

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RCP) COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA

Alvarez Rubianes, N.; Oriani, D.S.

Cátedra Microbiología Especial y Virología. Facultad. Cs. Veterinarias. UNLPam.

RESUMEN

Se analiza la posibilidad de utilización de RCP como herramienta diagnóstica de Leucosis Enzoótica Bovina, comparándola con las técnicas serológicas tradicionales como inmunodifusión en gel de agar (IDGA) e inmunoensayo enzimático (ELISA), en las condiciones epidemiológicas presentes en Argentina con respecto a dicha enfermedad. Se discuten además las alternativas de distintas estrategias asociadas a RCP, de tal manera de que la misma constituya una técnica de uso rutinario en laboratorios de mediana complejidad. Se concluye que esta técnica adquiere importancia para condiciones de prevalencias muy bajas, en casos puntuales, donde sea necesario definir situaciones epidemiológicas específicas.

Palabras Claves: grupo HTLV-BLV; RCP; diagnóstico.

Polimerasa Chain Reaction (PCR) as a diagnostic tool for enzootic bovine leukosis

SUMMARY

The possible utilization of PCR as a diagnostic tool for enzootic bovine leukosis, comparing its use to traditional serologic techniques such as immunodiffusion agar assay (IDGA) and enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) under epidemiological conditions present in Argentina, is analyzed. Further, the use of alternative strategies associated with PCR will be reviewed in order to evaluate the use of PCR as a routine technique in moderately sophisticated laboratories. It is concluded that PCR becomes important under situations of low prevalence, in cases where it becomes necessary to define specific epidemiological circumstances.

Key words: HTLV-BLV group; PCR, diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad viral producida por un virus perteneciente a la subfamilia Oncovirinae, familia Retroviridae y que se lo clasifica junto con los virus de la leucemia humana a linfocitos T, tipo I y II (HTLV I y II), con los cuales comparte casi un 50% de homología genética, como grupo HTLV-BLV (Murphy et al., 1995). En el bovino es un virus predominantemente células B linfotrópico.

Los animales infectados pueden permanecer clínica y hematológicamente

normales o desarrollar, en aproximadamente un 30 % de los casos, una linfocitosis persistente (LP), que corresponde a una proliferación no neoplásica de linfocitos B, o bien en menos del 5% de los animales infectados, se desarrolla como manifestación clínica, linfosarcomas que tienen como soporte linfocitos B neoplásicos y que se evidencian con o sin LP previa (Esteban, E.N., 1987).

Cómo métodos diagnósticos de ésta enfermedad de gran importancia económica, se han desarrollado varias técnicas

serológicas que incluyen IDGA, ELISA y radio inmuno ensayo (RIE), las que tienen muy buena sensibilidad y especificidad, pero hay ciertas condiciones del animal que pueden llevar a falsos positivos o negativos, tal el caso de vacas en período periparto, animales inmunodeprimidos o simplemente productores de una baja respuesta inmune, como así también terneros hasta aproximadamente los 6 meses de edad, todos, animales epidemiológicamente muy importantes cuando se realizan planes de control y erradicación de ésta enfermedad. Estos métodos detectan anticuerpos contra los antígenos p24 y/o gp51 del virión.

Se ha informado (Roberts et al., 1989) que animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), presentan una respuesta inmunológica deprimida hacia el virus de la leucosis bovina (VLB). Dada la amplia distribución del VDVB en los rebaños bovinos quizás, con los métodos convencionales de diagnóstico, no se capte el total de los animales infectados con VLB.

La RCP, se plantea cómo una técnica diagnóstica alternativa o accesoria para dar respuesta a posibles casos de falsos positivos o negativos y en el futuro adquirirá mayor importancia cuando disminuyan los valores de prevalencia al 05-1% como resultado de la implementación de planes de erradicación de LEB, y sea necesaria una técnica segura para distinguir tumores inducidos por VLB de tumores de otras etiologías.

