



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA
HOYA DE LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR
MEDIO DEL METODO DE ELISA.”**

Tesis de grado previa a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

AUTORA:

JANETH KAROLINA APOLO CARRIÓN

1859
DIRECTOR:

Dr. SEGUNDO BARRAGÁN FIERRO Mg. Sc

Loja – Ecuador

2014

**“DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE EN
HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL METODO DE ELISA.”**

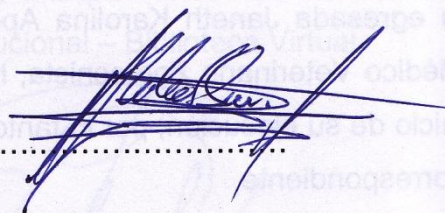
Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Aprobada:

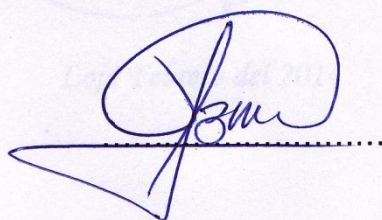
Dr. Javier Vicente Cevallos Cueva Mg. Sc.....
Presidente del Tribunal



Dr. Victor Rolando Sisalima Jara Mg. Sc.
Miembro del Tribunal



Dr. Juan Alberto Parra Ch., Mg Sc.
Miembro del Tribunal




CERTIFICACIÓN

Dr. Segundo Barragán Fierro Mg. Sc.
Director de Tesis

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado "DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL METODO DE ELISA", realizado por la egresada Janeth Karolina Apolo Carrión, previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, ha sido dirigido y prolijamente revisado desde el inicio de su ejecución; por lo tanto, se autoriza su presentación para la calificación correspondiente.

Loja, Enero de 2014.


Dr. Segundo Barragán Fierro Mg. Sc.
Director de Tesis

AUTORÍA

Yo, **Janeth Karolina Apolo Carrion**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su actor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, a la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual



Janeth Karolina Apolo Carrion

Loja Febrero del 2014

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, Janeth Karolina Apolo Carrión, declaro ser autora, de la tesis titulada **“DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL METODO DE ELISA”** como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 12 días del mes de febrero del dos mil catorce, firma el autor.

Firma: 

Autora: Janeth Karolina Apolo Carrión.
C.I: 1104643273
Dirección: Balsas, El Oro - Ecuador
Correo Electrónico: janeka_1987@hotmail.com
Teléfono: 0988207861

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Dr. Segundo German Barragan F. Mg, Sc.

Tribunal de Grado: Dr. Javier Vicente Cevallos Cueva Mg. Sc
Dr. Victor Rolando Sisalima Jara Mg, Sc.
Dr. Juan Alberto Parra Chalan Mg, Sc.

AGRADECIMIENTO

Al haber culminado mis estudios universitarios y este trabajo investigativo, quiero dejar constancia de mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, que me abrió las puertas para ingresar a la prestigiosa Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables; a sus autoridades, que día a día forjan el porvenir de la entidad, así como a mis maestros quienes me brindaron sus conocimientos para llegar a ser una profesional competitiva.

De igual manera agradezco, al Dr. Segundo Barragán F. Mg. Sc., Director de Tesis, quien con sus valiosos conocimientos y paciencia orientó la realización de este trabajo investigativo.

Janeth Karolina Apolo Carrión

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo, fruto de mi esfuerzo, a mis queridos padres que supieron apoyarme siempre para llegar a ser la profesional que soy ahora; a mi adorada hija, mis hermanos y familiares, quienes contribuyeron en mi deseo de triunfar; de igual manera a mis mejores amigos y compañeros con quienes compartí las aulas universitarias y que ahora son parte fundamental de mi vivir. A todos les agradezco infinitamente de corazón gracias por su paciencia.

Janeth Karolina Apolo Carrión

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Pagina |
|---|--------|
| CERTIFICACIÓN..... | iii |
| AUTORÍA..... | iv |
| CARTA DE AUTORIZACIÓN..... | v |
| AGRADECIMIENTO..... | vi |
| DEDICATORIA..... | vii |
| ÍNDICE GENERAL..... | viii |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | xii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xiv |
| RESUMEN..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA..... | 3 |
| 2.1.1 Definición..... | 3 |
| 2.1.2 Historia..... | 4 |
| 2.1.3 Distribución..... | 5 |
| 2.1.4 Sinónimos..... | 5 |
| 2.2 ETIOLOGÍA..... | 6 |
| 2.2.1 Características Estructurales..... | 7 |
| 2.2.2 Organización Genómica..... | 9 |
| 2.2.3 Transcripción y Eventos Post – Transcripcionales..... | 11 |
| 2.2.4 La Glicoproteína gp51..... | 12 |
| 2.2.5 Ciclo Replicativo..... | 13 |
| 2.2.6 Variabilidad Genética de VLB..... | 15 |
| 2.3 PATOGENIA..... | 17 |
| 2.4 HUÉSPEDES SUSCEPTIBLES..... | 18 |
| 2.4.1 Síntomas..... | 18 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.8 | TRANSMISIÓN..... | 20 |
| 2.5.1 | Transmisión Natural o Vertical..... | 21 |
| 2.5.2 | Transmisión Horizontal..... | 23 |
| 2.5.2.1. | Transmisión por sangre..... | 24 |
| 2.6 | LESIONES..... | 24 |
| 2.7 | DIAGNÓSTICO..... | 27 |
| 2.8 | INMUNIDAD DE LA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA..... | 28 |
| 2.9 | EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL..... | 30 |
| 2.9.1 | Erradicación..... | 30 |
| 2.9.2 | Vacunación..... | 30 |
| 2.10 | HEMATOLOGÍA..... | 31 |
| 2.10.1 | Tinción de Wright..... | 31 |
| 2.10.2 | Linfocitos..... | 33 |
| 2.10.3 | Valores Normales Sanguíneos en Bovinos..... | 34 |
| 2.11 | ELISA..... | 34 |
| 2.11.1 | Elisa Directo..... | 35 |
| 2.11.2 | Elisa Indirecto..... | 35 |
| 2.11.3 | Elisa Sandwich “DAS”..... | 36 |
| 2.11.4 | Elisa Sándwich “HADAS”..... | 37 |
| 2.11.5 | Elisa Competitivo..... | 38 |
| 2.11.6 | Método de Elisa..... | 38 |
| 2.11.7 | Kit para la Detección de Anticuerpos Frente al Virus de la Leucosis Enzootica Bovina (LEB)..... | 39 |
| 2.11.8 | Reactivos..... | 40 |
| 2.11.9 | Precauciones y Advertencias para los Usuarios..... | 41 |
| 2.11.10 | Preparación de los Reactivos..... | 42 |
| 2.12 | TRABAJOS RELACIONADOS..... | 43 |
| 3 | MATERIALES Y METODOS..... | 46 |
| 3.1 | Materiales..... | 46 |
| 3.1.1 | Materiales de Campo..... | 46 |
| 3.1.2 | Materiales de Laboratorio..... | 46 |
| 3.1.3 | Muestras Biológicas..... | 47 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.1.4 | Materiales de Oficina..... | 47 |
| 3.2 | MÉTODOS..... | 48 |
| 3.2.1 | Ubicación de la Investigación..... | 48 |
| 3.2.2 | Método de Muestreo..... | 48 |
| 3.2.3 | Población del Universo Geográfico..... | 48 |
| 3.2.4 | Tamaño de la Muestra..... | 49 |
| 3.2.5 | Determinación de la Fracción del Muestreo..... | 50 |
| 3.2.6 | Descripción y Adecuación del Área de Trabajo..... | 50 |
| 3.2.7 | Descripción de las Unidades Experimentales..... | 53 |
| 3.2.8 | Diseño de la Investigación..... | 53 |
| 3.2.9 | Variables de Estudio..... | 53 |
| 3.2.9.1. | Prevalencia de leucosis bovina en la Hoya de Loja..... | 54 |
| 3.2.9.2. | Prevalencia de leucosis bovina según el Sector..... | 54 |
| 3.2.9.3. | De acuerdo al número de linfocitos..... | 54 |
| 3.2.10 | Toma de Datos..... | 54 |
| 3.2.11 | Análisis Estadístico Descriptivo..... | 54 |
| 3.2.12 | Manejo de los Animales..... | 55 |
| 3.2.13 | Método de Recolección de Muestras..... | 55 |
| 3.2.14 | Protocolo del Ensayo para ELISA..... | 56 |
| 3.2.14.1. | Lectura de resultados..... | 57 |
| 3.2.14.2. | Cálculos..... | 57 |
| 3.2.14.3. | Interpretación de resultados..... | 58 |
| 3.2.15 | Protocolo para el Hemograma..... | 58 |
| 3.2.15.1. | Preparación del frotis de sangre..... | 58 |
| 3.2.15.2. | Para teñir la preparación..... | 59 |
| 4. | RESULTADOS..... | 60 |
| 4.1 | PREVALENCIA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE LOJA..... | 60 |
| 4.1.1 | Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja por Sectores..... | 61 |
| 4.1.2 | Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja Sector Sur..... | 62 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.3 | Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Norte..... | 63 |
| 4.1.4 | Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Oeste..... | 65 |
| 4.1.5 | Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Este..... | 66 |
| 4.1.6 | Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio, Sector Sur..... | 68 |
| 4.1.7 | Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio, Sector Norte..... | 70 |
| 4.1.8 | Diferencia en el contaje de linfocitos entre animales positivos y negativos por sectores de estudio, sector Oeste..... | 72 |
| 4.1.9 | Diferencia en el contaje de linfocitos entre animales positivos y negativos por sectores de estudio, sector Este..... | 74 |
| 5. | DISCUSION..... | 77 |
| 5.1 | Prevalencia Leucosis Enzootica Bovina En La Hoya De Loja..... | 77 |
| 5.1.1 | Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja por Sectores..... | 77 |
| 5.1.2 | Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio..... | 78 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 79 |
| 7. | RECOMENDACIONES..... | 80 |
| 8. | BIBLIOGRAFIA..... | 81 |
| 9. | ANEXOS..... | 85 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Página |
|--|---------------|
| Cuadro 1: Promedios Normales de Elementos Celulares de la Sangre de Bovino..... | 34 |
| Cuadro 2: Cifras Promedio de Leucocitos los Bovinos..... | 34 |
| Cuadro 3: Reactivos para Elisa..... | 41 |
| Cuadro 4: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Norte de la Hoya de Loja..... | 50 |
| Cuadro 5: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Sur de la Hoya de Loja..... | 51 |
| Cuadro 6: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Este de la Hoya de Loja..... | 52 |
| Cuadro 7: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Oeste de la Hoya de Loja..... | 52 |
| Cuadro 8: Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya De Loja en porcentaje..... | 60 |
| Cuadro 9: Prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina en la Hoya de Loja con muestras positivas y negativas por sectores..... | 61 |
| Cuadro 10: Prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina en casos positivos y negativos en los barrios del sector sur de la hoya de Loja..... | 62 |
| Cuadro 11: Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina con casos positivos y negativos en el sector Norte..... | 63 |
| Cuadro 12: Prevalencia de leucosis enzoótica bovina en los barrios del sector Oeste..... | 65 |
| Cuadro 13: Prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina con casos positivos y negativos en los barrios del sector este de la hoya de Loja sector Este..... | 67 |
| Cuadro 14: Diferencia en el contaje de linfocitos entre animales positivos y negativos en el sector Sur..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 15: Diferencia en el conteo de linfocitos positivos y negativos en el sector Norte de la hoya de Loja..... | 70 |
| Cuadro 16: Diferencia en el conteo de linfocitos en animales positivos y negativos en el sector Oeste..... | 73 |
| Cuadro 17: Diferencia en el conteo de linfocitos en animales positivos y negativos en el sector Este..... | 75 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Árbol filogenético..... | 7 |
| Figura 2. Esquema de una partícula de VLB..... | 8 |
| Figura 3. Esquema de la organización genómica de VLB..... | 10 |
| Figura 4. Mecanismo de transmisión de la leucosis bovina..... | 20 |
| Figura 5. Porcentaje total de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja... | 60 |
| Figura 6. Prevalencia de Leucosis Bovina por sectores..... | 61 |
| Figura 7. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector Sur de la Hoya de Loja..... | 63 |
| Figura 8. Prevalencia de Leucosis Bovina en el sector Norte..... | 64 |
| Figura 9. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector Oeste..... | 66 |
| Figura 10. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector este de la Hoya de Loja..... | 67 |
| Figura 11: Recolección de muestras..... | 85 |
| Figura 12: Centrifugación de muestras..... | 85 |
| Figura 13: Ordenamiento de muestras en tubos eppendorf con su respectiva identificación..... | 86 |
| Figura 14: Elaboración de placas para exámenes hematológicos..... | 87 |
| Figura 15: Kit de análisis de anticuerpos contra el virus de la Leucosis bovina.. | 88 |
| Figura 16: Placas recubiertas con VLB..... | 88 |
| Figura 17: Tesista en el laboratorio..... | 89 |
| Figura 18: Lector de Microelisa..... | 89 |
| Figura 19: Tesista y Director..... | 90 |
| Figura 20: Sectores de la Hoya de Loja..... | 91 |
| Figura. 21: Informe de resultados Positivos..... | 94 |

