel apparatus III* (BioRad).

La muestra de BLVc se mezcló en una relación 1:1 con el *buffer* muestra-PAGE 2x. Para el gel de calles, se sembraron 10 µl de la muestra y 10 µl de *Protein Molecular Weight Marker* (Promega). Para el gel preparativo, se sembraron 200 µl de la muestra en la calle mayor del gel y 10 µl de marcador de peso (kDa) de proteínas (*Prestained protein Ladder*, (Promega) en la calle de referencia. La electroforesis de los geles se realizó a 150 V durante 1 hora utilizando *buffer* de corrida 1X. Una vez finalizada, uno de los geles (gel de calles) se tiñó con una solución colorante *Coomassie R-250* (**Anexo I**).

El otro gel se transfirió a una membrana de PVDF (BioRad) a 350 mA constante durante 1 hora, utilizando el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La membrana se bloqueó toda la noche (ON, Over night) con bloqueante de ELISA. La inmunodetección se realizó sobre tiras verticales de 3 mm de la membrana transferida, las que se incubaron en agitación por 1 hora a temperatura ambiente (TA) con diferentes anticuerpos específicos disponibles en el grupo de trabajo según la **Tabla 2**.

Tabla 2: Anticuerpos específicos utilizados.

Nombre	Especificidad	Origen
BLV 1	Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de envoltura (gp51) BLV conformacional	Comercial (VMRD Inc.)
BLV 2	Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de envoltura (gp51) BLV lineal	Comercial (VMRD Inc.).
BLV 3	Anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de cápside (p24) BLV	Comercial (VMRD Inc.).
SC+	Suero de campo positivo correspondiente a un bovino infectado naturalmente con BLV	INTA
SC-	Suero de campo negativo, correspondiente a un bovino no infectado	INTA
IgY BLV	Anticuerpo policlonal IgY contra BLV completo	INTA
IgY p24	Anticuerpo policlonal IgY contra p24 de BLV	INTA
IgY NR	Anticuerpo policlonal IgY no relacionado	INTA

Luego se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Se utilizaron distintos conjugados y distintas diluciones según correspondía:

- (1) IgG anti Ratón conjugada con peroxidasa, para los anticuerpos monoclonales.
- (2) IgG anti Bovino conjugada con peroxidasa para los sueros de campo.
- (3) IgG anti Gallina conjugada con peroxidasa para las IgY.

La reacción se reveló con *3,3´diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)*, y se frenó con H₂O.

4.4.3.2 Microscopia electrónica de transmisión

El producto obtenido de la concentración de BLV (BLVc) fue acondicionado con glutaraldehído al 4%, mezclando 500 µl de muestra con 500 µl de glutaraldehído al 8%, y enviado a analizar mediante microscopía electrónica de transmisión al servicio de microscopía del CIAP, Córdoba, adherido al SNM (Sistema Nacional de Microscopía). En el servicio cuentan, entre otros, con un microscopio de transmisión JEOL JEM EXII 1200, operando a 80 kv y un microscopio de transmisión JEOL JEM EXII 1200 de alto contraste, operando a 80 kv.

4.4.3.3 Detección de antígenos: ELISA de antígeno BLV

Para detectar antígenos estructurales de BLV se utilizó un ELISA “sandwich” indirecto (ELISA de antígeno, Martínez y col., 2014) (**Figura 5a**).

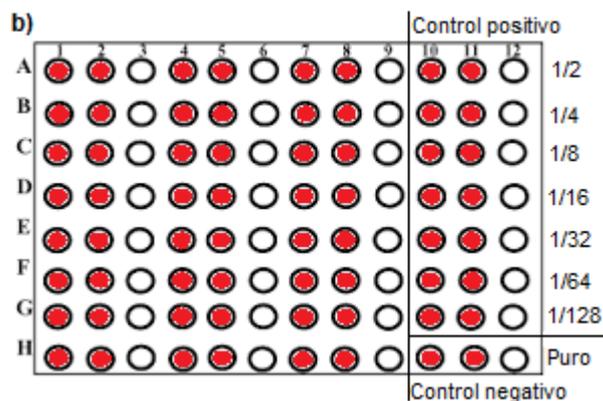
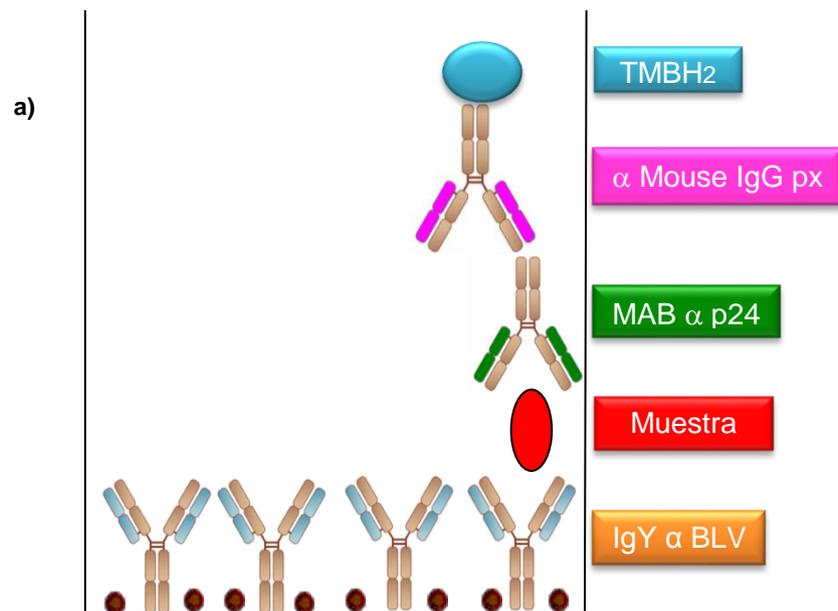
Brevemente, las placas (Maxisorp, Nunc) se sensibilizaron con una solución 0,1 mg/ml del anticuerpo policlonal IgY anti BLV. El esquema de sensibilización consistió en dos columnas con la solución de IgY y una columna sin IgY (sólo con el buffer de sensibilización), para poder analizar luego las reacciones inespecíficas a alguno de los componentes del sistema (**Figura 5b**).

Las muestras a ensayar, donde se buscó identificar antígenos virales, fueron analizadas por triplicado puras y en diluciones sucesivas en base 2 en bloqueante de ELISA, e incubadas toda la noche a 4°C. Como control positivo se utilizaron diluciones en base 2 de sobrenadante de FLK-BLV, comenzando con sobrenadante diluido al medio y como control negativo se utilizó sobrenadante de células de riñón ovino puro (**Figura 5b**). Los controles fueron tratados de la misma manera que las muestras.

Luego de la incubación y el lavado, se agregó a cada pocillo el anticuerpo primario; anticuerpo monoclonal anti p24 de BLV (MAb AF3) (Ingenasa). Luego de la incubación y el lavado, se agregó a cada pocillo el anticuerpo secundario; IgG anti ratón conjugado con peroxidasa. La reacción se reveló con TMB y H₂O₂, se frenó utilizando H₂SO₄ y la absorbancia se determinó a 450 nm (**Figura 5a**).

El punto de corte para declarar una muestra positiva fue establecido en 2xDS (desvíos estándar) del control negativo riñón ovino corrido en la misma placa, según determinaciones previas.

Figura 5: Elisa de antígeno BLV. (a) Esquema del ensayo, (b) Esquema de sensibilización y controles en la placa de ELISA.



En rojo se muestran los pocillos sensibilizados con IgY anti BLV y en blanco los pocillos sin anticuerpo. Control positivo (sobrenadante de FLK-BLV) dilución inicial $\frac{1}{2}$ y diluciones en base 2. Control negativo (sobrenadante células de riñón ovino) puro.

4.4.4 Inmunización de gallinas con BLVc y producción del polvo de huevo

A partir del BLVc caracterizado previamente, se formuló el inóculo en una relación 1:1 con el adyuvante comercial MontanideTM ISA 71 VG. Este adyuvante, formulado en base a aceite mineral, incorpora un emulsionante altamente refinado de manitol / ácido

oleico que permite la estimulación preferencial de la inmunidad mediada por células Th1 (Aucouturier y col., 2006).

Se inocularon 50 gallinas de raza leghorn, las cuales ponen en promedio 1 huevo por día, con 500 µl del inóculo por vía intramuscular, siguiendo un esquema de dosis múltiples a los 0, 21, 45, 70 días y refuerzos cada 45 días hasta colectar el número necesario de huevos para producir aproximadamente 90 kg de polvo huevo entero.

En cada tiempo de inoculación, se tomaron muestras de sangre y se analizó el nivel de anticuerpos sistémicos en dos gallinas seleccionadas al azar mediante ELISA Leukofast (ver sección 4.2.1). Una vez verificada la persistencia de la respuesta inmune, se colectaron los huevos diariamente a partir del día 45 y se secaron utilizando la tecnología de secado spray por lotes hasta obtener los 90 Kg. A cada lote se le realizaron ensayos de calidad biológica: recuento de aerobios totales, recuento de hongos y levaduras, búsqueda de *Salmonella* y de *Escherichia coli*. Estos ensayos se realizaron en BIOINNOVO.

Mediante ELISA Leukofast (ver sección 4.2.1) se cuantificó el nivel de IgY específicas anti BLV en soluciones de polvo de huevo entero (que contienen las IgY) en una concentración de 10 mg/ml diluida en agua ultrapura estéril (Invitrogen).

4.4.5 Producción de lote concentrado de IgY para caracterización

Para caracterizar los anticuerpos IgY producidos en yema de huevo, se seleccionaron 30 huevos al azar y se concentraron las IgYs por precipitación con sulfato de amonio, utilizando un protocolo estandarizado basado en trabajos previos de Akita y Nakai (1993).

Se colectaron las yemas de los huevos, se diluyeron 1/5 con agua destilada, se homogenizaron y luego se almacenó la solución a -20°C con el fin de remover los lípidos presentes en altas concentraciones en el huevo. Se descongeló la solución y se centrifugó a 8000 g durante 12 minutos a 4°C sin freno. Inmediatamente se descartó el precipitado y se filtró el sobrenadante obtenido. Se agregaron 0,24 gr/ml de sulfato de amonio (SO₄(NH₄)₂, Cicarelli) por ml de sobrenadante filtrado, con agitación suave por 10 minutos (40% concentración final de sulfato de amonio). Se centrifugó a 10000 g durante 12 minutos a 4 °C, sin freno. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen original de yema de huevo en una solución 2 M de sulfato de amonio

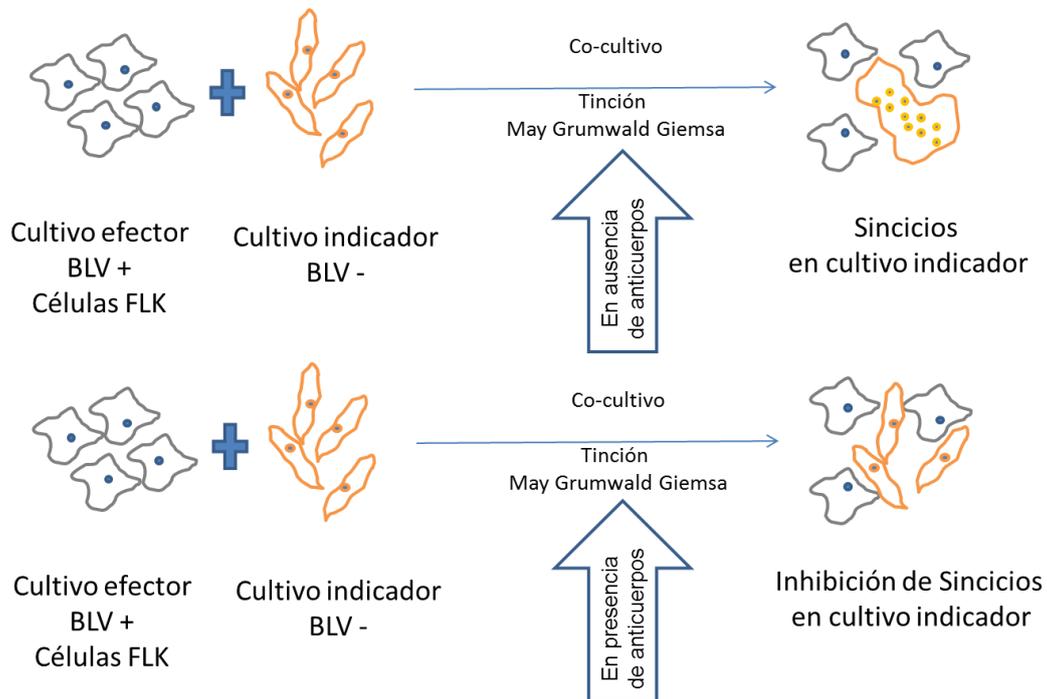
(75% concentración final de sulfato de amonio). Se incubó a temperatura ambiente con agitación suave hasta disolución completa. Se centrifugó a 10000 g por 12 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS 1X en una dilución 1/10 del volumen original de yema de huevo. La solución obtenida se dializó en PBS 1X con agitación suave a 4°C durante 16 hs con al menos 3 cambios de PBS 1X. Las IgY concentradas se esterilizaron por filtración con filtro de 0.2 µm (Ministart) y se almacenaron a -20°C en alícuotas.

El lote concentrado de IgY fue analizado mediante ELISA Leukofast (ver sección 4.2.1).

4.4.6 Ensayo *in vitro* de neutralización viral: Inhibición de la formación de sincicios

El ensayo de inhibición de sincicios ha sido reportado para identificar la actividad neutralizante de los anticuerpos producidos en infecciones naturales con BLV (Greig y col., 1978; Kono y col., 1983). En este ensayo, se evidencia la presencia de BLV en un cultivo efector que expresa virus (FLK), sobre un cultivo celular indicador donde se manifiesta el efecto (línea celular CC81). El virus producido por las células FLK-BLV se libera al sobrenadante y provoca la fusión de membranas en las células CC81. De este modo, se evidencia la infección con la aparición de células gigantes multinucleadas de 20 o más núcleos (**Figura 6**). Las células CC81 son fibroblastos de riñón felino transformadas con virus del sarcoma murino (Fischinger y col., 1974) y fueron cedidas gentilmente por el Dr. Luc Willems de la Universidad de Liege, Bélgica.

Figura 6: Representación gráfica del ensayo de formación / inhibición de sincicios en ausencia/presencia de anticuerpos neutralizantes



En presencia de anticuerpos, el efecto sincicial es interferido por neutralización, lo que se traduce en la inhibición específica y ausencia del efecto en la línea indicadora.

Debido a que el ensayo de inhibición de formación de sincicios no es una técnica utilizada de rutina, y con el objetivo de detectar efecto neutralizante en la preparación de IgY anti BLV, se ajustó el número y concentración relativa de células a utilizar en co-cultivo (**Tabla 3**) y los tiempos de incubación.

Tabla 3: Relación y concentración de los cultivos celulares de células efectoras e indicadoras utilizados en los ensayos de formación de sincicios.

Relación células efectoras/indicadoras	Concentración células efectoras/indicadoras
1:1	1 x 10 ⁵ / 1 x 10 ⁵
	2 x 10 ⁵ / 2 x 10 ⁵
1:2	5 x 10 ⁴ / 1 x 10 ⁵
	1 x 10 ⁵ / 2 x 10 ⁵
1:4	5 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵
	1 x 10 ⁵ / 4 x 10 ⁵
1:8	2.5 x 10 ⁴ / 2 x 10 ⁵
1:10	4 x 10 ⁴ / 4 x 10 ⁵
2:1	2 x 10 ⁵ / 1 x 10 ⁵

Tiempos de incubación ensayados: 24, 30, 48 y 72 hs.

El ensayo consistió en un co-cultivo de ambas líneas en placas de 24 pocillos. Para ello, se prepararon las suspensiones celulares de CC81 y FLK en el medio de cultivo correspondiente, inmediatamente antes de su uso.

El ajuste del ensayo de neutralización con anticuerpos se realizó utilizando muestras de suero pertenecientes a un bovino infectado natural, con un título de 1:128, y un bovino no infectado en diluciones seriadas en base 2 en medio de cultivo, previamente caracterizados por ELISA Leukofast (ver sección 4.2.1), en distintas diluciones. Los sueros se centrifugaron durante 3 minutos a 12000 g para eliminar impurezas, luego se inactivaron a 56°C durante 30 minutos y finalmente se filtraron con un filtro de 0,2 µm (Ministart).

La suspensión de células efectoras FLK-BLV (1 ml) se incubó durante 1 hora con 1 ml de la muestra a 37°C. Finalizada la incubación se agregó 1 ml de la suspensión celular CC81 a todos los pocillos. Los co-cultivos se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ durante 30 horas, luego de las cuales fueron teñidos con May Grünwald-Giemsa según se

describe a continuación. Se descarto el medio de cultivo y sin lavar se cubrió la monocapa con solución de May Grünwald pura (Merck) y se incubo durante 3 minutos a temperatura ambiente. Sin descartar el colorante se agregó el mismo volumen de agua destilada, se mezcló por vaivén e incubo durante 1 minuto. Esta se descartó y, sin lavar, se agregó solución de Giemsa (300 µl de Giemsa Biopur puro más 10 ml de agua destilada) y se incubo durante 15 minutos. Se descartó y se lavó con agua destilada hasta que el agua estuviera transparente, y en el último lavado se descartó dejando un volumen suficiente como para cubrir el pocillo. Se observó al microscopio con objetivo 4, 10 y 20X.

En cada ensayo se dejaron pocillos con las líneas celulares en forma independiente y en co-cultivo, sin agregado de muestra, como control de la morfología celular normal y de la formación de sincicios, respectivamente.

4.4.7 Detección *in vivo* de anticuerpos neutralizantes: Bioensayo en corderos

Para evaluar la capacidad neutralizante de las IgY anti BLV *in vivo*, se realizó un bioensayo en corderos. Como paso preliminar, se determinó la dosis mínima de virus y provirus necesaria para establecer una infección experimental. Se utilizó como fuente de virus la línea celular FLK-BLV. En todos los casos se inocularon por vía subcutánea 2 corderos (n=2) por muestra a analizar. Se tomaron muestras de sangre entera con y sin anticoagulante a los 0, 30 y 60 días post inoculación. El seguimiento se realizó determinando la presencia de anticuerpos por ELISA Leukofast (ver sección 4.2.1), y de provirus BLV mediante nested-PCR (ver sección 4.3.4).