Virus de la leucosis enzoótica bovina

El VLB es un retrovirus exógeno, no defectivo, de tumorigénesis retardada, no presenta oncogenes y permanece integrado al genoma de células bovinas por toda la vida del mismo, a pesar de una vigorosa respuesta inmune.

Los retrovirus poseen un genoma diploide de ARN(+) el que es transcrito, en el citoplasma de la célula infectada, por una transcriptasa reversa viral (ADN polimerasa ARN dependiente) en un ADN copia doble

cadena (cADN), el cual se integra al genoma celular.

La secuencia completa del genoma del VLB integrado (provirus), consta de 8.714 nucleótidos con una configuración estructural 5'LTR-*gag-pol-env-pXBL*-3'LTR. (Sagata et al., 1985)

LTR: Incluye tres regiones U3, R y U5 que derivan de la fusión de secuencias de las terminales 5' y 3' del ARN viral, durante el proceso de transcripción reversa, y cumplen funciones esenciales en la replicación, integración y transcripción viral.

Gen *gag*: Representa las secuencias para la proteína mayor del core viral, la p24, la p12 o proteína de la nucleocápside y la p15 o proteína de la matriz viral.

Gen *pol*: El producto de éste gen es una proteína de 95 kDa, que incluye a la transcriptasa reversa (70 kDa) y una endonucleasa (30 kDa).

Gen *env*: Codifica para las proteínas de superficie, la gp51 (glicoproteína de superficie) y la gp30 (glicoproteína de transmembrana). La secuencia de la proteína de transmembrana está fuertemente conservada entre retrovirus relacionados no así la glicoproteína de superficie, la cual es determinante de especie.

Gen *pXBL*: Esta región genómica la comparten sólo con los HTLV I y II y es única entre los retrovirus. Contiene al menos 4 genes, entre ellos los genes *tax* y *rex*, los cuales, respectivamente, están involucrados en la regulación transcripcional y post-transcripcional de la replicación viral y alteración de la respuesta celular hacia factores que regulan la proliferación celular. (Rosen et al., 1985; Haas et al., 1992; Schwartz et al., 1994^a).

Fueron identificados además otros dos genes, *R3* y *G4*, cuyas funciones se desconocen. Sin embargo parecieran tener funciones importantes, ya que su delección restringe la propagación viral "in vivo" y específicamente *G4* exhibe un potencial poder oncogénico en estudios realizados "in vitro" (Kerkhofs et al., 1998).

En bovinos está bien documentado el tropismo del virus hacia los linfocitos B,

considerada la célula blanco primaria y más importante (Aida et al., 1989) en cuanto a proporción de células con genomas integrados, y dentro de ellas los subtipos CD5(+) y CD5(-), en proporciones que varían con el estado de la infección (Meirom et al., 1997).

También se ha demostrado la presencia de provirus en células T CD8(+), monocitos, granulocitos, pero no en células T CD4(+), también con amplias diferencias de acuerdo a la etapa de la enfermedad (Schwartz et al., 1994^b).

El VLB está principalmente asociado con células CD5(+) en vacas con LP, mientras que en animales infectados, pero hematológicamente normales, se puede detectar presencia de provirus tanto en células CD5(+) como CD5(-) (Schwartz et al., 1994^b; Mirsky et al., 1996; Meirom et al., 1997).

En su trabajo sobre prevalencia de provirus VLB, en células mononucleares de sangre periférica, Mirsky et al. (1996) encontraron que el porcentaje de células CD5(+) y CD5(-) con provirus, estaba fuertemente correlacionado entre animales sin LP, pero no así entre animales con LP. Entre los animales sin LP, los valores medios de células CD5(+) y CD5(-) conteniendo el provirus fue de 9,2% (+/- 19%) y 0,9% (+/- 1,8%) respectivamente. Entre animales con LP, 66% (+/- 6,6%) de células CD5(+) poseían provirus mientras que sólo 13,9% (+/- 6,6%) de células CD5(-). Células conteniendo el provirus llegan a 46-65% y 0-18% del total de células B en vacas positivas a VLB con y sin LP, respectivamente.