RESUMEN

El presente trabajo realizado en la Hoya de Loja, demostró que la enfermedad de la leucosis bovina se encuentra presente. En un porcentaje de prevalencia del 4.5%; el objetivo fue diagnosticar la presencia de Leucosis Enzootica Bovina (LEB), mediante el método de ELISA y la Biometría Hemática. Se examinaron 150 muestras de sangre obtenidas de hatos bovinos de la Hoya de Loja; las muestras se tomaron en tubos vacutainer de la vena yugular con anticoagulante (150 muestras), y sin anticoagulante (150 muestras); se trasladaron en hielo seco al laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja. Los exámenes positivos por el método de Elisa se encontraron en los sectores Sur y Norte de la Hoya de Loja; y en la Biometría Hemática se vieron porcentajes de linfocitos en los animales infectados que presentan una elevación poco marcada en cuanto a los valores normales de linfocitos (40-70%) para los bovinos.

ABSTRACT

This work in the Hoya de Loja, showed that the disease bovine leukosis is present. In a prevalence rate of 4.5%, the aim was to diagnose the presence of enzootic bovine leukosis (LEB) by ELISA and blood count . 150 blood samples obtained from cattle herds in the Hoya de Loja were examined, the samples were taken in vacutainer tubes with anticoagulant jugular vein (150 samples) and without anticoagulant (150 samples) were transferred on dry ice to the laboratory Integral diagnosis Race Vet Veterinary Medicine , National University of Loja. Positive tests by Elisa method were found in the South and North of the Hoya de Loja sectors blood count and the percentages of lymphocytes were seen in the infected animals having a little marked elevation in terms of normal lymphocyte (40-70 %) for cattle

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería en nuestro país, y en especial en nuestra región se encuentra encaminada en un desarrollo poco incipiente; en donde la mayoría de ganaderos llevan un manejo de sus hatos de forma extensiva, es así como la falta de cuidados sanitarios y la falta de un manejo adecuado han permitido el desconocimiento sobre la situación actual acerca del virus de la Leucosis Enzootica Bovina (LEB), sumado a ello el desinterés por parte de las autoridades competentes en cuanto al estudio de dicha enfermedad.

Una de las causas más importantes que puede provocar pérdidas en la producción ganadera bovina, es la presencia de la Leucosis Enzootica Bovina (LEB), ya que es una enfermedad viral, contagiosa, además de ser un foco de infección para el sector, afecta la economía del ganadero, de manera considerable; ya que el virus causa problemas como menor producción de leche, aumento de ganglios, anemia entre otros y que al presentarse no se toman las medidas correctas en el control de la misma.

Por otra parte se debe considerar el poco o nulo conocimiento sobre la presencia de la Leucosis Enzootica Bovina (LEB), debido a la falta de asesoramiento técnico que reciben los ganaderos; sumándose a ello la falta de técnicas de campo para diagnosticar la presencia del virus, dando como consecuencia la disminución de calidad y pérdidas económicas cuantiosas para los ganaderos de la región en especial de la Hoya de Loja.

La presente investigación pretende dar un conocimiento adecuado de la situación actual del virus de la enfermedad conocida como Leucosis Enzootica Bovina (LEB), para lo cual es importante el uso de técnicas de diagnóstico serológico como es el método de ELISA, que es una técnica específica para la detección de anticuerpos en la sangre de los animales infectados. Los resultados permitieron obtener información valiosa y adquirir

datos específicos para la realización de un control efectivo de la enfermedad, en los bovinos de la Hoya de Loja.

Esta investigación, realizada en las ganaderías bovinas de la Hoya de Loja, permitió conocer por el método de Elisa la prevalencia de la Leucosis Enzoótica Bovina, de las 150 hembras bovinas 3, fueron positivos 4.5%, permitiendo generar información básica para fundamentar el diagnóstico, control, erradicación y vigilancia sanitaria de esta enfermedad y, a su vez, determinar los focos endémicos de la misma.

Para la realización del presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la presencia de la Leucosis Enzoótica Bovina en las distintas ganaderías de la Hoya de Loja;
- Establecer el porcentaje de animales positivos que se presentan en la Hoya de Loja; y,
- Identificar la zona con mayor prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA

2.1.1 Definición

La leucosis bovina (LB) o leucosis enzoótica bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa, crónica, viral, contagiosa, que afectan actualmente al ganado bovino. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero dentro de los tres años posteriores al contagio alrededor del 30% de los afectados desarrollará linfocitosis persistente y una proporción menor linfosarcomas en diversos órganos (Baruta, et al, 2011).

Afecta al tejido linfoide y aunque todas las razas son susceptibles, su frecuencia es predominante en el ganado lechero adulto. El rasgo patológico distintivo es la transformación neoplásica de linfocitos, los cuales proliferan anárquicamente infiltrando órganos diversos y generando tumores. El proceso neoplásico afecta con frecuencia a ganglios linfáticos, corazón, abomaso, útero, bazo, riñones y con menor frecuencia a médula ósea, canal espinal, hígado y vejiga.

El cuadro clínico más frecuente es la disminución de la producción láctea, el agrandamiento de ganglios linfáticos, la pérdida de peso, emaciación, anemia, exoftalmo (ojo fuera de la órbita) y otras manifestaciones que dependen del órgano de asiento de los tumores. Invariablemente la enfermedad es mortal. La LEB es producida por un virus (BLV) que es el prototipo del Género Deltarretrovirus de la Familia Retroviridae (Giraudó, et al, 2010).

La presentación de la enfermedad se puede dar como **Linfocitosis persistente**, en la cual se detecta un incremento sostenido del número

absoluto de linfocitos en la sangre, una presentación linfoproliferativa tumoral en forma de linfosarcoma o linfoma maligno y también se puede manejar una forma en la que los animales tienen anticuerpos anti-virus de leucosis bovina, pero sin linfocitosis persistente ni lesiones tumorales.

Se ha definido la **linfocitosis persistente** por el Comité Internacional de Leucosis, como un incremento en el número absoluto de linfocitos de tres o más desvíos estándar sobre la media normal determinada para la raza respectiva y el grupo etario de un rodeo libre de leucosis.

La enfermedad suele manifestarse en curso clínico lento, con un periodo de incubación que puede variar entre 1 a 5 años, por tanto afecta más comúnmente a animales mayores de 2 años. Existen animales que permanecen asintomáticos por toda su vida, por otro lado solamente el 30 al 70 % presentan linfocitosis persistente y un porcentaje aún menor 0.1 al 10% de los animales eventualmente desarrollan tumores que es la forma letal de la enfermedad (Gatti, 2007).

2.1.2 Historia

Las primeras descripciones de la LEB datan de 1871 en Alemania, realizadas por Leisering. Se cree que los primeros casos aparecieron en la zona de Memel (Lituania) y luego se desplazaron hacia el oeste del continente. En los años posteriores a la Segunda Guerra Mundial se incrementaron los casos de la enfermedad con tumores en Alemania y otros países del este de Europa, lo que originó la profundización de las investigaciones en esta zona.

A su vez, vacas infectadas fueron exportadas desde las costas del Mar Báltico a EEUU y así llegó la enfermedad a América, expandiéndose por EEUU y Canadá, principalmente en el ganado lechero. Los demás países de

América probablemente la han adquirido a través de importaciones para mejorar los rebaños de los mismos.

El término de Leucosis fue introducido por Dobberstein, aunque la primera descripción detallada de la leucosis se debe a Knuth y Volkmann en 1916. En Hannover, Alemania, Gotze inicia durante 1953 una amplia investigación sobre leucosis bovina.

El número de casos aumentó sustancialmente tras la segunda guerra mundial, época para la cual las naciones europeas así como Estados Unidos habían notificado su presencia. En 1954 Gotze emplea la linfocitosis persistente en conteo sanguíneo de leucocitos para diagnóstico de la leucosis enzoótica bovina. Bendixen en Dinamarca, elabora su propia clave hematológica (Baruta et al, 2011).

2.1.3 Distribución

El virus de la BLV tiene una distribución mundial, ha sido una de las principales causas de pérdidas económicas en los hatos lecheros. No hay evidencia de que BLV es transmisible a los seres humanos, y el virus se inactiva rápidamente por la pasteurización de la leche. Sin embargo, la pérdida de los mercados internacionales y el efecto de publicidad adversa en el mercado nacional, tienen el potencial ser económicamente desventajoso para la industria láctea, de ahí la motivación para el nacional programa de erradicación (Macarthur, 2005).

2.1.4 Sinónimos

Leucosis enzoótica bovina, leucosis linfoide, leucosis viral bovina BVL. linfomatosis bovina, linfositomatosis bovina, leucemia bovina, linfosarcoma bovino, linfoma maligno bovino (Descriptor en Ciencias de la Salud, 2012).

2.2 ETIOLOGÍA

Clasificación del agente etiológico

Familia: Retroviridae

Subfamilia: Oncoviridae

Género: Deltavirus

Proteínas principales: gp 51 – p 24

Material genético: RNA

Genoma: 8714 nucleotidos (nt) (Meza, 2008).

El virus de la leucosis enzoótica bovina pertenece a la familia Retroviridae, y al género Deltaretrovirus, con los cuales comparte dos características particulares:

- 1) Invierten el orden en el que naturalmente fluye la información genética en los sistemas biológicos, ya que son virus de ARN por lo que necesitan de una transcriptasa reversa para convertir este ARN en ADN.
- 2) Integran su genoma en el genoma del hospedero. Este proceso se encuentra mediado por una enzima denominada integrasa. La forma integrada de un retrovirus es denominada provirus. Los genes de este provirus son expresados por mecanismos celulares y se sintetizan así, las nuevas partículas virales. El mismo comparte su organización genómica con los virus linfotrópicos de células T de humanos (HTLV-1y HTLV-2) y de simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3) (Moratorio, 2012).