4.4.7.1 Obtención de virus y provirus

El virus libre de células fue obtenido a partir del sobrenadante de una monocapa de células FLK-BLV con 100% de confluencia; el sobrenadante se centrifugó durante 15 minutos a 1600 g, se descartó el pellet de restos celulares y se utilizó el sobrenadante clarificado.

Para la obtención de células viables con provirus integrado, se utilizaron las células FLK-BLV tripsinadas el mismo día de la inoculación y lavadas con medio de cultivo RPMI. Se realizó el recuento de células utilizando una cámara de *neubauer*.

En ambos casos, se conservaron los stocks $-65 \pm 10^{\circ}\text{C}$ para análisis posteriores. Las diluciones para preparar los inóculos se realizaron en medio RPMI. Los inóculos fueron analizados por ELISA de antígeno BLV (ver sección 4.4.3.3), RT-nPCR y nPCR (ver secciones 4.3.3 y 4.3.4).

4.4.7.2 Ensayo de infección experimental: Dosis mínima

El ensayo de infección experimental para establecer la dosis mínima de BLV se realizó inoculando virus libre de células y células FLK-BLV viables, ambos en diluciones en base 10 (**Tabla 4**).

Tabla 4: Diseño de los inóculos utilizados en el ensayo de dosis mínima.

Tipo de inóculo	Fuente de Virus/provirus	Volumen final/inóculo	N° animales
Virus	Sn FLK-BLV 1/10	5 ml	2
	Sn FLK-BLV 1/100	5 ml	2
	Sn FLK-BLV 1/1000	5 ml	2
	Sn FLK-BLV 1/5000	5 ml	2
	Sn FLK-BLV 1/10000	5 ml	2
Células	5000 células	5 ml	2
	500 células	5 ml	2
	50 células	5 ml	2

Sn: sobrenadante.

4.4.7.3 Ensayo de neutralización viral *in vivo*

Se realizó un ensayo preliminar de neutralización, utilizando sobrenadante de FLK-BLV en dilución 1/10 previamente incubado durante toda la noche a 4°C con suero bovino positivo a BLV con un título de 1:128 en distintas relaciones. Lo mismo se realizó incubando el sobrenadante con suero negativo a BLV (ELISA Leukofast, ver sección 4.2.1) (**Tabla 5**). Los sueros fueron previamente inactivados a 56°C durante 30 minutos, luego centrifugados durante 15 minutos a 3000 g y luego filtrados con filtros de 0,45 µm y 0,2 µm (Ministart).

Posteriormente, se realizó el ensayo utilizando la preparación de IgY anti BLV con las condiciones que se describen a continuación. Se utilizó sobrenadante de FLK-BLV en dos diluciones, 1/100 y 1/1000. El sobrenadante 1/100 se incubó previamente durante toda la noche a 4°C con: (1) IgY concentrada con sulfato de amonio anti BLV, (2) IgY concentrada con sulfato de amonio no relacionada con BLV, (3) polvo de huevo anti BLV 30 mg/ml (diluido en agua destilada estéril), (4) polvo de huevo no relacionado con BLV 30 mg/ml (diluido en agua destilada estéril), (5) suero bovino positivo a BLV con un título de 1:128 y (6) suero bovino negativo para BLV. El sobrenadante 1/1000 se incubó previamente durante toda la noche a 4°C con: (1) IgY concentrada con sulfato de amonio anti BLV y (2) polvo de huevo anti BLV 30 mg/ml (**Tabla 5**).

Los inóculos fueron analizados por ELISA de antígeno BLV (ver sección 4.4.3.3), RT-nPCR y nPCR (ver secciones 4.3.3 y 4.3.4).

Tabla 5: Diseño de los inóculos utilizados en el ensayo de neutralización.

Tipo de inóculo	Fuente de Virus/provirus	Relación virus/suero*	Volumen final/inóculo	N° animales
Virus + suero positivo	Sn FLK-BLV 1/10	1+1	5 ml	2
		1+2	5 ml	2
		1+4	5 ml	2
Virus + suero negativo	Sn FLK-BLV 1/10	1+1	5 ml	2
		1+2	5 ml	2
		1+4	5 ml	2
Virus + IgYc BLV	Sn FLK-BLV 1/100	n/a	5 ml	2
Virus + IgYc n/r		n/a	5 ml	2
Virus + Polvo IgY BLV 30 mg/ml		n/a	5 ml	2
Virus + Polvo IgY n/r 30 mg/ml		n/a	5 ml	2
Virus + suero positivo		1+2	5 ml	2
Virus + suero negativo		1+2	5 ml	2
Virus + IgYc BLV		Sn FLK- BLV 1/1000	n/a	5 ml
Virus + Polvo IgY BLV 30 mg/ml	n/a		5 ml	2

Sn: sobrenadante. n/r: no relacionado con BLV.* volumen/volumen. n/a: no aplica.

4.5 Ensayo controlado de eficacia a campo

Con el propósito de analizar el efecto de los anticuerpos IgY anti BLV presentes en el polvo de huevo entero (ver sección 4.4.4) en la dinámica de la infección con BLV, en relación a su potencial efecto neutralizante, se diseñó un ensayo controlado de eficacia a campo. Se evaluó la progresión de la infección por BLV en animales jóvenes luego de ingerir anticuerpos IgY anti BLV (en forma de polvo de huevo, sección 4.4.4) durante el

período de crianza como suplemento alimentario en la leche de consumo (grupo TRATADO), en comparación con un grupo de animales no tratados (grupo CONTROL).

Los terneros recién nacidos del grupo tratado fueron alimentados bajo la rutina normal de alimentación en la guachera con 2 litros de leche fresca del tanque no pasteurizada por la mañana y 2 litros por la tarde, durante 2 meses, con el agregado de 30 gr de polvo de huevo anti BLV en cada toma (60 gr totales diarios). El grupo control fue manejado de la misma manera que el grupo tratado pero sin el agregado de suplemento.

El criterio principal de selección consistió en enrolar terneros de 4 a 10 días de edad con provirus no detectable en sangre. Todos los terneros pertenecieron a nacimientos acontecidos en un lapso de 2 meses, con el propósito de que compartieran la crianza y el manejo. El objetivo final fue estimar la proporción de animales infectados en cada grupo a los 12 meses de edad, y establecer un probable efecto del uso de IgY como suplemento. Para el estudio de la proporción de animales infectados, la estimación del tamaño de la muestra estuvo basada en los siguientes supuestos y requisitos:

- Nivel de confianza = 95%, (error tipo I, $\alpha = 0,05$)
- Potencia $(1-\beta) = 80\%$, (error tipo II, $\beta = 0,20$)
- Proporción de infectados en el grupo control (G_c) al final del estudio = 0,60
- Proporción de infectados en el grupo tratado (G_t) al final del estudio = 0,20
- Razón tamaño de muestras $G_c/G_t = 1$

Para el cálculo se utilizó *Epitools Sample Size Calculations, AusVet Animal Health Services* (Sergeant, ESG, 2013. Epitools epidemiological calculators). Este análisis arrojó un número necesario de 28 hembras en cada grupo al final del estudio (12 meses) (**Tabla 6**).

Tabla 6: Tamaño de muestra para detectar diferencias significativas entre dos proporciones ($\alpha = 0,05$), ($\beta=0,20$).

	Grupo Tratado									
Grupo Control	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
0.9	6	7	8	10	13	17	25	38	72	219
0.8	7	8	10	13	19	28	45	91	313	
0.7	9	11	13	19	29	49	103	376		
0.6	12	14	17	28	49	107	408			
0.5	15	19	25	45	103	408				
0.4	21	27	38	91	376					
0.3	30	43	72	313						
0.2	50	88	219							
0.1	121	474								
0.05	333									

La primera fila y la primera columna indican las proporciones de individuos infectados esperadas en cada grupo. El resultado indica el número de individuos a incluir en cada grupo.

Los animales del ensayo convivieron en la guachera durante la crianza y recibieron aproximadamente 4 (3,6 a 4,2) litros de leche de tanque a 38-42° C, sin pasteurizar, en dos tomas diarias. Además de la leche recibieron alimento balanceado con 18% de proteína de alta digestibilidad, entre la primera y segunda semana de vida, y agua *ad libitum*.

La suplementación de polvo de huevo en los animales tratados se hizo de manera individual, suministrando primero el polvo de huevo a cada balde y agregando la leche entibada previamente sobre el mismo para cada ternero. Se mezcló con un batidor de alambre para disolverlo.

4.5.1 Monitoreo de la infección

Se realizó el monitoreo rutinario de la infección durante 9 meses en ambos grupos, tratado y control, tomando muestras de sangre con anticoagulante (heparina). Las muestras fueron tomadas en el momento previo al tratamiento (T0), y a los 2, 7 y 9 meses de comenzado ensayo (T2M, T7M y T9M).

A partir de las muestras de sangre se obtuvo plasma y el paquete leucocitario. Se verificó la presencia de anticuerpos totales anti BLV por ELISA Leukofast (sección 4.2.1) y la presencia de provirus por nPCR (sección 4.3.4).

4.6 Análisis estadístico

Para el análisis de producción de BLVc, se utilizó el método de One-Way ANOVA, seguido por el Test de Tukey.

Los análisis de distribución, rango y varianza de los niveles de anticuerpos, antígeno y provirus en las muestras de leche y sangre se realizaron utilizando herramientas estadísticas no paramétricas. La comparación entre títulos de anticuerpos específicos anti BLV en suero y leches individuales y la comparación de cargas provirales de suero y leches individuales se realizó mediante la prueba U Mann-Whitney. Las correlaciones entre las cargas provirales y títulos de anticuerpos específicos anti BLV en las distintas muestras se midieron mediante el Test Spearman r .

En todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism 5.0.

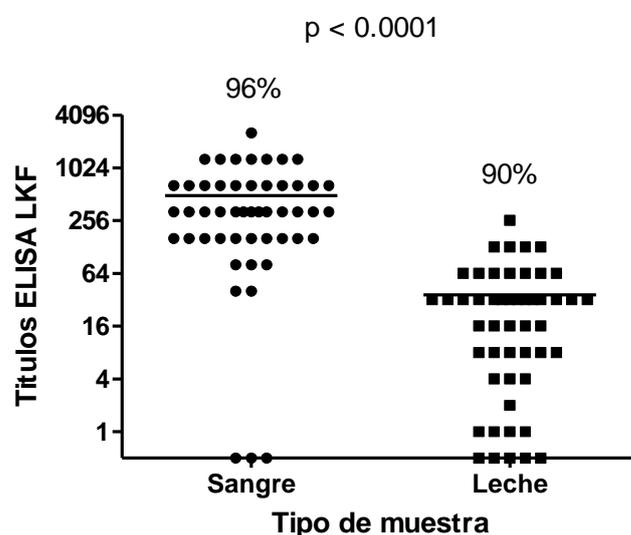
5. Resultados

5.1 Niveles de anticuerpos y virus/provirus en sangre y leche de vacas en estudio

Se observó una prevalencia de anticuerpos totales por ELISA Leukofast del 96 % en las muestras de sangre de vacas en ordeño utilizadas en este estudio (n=49), similar a la prevalencia de anticuerpos en sangre del 94% encontrada en el rodeo general (n=332). También se detectaron anticuerpos en el 90% de las muestras individuales de leche (Figura 7 y 9). Los títulos de anticuerpos en sangre fueron significativamente más altos que los encontrados en leche y oscilaron en el rango 2-1024 y 2-128, respectivamente (Figura 7).

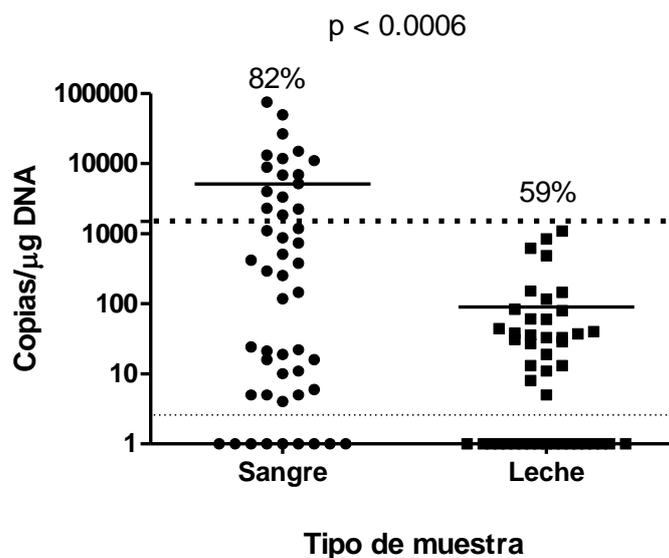
Asimismo, se detectó mediante qPCR la presencia de provirus en el 82% y 59% en muestras de sangre y leche individual respectivamente (Figura 8 y 9). La carga proviral en leche fue significativamente menor que en sangre, el 41% de los animales infectados tuvo valores indetectables en leche, mientras que en sangre este porcentaje fue del 18% y no se observó ninguna leche con alta carga proviral (Tabla 7).

Figura 7: Título de anticuerpos específicos anti BLV en sangre y leche.



Se indica el valor p en la figura (prueba U Mann-Whitney). Las barras horizontales indican la media. El porcentaje indica la prevalencia de anticuerpos.

Figura 8: Carga proviral en muestras de sangre y leches individuales.



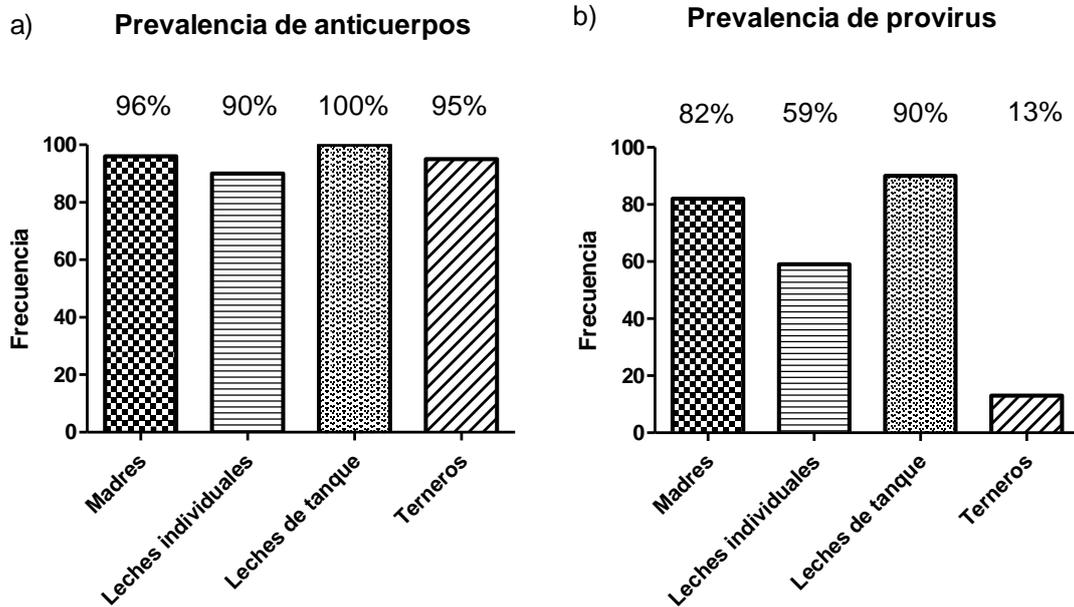
Se indica el valor p en la figura (prueba U Mann-Whitney). Las barras horizontales indican la media, la línea punteada gruesa marca el *cut off* (1500 copias). El porcentaje indica la prevalencia de provirus. Sangre: Media: 5129.2, DS: 1333.3, valor máximo: 75665. Leche: Media: 90.6, DS: 222.2, valor máximo: 1080.

Tabla 7: Distribución de la carga proviral en sangre y leches individuales

	Alta CPV	Baja CPV	CPV indetectable
Sangre	16	24	9
Leche	0	27	22

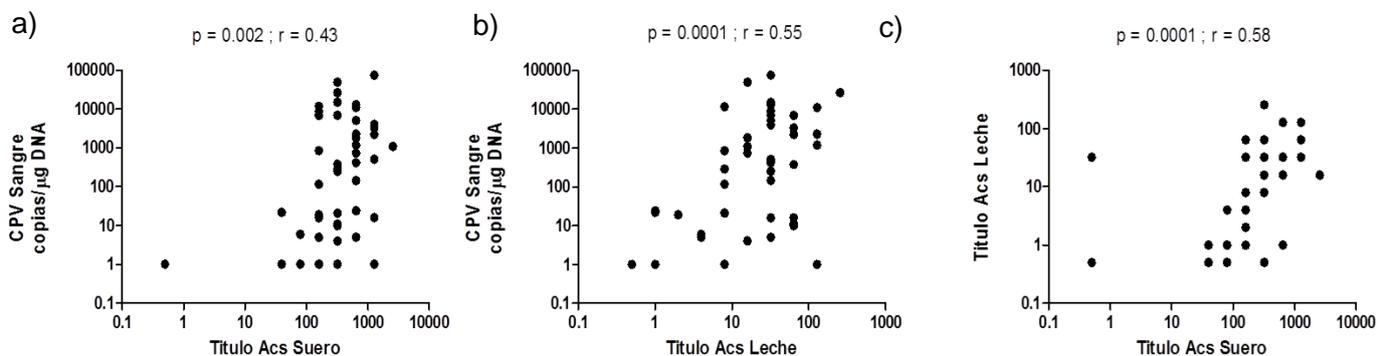
CPV: Carga proviral

Figura 9: Prevalencia de (a) anticuerpos y (b) provirus en madres, leches individuales, leches de tanque y terneros.



Se observó además que existe una correlación positiva significativa entre carga proviral y anticuerpos en sangre ($p=0.002$; $r=0.43$), carga proviral en sangre y anticuerpos en leche ($p=0.0001$; $r=0.55$), así como entre anticuerpos en sangre y anticuerpos en leche ($p=0.001$; $r=0.58$) (Test Spearman r) (**Figura 10**).

Figura 10: Correlación entre (a) carga proviral y anticuerpos en sangre, (b) carga proviral en sangre y anticuerpos en leche, (c) anticuerpos en leche y anticuerpos en sangre.



Se indica el valor p y el coeficiente de correlación (r) en las figuras (Test de spearman r).

