

## **INFORME APROBACION TESIS MAGISTER**

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

**Nicolás María José Álvarez Rubianes**

**Leucosis Enzoótica Bovina: Estudio seroepidemiológico en rebaños de cría de la provincia de La Pampa – Argentina.**

Ha sido aprobada por el Comité de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias, con mención en Medicina Veterinaria Preventiva.

### **PREFESOR PATROCINANTE**

**Prof. Dr. Gustavo Montes O.**

---

### **PROFESORES CONSEJEROS**

**Prof. Dra. María Orfelía Celedón V.**

---

**Prof. Dr. Pedro Abalos P.**

---

**Fecha aprobación de Tesis:**

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

La presente Tesis fue financiada por la Universidad Nacional de La Pampa a través de La Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias: Proyecto de investigación Resolución N° 041-98 del H.C.D.

El trabajo en terreno, de recolección de muestras, fue realizado en los distintos predios privados, con el aval y colaboración del personal de la delegación del SENASA de General Pico, provincia de la Pampa – Argentina.

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

## BIOGRAFIA

Nacido en Villagarcía de Arosa, España, el 29 de mayo de 1950. Estudios primarios en la Escuela N° 57 y secundario en el Colegio Nacional República de El Salvador de General Pico, provincia de La Pampa – Argentina.

Ingresa como alumno regular a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa en 1977 y egresa en 1981. Obtiene el título de Médico Veterinario en julio de 1982.

Desde julio 1982 a marzo de 1983, ejerce la profesión libre.

En marzo de 1983 ingresa al cuerpo técnico profesional del Laboratorio Rosenbusch SA., hasta diciembre de 1993. En setiembre de 1988 es designado por dicho laboratorio para realizar un proyecto de investigación sobre anticuerpos monoclonales contra Distemper canino, en el Veterinary Medical Research Institute de la Universidad de Iowa, EE.UU., hasta abril de 1989.

En marzo de 1994 ingresa, como docente, a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam., primero como ayudante jornada completa y actualmente como Profesor adjunto en las cátedras Microbiología General e Inmunología Básica y Microbiología Especial y Virología.

En marzo de 1996, ingresa al Programa de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la U. de Chile, como estudiante del Magister en Ciencias Veterinarias con mención en Medicina Veterinaria Preventiva.

## DEDICATORIA

A mi madre, a mi padre  
que me sigue guiando desde el cielo.  
A mi esposa Mercedes, y a mis hijos Pilar y Nicolás,  
motivo de mi esfuerzo y dedicación,  
como legado a esta altura de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Dr. Gustavo Montes O. por su apoyo constante y su ayuda en todos los momentos en que lo necesité.

Al Prof. Dr. José Pokniak R. por su ocupación y preocupación, y por sus palabras de aliento e interés en la finalización de la Tesis.

A los Prof. Dra. María Orfelía Celedón V. y Dr. Pedro Abalos, correctores de la Tesis, por su voluntad en la lectura crítica de la misma y por sus sensatas sugerencias.

Al Prof. Dr. Eduardo Esteban de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UN. del Centro de Argentina, por su colaboración desinteresada en la realización de las pruebas de ELISA.

A las autoridades de SENASA por la colaboración institucional y operativa y en especial a los Drs. Alberto Luis Fuertes y Luis Carne, que oficiaron de intermediarios para el aval del citado organismo al trabajo realizado.

A las autoridades académicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. por brindarme el apoyo institucional y económico que hizo posible la realización del Magister.

A la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. por constituirse en el apoyo financiero del trabajo de Tesis.

Al grupo docente de las cátedras de Microbiología General y Especial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. por suplantar mis ausencias.

Al Sr. Cirilo Urioste, paratécnico de Senasa, delegación General Pico, por su inestimable colaboración, posibilitando la entrada a los predios y extracción de las muestras.

## INDICES DE CONTENIDOS

	Pagina
Informe de Aprobación	3
Fuentes de financiamiento	4
Biografía	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Indice de Contenidos	8
Indice de Ayudas Ilustrativas	11
<b>Resumen</b>	13
<b>Summary</b>	14
<b>1. Introducción</b>	15
<b>2. Revisión Bibliográfica</b>	19
2.1. Agente etiológico	19
2.2. Replicación viral	21
2.3. Patogenia	22
2.4. Epidemiología descriptiva	27
2.5. Factores de riesgo asociados con la transmisión del VLB	30
2.5.1. Fluidos corporales	30
2.5.2. Factores iatrogénicos	32
2.5.3. Portadores de VLB con linfocitosis persistente	33
2.5.4. Insectos y artrópodos	34
2.5.5. Factores genéticos	34
2.5.6. Especies animales	35
2.6. Pruebas diagnósticas	35
2.6.1. Inmunodifusión en gel de agar - IDGA	35
2.6.2. Radioinmunoensayo - RIE	36

2.6.3. Ensayo inmunoenzimático - ELISA	37
2.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	37
2.6.5. Diagnóstico directo	38
2.7. Control de la infección con el VLB	38
2.7.1. Diagnóstico de animales infectados	38
2.7.2. Acciones correctivas	39
2.7.3. Separación y acciones correctivas	40
2.7.4. Acciones correctivas sin separación	40
2.7.5. Exportación e importación	40
2.8. Vacunas	40
<b>3. Objetivos</b>	<b>42</b>
3.1. Objetivo general	42
3.2. Objetivos específicos	42
<b>4. Hipótesis</b>	<b>43</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>44</b>
5.1. Modelo biológico	44
5.1.1. Definición de las unidades de observación	44
5.2. Diseño de la muestra	44
5.3. Muestreo	47
5.4. Prueba inmunodifusión en gel de agar (IDGA)	48
<b>6. Resultados</b>	<b>49</b>
6.1. Características de los rebaños muestreados	49
6.2. Características de las unidades de observación	50
6.3. Prueba IDGA	52
6.3.1. Seroprevalencia a LEB	52
<b>7. Discusión de Resultados</b>	<b>55</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>58</b>
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>59</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>60</b>

<b>11. Material complementario</b>	<b>72</b>
11.1 Anexo I. Ubicación geográfica y características del área donde se realizó el estudio	72
11.2. Anexo II.	76
11.2.A. Tamaño de muestra mínima para estimar prevalencia con un grado de precisión especificado	76
11.2.B. Prueba de inmunodifusión	77
11.2.B.1. Inmunodifusión doble en gel de agar (IDGA)	77
11.2.B.2. IDGA-Leucosis Bovina (Instrucciones del fabricante)	78
11.3. Anexo III. Planilla de sangrado	81
11.4. Anexo IV. Informe epizootiológico	85
11.5. Anexo V. Planilla resultados prueba IDGA	89
11.6. Anexo VI.	90
11.6. Tabla A.	90
11.6. Tabla B	91
11.6. Tabla C	92
11.7. Anexo VII. Fotografías	93



## INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

		Página
<b>TABLAS</b>		
Tabla 1	Distribución de predios y vacas de cría, según tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	45
Tabla 2	Predios y vacas de cría muestreados, según tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	46
Tabla 3	Distribución por razas de vacas muestreadas, en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có. La Pampa – ARGENTINA	51
Tabla 4	Distribución por edades de vacas muestreadas, en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	51
Tabla 5	Resultados Prueba IDGA-LEB, de sueros de vacas de 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	52
<b>FIGURAS</b>		
Figura 1	Número de predios existentes, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	45
Figura 2	Número de vacas de cría existentes, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA	45
Figura 3	Número de predios muestreados, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	47
Figura 4	Número de vacas de cría muestreadas, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	47
Figuras 5, 6 y 7	Distribución de rebaños, según características de los mismos en cuanto a condiciones de manejo, reproductivas y alimenticias	50

Figura 8	Distribución por razas de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	51
Figura 9	Distribución por edades o número de parto de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA	51
Figura 10	Provincia de La Pampa en el contexto de la República Argentina	72
Figura 11	Gradiente de productividad agropecuaria	73
Figura 12	Esquema del sacabocados	80
Figuras 13, 14 y 15	Interpretación de resultados prueba IDGA_LEB	80

### **FOTOGRAFIAS**

Fotografía 1	Prueba IDGA-LEB. Observación de bandas de precipitación correspondientes a sueros controles positivo, débil positivo y negativo	93
Fotografía 2	Prueba IDGA-LEB. Bandas de precipitación correspondientes a suero control positivo y sueros problema de reacción positiva	93

## RESUMEN

La infección por el virus de la leucosis bovina (VLB) es pandémica y si bien la seroprevalencia en rebaños lecheros, es tema de innumerables trabajos, ello no ocurre en rebaños productores de carne. Ante la inminente implementación en Argentina del Plan Nacional de Control y Erradicación de la leucosis enzoótica bovina, acompañando a otros planes en vigencia, es necesario conocer sobre que parámetros se trabajará, cual es la prevalencia de infección y cuales los factores de riesgo asociados a nuestras condiciones de manejo y sistemas de producción.

Se analizó la presencia y magnitud de la leucosis enzoótica bovina en 1798 muestras de suero de vacas pertenecientes a 30 rebaños de cría, estratificados en categorías de acuerdo al tamaño de los mismos y distribuidos en el departamento Mará-Có, de la provincia de La Pampa – Argentina. Los sueros fueron evaluados por la presencia de anticuerpos anti-VLB, utilizando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y la totalidad de las muestras de sueros de los rebaños, en donde se evidenció al menos un animal positivo, se corroboraron utilizando una prueba ELISA.

A efectos de evaluar factores de riesgo asociados con la transmisión del VLB, y teniendo en cuenta las condiciones de manejo y sistemas de producción regionales, se requirió en cada predio contestar un cuestionario referente a tamaño y características del rebaño y variables de manejo, reproductivas, alimenticias y sanitarias

Se detectaron en 3 de los 30 rebaños analizados, un animal positivo en cada uno de ellos, resultando una prevalencia predial del 10% y una poblacional del 0,17%. Los rebaños clasificados como positivos, corresponde a la categoría de pequeños, lo que lleva implícito características de los mismos, que podrían constituirse en factores de riesgo de esta enfermedad.

Se sientan las bases para profundizar en estudios de este tipo en otras regiones de la provincia de La Pampa y del resto del país, haciendo especial énfasis en la valoración de rebaños de pequeños productores, por las características particulares en cuanto a la comercialización y constitución de los mismos.

## SUMMARY

Bovine leukosis virus (BLV) infection is pandemic in cattle and there are many seroprevalence studies in dairy herds, but not in beef cattle. A National Program of Control and Eradication of bovine leukosis is ready to start in Argentina, therefore it is necessary to know what is the prevalence of infection and what are the risk factors associated with the management and production systems.

The presence of the bovine leukosis was analyzed in 1798 serum samples from 30 beef herds, in the Mará-Có department of La Pampa–Argentina. The samples were tested for the presence of BLV antibodies by agar-gel immunodiffusion, and the samples coming from the herds, where there was at least one positive cow, were all retested by ELISA.

In order to evaluate BLV transmission risk factors associated to local conditions of management and production systems, a questionnaire including aspects on herd's size, breeding, alimentary and sanitary status was carried out in each farm

In 3 of the 30 herds studied, there was one positive cow in each one of them. This means 10% of predial and 0,17% poblacional prevalences. The positive herds belong to the small ones sampled, with particular characteristics, that could become in risk factors of the disease.

This work could be a precedent to carry out assays of this kind in another regions of La Pampa and to other provinces of the country, making a special emphasis on the evaluation of small herds.

## 1. INTRODUCCION

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es un cáncer linfoideo de ocurrencia natural en el ganado bovino, causado por un retrovirus exógeno Tipo C, denominado virus de la leucosis bovina (VLB). Taxonómicamente ubicado en la Familia *Retroviridae*, género BLV-HTLV (Murphy et al., 1995).

La infección por VLB es pandémica y la prevalencia, en rebaños principalmente lecheros, puede alcanzar valores de 60-90% (Johnson y Kaneene, 1992). Dada las características particulares del VLB, un animal infectado por dicho virus, lo será de por vida.

La primera descripción de leucosis en bovinos aparece en la literatura alemana en 1871, por lo que Europa es considerada la zona geográfica de origen del VLB. Probablemente ganado europeo infectado con VLB fue importado por Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.) a fines del siglo XIX. El primer reporte de LEB en ese país apareció previo a la segunda guerra mundial y la infección se extendió al ganado americano y canadiense. Actualmente muchos rebaños lecheros en esos países tienen altos valores de prevalencia de infección (Johnson y Kaneene, 1992). Posterior a la segunda guerra mundial, se producen cambios en la dirección de importación-exportación de bovinos y se argumenta que animales infectados con VLB de EE.UU. y Canadá, han contribuido a la diseminación de la enfermedad a bovinos de otros países de Europa y América del Sur (Johnson y Kaneene, 1992).

Si bien la infección con VLB, en la mayoría de los bovinos no está asociada con signos clínicos de la enfermedad, el 30% de los animales infectados pueden desarrollar una linfocitosis persistente, considerada una manifestación benigna, y sólo el 5% o menos desarrollarán linfosarcomas. Esta

es una enfermedad de importancia económica debido a la pérdida de mercados que requieren la condición de animales libres de dicha enfermedad, los costos que implican las técnicas de diagnóstico, la eliminación prematura o muerte de animales particularmente de raza de alto valor genético y el descarte de reses o carcazas en matadero, como así también la menor producción de leche y carne de los rodeos infectados (D'Angelino et al., 1998).

Debido a la alta prevalencia, los costos prohibitivos de cualquier forma de terapia de linfomas en bovinos y la poca perspectiva de lograr vacunas eficientes, el énfasis de los estudios epidemiológicos se ha puesto en conocer la forma de transmisión del VLB y los factores de riesgo asociados a la infección, como también en el desarrollo de programas de control para prevenir la transmisión del agente, minimizar las pérdidas económicas asociadas y lograr finalmente rebaños libres de infección con VLB (Johnson y Kaneene, 1992).

Muchos países de Europa Occidental, desde hace años vienen desarrollando programas de erradicación con muy buenos resultados.

El primero de ellos fue implementado en Dinamarca en 1959 y actualmente solo 0,006% de 149.300 bovinos sacrificados en mataderos y controlados serológicamente al azar fueron positivos desde 1982 a 1985 (Johnson y Kaneene, 1992).

En la República Federal Alemana, se implementó en 1964 un programa similar al Danés y menos del 0,5% de todos los rebaños y 0,05% de todos los bovinos evaluados fueron positivos en 1983 (Johnson y Kaneene, 1992).

Francia inició en 1987 una campaña nacional contra LEB. El porcentaje de muestras positivas decreció de 4,3% en 1987 al 2,9% en 1988 y al 1,6% en 1989 (Caudert et al., 1990).

En Suecia comenzó en 1989 un programa voluntario de erradicación de LEB el cual prácticamente ha finalizado con éxito ya que 29.414 (87%) de 33.682 rebaños lecheros y de carne fueron declarados libres en 1996 (Forschell, 1996).

En América del Sur varios países tienen diagramados programas de control y erradicación de LEB, conscientes de la barrera para-arancelaria que significará ésta enfermedad en el futuro inmediato. Entre ellos se destacan Argentina y Chile por el grado de avance de los mismos.

En Chile, la LEB fue descrita clínicamente por primera vez por Schulz en 1962 en las provincias de Talca y Los Angeles (VII y VIII Región). Actualmente se reconoce que está ampliamente distribuida desde la Región III a la XII, con zonas endémicas en la Región VIII, lo que generó por parte del Servicio Agrícola y Ganadero-Ministerio de Agricultura (SAG) la implementación de un Plan Nacional de Control de la LEB, desde el año 1983, de carácter voluntario y en el cual participan mas de 1470 predios, de los cuales 976 han sido declarados libres (Vega, 1997).

El SAG ha realizado estudios serológicos que dieron como resultados 27,2%, 7,2%, y 4,9% de prevalencia de infección a VLB en las Regiones VII, IX y X respectivamente (Naranjo et al., 1992). Además se han realizado varios estudios en los cuales se ha relacionado el estado de infección a VLB con parámetros productivos y reproducidos, verificándose resultados dispares, aunque en sentido estricto no pareciera existir una correlación positiva entre dichos parámetros y el estado de infección a VLB (Reinhardt et al., 1988; Villouta et al., 1992; Villouta et al., 1994; Donoso, 1996; Riquelme, 1997).

En Argentina no existe un relevamiento real de prevalencia de la enfermedad, aunque se conocen valores puntuales en rebaños lecheros que

arrojan cifras bastante alarmantes. Poco se ha estudiado en cuanto a rebaños de carne, tanto en Argentina como en el resto del mundo.

En Argentina durante el periodo 1989-1993 se evaluaron 9.114 bovinos lecheros de raza Holando Argentino y 5.519 bovinos de razas productoras de carne, usando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), obteniéndose un 9,3 y 1,8% respectivamente de animales positivos a VLB (Huici et al., 1996 y 1997).