Los virus integrantes del género Deltaretrovirus son capaces de regular la expresión de sus propios genes, mediante la síntesis de proteínas reguladoras expresadas a partir de su propio genoma.

Esta propiedad, conferida por una región genómica ubicada entre el gen “**env**” (envoltura) y el LTR3’, es compartida por todos los lentivirus que provocan inmunodeficiencia en humanos (HIV), simios (SIV), bovinos (BIV) y felinos (FIV), entre otros; como el virus de la Anemia Infecciosa Equina (EIAV), virus de la Artritis- Encefalitis Caprina (CAEV) y virus Visna-Maedi (VISNA); y los espumavirus, como el virus espumoso de los simios (SFV); y les confiere el nombre de “retrovirus complejos” (Moratorio, 2012).

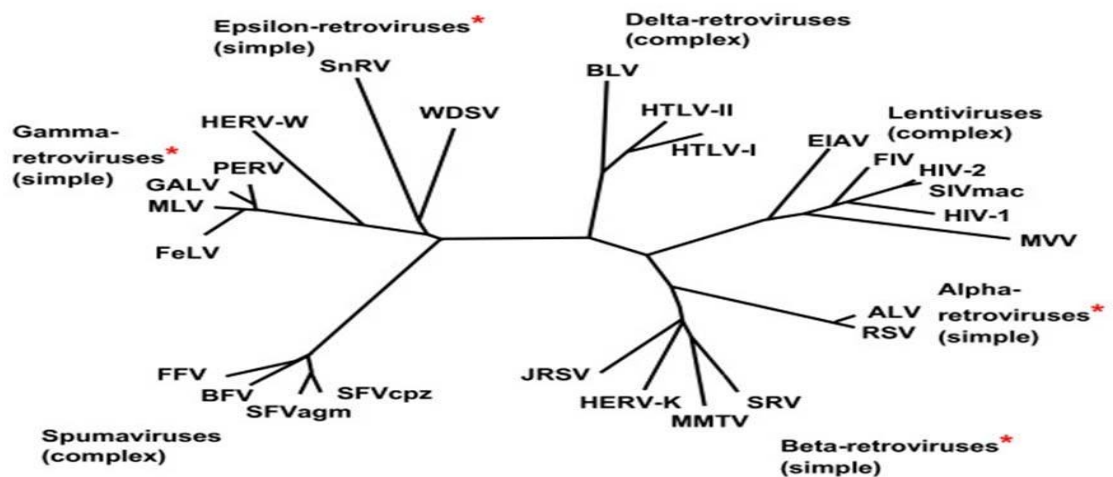


Figura 1. Árbol filogenético, en forma de estrella, en donde se representan las relaciones entre los diferentes miembros de la familia Retroviridae, basado en la secuencia del gen pol y realizado mediante el método de “neighbor-joining”. SnRV, retrovirus de serpiente; WDSV, virus del sarcoma de leucomas dérmicos; BLV, Virus de la Leucosis Bovina; EIAV, virus de la Anemia Infecciosa Equina; RSV, Virus del Sarcoma de Rous; IAP, partícula intrasisternal tipo A de ratón; FeLV, Virus de la Leucosis Felina (Moratorio, 2012).

2.2.1 Características Estructurales

La partícula viral de VLB presenta entre 80 y 120nm de diámetro, es un virión envuelto (presenta una envoltura lipídica) y de forma esférica (Figura 2).

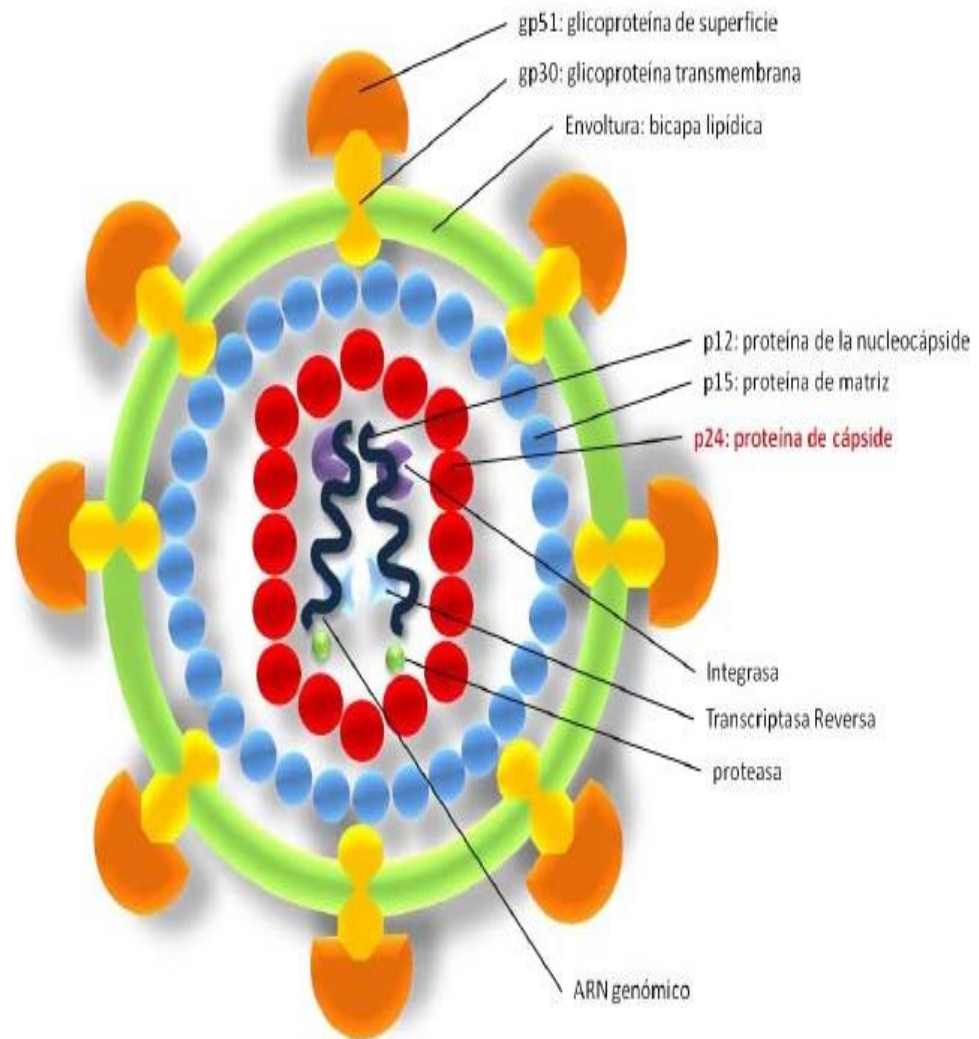


Figura 2. Esquema de una partícula de VLB. Del interior al exterior, dos copias de ARN genómico junto con proteína de la nucleocápside, asociado a la proteasa, transcriptasa inversa e integrasa; cápside, matriz, envoltura lipídica con glicoproteínas transmembrana y glicoproteínas de superficie (Moratorio, 2012).

El empaquetamiento del material genético con las proteínas virales para formar la partícula viral es un proceso complejo, que involucra primeramente la unión de regiones específicas del ARN genómico con la proteína mayoritaria de cápside, la proteína p24. Este complejo ribo-proteico primario, se ensambla junto con las enzimas virales transcriptasa inversa, proteasa e integrasa, y un número menor de copias de las proteínas p12 y p10.

Así mismo, es posteriormente rodeado de una matriz amorfa constituida por la proteína p15, dando lugar a la nucleocápside completa en el citoplasma de la célula hospedera. La partícula viral termina de formarse durante su extrusión de la célula, cuando el virión adquiere la envoltura mediante el proceso de exocitosis.

Las proteínas virales de la envoltura gp51 (mayor de superficie) y gp30 (de anclaje), son sintetizadas y translocadas a la superficie celular donde se incorporan al virión. Las mismas son ancladas, en primera instancia, en la bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática perteneciente a la célula hospedera (Moratorio, 2012).

2.2.2 Organización Genómica

EL VLB presenta un genoma compuesto de dos copias idénticas de ácido ribonucleico (ARN), simple hebra y de polaridad positiva, unidas no covalentemente por el extremo 5', dando lugar a la formación de un dímero. El mismo consta de 8700 nucleótidos aproximadamente.

Al igual que el genoma de todos los retrovirus consta de regiones internas, con tres genes estructurales denominados “**gag**” (grupo de antígenos asociados), “**pol**” (polimerasa) y “**env**”, en dirección 5' a 3', respectivamente. La expresión del gen “gag” codifica para una poliproteína precursora de 66kDa (masa atómica y masa molecular más pequeña) (Pr 66) que se “**cliva**” (dividir, fragmentar) posteriormente dando lugar a las cuatro proteínas estructurales no glicosiladas: p24 o proteína mayoritaria del core viral, p15o matriz, p12 y p10. El gen “**prot**” (proteína) codifica en forma independiente para la proteasa viral (p14), responsable del clivaje de las poliproteínas precursoras.

Las enzimas virales polimerasa, integrasa y endonucleasa, son sintetizadas a partir de un precursor de 145kDa (Pr145) originado en los genes gag y pol. El gen env codifica para un precursor de 72kDa (Pr72) del cual provienen las dos glicoproteínas de envoltura: gp51 (proteína mayor de superficie) y gp30 o proteína transmembrana (figura 3).

El genoma se encuentra flanqueado por dos regiones no codificantes, que contienen secuencias comprometidas en los procesos de regulación de la expresión génica viral, denominadas **“Long Terminal Repeats – LTRs”** (repeticiones terminales largas). Las regiones LTRs son idénticas entre sí y están organizadas en 3 zonas denominadas U3-R- U5, 5´ a 3´, respectivamente.

Se encuentran ubicadas a ambos extremos del genoma proviral y contienen secuencias regulatorias de importancia en la interacción virus- hospedero y durante los procesos de iniciación de la transcripción y maduración post-transcripcional.

Por otra parte, el genoma de VLB, presenta una región llamada X o pX, entre el gen env y el LTRs del extremo 3´, que contiene al menos 4 genes con marcos de lectura superpuestos, y que codifican para tax, rex, RIII y GIV, involucradas en asociación con secuencias presentes en los LTRs, en la regulación de la expresión viral a nivel transcripcional y post-transcripcional (Moratorio, 2012).

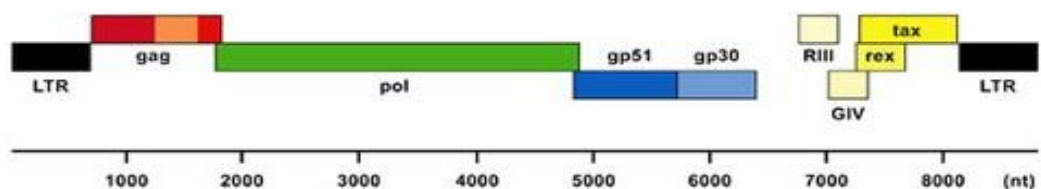


Figura 3. Esquema de la organización genómica de VLB.