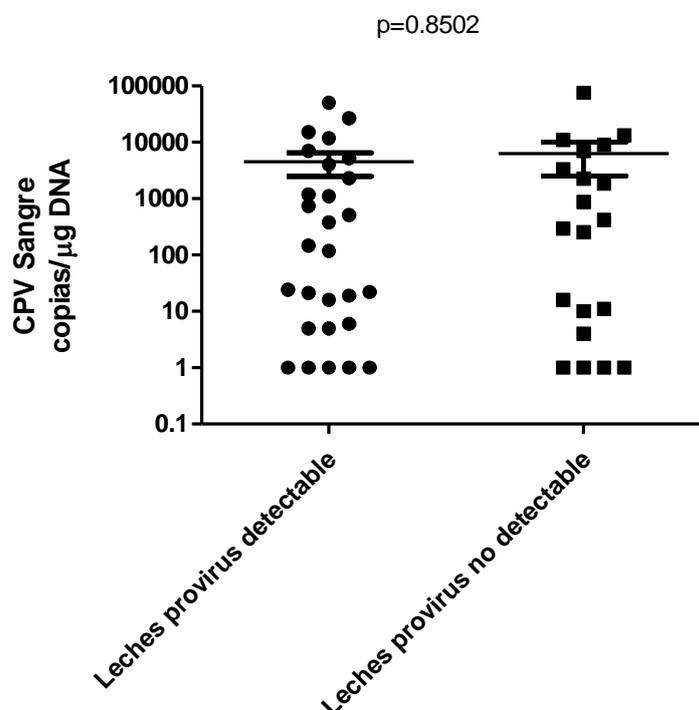
No se observó una correlación entre la carga proviral en sangre y leche individual. El provirus fue detectable en leche de vacas con carga proviral alta, baja e indetectable, siendo más prevalente en las últimas dos categorías (**Figura 11 y Tabla 8**). Se encontró una leve correlación negativa entre carga proviral en leche individual y el nivel de anticuerpos en leche individual, $p= 0.49$ y $p= 0.04$ respectivamente (Test Spearman r) (**Figura 12**).

Tabla 8: Distribución de la carga proviral pareada en sangre y leche.

		Sangre		
		Alta CPV	Baja CPV	CPV indetectable
Provirus en leche	Detectable	8	15	5
	No detectable	8	8	4

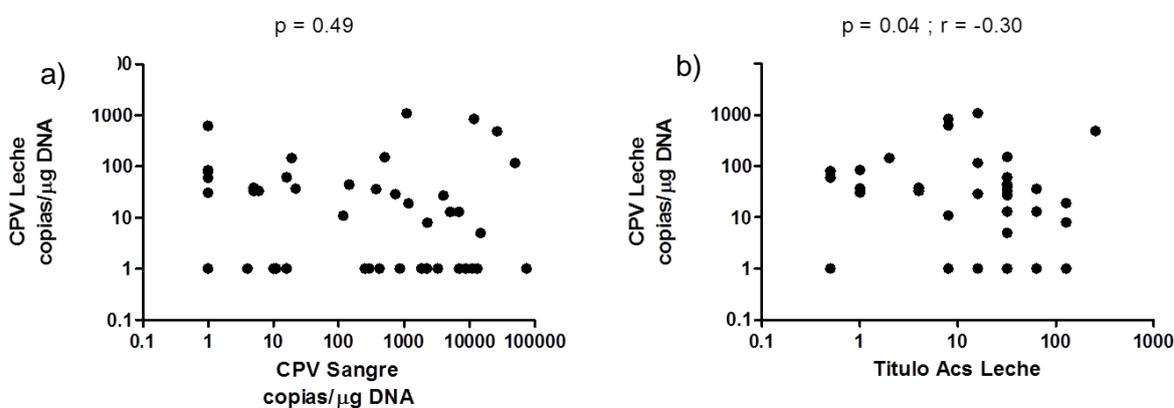
CPV: Carga proviral

Figura 11: Comparación de la distribución de la carga proviral en sangre con sus respectivas leches con y sin provirus detectable.



Se indica el valor p en la figura (prueba U Mann-Whitney). La media de CPV en sangre para leches con provirus detectable es de 4850,2 y para leches con provirus no detectable es de 6258,9. CPV: Carga proviral.

Figura 12: Correlación de la carga proviral en leche, sangre y el nivel de anticuerpos. (a) Carga proviral en leche individual y carga proviral en sangre, (b) carga proviral en leche individual y el nivel de anticuerpos en leche individual.



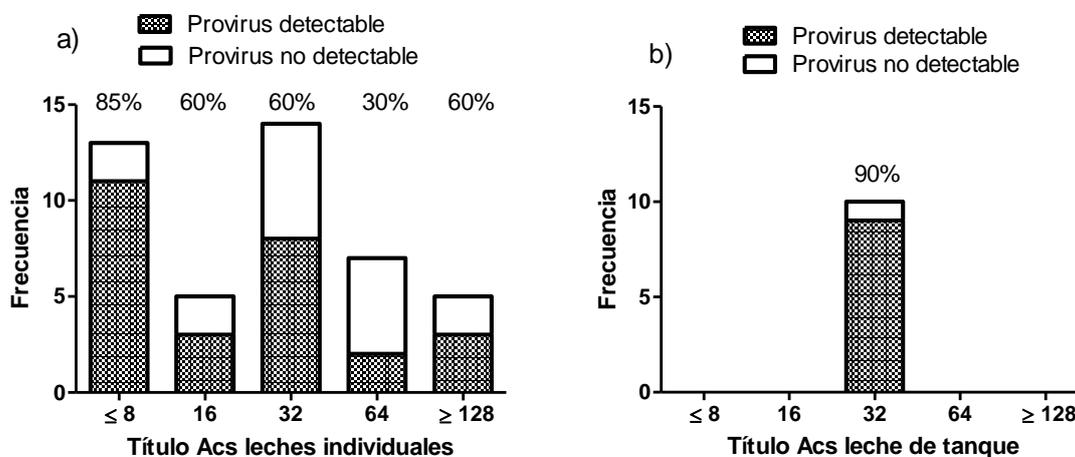
Se indica el valor p y el coeficiente de correlación (r) en las figuras (Test de spearman r).

En todas las muestras de leche de tanque del ordeño diario (n=10), se encontraron anticuerpos con un título de 1:32 (**Figura 13b**). Mientras que en las muestras de leches individuales el rango de títulos de anticuerpos fue amplio siendo la media de 1:32 (**Figura 13a**).

Mientras que en las leches de tanque se detectó provirus en el 90% de las muestras, la detección en leches individuales es heterogénea. El provirus fue detectable en muestras de todos los niveles de anticuerpos, con 85% de prevalencia de provirus en las leches de títulos ≤ 8 , y 60% en títulos $\geq 1:128$. Las muestras de nivel 1:32 mostraron un 60% de provirus.

La carga proviral en leche de tanque fue extremadamente baja, las 9 muestras mostraron reactividad específica por fuera del rango dinámico, no cuantificables según los parámetros de la reacción. Dado que las muestras poseían un pico específico en la curva de reactividad, fueron consideradas positivas (no mostrado). La performance del ensayo en muestras de estas condiciones fue previamente analizada y confirmada en nuestro laboratorio (Jaworski y col., 2018).

Figura 13: Título de anticuerpos y detección de provirus en (a) leches individuales y de (b) leche tanque.



Los porcentajes indican la prevalencia de provirus. Acs: Anticuerpos.

5.2 Anticuerpos y provirus en los terneros recién nacidos en estudio

Se detectaron anticuerpos anti BLV en el 95,5% de los terneros analizados en este estudio, lo que junto con una alta reactividad (media 177%, con más del 75% de terneros con reactividades superiores a 100%) evidencia un buen calostrado. Asimismo, se detectó provirus en el 13% de las muestras analizadas, siendo de alta carga proviral con excepción de una muestra (**Figura 9**). Los datos crudos se pueden observar en el **Anexo II (Tabla A2)**.

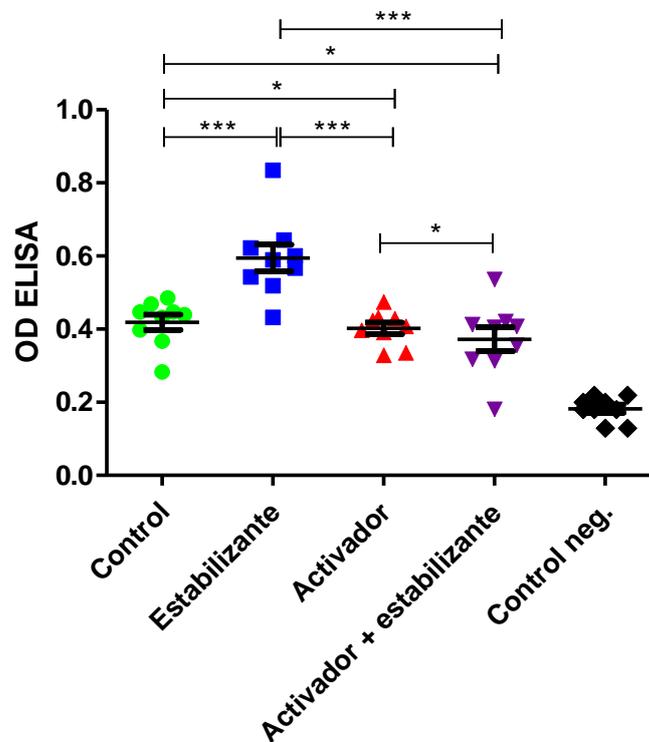
5.3. Producción y caracterización de anticuerpos IgY anti BLV

5.3.1 Producción virus completo concentrado (BLVc)

5.3.1.1 Optimización del Rendimiento

El agregado de valproato de sodio 5 Mm como potencial activador de la expresión viral en el medio de cultivo de las células FLK no mejoró el rendimiento según se observó en los ensayos de ELISA de antígeno. No se encontraron diferencias significativas entre el cultivo con y sin agregado de valproato ($p > 0.05$). Más aún, el agregado de valproato produjo un leve efecto citotóxico para las células (**Figura 14**). El agregado de trehalosa al 15% como estabilizante mostró un efecto positivo ($p < 0.05$) cuando se comparó el rendimiento del sobrenadante de FLK estabilizado con trehalosa (estabilizante PC) y (1) el sobrenadante de FLK (control), (2) el sobrenadante de FLK tratado con valproato (activador) y (3) el sobrenadante de FLK tratado con valproato y estabilizado con trehalosa (activador + estabilizante). La diferencia de los distintos tratamientos con respecto al sobrenadante de riñón ovino (utilizado como control negativo) fue significativa en todos los casos ($p < 0.05$) (**Figura 14**).

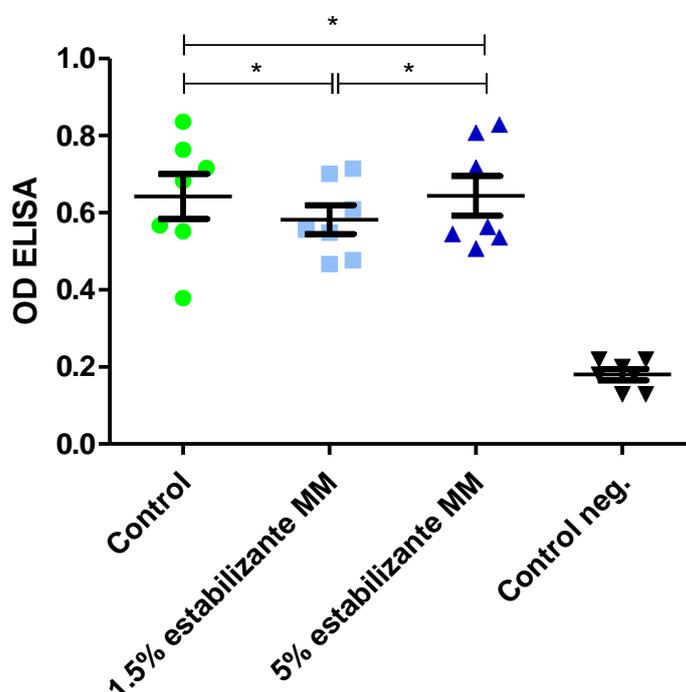
Figura 14: Detección de antígenos de BLV en células FLK con el agregado de valproato y trehalosa por ELISA de captura en cultivos de FLK con el agregado de valproato y trehalosa.



FLK (control), FLK estabilizado con trehalosa 15% (estabilizante), FLK con valproato 5 Mm (activador), FLK con valproato 5 Mm y conservado con trehalosa 15% (activador + estabilizante) y de Riñón ovino (control negativo). Cada punto corresponde al sobrenadante de FLK colectado en distintos días de cultivo. * Diferencia no significativa ($p > 0.05$), *** Diferencia significativa ($p < 0.05$). Verde: control. Azul: estabilizante. Rojo: Activador. Violeta: activador + estabilizante. Negro: Control negativo.

El agregado de trehalosa (estabilizante MM) al 10% en el medio de cultivo produjo un efecto citotóxico severo para las células, provocando el levantamiento de la monocapa, por lo cual no se pudo continuar con la producción viral. Sin embargo, cuando el medio de cultivo se suplementó con 1,5 y 5% de trehalosa, no se observó acción citotóxica. En el caso de 1,5% se registró un modesto incremento en la producción viral. No obstante, el análisis estadístico no evidenció una mejora significativa ($p < 0.05$) La diferencia de los distintos tratamientos con respecto al sobrenadante de riñón ovino (control negativo) fue significativa en todos los casos ($p < 0.05$) (**Figura 15**).

Figura 15: Detección de antígenos de BLV en cultivos FLK con agregado de trehalosa como potencial estabilizante en el medio de mantenimiento celular por ELISA de captura.



FLK (control), FLK con trehalosa al 1.5% (1.5% estabilizante MM), FLK con trehalosa al 5% (5% estabilizante MM), y de Riñón ovino (control negativo). Cada punto corresponde al sobrenadante de FLK colectado en distintos días de cultivo. * Diferencia no significativa ($p > 0.05$), *** Diferencia significativa ($p < 0.05$). Verde: control. Celeste: 1.5% estabilizante MM. Azul: 5% estabilizante MM. Negro: Control negativo.

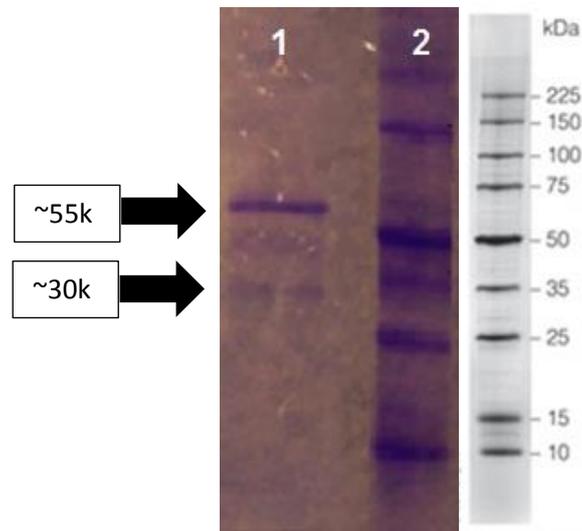
5.3.2 Caracterización de BLVc: detección de partículas y proteínas virales.

Reconocimiento específico de anticuerpos

Se colectaron aproximadamente 8 litros de sobrenadante a partir de cultivos confluentes de células FLK-BLV, de los cuales se obtuvieron aproximadamente 80 ml de BLV concentrado, que se conservó en ultrafreezer a $-65 \pm 10^\circ\text{C}$.

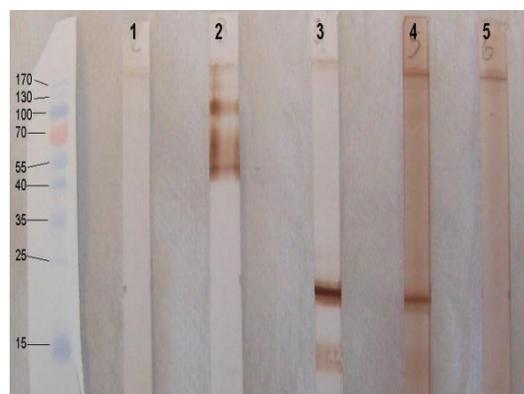
Por SDS-PAGE se observó la presencia de 2 bandas mayoritarias de aproximadamente 55 y 30 kDa coincidentes con las proteínas gp51 y p24 de la estructura viral (**Figura 16**). La concentración estimada de proteínas totales medidas por espectrofotometría en Nanodrop fue de $0,625 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Figura 16: Gel de poliacrilamida teñido con colorante de coomassie. 1: BLV concentrado, 2: Marcador de peso molecular.



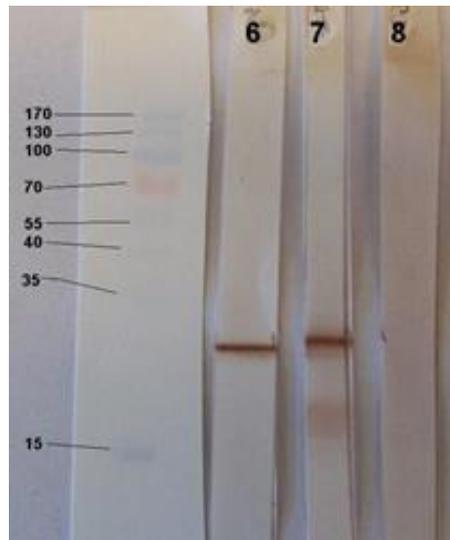
El ensayo de inmunodetección reveló la presencia de las proteínas virales específicas gp51 y p24 cuando se utilizaron los sueros positivos policlonales y monoclonales anti gp51 y p24 cuando se utilizaron los sueros positivos policlonales y monoclonales anti gp51 lineal y anti p24. No se visualizó banda cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal anti gp51 que reconoce la proteína en su estructura conformacional, como era esperable en un gel corrido en condiciones desnaturalizantes. El suero policlonal positivo de campo identificó claramente la banda correspondiente a p24 en el BLVc, mientras que el suero negativo no mostró reactividad contra el virus concentrado (**Figura 17**).

Figura 17: Ensayo de inmunodetección con el BLV concentrado. 1: MAB anti BLV conformacional, 2: MAB anti BLV lineal, 3: MAB anti p24, 4: Suero control positivo, 5: Suero control negativo.



Los anticuerpos IgY anti BLV y anti p24 reconocieron asimismo proteínas del BLV concentrado, algo no observado al utilizar IgY no relacionadas (**Figura 18**).

Figura 18: Ensayo de inmunodetección con el BLV concentrado. 6: IgY anti BLV, 7: IgY anti p24, 8: IgY no relacionada (pool INCUINTA).