En la zona denominada “Mar y Sierra”, de la provincia de Buenos Aires-Argentina, área de producción lechera que comprende unos 300 establecimientos, usando un ELISA indirecto sobre 4.203 muestras de leche de 73 granjas, 23 granjas (31,5%) estaban libres de infección, 36 (49,4%) tenían una prevalencia de infección de hasta 15%, 13 (17,8%) una prevalencia entre 15 y 30% y 1 granja (1,4%) con prevalencia mayor a 30% (Ghezzi et al., 1997).

Por otro lado, en un estudio realizado sobre 798 muestras de sueros provenientes de 41 rebaños de carne del noroeste de la provincia de Río Negro (Patagonia Argentina), todos fueron negativos para la infección con VLB (Layana et al., 1997).

Evidentemente para poner en marcha un programa de control y erradicación, es prioritario conocer sobre que parámetros se trabajará, cual es la prevalencia de infección y cuales los factores de riesgo asociados a nuestras condiciones de manejo y sistemas de producción.

En el presente proyecto se realiza un estudio seroepidemiológico en rebaños productores de carne de una zona de la provincia de La Pampa-Argentina, a efecto de determinar tasas de prevalencia a VLB asociado con evaluación de factores de riesgo de dicha enfermedad.



## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Agente etiológico

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad viral producida por un virus perteneciente a la familia *Retroviridae*, clasificado junto con HTLV-I y II, con los cuales comparte casi el 50% de homología genómica, en el género Retrovirus BLV-HTLV (Murphy et al., 1995).

El virus de la leucosis enzoótica bovina es un virus ARN con la particularidad de poseer dos cadenas lineales idénticas de polaridad positiva y unidas por su extremo 5' conformando la única excepción conocida de un virus con genoma diploide.

La secuencia completa del genoma de VLB integrado es de 8.714-9.000 par de bases (pb) con una configuración estructural 5' *LTR-gag-pol-env-pX(BL)*-3' *LTR* (Sagata et al., 1985).

La secuencia de nucleótidos completa de *LTR* consta de 530 pb (Derse et al., 1985) e incluye 3 regiones U3-R-U5 que derivan de la fusión de secuencias de las terminales 5' y 3' del ARN viral durante la transcripción reversa y cumplen funciones esenciales en la replicación integración y transcripción viral (Rosen et al., 1985; Derse et al., 1985; Derse et al., 1986).

El gen *gag* conforma las secuencias génicas para la p24, proteína mayor del core viral, la p12 o proteína de la nucleocápside y la p15 o proteína de la matriz (Oroszlan et al., 1982).

El gen *pol* codifica para una proteína de 95 kDa e incluye a la transcriptasa reversa (70 kDa) y una endonucleasa (32 kDa) (Sagata et al., 1985).

En el gen *env* los productos lo constituyen la gp51 (glicoproteína de superficie) y la gp30 (proteína de transmembrana) (Devare et al., 1977; Rice et al., 1984; Sagata et al., 1985). 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.

La región *pX(BL)* la comparte solo con HTLV I y II y es única entre el resto de los retrovirus (Sagata et al., 1985). Esta región contiene al menos 4 genes, entre ellos los genes *tax* y *rex* los cuales están involucrados en la regulación transcripcional y postranscripcional 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., 1994b). Fueron identificados además otros dos genes *R3* y *G4* que, si bien sus funciones son aún desconocidas, parecieran ser importantes, ya que su delección restringe la propagación viral "in vivo" y específicamente *G4* exhibió un potencial poder oncogénico en estudios realizados "in vitro" (Kerkhofs et al., 1998).

Con respecto a la célula blanco en bovinos, está bien documentado el tropismo y sin duda los linfocitos B son la célula blanco primaria y más importante (Aida et al., 1989; Heeney et al., 1992) en cuanto a proporción de genomas de VLB integrados y dentro de ellas los subtipos CD5(+) y CD5(-), en proporciones que varían con el estado de la infección (Meirom et al., 1997).

Se ha demostrado además la presencia de provirus en células T CD8(+), monocitos, granulocitos, pero no en células T CD4(+), también con amplias diferencias en proporción, de acuerdo al estado de la enfermedad (Schwartz et al., 1994a).

El VLB está principalmente asociado con células B CD5(+) en vacas con linfocitosis persistente, mientras que en animales infectados, pero hematológicamente normales, se puede detectar presencia de provirus tanto en

células B CD5(+) como CD5(-) (Schwartz et al., 1994a; Mirsky et al., 1996; Meiom et al., 1997).

Existen evidencias que VLB es capaz de infectar y expresar antígeno "in vivo" en células del epitelio glandular de glándula mamaria, esto por un lado tendría importancia en la transmisión de virus libre de células y por otro lado éstos antígenos podrían además estimular la producción de anticuerpos (Buehring et al., 1994; Yoshikawa et al., 1997).

## **2.2. Replicación viral** (Fenner et al., 1993)

Tras la adsorción a la célula huésped, establecida entre la gp51 y receptores celulares específicos, se produce la penetración a la misma por un proceso de endocitosis, permitiendo las enzimas lisosomales la liberación del ARN viral dentro del citoplasma celular.

El ARN viral es copiado a ADN por acción de la transcriptasa reversa que actúa como ADN polimerasa ARN dependiente. La molécula de ARN parenteral es liberada a continuación del híbrido ARN-ADN, por la ribonucleasa H, segunda actividad enzimática de la transcriptasa reversa.

La cadena de ADN(-) naciente, es copiada a ADN doble cadena y ambos extremos flanqueados por secuencias adicionales idénticas de varios cientos de nucleótidos conocidos como *LTR* (Long Terminal Repeat), que incluyen secuencias de ambos extremos del ARN vírico, *U3* del extremo 3', *U5* del extremo 5' y una corta secuencia *R*, presente en ambos extremos del ARN genómico viral. Este ADN doble cadena lineal, es transportado del citoplasma al núcleo donde se hace circular y se integran varias copias en el ADN cromosómico de la célula huésped, en lugares al azar o casi al azar (Onuma et al., 1982). Durante éste proceso de integración se sintetizan cortas repeticiones del ADN celular que se unen a los extremos del provirus (Sagata et al., 1983).

El provirus es una unidad de transcripción completa e independiente ya que las *LTR* contienen promotores que dirigen la iniciación de la transcripción y un potenciador que amplifica la transcripción confiriendo especificidad tisular al virus. Además, puede simplemente permanecer integrado y ser transmitido a las células progenie o puede ser transcrito en mARNs, utilizando la ARN polimerasa II celular, los que se traducen en las distintas proteínas estructurales y no estructurales y asociándose ARN viral de polaridad positiva de a dos, a efecto de formar el genoma diploide de los viriones progenie.

El proceso de maduración de nuevos viriones implica la asociación de la poliproteína *env* con la membrana plasmática y el fraccionamiento de la misma en las glicoproteínas de superficie (gp51 y gp30). Por otra parte la poliproteína *gag* y *gag-pol*, junto con el ARN viral son transportadas a un lugar por debajo de la membrana celular donde las proteínas de la envoltura ya se encuentran presentes, se ensamblan las nucleocápsides mediante una serie de fraccionamientos proteicos y salen de la célula infectada por gemación.

### **2.3. Patogenia** (Albert et al., 1994)

Los oncovirus de la familia *Retroviridae*, así como otros virus oncogénicos, transforman células debido a que la presencia permanente del cADN viral en la célula huésped, causa la síntesis de nuevas proteínas que alteran el control de la división celular.

Los genes que codifican tales proteínas, se llaman oncogenes, y para el caso de los virus ARN, éstos oncogenes son versiones modificadas de genes celulares, que en sí no son requeridos para la replicación viral. Utilizando sondas específicas de ADN, se vio que los genomas de células normales de vertebrados contenían secuencias génicas muy similares, pero no idénticas a los oncogenes virales, de allí que evidentemente el gen había sido levantado

accidentalmente por el retrovirus del genoma de células huésped, producto de su co-evolución, pero en dicho proceso habría sufrido alguna mutación, dando como resultado un gen perturbado en su función que finalmente producía cáncer.

Hay dos maneras por las cuales un protooncogen puede convertirse en un oncogen luego de la incorporación a un retrovirus. La secuencia génica puede estar alterada de tal manera que codifique para proteínas con actividad anormal, o el gen celular puede quedar bajo el control de poderosos promotores y amplificadores del genoma viral, lo que hace que su producto se fabrique en exceso o en circunstancias inapropiadas.

En su proceso de integración al genoma celular, el ADN copia del ARN viral (cADN) puede sencillamente insertarse vecino o aún dentro de un protooncogen, de ésta manera el genoma celular alterado, es heredado por la progenie de la célula huésped originalmente infectada.

Hasta hoy día se conocen mas de 60 *v-onv* (oncogen viral) y sus respectivos *c-onc* (protooncogen) y algunas de las proteínas por ellos codificadas. Hay un grupo de ellas conocidas como *v-myc* que son proteínas fijadoras de ADN y que posiblemente regulen la transcripción; las proteínas de la familia *v-ras*, de localización en membrana plasmática y que regulan la adenil-ciclase; el producto del gen *v-sis* es un factor de crecimiento y el de *erb-B*, también localizado en membrana plasmática, es un receptor de un factor de crecimiento epidérmico y específicamente se parece a la porción del receptor del factor de crecimiento epidérmico portador de la actividad proteín-tirosin-quinasa específica. Aproximadamente la mitad de los oncogenes conocidos codifican proteínas que presentan actividad proteín-tirosin-quinasa o que muestran homología con ésta enzima. Cuando el factor de crecimiento epidérmico se une al receptor externo, se transmite un cambio conformacional a

la región interna de la célula y se activa la tirosin-quinasa, así varias proteínas celulares próximas, son fosforiladas en forma anormal en los restos tirosina en vez de los restos serina o treonina. Esta fosforilación de las proteínas celulares a una mayor velocidad o en un momento inadecuado, puede tener efectos a largo alcance, especialmente si la activación enzimática es permanente. Por ejemplo la fosforilación de proteínas del citoesqueleto celular, situado inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, podría dar lugar a perturbaciones en la estructura celular y en el modo de interacción de una célula con sus vecinas, favoreciendo la falta de inhibición por contacto.

El virus de la LEB es exógeno, no defectivo, de tumorigénesis retardada, no presenta oncogenes y permanece integrado al genoma celular durante toda la vida del animal infectado, o sea no es capaz de producir viriones progenie, por lo menos en cantidades detectables. Por otro lado se sabe que entre los animales infectados con VLB, sólo un 5% o menos, desarrollaran tumores sólidos a células B, un 30% presentaran una linfocitosis persistente como manifestación clínica y en el resto cursará como una enfermedad subclínica (Kettmann et al., 1980; Esteban, 1987; Villouta et al., 1992).

Por medio de estudios de hibridación molecular, utilizando sondas de ADN complementarias al cADN del VLB, no fue posible detectar ARN específico de VLB en linfocitos infectados, por el contrario, si dichos linfocitos eran cultivados "in vitro" por corto tiempo, eran detectables significativas cantidades de ARN viral (Zandomeni et al., 1992). Estos resultados sugieren que "in vivo" el genoma de VLB está reprimido a nivel transcripcional. Se ha caracterizado un factor proteico, presente en el plasma de bovinos infectados con VLB, no perteneciente al grupo de inmunoglobulinas ni interferones, que sería el responsable del bloqueo de la expresión del virus "in vivo". El mecanismo involucrado es desconocido pero se teoriza que éste factor, como el factor de crecimiento epidérmico, reconocería receptores específicos sobre la superficie

celular y luego de la internalización del complejo receptor-factor, podría disociarse y dicho factor podría controlar la expresión viral, interactuando con el genoma celular (Gupta y Ferrer, 1982; Gupta et al., 1984).

Con respecto al poder oncogénico del virus VLB, bueno es recordar que éste virus no posee *v-onc* por lo tanto su potencial oncogénico estaría relacionado con su ubicación al azar, en el proceso de integración genómica, al lado o cerca de un protooncogen celular y así los poderosos promotores y amplificadores virales ubicados en las LTR de su genoma, activarían dichos oncogenes celulares dando como resultado un descontrol en el ámbito de regulación de la multiplicación celular (Kettmann et al., 1982; Gregoire et al., 1984).

Existen otras teorías y evidencias, que no son excluyentes, pues se cree que son varios los factores concomitantes que llevarían a la formación de tumores asociados con VLB.

Estudios sobre posibles componentes genéticos señalan que mutaciones a nivel del gen *p53* tumor-supresor celular estarían relacionadas con la formación de tumores inducidos por VLB (Dequiedt et al., 1995; Ishiguro et al., 1997). Existen además evidencias de que resistencia y susceptibilidad al desarrollo de linfocitosis persistente está relacionado con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad asociados a linfocitos (BoLA). Resistencia a linfocitosis persistente entre animales seropositivos está asociado con BoLA-DA7, mientras que la susceptibilidad está asociada con el antígeno BoLA-DA12.3 (Xu et al., 1993).

También existen evidencias, al igual a lo que ocurre en humanos con leucemia, que en los linfocitos de animales infectados con VLB, existen altos niveles de antígeno nuclear de proliferación celular (ANPC) o Ciclin (C) lo que

jugaría un rol importante en el proceso de transformación linfoidea (Hailata et al., 1995).

Es de destacar además que la respuesta inmune del organismo huésped pareciera ser definitoria del tipo de evolución de la enfermedad. Se observó niveles elevados de Interleuquina-2 (IL-2) e IL-12 tanto en bovinos positivos a VLB, pero aleucémicos, como en bovinos positivos con linfocitosis persistente, mientras que Interferon gamma ( $\gamma$ -IFN) estaba elevado en los animales aleucémicos pero no en bovinos con linfocitosis persistente (Keefe et al., 1997; Trueblood et al., 1998). La IL-12 en animales infectados con VLB puede regular la producción de otras citoquinas como  $\gamma$ -IFN e IL-10 y la progresión de leucosis bovina en animales que desarrollan grados de enfermedad tales como linfocitosis persistente o linfosarcomas (Pyeon et al., 1998). La IL-10 producida por células Th-2, linfocitos B y macrófagos, inhibe la producción de citoquinas por parte de los linfocitos Th-1, e incrementa la proliferación y diferenciación de linfocitos B, dirigiendo la respuesta inmune humoral y restringiendo la respuesta inmune celular (Pyeon et al., 1996). Se ha observado que células mononucleares sanguíneas (monocitos/macrófagos) de animales infectados con el VLB, en estados avanzados de la enfermedad, expresaban cantidades considerablemente mayores de ARN mensajero para IL-10 que animales no infectados o animales infectados pero en estadios no clínicos de la enfermedad, como así también que la producción de citoquinas tipo 1, como IL-2 y  $\gamma$ IFN decrecen con la progresión de la enfermedad (Pyeon et al., 1996). Estos hallazgos sugieren que la IL-10 podría afectar el progreso de la enfermedad en bovinos que desarrollan linfocitosis persistente o linfosarcomas, relacionado con la disminución de la inmunidad celular y preponderancia de la inmunidad humoral (Pyeon et al., 1996).

Así la integridad del sistema inmune sería responsable del curso que tome la enfermedad, la enfermedad clínica estaría contenida mientras se active



el sistema Th-1 (IL-2,  $\gamma$ -IFN) y progresaría hacia la linfocitosis persistente y/o linfosarcoma, cuando el sistema Th-2 (IL-10 entre otras IL) se hace preponderante.

## **2.4 Epidemiología descriptiva** (Johnson y Kaneene, 1992; Digiacomio, 1992b)

En la revisión bibliográfica sobre epidemiología descriptiva de LEB e infección a VLB nos encontramos con una calidad variable de la información suministrada. Existen dos razones para ello: a) son raros los diseños adecuados de estudios epidemiológicos descriptivos tanto del agente como de la enfermedad; b) ni la enfermedad ni el agente son de notificación obligatoria, excepto en unos pocos países (Johnson y Kaneene, 1992). La mayoría de los estudios, ya sean transversales o prospectivos de cohorte, fueron hechos sobre un número pequeño de rebaños bovinos. Las técnicas de muestreo en muchos de los estudios no fueron al azar o no fueron descriptas y en consecuencia no es adecuado hacer inferencias sobre las poblaciones de las que se eligieron los animales. La información más completa de LEB está disponible de países de Europa, miembros de la Comunidad Económica Europea (CEE), muchos de los cuales tienen implementados programas oficiales de erradicación de ésta enfermedad. La información de incidencia de LEB en la mayoría de otros países es incompleta (Johnson y Kaneene, 1992).

Se reportan numerosos estudios seroepidemiológicos, utilizando la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) para determinar la prevalencia de infección a VLB (Lorenz y Straub, 1987). Muchos de éstos estudios también sufren de una inapropiada técnica de muestreo y en consecuencia no son indicativos de los reales valores poblacionales (Johnson y Kaneene, 1992).