2.2.3 Transcripción y Eventos Post - Transcripcionales

La iniciación de la síntesis de ARN tiene como actor principal a una secuencia promotora ubicada en la región LTR5', así mismo es necesaria la supresión del promotor ubicado en la región LTR 3'. El eficiente funcionamiento de las secuencias responsables de la transcripción presentes en el extremo 5' del LTR del genoma viral depende del producto de expresión del gen tax.

El gen tax codifica para una fosfoproteína nuclear (p34Tax) que activa, en trans, la transcripción viral a partir del promotor único (TATA box) presente en U3; y que requiere del "elemento de respuesta a Tax o TxRe", también en la región U3 del LTR.

Durante la replicación y expresión de proteínas del VLB intervienen tres ARN mensajeros (ARNm), los cuales son generados mediante el mecanismo deslizamiento post- transcripcional. De esta forma a partir de un transcrito primario de 8.5kbsy expresan las proteínas de los genes gag y pol, y también se produce la progenie viral (ARN genómico). (Figura 3).

El transcrito primario sufre fenómenos de splicing simple y doble; y madura en dos ARNm subgenómicos, de 4.2 kb y 2.1 kb, que son utilizados para la expresión del gen env y de los genes reguladores tax y rex, respectivamente.

En el estado aleucémico, se puede evidenciar a bajos niveles pero de forma constante la presencia de ARN genómico y ARNm de la envoltura. Por otra parte se ha podido evidenciar la presencia de ARNm de tax y de rex en el citoplasma de linfocitos de animales en todos los estadios. El producto de expresión del gen rex, p18 Rex, actúa a nivel post-transcripcional, como

regulador de la expresión de los diferentes ARN transcriptos, aumentando la transcripción de los genes estructurales.

Como resultado de la regulación positiva sobre los genes estructurales, Rex inhibe indirectamente la expresión de los genes de regulación tax y rex. La función de Rex es Tax independiente y requiere de una secuencia presente en las regiones U3 - R de la LTR 3', a la cual se une directamente.

La presencia continua de anticuerpos en los animales infectados indica la existencia de estimulación antigénica constante, lo que sugiere que VLB no persiste en un verdadero estado de latencia, sino que mantiene una frecuencia excepcionalmente baja de expresión, que se encontraría fuertemente regulada (Moratorio, 2012).

2.2.4 La Glicoproteína gp51

El gen env de VLB, tal como se mencionó anteriormente, codifica para un precursor peptídico denominado gp72, el cual es clivado por acción de la proteasa viral dando lugar a las glicoproteínas gp30 y gp51, transmembrana y de superficie respectivamente.

Ambas proteínas se encuentran asociadas mediante puentes disulfuros. La actividad biológica del virus (infectividad, inducción de **“sincitios”** (Masa de citoplasma que contiene varios núcleos no separados por membranas.) y lisis celular por anticuerpo o complemento) está relacionada con estos epitopes presentes en la glicoproteína gp51. Dicha proteína presenta un peso de 51KDa y es utilizada para estudios filogenéticos como también para la detección de anticuerpos contra la misma en el diagnóstico de esta enfermedad. Así mismo, la glicoproteína gp51 es biológicamente muy importante ya que es responsable de la infectividad del virus. Su hipotética unión a un receptor celular específico es el paso inicial de la infección.

La formación de sincitios *in vitro* es resultado de la unión de gp51 a la membrana de algunas células. Dicha proteína, es hasta el momento el mayor candidato a presentar el dominio de unión a receptor celular y actor principal involucrado en etapas tempranas de infección viral. El estudio de esta proteína es de fundamental interés para intentar dilucidar cual o cuales receptores celulares están involucrados en los pasos de reconocimiento e infección viral.

Es importante resaltar que el receptor celular aún no ha sido encontrado, aunque, recientemente se ha propuesto como candidato la sub-unidad δ del complejo AP3, el cual está involucrado en transporte intracelular, por lo que existe gran controversia, ya que es difícil entender su funcionamiento a nivel de receptor en la superficie celular (Moratorio, 2012).

2.2.5 Ciclo Replicativo

El VLB infecta células de la serie mononuclear, preferentemente linfocitos BCD5+ maduros, aunque se ha detectado en menor grado, la presencia de ARN mensajero viral en granulocitos, monocitos y linfocitos TCD8+. Como otros retrovirus, este virus presenta una estrategia replicativa, que involucra dos etapas, una temprana, dependiente de proteínas virales y una tardía, dependiente de enzimas del hospedero y de los productos de los genes virales.

El primer paso del ciclo Replicativo es el reconocimiento específico de los receptores de la célula hospedera por parte de las proteínas de la envoltura. Esta interacción genera un cambio conformacional en la proteína de la envoltura viral que da lugar a la penetración a través del mecanismo de fusión de membranas independiente de pH. Una vez en el citoplasma celular, ocurre la etapa de desnudamiento, seguida de la síntesis de ADN a partir del ARN viral mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa.

Durante la etapa de retro transcripción las secuencias presentes a ambos extremos del genoma viral se repiten en cada extremo del nuevo ADN dando lugar a los extremos terminales, como se mencionó anteriormente, denominados LTRs. La nueva molécula de ADN penetra en el núcleo celular y mediante la actividad de la enzima integrasa, se integra al azar al genoma del hospedero. La forma viral integrada es denominada provirus.

A pesar de poseer un genoma diploide, solo una de las moléculas de ADN generadas por retro transcripciones integrada al genoma del hospedero. La integración del ADN lineal es un paso crítico que asegura la asociación estable con el genoma del hospedero. La integración viral marca el fin de la etapa temprana y el comienzo de la etapa tardía del ciclo viral, donde se lleva a cabo la síntesis de ARN viral, síntesis de proteínas virales y ensamblaje de la progenie.

Inmediatamente después de la infección, se activa la expresión génica y la traducción de las proteínas necesarias para la producción de viriones maduros en la célula hospedera. Se puede identificar una viremia que dura de 10 a 12 días post-infección, después de la cual se genera una respuesta inmune persistente, aunque ya no se pueden detectar viriones en los órganos de los animales infectados.

La partícula viral se puede aislar de un individuo infectado únicamente cuando se realiza el cultivo en vivo de células mononucleares de sangre periférica **“peripheral blood mononuclear - PBMCs”** (células mononucleares de sangre periférica).

Aunque in vivo la expresión genética viral parece estar inhibida, se puede detectar la presencia de ARN viral en uno de cada 2.000 a 50.000 linfocitos de bovinos clínicamente normales utilizando la técnica de hibridación in situ.

Este proceso de inactivación de la expresión génica viral se debe a la compleja interacción entre factores de regulación viral y celular.

Luego de la infección, la respuesta humoral, citotóxica y los factores plasmáticos podrían suprimir eficientemente el ciclo de replicación viral. Sin embargo, la presencia continua de anticuerpos en los animales infectados indica la existencia de estimulación antigénica constante, lo que sugiere que VLB no persiste en un verdadero estado de latencia, sino que mantiene una frecuencia excepcionalmente baja de expresión, que se encontraría fuertemente regulada (Moratorio, 2012).

2.2.6 Variabilidad Genética de VLB

Los virus de ARN explotan todos los mecanismos conocidos para generar variabilidad genética, los más frecuentes son la mutación y la recombinación. La mutación es un mecanismo clave en la generación de variación genética en los virus cuyo genoma está constituido por ARN, y el mismo se debe mayoritariamente a la carencia de actividad de corrección de errores de las ARN polimerasas, lo que determina una frecuencia de error del orden de 10^{-4} sustituciones por nucleótido y ciclo replicativo.

Ésta, es responsable de la generación de gran número de variantes virales en el curso de una infección. Algunas de estas mutaciones acumuladas por ciclo de replicación son silenciosas o sinónimas, por lo cual no tienen impacto directo en la secuencia de aminoácidos de la proteína viral, pero sí pueden afectar la estructura secundaria del ARN.

Otras mutaciones, las llamadas no sinónimas, llevan a cambios en la secuencia proteica y producen la emergencia de nuevas variantes. Adicionalmente existen mutaciones que llevan a la producción de virus defectuosos, las cuales son denominadas letales.

Esta población es una nube dinámica de mutantes los cuales pueden cooperar o competir, la misma se considera como una unidad de selección. La presencia de diferentes poblaciones virales en un mismo hospedero, sean variantes que conforman al espectro de cuasi especies o cepas de diferentes genotipos que co- infecten a una misma célula, abre la posibilidad de otro mecanismo de generación de diversidad genética denominado recombinación.

Ésta consiste en la generación de nuevas estirpes a través de diferentes combinaciones genéticas entre variantes distintas. Estos eventos pueden dar lugar a variantes difíciles de diferenciar de las cepas que recombinen en el caso de que éstas sean genéticamente similares.

Sin embargo, cuando la recombinación ocurre entre variantes de distintos genotipos que circulan simultáneamente en la misma célula, pueden originar cepas con mayor capacidad de replicación, además fácil transmisión o más virulentas. Por esta razón, la recombinación es una herramienta muy efectiva para aumentar la variabilidad genética de una población viral, que provee a estos virus una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones impuestas por el sistema inmunitario del hospedero, así como a drogas o terapias antivirales.

Sin embargo, a pesar de que VLB es un virus ARN, el mismo presenta una baja variabilidad genética debida principalmente a su latencia en el genoma del hospedero, y el uso de la mitosis celular como principal vía de replicación de su genoma. La baja heterogeneidad genética de VLB se fundamenta en su relativa lenta tasa de sustitución nucleotídica. (Moratorio, 2012).

2.3 PATOGENIA

El período de incubación es largo hasta la aparición de los síntomas clínicos. Dependiendo de factores genéticos y ambientales, entre el 30% y el 70% de los animales portadores del virus desarrollan una enfermedad conocida como linfocitosis persistente (LP). Solo un bajo porcentaje (0,1%-10%) con o sin LP, desarrollan tumores linfoideos. El porcentaje de animales con LP que producen tumor varía ampliamente (10% - 85%).

En LP, el ADN proviral fue encontrado integrado en una gran cantidad de sitios en el genoma, de un 25% a un 50% de los linfocitos circulantes. Secuencias del provirus fueron encontradas por ADN-ADN hibridación en linfocitos o en tejidos tumorales, pero no en otros tejidos que no estuviesen infiltrados por linfocitos. En la forma tumoral el ADN se encuentra solo en pocos lugares del genoma de leucocitos y de células tumorales.

Los clones de células linfoideas correspondientes al linaje de linfocitos B pueden llevar copias completas o con elecciones parciales localizadas en la fracción 5' de la molécula de provirus, lo cual no influye para el mantenimiento del proceso neoplásico mientras que si ocurre en la fracción 3' de la molécula puede ser importante.

Se determina que en los portadores asintomáticos (seropositivos), el 5% del total de leucocitos llevan el provirus. Ni los anticuerpos adquiridos pasivamente, ni la inmunidad activa son efectivos en erradicar la enfermedad. Los anticuerpos contra la gp51 producidos por el huésped parecen no tener efecto protectoro contra la progresión de la enfermedad hacia la fase neoplásica. Habría modulación antigénica que controla la expresión de los antígenos virales que no son expuestos en la superficie de los linfocitos infectados in vivo.

En la mayoría de los casos el título de anticuerpos va elevándose con la evolución de la enfermedad hasta alcanzar un máximo con la muerte del animal en la fase tumoral.