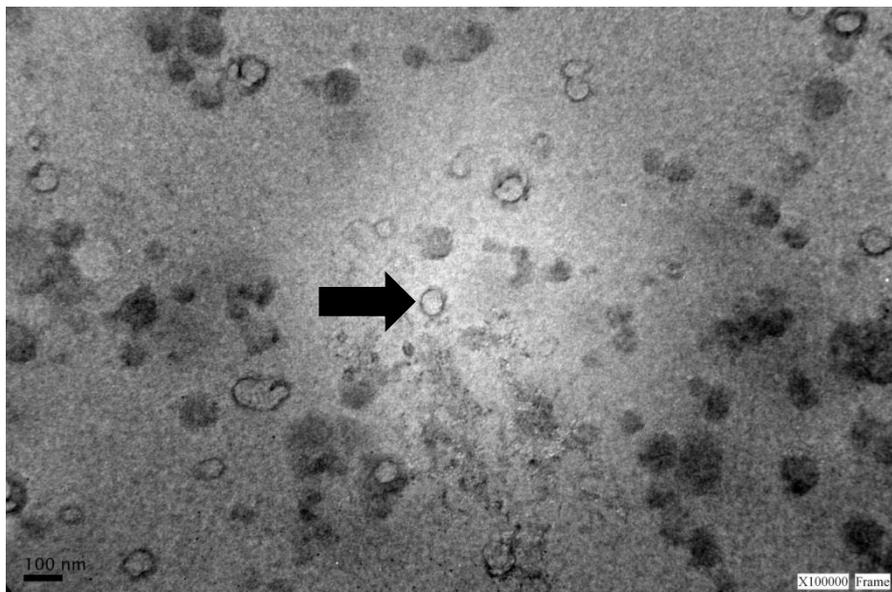
Para comparar la reactividad se realizó la misma inmunodetección utilizando el antígeno producido para Elisa Leukofast (ver sección 4.2.1), que consiste en un concentrado de BLV completo lisado posteriormente con una solución con el detergente Tritón. El ensayo de inmunodetección reveló la presencia de las proteínas virales específicas gp51 y p24, igual que con BLVc, no se visualizó banda cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal anti gp51 El suero control negativo no mostró reactividad contra el virus concentrado. Los anticuerpos IgY anti-BLV reconocieron asimismo proteínas del antígeno de ELISA, algo no observado al utilizar las IgY no relacionadas (**Figura 19**)

Figura 19: Ensayo de inmunodetección con el antígeno de ELISA Leukofast. 1: MAB anti BLV conformacional, 2: MAB anti BLV lineal, 3: MAB anti p24, 4: Suero control positivo, 5: Suero control negativo, 6: IgY anti BLV, 7: IgY no relacionada (pool INCUINTA).



La microscopía electrónica de transmisión mostro evidencia de partículas de forma y tamaño compatibles con estructuras virales (80-120 nm) (**Figura 20**).

Figura 20: Fotografía de microscopía electrónica de un preparado de BLVc. La flecha indica una partícula compatible con una estructura viral de BLV.



Escala X100000

La preparación de BLVc mostró reactividad superior (OD promedio 0,63) que el sobrenadante crudo de células FLK-BLV (OD promedio 0,46) en el ensayo de ELISA de captura de antígeno.

5.4 Producción y caracterización de anticuerpos IgY anti BLV

Se vacunaron 50 gallinas con 8 dosis de BLVc, con una masa total de 125 µg de proteína por inóculo (**Figura 21 a y b**) en un volumen final de 500 µl por dosis.

Los anticuerpos anti BLV en suero de las gallinas inmunizadas fueron detectables a partir del día 21 post-inoculación y aumentaron desde entonces, alcanzando un valor máximo (1:256) luego de la octava inoculación, a los 255 días (**Figura 22**).

Se colectaron los huevos de las gallinas inoculadas a partir del día 45 (**Figura 22**). Para caracterizar los anticuerpos IgY, a partir de 390 ml de yema de huevo, extraída de 30 huevos seleccionados al azar, se obtuvieron 32 ml de IgY concentradas (62,6 mg/ml) por precipitación con sulfato de amonio, con un título de anticuerpos por ELISA Leukofast de 1:30000.

Se colectaron alrededor de 9000 huevos que fueron sometidos a secado *spray* y se obtuvieron 86,435 Kg de polvo de huevo entero, en 7 lotes distintos (**Figura 21 c y d**). Los mismos resultaron aptos para consumo, siendo ≤ 10000 UFC/g para el recuento de aerobios totales y ≤ 100 UFC/g para el recuento de hongos y no se detectaron levaduras en 25 gr de producto, tampoco se encontró *Salmonella* ni *E. Coli* (en 1 gr de producto) (**Tabla 9**). Todos los lotes resuspendidos en concentración 10mg/ml tuvieron títulos de anticuerpos de 1:32 o 1:64 (**Tabla 9**).

El resumen de los resultados de esta sección se puede observar en la **Figura 23**.

Figura 21: Producción de polvo de huevo entero anti BLV: (a) Inóculo BLVc, (b) gallinas inoculadas en BIOINNOVO, (c) y (d) baldes de polvo de huevo entero.

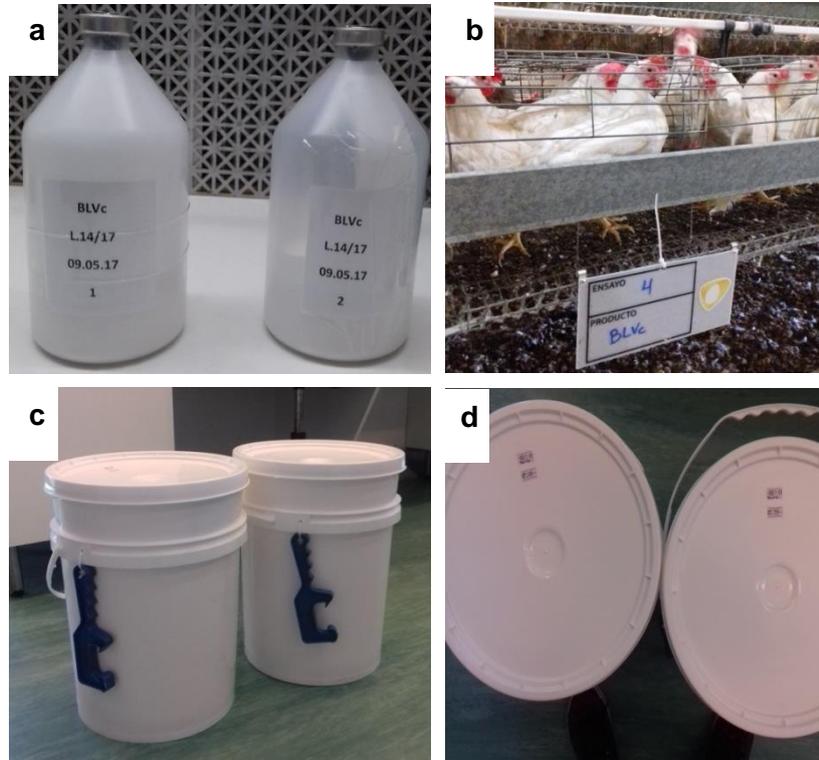
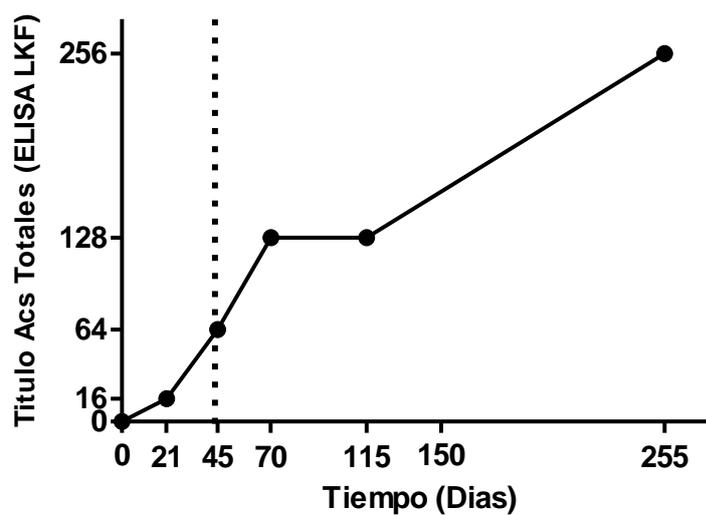


Figura 22: Títulos de anticuerpos totales anti BLV de los sueros de las gallinas inoculadas en distintos tiempos.



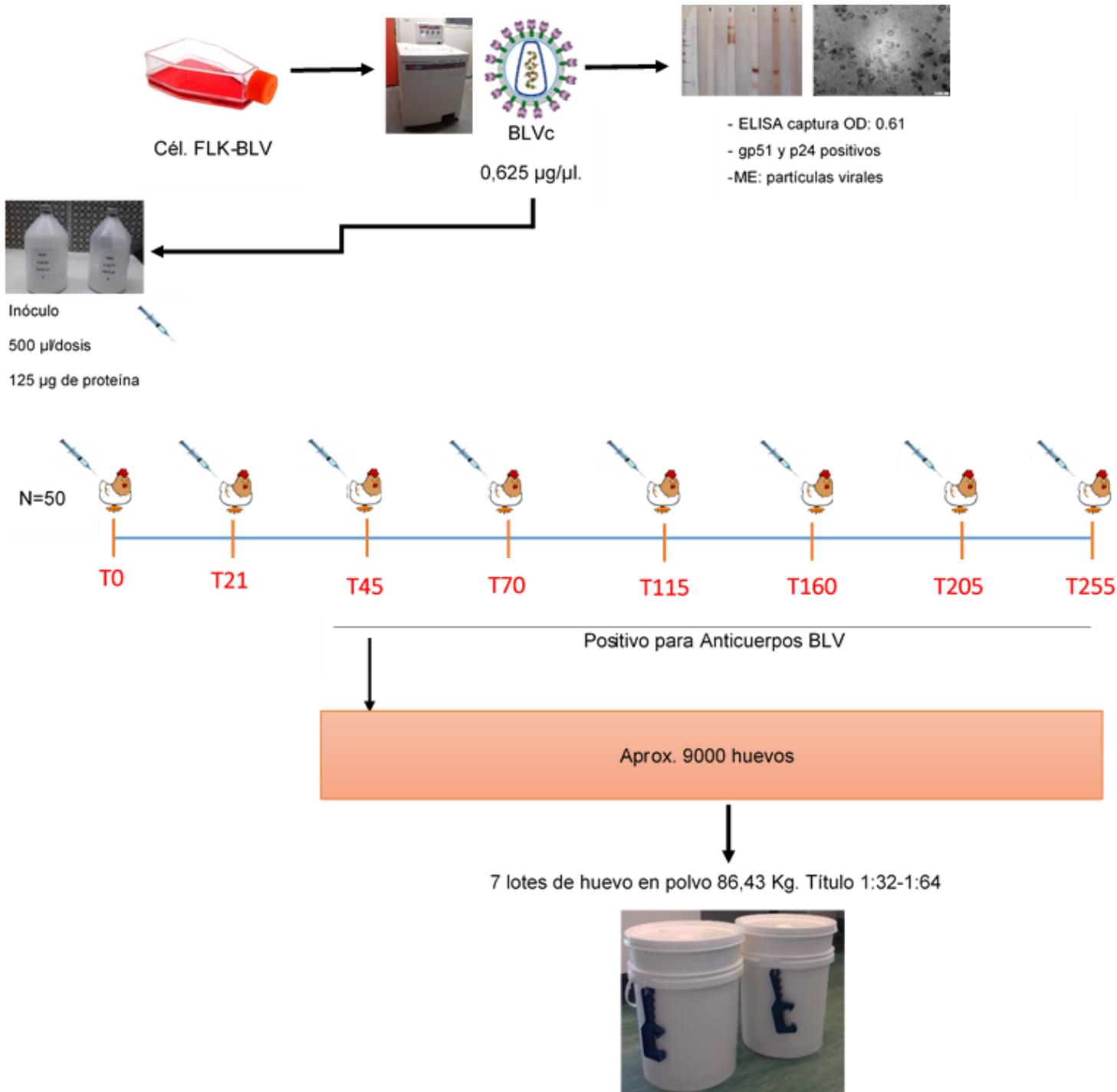
La línea punteada indica el momento en el que se comenzaron a coleccionar huevos.

Tabla 9: Detalle de lotes 1-7 del polvo de huevo entero.

Lote	Peso	Control biológico (1)	Título de anticuerpos por ELISA LKF (2)
1	15,355 Kg	OK	1:64
2	14 Kg	Ok	1:64
3	17,340 Kg	Ok	1:64
4	11,160 Kg	Ok	1:64
5	10 Kg	Ok	1:32
6	12 Kg	Ok	1:64
7	6,580 Kg	Ok	1:32
	86,435 Kg		

(1) Control realizado por BIOINNOVO. (2) producto diluido 10 mg/ml.

Figura 23: Producción de polvo de huevo con IgY anti BLV.

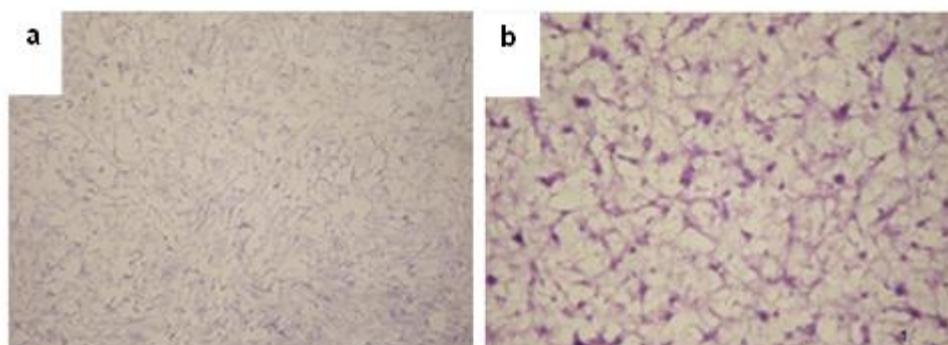


5.4.1 Ensayo de neutralización in vitro: Inhibición de la formación de sincicios

El co-cultivo de células indicadoras CC81 (**Figura 24b**) células efectoras FLK-BLV (**Figura 24a**), evidenció formación de sincicios con la presencia de grandes células multinucleadas con más de 10 núcleos (**Figura 25**).

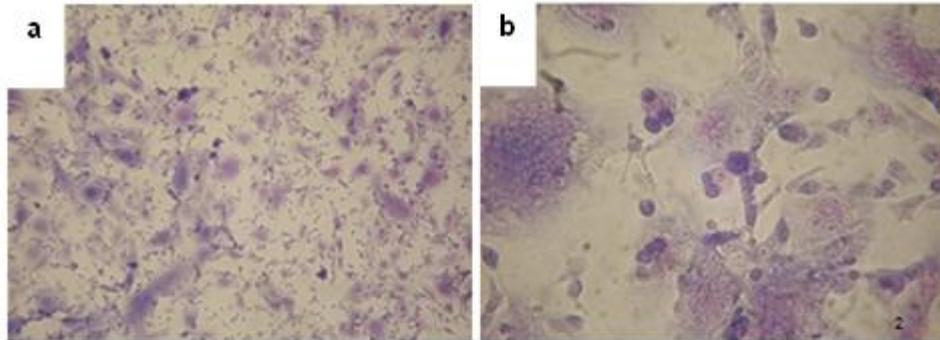
Se observaron diferencias de confluencia en las monocapas celulares dependiendo de la relación y concentración celular utilizada. La relación de células indicadoras/efectoras 1:4 en las concentraciones $2.5 \times 10^4 / 2 \times 10^5$ (**Figura 24**) generó co-cultivos con buena confluencia y observación de sincicios homogéneos en todo el pocillo. Las relaciones más bajas presentaron monocapas de menor confluencia con sincicios presentes en forma heterogénea en la periferia o en el centro del pocillo. Las relaciones más altas fueron difíciles de observar dado al gran número de células presentes que saturaban el campo visual. La observación de sincicios fue óptima para la lectura a las 30 hs de co-cultivo (**Figura 26**).

Figura 24: Microscopía óptica de células (a) FLK-BLV y células (b) CC81.



Aumento 4X.

Figura 25: Microscopía óptica de co-cultivo de células efectoras FLK-BLV (2.5×10^4 cél/ml) con células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml).



a) Aumento 4X y b) Aumento 20x.

Figura 26: Microscopía óptica de co-cultivo de células efectoras FLK-BLV (2.5×10^4 cél/ml) con células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml) y de cultivo de células indicadoras CC81 (2×10^5 cél/ml) a las 24, 30, 48 y 72 hs de cultivo.

	24 hs	30 hs	48 hs	72 hs
2.5×10^4 FLK + 2×10^5 CC81				
2×10^5 CC81				

Aumento 10x.

Los co-cultivos se realizaron en placas de 24 wells (Biofil), con 1 ml de ambas suspensiones celulares suspensión durante 30 horas a 37°C (**Figura 26**). Este protocolo demostró repetitividad pudiendo observar de manera consistente la formación de sincicios del tamaño esperado.

Cuando se realizaron los ensayos de co-cultivo en presencia de suero bovino negativo a BLV (sin anticuerpos) las monocapas mostraron un efecto citotóxico que impedía observar el cultivo con claridad. Contrariamente de lo esperado, no se observó efecto sincicial, lo que permite pensar que este efecto puede deberse a un efecto de inactivación viral del suero utilizado, caracterizado previamente como negativo a anticuerpos específicos anti BLV. En los ensayos de co-cultivo en presencia de suero positivo a BLV (con anticuerpos) también se observó efecto citotóxico y una leve actividad sincicial.

Estos hallazgos se observaron en repeticiones intraplaca e interplaca. Si bien el efecto sincicial pudo ser observado en presencia de suero negativo en algunas réplicas de algunos ensayos, no se pudo observar robustez en este hallazgo, así como tampoco se pudo eliminar el efecto citotóxico. Debido a que no fue posible encontrar las condiciones óptimas se decidió no continuar con el ajuste.

5.4.4 Detección *in vivo* de anticuerpos neutralizantes: Bioensayo en corderos

Para determinar la capacidad neutralizante de la IgY anti BLV producida, se realizó un ensayo *in vivo* en ovinos con una preparación conocida de BLV activo con el agregado de anticuerpos IgY.

Para esto se realizó en primer lugar un ensayo para determinar la dosis mínima de virus necesaria para establecer una infección experimental con BLV en ovinos (**Tabla 10**). El virus libre de células obtenido a partir de sobrenadante puro y clarificado de una monocapa confluyente de células FLK-BLV resultó infectivo hasta la dilución 1/1.000. Los dos animales inoculados con cada dilución mostraron evidencia de infección con la presencia de anticuerpos y provirus al finalizar el estudio. Cuando se utilizaron células FLK viables, fueron necesarias 5.000 células para generar la infección en los 2 corderos receptores, mientras que con 500 células se infectó únicamente 1 de los 2. Ver datos detallados de la progresión de la infección en el **Anexo II (Tabla A3)**.