Uno de los primeros estudios epidemiológicos descriptivos en el cual no hay evidencia de estimaciones erróneas fue un estudio transversal de infección a VLB en Florida-EE.UU. (Burrige et al., 1981). Seleccionaron 18 rebaños lecheros y 28 rebaños de carne de cuatro regiones geográficas, por muestreo estratificado al azar, donde los distintos estratos fueron tipo de producción (leche-carne), tamaño de rebaño y razas. La prevalencia puntual de anticuerpos determinada por IDGA, para 7.768 bovinos de leche mayores de 18 meses de edad fue de 47,8% y para 4.911 de carne de 6,7%. La prevalencia de anticuerpos estuvo asociada positivamente con la edad en ambos tipos de ganado, aunque fue mayor en el lechero. En cuanto a razas, en este estudio la prevalencia en ganado Jersey excedió al de otras razas lecheras. No hubo asociación de prevalencia con respecto al sexo.

Otro estudio sobre prevalencia de anticuerpos contra VLB fue hecho en Michigan-EE.UU. (Kaneene et al., 1983) sobre ganado lechero usando una combinación de procedimientos; estratificado, cerrado y simple al azar. El estado fue estratificado en distritos agrícolas y por densidad y se seleccionaron muestras proporcionales de rebaños de ganado lechero en cada distrito. Los rebaños de cada distrito fueron estratificados basándose en el tamaño de los mismos y aquellos a ser muestreados fueron seleccionados al azar en cada estrato. En cada rebaño se muestreo un 66% del ganado de 2 años o más y se realizó la prueba IDGA para medir anticuerpos contra VLB. Bovinos de todos los distritos fueron positivos y la prevalencia de anticuerpos contra VLB, ajustada por edad, de 3.132 bovinos de 82 rebaños alcanzó valores entre 24 y 36%. La prevalencia se incrementó significativamente con el incremento de la edad y además fue mayor en rebaños abiertos y no se vio influenciada por el número de casos de LEB ni por el tipo de ganado.

En Canadá, usando la prueba IDGA para VLB, se examinaron sueros de 38.297 bovinos provenientes de 990 (0,48%) de los 206.900 rebaños lecheros

y de carne, existentes en ese país. La prevalencia de anticuerpos por rebaño fue de 40% (N: 116) de 287 rebaños lecheros y 11% (N: 79) de 703 rebaños productores de carne (Samagh y Kellar, 1982).

En Israel se evaluó el 25% de 3.100 bovinos lecheros de 8 rebaños y el 24% fueron positivos, de ellos 50% de 362 vacas adultas en lactación, fueron seropositivas y sólo el 3% de 407 vacas de primera parición. El 31% de terneros provenientes de vacas de primera parición seroconvirtieron 2 meses después de mezclarse con ganado adulto (Brenner et al., 1986).

En países de la CEE, donde hay programas de erradicación de VLB, la prevalencia de anticuerpos no excede 0,5 al 1,0%.

En Taiwan se llevó a cabo un estudio serológico y el 2% de 1.034 muestras fueron positivas encontrándose posteriormente evidencias del origen de tales infecciones en bovinos importados ya que no detectaron seropositivos entre rebaños de bovinos y búfalos que no habían estado en contacto con esos animales introducidos (Wang, 1991).

En trabajos ejecutados por varios autores en distintas regiones del mundo se llevaron a cabo estudios epidemiológicos en rebaños individuales, generalmente lecheros, dando tasas de prevalencia tan altas como 95% (Johnson et al., 1985). En tales casos también se realizaron estudios para investigar factores de riesgo asociados con la transmisión de VLB, tales como tamaño de rebaño, procedimientos de manejo, tipos de producción, raza, edad, número de parición, densidad poblacional e influencias estacionales (Hubner et al., 1997; Oliveira et al., 1997; Sargeant et al., 1997a).

Además de estudios transversales en grandes poblaciones, en donde el punto final fue prevalencia puntual de anticuerpos, se han realizado varios estudios longitudinales, donde el ganado fue estratificado usualmente en 4 o 5

cohortes por edad y se determinaba repetidamente tasas de incidencia y prevalencia entre vacas y terneros (Kaaden et al., 1978).

Las conclusiones generales a las que se puede arribar analizando estos estudios, son que las prevalencias e incidencias son mayores en ganado de 24 meses y más y que no más del 4 al 10% de terneros adquieren la infección en forma prenatal. De allí surge la hipótesis que el inicio de contacto físico íntimo y prácticas intensivas de manejo, asociadas con el incremento de intervención del hombre, lo que se daría entre 1,5 a 2 años de vida, son importantes factores de riesgo en la transmisión horizontal de infección con VLB (Villouta et al., 1994).

## **2.5 Factores de riesgo asociados con la transmisión del VLB**

(Johnson y Kaneene, 1992; Digiacomo, 1992a)

### **2.5.1. Fluidos corporales**

Linfocitos infectados con VLB raramente producen virus libre de células “in vivo” por lo tanto los animales susceptibles se infectan por exposición con linfocitos infectados portadores del provirus y no con virus libres de células. Así una variedad de tejidos bovinos, secreciones y excreciones corporales, poseen linfocitos infectados con VLB y consecuentemente sirven como medio adecuado para la transmisión de VLB. Sangre, saliva, secreciones nasales, lavado broncopulmonar, calostro, leche, orina, heces, semen, fluidos de lavado uterino, embriones, son algunos de los materiales estudiados.

La sangre es el elemento más frecuentemente estudiado y en un experimento (Evermann y col., 1986), en que 10  $\mu$ l (45.240 linfocitos) o 1  $\mu$ l (4.524 linfocitos) de sangre entera de una vaca seropositiva fueron inyectados en grupos de 4 terneros por las siguientes rutas: intramuscular, endovenosa, subcutánea e intradérmica y luego semanalmente se les realizó la prueba

IDGA. Terneros que recibieron 10  $\mu$ l, seroconvirtieron 3 semanas post-infección y aquellos que recibieron 1  $\mu$ l a las 4 semanas post-infección.

En su trabajo, Islas et al. (1996) inocularon terneros de 9 meses, libres de infección VLB, con 100 $\mu$ l de sangre de una vaca seropositiva y anticuerpos contra VLB fueron detectados, por ELISA y por IDGA, 30 días y 60 días pi. respectivamente. Linfocitos de terneros infectados experimentalmente indujeron sincicios 120 días pi., cuando fueron co-cultivados con células renales fetales de cordero.

No se obtuvieron resultados al inyectar aún grandes volúmenes de saliva de animales infectados en animales susceptibles, por lo cual no sería un factor a considerar en la transmisión horizontal de VLB.

La infectividad de leche y calostro ha sido demostrada (Romero et al., 1982) pero no siguiendo la vía de entrada natural, ya que fue inyectada. No logró seroconvertir terneros cuando se administró vía oral. Se especula que los anticuerpos calostrales pueden reducir el riesgo de infección. En un estudio se concluyó que consumir calostro con anticuerpos contra VLB puede reducir la incidencia de infección en un 50% durante los primeros 6 meses de vida (Lassanzet et al., 1989).

El trabajo de Buehring et al. (1994), plantea la necesidad de una revisión en cuanto al potencial poder infectivo de consumo de leche por parte de las crías, a partir de hembras que estén liberando virus VLB el cual se esté replicando activamente en células epiteliales de glándula mamaria.

Aunque los lavados broncopulmonares fueron infectivos, para la transmisión del VLB, no se comprobó que fuera infectivo el contenido de hisopados nasales (Roberts et al., 1982).

Ni orina, ni semen (con una sola excepción), ni heces, han demostrado ser infectivos (Miller y Maaten, 1979). La única excepción con semen estuvo asociada con un procedimiento traumático de recolección, con lo que el semen se contaminó con sangre (Bouillant et al., 1981). Aparentemente la incapacidad del semen en la transmisión de VLB estaría dada por el factor de dilución utilizado o bien porque poseería algún inhibidor del VLB (Schultz et al., 1977).

Aunque se ha demostrado infectividad con fluidos uterinos obtenidos por lavaje, posiblemente también estuvieran contaminados con sangre como consecuencia de injuria traumática (Bouillant et al., 1981).

Con los experimentos comentados precedentemente, lo que se intentó fue demostrar la infectividad de distintos materiales, pero en muchos casos las rutas de inoculación no fueron las naturales con que se encontraría un animal susceptible en condiciones de campo.

Susceptibilidad de infección fue confirmada vía intradérmica, intramuscular, endovenosa, intraperitoneal, intranasal, intrauterina, aerosoles y vía oral (Evermann et al., 1986; Hopkins et al., 1988).

### **2.5.2. Factores iatrogénicos**

El VLB está asociado a células y sólo algunos de los materiales biológicos conteniendo células sanguíneas son infecciosos, en virtud de lo cual se podría esperar que VLB no fuera fácil de ser transmitido. Sin embargo, varios estudios epidemiológicos han demostrado que la prevalencia de infección por VLB, especialmente en rebaños lecheros, puede ser tan alta como 90-95%. Se ha comentado además que la incidencia se incrementa significativamente luego de 16-24 meses de edad, época en que el hombre comienza a tener mayor importancia en el manejo y manipulación de animales: inyección de medicamentos por cualquier vía, vacunaciones, descorne, castración, tatuajes,

marcación, remoción de pezones supernumerarios, tacto rectal, prueba de tuberculina, transfusiones sanguíneas, etc. (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

Se ha reportado que bovinos a los que se les extrajo sangre inmediatamente después de sangrar a un bovino VLB positivo, tiene 8 veces más riesgo de seroconvertir que animales que no fueron sangrados, por lo tanto es fundamental el cambio de aguja entre animal y animal al realizar cualquier técnica parenteral (Wilesmith, 1979).

El descornado es otro factor de riesgo y como medida de control se recomienda cauterizar por 30" con fuego o utilizar descornador eléctrico y desinfección del elemento con diacetato de clorhexidina entre animal y animal. El tatuaje es otro factor de riesgo importante (DiGiacomo et al., 1985).

La palpación rectal, que generalmente produce hemorragias, es otro factor de riesgo cuando no hay recambio de guantes entre animales y no se desinfectan adecuadamente los elementos obstétricos utilizados (Hopkins et al., 1988). Disminuye el riesgo, si conociendo el estado de infección de los animales, se trabaja primero con los animales libres y luego con los infectados.

La transferencia embrionaria no se reporta que tenga mayor importancia como factor de riesgo en la transmisión del VLB (Eaglesome et al., 1982).

Las prácticas de vacunaciones masivas o inyecciones parenterales de otro tipo, son factores de riesgo iatrogénicos de gran importancia cuando se utiliza la misma jeringa y aguja.

### **2.5.3. Portadores de VLB con linfocitosis persistente**

Bovinos seropositivos con linfocitosis persistente, son la mayor fuente de infección para animales susceptibles. Estudios sugieren que un volumen de sangre de una vaca con linfocitosis incrementa el riesgo de infección cuando se

lo compara con igual volumen de una vaca seropositiva pero sin linfocitosis (Itohara et al., 1985).

#### **2.5.4. Insectos y artrópodos**

Estudios realizados sobre la posibilidad de transmisión efectiva de VLB por medio de insectos y artrópodos hematófagos, han demostrado que éstos son reales transmisores de VLB en forma mecánica (Bech-Nielsen et al., 1978; Ohshima et al., 1981).

Algunas conclusiones de éstos trabajos de investigación fueron que la habilidad de transmitir VLB depende de: 1) cantidad de sangre retenida en el aparato succionador luego de alimentarse, 2) la infectividad del animal donante, 3) la susceptibilidad del animal recipiente, 4) los hábitos de alimentación del vector. Así, insectos o artrópodos grandes, mas que los pequeños, susceptibilidad genética del animal recipiente, animal donante seropositivo y con linfocitosis persistente y vectores que alternan frecuentemente de huésped, son considerados factores de riesgo importantes en la transmisión efectiva de VLB por vectores animados, por lo cual la mosca del establo como la mosquita de los cuernos serían de poca importancia como vectores transmisores de VLB (Johnson y Kaneene., 1992). En general los estudios realizados evidencian alguna importancia a los tábanos y posiblemente garrapata en la transmisión de VLB, pero no a otros vectores. Sin embargo, un trabajo sobre el posible rol de dos especies de garrapatas en la transmisión de VLB, no logro demostrar que fueran importantes elementos en la transmisión de VLB (Morris et al., 1996).

#### **2.5.5. Factores genéticos**

Se ha reportado resistencia y susceptibilidad al desarrollo de linfocitosis persistente relacionada con antígeno asociado al complejo mayor de histocompatibilidad de linfocitos (antígenos BoLA) (Lewin y Bernoco, 1986).



Vacas con antígeno BoLA-w8 específico tienen mayor riesgo de ser positivas a la infección. Resistencia a linfocitosis persistente entre animales seropositivos está asociado con BoLA-DA7, mientras que la susceptibilidad estaría asociada con el antígeno BoLA.DA12,3 (Xu et al., 1993). Existen además evidencias que mutaciones a nivel del gen p53 tumor-supresor estarían relacionadas con inducción de tumores por el VLB (Dequiedt et al., 1995; Ishiguro et al., 1997).

### **2.5.6. Especies animales**

El VLB fue aislado inicialmente y se piensa que su infección ocurre primariamente, en bovinos domésticos de la especie *Bos-taurus*. Sin embargo ocurren infecciones en otros bovinos (*Bos-indicus*) y en otras especies no bovinas, como resultado de infecciones tanto naturales como experimentales (búfalos, varias razas de ovejas, cabras salvajes).

Muchos trabajos experimentales se han realizado en ovejas y éstas parecen ser altamente susceptibles a desarrollar leucemia y tumores sólidos, posiblemente más que los bovinos (Kenyon et al., 1981; Aida et al., 1989; Ohishi et al., 1992; Schwartz et al., 1994a).

Cabras y cerdos seroconvierten pero efectos patológicos de infección por VLB o son muy leves o bien no ocurren (Olson et al., 1981; Mammerickx et al., 1981).

## **2.6. Pruebas diagnosticas** ( Johnson y Kaneene, 1992; Evermann, 1992)

### **2.6.1. Inmunodifusión en Gel de Agar-IDGA**

La primera prueba serológica para el diagnóstico de LEB fue una IDGA la cual utilizaba como antígeno la proteína del “core viral” p24, posteriormente al descubrimiento de la glicoproteína de superficie gp51, se vio que la prueba

aumentaba la sensibilidad utilizando dicha proteína como antígeno y hoy generalmente se utiliza dicha proteína o bien una combinación de gp51 y p24 (Johnson y Kaneene, 1992).

Para la medición de anticuerpos ésta prueba utiliza exclusivamente suero del animal a analizar. Esta prueba indica la presencia de anticuerpos específicos inducidos por infección con VLB y pueden ser detectados tan temprano como 3 semanas post infección, dependiendo de la dosis de virus recibido como también de las condiciones propias del sistema inmune de cada animal (Evermann, 1992).

A los bovinos infectados con VLB se los considera portadores permanentes, sin embargo la seropositividad no está correlacionada con susceptibilidad a formación de tumores.

Es una prueba con buena especificidad y sensibilidad y ha sido utilizada mundialmente acompañando planes de control y erradicación de LEB. De acuerdo con estudios realizados sobre 1.296 casos, se estimó la especificidad en 99,8% y la sensibilidad en 98,5% (Monke et al., 1992).

### **2.6.2. Radioinmunoensayo-RIE**

Se han desarrollado pruebas RIE utilizando tanto el antígeno p24 como gp51, siendo la sensibilidad igual para ambos (Devare et al., 1976; Devare y Stephenson, 1977).

Tiene la ventaja de poder utilizar muestras de suero o de leche para evaluar anticuerpos contra VLB, y la desventaja de ser mas sofisticada, necesitar personal especializado en manejo de radioisótopos y equipo costoso.

Es considerada uno de las pruebas más sensibles, característica de utilidad para el diagnóstico precoz de la enfermedad como así también para detectar madres positivas en periodo periparto (Johnson y Kaneene, 1992).

### **2.6.3. Ensayo Inmunoenzimático-ELISA**

Esta prueba ha demostrado ser altamente sensible (Otachel-Hawranek et al., 1995; Domenech et al., 1998). Sin embargo con su moderadamente baja especificidad, los rebaños identificados como positivos por ELISA, requerirían de pruebas adicionales, ya sea individuales o de rebaño, para confirmar el real estado de infección a VLB (Sargeant et al., 1997b).

Posee esta técnica otra gran ventaja y es la de poder usar "pool" de sueros o de leche, por lo que adquiere importancia como método de "screening" en rebaños (Carli et al., 1993). El uso de anticuerpo monoclonal de captura, anti-gp51, en conjunto con monoclonal IgG antibovino, aumenta tanto la sensibilidad como la especificidad para detección de anticuerpos en "pool" de leche (Florent et al., 1988).

### **2.6.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR**

Técnica de gran utilidad y de importancia epidemiológica ya que tempranamente detecta la presencia de provirus en células linfoides, caso de terneros que pueden dar falsos positivos por técnicas convencionales debido a la presencia de anticuerpos calostrales, los que perduran hasta aproximadamente los 6 meses de vida y que pueden ser positivos verdaderos por infección prenatal (transmisión vertical) (Rasmussen et al., 1991; Naif et al., 1992; Kelly et al., 1993; Agresti et al., 1993; Eaves et al., 1994; Xie et al., 1997).