En algunos casos la presencia de linfosarcoma con incremento en el número de leucocitos en sangre periférica (linfosarcoma leucémico). Los animales con LP no tienen anomalías clínicas, no pierden peso, no disminuyen la producción láctea y se reproducen normalmente. LP no es una forma subclínica de linfosarcoma, es una respuesta distinta, a la infección por este virus, donde la constitución genética juega un rol importante (Palma, 2011).

2.4 HUÉSPEDES SUSCEPTIBLES

Se considera que el virus infecta naturalmente a los bovinos, búfalos y capibaras y en forma inducida a los ovinos, experimentos in vitro reportan susceptibilidad de células humanas a la infección con VLB. Actualmente hay evidencia de la posibilidad de la infección natural en humanos. In vitro es posible infectar experimentalmente cultivos celulares en mono capa provenientes de diversas especies: humano, mono rhesus, chimpancé, canino, ovino, bovino, caprino y murciélagos, conejos y pollos. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en animales mayores de 2 años y más en los rebaños lecheros que en los de carne (Baruta, 2011).

2.4.1 Síntomas

Los síntomas se aprecian mayoritariamente después de los 2 años de edad y el periodo de mayor frecuencia es entre los 5 y 8 años. La mayoría de los síntomas son inespecíficos y variables, puesto que van a responder a la ubicación de las formaciones neoplásicas y según el grado de afectación de los órganos. Se ha descrito anemia, emaciación e infertilidad. También se

han reportado momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos.

El signo más frecuente que lleva a pensar en la enfermedad es el agrandamiento bilateral y más o menos simétrico de los ganglios explorables. Se ha informado de ganglios pre-escapulares que llegan a pesar 1.8kilos. La exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, es bastante específico como signo de la enfermedad.

La presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad. La linfocitosis persistente en rebaños con alta incidencia de linfosarcoma, un número variable de animales clínicamente normales desarrolla linfocitosis persistente. Esto dio lugar para el establecimiento de las “claves hematológicas. Una proporción variable de animales infectados estimada en el30%desarrolla linfocitosis persistente.

La mayor parte de las células involucradas son morfológicamente linfocitos normales, aunque también se han descrito células atípicas y anormales, lo cual se ha considerado como indicativo de un estado pre-leucémico. El incremento en el conteo de linfocitos, corresponde con el incremento en los linfocitos B. Los bovinos con linfocitosis persistente presentan títulos más elevados de anticuerpos específicos que aquellos infectados sin linfocitosis persistente.

La leucemia hematológicamente se debe distinguir leucemia de linfocitosis persistente. La leucemia hace referencia a la presencia de células tumorales o anormales detectadas en la corriente sanguínea indicando transformación neoplásica de la médula ósea y presencia de linfosarcoma.

Estas células neoplásicas en sangre aparecen entre 5 – 10% de los casos de linfosarcoma y se conocen como prolinfocitos, células de Rieder, linfoblastos, paralinfoblastos, aunque solo los dos últimos tipos asociados a figuras de mitosis pueden ser de significación diagnóstica en leucemia.

La presencia de anomalías en el cariotipo, aneuploidía con aparición de cromosomas adicionales, es prueba del carácter neoplásico de estas células. Estas anomalías celulares varían de un animal a otro, pero no en el mismo animal, por lo que demuestra que el tumor es monoclonal (Baruta et al, 2011).

2.8 TRANSMISIÓN

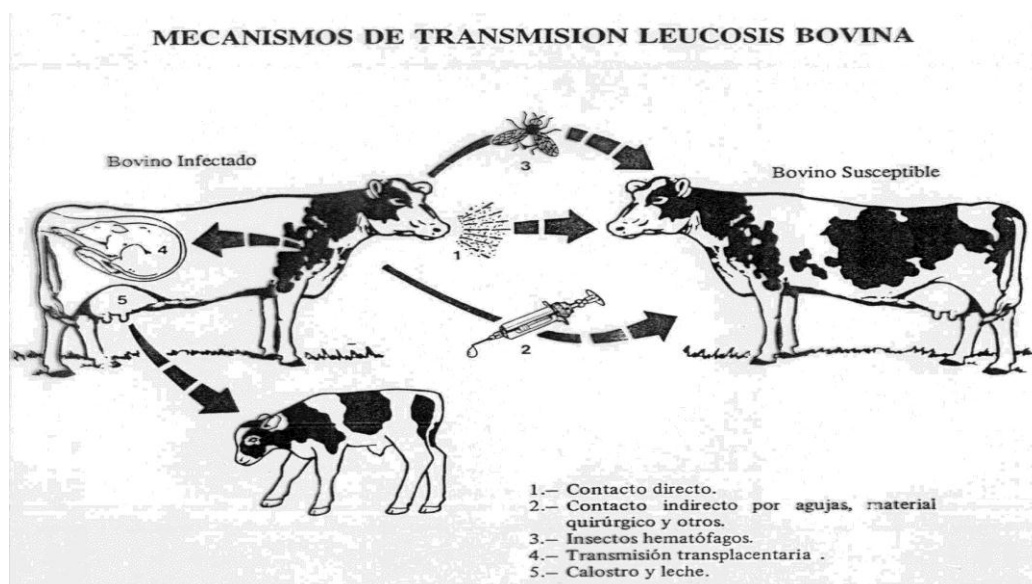


Figura 4. Mecanismo de transmisión de la leucosis bovina

Observaciones epizootológicas han demostrado que VLB es transmitido fundamentalmente en forma vertical. La transmisión congénita, aquella en que las madres enfermas pueden transmitir el virus al feto vía transplacentaria, es relativamente poco frecuente, aunque también puede ocurrir, el rol del virus libre en este modo de propagación no ha sido aún dilucidado. Algunos trabajos indican infección transplacentaria.

Dada su condición de virus exógeno VLB, no se transmite a través del óvulo o del espermatozoide. Como el virus libre es producido raramente in-vivo, se postula que la mayoría de los bovinos resultan infectados por exposición a linfocitos portadores (Palma, 2011).

Los animales portadores asintomáticos son las grandes fuentes de contagio en los rodeos, siendo ellos, en la forma vertical, el contagio más importante y la que produce mayor número de nuevos infectados. Esta transmisión se da por traspaso de glóbulos blancos (linfocitos) infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano. En las secreciones y fluidos biológicos como: leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados transformando a estos fluidos en una fuente de contagio.

No obstante la mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran obviamente en la sangre, por lo tanto cualquier medida de manejo o practica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, castración, descorne, aplicación de inyectables, cirugías, palpación rectal, tatuaje, etc. que se practican sin tomar las medidas higiénicas correspondientes son una importante forma de diseminación de la enfermedad (iatrogénica).

Los artrópodos hematófagos como tábanos, moscas podrían ser otra vía de transmisión. En los rodeos con gran número de animales infectados y alta carga de animales por superficie se ve muy favorecida la transmisión horizontal por que se acentúa el contacto físico entre animales y la transmisión del virus (Gatti, 2007).

2.5.1 Transmisión Natural o Vertical

La forma vertical la cual puede ocurrir durante la gestación o en el parto, Los principales mecanismos involucrados en la transmisión vertical son:

- **Transmisión intrauterina**

Las infecciones intrauterinas ocurren entre el 2 y el 10 % según el rodeo (dependiendo de la susceptibilidad, la línea genética, etc.). No dependen del número de parición, ni del momento de infección de la madre y ocurre en etapas de la gestación en que el ternero es inmunocompetente (a partir del tercer mes de gestación). Estas infecciones pueden ser detectadas por métodos serológicos o virológicos al momento del nacimiento (Giraudó, 2010).

- **Transmisión vía calostro y leche**

El VLB está presente en el calostro y leche de vacas infectadas. Tanto la fracción celular como las fracciones libres de células, aunque éstas últimas con menor frecuencia, pueden ser infecciosas, tanto de leche como de calostro (Giraudó, 2010).

- **Transmisión viral por productos reproductivos**

Si bien puede haber presencia de virus en el semen debido a la salida, por traumatismos, de linfocitos infectados al tracto urogenital de los machos, se cree que esta vía de transmisión es poco probable en bovinos. La transmisión del VLB mediante el trasplante embrionario puede ocurrir muy raramente (Giraudó, 2010).

- **Transmisión iatrogénica**

La posibilidad de transmisión de linfocitos infectados de bovino es en ocasión de las tomas de muestra o inyecciones múltiples con una misma

aguja. De esta manera una cierta cantidad de sangre residual en la luz de las agujas es suficiente para reproducir la infección.

Ciertas prácticas veterinarias con infecciones profilácticas (vacunas de babesiasis y anaplasmosis), el empleo de jeringas, de agujas, e incluso a veces de instrumentos quirúrgicos, de una animal infectado a otros pueden ser culpadas, e incluso en los tatuajes (Ochoa ,1998).

- **Transmisión por Vectores**

Consideraciones de tipo epidemiológico han considerado que los artrópodos juegan un papel importante en la transmisión de VLB. Los mosquitos no jugarían más que un papel limitado de la transmisión, contrariamente a tábanos por dos razón; es de una parte su escaso tamaño y otra sus hábitos alimentarios que les hacen generalmente comenzar y terminar una comida sanguínea en el mismo hospedero. Finalmente más que por simples transportadores mecánicos, las garrapatas puedes jugar un papel importante en la transmisión de VBL, gracias a una transmisión transestedia. (Ochoa, 1998).

2.5.2 Transmisión Horizontal

La transmisión horizontal es la responsable de la mayoría de las infecciones por VLB en el ganado.

2.5.2.1. Transmisión por sangre

- **Vía intradérmica**

La inoculación intradérmica de 2.500 linfocitos provenientes de animales infectados puede desarrollar infección, equivalentes a 0,5 microlitros de sangre entera (Giraudó, 2010).

- **Vía subcutánea**

Volúmenes de sangre de 0,1 y 0,5 microlitros de sangre producen infección en los terneros. La inoculación subcutánea, intramuscular e intravenosa de 1 a 10 microlitros de sangre de un animal infectado sin linfocitosis es infectante.

En palpaciones: 2ml de sangre proveniente de vacas infectadas, colocados por vía rectal, con o sin palpación rectal de por medio, inducen la infección (Giraudó, 2010).

2.6 LESIONES

La patogénesis de la LBE está asociada con un número considerable de aberraciones en el sistema inmune del huésped:

- Linfocitosis persistente
- Incremento en el número de linfocitos B circulantes
- Disminución en el número de linfocitos T en sangre periférica
- Reducción de las células productoras de IgM en bazo y ganglios linfáticos.
- Niveles bajos de IgM secretora.
- Presencia de para-proteínas séricas.

- Disminución en la respuesta a otros antígenos
- Producción de “Igs” (inmunoglobulinas) con estructura o reactividad biológica anormal

El linfosarcoma bovino es una enfermedad característicamente afebril, el estado Terminal en este tipo de neoplasia puede aparecer rápidamente, con muertes repentinas.

Resulta constante la localización de los tumores en los ganglios linfáticos describiéndose la extensión de afectación de estos órganos en: generalizada afecta 76 a 100%, diseminada afecta 26 a 75% y localizada afecta 1 a 25%. Los ganglios linfáticos más frecuentemente afectados son los iliacos 65 – 83%, seguidos de los intratorácicos 62 - 74% y mesentéricos 66% y los superficiales (pre-escapulares, pre-cruales y de la región cervical) son afectados con menos frecuencia 41 - 62%.