Se detectó ARN viral de BLV hasta una dilución 1/1000 del Sn de FLK-BLV utilizado como fuente de virus libre de células, y en ninguno de los inóculos preparados con células. Se detectó ADN proviral en la fuente de virus libre de células en dilución 1/10 y en el inóculo preparado con 5.000 células viables (**Tabla 10**).

Tabla 10: Dosis respuesta de virus BLV en ovinos receptores (virus y células).

Inoculo				Ovinos receptores infectados(*) /ovinos inoculados
Tipo	Fuente de Virus/provirus	Detección ADN	Detección ARN viral	
Virus	Sn FLK-BLV 1/10	Detectado	Detectado	2/2
	Sn FLK-BLV 1/100	No detectado	Detectado	2/2
	Sn FLK-BLV 1/1000	No detectado	Detectado	2/2
	Sn FLK-BLV 1/5000	No detectado	No detectado	0/2
	Sn FLK-BLV 1/10000	No detectado	No detectado	0/2
Células	5000 células FLK-BLV	Detectado	No detectado	2/2
	500 células FLK-BLV	No detectado	No detectado	1/2
	50 células FLK-BLV	No detectado	No detectado	0/2

(*) Se considera infectado cuando se detectan anticuerpos y provirus en sangre por ELISA y nPCR. Sn: Sobrenadante.

En segundo lugar se realizó un ensayo de neutralización del BLV utilizando como fuente de anticuerpos 1 suero bovino con anticuerpos específicos anti BLV (título 1:128) y 1 suero bovino sin anticuerpos, en presencia de sobrenadante de FLK diluido 1:10 (**Tabla 11**). El suero positivo logró evitar la infección de los corderos receptores cuando se utilizó en las relaciones 1+4 y 1+2 (virus:suero), que no mostraron evidencia de infección, ya que no se detectaron anticuerpos ni provirus. Cuando la relación virus/anticuerpos fue 1+1, uno de los dos corderos resulto positivo a la detección de provirus por nPCR sin detección de anticuerpos durante todo el periodo en estudio. Todos los ovinos se infectaron cuando se inocularon con virus libre de células en presencia de suero bovino negativo a BLV en relación 1+1, 1+2 y 1+4.

Cuando se inocularon corderos con sobrenadante de FLK-BLV en dos diluciones, 1/100 y 1/1000, incubados previamente con la preparación de IgY concentrada anti BLV (diluida 1/6, con un título final de 1:5000) y con la preparación de polvo de huevo anti BLV resuspendido en una concentración de 30 mg/ml en agua destilada estéril (título 1:512), todos los corderos resultaron infectados, con excepción de uno de los animales que inexplicablemente tenía anticuerpos anti BLV al momento en el que se inició el ensayo (detectables por ELISA y confirmados por inmunodifusión en gel de agar). El suero positivo (título 1:128) en relación 1+2 neutralizó la infección cuando fue preincubado con sobrenadante de FLK diluido 1/100, mientras que los animales

inoculados con el sobrenadante 1/100 con suero bovino negativo para BLV, se infectaron (Tabla 3). Ver datos detallados de la progresión de la infección en el **Anexo II (Tabla A4)**.

Tabla 11: Resultados del ensayo de neutralización de anticuerpos en ovinos receptores

Tipo	Inoculo				Ovinos infectados(*) /ovinos inoculados
	Fuente de virus	Relación virus/suero	Detección ADN proviral	Detección ARN viral	
Virus + suero bovino positivo	Sn FLK-BLV 1/10	1+1	Detectado	Detectado	1/2
	Sn FLK-BLV 1/10	1+2	Detectado	Detectado	0/2
	Sn FLK-BLV 1/10	1+4	Detectado	Detectado	0/2
Virus + suero bovino negativo	Sn FLK-BLV 1/10	1+1	Detectado	Detectado	2/2
	Sn FLK-BLV 1/10	1+2	Detectado	Detectado	2/2
	Sn FLK-BLV 1/10	1+4	Detectado	Detectado	1/2
Virus + IgYc BLV	Sn FLK-BLV 1/100	n/a	Detectado	Detectado	2/2
Virus + IgYc n/r		n/a	Detectado	No detectado	2/2
Virus + Polvo IgY BLV 30 mg/ml		n/a	Detectado	No detectado	1/2
Virus + Polvo IgY n/r 30 mg/ml		n/a	Detectado	No detectado	2/2
Virus + suero bovino positivo		1+2	Detectado	No detectado	0/2
Virus + suero bovino negativo		1+2	Detectado	No detectado	2/2
Virus + IgYc BLV		Sn FLK- BLV 1/1000	n/a	Detectado	Detectado
Virus + Polvo IgY BLV 30 mg/ml	n/a		No detectado	No detectado	2/2

(*) Se considera infectado cuando se detectan anticuerpos y provirus en sangre por ELISA y nPCR. Sn: Sobrenadante. Título suero bovino positivo: 1:128. Título IgYc BLV: 1:5000. Título polvo IgY BLV: 1:512.

5.5 Ensayo controlado de eficacia a campo

El ensayo comenzó inmediatamente después de que los terneros fueron separados de sus madres. A partir del primer nacimiento convenido, se derivó de cada parto exitoso, Un ternero para el grupo tratado y uno para el grupo control. Debido a la necesidad de

iniciar el ensayo apenas cada ternero era transferido a la zona de crianza, la detección de anticuerpos e infecciones perinatales se realizó posteriormente al inicio del ensayo. Cada ternero inició el ensayo en forma independiente el primer día de crianza. Los terneros nacidos con provirus detectable no fueron incluidos en el ensayo (8 en total, 4 habían sido reclutados en el grupo tratado y 4 en el grupo control).

Ambos grupos quedaron conformados por 15 terneros, después de la reducción en la guachera de 11 terneros por muertes no relacionadas (5 en grupo tratado y 6 en el grupo control), con una prevalencia de anticuerpos del 93,3% tanto en el grupo control (14/15) como en el grupo tratado (14/15) (**Tabla 12**). El polvo agregado al balde mostró dificultades para ser resuspendido con la presencia de grumos y apelmazamiento según los comentarios del operador que realizaba la resuspensión y la provisión de leche diaria.

A los 2 meses de edad, una vez finalizado el tratamiento, la seroprevalencia se redujo a 46,6% y 60% en los grupos tratado y control, respectivamente. En este momento ambos grupos egresaron del período de cría y fueron transferidos al área de recría donde permanecieron por el resto de la experiencia. En el grupo tratado se observó 1 animal con provirus detectable (1/15, ID 6670) (**Tabla 12**).

En el muestreo de los 7 meses se redujeron prácticamente todos los seroreactores, detectándose solamente 1 de 15 (6,6%) en el grupo tratado y ningún ternero seropositivo en el grupo control. El número de animales se redujo a 14 en el grupo control debido a la desaparición de uno de ellos (ID 7014). El ternero 6670 fue el único con provirus detectable en sangre, igual que a los 2 meses de edad (1/15) (**Tabla 12**).

En el muestreo de los 9 meses, se detectó el provirus en 1 animal (1/12, ID 6531) del grupo control, sin detección de anticuerpos anti BLV (0/12). El número de animales se redujo a 13 debido a una nueva desaparición (ID 7013). Para el grupo tratado se detectaron anticuerpos y provirus en el animal 6670 nuevamente (1/15) (**Tabla 12**).

En resumen, en ambos grupos se observó la aparición de un nuevo animal infectado, en el caso del grupo tratado a los 2 meses de edad, y en el caso del grupo control a los 9 meses de edad. La proporción de infectados sin embargo fue diferente debido al

impacto de un único animal infectado en los grupos de 15 y 13 animales, respectivamente. Los resultados de la progresión en el tiempo pueden ser observados en el **Anexo II (Tabla A5 y A6)**.

Tabla 12: Progresión del ensayo caso controlado de eficacia a campo.

Grupo	T0		2 meses		7 meses		9 meses	
	Anticuerpos	Provirus	Anticuerpos	Provirus	Anticuerpos	Provirus	Anticuerpos	Provirus
Tratado	14/15	0/15	9/15	1/15	1/15	1/15	1/15	1/15
Control	14/15	0/15	7/15	0/15	0/14	0/14	0/13	1/13

El índice de prevalencia individual al final del ensayo fue de 6,6% en el grupo tratado y 7,7% en el grupo control (**Tabla 13**).

Tabla 13: Detalle de unidades experimentales y prevalencia en los distintos grupos.

	n al inicio	n al final	Prevalencia infección al inicio	Incidencia infección al final
Tratado	15	15	0%	6,6%
Control	15	13	0%	7.7%

n: número de terneros por grupo

6. Discusión

Este trabajo de tesis indaga sobre la potencialidad de utilizar anticuerpos específicos anti BLV durante el período de crianza en el ámbito natural de un rodeo lechero, donde los terneros conviven con la infección desde el nacimiento debido a la alta endemicidad actual en Argentina. El propósito final consiste en diseñar una estrategia que permita influir positivamente en la dinámica de la infección, disminuyendo progresivamente el ciclo epidemiológico de transmisión comenzando desde la edad temprana. Esta sería la única opción válida para controlar al BLV que consistiría en reducir la prevalencia en los animales jóvenes. La propuesta plantea un criterio diferente a lo sugerido en las propuestas clásicas de control, basado en el refuerzo de anticuerpos por consumo oral. Lo novedoso consiste asimismo, en la utilización de anticuerpos del tipo IgY producidos en huevos como consecuencia de la hiperinmunización de gallinas con virus BLV completo.

Para diseñar este trabajo tuvimos en cuenta el contexto productivo en los establecimientos de tambo y la endemicidad natural del BLV en Argentina en rodeos lecheros, donde la infección se ha instalado después de su introducción y diseminación a partir del año 1973, y se manifiesta clínicamente en forma de linfosarcoma con la pérdida primaria del animal y de las ganancias asociadas a la unidad productiva. En este sentido, se eligió un tambo típico Rafaela, en una de las zonas de mayor producción de leche del país, donde el manejo y el comportamiento de la infección es similar al de otros de la misma región, tal como se observa en la **Figura 9**, donde los datos de prevalencia de anticuerpos y provirus en sangre y leche son similares a los reportados previamente (Gutiérrez y col., 2012; Merlini y col., 2016). Los terneros de tambo recién nacidos calosttran naturalmente al pie de su propia madre, con la cual conviven durante 48-72 hs. Durante esta etapa obtienen inmunidad pasiva por consumo de calostro, lo que queda en evidencia por la alta reactividad de anticuerpos encontrada (**Figura 9**). En este proceso también pueden recibir virus libre en la secreción y/o células con provirus integrado (Lomonaco y col., 2014; Gutiérrez y col., 2014b). Después del calostrado, los terneros son separados de la madre, que ingresa al tambo para su ordeño, y transferidos a la guachera, donde consumen leche fresca proveniente del tambo. En la guachera, el ternero se enfrenta a dos fuentes de desafío natural de BLV: el contacto con otros terneros nacidos infectados, que en general desarrollan altos niveles de carga proviral rápidamente (Gutiérrez y col., 2014b), y el consumo de leche fresca del tambo, que contiene anticuerpos específicos y también virus/provirus (Gutiérrez y col., 2011), ambas opciones evidenciadas también en este trabajo (**Figuras 9 y 12a**).

En línea con este razonamiento, la implicancia de la infección natural con BLV por consumo de leche e ingreso a través de la mucosa digestiva después del cierre

intestinal, alrededor de las 24 hs de vida, es una pregunta que sigue vigente. La infección podría darse por contacto con células de leche infectadas y/o con partículas virales producidas por expresión viral *ex vivo* a partir de células infectadas. Independientemente de la fuente viral y del sitio de entrada, el ingreso podría estar moderado por la interferencia producida por distintos niveles de anticuerpos en la leche misma. Más aún, el éxito de la infección podría estar influenciado por el nivel de anticuerpos pasivos circulantes, como también se estudia esta incógnita con otros retrovirus similares como HTLV y HIV (Takezaki y col., 1997). De hecho, Van der Maaten y colaboradores confirmaron la infección por vía oral en terneros de pocos días de vida cuando suministraron linfocitos infectados de un bovino adulto en ausencia de anticuerpos calostrales (Van der Maaten y col., 1981b). Como puede observarse, el panorama incluye múltiples variables, y contiene desafíos concurrentes para estudiar.

El hecho de que productores de tambo de alta prevalencia que controlan la iatrogenia a través de procedimientos correctos y calostran a sus terneros en forma artificial con banco de calostro procedente de vacas no infectadas, pero continúan la crianza con leche fresca de tanque, posean alrededor del 40% de animales jóvenes de pre-parto infectados (datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, Merlini y col., 2016), sugiere que en el ámbito del tambo la infección por consumo oral a través de la leche sería un punto significativo en la transmisión, ya que la incidencia es similar a la que se observa en los rodeos donde cada ternero consume calostro naturalmente de su propia madre. Este mismo concepto ha sido discutido previamente (Dimmock y col., 1991), aunque no se ha avanzado en su estudio.

Todos estos datos indican que los períodos de cría y recría son cruciales en la dinámica de transmisión del virus, y permite una posible interpretación sobre el progreso de la infección durante los 2 primeros años de vida, que podrían establecerse como consecuencia de 3 acciones, probablemente concurrentes: (1) consumo de calostro, (2) contacto con los animales nacidos infectados y/o (3) consumo de leche (Ruiz y col., 2018).

Los estudios enfocados en el calostro han sido abordados en otro proyecto de nuestro grupo de trabajo. Por lo tanto, este trabajo de tesis se centra en la leche y sus características, en un contexto de altos niveles de infección, con la idea de que el consumo de leche podría ser un elemento crítico en la transmisión natural.

Los datos de prevalencia en el rodeo general, así como en los animales en estudio (**Figura 9**) nos permitieron concluir que el rodeo donde se desarrolló este trabajo se comporta de modo similar a los estudiados y reportados previamente, con lo cual resulta

válido el diseño y prosecución del ensayo controlado de eficacia a campo de los anticuerpos.

El primer hallazgo novedoso reportado en este trabajo consiste en la caracterización de la leche de vacas infectadas y su comparación con lo que se observa en sangre. Sumado a esto, si bien la presencia de anticuerpos y provirus en secreciones lácteas ha sido previamente reportada (Gutierrez y col., 2011; Yamada y col., 2013; Gutierrez y col., 2015; Olaya Galán y col., 2017), hasta el momento no se habían descripto los niveles naturales en leches individuales y en leches de tanque. En este trabajo observamos que la prevalencia de provirus, la carga proviral y los niveles de anticuerpos, son significativamente más bajos en leche que en sangre circulante. Mientras que ninguna leche muestra carga proviral alta, con un valor máximo de 1080 copias/ μ g DNA, el 33% de las vacas posee niveles de provirus en sangre superiores a 1500 copias/ μ g. La detección de provirus en leche no es más prevalente en vacas con mayores niveles de provirus circulante y se dispersa en todo el rango de anticuerpos en esta secreción (**Figura 11 y 12a**). A pesar de no observarse una correlación entre la carga proviral en leche y sangre, se detecta una correlación positiva entre anticuerpos en ambos fluidos, así como entre el nivel de provirus en sangre y anticuerpos en leche. Todo esto sugiere que los niveles de infección individual se ven reflejados en leche y que los anticuerpos son los marcadores indirectos de dichos niveles, tal como ha sido reportado en sangre (Gutierrez y col., 2012) y que también se observa en este trabajo con la correlación positiva entre carga proviral y anticuerpos circulantes (**Figura 10a**). Estos hallazgos indicarían que independientemente del nivel de infección circulante, el riesgo de transmisión no estaría asociado únicamente al consumo de leche proveniente de vacas de mayor carga proviral. Por el contrario, las vacas con menores niveles de infección circulante, que poseen bajos niveles de anticuerpos en leche plantearían un desafío mayor, debido a la prevalencia elevada de provirus. Como dato accesorio se destaca que la leche con el valor superior de carga (1080 copias/ μ g) pertenece al grupo de carga baja en sangre, lo que también abona a este razonamiento.

Debido a que la crianza artificial en estaca es la rutina de manejo del tambo, el razonamiento anterior fue complementado con el análisis de leche fresca de tanque que se suministra a los terneros durante la crianza. A diferencia de lo observado en leche individual, todas las leches de tanque mostraron un título igual de anticuerpos de 1:32, con un 90% de provirus detectable. La carga proviral fue en todos los casos extremadamente baja, por fuera del rango dinámico de la reacción de PCR en tiempo real. Aun por fuera del límite de cuantificación por sus altos valores de CT, pero con un pico de reactividad específico en la curva individual (no mostrado), las 9 muestras fueron

clasificadas como positivas debido a ensayos previos de proficiencia contra un panel internacional, que confirmaban la especificidad de este tipo de hallazgos (Jaworski y col., 2018).

El efecto del consumo de leche fresca durante la crianza lo desconocemos. En el caso de HTLV, un virus altamente relacionado con BLV, el riesgo de transmisión está asociado a la lactancia materna. El hallazgo concurrente de provirus y anticuerpos en leche plantea la misma dicotomía, y actualmente se recomienda a las madres infectadas evitar la lactancia natural, incluyendo el consumo de calostro (Percher y col., 2016). Nuestra interpretación es que los terneros de tambo, debido a la separación de su madre y al consumo obligado de leche de tanque, se encuentran en una situación en la cual el equilibrio natural de transferencia de anticuerpos/patógeno a través de la leche se encuentra alterado. Nuestros resultados muestran que la composición de la leche de tanque varía cuando se la compara con las leches individuales, aportando una oferta constante de virus/provirus y una cantidad de anticuerpos intermedia (1:32). Esto difiere de lo que recibirían de su propia madre en caso de la crianza natural al pie, no sólo en el ámbito nutricional sino en el específico relacionado con el BLV, cuando recibirían distintos títulos de anticuerpos (rango de títulos de anticuerpos varía de <1:16 a >1:64) en presencia irregular de provirus, dependiendo de cada vaca. El tanque representa un factor igualador de provirus y anticuerpos. Los terneros consumen en promedio 4 litros de leche fresca de tanque por día durante 60 días, lo que significa un total de alrededor de 240 litros totales durante la crianza. Con un desafío constante, impuesto por la ingesta de pequeñas dosis diarias de BLV en la leche en presencia de títulos moderados de anticuerpos, los terneros susceptibles con menores niveles de inmunidad calostrual, podrían estar en situación de desventaja frente a la posible infección oral.