### **2.6.5. Diagnostico directo**

Se refiere al aislamiento del virus o identificación de sus antígenos a partir de linfocitos sanguíneos infectados. Si bien no es un método de aplicación masiva, resulta útil para la identificación de animales menores de 6 meses de edad, dada la presencia de anticuerpos calostrales y de vacas en el último tercio de la gestación cuando se produce una depleción parcial de inmunoglobulinas que pasan a formar parte del calostro (Montes et al., 1988).

## **2.7. Control de la infección con el VLB** ( Johnson y Kaneene, 1992; Digiacomo, 1992b)

### **2.7.1. Diagnóstico de animales infectados**

Todo animal de 6 meses y más debe ser evaluado serológicamente usando la técnica IDGA, ya que se sabe que animales menores de 6 meses pueden dar falsos positivos por la presencia de anticuerpos pasivos consumidos en el calostro, de cualquier manera entre el 4 al 6% de éstos terneros pueden ser verdaderos positivos por infección vertical (Lovera et al., 1998).

Todo animal a introducir en un rebaño en control, debe ser evaluado serológicamente 30-60 días previos y una segunda vez, finalizado su periodo de cuarentena.

En animales preñados se realizará el control serológico 6 semanas antes del parto para prevenir falsos negativos debido al pasaje masivo de anticuerpos desde la sangre al calostro.

### **2.7.2. Acciones correctivas**

A los terneros dar calostro de animales positivos ya que se sabe posee anticuerpos antiVLB, los cuales proveen protección contra VLB durante 4-6 semanas de vida. El riesgo de infección por consumo oral de calostro se sabe que puede ser significativo sólo si la madre es una vaca de primera parición, cuyo calostro puede ser pobre en cuanto a cantidad de anticuerpos anti-VLB (Brunner, 1990).

Pasteurización tanto de calostro como de leche reduciría la potencial infecciosidad virtualmente a cero. Alimentar solo con calostro o leche de vacas negativas, no requeriría de la pasteurización y en todo caso en forma intermedia sería mas seguro utilizar leche del tanque de recolección mas que de una sola vaca seropositiva. No se requiere ninguna precaución especial para proteger terneros seronegativos sí solo consumen calostro o leche de madres seronegativas, sin embargo dichos terneros no consumen anticuerpos anti-VLB, por lo cual tienen un riesgo mayor de adquirir la infección por algún otro mecanismo (Johnson y Kaneene, 1992).

Desinfectar correctamente, entre animal y animal, todo instrumental quirúrgico para castración, descorne, tatuaje, colocación de caravanas, cambiar agujas en vacunaciones masivas y otras prácticas de inyecciones parenterales, cambiar de guantes al realizar palpación rectal.

Implementar programa de control de insectos y artrópodos, principalmente tábanos y garrapatas.

Vacas con procesos de mastitis pueden dejar residuos de sangre en pezoneras por lo cual es aconsejable ordeñar primero los animales negativos o mejor aún utilizar temporalmente distintos equipos de ordeño.

### **2.7.3. Separación y acciones correctivas**

Aunque una separación indiscriminada puede no ser una alternativa posible, si las pérdidas económicas son muy grandes, sacar todos los animales seropositivos del rebaño, reducirían rápidamente la prevalencia (Machado-Braga et al., 1997). Una vez eliminados los positivos, el rebaño se evalúa serológicamente una o dos veces con un intervalo de 30-60 días para detectar casos de incidencia adicional, como pueden ser animales en periodo de incubación de la enfermedad. Posteriormente, se pueden controlar anualmente, lo que sería suficiente para detectar nuevos reactores y siempre con la adición de acciones correctivas da manejo.

### **2.7.4. Acciones correctivas sin separación**

Cuando la prevalencia a VLB sea muy alta que haga imposible eliminar los animales positivos inmediatamente, ambos positivos y negativos, deben estar perfectamente identificados y emplear acciones correctivas y periódicos controles serológicos (Johnson y Kaneene, 1992).

### **2.7.5. Exportación e importación**

Todo animal para exportación o importación será aislado y tendrá que tener al menos dos resultados serológicos consecutivos negativos con un intervalo de 4 semanas, antes de ser vendido (Johnson y Kaneene, 1992).

## **2.8 Vacunas**

Una vacuna contra VLB debería reunir los requisitos de no ser infecciosa, no ser oncogénica y no interferir con las pruebas serológicas usadas para detectar animales infectados.

Hasta hoy día, las vacunas desarrolladas no han logrado prevenir eficientemente la infección y además producen anticuerpos que son detectados tanto por IDGA como por ELISA, con lo cual no se puede discriminar entre enfermedad y anticuerpos vacunales.

Una alternativa podría ser utilizar una vacuna a subunidades gp51 y reemplazar en la prueba diagnóstica, el antígeno gp51 por el p24 (Daniel et al., 1993; Callebaut et al., 1994). Otra alternativa sería la fabricación de vacunas recombinantes que contengan la región TAT (Proteína Transactivadora) del genoma del VLB, con posibilidad de utilizarla terapéuticamente ya que activaría la expresión del sistema inmune debido a que los antígenos virales usualmente no son detectables si el virus no se está replicando activamente y depositando antígeno sobre la superficie de las células infectadas por él, por lo tanto la activación de éste proceso podría hacer que las células infectadas sean atacadas por el sistema inmune del huésped afectado.

En un trabajo reciente se concluyó que la proteína “tax” contiene algunos de los epitopes inmunodominantes de VLB y dicha información podría aplicarse a la fabricación de una vacuna capaz de inducir anticuerpos neutralizantes e inmunidad celular (Sakakibara et al., 1998).

Se han desarrollado también vacunas recombinantes incluyendo el gen “env” o parte de él (Ohishi et al., 1992) con resultados bastante promisorios cuando se las probó experimentalmente en ovejas, evidenciando una fuerte inducción de inmunidad humoral, así como vacunas a subunidades gp51 purificadas integradas dentro de Iscom (complejo inmunoestimulante), la cual se perfila altamente inmunogénica (Merza et al., 1991).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Aportar evidencias sobre la presencia de infección con VLB en rebaños de producción de carne de una zona geográfica de la provincia de La Pampa-ARGENTINA.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a. Determinar valores de seroprevalencia de infecciones con el virus de la leucosis bovina en vacas de cría pertenecientes a rebaños ubicados en el área de estudio.

b. Evaluar factores de riesgo asociados a dicha infección en lo concerniente a condiciones de manejo, tamaño y características del rebaño y variables reproductivas y alimenticias.



## **4. HIPOTESIS**

Basado en valores de prevalencia poblacional de infección a VLB aportado por la literatura internacional en rebaños productores de carne además del hecho de no observarse en el departamento Mará-Có, de la provincia de La Pampa-Argentina, linfosarcomas como manifestación clínica de dicha enfermedad, se considera que en el área a evaluar, la prevalencia a VLB no superará el 5% de la población susceptible sujeta a estudio.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. Modelo biológico**

Se utilizó a tal efecto, la vaca de cría entre primer y cuarto o más parto, pertenecientes a rebaños ubicados en el departamento Mará-Có de la provincia de La Pampa-Argentina (Ver Anexo I).

#### **5.1.1. Definición de las unidades de observación**

Vaca de cría: Toda vaca de cualquier raza productora de carne, perteneciente a un rebaño de al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo, ubicado en el área donde se realiza el estudio.

Rebaño de cría: Que pertenezca a predios ubicados en el área donde se realiza el estudio y cuente con al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo.

Predio: Aquel que dedique toda su superficie o parte de ella a la producción de terneros de razas de carne, que posea un rebaño de al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo y se halle ubicado dentro de los límites del área donde se realiza el estudio.

### **5.2. Diseño de la muestra**

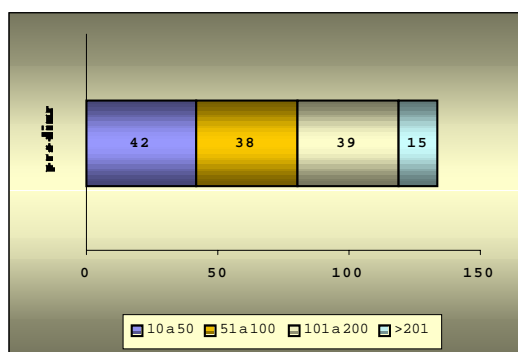
Se realizó un muestreo aleatorio estratificado con afijación proporcional de acuerdo al tamaño del rebaño.

Los predios se estratificaron en cuatro categorías de acuerdo al número de vacas que conforman el rebaño de cría (Ver Tabla 1, Fig. 1 y 2).

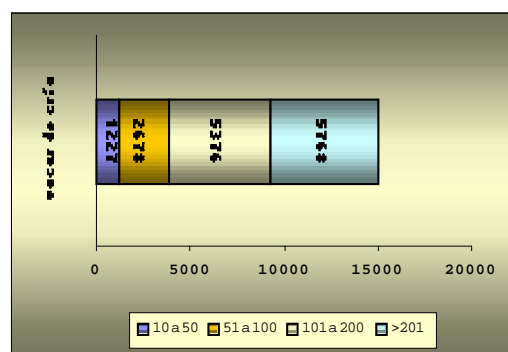
**TABLA 1.- Distribución de predios y vacas de cría, según tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**

Categoría de rebaño	Nº de predios (%)	Nº de vacas (%)	Promedio vacas/predio
10-50	42 (31,3)	1227 (8,2)	29
51-100	38 (28,4)	2678 (17,8)	70
101-200	39 (29,1)	5376 (35,7)	138
> 201	15 (11,2)	5768 (38,3)	385
<b>TOTAL</b>	<b>134 (100,0)</b>	<b>15049 (100,0)</b>	<b>112</b>

Dentro de cada rebaño, las vacas muestreadas se estratificaron en cuatro categorías de acuerdo al número de parto: 1ro., 2do., 3ro.y 4to. o más.



**FIGURA 1. Número de predios existentes, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**



**FIGURA 2. Número de vacas de cría existentes, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**

El tamaño muestral se estableció para un prevalencia esperada de 5%, un error relativo del 20% y un  $\alpha$ : 0.05, en 1627 vacas de cría distribuidas proporcionalmente en las distintas categorías de rebaño (Ver Anexo II, punto A).

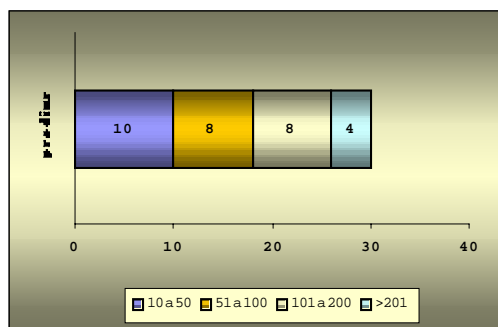
A efectos prácticos, entre los 134 rebaños, con un total de 15.049 vacas de cría, presentes en el área geográfica en estudio, se eligieron, en forma aleatoria, 30 rebaños (22,3%) y un total de 1800 vacas (12,0%) distribuidas proporcionalmente en las distintas categorías de rebaño (Ver Tabla 2, Fig.3 y 4).

Sobre la base de distribución de predios, según la categoría de rebaño, indicado en Tabla 1, los mismos se numeraron de 1 a 42; 1 a 38; 1 a 39 y 1 a 15 y utilizando el programa de computación VETSTAT, para números al azar, se extrajeron 10, 8, 8 y 4 números respectivamente, y de tal manera se eligieron los predios correspondientes a los números obtenidos. La identificación de cada predio se extrajo de la base de datos correspondientes al departamento Mará-Có, de SENASA, delegación General Pico.

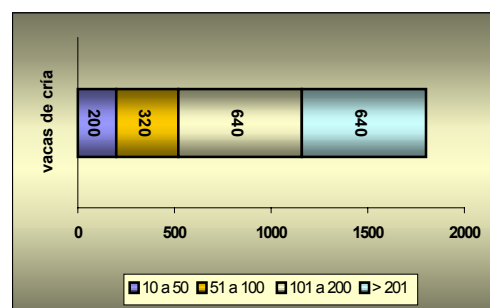
La elección de las vacas a muestrear en cada rebaño, se realizó teniendo en cuenta a los animales a medida que iban entrando a la manga, dado que en la gran mayoría de los predios, las vacas no estaban identificadas individualmente, ni existían registros de cada una de ellas. Tal identificación fue realizada en el momento de la toma de la muestra de sangre, utilizando caravanas con números, que siguen normas de seguridad para evitar la transferencia de sangre de un animal a otro, colocadas en las orejas de cada animal muestreado.

**TABLA 2. Predios y vacas de cría muestreados, según tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**

<b>Categoría de rebaño</b>	<b>Predios</b>	<b>%</b>	<b>Vacas/Predio</b>	<b>Total vacas</b>	<b>%</b>
10-50	10/42	23,8	20	200	16,3
51-100	8/38	21,0	40	320	11,9
101-200	8/39	20,5	80	640	11,9
>201	4/15	26,7	160	640	11,1
<b>Total</b>	<b>30/134</b>	<b>22,3</b>		<b>1800/15049</b>	<b>12,0</b>



**FIGURA 3. Número de predios muestreados, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA.**



**FIGURA 4. Número de vacas de cría muestreadas, según categoría tamaño de rebaño. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA.**

### 5.3. Muestreo

De las vacas seleccionadas se obtuvo una muestra de sangre por venipuntura de la vena yugular (o en su defecto coccígea media), utilizando aguja y jeringa individual estériles. Obtenido el suero, se transfirió a tubos tipo "Eppendorf" y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la prueba.

Por cada rebaño se confeccionó una planilla de trabajo donde consta n° de protocolo, fecha, nombre del propietario/establecimiento, n° de vacas muestreadas y por cada vaca, n° identificador, n° de parto, raza y estado general (Ver Anexo III).

Se requirió además, a cada propietario o responsable del predio, contestar un cuestionario referente a características del predio, variables reproductivas (n° ordinal del parto, tipo de preñez y otras), alimenticias (tipo de pastoreo, tipo de alimento) y de manejo (características del rebaño, uso o no individual de elementos como jeringas, marcadores, guantes, etc.) (Ver Anexo IV).

#### **5.4. Prueba inmunodifusion doble en gel de agar (IDGA)**

Esta prueba es un método para demostrar la precipitación de un antígeno por un anticuerpo y cuando éstos reactivos se encuentran en proporciones óptimas, se observa una línea blanca opaca de precipitado (Ver Anexo II, punto B).

Los sueros fueron evaluados utilizando un "kit" comercial (Ver Anexo II, punto B).

La puesta a punto de ésta técnica diagnóstica se realizó utilizando, además del suero control positivo provisto por el "kit", con sueros positivos, débil positivos y negativos, cedidos gentilmente por los doctores Gustavo Montes, de la Fac. de Cs. Veterinarias de la U. de Chile y Eduardo Esteban, del Laboratorio de Virología de la Fac. de Cs. Veterinarias de Tandil, Argentina, con resultados de identidad inmunológica comprobable (Ver Anexo VII, Foto 1).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Características de los rebaños muestreados**

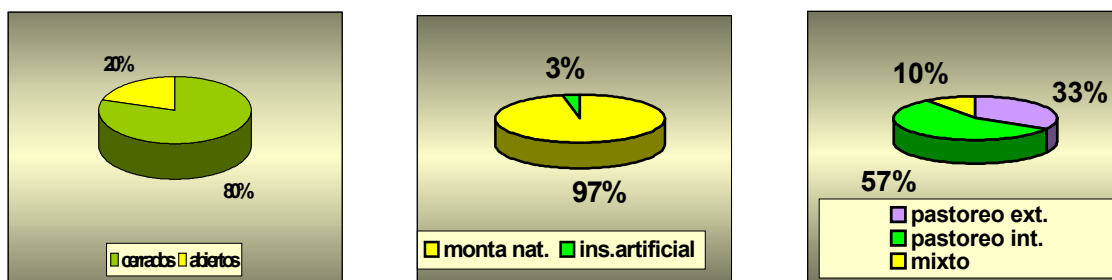
Del análisis de la base de datos recopilados en el informe epizootiológico (Ver Anexo IV), requerido en cada uno de los predios muestreados para la realización del presente estudio, surge que 24 rebaños (80%), corresponden a la condición de cerrados, donde la reposición de los animales de reemplazo se logra a través de vaquillonas de producción propia, mientras que 6 rebaños (20%), obtienen los animales de reemplazo por compra de vaquillonas o vacas de otros productores, configurando la condición de rebaño abierto (Ver Fig. 5).

Con respecto al tipo de concepción de las vacas de cría, 29 rebaños (96,7%) utilizan la monta natural con toros propios y sólo 1 rebaño (3,3%), la inseminación artificial para tal propósito (Ver Fig. 6).