Por otro lado Orlik y Splitter (1996) demostraron que la proliferación de células T CD4(+) hacia proteínas *gag* y *env* era menor en animales con LP y linfosarcomas que en animales aleucémicos. A su vez la proporción de linfocitos con el provirus en animales con LP era de 33-77%, mientras que menos de 1% en animales infectados pero aleucémicos.

Reacción en cadena de la polimerasa

RCP es una técnica por medio de la cual son amplificadas secuencias específicas de un ADN o cADN blanco mediante un proceso de ciclado que comprende tres etapas.

1. Desnaturalización del ADN blanco
2. Anillado de cebadores.
3. Extensión de cebadores.

Durante la desnaturalización, a 92°C-95°C, las dos cadenas de ADN blanco se separan, permitiendo a los cebadores hibridizar o anillar a sus secuencias complementarias, cuando la temperatura se baja a 37°C-60°C, de tal manera que una ADN polimerasa termoestable, a 72°C, produzca cadenas complementarias a la porción de ADN blanco definido por los cebadores. Si éste proceso es repetido 30-40 veces, se produce una acumulación exponencial de copias de ADN y así la secuencia de ADN blanco de origen, es amplificado millones de veces.

Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos cuya secuencia es complementaria al extremo izquierdo de una de las cadenas o al extremo derecho de la otra del fragmento genómico que se ha de amplificar. Los cebadores seleccionados no deben estar separados entre si por mas de 600 bases ya que la eficiencia de la RCP disminuye cuando la longitud del fragmento que se ha de amplificar aumenta.

En resumen los componentes básicos de una RCP son: los cebadores, deoxinucleótidos (dNTPs), un buffer que contiene cloruro de magnesio, una ADN polimerasa termoestable y ADN blanco. La concentración de los componentes y los parámetros de duración y temperatura de ciclado deben ajustarse para la amplificación de cada ADN.

El producto de la prueba RCP generalmente se detecta como una banda en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Su tamaño, comparado con los pesos moleculares de referencia, corresponde a la longitud de la secuencia de ADN blanco definido por los cebadores. La identidad del producto amplificado puede ser confirmado

por hibridación con una sonda marcada, cuya secuencia es complementaria a una zona de dicho producto amplificado, por medio de técnicas de dot blot o Southern blot. Otra alternativa posible consiste en la captura específica del amplificado por una fase sólida, donde se ha unido covalentemente una sonda de captura, seguido de una detección colorimétrica.

Esta poderosa técnica ha revolucionado la detección de patógenos virales, tal es el caso de retrovirus como HIV, HTLV y citomegalovirus, ya que es capaz de amplificar secuencias génicas raras o copias únicas. Brinda además la ventaja de poder ser utilizada asociada con otras técnicas como ELISA e hibridación *in-situ*.

Esta técnica fue desarrollada, por varios investigadores en el mundo, para la detección de animales infectados con el VLB, si bien en la mayoría de los casos se trabajó sobre animales infectados experimentalmente o fue evaluada sobre ciertas etapas de la infección viral (LP y/o linfosarcomas) (Rasmussen et al., 1991; Naif et al., 1992; Hass et al., 1992; Willems et al., 1993; Schwartz et al., 1994^a; Mirsky et al., 1996; Orlik, O. y Splitter, G.A., 1996; Xie et al., 1997).

Analizando los resultados, específicamente de los trabajos de Rasmussen, Naif y Xie, quienes utilizaron RCP como estrategia de diagnóstico, en todos los casos utilizaron o bien animales infectados experimentalmente con VLB o animales en estadios bien definidos de la enfermedad, que en realidad no son la mayoría de los animales infectados en condiciones de campo.

Rasmussen et al., (1991) justifican la implementación de esta técnica para la detección de VLB en tumores linfoides o bien identificación de animales positivos a VLB, en rebaños seropositivos al final de programas de erradicación de la enfermedad o para documentar libres de infección animales con tumores linfoides. Evidentemente ésta no es nuestra realidad, estamos mas bien en los albores del plan de control de LEB y con valores de prevalencia

muy altos, en rebaños principalmente lecheros.