Abriendo un paréntesis en el razonamiento, es importante decir que este trabajo muestra únicamente la detección de provirus, aun cuando es probable que también se encuentre virus BLV activo presente en secreciones lácteas según ha sido reportado (Yamada y col., 2013). La detección de ARN viral en leche no se encuentra puesta a punto en nuestro laboratorio. Si bien se hicieron intentos de extracción de ARN utilizando distintos métodos como columnas comerciales y Trizol, y partiendo de distintas matrices lácteas como leche entera, suero de leche con y sin solución estabilizante de ARN (RNAlater), no hemos llegado a resultados válidos para reportar. La matriz láctea representa un factor crítico en los sistemas de extracción de ácidos nucleicos debido a su gran contenido en grasa. Aún en muestras de leche contaminadas experimentalmente con virus BLV, no hemos podido detectar ARN viral con robustez, con hallazgos de

reducción de la sensibilidad analítica de hasta 2 log. Las diluciones de sobrenadante de células FLK-BLV que daban resultado positivo hasta 1:1000, se reducían a 1:10 en leche contaminada artificialmente. Considerando que el valor esperado de BLV natural en leche sería muy bajo, no se realizaron los análisis por considerar que no contábamos con buena performance diagnóstica.

De los resultados reportados hasta aquí, y asumiendo como válida la infectividad de las secreciones lácteas (Kanno y col., 2014) y la ruta de transmisión oral (Van der Maaten y col., 1981b), entendemos que resulta crítico intervenir lo antes posible luego del nacimiento, con el objetivo de interrumpir el potencial contagio por consumo de calostro y leche. Particularmente, la leche de tanque plantea un desequilibrio frente a la situación de crianza natural al pie de la madre. En este contexto y según nuestro punto de vista, se podrían realizar dos acciones que favorecerían la reducción de la transmisión y que podrían ser complementarias en la rutina de manejo del tambo: la inactivación de la infectividad del BLV por pasteurización o provisión de sustituto lácteo y la suplementación de la leche con anticuerpos anti BLV.

Teniendo en cuenta que los anticuerpos naturales contra la infección poseen características neutralizantes para la infectividad con virus asociado a células y suspensiones virales libres de células (Greig y col., 1978), se propuso suplementar la leche de tanque utilizada para el consumo durante la crianza con anticuerpos anti BLV. Este abordaje podría colaborar con la reducción de la infección por consumo y, de modo indirecto, se obtendría evidencia experimental sobre el contagio por vía oral en el contexto epidemiológico natural.

En línea con esta propuesta, se diseñó un experimento controlado de eficacia a campo para proveer anticuerpos anti BLV a un grupo de terneros calostrados naturalmente, nacidos en el mismo rodeo donde se realizaron los estudios preliminares. En iguales condiciones iniciales, el propósito fue observar el comportamiento de la infección en un grupo no tratado o “natural” frente a un grupo tratado donde estaríamos incorporando un factor de interferencia a las infecciones provenientes del consumo de leche de tanque por el agregado de anticuerpos específicos anti BLV. Debido a que (1) la capacidad neutralizante de patógenos de mamíferos ha sido reportada para las inmunoglobulinas de tipo IgY (Kweon y col., 2000; Van Nguyen y col., 2006; Nguyen y col., 2010; Vega y col., 2011; Vega y col., 2015) (2) su uso para interferir *in vivo* en infecciones virales y bacterianas provocadas por consumo oral ha sido demostrada (Bilbao y col., 2007) (3) su producción a escala es menos costosa y con mayores rendimientos que la producción en otros sistemas animales (4) contamos en INTA con las instalaciones para alojar un gran número de gallinas, (5) se reporta el uso de las inmunoglobulinas de tipo IgY por

suplemento de huevo completo en la dieta y; (6) contamos en INTA con la capacidad de realizar el procesamiento de huevos a escala por secado *spray*, la propuesta fue producir inmunoglobulinas en yema de huevo por hiperinmunización de gallinas con BLV completo concentrado. La provisión se realizó por adición de polvo de huevo directamente a la leche del balde que se ofrece a cada ternero durante el periodo de cría en la guachera.

Las gallinas fueron hiperinmunizadas con una preparación de virus BLV concentrado elaborado a partir del sobrenadante de FLK, que mostró las condiciones esperadas durante la caracterización (**Figuras 16, 17, 18 y 20**). Las proteínas mayoritarias de la estructura viral gp51 y p24 fueron reconocidas específicamente en la preparación de BLVc, por inmunodetección y en el ELISA de captura de antígenos. Aunque no se realizaron ensayos para detectar proteínas virales en condiciones no desnaturizantes, la integridad de la partícula viral parece haber sido mantenida durante la elaboración del BLVc, debido a la evidencia de estructuras compatibles en los ensayos de microscopía electrónica. No solamente para incrementar y acelerar la producción viral para este ensayo, sino considerando también que la colecta de virus para producir antígeno de ELISA suele ser laboriosa y extensa, y que las partículas virales son extremadamente lábiles una vez secretadas al medio extracelular, se trabajó con la línea celular FLK en condiciones clásicas y con el agregado de dos componentes que podrían colaborar con los niveles de expresión viral y la estabilidad de las partículas, valproato de sodio y trehalosa respectivamente. Ambos compuestos con estudios previos que mostraban acción específica sobre los niveles de expresión del BLV y HTLV, para el caso del valproato (Achachi y col., 2005), y sobre la estabilidad de partículas virales, para el caso de la trehalosa (Pastorino y col., 2015; Prabhu y col., 2014).

A pesar de los efectos previos reportados, no observamos un efecto positivo en la producción viral cuando el valproato fue utilizado en las condiciones de estudio, aun cuando fueron similares a las disponibles en las publicaciones. Si bien la única herramienta utilizada fue el ELISA para detectar antígenos totales del BLV, y aún sin utilizar un sistema de cuantificación absoluta, los hallazgos fueron considerados válidos debido a que los datos crudos de absorbancia fueron similares a los obtenidos en los cultivos sin el agregado de valproato (**Figura 14**). El efecto inhibitor de la metilación por el cual se hipotetiza la capacidad del valproato de incrementar la transcripción y en consecuencia los niveles de expresión viral, debería estudiarse con mayor profundidad y particularmente en la línea celular FLK, debido a que podrían existir otros aspectos a tener en cuenta para que el efecto sea sustentable y/o que por alguna razón no se estuviera produciendo como era esperado. Los análisis para verificar el grado de

metilación en las condiciones ensayadas no fueron realizados ya que no contamos con las condiciones, los conocimientos ni los recursos necesarios.

También se utilizó trehalosa como aditivo estabilizante en el medio de cultivo de mantenimiento y en el sobrenadante celular cosechado, con el propósito de evitar la degradación de las partículas virales durante la producción y mantener la estabilidad durante el congelado. Se recurrió a este compuesto ya que posee actividad reportada como preservante de proteínas, ácidos nucleicos y partículas virales (Pastorino y col., 2015; Prabhu y col., 2014). Teniendo en cuenta los datos en la literatura, se utilizaron 3 concentraciones de trehalosa como suplemento del medio de cultivo celular. Mientras que el agregado de 10% de trehalosa provocó efectos tóxicos sobre las células, el agregado de 1,5% y al 5% no modificó la cantidad de antígenos virales detectados, aún sin provocar citotoxicidad. El agregado de trehalosa al 15% como estabilizante post-cosecha mostró una mayor capacidad estabilizante, con mejor rendimiento según el ensayo de ELISA de antígeno. El BLV al igual que otros Retrovirus, es muy lábil y se degrada fácilmente en el medio extracelular. Esta es la primera evidencia de que el agregado de un compuesto como la trehalosa podría colaborar en el mantenimiento de stocks virales para distintos usos posteriores. Los datos obtenidos sugieren que su utilización como conservante evitaría la degradación de las partículas virales, incrementando así el número de las mismas en las preparaciones obtenidas de cultivos celulares. Un ejemplo posible lo constituye la preservación de partículas virales en vacunas vivas atenuadas como la que se encuentra actualmente en desarrollo en nuestro laboratorio.

El protocolo de inmunización de gallinas utilizando BLVc produjo los resultados esperados, con la presencia de anticuerpos específicos en sangre desde el día 45 post inoculación. La fracción de anticuerpos IgY concentrados con sulfato de amonio a partir de yema de huevo mostró claramente la presencia de anticuerpos totales anti BLV de alto título. De la colecta de alrededor de 9000 huevos, se produjeron 86,4 kg de polvo distribuidos en 7 lotes secados en forma independiente, donde se confirmó la presencia y el título de anticuerpos específicos (**Tabla 9**).

Con el propósito de detectar la capacidad neutralizante de los anticuerpos IgY, realizamos dos ensayos diferentes: inhibición de formación de sincicios *in vitro* con la preparación de IgYs anti BLV concentradas, y neutralización *in vivo* en un bioensayo en corderos con la preparación concentrada de IgYs anti BLV y con el polvo de huevo

resuspendido. En ambos casos los resultados no fueron concluyentes, y no pudimos obtener evidencia sobre la acción neutralizante de los anticuerpos IgY.

Basándonos en los estudios previos disponibles de inhibición de formación de sincicios, no fue posible optimizar la repetibilidad y reproducibilidad del ensayo. La capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en infecciones naturales de campo ha sido previamente reportada, en las primeras publicaciones sobre la respuesta inmune contra la infección, hace más de 30 años (Ferrer y col., 1976, Kono y col., 1983). Actualmente, este ensayo no se utiliza en ninguna rutina de diagnóstico por ser laborioso, costoso y poco robusto. En su lugar, se utilizan ensayos de ELISA o inmunodifusión en gel de agar para declarar el estatus sanitario de animales individuales o poblaciones. Debido a que no se ha reportado la capacidad neutralizante en secreciones lácteas ni en anticuerpos IgY anti BLV, resultaba interesante indagarlo según nuestro punto de vista. Aun cuando seguimos las indicaciones reportadas en las publicaciones, los sueros de campo utilizados en la puesta a punto resultaban tóxicos para las células, generando el levantamiento de la monocapa.

A fin de contar con un método alternativo capaz de evaluar la capacidad neutralizante, se decidió realizar ensayos *in vivo* en ovinos, debido a su susceptibilidad a las infecciones experimentales con el virus. Esta decisión, de alto costo operativo, mayores complicaciones de manejo y tiempo de ejecución, era la alternativa válida, según nuestro punto de vista, para llegar al resultado deseable sobre el efecto neutralizante de las IgYs. Para esto fue necesaria la optimización previa de los ensayos de infección experimental. Se inocularon ovinos jóvenes tanto con virus libre de células como con células FLK viables, y se determinó que las mínimas cantidades para provocar la infección fueron una dilución 1/1000 de sobrenadante de células FLK, como así también 5000 células por inóculo. También pudimos observar que un título de anticuerpos anti BLV de 1:128 presente en un suero de un bovino positivo para BLV fue suficiente para neutralizar el virus e inhibir desarrollo de la infección experimental. Durante la realización del ensayo observamos que es posible que los componentes del suero bovino en altas concentraciones generen un efecto de interferencia inespecífico sobre la acción del BLV, anulando o retrasando la infección tal como se observó en los animales inoculados con la mezcla virus libre de células con suero negativo en relación 1+4. Este hallazgo es importante a la hora de interpretar los resultados en caso de utilizar este ensayo, ya que podrían confundirse los efectos de la neutralización específica con la interferencia y/o inactivación viral provocada por componentes propios de la muestra en estudio, algo similar a lo que se observa en los ensayos *in vitro* con el efecto citotóxico y la ausencia de sincicios al utilizar suero bovino negativo.

Todos los corderos resultaron infectados cuando fueron inoculados con virus libre de células previamente incubado con la preparación de IgY concentrada anti BLV y con la preparación de polvo de huevo anti BLV (30 mg/ml, título 1:512). Este hallazgo estaría demostrando la incapacidad de las IgY anti BLV de neutralizar el virus presente en el sobrenadante de células FLK-BLV. Por el contrario, las preparaciones con IgY no generaron ningún efecto adverso sobre la infectividad viral.

Las ovejas no son huéspedes naturales del BLV, y si bien el virus resulta infectivo de modo experimental, el comportamiento de la infección y del hospedador difiere en varios aspectos de lo que sucede en la infección natural de los bovinos. Esto se encuentra ampliamente reportado y ha sido revisado por Gillet y col. (2007). Debido a esto, el estudio de la infección y la patogénesis utilizando infecciones experimentales en ovinos puede ser informativo para comprender ciertos aspectos de la patogénesis, aunque no todos podrían estar cubiertos. En el caso de la IgY, y siendo el primer intento, podríamos inferir que si bien no observamos el efecto neutralizante como sucedió con los sueros bovinos, estos resultados se podrían deber a la utilización de un modelo animal distinto al hospedador natural. Quizás algún aspecto de la infección relacionado con el hospedador pudo producir una interferencia en los resultados esperados. Asimismo, y aunque se utilizó una preparación de virus completo para la inmunización, con lo cual se predice una respuesta contra las proteínas virales expuestas en su contexto nativo del mismo modo que en el caso natural, los anticuerpos podrían no tener acción neutralizante, aunque esté descrito para otros patógenos, por alguna razón que hasta el momento desconocemos.

Si bien el ensayo *in vivo* fue una alternativa para el ensayo *in vitro* con el objeto de analizar la capacidad neutralizante de los anticuerpos IgYs, y aunque no se obtuvieron los resultados esperados, su realización ha resultado beneficiosa para el grupo de trabajo, ya que contamos con una herramienta nueva y válida para realizar distintos estudios en el marco de los proyectos actuales y futuros. De todos modos, más ensayos deben ser realizados en este sentido para definir si las IgYs poseen o no capacidad neutralizante.

El ensayo controlado a campo se llevó a cabo de todos modos, considerando que el suplemento de polvo de huevo con IgYs anti BLV en la leche generaba un aumento real del nivel de anticuerpos totales anti BLV disponibles. Se suministraron a cada ternero 2 tomas diarias de 30 gr de polvo de huevo entero resuspendidos en 2 litros de leche de tanque. El objetivo fue aumentar los niveles disponibles de anticuerpos naturales anti

BLV en leche de tanque durante el consumo diario en la crianza, y de este modo, elevar la capacidad de interferencia de la potencial infectividad viral in vivo. Aunque los anticuerpos IgY y los naturales no pueden ser titulados juntos en el ensayo de ELISA debido a la diferencia de especie, sabemos que poseen títulos de 1:128-1:256, en el caso de las IgY y de 1:32, en el caso de los anticuerpos naturales. Esto indicaría que provocamos un aumento de anticuerpos considerable, cercano a los niveles superiores en leches individuales.

Además de haber resultado extremadamente costoso, y de la falta de confirmación de la actividad neutralizante de los anticuerpos IgY, ambas situaciones contempladas previamente cuando se planificó el proyecto, la realización de este ensayo ha estado sujeta a múltiples fuentes de incertidumbre y situaciones emergentes que se describen a continuación, y que definitivamente, han cambiado el curso y los resultados esperables.

El diseño del mismo fue cuidadosamente realizado con la colaboración de un experto en epidemiología y bioestadística, asumiendo las condiciones de la infección natural, los aspectos generales de salud animal y de manejo productivo dentro del establecimiento donde se realizaría el ensayo. El número necesario para realizar un análisis adecuado al finalizar el estudio era de 28 animales (**Tabla 6**). Aquí nos encontramos con el mayor contratiempo emergente. Si bien en el momento de los partos se destinaron más de 30 terneros recién nacidos a cada grupo, la reducción por muertes en las primeras semanas de vida fue más elevada que lo esperado y asumido durante el diseño. Las oscilaciones en los índices de mortalidad suelen ser una causa de problemas para la reposición de animales de ordeño. Justamente en el momento de la cría de nuestras unidades experimentales, un brote de diarreas asociado a malas condiciones climáticas provocó una reducción mayor a la esperada. Si bien más de 30 terneros iniciaron el estudio, la reducción del n fue inmediatamente posterior al inicio, sumando las muertes naturales y la remoción de animales con provirus detectable (13.3% detección de provirus positivos en ambos grupos, 8/60), el número de terneros final fue de 15 por grupo.

Al inicio, y antes de la reducción significativa de unidades experimentales, más del 85% de los terneros enrolados poseían anticuerpos anti BLV (52/60) con altos niveles de reactividad, lo que indicaba un eficiente calostrado. La tasa de animales nacidos infectados, los niveles de anticuerpos calostrales y la reducción de prevalencia de anticuerpos calostrales, concuerdan con reportes previos del grupo de trabajo. Sin embargo, la incidencia de la infección en los grupos en estudio, ha sido diferente a la observada en situaciones naturales previamente analizadas, incluso en el rodeo en estudio. En estos análisis previos, con un índice de animales nacidos con provirus

detectables del 10-12%, las prevalencias a los 6, 9 y 12 meses aumentan a 18-20%, 25-30% y 32-36% respectivamente. En este estudio sin embargo, solamente se detectó un nuevo animal infectado en el grupo tratado a los dos meses, y uno en el grupo control a los 9 meses, con una prevalencia final del 6.6% en el grupo tratado y del 7.7% en el grupo control. Aun teniendo en cuenta que los grupos iniciaron sin ningún animal infectado, la progresión no fue la esperada. La aparición de 1 animal infectado a los dos meses puede deberse a que el mismo haya nacido infectado con baja carga proviral por lo tanto no pudo ser detectarlo al inicio de la experiencia, o también que haya adquirido la infección durante el periodo periparto o durante la cría, como sucedió con el nuevo infectado en el grupo control, algo previamente observado en otras poblaciones en estudio.

Según nuestro punto de vista, la reducción del número de animales en estudio, muy por debajo de lo planificado durante el diseño ha reducido el valor de los hallazgos del estudio, y no permite ni siquiera realizar un análisis, y menos aún llegar a conclusiones válidas. Ante esta realidad, es importante dejar explícito el efecto de no contar con el número válido de muestras, algo muchas veces poco estimado en el diseño y prosecución de los proyectos de investigación, sobre todo con ensayos de campo. Sumado a esto, al momento de la presentación de esta tesis solo disponemos de los resultados de ambos grupos hasta los 9 meses. Los animales se seguirán estudiando hasta la edad de 2 años, momento de entrar en el sistema productivo y etapa en la cual se espera un fuerte incremento de la incidencia de la infección en los sistemas de tambos de alta producción (Gutierrez y col., 2012; Merlini y col., 2016).