Surgen además conclusiones con respecto a la forma de alimentar las vacas de cría y al tipo de alimento suministrado. En 10 rebaños (33%) utilizan un pastoreo extensivo, en su gran mayoría sobre praderas naturales, en 17 rebaños (57%) instrumentan la modalidad de pastoreo rotativo, con alta carga animal por tiempo reducido, sobre praderas artificiales consociadas y 3 rebaños (10%) realizan una combinación de ambos procedimientos, de acuerdo a la época del año y a la abundancia de pastos (Ver Fig. 7). Ante las condiciones climáticas adversas y la escasez de pastos en invierno, en 23 rebaños (77%) suplementan con rollos de pasto y dentro de ellos en 6 rebaños (26%) suministran además grano en bateas, generalmente maíz y/o sorgo.

Con respecto al análisis de un factor de riesgo como son las prácticas parenterales u obstétricas, surge de los datos obtenidos, que en el 100% de los rebaños no se toman precauciones en cuanto a la desinfección o uso individual

de elementos como jeringas, instrumental, guantes, colocado de caravanas, marcación etc.



**FIGURAS 5, 6 y 7. Distribución de rebaños, según características de los mismos en cuanto a condiciones de manejo, reproductivas y alimenticias.**

## 6.2. Características de las unidades de observación

Del análisis de los datos recopilados en la planilla de trabajo (Ver Anexo III) realizada durante el muestreo de las vacas en cada uno de los rebaños seleccionados a tal fin, surge que de un total de 1798 vacas muestreadas, 1731 (96,3%) corresponden a animales de razas de aptitud carnífera, tanto puras como cruzas y el resto, 67 vacas (3,7%) a razas lecheras, específicamente Holando Argentina o cruzas, utilizadas en esos rebaños como vientres para la producción de terneros, que cumplido su ciclo, la finalidad última es la faena para consumo de carne (Ver Tabla 3, Fig. 8).

En cuanto a la distribución de edades de los animales muestreados, el 13,74% corresponden a vacas de  $\pm$  25 meses o primer parto, 14,85% de  $\pm$  37 meses o segundo parto, 16,35% de  $\pm$  49 meses o tercer parto y el 55,06% de  $\pm$  61 a 120 meses o cuarto o más parto (Ver Tabla 4, Fig. 9).

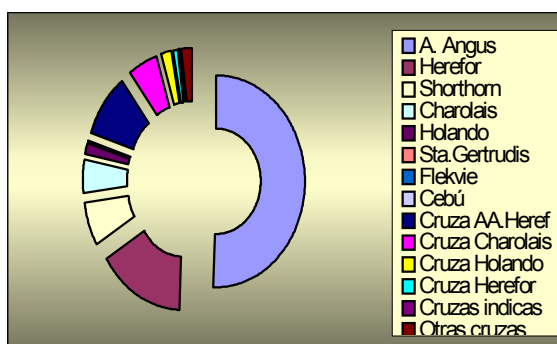


**TABLA 3.-Distribución por razas de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA.**

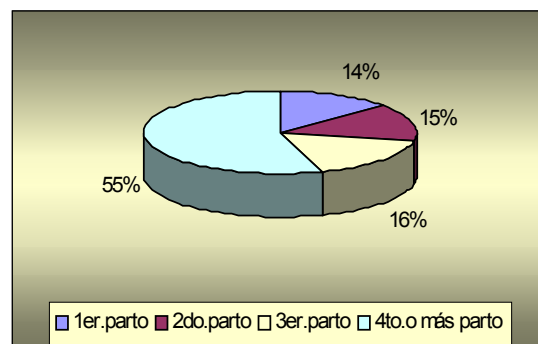
Razas	A. Angus	Heresfor	Shorthorn	Charolais	Holando	Sta. Gertrudis	Flekvie	Cebú	Cruza AA-Heref.	Cruza Charolais	Cruza Holando	Cruza Heresfor	Cruzas Indicas	Otras Cruzas	Total General
Total	902	288	121	90	30	1	1	1	177	97	37	12	7	34	1798
%	50,2	16,0	6,7	5,0	1,7	0,06	0,06	0,06	9,8	5,4	2,1	0,7	0,4	1,9	100,0

**TABLA 4.- Distribución por edades de vacas muestreadas, en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA.**

Edad de vacas	± 25 meses 1er. parto	± 37 meses 2do. parto	± 49 meses 3er. parto	± 61 a 120 meses 4to. o más parto	Total General
Total	247	267	294	990	1798
(%)	(13,74)	(14,85)	(16,35)	55,06)	(100,0)



**FIGURA 8. Distribución por razas de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**



**FIGURA 9. Distribución por edades o número de parto de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**

### 6.3 Prueba IDGA

Los resultados de la prueba IDGA, fueron recopilados sobre una planilla, creada a tal efecto (Ver Anexo V), realizándose lectura a las 24, 48 y 72 hs. Es de destacar que en todo los casos se evidenció, en los sueros control positivos, bandas de precipitación a la lectura de 24 horas.

#### 6.3.1. Seroprevalencia a LEB

En 3 de los 30 rebaños analizados se identificó un animal seropositivo a LEB en cada uno de ellos (Ver Tabla 5 y Anexo VI, Tabla C).

**TABLA 5.- Resultados Prueba IDGA-LEB, en sueros de vacas de 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA**

		Resultados Prueba IDGA			Prevalencia	%
		Positivo	Sospechoso	Negativo		
Rebaños analizados	30	3	-	27	3/30	10,0
Sueros analizados	1798	3	-	1795	3/1798	0,17

Dichos rebaños, clasificados como positivos, corresponden a la categoría de rebaños pequeños, formados generalmente por acopio de vacas, donde conviven varias razas y específicamente los animales positivos, uno es de raza Holando Argentina de 6to. parto, otro es de craza Holando de 5to parto y el tercero es de raza Cebú de 3er. parto, perteneciente al único rebaño, de los analizados, donde la mayoría de las vacas que conforman el mismo son de razas o cruza indicas.

La totalidad de los sueros correspondientes a los rebaños positivos (2x20 y 1x40 : 80 sueros) fueron evaluados comparativamente por medio de la técnica

de ELISA, gentilmente realizada en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Univ. Nac. del Centro, y cuyos resultados confirmaron los obtenidos por IDGA.

Dada la muy baja prevalencia poblacional observada, nos encontramos frente a un acontecimiento que podríamos calificar como poco frecuente de presentarse para la población en estudio y por lo tanto, ésta variable seguiría una distribución de Poisson. Para calcular los límites de confianza se utilizó la tabla de valores de límites de confianza 95% para estimación de una variable que sigue una distribución de Poisson ( Thrusfield, 1995).

De 1798 vacas de cría evaluadas, sólo 3 fueron positivas a LEB, por lo tanto se puede extrapolar una prevalencia de 222 por 100.000. Para calcular los límites de confianza 95%, se entra en la tabla en n: 3 (número observado de seropositivos) y se obtiene un factor del límite inferior, L : 0,206 y un factor del límite superior, U : 2,92. Estos límites se convierten en límites por 100.000, multiplicándolos por la prevalencia estimada por 100.000, extrapolada de la muestra original (en éste caso 222).

Límite inferior :  $222 \times 0,206 : 45,73$

Límite superior:  $222 \times 2,92 : 648,24$

Así el intervalo de confianza 95%, para la seroprevalencia a LEB es de **45,73 - 648,24** casos por 100.000 vacas de cría.

Para el cálculo del intervalo de confianza correspondiente a la seroprevalencia predial observada se utilizó la tabla de valores exactos de límites de confianza 95% para proporciones (Thrusfield, 1995). Esta tabla brinda valores exactos de límites de confianza para proporciones, basados en una distribución binomial, donde se establecen relaciones entre el número de aciertos, en éste caso x : 3 y la diferencia entre el tamaño de la muestra y la

cantidad de aciertos,  $n - x : 30 - 3 : 27$ . Por lo cual la prevalencia predial estimada, 10%, presenta un intervalo estimado de confianza según tabla de **0,021 - 0,265** (2,1% - 26,5%).

## 7. DISCUSION

Si bien son escasos los trabajos aportados tanto por la literatura internacional como nacional que estudien la seroprevalencia a LEB en rebaños productores de carne, todos demuestran valores de la misma muy inferiores a lo que ocurre con los rebaños lecheros. Tal condición estaría relacionada con variables genéticas y de manejo diferenciales de ambos tipos de rebaños, así como ubicación geográfica de áreas evaluadas y asociado además con la menor frecuencia de investigación de ésta enfermedad en rebaños productores de carne.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, 10% de rebaños, con un solo animal positivo en cada uno de ellos, y 0,17% de todos los animales analizados serológicamente positivos a LEB, coinciden con lo descrito en trabajos realizados en Argentina, y específicamente con el valor 0%, obtenido por Layana et al. (1997) en la provincia de Río Negro (Patagonia Argentina) y por Huici et al., (1995), en las provincias patagónicas de Neuquén, Chubut y Río Negro, evaluación realizada sobre 3000 sueros bovinos de aptitud carnífera, si tenemos en cuenta que dos de los tres animales positivos en éste estudio son de razas lecheras y que actualmente forman parte de rebaños de carne correspondientes a pequeños productores, que constituyen los mismos a partir de acopio de vacas generalmente de descarte de otros tipos de rebaños. El tercer animal seropositivo a LEB corresponde a la raza Cebú. Las razas índicas, en la zona geográfica evaluada, son la excepción y generalmente provienen del norte de Argentina donde es un hecho común la práctica de prepatencia a Babesiosis bovina la que se realiza utilizando sangre entera de animales positivos a la misma, y que se inocula en animales receptores, como forma de lograr un cierto grado de inmunidad contra dicho parásito. Con respecto a éste tema, en un trabajo realizado por el Dr. Eduardo Esteban (comunicación personal), en un rebaño productor de carne de la provincia de Formosa -

Argentina, obtuvo altos valores de seroprevalencia a LEB, cercano a 90%. Estos animales habían sido inoculados con sangre entera de vacas lecheras con Babesia, las cuales además eran positivas a LEB.

Por otra parte en un trabajo realizado sobre animales de exportación provenientes de 8 provincias argentinas (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa y La Pampa) donde se analizaron 5519 sueros bovinos de distintas razas de carne (Huici et al., 1997 ) obtuvieron una seroprevalencia a LEB de 1,8%, con valores extremos de 0% para la provincia de La Pampa y 9,7% para Formosa. El mismo trabajo demostró que las razas con mayor seroprevalencia a LEB, fueron la Brahma, con el 8,7% y la Brangus con 4,8%, coincidiendo con las razas explotadas en el norte de Argentina, como así también con la mayor densidad de insectos hematófagos en esas áreas subtropicales, asociado a la práctica de prepatencia contra Babesia sp. en esas zonas endémicas de dicho parásito.

Con respecto a la prueba de evaluación (IDGA), utilizada en el presente trabajo, la misma es una técnica operativamente sencilla, de relativo bajo costo y realizable en cualquier laboratorio de mediana complejidad, es usada en todo el mundo acompañando planes de control y erradicación de LEB y varios países europeos han logrado dicho propósito utilizando sistemáticamente dicha técnica. La elección de ésta técnica para la evaluación serológica de las muestras en el presente trabajo, se basó justamente en las características expresadas de la IDGA y en el hecho de que en un principio el Plan Nacional de Control y Erradicación de LEB, implementado en Argentina, contemplaba a la misma como única alternativa. Actualmente también se ha aprobado para tal fin la técnica de ELISA, usadas indistintamente.

La IDGA presenta buenos valores, tanto de sensibilidad como de especificidad. Dado que ELISA ha demostrado ser algo más sensible, la

totalidad de los sueros correspondientes a los 3 rebaños, donde se comprobó la seropositividad a LEB de un animal en cada uno de ellos, fueron evaluados comparativamente por dicha técnica para, sobre la base de su mayor sensibilidad, poder captar, en dichos rebaños, algún otro animal que no hubiera podido ser detectado por la técnica de IDGA. Si bien fueron pocos los sueros evaluados por ambas técnicas (80 sueros), es en dichos rebaños donde mayor probabilidad hay de que exista algún otro animal positivo a LEB, dadas las características epidemiológicas del VLB. Sin embargo, ambas técnicas coincidieron en un 100% en la evaluación de dichos sueros, lo que demuestra una alta correlación entre las mismas, brindando de tal manera una seguridad diagnóstica a los resultados obtenidos.

## **8. CONCLUSIONES**

Teniendo en cuenta lo expresado en Discusión, referente a las razas bovinas resultantes positivas a LEB en el presente estudio, se puede concluir que la seroprevalencia a LEB, en las razas productoras de carne, es eventualmente cero, lo que determinaría la ausencia de ésta enfermedad en los rebaños de cría de la zona geográfica evaluada.

Los resultados obtenidos permitirían lograr oficialmente un área libre de ésta enfermedad, en un todo de acuerdo con el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Leucosis Bovina e implementar medidas sanitarias, de manejo y vigilancia epidemiológica, que garanticen la permanencia, a través del tiempo, de tal condición, en los rebaños de cría del área evaluada.



## **9. RECOMENDACIONES**

Se debería avanzar en estudios epidemiológicos que permitan evaluar otras zonas tanto de la provincia de La Pampa, como del resto del país, haciendo especial énfasis en la valoración de rebaños de pequeños productores por las características particulares que imprimen a la comercialización de sus animales y la constitución de los mismos, de tal manera que asociado a lo que ocurre con las otras provincias patagónicas, se pudiera lograr una extensa área libre de ésta enfermedad, que posesionaría a Argentina en un lugar importante, con ventajas comparativas, de acuerdo a los requerimientos de los mercados internacionales más exigentes, con respecto a la sanidad de los animales de exportación y subproductos cárnicos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- **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. *Am. J. Vet. Res.* 54:373-378.
- **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.* 50:1946-1951.
- **ALBERT, B., BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D.** 1994. In: *Molecular biology of the cell.* Third edition. Garland Publ. Inc. 281-84 y 1273-78.
- **BECH-NIELSEN, S.; PIPER, C.E.; FERRER, J.F.** 1978. Natural mode of transmission of bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* 39:1089-1092.
- **BOUILLANT, A.M.P.; RUCKERBAUER, G.M.; EAGLESOME, M.D.; SAMAGH, B. SINGH, E.L.; HARE, W.C.D.; RANDALL, G.C.B.** 1981. Attempts to isolate bovine leukemia and bovine syncytial viruses from blood, uterine flush fluid, unfertilized ova and embryos from infected donor cattle. *Annales de Recherches Vétérinaires.* 12:385-395.
- **BRENNER, J.; MEIROM, R.; AVRAHAM, R.; TRAININ, Z.; SAVIR, D.** 1986. Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infectivity in some Israeli dairy herds. *Israel J. Vet. Med.* 42:11-15.
- **BRUNNER, M.A.** 1990. Prevention of infectious disease: a herd approach to preventing Johne's disease and leukosis. *Proc. Am. Ass. of Bov. Pract.* 23:34-39.
- **BUEHRING, G.C.; KRAMME, P.M.; SCHULTZ, R.D.** 1994. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab. Invest.* 71:359-365.
- **BURRIDGE, M.J.; PUHR, D.M.; HENNEMANN, J.M.** 1981. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 7:704-707.

- **CALLEBAUT, Y.; MORNON, J.P.; BURNY, A.; PORTETELLE, D.** 1994. The bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51 as a general mode for the design of a subunit vaccine against retroviral infection: mapping of functional sites through immunological and structural data. *Leukemia Suppl.* 1:6218-6221.
- **CARLI, K.T.; BATMAZ, H.; SEN, A.; MINBAY, A.** 1993. Comparison of serum, milk and urine as samples in an enzyme immunoassay for bovine leukaemia virus infection. *Res. Vet. Sci.* 55:394-395.
- **CAUDERT, M.; PERRIN, B.; FEDIDA, M.** 1990. Réseau national de surveillance sanitaire bovine: analyse des résultats sérologiques obtenus en matière de leucose bovine enzootique dans les laboratoires. *Revue de Médecine Vétérinaire.* 141:658-660.
- **D'ANGELINO, J.L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E.H.** 1998. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *J. Dairy Res.* 65:693-695.
- **DANIEL, R.C.; GATEI, MH.; GOOD, MF.; BOYLE, DB.; KAVIN, MF.** 1993. Recombinant viral vaccine for enzootic bovine leukosis. *Immunol. Cell Biol.* 75:399-404.
- **DEQUIEDT, F.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; WILLEMS, L.** 1995. Mutation in the p53 Tumor-Suppressor Gene are frequently associated with Bovine Leukemia Virus-induced leukemogenesis in cattle but not in sheep. *Virology* 209:676-683.
- **DERSE, D.; DINIAK, A.J.; CASEY, J.W.; DININGER, P.L.** 1985. Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats. *Virology.* 141:162-166.
- **DERSE, D.; CASEY, J.W.** 1986. Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression. *Science.* 231:1437-1440.
- **DEVARE, S.G.; STEPHENSON, J.R.; SARMA, P.S.; AARONSON, S.A.; CHANDER, S.** 1976. Bovine lymphosarcoma: development of a radioimmunologic technique for detection of the etiologic agent. *Science USA.* 194:1428-1430.
- **DEVARE, S.G.; STEPHENSON, J.R.** 1977. Biochemical and Immunological characterization of the major envelope glycoprotein of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 23: 443-447.