Los ganglios linfáticos afectados se muestran aumentados de tamaño en forma difusa, la superficie externa generalmente es lisa, aunque también puede presentarse en forma nodular, sin adherencias con los tejidos circundantes, la consistencia es muy blanda y edematosa o bien firme, turgente y friable; en la superficie de cortes los detalles de la estructura anatómica del órgano se pierden por la infiltración de tejido tumoral de aspecto lordáceo (parecido a la grasa), húmedo y de color blanco-gris o blanco-amarillento que se encuentra prolapsado o sobresaliente.

La médula ósea puede estar infiltrada en muchos casos (40%) aunque no se establezca en los registros, quizás debido a que generalmente los huesos no se examinan con regularidad. Cuando está afectada aparece un tejido de color blanco gris o blanco reemplazando el color rojo que se observa en la médula hematopoyética normal.

La afectación tumoral de la médula ósea implica la presencia de leucemia, o sea, la aparición de células tumorales en la corriente sanguínea. Un 16% de los animales afectados con LBE presentaron tumoraciones de las meninges de las regiones lumbar y sacra, manifestándose en parálisis progresiva de los miembros posteriores, adoptando en ocasiones la posición de perro sentado.

El bazo se afecta del 10 al 50%, puede presentar un aumento moderado de tamaño o una esplenomegalia tumoral; la superficie de corte aparece seca y se observan nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima. Estos casos se acompañan de conteos linfocitarios muy altos 20.000 a 80.000 (microlitro desangre) y frecuentemente terminan con hemorragia intrabdominal fatal.

El corazón, a pesar de no ser un órgano linfoide, presenta una frecuencia de afectación bastante alta (50 - 90%) aparecen nódulos de variado tamaño o áreas infiltrativas en forma difusa de color blanquecino con límites mal definidos en el espesor del miocardio visibles a través del epicardio y endocardio. En casos avanzados se presenta edema del pecho y pulso yugular debido a insuficiencia cardíaca congestiva derecha. Los casos que ocurren sin agrandamiento de los ganglios linfáticos pueden semejar una retículo pericarditis traumática o bien una endocarditis bacteriana.

El abomaso aparece infiltrado por el tejido tumoral produciéndose el incremento de grosor de su pared, aunque también pueden presentarse úlceras sangrantes con heces oscuras y mal olientes producto de la sangre digerida; y puede presentar diarrea. Algunos de los animales presentan obstrucción del abomaso debido a la acumulación de partículas pesadas como arena, con impedimento en el transporte de líquidos, alimentos y secreciones abomasales y subsecuente reflujo de éstos hacia los pre-estómagos.

Los tumores en el útero, la vagina y la región perivaginal; son detectados durante las palpaciones del aparato genital, principalmente al final de la gestación, al parto o al inicio de la lactancia. En los riñones las lesiones aparecen en 50% de los casos y pueden tener un carácter infiltrativo, produciendo hemorragias visibles en la superficie del órgano o pueden presentarse nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal. La vejiga de la orina puede presentar su pared engrosada y la mucosa ulcerada debido a la infiltración tumoral.

El hígado presenta en los animales adultos una frecuencia de afectación relativamente baja (30 - 40%) al contrario de los animales jóvenes (80 - 90%) se observa aumento de tamaño, consistencia blanda, coloración pálida difusa.

En el pulmón las lesiones tumorales son de rara ocurrencia, pero pueden presentarse en la forma infiltrativa difusa nodular. Se han observado masas tumorales en el tejido celular subcutáneo de la región abdominal y de la porción interna del muslo y también adheridas a la pleura costal.

El tejido retro-ocular puede afectarse y provocar con su crecimiento la profusión del globo ocular o exoftalmo. Se han observado la infiltración tumoral de la córnea y también la presencia del tumor en la cámara anterior del ojo (Cañibano et al, 2011).

2.7 DIAGNÓSTICO

El 30% de los bovinos infectados desarrollaran linfocitosis persistentes (LP), y entre el 2 y 10% linfosarcoma (LFS). En consecuencia, una primera aproximación diagnóstica puede hacerse a través de la sintomatología clínica en bovinos con linfosarcoma.

Los signos clínicos dependen del sistema u órgano afectado, pudiendo presentarse exoftalmus, trastornos digestivos, circulatorios, urinarios, reproductivos, locomotores y respiratorios. Se han reportado muertes súbitas por ruptura de bazo especialmente en vacas. En animales mayores la sintomatología concuerda con un proceso caquético. La LP se diagnostica mediante exámenes hematológicos periódicos que demuestren la persistencia de la linfocitosis por al menos 3 meses.

El diagnóstico de la infección por el BLV se hace de rutina detectando anticuerpos contra el virus en suero sanguíneo. La técnica serológica más utilizada es la Inmunodifusión en agar. Actualmente también están disponibles diversos ELISAs que pueden detectar anticuerpos en suero sanguíneo y leche.

Los principales diagnósticos diferenciales de los cuadros clínicos de linfosarcoma son tuberculosis, para tuberculosis, retículo pericarditis traumática y carbunco bacteriano (por ruptura y/o el tamaño del bazo). Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra gp51 y p24 del virus. La mayor parte de las pruebas rutinarias como ID y ELISA detectan anticuerpos contra la glicoproteína gp51, que son de aparición temprana. Se han descrito métodos para realizar estas pruebas (Giraudó, 2010).

2.8 INMUNIDAD DE LA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA

Todo animal que se infecte con el virus de LBE desarrolla anticuerpos detectables a partir de las 8 ó 12 semanas por las técnicas de ELISA ó inmunodifusión respectivamente. A lo largo del tiempo, aproximadamente el 30 al 40% de los animales infectados desarrollan LP, lo cual se considera un estado preclínico de la enfermedad. De estos, uno de cada tres termina en

fase clínica con la formación de múltiples tumores en distintos órganos y muere con un diagnóstico histopatológico de linfosarcoma.

Como el virus de LBE se multiplica en las mismas células donde se originan los linfocitos responsables del proceso de inmunidad, los animales infectados sufren un estado de inmunosupresión. Esta es una característica de los retrovirus, donde además del virus LBE se encuentra el del VIH – SIDA y el de anemia infecciosa equina.

Como consecuencia de la pérdida o disminución de la capacidad de respuesta inmune, los animales infectados no responden adecuadamente cuando sufren enfermedades infecciosas como: mastitis, metritis ó sabañón; tampoco desarrollan la inmunidad que se espera cuando se vacunan contra una patología específica. Un ejemplo de esto puede ser el comportamiento de las vacunas usadas para prevenir los problemas reproductivos causados por rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR), diarrea viral bovina (DVB) y leptospirosis, que en el pasado se usaban con intervalos de 10 a 12 meses y hoy las mismas vacunas, incluso mejores en cuanto a su preparación, requieren refuerzos semestrales o más cortos.

Reflejo de ese cuadro de inmunodeficiencia son aquellas vacas mayores de 5 años que bajan la producción, pierden peso, se notan enfermas pero sin una sintomatología específica, no responden a las terapias con vitaminas, minerales y otros medicamentos y finalmente son eliminadas después de un gasto importante en tratamiento. Algo similar sucede con vacas caídas, en cualquier período de lactancia, que no responden a la terapia específica para este síndrome porque presentan tumores que comprimen la médula espinal (Cottrino, 2012).

2.9 EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL

Como medidas de control se pueden implementar:

1. Aplicación de una prueba diagnóstica y luego sacrificar o separar los animales que resulten positivos. Ha sido extensamente utilizado en Europa, y se ha probado en una gran cantidad de países.
2. Sólo implementación de medidas correctivas: La aplicación de medidas correctivas encamina a reducir la transmisión entre animales y es muy útil en el control de la infección. Algunas de estas medidas de control son, el uso de una aguja por animal, desinfección de elementos no desechables, modificar los métodos de descorne, uso de una manga por vaca en la palpación rectal, eliminar el uso de picanas con clavos, etc.
3. Diagnóstico y segregación de reaccionantes positivos más la aplicación de medidas correctivas de control al resto del rebaño: Esta es una combinación de las dos estrategias anteriores, donde la vigilancia generalmente es hecha mediante pruebas serológicas, seguida por la remoción de los reaccionantes positivos (Grau, 2009).

2.9.1 Erradicación

La erradicación mediante ensayo y sacrificio se consigue rápidamente. Programas con base en la eliminación de vacas positivas. Conservación de hato cerrado permitiendo el ingreso sólo a los animales libres de la infección (Buenas Tareas, 2012).

2.9.2 Vacunación

Se debe tener en cuenta que el uso del virus atenuado o células vivas como vacuna es peligroso particularmente trabajando con retrovirus, porque la información genética es insertada en el ADN celular. Como no existe

relación etiología entre el linfosarcoma juvenil y la leucosis enzoótica, se postula que la protección sería debida a antígenos tumorales localizados en la superficie celular (TATA: trasplatación antígeno asociado).

Haciendo una proyección hacia el futuro, sería de utilidad para aplicación en gran escala, el desarrollo de una vacuna a partir de subunidades de la cubierta viral, libre del ARN viral. Aparentemente la glicoproteína de superficie gp51. Es altamente inmunogénica y títulos de anticuerpos superiores a 1/8 protegen contra la infección a VLB.

La fracción carbohidratada de este antígeno es fundamental para estimular la inmunidad. Por técnicas de ingeniería genética y considerando que los epitopes F. G y H de la gp51 tienen que ser usados como vacunas, su producción podría ser llevada a cabo en sistemas celulares capaces de una adecuada glicosilación del antígeno y de esta forma se podría obtener una inmunización efectiva (González, et al, 1988)

2.10 HEMATOLOGÍA

Las células sanguíneas se originan de células mesodérmicas primitivas. Los glóbulos rojos se originan en las células intravasculares del sistema retículo endotelial, mientras la totalidad de los glóbulos blancos parten de una o más células extravasculares (retículo) del mismo sistema. Todas las células sanguíneas se originan de una sola célula madre, el hematoblasto (Coffin, 1959).

2.10.1 Tinción de Wright

1. Cúbrase el frotis sanguíneo seco con tanta tintura de Wright como pueda sostener y déjese así de 1 a 3 minutos.

- a) La tintura alcohólica no diluida actúa principalmente como fijadora, ya que su aptitud de tinción es mínima mientras no se diluya en solución amortiguadora, y se emplea exclusivamente en algunas tinciones de elementos neutros.
 - b) El tiempo que debe dejarse varia con la fuerza de la tintura.
 - c) El soporte debe estar horizontal para evitar la acumulación de tintura a un lado.
2. Añádase una cantidad igual de solución amortiguadora (pH 6.6 a 6.9), repitiéndola por todo el cubreobjetos, y deje estar de 3 a 5 minutos.
- a) La disolución parcial de los componentes en la tintura tiene entonces lugar, gracias a la disolución de la solución amortiguadora, produciendo colorante ácido libre (eosina), y azul de metileno libre, alcalino, y sus derivados.
 - b) La tintura de Wright y la solución amortiguadora se logran mezclar bien soplando suavemente la superficie
3. Lávese bien la extensión teñida con agua corriente o agua destilada, en el caso que el agua del lugar fuera alcalina.
- a) No se escurra la tintura del cubreobjetos antes de lavar pues esto produciría un precipitado, sino échese el agua encima.
4. Límpiase de tintura el reverso del cubreobjetos.
5. Déjese secar al aire el cubreobjetos apoyando sobre un costado o séquese con suavidad usando un papel secante.
6. Móntese el cubreobjetos con el lado teñido para abajo, en un portaobjetos con bálsamo de Canadá (Maxine, 1961).