La defensa que hacen Naif et al., (1992) de su propuesta es interesante y pone de manifiesto las bondades de RCP y mas aún asociada con una técnica colorimétrica en la identificación de los productos amplificados.

IDGA es la prueba diagnóstica universalmente utilizada y que apoyó planes de control y erradicación de LEB en todo el mundo. Esta prueba es simple en su realización y de bajo costo, sin embargo tiene algunas desventajas, una sensibilidad un poco inferior a otras técnicas y los anticuerpos no se pueden detectar en todos los casos antes de las 8 semanas o aún varios meses post-infección.

El otro método de diagnóstico utilizado ampliamente es ELISA, el cual con la incorporación de anticuerpos monoclonales anti-gp51 se muestra muy sensible, altamente específico, veraz y fácil de realizar, sin embargo en un estudio reciente comparando cuatro "kits" de ELISA comerciales, para la detección de anticuerpos anti VLB en leche, Eloit et al. (citado por Naif et al., 1992), demostraron falsos negativos en algunos rebaños, aún con "kits" de última generación.

RCP asociado a ELISA identificó el 50% de los animales infectados con VLB, 1 semana post-infección y el 100% a las dos semanas y la cantidad de producto amplificado que detectó el ELISA fue de 0,1-0,2 ng, lo que es aproximadamente 10 veces menor que lo detectado en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Este nivel de determinación es intermedio entre lo que identifican geles teñidos y sondas radioactivas, pero ELISA evita el uso de esos métodos y el manipuleo de material radioactivo y es además un método más rápido que las técnicas de hibridación.

De cualquier manera los autores son conscientes que es improbable que RCP reemplace a IDGA para monitoreos generales de ganado bovino frente a infecciones con VLB.

De acuerdo al trabajo de Xie et al. (1997) RCP asociado a hibridación "in-situ", utilizando sondas de ADN biotinizadas,

se presenta como muy sensible y capaz de detectar células infectadas con prácticamente un solo provirus VLB, lo que es imposible por otras técnicas inmunohistoquímicas y aún técnicas de hibridación.

Otra serie de trabajos evaluaron RCP en condiciones de campo (Eaves et al., 1994; Fechner et al., 1996^a; Fechner et al., 1996^b).

Eaves et al. (1994) utilizaron RCP en un rebaño de 166 animales con un 30% de seroprevalencia a VLB y en un rebaño de 194 animales libres de la infección. Utilizando una RCP, simple amplificación, detectaron infección con VLB en 61 de 72 animales seropositivos a IDGA, y en una vaca con repetidos IDGA negativos. Analizando nuevamente los 9 animales negativos a la RCP, usando una RCP, doble amplificación, detectaron provirus en 8 de los 9 animales. También fueron capaces con la RCP distinguir terneros infectados a VLB de no infectados y seropositivos debido a la presencia de anticuerpos calostrales.

Fechner et al. (1996^a), plantean que la dificultad del uso de RCP como técnica de diagnóstico de rutina se debe al aislamiento y purificación del cADN viral. Compararon el uso de cADN no purificado con cADN altamente purificado en RCP para diagnóstico de infección con VLB, a partir de 15 bovinos caracterizados serológicamente.

Con ambos métodos los animales fueron identificados correctamente, de tal manera que la utilización de cADN no purificado, para amplificar secuencias específicas de VLB por RCP, puede ser una buena alternativa para el diagnóstico de rutina en la identificación de bovinos infectados.

Fechner et al. (1996^b) compararon pruebas serológicas con RCP concluyendo que RCP fue definitivamente el método más sensible y el que dio el más alto número de resultados positivos (10% más comparado con ELISA y 17,7% más comparado con IDGA). En rebaños con prevalencia por debajo del 5%, de 51 animales positivos a BLV por RCP, solo 43 fueron captados correctamente por ELISA y 37 por IDGA.