- **DiGIACOMO, R.F.** 1992a. Vertical transmission of the bovine leukemia virus. (Symposium on bovine leukemia virus infection). Vet. Med. March 1992: 258-262.
- **DiGIACOMO, R.F.** 1992b. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection (Symposium on bovine leukemia virus infection). Vet. Med. March 1992: 242-257.
- **DiGIACOMO, R.F.; DARLINGTON, R.L.; EVERMANN, J.F.** 1985. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. Can. J. Comparative Med. 49:340-342.
- **DOMENECH, A.; LLAMES, L.; GOYACHE, J.; SUAREZ, G.; GOMEZ, L.E.** 1998. Comparison of four tests to evaluate the reactivity of rabbit sera against envelope or Gag-related proteins of bovine leukemia virus (BLV). Vet. Microb. 60:13-25.
- **DONOSO, D.** 1996. Leucosis Enzoótica Bovina: Relación entre la infección subclínica con el virus leucemia bovina y algunas variables reproductivas de vacas lecheras de rebaños de la zona central de Chile. Memoria Med. Vet. U. de Chile, Fac. Cs. Vet y Pec. Stgo. 68 p.
- **EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; BETTERIDGE, K.J.; RANDALL, G.C.B.; SINGH, E.L.; SAMAGH, B.S.** 1982. Transfer of embryos from bovine leukaemia virus infected cattle to uninfected recipients: preliminary results. Vet. Rec. 111:122-123.
- **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. 39:313-321.
- **ESTEBAN, E.N.** 1987. Leucosis Bovina. A. Microb. e Enf. Infec. 6:76-88. R.Arg.
- **EVERMANN, J.F.** 1992. A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. (Symposium on bovine leukemia virus infection). Vet. Med. March 1992:272-278.
- **EVERMANN, J.F.; DiGIACOMO, R.F.; FERRER, J.F.; PARISH, SM.** 1986. Transmission of bovine leukosis virus by blood inoculation. Am. J. Vet. Res. 47:1885-1887.

- **FENNER, F.J.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O.** 1993. Mechanims of viral oncogenesis. Retroviridae. In: Veterinary Virology. Second Edition. Academic Press, Inc. San Diego, USA. pp 193-206 y 561-569.
- **FLORENT, G.; DELGOFFE, J.C.; ZYGRAICH, N.** 1988. Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. Vet. Microb. 18:89-93.
- **FORSHELL, K.P.** 1996. The leukosis programme is coming to an end!. Svensk Veterinartidning. 48:615-617.
- **GHEZZI, P.C.; DOLCINI, G.L.; GUTIERREZ, S.E.; BANI, P.C.; TORRES, JO.; ARROYO, G.; ESTEBAN E.N.** 1997. Prevalence of bovine leukaemia virus (BLV) in the "Mar y Sierra" dairy production area of Argentina between 1994 and 1995. Rev. Arg. de Microb. 29:137-146.
- **GREGOIRE, D.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; HUERTZ, S.; HORS-CAYLA, M.C.; SZPIRER, J.; SZPIRER, C.; BURNY, A.; HUEZ, G.; KETTMANN, R.** 1984. Different bovine leukemia virus-induced tumor harbor the provirus in different chromosomes. J. Virol. 50:275-279.
- **GUPTA, P.; FERRER, J.F.** 1982. Expression fo bovine leukemia virus genome is blocked by a nonimmunoglobulin protein in plasma from infected cattle. Science. 215:405-407.
- **GUPTA, P.; KASHMIRI, S.V.S.; FERRER, F.** 1984. Transcriptional control of the bovine leukemia virus genome: Role and characterization of a non-immunoglobulin plasma protein from bovine leukemia virus-infected cattle. J. Virol. 50:267-270.
- **HAAS, L.; DIVERS, T.; CASET, J.W.** 1992. Bovine leukemia virus gene expression in vivo. J. Virol. 66:6223-6225.
- **HAILATA, N.; JOHNSON, R.; al BAGDALI, F.; HANASH, S.** 1995. Proliferating cell nuclear antigen expression in sheep infected with bovine leukemia virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 44:211-222.
- **HEENEY, J.L.; VALLI, P.J.S.; JACOBS, R.M.; VALLI, V.E.O.** 1992. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. Lab. Invest. 66:608-617.

- **HOPKINS, S.G.; EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; PARISH, S.M.; FERRER, J.F.** 1988. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. *Vet. Rec.* 122:389-391.
- **HOPKINS, S.G.; DIGIACOMO, R.F.** 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clinic. N. American Food Animal Practice.* 13:107-128.
- **HUBNER, S.O.; WEIBLEN, R.; MORAES, M.P.; SILVA, A.M.; CARDOSO, M.J.L.; PEREYRA, N.M.; ZANINI, M.** 1997. Intrauterine infection by bovine leukaemia virus. *Rev. Brasileira de Reproducao Animal.* 21:8-11.
- **HUICI, N.C., SEGADE, G.; RAMIREZ, V.; GONZALEZ GENTILE, A.** 1995. Serologic diagnosis of EBL in Patagonia. *Vet.Arg.* XII: 303-305.
- **HUICI, N.; SEGADE, G; RAMIREZ, V; GONZALEZ GENTILE, A.** 1996. Diagnosis of enzootic bovine leukosis in dairy cattle for export during the period 1989-1993. *Vet. Arg.* 12:16-22.
- **HUICI, N.; SEGADE, G.; RAMIREZ, V.** 1997. Diagnosis of bovine leukosis in beef cattle for export: 1989-1994. *Vet. Arg.* 14:26-31.
- **ISHIGURO, N.; FURUOKA, H.; MATSUI, T.; HORIUCHI, M.; SHINAGAWA, M.; ASAHINA, M.; OKADA, K.** 1997. p53 mutation as a potencial cellular factor for tumor development in enzootic bovine leukosis. *Vet. Immunol. Immunopath.* 55: 351-358.
- **ISLAS, A.; MONTES, G.; LOPEZ, J.; ROJAS, K.** 1996. Experimental induction of bovine leukosis with two sources of virus. *Arch. Med. Vet.* 28:117-120.
- **ITOHARA, S.; OIKAWA; TERUI, S.; MIZUNO, Y.** 1985. Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. *Jap. J. Vet. Sci.* 47:807-810.
- **JOHNSON, R.; GIBSON, C.D.; KANEENE, J.B.** 1985. Bovine Leukemia virus: a herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med.* 3:339-349.
- **JOHNSON, N.; KANEENE, J.B.** 1992. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis (Reviewed). *Vet. Bulletin.* 62:287-312.

- **KAADEN, O.R.; NETH, R.; FRENZEL.** 1978. Sequential studies of bovine leukemia virus antibody development in dairy cattle over a four-year period. *Annales de Recherches Vétérinaires.* 9:771-776.
- **KANEENE, J.B.; NICOL, J.; GIBSON, C.D.** 1983. Bovine leukemia virus: questions and answers for farmers. Michigan State University Agricultural Experiment Station E1674.
- **KEEFE, R.G.; CHOI, Y.; FERRICK, D.A.; STOTT, J.L.** 1997. Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopath.* 56:39-51.
- **KELLY, E.J.; JACKSON, M.K.; MARSOLAIS, G.; MORREY, J.D.; CALLAN, R.J.** 1993. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* 54:205-209.
- **KENYON, S.R.; FERRER, J.F.; McFEELY, R.A.; GRAVES, D.E.** 1981. Induction of lymphosarcoma in sheep by bovine leukemia virus. *J. Nat. Cancer Inst.* 67:1157-1163.
- **KERKHOFS, P.; HEREMANS, H.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L.** 1998. In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J. Virol.* 72:2554-2559.
- **KETTMANN, R.; CLEUTER, Y.; MAMMERICKX, M.; MEUNIER-ROTIVAL, M.; BERNARDI, G.; BURNY, A.; CHANTRENNE, H.** 1980. Genomic integration of bovine leukemia provirus: Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2577-2581.
- **KETTMANN, R.; DESCHAMPS, J.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; BURNY, A.; MARBAIX, G.** 1982. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:2465-2469.
- **LASSAUZET, M.L.G.; JOHNSON, W.O.; THRUMOND, M.C.; STEVENS, F.** 1989. Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Can. Jour. of Vet. Res.* 53:424-430
- **LAYANA, J.; GONZALEZ, N.; MOREIRA, A.S.; VAGHI, C.; UZAL, F.** 1997. Serological survey on brucellosis, bovine leukaemia and

paratuberculosis in the northwest of Rio Negro, Argentina. *Vet. Arg.* 14:83-90.

- **LEWIN, H.A.; BERNOCO, D.** 1986. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *Animal Genetics.* 17:197-207.
- **LORENZ, R.J.; STRAUB, O.C.** 1987. The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In: *Developments in veterinary virology. Volume 2 Enzootic Bovine Leukosis and Bovine leukemia Virus.* Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff, :51-68.
- **LOVERA, H.J.; YACIUK, R.E.; GIRAUDO, J.A.** 1998. Presence and persistence of antibodies against bovine leukaemia virus in calves during their first year of life. *Revista de Med.Vet.* 79:298-300.
- **MACHADO BRAGA, F.; van-der LAAN, C.W.; HALFEN, D.C.; VIDOR, T.** 1997. Appraisal of methods for controlling enzootic bovine leukosis. *Ciencia Rural.* 27:635-640.
- **MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.** 1981. Experimental cross-transmission of bovine leukaemia virus (VLB) between several animal species. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin, B.* 28:69-81.
- **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.* 59:113-119.
- **MERZA, M.; SOBER, J.; SUNDQUIST, B.; TOOTS, I.; MOREIN, B.** 1991. Characterization of purified gp51 from bovine leukemia virus integrated into iscom. *Arch. Virol.* 120:219-231.
- **MILLER, J.M.; MAATEN, M.J.van der.** 1979. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Nat. Cancer Ins.* 62:425-428.
- **MIRSKY, M.L.; OLMSTEAD, C.A.; DA, Y.; 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: 2178-2183.
- **MONKE, D.R.; ROHDE, R.F.; HUESTON, W.D.; MILBURN, R.J.** 1992. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel



immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1296 cases (1982-1989). JAVMA. 200:2001-2004.

- **MONTES, G.; VILLOUTA, G.; BERRIOS, P.; CELEDON, M.; CORNEJO, M.** 1988. Detección del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina. Av. Cs. Vet. 3:57-59.
- **MORRIS, S.D.; BRYSON, N.R.; WAAL, D.T de; MATTHEE, O.; PREEZ, ER. de; VAN VUUREN, M.; KADISH, ES.** 1996. The possible role of two common three-host ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum*, in the transmission of bovine leukosis virus. J. South African Vet. Ass. 67:148-150.
- **MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BOSHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A .W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D.** (eds.) 1995. Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien New York.
- **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. 30:675-679.
- **NARANJO, J.; PONS, A.; FUHRER, E.** 1992. Sistema de certificación de predios libre de leucosis bovina. Documento elaborado por la División de Protección Pecuaria y Programa Pecuario de la VIII Región, SAG. 14 p.
- **OHISHI, K.; SUZUKI, H.; YASUTOMI, Y.; ONUMA, M.; OKADA, K.; MUMAKUNAL, S.; OHSHIMA, K.; IKAWA, Y.; SUGIMOTO, M.** 1992. Augmentation of bovine leukemia virus (BLV)-specific lymphocyte proliferation responses in ruminants by inoculation with BLV env.recombinant vaccinia virus: Their role in the suppression of BLV replication. Microbiol. Immunol. 36:1317-1323.
- **OHSHIMA, K.; OKADA, K.; NUMAKUNAI, S.; YONEYAMA, Y.; SATO, S.; TAKAHASHI, K.** 1981. Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. Jap. J. Vet. Scie. 43:79-81.
- **OLIVEIRA, A.R. de; BARRETO, C.S.F.; MERICHELLO, D.; SANQUENTIN, W.M.** 1997. Epidemiology of bovine leukosis: occurrences of antibodies in different age groups. Rev. Bras. Med. Vet. 19:258-262.

- **OLSON, C.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; KAJA, R.** 1981. Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. *J. Nat. Cancer Inst.* 67:671-675.
- **ONUMA, M.; SAGATA, N.; OKADA, K.; OGAWA, Y.; IKAWA, Y.; OSHIMA, K.** 1982. Integration of bovine leukemia virus DNA in the genomes of bovine lymphosarcoma cells. *Microbiol.Immunol.* 26:813-820.
- **OROSZLAN, S.; SARNGADHARAN, M.G.; COPELAND, T.D.; KALYANARAMAN, VS.; GILDEN, R.V.; GALLO, R.C.** 1982. Primary structure analysis of the major internal protein p24- of human type C T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:1291-1294.
- **OTACHEL-HAWRANEK, J.; KORFANTY, E.; SZACHNOWSKI, S.; ERBERT, M.; CISZEWSKI, G.** 1995. Use of ELISA in the detection of antibodies against enzootic bovine leukaemia virus in individual and bulk milk samples. *Medycyna Weterynaryjna.* 51:402-404.
- **PYEON, D.; OREILLY, K.L.; SPLITTER, G.A.** 1996. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70:5706-5710.
- **PYEON, D.; SPLITTER, G.A.** 1998. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in lymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J. Virol.* 72:6917-6921.
- **RASMUSSEN, H.B.; HOFF-JØRGENSEN, R.; CLAUSEN, J.; CHRISTENSEN, LS.** 1991. PCR detection of bovine leukemia virus in lymphoid tumors. *BFE.* 8:517-519.
- **REINHARDT, G.; HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDEMANN, S.; LEAL, H.; NIEDDA, M.** 1988. Enzootic Bovine Leukosis. Serological study in a farm of the province of Valdivia and relation with productive and reproductive parameters. *J. Vet. Med.* 35:178-185.
- **RICE, N.R.; STEPHENS, R.M.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; GILDEN, R.V.** 1984. The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. *Virology.* 138:82-93.
- **RIQUELME, L.A.** 1997. Leucosis Enzoótica Bovina: Efecto de la infección subclínica sobre variables productivas del ganado lechero de la

Comuna de Los Angeles, VIII Región, Chile. Memoria Med. Vet. U. de Chile, Fac. Cs. Vet. y Pec. Stgo. 49 p.

- **ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G.; BUSHNELL, S.** 1982. Detection of bovine leukosis virus in bronchoalveolar lung washings and nasal secretions. Vet. Rec. 111:501-503.
- **ROMERO, C.H.; ZANOCCHI, H.G.; AGUIAR, A.A.; ABARACON, D.; SILVA, A.** 1982. Experimental transmission of enzootic bovine leucosis virus with blood and milk in the tropics. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 2:9-15.
- **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 cells. Science. 227:320-322.
- **SAGATA, N.; OGAWA, Y.; KAWAMURA, J.; ONUMA, M.; IZAWA, H.; IKAWA, Y.** 1983. Molecular cloning of bovine leukemia virus DNA integrated into the bovine tumor 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.
- **SAKAKIBARA, N.; KABEYA, H.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M.** 1998. Epitope mapping of bovine leukemia virus transactivator protein tax. J. Vet. Med. Sci. 60:599-605.
- **SAMAGH, B.S.; KELLAR, J.A.** 1982. Seroepidemiological survey of bovine leukemia virus infection in Canadian cattle. Vet. Med. and Animal Sci. 15:397-410.
- **SARGEANT, J.M.; KELTON, D.F.; MARTIN, S.W.; MANN, E.D.** 1997. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. Prev. Vet. Med. 31:211-221.
- **SARGEANT, J.M.; KELTON, D.F.; MARTIN, S.W.; MANN, E.D.** 1997. Evaluation of a bulk-milk ELISA test for the classification of herd-level bovine leukemia virus status. Prev. Vet. Med. 31:223-230.

- **SCHULTZ, R.D.** 1977. When can we achieve our goal of providing specific-pathogen-free bovine semen? Procc. Annual Meeting U.S. Animal Health Ass. 81:141-150.
- **SCHWARTZ, I.; BENSALD, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D.** 1994. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. J. Virol. 68:4589-4596.
- **SCHWARTZ, I.; COSTA, B.de; RHUN, D. le; LAINE, V.; GUILLEMET, M.; LEVY, D.** 1994. Mechanism of oncogenesis induced by bovine leukaemia virus; role of the Tax protein. 1eres.rencontres autour des recherches sur les ruminants :81-84.
- **SMITH, R.D.** 1995. Statistical Significance. In: Veterinary Clinical Epidemiology. Second Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton USA. pp. 145-159.
- **STITES, D.P.; TERR, AI.** 1993. In: Inmunología Básica y Clínica. 7ª. Edición. Editorial El Manual Moderno S.A de CV. Capítulo 18:244-247.
- **THRUSFIELD, M.** 1995. In: Veterinary Epidemiology. Second Edition , Blackwell Science Ltda.
- **TRUEBLOOD, E.S.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; STONE, D.M., McELWAIN, TF.** 1998. B-lymphocyte proliferation during elukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. Jour. Virol. 72:3169-3177.
- **VEGA, I.P.** 1997. Evaluación de una prueba de Elisa Indirecta para el diagnóstico de la infección con el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina en Chile. Memoria Título Medico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 62 p.
- **VILLOUTA, G.; CONTRERAS, M.; AGÜERO, H.; PEDRAZA, C.; MONTES, G.** 1992. Producción de leche y grasa de vacas libres e infectadas subclínicamente con el virus de la leucosis bovina. Av. Cs. Vet. 7:191-196.
- **VILLOUTA, G.; DURAN, Y.; CESPED, W.; MONTES, G.** 1994. Dinámica de la infección con el virus de la leucosis bovina en un predio lechero de Chile. Arch. Med. Vet. 26:63-73.
- **WANG, C.T.** 1991. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: Epidemiological study. J. Ve. Med. Sci. 53:395-398.