2.10.2 Linfocitos

Los linfocitos constituyen la mayor parte de los glóbulos blancos, su tamaño varía de 6 a 15 micras, siendo clasificados comúnmente como pequeños, medianos y grandes. En realidad, la gradación existente en sus dimensiones es casi imperceptible, por lo que cualquier división de formas pequeñas o grandes es bastante arbitraria.

Las formas menores poseen una banda estrecha, usualmente excéntrica de citoplasma azul oscuro, que rodea al núcleo purpura formado por bloques no diferenciados de cromatina. En las células mayores el citoplasma es pálido y contiene, frecuentemente, numerosos gránulos coloreados en violeta. Los linfocitos de gran tamaño se encuentran comúnmente en la sangre del ganado vacuno y otros rumiantes y con menor frecuencia en caballos y perros.

El aumento de los linfocitos en la sangre circulante recibe el nombre de linfocitosis. Este cuadro no es raro en los animales domésticos. En ocasiones una reducción de la cifra de neutrófilos (neutropenia), sin descenso correspondiente en los linfocitos, puede simular una linfocitosis.

Este cuadro se conoce como linfocitosis relativa para distinguirlo de la linfocitosis verdadera o linfocitosis absoluta, soliendo encontrar algunas enfermedades producidas por el virus y al comienzo de las septicemias. Cuando la proporción de las células blancas es expresada como número milímetro cúbico en lugar de hacerlo como por ciento de 100, la diferencia es más fácil (Coffin, 1959).

2.10.3 Valores Normales Sanguíneos en Bovinos.

Cuadro 1: Promedios Normales de Elementos Celulares de la Sangre de Bovinos.

| Especie | Eritrocitos | Hemoglobina | Hematocrito | H.G.M | V.G.M | C.H.G.M | Plaquetas | Reticulocitos |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|----------------|------------------|----------------------|
| Bovino | 5.4-9.0 | 8.0-14.5 | 30-40 | 14.4 18.6 | 49.5 60.7 | 32-34 | 0.3-0.8 | 0 |

Fuente: Coffin, 1959

Cuadro 2: Cifras Promedio de Leucocitos los Bovinos

| Especie | Leucocitos | Neutrófilos | Eosinófilos | Basófilos | Linfocitos | Monocitos |
|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Bovino | 4.5-13 | 30 (15-55) | 8 (1-15) | 0.5 (0-1) | 52 (40-70) | 9 (3-15) |

Fuente: Coffin, 1959

2.11 ELISA

Elisa se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Cultek, 2006).

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

Anticuerpos marcados:

- Elisa directo
- Elisa indirecto
- Elisa sándwich (DAS)
- Elisa sándwich (HADAS)

Antígeno marcado:

- ELISA competitivo (Cultek, 2006).

2.11.1 Elisa Directo.

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
3. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
4. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Principios básicos del Elisa competitivo, 2013).

2.11.2 Elisa Indirecto

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los

2. anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
3. Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
4. Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
5. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
5. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Principios básicos del Elisa competitivo, 2013).

2.11.3 Elisa Sandwich “DAS”.

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
3. Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítopo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran

fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

4. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
5. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Principios básicos del Elisa competitivo, 2013).

2.11.4 Elisa Sándwich “HADAS”.

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
3. Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.
4. Adición de anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso anterior. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
5. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
6. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Principios básicos del Elisa competitivo, 2013).

2.11.5 Elisa Competitivo.

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
2. Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
3. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
 - a. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra (Principios básicos del Elisa competitivo, 2013).

2.11.6 Método de Elisa

Se analizaron los sueros mediante la técnica de referencia de Elisa. Se utiliza un Kit contra anticuerpos de VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod 5505.20, WA; USA). Las muestras se procesan utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25.

La lectura se realiza en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm “**Termo Fisher Scientific INC., USA**” (termo Fisher científico). Se utilizan tres controles positivos débiles por placa, que poseen una baja concentración de anticuerpos contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus densidades óptimas (Beier, 2008).

2.11.7 Kit para la Detección de Anticuerpos Frente al Virus de la Leucosis Enzoótica Bovina (LEB)

Nombre y uso propuesto: IDEXX Leucosis Serum Screening es un ensayo inmunoenzimático de IDEXX para la detección de anticuerpos frente al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica (BLV) en muestras de suero y plasma individuales, y muestras de hasta 10 sueros de bovino.

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad infecciosa linfoproliferativa en ganado bovino distribuida por todo el mundo. La enfermedad es causada por un delta-retrovirus exógeno, virus de la leucosis bovina enzoótica que provoca una infección persistente en una subpoblación de linfocitos B mediante la integración de ADN proviral a un número de sitios del ADN celular. La mayoría del ganado infectado permanece sano de por vida, aproximadamente el 30% desarrolla la linfocitosis persistente y una pequeña parte (hasta el 10%) desarrolla tumores linfáticos. La enfermedad afecta principalmente al ganado lechero y se disemina principalmente por transmisión horizontal por contacto con sangre o secreciones que contienen linfocitos infectados.

No existe en la actualidad tratamiento ni vacuna, por lo que la erradicación de la enfermedad se basa en la identificación y eliminación de animales infectados, que se realiza principalmente por la detección de anticuerpos antivirales. Los animales infectados producen anticuerpos específicos frente

a la principal proteína viral desde los primeros estados de la infección. El test de inmunodifusión en Agar (AGID) fue muy utilizado. Pero la sensibilidad del AGID es limitada, haciéndose notificado casos de falsos negativos en análisis realizados con esta técnica.

Por este motivo, actualmente se realiza la vigilancia de los rebaños por el mismo ELISA que es más simple, rápido y sensible. Este Kit está diseñado para la detección de anticuerpos frente al virus de la leucosis bovina enzoótica (BLV) en muestras de suero y plasma individuales, y mezclas de hasta 10 sueros de bovino.

Descripción y principios: Las placas están tapizadas con antígeno de BLV. Las muestras a analizar se diluyen y se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo presente en la muestra específico frente a BLV forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. Tras el lavado, se incuban en los pocillos un anticuerpo anti-bovino unido a una enzima. El conjugado se une a los complejos antígeno-anticuerpo. Después de otro lavado, se añade a los pocillos el enzima substrato (TMB).

En presencia del enzima, el substrato se oxida generando una coloración azul, que vira a amarilla al añadir la solución de frenado. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos anti BLV presentes en la muestra. El diagnóstico se obtiene comparando la densidad óptica (DO) de la muestra con la media del control positivo (Beier,2008).

2.11.8 Reactivos

Conserve todos los reactivos a 2-8°C.

Cuadro 3: Reactivos para Elisa

| Reactivos | Cantidad |
|--|------------------|
| 1. Placas tapizadas con Antígeno BLV | 5 10 |
| 2. Control positivo | 1ml 1ml |
| 3. Control negativo | 1ml 1ml |
| 4 ^a . Conjugado concentrado (antibovino IgG peroxidasa del Rabano (HRPO)) | 1,5ml 1,5ml |
| 4b. Solución tampón de dilución n ^o 1 | 120ml 120ml |
| 5. Solución tampón de dilución n ^o 2 | 120ml 2x120ml |
| A. Substrato Tetrametilbenzidine (TMB) n ^o 13 | 60ml 120ml |
| B. Solución de frenado n ^o 3 | 60ml 120ml |
| C. Solución de lavado concentrado (20X) | 100ml 2x100ml |

Fuente: (Beier, 2008).

2.11.9 Precauciones y Advertencias para los Usuarios

- No usar la boca para pipetear.
- Llevas guantes/prendas/gafas/mascara de protección.
- Los controles, el substrato TMB y la solución de lavado concentrada (20X) pueden provocar irritación de los ojos. La solución de frenado puede provocar quemaduras graves en la piel y lesiones oculares

graves.

- Todo el material usado deberá descontaminarse adecuadamente antes de su eliminación (Beier, 2008).

2.11.10 Preparación de los Reactivos

- **Controles y muestras**

La dilución de los controles y de las muestras depende del protocolo de incubación elegido.

Incubación corta (1 hora (\pm 5 min) a + 37°C (\pm 3°C)): Los controles y las muestras se diluyen directamente en la microplaca (Beier,2008).

- **Solución de lavado**

La solución de lavado concentrada (20X) debe de diluirse 1/20 con agua destilada antes de ser usada (por ej. 15 ml de solución de lavado concentrada (20X) en 285 ml de agua destilada). Esta solución se conoce como "Solución de lavado"

Nota: la solución de lavado concentrada (20X) debe alcanzar 18-26°C antes de ser utilizada y debe agitarse suavemente para asegurar la disolución de cualquier sal precipitada. Después de diluir, la solución de lavado puede guardarse 3 días a 2-8°C (Beier, 2008).

- **Conjugado**

Diluir el conjugado concentrado 1/100 con la solución tampón de dilución nº 1. Nota: El conjugado diluido puede guardarse a 8 horas a 18-26°C (Beier, 2008).

- **Formula de la prevalencia**

La Prevalencia hace referencia al número total de casos de enfermos para un tipo específico de enfermedad, en un momento y lugar particular y especial. De este modo, la prevalencia es entendida como la acción de sobresalir o resaltar de un tipo específico de enfermedad en un tiempo y espacio determinados.

$$\text{Prevalencia real (PR)} = \frac{PA + (ESP - 1)}{SE + (ESP - 1)}$$

Donde PA es la prevalencia aparente; ESP es la especificidad de la prueba y SE es la sensibilidad de la prueba (Grau, 2010).

2.12 TRABAJOS RELACIONADOS

Mora Medina, Elías David 1997, en Costa Rica se realizó el trabajo “Evaluación de prácticas de manejo asociadas al riesgo de la transmisión del virus de la leucosis bovina enzoótica en hatos lecheros de Costa Rica por el método de Elisa”, en el cual resume:

Que en esta investigación participaron 15 fincas lecheras, con una población total en estudio de 1564 animales, localizadas en las provincias de Cartago, Alajuela y Heredia. Los animales analizados fueron de las razas Holstein (n=918), Guernsey (n=169), Jersey (n=403) y Normando (n=71). Se colectaron muestras de sangre de todos los bovinos mayores de 6 meses de edad, y se determinó la presencia de anticuerpos específicos al virus de la leucosis bovina (VLB) mediante la técnica del ELISA. Paralelamente al estudio serológico se realizó una encuesta en cada una de las fincas participantes, con el objetivo de registrar la información referente a las medidas de manejo que pudieran tener relevancia en la transmisión del VLB.

Los resultados obtenidos indicaron que algunas prácticas de manejo, en particular aquellas, en las cuales se manipula material o equipo contaminado con sangre, representan un riesgo significativo en la transmisión del VLB. Se pudo determinar además, que fincas con prevalencias altas y medianamente altas presentaron un mal manejo, mientras que fincas con prevalencias bajas y medianamente bajas presentaron generalmente un buen manejo. Las altas incidencias también estuvieron asociadas a fincas con altas prevalencias y mal manejo.