CONCLUSIONES

1. RCP se muestra como la técnica diagnóstica más sensible para detectar bovinos positivos a provirus VLB, pero con la desventaja de ser una técnica costosa y de requerir laboratorios con infraestructura y equipamientos adecuados para realizarla, como para pronosticar que se implementará como técnica de rutina en el diagnóstico etiológico de VLB, por lo menos para nuestra situación epidemiológica con respecto a ésta enfermedad. En nuestro país, a pesar de existir un plan nacional de control de LEB, las tasas de seroprevalencia son altas, especialmente en rodeos lecheros. Tal situación requiere en primera instancia técnicas de diagnóstico serológico más económicas, sencillas, capaces de ser realizadas en laboratorios con mínima infraestructura, en detrimento de menor sensibilidad. Cuando en Argentina se reduzcan los valores de seroprevalencia al 1% o menores, tal cual es la situación de países europeos, desde donde parten la mayoría de los desarrollos de distintas estrategias de RCP para detección de infecciones con VLB, se justificaría la implementación, en casos puntuales.

2. Del análisis de los distintos protocolos de RCP utilizados en los trabajos consultados surge que:

El cADN viral a amplificar lo obtienen a partir de linfocitos ya sea de sangre entera por el método de Ficoll-Paque, o bien de linfosarcomas.

Con respecto a la cantidad de dNTPs, la mayoría usó concentraciones de 200µM, uno, la mitad (100µM) y dos, 4 a 5 veces más (08mM y 1 mM).

Como ADN polimerasa, en todos los casos, se utilizó la *Taq* polimerasa en cantidades que variaron de 1 U hasta 25 U.

Los cebadores utilizados variaron en los distintos protocolos, incluyendo cebadores que reconocen secuencias génicas de las regiones LTR, *tax*, *pxBL*, *pol/env*. Fechner y col. (1996) encontró una mayor sensibilidad del método, usando cebadores que amplifican secuencias del gen *env* que usando cebadores

que reconozcan secuencias del gen *tax* si bien, *tax/rex*. incluidos en el segmento pX, son únicos en VLB y solo lo comparte con HTLV I y II humanos.

La temperatura y tiempo de desnaturalización varió, de 91°C a 99°C, durante 40" a 2', la de anillado de 55°C a 71°C, durante 1' a 4' y la de extensión en todos los casos se mantuvo en 72°C con tiempos que variaron de 1' a 2'.

La cantidad de ciclos varió entre 30 y 36 ciclos.

En cuanto al revelado de los productos amplificados, en la mayoría de los casos, utilizaron electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, técnicas de hibridación con sondas por lo general no radioactivas, en un caso se implementó un ELISA y en otro hibridación *in situ* con una sonda biotinizada.

3. La posibilidad que se perfila interesante es RCP asociado a ELISA lo que evitaría el manejo de geles y/o técnicas de hibridación, haciéndola así adaptable a laboratorios de mediana complejidad. También RCP asociado a hibridación "*in-situ*" con sondas no radioactivas se perfila

como viable, aunque en éste caso implica la preparación de muestras congeladas y/o embebidas en parafina y además hay divergencia en cuanto a las bondades de éste método cómo técnica diagnóstica.

4. Son inquietantes los resultados de Mirsky et al. (1996), en cuanto a la cantidad de células B con provirus, 46 a 65% en animales positivos con LP y 0 a 18% en animales sin LP. Recordemos que en condiciones naturales, aproximadamente un 30% de los animales infectados cursan con LP, menos del 5% con linfosarcomas y el resto de los animales infectados son aleucémicos.

5. El desarrollo de una técnica de RCP para el diagnóstico de VLB debería incluir la utilización de cADN no purificado y evitar el manejo de geles y técnicas de hibridación, por lo cual es interesante la posibilidad de la utilización de un ELISA como herramienta detectora de los amplificados, de tal manera de adaptarla a condiciones menos exigente, reducir costos, si se pretende utilizarla cómo técnica diagnóstica de rutina acompañando a los planes de control y erradicación de LEB.