- **WILESMITH, J.W.** 1979. Needle transmission of bovine leucosis virus. *Vet. Rec.* 104-107.
- **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 hibridization and the polymerase chain reaction. *J. Comp. Path.* 116:87-96.
- **XU, A.; vanEIJK, M.J.; PARK, C.; LEWIN, H.A.** 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with reasistance to persistent limphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151:6977-6985.
- **YOSHIKAWA, H.; XIE, B.; OYAMADA, T.; HIRAGA, A.; YOSHIKAWA, T.** 1997. Detection of bovine leukemia viruses (BLV) in mammary tissues of BLV antibody-positive cows affected by subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 59:301-302.
- **ZANDOMENI, R.O.; CARRERA. ZANDOMENI, M.; ESTEBAN, E.; DONAWICK, W.; FERRER, J.F.** 1992. Induction and inhibition of bovine leukemia virus expression in naturally infected cells. *J. Gen. Virol.* 73:1915-1924.

## ANEXO I

### UBICACION GEOGRAFICA Y CARACTERISTICAS DEL AREA DONDE SE REALIZO EL ESTUDIO

La provincia de La Pampa es uno de los estados más jóvenes de la República Argentina, ya que accedió al reconocimiento político en 1952.

Se ubica en el centro geográfico del país, en la franja de transición entre la región Central, la región Pampeana, Cuyo e integrada a la región Patagónica, participando de características propias de cada una de éstas regiones. Ocupa una superficie de 143.440 km<sup>2</sup> y una población cercana a los 300.000 habitantes. Políticamente está organizada en 22 departamentos y municipios.

La estructura ambiental de La Pampa, es simple. La provincia presenta un gradiente climático desde el noreste sub-húmedo, donde se registran los mejores niveles de precipitaciones, buenos suelos y temperaturas agradables, lo que ha permitido el asentamiento de la mayor parte de la población, con el mayor desarrollo económico, hacia el sudoeste, donde disminuye el nivel de precipitaciones y la calidad de los suelos, siendo las amplitudes térmicas muy pronunciadas, típico de los climas continentales. Las condiciones

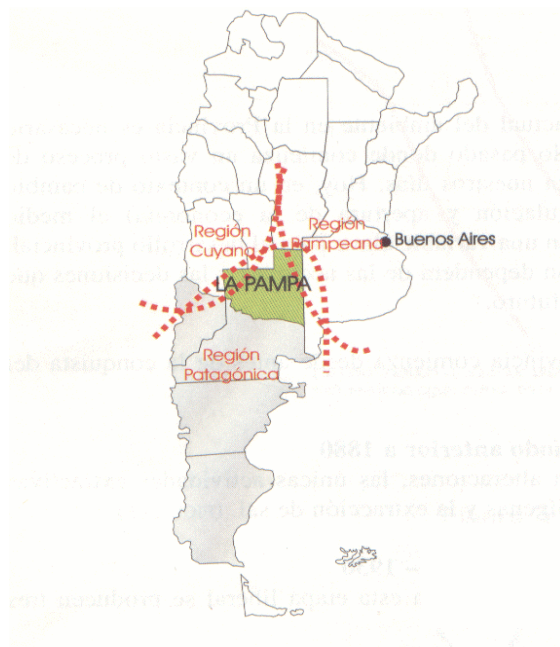


FIGURA 10.- Provincia de La Pampa en el contexto de la República Argentina

rigurosas del medio se acentúan en el extremo oeste, donde sólo es posible la ganadería de cría intensiva, la agricultura bajo riego y la actividad minera. Dicho eje climático define la organización territorial, la distribución de la población y la actividad económica de la provincia

Es una provincia eminentemente agrícola-ganadera, con incipientes polos de desarrollo industrial en Santa Rosa y General Pico, principales ciudades de la misma. La ganadería provincial está orientada específicamente a los bovinos, de los cuales existen actualmente unos 3 millones de animales (Anuario Estadístico INDEC, 1998), ovinos en franco retroceso, caprinos en las regiones semiáridas y áridas y cerdos.

Las características fisiográficas de la provincia se han esquematizado en 4 regiones basadas en rasgos de clima, geomorfología, edafología y vegetación.

Región Occidental: Esta región se caracteriza por tener un clima de árido a semiárido. La vegetación se compone de arbustales abiertos bajos y matorrales semidesérticos.

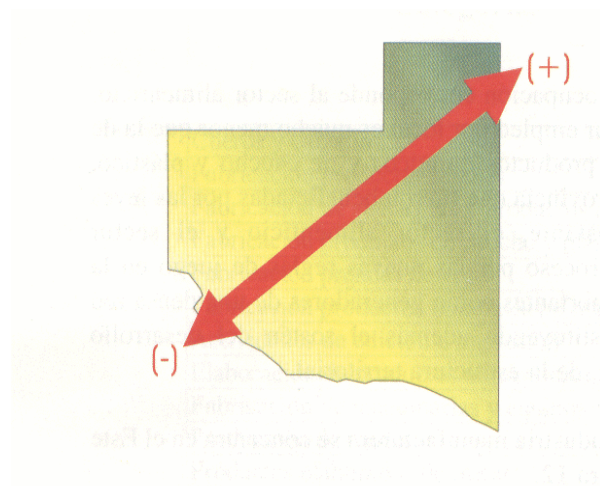


FIGURA 11.- Gradiente de productividad agropecuaria

Región Central: El clima es semiárido. La vegetación está compuesta de pastizales, matorrales, arbustales y bosques abiertos.

Región Oriental: El clima es sub-húmedo seco. Los suelos son más evolucionados, apreciándose una ganancia en el contenido de materia

orgánica. La vegetación está compuesta de cultivos, pastizales bajos y bosques abiertos.

Región Meridional: El clima es semiárido. Los suelos son intermedios entre poco evolucionados y evolucionados. La vegetación se compone fundamentalmente de arbustales, pastizales bajos y bosques abiertos.

Dentro de cada región fisiográfica se diferencian subregiones, basándose en los rasgos más sobresalientes del relieve, litografía o drenaje. El departamento Mará-Có, donde se realizó el estudio, se encuentra ubicado en la región Oriental, subregión de las planicies medanosas.

#### 1.1.-SUBREGION DE LAS PLANICIES MEDANOSAS

Esta subregión tiene una superficie de aproximadamente 9200 km<sup>2</sup>. Se encuentra ubicada en el extremo NE de la provincia y se localiza entre los meridianos 63° y 64° 15' oeste y los paralelos 35° y 37° 15' sur e incluye los departamentos Chapaleufú, Mará-Có, Quemú-Quemú, Catrilo y Atreucó. Limita al N con la provincia de Córdoba, al E con la de Buenos Aires, al S con el valle Argentino (subregión de las mesetas y valles) y al O con las subregiones de las planicies con tosca y la de las colinas y lomas.

En cuanto al clima, el sector N de ésta subregión se caracteriza por poseer un invierno más benigno, aunque las marcas mínimas pueden llegar a valores muy bajos (-13,6°C). La época estival es más cálida. Las precipitaciones difieren entre el N y el S en unos 80 mm, con un promedio anual en General Pico, cabecera del departamento Mará-Có de unos 1000 mm. Los vientos predominantes son del N-NE y S-SO. Su velocidad en el área N es algo superior que en el S. En General Pico, alcanza un promedio anual de 14 km./h y en Macachín 10 km./h.



Desde el punto de vista agroclimático es la subregión mejor dotada de toda la provincia, sus regímenes térmicos e hídricos son adecuados para obtener una buena producción agropecuaria.

El suelo es de textura franco arenosa fina, con 10% de arcilla y 15% de limo total. El suelo superficial (capa arable) tiene buen espesor, con alto contenido de materia orgánica.

En ésta subregión, la actividad principal es la ganadería, especialmente invernada y en menor grado, cría y re cría. La alfalfa sigue siendo uno de los cultivos más importantes, aunque en franco avance la implantación de praderas consociadas. Los cultivos anuales invernales más frecuentes son trigo, centeno, avena y cebada, y los de verano maíz, girasol, sorgo y soja. El maíz suele utilizarse como forraje diferido, para mantenimiento de la vaca de cría, en la época otoño-invierno.

## 1.2.-DEPARTAMENTO MARA-CO

Ocupa una superficie de 2500 km<sup>2</sup> y de acuerdo a los registros del Servicio Nacional de Sanidad Animal, delegación General Pico (Cabecera del dpto. Mará-Có), en el departamento Mará-Có, existen 577 predios, de los cuales 134 se dedican total o parcialmente a la cría de animales bovinos. La población bovina de dicho departamento es de aproximadamente 185.000 animales, de los cuales aproximadamente 15.000 corresponden a vacas de cría en periodo reproductivo.

## ANEXO II

### A.-TAMAÑO DE MUESTRA MINIMA PARA ESTIMAR PREVALENCIA CON UN GRADO DE PRECISION ESPECIFICADO (Ronald D. SMITH, 1995)

Si se desea detectar una enfermedad en una población y además estimar su prevalencia, el tamaño de muestra, para una población infinita, está dado por la siguiente fórmula:

$$N_{inf.} : \frac{P (1- P) Z^2}{D^2}$$

Donde:

P: Prevalencia esperada (como decimal)

Z: Grado de confianza de la estimación (para 95% de confianza Z: 1,96)

D: Máxima diferencia, que se acepta, entre la prevalencia observada y la real (como decimal).

Así, para una frecuencia esperada del 5% y error aceptable del 4% (20 % error relativo)

$$N_{inf.} : \frac{0.05 ( 1- 0.05) 1,96^2}{0.01^2} \quad \boxed{:1824}$$

Ahora bien, cuando el muestreo se hace sobre una población finita, se debe realizar la siguiente conversión:

$$N_{fin.} : \frac{N_{inf.}}{1 + (N_{inf.} - 1) / N}$$

para N: 15049

$$N_{\text{fin.}} : \frac{1824}{1 + (1823 / 15049)} \quad \boxed{:1627}$$

## **B.- PRUEBA DE INMUNODIFUSION (Daniel P. STITES; Abba I. TERR, 1993)**

El propósito de todas las técnicas de inmunodifusión es detectar la reacción de antígeno (Ag.) y anticuerpo (Ac.), mediante la reacción de precipitación.

Aunque la formación de complejos Ag.-Ac., en un medio semisólido como el agar, dependen de los electrolitos del amortiguador, el pH y la temperatura, los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de Ag. y Ac. La precipitación máxima se forma en el área de equivalencia, con disminución de su cantidad en las zonas de exceso de Ag. o exceso de Ac.

Las reacciones de inmunodifusión se pueden clasificar como sencillas y dobles. En la inmunodifusión sencilla, el Ag. o el Ac. permanecen fijos y el otro reactante se desplaza y se une con él. En la doble inmunodifusión ambos reactantes se pueden mover uno hacia el otro y precipitan en la zona de equivalencia.

### **Inmunodifusión doble en gel de agar. (IDGA)**

Esta técnica (prueba de Ouchterlony), se basa en el principio de que cuando el Ag y el Ac. difunden en un medio semisólido (por ejemplo agar), forman complejos inmunitarios estables que precipitan y se pueden analizar visualmente.

La prueba se realiza vertiendo agar disuelto en placas de vidrio o en cajas de Petri y permitiendo se endurezca. Se perforan pequeños orificios en el

agar, separados algunos milímetros. Las muestras que contienen Ag y Ac. se colocan en orificios opuestos y se permite que difundan uno hacia el otro, en una cámara húmeda, durante 24 o más horas. La visualización se realiza en cámara oscura con una luz que incida oblicuamente, y con ayuda de una lupa.

La formación de una sola línea de precipitación entre el Ag. y el Ac. correspondiente, de identidad con los controles positivos, se puede utilizar como una estimación de la pureza del Ag. y el Ac.

### **IDGA-Leucosis Bovina. (Instrucciones del fabricante)**

Corresponde a un “kit” comercial (Dr. BOMMELI AG–BERN–SWITZERLAND, comercializado por Hoechst Veterinär GmbH), que incluye:

- Ag. de Leucosis bovina para inmunodifusión: liofilizado, preparado con virus purificado y concentrado a partir de sobrenadante de un cultivo celular permanentemente infectado con el virus de la leucosis bovina. Los cultivos celulares utilizados corresponden a células de riñón de cordero (FLK) y/o cocultivo de células FLK y células de pulmón de murciélago [TB1/Lu (IVBL-12)]. Lote 803, Vto. 2-2002.
- Suero control positivo: liofilizado, derivado de bovinos infectados con el virus de la leucosis bovina. Lote 742, Vto. 4-2005.
- Mezcla de agar para inmunodifusión: mezcla de agar, sales y azida de sodio, como preservante. Lote 822, Vto. 4-2005.

#### Preparación de Reactivos.

Se disuelve el antígeno de leucosis bovina en 5 mL de agua destilada estéril.

Se disuelve el suero control positivo, en 24 mL de agua destilada estéril.

Se transfiere la mezcla de agar a un recipiente estéril, y se mezcla con aproximadamente 100 mL de agua destilada estéril. Se agregan 31 mL de ácido clorhídrico 1N y se lleva a 650 mL, como volumen final, con agua destilada estéril. El pH logrado debe ser 7,2, en caso contrario ajustarlo con hidróxido de sodio 1N ó ácido clorhídrico 1N. Se disuelve el agar en baño de agua hirviendo durante unos 15 minutos con agitación ocasional, y se lo deja enfriar en baño de agua a 60-70°C.

Se vierte el agar en placas de Petri de 10 cm. de diámetro, 19 mL en cada una, de tal manera que forme una capa de 2,5 mm de grosor. Se deja gelificar el agar colocando las placas de Petri abiertas sobre una superficie horizontal, luego de lo cual se tapan y se colocan en forma invertida en refrigerador (4°C), durante 24 hs, antes de ser utilizadas.

Al momento de ser utilizadas, dichas placas conteniendo el gel de agar, se dividen en cuatro cuadrantes (I a IV), siguiendo un sentido horario. En cada cuadrante, y utilizando un sacabocados, de acuerdo a las especificaciones del mismo dadas por los fabricantes del "kit", (ver Fig. 12), se realizan las perforaciones de pocillos, donde se procederá con la prueba de inmunodifusión, numerándose los mismos, en sentido horario, de 1 a 6.

En el orificio central se coloca el antígeno, hasta el borde del mismo (25-30 µl) en orificios opuestos (1 y 4), se coloca el suero control positivo (50-60 µl) y en los restantes 4 orificios (2,3,5 y 6), se colocan los sueros problema a evaluar (50-60 µl).

Se incuban a temperatura ambiente, en cámara húmeda, con una primera lectura a las 18-24 hs y una segunda lectura a las 48-96 hs, utilizando una luz de incidencia oblicua, sobre un fondo oscuro. (ver Fig. 13, 14 y 15 y Anexo VII, Foto 2)

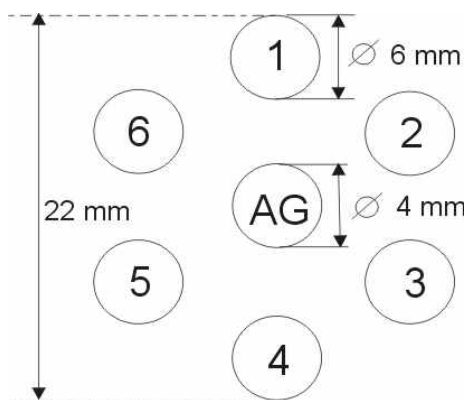


FIGURA 12.- Esquema del sacabocados

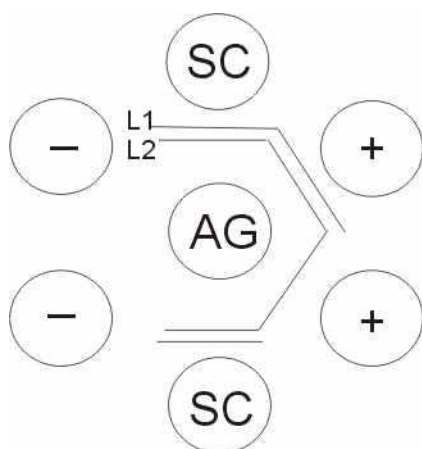


FIGURA 13

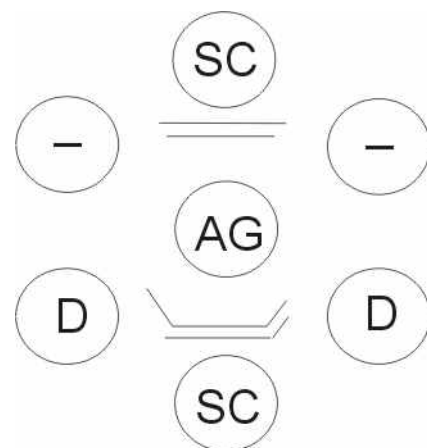


FIGURA 14.-

Interpretación de resultados  
 AG: Antígeno LEB  
 S C: Suero control positivo  
 L 1: Primera lectura, 18-24 hs.  
 L 2: Segunda lectura, 48-96 hs.