Como aspecto positivo, además de que el ensayo fue realizado en condiciones productivas reales, desde el punto de vista operativo contamos con una excelente predisposición y acompañamiento del personal que asistió *in situ* en la guachera y que realizó el seguimiento y la toma de muestras posterior. Toda la información estuvo disponible en tiempo real. Uno de los hechos reportados y que también pudo haber influido en los resultados finales fue el manejo del polvo de huevo durante la preparación de la leche para la provisión diaria, con la aparición de grumos y dificultad para la disolución a pesar de que la leche se utilizó entibada y que se mezclaba cuidadosamente procurando la disolución completa.

Cuando se realizan ensayos a campo en condiciones naturales, hay muchos factores que constituyen parte del riesgo que se debe tener en cuenta a la hora de la planificación. El éxito depende de factores variados como la disponibilidad del establecimiento donde la epidemiología de la infección es representativa, la disponibilidad de los animales, la pericia del personal técnico y auxiliar para realizar el

trabajo según lo planteado, las cuestiones operativas para realizarlo procurando intervenir lo menos posible en la rutina diaria de manejo del tambo, la capacidad de mantener el control y el seguimiento sobre los grupos en estudio, entre otras. En nuestro caso, aun contando con las condiciones arriba descritas, no hemos podido concluir exitosamente debido a las condiciones emergentes.

Finalmente, si bien la hipótesis planteada en el proyecto de tesis no ha podido ser demostrada, podemos decir que este trabajo de tesis aportó datos sobre la epidemiología natural de la infección, que deberían ser utilizados para el diseño y prosecución de una estrategia de control. La opción de suplementar la ingesta de leche con anticuerpos durante la crianza sigue siendo válida según nuestro entender, aunque su acción debería ser demostrada, utilizando en principio anticuerpos homólogos con reconocida actividad neutralizante. Una opción factible sería agregar al balde de leche cantidad adecuada de calostro bovino seco proveniente de vacas infectadas o hiperinmunizadas, con niveles de anticuerpos neutralizantes previamente conocidos. El uso de anticuerpos del tipo IgY debe seguir siendo estudiado, debido a que presenta muchas ventajas con respecto al uso de anticuerpos bovinos, no solamente la reducción del costo productivo, sino el rendimiento y la facilidad de elaboración. Sin embargo, es importante generar evidencia sobre la capacidad neutralizante para continuar este camino. La integridad de las IgY, además de la unión específica a la partícula viral y/o a las proteínas estructurales nativas, debería ser ensayada *in vitro* previamente para seguir avanzando. Esto genera la necesidad de poner a punto ensayos nuevos para lograr este objetivo, considerando entre ellos la cuantificación absoluta y la confirmación de la dosis neutralizante.

El BLV es endémico en Argentina donde produce pérdidas económicas directas e indirectas. Si bien las primeras han sido cuantificadas, con una pérdida de alrededor 5000 dólares por vaca muerta por linfosarcoma, las pérdidas indirectas son por el momento intangibles, y se deben a las restricciones comerciales hacia países que regulan esta infección, principalmente en el comercio de semen y animales en pie (Castellano y Goizueta, 2014). La incidencia de la infección natural, con alrededor del 50% de animales de parto infectados, sin haber tomado contacto con el rodeo adulto, muestra que el virus BLV posee una intensa dinámica de transmisión y se encuentra instalado en los animales desde el mismo momento del nacimiento. Teniendo en cuenta esta dinámica, las estrategias clásicas de control por interrupción del traspaso de sangre han quedado obsoletas, o al menos, no son suficientes. La interrupción del ciclo epidemiológico de transmisión sigue siendo el objetivo mayor, y probablemente, pueda ser logrado únicamente con la complementariedad de estrategias que colaboren en la

reducción en forma conjunta. Entre ellas, la reducción del contagio por supresión de la infectividad de la leche con la se alimentan los terneros durante la cría. Y en este caso, también es posible utilizar más de una opción: la inactivación de la infectividad viral con tratamientos como pasteurización y/o secado *spray* y la interferencia de la infectividad por adición de anticuerpos a la leche de consumo. Sea cual fuere la estrategia elegida, el punto crítico para el control de la infección por BLV es iniciar lo antes posible después del nacimiento de los terneros.

7. Conclusiones

1. El rodeo donde se desarrolló este trabajo se comporta de modo similar a los estudiados y reportados previamente, con lo cual resulta válido el diseño y prosecución del ensayo controlado a campo de eficacia de los anticuerpos.
2. La carga proviral y los niveles de anticuerpos, son significativamente más bajos en la leche que en la sangre circulante.
3. Los niveles de infección individual se ven reflejados en leche y los anticuerpos son los marcadores indirectos de dichos niveles.
4. Los terneros de tambo, debido al consumo obligado de leche de tanque, se encuentran en una situación en la cual el equilibrio natural de transferencia de anticuerpos/patógeno a través de la leche se encuentra alterado.
5. El tanque representa un factor igualador de provirus y anticuerpos, por lo que los animales que presenten menores niveles de inmunidad calostrual estarían en situación de desventaja frente a la posible infección oral provocada por la leche y necesitarían mayor potencial neutralizante en la misma, para poder detener la infección por consumo.
6. El agregado de un compuesto como la trehalosa podría colaborar en el mantenimiento de stocks virales para distintos usos posteriores. Su utilización como conservante evitaría la degradación de las partículas virales, incrementando así el número de las mismas en las preparaciones obtenidas de cultivos celulares.
7. Las gallinas inoculadas presentaron niveles de anticuerpos específicos anti BLV y el producto (polvo de huevo con IgY anti BLV) fue obtenido en las cantidades necesarias para realizar el ensayo a campo.
8. Se pudo optimizar con éxito la infección experimental en ovinos, siendo de gran utilidad para futuros ensayos del grupo de trabajo. Se pudo determinar la dosis mínima de sobrenadante libre de células FLK-BLV y de virus asociado a células

FLK-BLV. También se pudo realizar con éxito un ensayo de neutralización viral usando suero de un animal positivo para BLV, no así con las IgY anti BLV.

9. La suplementación de la leche con las IgY aumentó el título de anticuerpos totales anti BLV, alcanzando los valores observados en las leches individuales.
10. Si bien más de 30 terneros iniciaron el estudio, se observó una reducción inmediatamente posterior al inicio, debido a las muertes y la eliminación de animales con provirus detectable, resultando en 15 animales por grupo. La reducción del número de animales en estudio, no permite realizar un análisis estadístico.
11. Se realizó un ensayo controlado de eficacia a campo y se siguieron los animales hasta los 9 meses, momento en el cual la incidencia de infección por BLV fue del 6.6% en el grupo tratado y del 7.7% en el grupo control.
12. Los animales seleccionados para el estudio a campo se seguirán estudiando hasta la edad de 2 años, momento de entrar en el sistema productivo y etapa en la cual se espera un fuerte incremento de la incidencia de la infección en los sistemas de tambos de alta producción.
13. Este trabajo de tesis aportó datos sobre la epidemiología natural de la infección, que deberían ser utilizados para el diseño y prosecución de una estrategia de control. La opción de suplementar la ingesta de leche con anticuerpos durante la crianza sigue siendo válida, aunque su acción debería ser demostrada, utilizando en principio anticuerpos homólogos con reconocida actividad neutralizante.

8. Bibliografía

1. Acaite, J.; Tamosiunas, V.; Lukauskas, K.; Milius, J.; Pieskus, J. (2007) The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Preventive Veterinary Medicine*, 82:83–9.
2. Achachi, A.; Florins, A.; Gillet, N.; Debacq, C.; Urbain, P.; Foutsop, G.M.; Vandermeers, F.; Jasik, A.; Reichert, M.; Kerkhofs, P.; Lagneaux, I.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (2005) Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29): 10309–10314.
3. Agresti, A.; Ponti, W.; Rocchi, M.; Meneveri, R.; Marozzi, A.; Cavalleri, D.; Peri, E.; Poli, G.; Ginelli, E. (1993) Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *American journal of veterinary research*, 54:373–378.
4. Aida, Y.; Okada, K.; Amanuma, H. (1993) Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Research*, 15;53(2):429-37.
5. Aida, Y.; Murakami, H.; Takahashi, M.; Takeshima, S.N. (2013) Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, 8;4:328.
6. Akita, E.M.; Nakai, S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, 160(2):207-214.
7. Altanerova, V.; Portetelle, D.; Kettmann, R.; Altaner, C. (1989) Infection of rats with bovine leukaemia virus: Establishment of a virus-producing rat cell line. *Journal of general virology*, 70(7):1929-1932.
8. Altanerova, V.; Ban, J.; Kettmann, R.; Altaner, C. (1990) Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis. *Archiv fur Geschwulstforschung*, 60(2):89-96.
9. Aucouturier, J.; Ascarateil, S.; Dupuis, L. (2006) The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*, 24(2):44-45.
10. 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. *Viruses* 7(11):6080-8.

11. Bartlett, P.C.; Sordillo, L.M.; Byrem, T.M.; Norby, B.; Grooms, D.L.; Swenson, C.L.; Zalucha, J.; Erskine, R.J. (2014) Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244:914–922.
12. Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R.; Mammerickx, M.; Marbaix, G.; Portetelle, D.; Van den Broeke, A.; Willems, L.; Thomas, R. (1988) Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, 17(3):197-218.
13. Buxton, B.A.; Schultz, R.D. (1984) Factors affecting the infectivity of lymphocytes from cattle with bovine leucosis virus. *Canadian journal of comparative medicine*, 48(4):365-369.
14. Bilbao, G.N.; Chacana P.A.; Parreño, V.; Terzolo, H.R. (2007) El huevo de gallina, una herramienta para prevenir la diarrea de los terneros. *Revista Visión Rural Año XIV N° 68*.
15. Castellano, A.; 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. Asociación Argentina de Economía Agraria.
16. Daniel, R.C.W.; Gatei, M.H.; Good, M.F.; Boyle, D.B.; Lavin, M.F. (1993) Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis. *Immunology and cell biology*, 71(5): 399.
17. Dimmock, C.K.; Chung, Y.S.; MacKenzie, A.R. (1991) Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, 68(7):230-233.
18. Djilali, S.; Parodi, A.L.; Levy, D.; Cockerell, G.L. (1987) Development of leukemia and lymphosarcoma induced by bovine leukemia virus in sheep: a hematopathological study. *Leukemia* 1:777–781.
19. Djilali, S.; Parodi, A.L. (1989) The BLV-induced leukemia-lymphosarcoma complex in sheep. *Veterinary immunology and immunopathology*, 22(3): 233-244.
20. European Panel on Animal Health and Welfare (EPAHW). (2015) Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal*, 13:63-114.
21. Ferrer, J.F.; Baliga, V.; Diglio, C.; Graves, D.; Kenyon, S.J.; McDonald, H.O.; Piper, K.; Wu, K. (1976). Recent studies on the characterization of the bovine leukemia

- virus (BLV); development of new methods for the diagnosis of BLV infection. *Veterinary Microbiology*, 1(2-3):159-184.
22. Ferrer, J.F.; Marshak, R.R.; Abt, D.A.; Kenyon, S.J. (1978) Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Annales de Recherches Veterinaires*, 9(4):851-857.
 23. Ferrer, J.F.; Piper, C.E. (1978). An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Annales De Recherches Veterinaires*, 9(4):803-807.
 24. Ferrer, J.F.; Piper, C.E. (1981) Role of Colostrum and Milk in the Natural Transmission of the Bovine Leukemia Virus. *Cancer Research*, 41:4906–4909.
 25. Fischinger, P.J.; Blevins, C.S.; Nomura, S. (1974). Simple, quantitative assay for both xenotropic murine leukemia and ecotropic feline leukemia viruses. *Journal of Virology*, 14(1):177-179.
 26. 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. (2007) Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12: 1520-1531.
 27. 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. *Veterinary immunology and immunopathology*, 125(1-2): 1-7.
 28. Gillet, N.A.; Florins, A.; Boxus, M.; Burteau, C.; Nigro, A.; Vandermeers, F.; Balon, H.; Bouzar, 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: 18.
 29. Gillet, N.A.; Gutiérrez, G.; Rodríguez, S.M.; 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 Pathogens*, 9:10:e1003687.
 30. Greig, A.S.; Chander, S.; Samagh, B.; Bouillant, A.M. (1978) A simple, rapid syncytial-inhibition test for antibodies to bovine leukemia virus. *Canadian journal of comparative medicine*, 42(4):446-451.

31. Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Politzki, R.; Lomónaco, M.; Dus Santos, M.J.; Rondelli, F.; Fondevila, N.; Trono, K. (2011) Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 151(3-4):255-263.
32. Gutiérrez, G.; Carignano, H.; Alvarez, I.; Martínez, C.; Porta, N.; Politzki, R.; Gamella, M.; Lomonaco, M.; Fondevila, N.; Poli, M.; Trono, K. (2012) Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC veterinary research*, 8(1):187.
33. Gutiérrez, G.; Rodríguez, S.M.; de Brogniez, A.; Gillet, N.; Golime, R.; Burny, A.; Jaworski, J.P.; Alvarez, I.; Vagnoni, L.; Trono, K.; Willems, L. (2014a) Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses*, 6(6):2416-27.
34. Gutiérrez G, Alvarez I, Merlini R, Rondelli F, Trono K. (2014b) Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Vet Res*. 10:82.
35. Gutiérrez, G.; Lomonaco, M.; Alvarez, I.; Fernandez, F.; Trono, K. (2015) Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Veterinary microbiology*, 177(3-4):366-369.
36. Hopkins, S.G.; DiGiacomo, R.F. (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 13:107-28.
37. Jaworski, J.P.; Porta, N.G.; Gutierrez, G.; Politzki, R.P.; Álvarez, I.; Galarza, R.; Abdala, A.; Calvino, L.; Trono, K. (2016) Short communication: Relationship between the level of bovine leukemia virus antibody and provirus in blood and milk of cows from a naturally infected herd. *Journal of Dairy Science*. 99(7):5629-5634.
38. Jaworski, J.P.; Pluta, A.; Rola-Luszczak, M.; Finnegan, C.; Heenemann, K.; Alvarez, I.; Murakami, K.; Willems, L.; Vahlenkamp, T.W.; Trono, K.G.; Choudhury, B.; Kuźmak, J. (2018) Inter-laboratory comparison of six real time polymerase chain reaction assays for detection of bovine leukemia virus proviral DNA. *Journal of clinical microbiology*, *Journal of clinical microbiology*, 56(7):e00304-18
39. Juliarena, M.A.; Barrios, C.N.; Ceriani, M.C.; Esteban, E.N. (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.
40. 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.
41. Kanno, T.; Ishihara, R.; Hatama, S.; Oue, Y.; Edamatsu, H.; Konno, Y.; Tachibana, S.; Murakami, K. (2014) Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the

- transmission of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2):255-7.
42. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4):1014-8.
 43. Kettmann, R.; Burny, A. (1994) Bovine Leukemia Virus. En: Levy J.A. *The Retroviridae. The Viruses*. Springer, Boston, MA. Capítulo 2:39-81.
 44. Kono, Y.; Irishio, W.; Sentsui, H. (1983) Syncytium-induction inhibition test with complement for detection of antibodies against bovine leukemia virus. *Canadian journal of comparative medicine*, 47(3):328-331.
 45. Kono, Y.; Arai, K.; Sentsui, H.; Matsukawa, S.; Itohara, S. (1986) Protection against bovine leukemia virus infection in sheep by active and passive immunization. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 48(1): 117-125.
 46. Kovacs-Nolan, J.; Mine, Y. (2012) Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3:163-182.
 47. Kulkarni, A.; Bangham, C.R. (2018) HTLV-1: Regulating the balance between proviral latency and reactivation. *Frontiers in microbiology*, 9:449.
 48. Kweon, C.H.; Kwon, B.J.; Woo, S.R.; Kim, J.M.; Woo, G.H.; Son, D.H.; Hur, W.; Lee, Y.S. (2000) Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(9):961-964.
 49. Lassauzet, M.L.; Johnson, W.O.; Thurmond, M.C.; Stevens, F. (1989) Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53:424-430.
 50. Lassauzet, M.L.; Thurmond, M.C.; Johnson, W.O.; Stevens, F.; Picanso, J.P. (1990) Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54(1):184-9.
 51. Lassauzet, M.L.; Thurmond, M.C.; Johnson, W.O.; Stevens, F.; Picanso, J.P. (1991) Factors associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *American journal of epidemiology*, 133:164–176.

52. Lomonaco, M.; Alvarez, I.; Martínez, C.; Porta, N.; Merlini, R.; Carignano, H.; Gutiérrez, G.; Trono, K. (2014) Epidemiological features of BLV natural infection. 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. Montreal, Canada, 26 al 30 de Junio de 2013. *Retrovirology*, 11(Suppl 1):P45.
53. Mammerickx, M.; Portetelle, D.; Burny, A. (1981) Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 28(1):69-81.
54. 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. *Leukemia Research*, 11(4):353-358.
55. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (2012). OIE. Leucosis bovina enzoótica.
(<http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>) Consultado 14 de Junio de 2018.
56. Marawan, M.A.; Mekata, H.; Hayashi, T.; Sekiguchi, S.; Kirino, Y.; Horii, Y.; Moustafa A.M.; Arnaout F.K.; Galila E.S.M.; Norimine, J. (2017). Phylogenetic analysis of env gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(5):912-916.
57. Maresca, C.; Costarelli, S.; Dettori, A.; Felici, A.; Iscaro, C.; Feliziani, F. (2015) Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012). *Preventive Veterinary Medicine*, 119:222–6.
58. Martínez, C.; Gutiérrez, G.; Alvarez, I.; Porta, N.; Lomónaco, M.; Wigdorovitz, A.; Chacana, P.; Trono, K. (2014) Egg yolk antibodies (IgY) against Bovine Leukemia Virus. 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses. Montreal, Canada, 26 al 30 de Junio de 2013. *Retrovirology* 11(1):P46.
59. Martin-Latil, S.; Gnädig, N.F.; Mallet, A.; Desdouits, M.; Guivel-Benhassine, F.; Jeannin, P.; Prevost, M.C.; Schwartz, O.; Gessain, A.; Ozden, S.; Ceccaldi, P.E. (2012) Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood*, 120(3):572-80.
60. 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(3):275-82.
61. Mekata, H.; Sekiguchi, S.; Konnai, S.; Kirino, Y.; Honkawa, K.; Nonaka, N.; Horii, Y.; Norimine, J. (2014) Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine

- leukaemia virus. *Veterinary Record*, 176:254.
62. Merlini, R.; Gutierrez, 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. *Archives of Virology*, 161(11):3215-3217.
 63. Miller, J.M.; Van der Maaten, M.J. (1978) Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 9(4):871-7.
 64. Miller, J.M.; Van der Maaten, M.J. (1979) Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 62(2):425-8.
 65. Miller, J.M.; Van der Maaten, M.J.; Schmerr, M.J. (1983) Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus. *American Journal of Veterinary research*, 44(1):64-7.
 66. Nagy, D.W.; Tyler, J.W.; Kleiboeker, S.B. (2007) Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. *Journal of veterinary internal medicine*, 21:1104–1107.
 67. Nekouei, O.; VanLeeuwen, J.; Stryhn, H.; Kelton, D.; Keefe, G. (2016) Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 133:1-9.
 68. Nguyen, H.H.; Tumpey, T.M.; Park, H.J.; Byun, Y.H.; Tran, L.D.; Nguyen, V.D.; Kilgore, P.E.; Czerkinsky, C.; Katz, J.M.; Seong, B.L.; Song, J.M.; Kim, Y.B.; Do, H.T.; Nguyen, T.; Nguyen, C.V. (2010) Prophylactic and therapeutic efficacy of avian antibodies against influenza virus H5N1 and H1N1 in mice. *PloS one*, 5(4):e10152.
 69. Norby, B.; Bartlett, P.C.; Byrem, T.M.; Erskine, R.J. (2016) Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(3):2043-52.
 70. Nuotio, L.; Rusanen, H.; Sihvonen, L.; Neuvonen, E. (2003) Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Preventive Veterinary Medicine*, 59:43–9.
 71. Ohshima, K.; Okada, K.; Numakunais, S.; Yoneyama, Y.; Sato, S.; Takahashi, K. (1981) Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 43:79–81.
 72. OIE. World Animal Health Information Database (WAHID Interface) Version 1. 2017. (http://www.oie.int/wahis_2/public/index.php/home) Consultado 14 de Junio de 2018.