BIBLIOGRAFÍA

AIDA, Y.; MIYASAKA, M.; OKADA, K.; ONUMA, M.; KOGURE, S.; SUZUKI, M.; MINOPRIO, P.; LEVY, D.; IKAWA, Y. -1989- Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. *Am.J.Vet.Res.* 50(11): 1946-1951.

EAVES, F.W.; MOLLOY, J.B.; DINMOCH, C.K.; EAVES, L.E. -1994- A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet.Microb.* 39(3-4): 313-321.

ESTEBAN, E.N. -1987- Leucosis Bovina. *A.Microb. y Enf. Infec.* 6: 76-88 R.Arg.

FECHNER, H.; KURG, A.; BLANKENSTEIN, P.; MEWES, G.; GRUE, L.; ALBRECHT, C.; EBNER, D. -1996- Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Berl Munch Tierarztl Wechensehr* 100(11-12): 446-450.

FECHNER, H.; KURG, A.; GEUE, L.; BLANKESTEIN, P.; MEWES, G.; EBNER, D.; BEIER, D. -1996- Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed(B)* 43(10): 621-630.

HAAS, L.; DIVERS, T.; CASET, J.W. -1992- Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J.Virol.* 66 (10): 6223-6225.

KERKHOFS, P.; HEREMANS, H.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. -1998- In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J.Virol.* 72(3): 2554-2559.

MEIROM, R.; MOSS, S.; BRENNER, J. -1997- Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Vet.Immunol.Immunopath.* 59(1-2): 113-119.

MIRSKY, M.L.; OLMSTEAD, C.A.; DA, L.; LEWIS, H.A. -1996- The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stage of infection. *J.Virol.* 70(4): 2178-2183.

MURPHY, F; FIELAS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S.E. -1995- *Fields Virology*. 3ra. Ed. Lippincott-Raven Pu. Philadelphia. NY. p.15-58.

NAIF, H.M.; DANIEL, R.C.; COUGLE, W.G.; LAVIN, M.F. -1992- Early detection of bovine leukemia virus by using an Enzyme-Linked Assay for Polymerase Chain Reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J.Clinic.Microbiol.* 30(3): 675-679.

ORLIK, O.; SPLITTER, G.A. -1996- Progression to persistent lymphocytosis and tumor development in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4+ cells in response to gag and env encoded BLV proteins. *J.Virol.* 70(11): 7584-7593.

RASMUSSEN, H.B.; HOFF-JORGENSEN, R.; CLAUSEN, J.; CHRISTENSEN, L.S. -1991- PCR detection of bovine leukemia virus in lymphoid tumors. *BFE* 8(9): 517-519.

ROBERTS, D.M.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G.; WESTCOTT, D. -1989- Response for cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukemia virus. *Vet.Rec.* 122(13): 293-296.

ROSEN, C.A.; SADROSKI, J.G.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; HASELTINE, W.A. -1985- Transactivation of the bovine leukemia virus long terminal repeat in BLV-infected cell genome. *Gene* 26: 1-10.

SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; OSHISHI, K.; OGAWA, Y.; IKAWA, Y. -1985- Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82: 677-681.

SCHWARTZ, I.; BENSALD, A.; POLACK, R.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. -1994- In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J.Virol.* 68(7): 4589-4596.

SCHWARTZ, I.; COSTA, B DE; RHUN, D.; LAINE, V.; GUILLEMET, M.; LEVY, D. -1994- Mechanism of oncogenesis induced by bovine leukaemia virus; rol of the Tax protein. *Ieres.recontres autour des recherches sur les ruminants*: 81-84.

WILLEMS, L.; THIENPONT, E.; KERKHOPS, P.; RURNY, A.; MAMMERICKX, M.; KETTMANN, R. -1993- Bovine Leukemia virus, an animal model for the study of intrstrain variability. *J.Virol.* 67(2): 1086-1089.

XIE, B.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, H.; OYAMANDA, T.; YOSHIKAWA, T. -1997- Detection of proviral DNA of bovine leukaemia virus in cattle by a combination of in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J.Com.Path.* 116: 87-96.