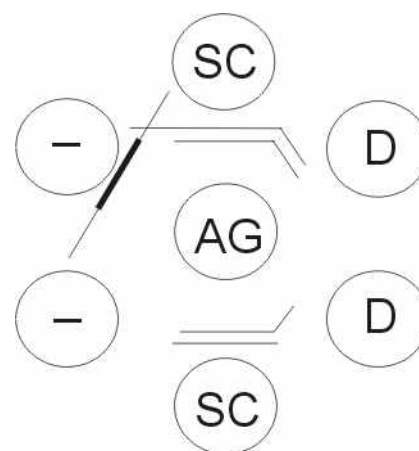


FIGURA 15.-

## ANEXO III

### "LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA: ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO EN REBAÑOS DE CRIA DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA - ARGENTINA" PLANILLA DE SANGRADO

PROTOCOLO DE MUESTREO N°:

FECHA:

- ESTABLECIMIENTO/PROPIETARIO:
- CARACTERISTICAS GRALES. DEL PREDIO:
- CARACTERISTICAS INSTALACIONES DE TRABAJO:
- CANTIDAD DE VACAS A MUESTREAR:

N°	CARAVANA	EDAD (MESES)	N° PARTO	RAZA	ESTADO GENERAL
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					

26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					



71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
106					
107					
108					
109					
110					
111					
112					
113					
114					
115					

116					
117					
118					
119					
120					
121					
122					
123					
124					
125					
126					
127					
128					
129					
130					
131					
132					
133					
134					
135					
136					
137					
138					
139					
140					
141					
142					
143					
144					
145					
146					
147					
148					
149					
150					
151					
152					
153					
154					
155					
156					
157					
158					
159					
160					

## ANEXO IV

### "LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA: ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO EN REBAÑOS DE CRIA DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA-ARGENTINA" INFORME EPIZOOTIOLOGICO

#### ESTABLECIMIENTO

1.-PREDIO N° #####

2.- FECHA <dd/mm/yy>

3.-PROPIETARIO O RAZON SOCIAL

---

4.-UBICACION

---

#### CARACTERISTICAS DE LA EXPLOTACION

5.1 CARNE <Y>

5.-TIPO DE EXPLOTACION : 5.2 LECHE <Y>

5.3 MIXTO <Y>

6.-SUPERFICIE EN HECTAREAS #####

7.-SUPERFICIE DEDICADA A LA CRIA #####

8.-CONDICIONES HIGIENICAS 8.1 BUENA \_\_\_ 8.2 REGULAR \_\_\_ 8.3 MALA

#### PLANTEL BOVINO

9.-CANTIDAD TOTAL DE BOVINOS #####

10.-CANTIDAD DE VACAS DE CRIA ####

---

11.-RAZA/S

12.-CANTIDAD DE TOROS REPRODUCTORES ###

13.-RAZA/S

14.-% DE REPOSICION ANUAL DE VACAS DE CRIA ###

15.-EDAD DE LA VACA AL PRIMER PARTO(MESES) ###

16.-EDAD DE LA VACA AL ULTIMO PARTO(MESES) ###

17.-TIPO DE PREÑEZ 17-1 NATURAL <Y>

17-2 I.A. <Y>

18.-ALIMENTACION: 18-1 PRADERAS NATURALES <Y>

18-2 PRADERAS ARTIFICIALES <Y>

18-3 CONCENTRADOS <Y>

18-4 OTROS <Y>

19.-TIPO DE PASTOREO: 19-1 EXTENSIVO <Y>

19-2 ROTATIVO <Y>

20.-RODEO DE CRIA: 20-1 ABIERTO <Y>

20-2 CERRADO <Y>

### **SANIDAD-MANEJO**

PRACTICA	FRECUENCIA	ELEMENTO	DESINFECCION
21.-VACUNACIONES _____			<Y>
22.-DESPARASITACIONES _____			<Y>
23.-DESCORNE _____			<Y>

24.-TATUAJE O MARCA \_\_\_\_\_ <Y>

25.-TACTO \_\_\_\_\_ <Y>

26.-TUBERCULINIZACION \_\_\_\_\_ <Y>

27.-OTROS \_\_\_\_\_ <Y>

28.-NOMBRE CUALES DE LAS OPCIONES ANTERIORES SON REALIZADAS  
POR PROFESIONAL VETERINARIO

---

### **EPIZOOTIOLOGIA**

29.-"REALIZO CON ANTERIORIDAD PRUEBAS PARA IDENTIFICAR LEB EN  
EL RODEO? <Y>

29 -1 "QUE PRUEBA? \_\_\_\_\_ 29-2 RESULTADOS

---

30.-CAUSAS DE ELIMINACION PREMATURA DE VACAS

---

31.-"HA OBSERVADO TUMORES SUPERFICIALES EN VACAS DE CRIA Y/O  
TOROS? <Y>

32.-CUANDO Y CUANTOS

---

33.-COJERAS <Y>

34.-CUANDO Y CUANTOS

---

35.-SI HUBO DESCARTE DE ANIMALES VIEJOS,"CONOCE SI SE  
EFECTUARON DECOMISOS? <Y>

**MANEJO DE LOS TERNEROS**

36.-ALIMENTACION: 36-1 MADRE <Y>

36-2 MADRE SUSTITUTA <Y>

36-3 CRIA ARTIFICIAL <Y>

37.-DESTETE EN DIAS ###

**38.-PRESENCIA EN EL REBAÑO DE OTRAS ENFERMEDADES:**

38-1 TBC. <Y>

38-2 BRUC. <Y>

38-3 IBR. <Y>

38-4 BVDV. <Y>

38-5 OTRAS <Y>

**39-OBSERVACIONES**

---

---

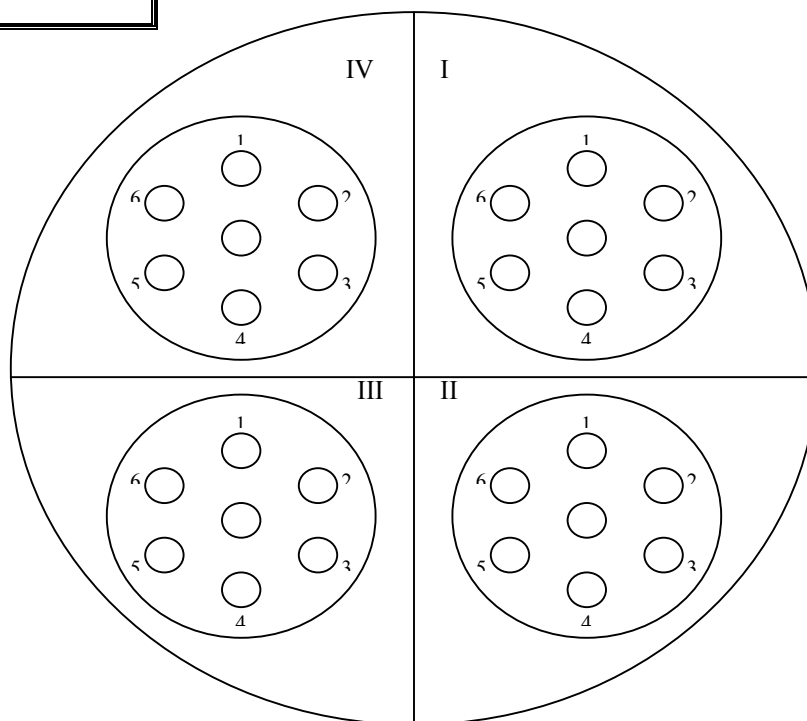
## ANEXO V

LEB: Estudio seroepidemiológico en rebaños de cría de la Pcia. de La Pampa - ARGENTINA

### RESULTADOS PRUEBA IDGA.

Protocolo N°:	Propietario:	Fecha:
---------------	--------------	--------

Cant. Sueros:
---------------



Cuadrante	Placa N°:		Lectura:		
	Pocillo	Suero N°	24 hs.	48 hs	72 hs.
I	2				
	3				
	5				
	6				
II	2				
	3				
	5				
	6				
III	2				
	3				
	5				
	6				
IV	2				
	3				
	5				
	6				

Observaciones:

---



---



---

## ANEXO VI

**TABLA A.- Distribución por razas de vacas muestreadas en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa – ARGENTINA.**

Rebaño	A. Angus	Heresfor	Shorthorn	Charolais	Holando	Sta. Gertrudis	Flekvie	Cebú	Cruza AA-Heref.	Cruza Charolais	Cruza Holando	Cruza Heresfor	Cruza Indicas	Otras cruza	Total por Rebaño
1	4	6	14	21					9	17				9	80
2	3			33						4					40
3	9				2					29					40
4	3			4	1	1			1	26	4				40
5	37	1	2												40
6	23		3		2				5		3			4	40
7	17	1	17						3					2	40
8	73	1	3						3						80
9	58	2	3	1					9	2	1			2	80
10	130	16							14						160
11	53		11						12		1			2	79
12	109	10	12	6	9				13					1	160
13	67			6	1				6						80
14	87	32	9	6			1		25						160
15	12	9							18	1					40
16	8				3				2					7	20
17	68			6	2				2	1	1				80
18	34								36			10			80
19	50	3	2	5					4	15		1			80
20	8	1	2					1		1			7		20
21		40													40
22			19								1				20
23	10		5											5	20
24			19									1			20
25	4			2	5						9				20
26		2									17				19
27	10	1			3				6						20
28	17				2					1					20
29	8	3							9						20
30		160													160
<b>Total</b>	<b>902</b>	<b>288</b>	<b>121</b>	<b>90</b>	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>177</b>	<b>97</b>	<b>37</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>34</b>	<b>1798</b>
<b>%</b>	<b>50,2</b>	<b>16,0</b>	<b>6,7</b>	<b>5,0</b>	<b>1,7</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>9,8</b>	<b>5,4</b>	<b>2,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>	<b>1,9</b>	<b>100,0</b>



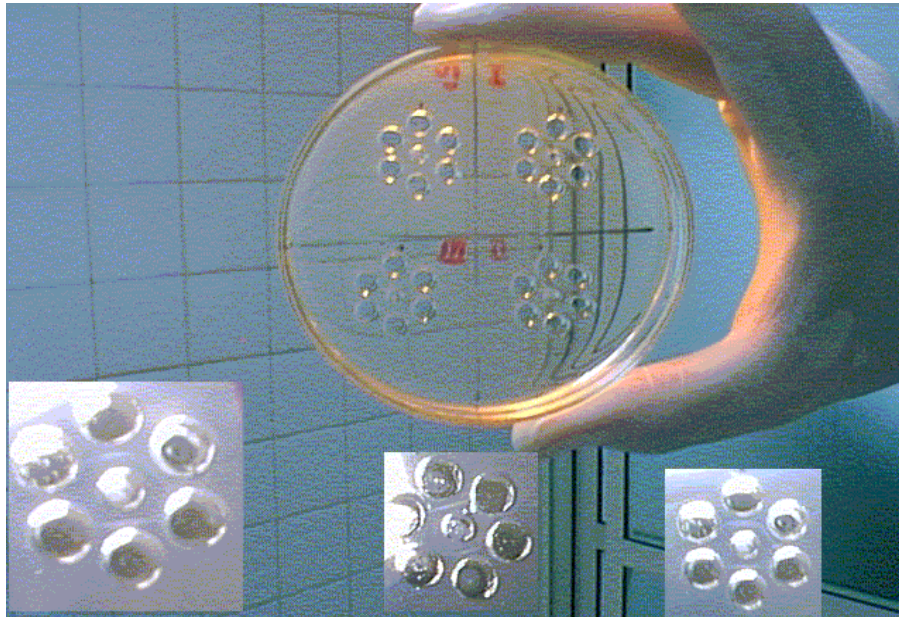
**TABLA B.- Distribución por edades de vacas muestreadas, en 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA.**

Rebaño	± 25 meses	± 37 meses	± 49 meses	± 61 a 120 meses	Total por
Nº	1er. parto	2do. parto	3er. parto	4to. o + parto	Rebaño
1	18	16	12	34	80
2	2	4	6	28	40
3	1	4	7	28	40
4	10	6	9	15	40
5	0	5	12	23	40
6	7	8	10	15	40
7	5	10	15	10	40
8	10	23	6	41	80
9	6	10	31	33	80
10	29	10	17	104	160
11	11	17	16	35	79
12	8	18	38	96	160
13	19	13	0	48	80
14	32	19	14	95	160
15	6	3	11	20	40
16	5	3	3	9	20
17	5	10	20	45	80
18	6	7	6	61	80
19	0	24	7	49	80
20	4	6	4	6	20
21	19	5	2	14	40
22	4	2	7	7	20
23	4	4	6	6	20
24	0	4	4	12	20
25	2	7	3	8	20
26	1	2	3	13	19
27	0	0	1	19	20
28	2	4	4	10	20
29	3	3	5	9	20
30	28	20	15	97	160
<b>Total</b>	<b>247</b>	<b>267</b>	<b>294</b>	<b>990</b>	<b>1798</b>
<b>(%)</b>	<b>(13,74%)</b>	<b>(14.85%)</b>	<b>(16.35%)</b>	<b>(55,06%)</b>	<b>(100%)</b>

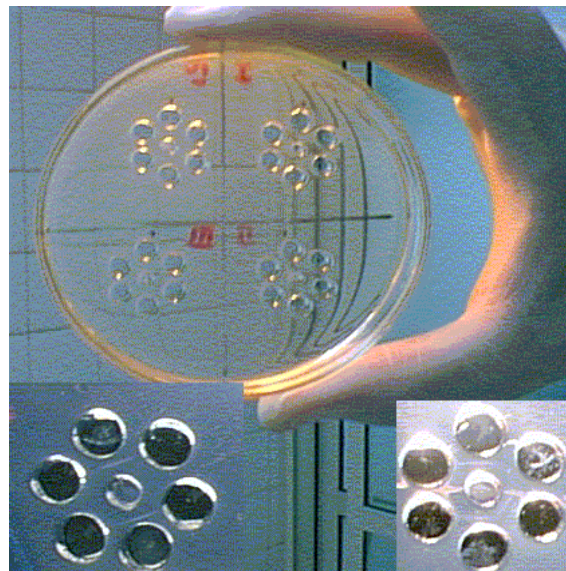
**TABLA C.- Resultados prueba IDGA-LEB, en sueros de vacas de 30 rebaños de cría. Departamento Mará-Có, La Pampa - ARGENTINA.**

Protocolo Nº	Cantidad de muestras	Resultados Prueba IDGA			Prevalencia	%
		Positivo	Sospechoso	Negativo		
1	80	-	-	80	0/80	-
2	40	-	-	40	0/40	-
3	40	-	-	40	0/40	-
4	40	1	-	39	1/40	2,50
5	40	-	-	40	0/40	-
6	40	-	-	40	0/40	-
7	40	-	-	40	0/40	-
8	80	-	-	80	0/80	-
9	80	-	-	80	0/80	-
10	160	-	-	160	0/160	-
11	79	-	-	79	0/79	-
12	160	-	-	160	0/160	-
13	80	-	-	80	0/80	-
14	160	-	-	160	0/160	-
15	40	-	-	40	0/40	-
16	80	-	-	80	0/80	-
17	20	1	-	19	1/20	5,00
18	80	-	-	80	0/80	-
19	80	-	-	80	0/80	-
20	20	1	-	19	1/20	5,00
21	40	-	-	40	0/40	-
22	20	-	-	20	0/20	-
23	20	-	-	20	0/20	-
24	20	-	-	20	0/20	-
25	20	-	-	20	0/20	-
26	19	-	-	19	0/19	-
27	20	-	-	20	0/20	-
28	20	-	-	20	0/20	-
29	20	-	-	20	0/20	-
30	160	-	-	160	0/160	-
<b>Total</b>	<b>1798</b>	<b>3</b>	<b>-</b>	<b>1795</b>	<b>3/1798</b>	<b>0,17</b>

## ANEXO VII



**FOTOGRAFIA 1.- Prueba IDGA-LEB - Observación de bandas de precipitación correspondientes a sueros controles positivos, débil positivo y negativos.**



**FOTOGRAFIA 2.- Prueba IDGA-LEB. bandas de precipitación correspondientes a suero control positivo y sueros problema de reacción positiva.**