73. Olaya-Galán, N.N.; Corredor-Figueroa, A.P.; Guzmán-Garzón, T.C.; Ríos-Hernandez, K.S.; Salas-Cárdenas, S.P.; Patarroyo, M.A.; Gutierrez, M.F. (2017). Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. *Epidemiology & Infection*, 145(15):3125-3130.
74. Olson, C.; Baumgartener, L.E. (1976) Pathology of lymphosarcoma in sheep induced with bovine leukemia virus. *Cancer Research*, 36:2365-2373.
75. Olson, C.; Kettmann, R.; Burny, A.; Kaja, R. (1981) Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(3):671-675.
76. Onuma, M.; Wada, M.; Yasutomi, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.M.; Kawakami, Y. (1990) Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Microbiology*. 25(2-3):131-141.
77. Pastorino, B.; Baronti, C.; Gould, E.A.; Charrel, R.N.; De Lamballerie, X. (2015) Effect of chemical stabilizers on the thermostability and infectivity of a representative panel of freeze dried viruses. *PLoS one*, 10(4):e0118963.
78. Percher, F.; Jeannin, P.; Martin-Latil, S.; Gessain, A.; Afonso, P.; Vidy-Roche, A.; Ceccaldi, P.E. (2016) Mother-to-child transmission of HTLV-1 epidemiological aspects, mechanisms and determinants of mother-to-child transmission. *Viruses*, 8(2):40.
79. Piper, C.E.; Ferrer, J.F.; Marshak, R.R. (1979) Postnatal and Prenatal Transmission of the Bovine Leukemia Virus Under Natural Conditions. *Journal of the National Cancer Institute*, 62:165–168.
80. Polat, M.; Takeshima, S.N.; Hosomichi, K.; Kim, J.; Miyasaka, T.; Yamada, K.; Arainga, M.; Murakami, T.; Matsumoto, Y.; De la Barra Diaz, V.; Panei, C.J.; González, E.T.; 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.
81. Pomier, C.; Alcaraz, M.T.; Debacq, C.; Lançon, A.; Kerkhofs, P.; Willems, L.; Wattel, E.; Mortreux, F. (2008) Early and transient reverse transcription during primary deltaretroviral infection of sheep. *Retrovirology*, 5:16.
82. Prabhu, M.; Bhanuprakash, V.; Venkatesan, G.; Yogisharadhya, R.; Bora, D.P.; Balamurugan, V. (2014) Evaluation of stability of live attenuated camelpox vaccine stabilized with different stabilizers and reconstituted with various diluents. *Biologicals*, 42(3):169-175

83. Rodríguez, S.M.; Florins, A.; Gillet, N.; de Brogniez, A.; Sánchez-Alcaraz, M.T.; 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*, 3:7 1210-1248.
84. Romero, C.H.; Cruz, G.B.; Rowe, C.A. (1981) Transmission of Bovine Leukaemia Virus in milk. *Tropical animal health and production*, 15:215–218.
85. Rossich, L.; Gutierrez, G.; Rodriguez, S.; Lefebvre, E.; Trono, K.; Dus Santos, M.J. (2007) Detection of BLV in frozen semen samples by PCR assay. 13th International symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians WAVLC. Melbourne. Australia, 11-14 Noviembre de 2007.
86. Ruiz, V.; Porta, N.G.; Lomónaco, M.; Trono, K.; Alvarez, I. (2018). Bovine Leukemia Virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Frontiers in veterinary science*, 5:267.
87. Sajiki, Y.; Konnai, S.; Nishimori, A.; Okagawa, T.; Maekawa, N.; Goto, S.; Nagano, M.; Kohara, J.; Kitano, N.; Takahashi, T.; Tajima, M.; Mekata, H.; Horii, Y.; Murata, S.; Ohashi, K. (2017) Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(12):2036-2039.
88. Takezaki, T.; Tajima, K.; Ito, M.; Ito, S.; Kinoshita, K.; Tachibana, K.; Matsushita, Y. (1997) Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study Group. *Leukemia*, 3:60-2.
89. Thurmond, M.C.; Carter, R.L.; Puhr, D.M.; Burridge, M.J.; Miller, J.M.; Schmerr, M.J.; Van der Maaten, M.J. (1983) An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47:316–9.
90. Trono, K.G.; Pérez-Filgueira, D.M.; Duffy, S.; Borca, M.V.; Carrillo, C. (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Veterinary Microbiology*, 83(3):235-48.
91. Van Der Maaten, M.J.; Miller, J.M. (1976) Replication of Bovine Leukemia Virus in monolayer cell culture. *Bibliotheca Haematologica*, 43:360-362.
92. Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M. (1978) Sites of in vivo replication of bovine leukemia virus in experimentally infected cattle. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 9(4):831-5.
93. Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M.; Schmerr, M.J. (1981a) In utero transmission of bovine leukemia virus. *American journal of veterinary research*, 42(6):1052-1054.

94. Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M.; Schmerr, M.J. (1981b) Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *American journal of veterinary research*, 42(9):1498-500.
95. Vega, C.; Bok, M.; Chacana, P.; Saif, L.; Fernandez, F.; Parreño, V. (2011) Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(3-4):156-169.
96. Vega, C.; Bok, M.; Saif, L.; Fernandez, F.; Parreño, V. (2015) Egg Yolk IgY Antibodies: a therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Research in veterinary science*, 103:1-10.
97. Van Nguyen, S.; Umeda, K.; Yokoyama, H.; Tohya, Y.; Kodama, Y. (2006) Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Canadian journal of veterinary research*, 70(1), 62.
98. Wyatt, C.R.; Wingett, D.; White, J.S.; Buck, C.D.; Knowles, D.; Reeves, R.; Magnuson, N.S. (1989) Persistent infection of rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction. *Journal of Virology*, 63(11):4498-4506.
99. 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(2):81-87.
100. Yamada, T.; Shigemura, H.; Ishiguro, N.; Inoshima, Y. (2013) Cell Infectivity in relation to bovine leukemia virus gp51 and p24 in bovine milk exosomes. *PLoS one*, 8(10): e77359.

Anexo I: Reactivos y soluciones

Buffer de bloqueo para ELISA

- Suero normal equino 10%
- PBS 1X
- Tween 20 0,2%

Buffer de corrida 1x

- Tris-Base 0,025 M
- Glicina 0,192 M
- SDS 0,1% p/v
- pH 8,3 (aproximado)

Buffer de transferencia 1x

- Tris base 48 mM
- Glicina 39 mM
- Metanol 20% v/v
- SDS 1,3 mM

Buffer muestra-PAGE 2x

- Tris-HCl 0,125 M pH 6,8
- Glicerol 20% v/v
- SDS 4% p/v
- 2-Mercaptoetanol 10% v/v
- Azul de Bromo fenol 0,1% p/v

Medio de crecimiento para FLK-BLV

- RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*)
- 2,55% de Hepes 1M (Promega)
- 10% de Piruvato de sodio 100mM (Gibco)
- Penicilina 2 g / litro
- Estreptomicina 3 x 10⁶ UI / litro
- Anfotericina B 250 U /ml
- Suero fetal bovino irradiado (Internegocios) 5% e inactivado (56°C por media hora)

Medio de mantenimiento para FLK-BLV

- RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*)
- 2,55% de Hepes 1M (Promega)
- 1% de Piruvato de sodio 100 mM (Gibco)
- Penicilina 2 g /litro
- Estreptomicina 3 x 10⁶ UI/litro
- Anfotericina B 250 U /ml
- Suero fetal bovino irradiado (Internegocios) 1% e inactivado (56°C por media hora)

PBS 1X

- Cloruro de sodio 137 mM
- Cloruro de potasio 2,7 mM
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado 4,3 mM
- Fosfato de potasio monobásico 14 mM
- pH 7,3 (aproximado)

Solución colorante Coomassie R-250

- Coomassie blue R-250 0,05% en 50 MeOH : 10 AcOH : 40 H₂O

Solución decolorante de PAGE

- Metanol 30% v/v
- Ácido Acético glacial 20% v/v

Tabla A1: Composición de reactivos para 2 geles de SDS-PAGE.

Reactivo	Gel de Separación 12%	Gel de Concentración 4%
Agua destilada c.s.p.	3,35 ml	3 ml
<i>Buffer</i> del gel de separación (Tris-HCl 1,5M pH 8.8)	2,5 ml	---
<i>Buffer</i> del gel de concentración (Tris-HCl 0,5M pH 6.8)	---	1.3 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
Acilamida/Bisacilamida (30% / 0,8%)	4 ml	0,66 ml
Persulfato de amonio 10% (p/v)	50 µl	25 µl
TEMED (BioRad)	5 µl	5 µl

Anexo II: Información suplementaria

Tabla A2: Resultados crudos de las muestras de terneros recién nacidos, analizadas mediante ELISA Leukofast y qPCR.

ID Ternera	ELISA LKF		qPCR	
	% de Reactividad	Resultado	Copias BLV/ug ADN	Resultado
101 C	299,67	+	0	-
102 C	197,33	+	0	-
6457 C	-19,20	-	0	-
6467 T	135,20	+	0	-
6468 T	95,20	+	0	-
6469 T	30,80	+	0	-
6470 T	140,60	+	0	-
6471 T	126,40	+	0	-
6472 T	137,80	+	10264,6	+
6473 T	189,94	+	0	-
6474 T	214,66	+	0	-
6475 T	197,13	+	0	-
6476 T	47,41	+	0	-
6477 T	170,69	+	0	-
6478 C	192,24	+	0	-
6479 T	133,91	+	0	-
6481 C	174,43	+	0	-
6483 T	118,39	+	0	-
6484 T	205,75	+	0	-
6485 T	178,45	+	0	-
6486 C	97,41	+	34565,1	+
6488 C	152,42	+	0	-
6490 C	295,67	+	0	-
6491 C	304,33	+	0	-
6492 C	322,67	+	0	-
106 C	135,78	+	0	-
107 T	158,72	+	0	-
108 C	79,36	+	0	-
109 T	219,27	+	0	-
6498 T	245,41	+	0	-
6499 C	64,98	+	0	-
6600 T	77,06	+	0	-
6601 C	211,47	+	4068,9	+
6602 T	251,38	+	549,8	+
6603 T	241,74	+	2022,2	+
6604 C	264,68	+	0	-
6605 C	265,14	+	0	-
6606 T	189,86	+	0	-
6607 T	198,17	+	7410,4	+
6608 C	73,85	+	0	-
6609 T	214,75	+	0	-
6610 C	-24,31	-	No se analizó	No se analizó
6611 T	141,94	+	0	-
6612 C	224,31	+	0	-
6613 T	196,33	+	0	-

En rosa se marcaron las muestras que fueron positivas tanto para ELISA como para qPCR.

Tabla A3: Detalle de la progresión de la infección en el ensayo de dosis mínima. Resultados de ELISA Leukofast y n-PCR TAX en los distintos tiempos de muestreo.

Inóculo		ID cordero	T0 (0 dpi)		T30 (30 dpi)		T60 (60 dpi)	
Contenido	Número		ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR
Sn FLK 1:10	1	3031	-	-	+	+	+	+
		3233	-	-	+	+	+	+
Sn FLK 1:100	2	3435	-	-	+	+	+	+
		3637	-	-	+	+	+	+
Sn FLK 1:1000	3	3839	-	-	-	+	+	+
		4041	-	-	-	+	+	+
Sn FLK 1:5000	4	15	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	-	-
Sn FLK 1:10000	5	13	-	-	-	-	-	-
		11	-	-	-	-	-	-
5000 Cel. FLK	6	2627	-	-	-	-	-	+
		2829	-	-	-	+	+	+
500 Cel. FLK	7	4243	-	-	-	-	-	+
		4445	-	-	-	-	-	-
50 Cel. FLK	8	4647	-	-	-	-	-	-
		4849	-	-	-	-	-	-

(+) Positivo, (-) Negativo

Tabla A4: Detalle de la progresión de la infección en el ensayo de neutralización. Resultados de ELISA Leukofast y n-PCR TAX en los distintos tiempos de muestreo.

Inóculo		ID cordero	T0 (0dpi)		T30 (30 dpi)		T60 (60 dpi)		T90 (90 dpi)	
Contenido	Número		ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR
Sn FLK 1:10 + Suero (+) 1+1	1	5152	-	-	-	-	-	-	-	-
		5354	-	-	-	-	-	-	-	+
Sn FLK 1:10 + Suero (+) 1+2	2	5556	-	-	-	-	-	-	-	-
		5758	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn FLK 1:10 + Suero (+) 1+4	3	5960	-	-	-	-	-	-	-	-
		6162	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn FLK 1:10 + Suero (-) 1+1	4	8	+	-	+	+	+	+	+	+
		10	-	-	+	+	+	+	+	+
Sn FLK 1:10 + Suero (-) 1+2	5	9	-	-	+	+	+	+	+	+
		12	-	-	-	+	+	+	+	+
Sn FLK 1:10 + Suero (-) 1+4	6	6364	-	-	-	+	+	+	+	+
		6566	-	-	-	-	-	-	-	+
Sn FLK 1:100 + IgYc BLV	7	451-52	-	-	+	+	+	+	N/A	N/A
		453-54	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
Sn FLK 1:100 + IgYc no relac.	8	455-56	-	-	-	+	-	+	N/A	N/A
		457-58	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
	9	459-60	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A

Sn FLK 1:100 + Polvo BLV 30 mg/ml		461-62	+	-	+	-	+	-	N/A	N/A
Sn FLK 1:100 + Polvo no relac. 30 mg/ml	10	464-65	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
		466-67	+	-	+	-	+	+	N/A	N/A
Sn FLK 1:100 + Suero (+) para BLV 1/128 (1+2)	11	468-69	-	-	+	-	-	-	N/A	N/A
		470-71	-	-	-	-	-	-	N/A	N/A
Sn FLK 1:100 + Suero (-) para BLV (1+2)	12	472-73	-	-	+	+	+	+	N/A	N/A
		474-75	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
Sn FLK 1:1000 + IgYc BLV	13	476-77	-	-	-	-	+	+	N/A	N/A
		478-79	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
Sn FLK 1:1000 + Polvo BLV 30 mg/ml.	14	480-81	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A
		482-83	-	-	-	+	+	+	N/A	N/A

(+) Positivo, (-) Negativo.

Tabla A5: Resultados obtenidos grupo control.

Nº Orden	Nº caravana	T0		T2M		T7M		T9M	
		ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR
1	6661	+	-	-	-	-	-	-	-
2	6664	+	-	-	-	-	-	-	-
3	7000	+	-	-	-	-	-	-	-
4	7002	+	-	-	-	-	-	-	-
5	6531	+	-	+	-	-	-	-	+
6	179	+	-	+	-	-	-	-	-
7	7005	+	-	+	-	-	-	-	-
8	6941	+	-	-	-	-	-	-	-
9	7009	+	-	-	-	-	-	-	-
10	7014	+	-	+	-	Desaparecido		Desaparecido	
11	7013	+	-	-	-	-	-	Desaparecido	
12	6946	+	-	+	-	-	-	-	-
13	6533	-	-	-	-	-	-	-	-
14	6536	+	-	+	-	-	-	-	-
15	6677	+	-	+	-	-	-	-	-
Total	-	14/15	0/15	7/15	0/15	0/14	0/14	0/13	1/13

T0: Tiempo cero (24 – 72 hs de nacidos); T2M: Tiempo 2 meses; T7M: Tiempo 7 meses; T9M: Tiempo 9 meses. N/A: No analizado. En gris se marcan los animales que salieron del ensayo.

Tabla A6: Resultados obtenidos grupo tratado.

Nº Orden	Nº caravana	T0		T2M		T7M		T9M	
		ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR	ELISA LKF	nPCR
1	7004	-	-	-	-	-	-	-	-
2	6663	+	-	-	-	-	-	-	-
3	7003	+	-	-	-	-	-	-	-
4	6937	+	-	+	-	-	-	-	-
5	6532	+	-	-	-	-	-	-	-
6	7006	+	-	-	-	-	-	-	-
7	7008	+	-	+	-	-	-	-	-
8	6942	+	-	+	-	-	-	-	-
9	7010	+	-	+	-	-	-	-	-
10	6668	+	-	+	-	-	-	-	-
11	180	+	-	+	-	-	-	-	-
12	6534	+	-	-	-	-	-	-	-
13	6670	+	-	+	+	+	+	+	+
14	7015	+	-	+	-	-	-	-	-
15	6672	+	-	+	-	-	-	-	-
Total	-	14/15	0/15	9/15	1/15	1/15	1/15	1/15	1/15

T0: Tiempo cero (24 – 72 hs de nacidos); T2M: Tiempo 2 meses; T7M: Tiempo 7 meses; T9M: Tiempo 9 meses. En gris se marcan los animales que salieron del ensayo.