En 1997 Poblete S, Andrea José Chillan en el tema titulado “Estudio seguimiento de la leucosis enzootica bovina en dos predios lecheros de la provincia de Ñuble utilizando el método de Elisa”, menciona:

La LEB es una enfermedad neoplásica, transmisible e infecciosa de tipo viral, que afecta en forma natural al bovino, existiendo un alto porcentaje de seroconversión en la región, por esta razón se determinó la dinámica de la enfermedad en dos predios lecheros de la provincia de Ñuble, usando como prueba de diagnóstico ELISA. Se utilizaron 299 hembras bovinas mayores de 1 año de edad y los exámenes serológicos fueron realizados en dos periodos (Otoño-Primavera). Los resultados obtenidos en la prevalencia por predio, fue de 28.36% y 43.95%. La tasa de incidencia de la infección con el VLB, disminuyó desde un 7.25 a 5.12% y de un 14.7 a 12%, en ambos predios; no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los predios e intrapredial. De los resultados obtenidos se puede concluir, que la mayor incidencia se presenta en animales adultos.

Andrés Veintimilla en 2013 con el tema titulado “Diagnostico de Leucosis Bovina por el Método Agar Gel Difusión (IDGA) y cuenta de Leucocitos en bovinos faenados en el Camal Frigorífico de Loja”, que

Que se analizaron un total de cien muestras de sueros sanguíneos, de bovinos faenados en un periodo de tres meses; se utilizó el método de Inmuno difusión en Gel Agar (IDGA), se realizó el conteo de glóbulos blancos de cada una de las muestras en el laboratorio de Diagnostico Veterinario de la Universidad Nacional de Loja.

Los resultados procedentes de Loja negativos 55%, del cantón Gonzanama negativos 7%, Malacatos negativos 3%, positivos 2%, Zamora negativas 15% y positivas 1% y del cantón Yanzatza negativas 16% y positivas 1%; lo que de un porcentaje de 96% Negativos y un 4% Positivos.

Franklin Zhingre en 2003 con su tema “Diagnostico de Leucosis Bovina en el Camal Frigorífico de Loja Cafrilosa”, explica:

Que se analizaron 82 muestras de sueros sanguíneos, de bovinos faenados en un periodo de sesenta días, las muestras procedieron de Loja, Gonzanama, Malacatos y Zamora, utilizando el método de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) en láminas portaobjetos. Las muestras se obtuvieron de los bovinos que se faenaron en el Camal Frigorífico de Loja “Cafrilosa”, tomando sangre de amínales mayores de 3 años de edad. Los resultados indicaron que no hay la presencia de anticuerpos contra el virus de la leucosis Bovina en estas zonas en estudio. La negatividad fue del 100%

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materiales de Campo

- 150 hembras bovinas mayores a dos años de edad
- Botas de caucho
- Vestuario adecuado
- Desinfectante
- Agujas vacutainer
- Bretes
- Tubos vacutainer
- Papel absorbente
- Agua limpia
- Guantes descartables
- Libreta de apuntes

3.1.2 Materiales de Laboratorio

- Guantes
- Fuentes de iluminación
- Cámara húmeda
- Pipetas
- Tubos vacutainer
- Agujas vacutainer
- Papel absorbente
- Puntas
- Porta objetos
- Centrifuga (2000 x seg)

- Vortex o agitador similar
- Micropipetas de precisión y micropipetasmultidispensadoras
- Puntas de micropipetas
- Agitador de microplacas
- Agua destilada o desionizada
- Lavador de micropipetas manual, semiautomática o automática
- Papel de aluminio o adhesivos, para cubrir las microplacas
- Lector de microplacas provisto de filtro de 450 nm
- Cámara húmeda o incubadora a + 37°C (\pm 3°C)ç

3.1.3 Muestras Biológicas

- 150 muestras de sangre y suero sanguíneo
- Kitt para leucosis bovina

3.1.4 Materiales de Oficina

- Computador
- Impresora
- Libreta de apuntes
- Informes de laboratorio
- Cámara digital
- Regla
- Bolígrafos
- Hojas de papel bond
- Calculadora
- Flash memory
- Escritorio

3.2 METODOS

3.2.1 Ubicación de la Investigación

El presente trabajo se lo realizó en la Hoya de Loja, ubicada al sur del Ecuador, que limita: al Norte por el sector Acacana-Guagrahuma, al Sur por el nudo de Cajanuma, al Oeste por el cerro del Villonaco y al Este con la Cordillera Oriental de los Andes. La altitud media es de 2 160 msnm, con una superficie de 5 374 ha, una humedad relativa del 75%/año, temperatura media de 17°C (máxima de 23°C y mínima de 15,7°C). Tiene una precipitación pluvial promedia de 900,9 mm/año. Cuenta con una topografía irregular, rodeada de varias elevaciones, lo que le hace propicio para la crianza y comercialización de ganado bovino y producción de leche. El área de estudio comprendió los sectores: norte, sur, este y oeste de la Hoya de Loja, con sus respectivos barrios.

3.2.2 Método de Muestreo

Para esta investigación se contó con el número establecido de hembras bovinas mayores de 2 años de los sectores norte, sur, este y oeste de la Hoya de Loja. Se realizó un muestreo en etapas sucesivas, tomando en cuenta cada uno de los barrios que se encuentran distribuidos en la Hoya de Loja.

3.2.3 Población del Universo Geográfico

Para el presente estudio se indica que se realizó el muestreo de la población total de bovinos existentes en la zona, que es de 9 482, de acuerdo al censo del 2010. El número de predios atendidos es de 1 087 con sus respectivos barrios (Agrocalidad 2010). De esta cifra las hembras mayores de 24 meses

existentes en la Hoya de Loja es de 4 006, que constituirá el universo de estudio.

3.2.4 Tamaño de la Muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se aplica la siguiente formula:

$$n = \frac{N * Z^2 * P * Q}{(N - 1)e^2 + Z^2 * P * Q}$$

n = Tamaño de la muestra a calcular

N = Número de animales existentes (4006)

Z = Constante (1,96)

P = Probabilidad de éxito (0.5) 50%

Q = Probabilidad de fracaso (0.5) 50%

E² = Error de la muestra (0.08) 8%, no mayor al 10%

$$n = \frac{4006 * (1.96)^2 * 0.5 * 0.5}{(4006 - 1)(0.08)^2 + (1.96)^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = \frac{4006 * 3.8416 * 0.25}{(4005)0.0064 + 3.8416 * 0.25}$$

$$n = \frac{3847.36}{25632 + 0.9604}$$

$$n = \frac{3847.36}{26.5924}$$

$$n = 144.6 \approx (150)$$

3.2.5 Determinación de la Fracción del Muestreo

$$F = \frac{N}{n} \qquad F = \frac{4006}{150}$$

$$F = 26.70 (27) = \frac{1}{27}$$

Para el análisis de la fracción de muestreo se toma en cuenta una por cada 27 hembras bovinas para su respectivo estudio. Del total de bovinos en la Hoya de Loja se toma como muestra 150 bovinos para el estudio pertinente, divididos en los diferentes sectores que comprenden la Hoya de Loja, con sus respectivos barrios.

3.2.6 Descripción y Adecuación del Área de Trabajo

Para la realización del estudio se tomó en cuenta los barrios de las zonas o sectores pertenecientes a la Hoya de Loja, considerando la cantidad existente de hembras bovinas en cada barrio.

Cuadro 4. Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Norte de la Hoya de Loja.

| Lugar/barrios | Nº de hembras >2 años | Fracción del muestreo | Tamaño de la muestra |
|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Zalapa | 718 | 1/27 | 27 |
| Jipiro | 299 | 1/27 | 11 |
| Zhucos | 286 | 1/27 | 10 |
| Carigán | 225 | 1/27 | 8 |
| Tenería | 214 | 1/27 | 7 |
| Amable | 200 | 1/27 | 7 |

| | | | |
|------------------------------|------|------|----|
| María | | | |
| Virgen Pamba | 107 | 1/27 | 4 |
| La banda | 84 | 1/27 | 3 |
| Las Pitas | 31 | 1/27 | 1 |
| Motupe | 28 | 1/27 | 1 |
| La Paz | 22 | 1/27 | 1 |
| Los Molinos | 6 | 1/27 | 1 |
| Total | 2220 | | |
| Total de muestras sanguíneas | | | 81 |

Cuadro 5: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Sur de la Hoya de Loja

| Lugar/barrios | N ^o de hembras >2 años | Fracción del muestreo | Tamaño de la muestra |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| El Capulí | 197 | 1/27 | 7 |
| Punzara | 186 | 1/27 | 6 |
| Quilloyacu | 126 | 1/27 | 5 |
| Santa Teresita | 123 | 1/27 | 4 |
| Argelia | 57 | 1/27 | 2 |
| Pueblo Nuevo | 28 | 1/27 | 1 |
| Dos Puentes | 25 | 1/27 | 1 |
| Las Minas | 20 | 1/27 | 1 |
| San Isidro | 11 | 1/27 | 1 |
| Total | 773 | | |
| Total de muestras sanguíneas | | | 28 |

Cuadro 6: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Este de la Hoya de Loja.

| Lugar/barrios | Nº de hembras >2 años | Fracción del muestreo | Tamaño de la muestra |
|---|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| El Churo | 20 | 1/27 | 1 |
| El Rincón | 10 | 1/27 | 1 |
| Calvario | 58 | 1/27 | 3 |
| Zamora | 71 | 1/27 | 3 |
| Huayco | | | |
| San Cayetano | 11 | 1/27 | 1 |
| Yanacocha | 125 | 1/27 | 5 |
| Las Palmas | 32 | 1/27 | 1 |
| Total | 336 | | |
| Total de muestras sanguíneas a estudiar | | | 15 |

Cuadro 7: Distribución de las UBA hembras mayores de dos años por barrios en la zona Oeste de la Hoya de Loja.

| Lugar/barrios | Nº de hembras >2 años | Fracción del muestreo | Tamaño de la muestra |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Eucaliptos | 162 | 1/27 | 6 |
| Belén | 79 | 1/27 | 3 |
| Menfis | 73 | 1/27 | 3 |
| Tierras Coloradas | 73 | 1/27 | 3 |
| Bolonia | 61 | 1/27 | 2 |

| | | | |
|---|-----|------|----|
| Payanchi | 56 | 1/27 | 2 |
| Plateado | 37 | 1/27 | 1 |
| La Victoria | 35 | 1/27 | 1 |
| Las Palmeras | 32 | 1/27 | 1 |
| Obra pía | 24 | 1/27 | 1 |
| Miraflores | 21 | 1/27 | 1 |
| San Francisco | 11 | 1/27 | 1 |
| Colinas Lojanas | 6 | 1/27 | 1 |
| Total | 670 | | |
| Total de muestras sanguíneas a estudiar | | | 26 |

El total de muestras sanguíneas de los bovinos hembras mayores de dos años de la Hoya de Loja son 150.

3.2.7 Descripción de las Unidades Experimentales

Para el presente trabajo se utilizaron 150 bovinos (hembras mayores de 2 años, en estado de ordeño y secas) a las cuales se les tomaron muestras de sangre de la vena yugular para ser analizada.

3.2.8 Diseño de la Investigación

En el diseño de la investigación se realizó un muestreo de etapas sucesivas donde se dividió la zona de estudio en Unidades Primarias de Muestreo, y se seleccionaron los animales de acuerdo al número existente de cada barrio, en cada sector geográfico de la Hoya de Loja.

3.2.9 Variables de Estudio

Se evaluaron las siguientes variables:

3.2.9.1. Prevalencia de leucosis bovina en la Hoya de Loja

- Porcentaje de animales negativos.
- Porcentaje de animales positivos.

3.2.9.2. Prevalencia de leucosis bovina según el Sector.

- Porcentajes de animales negativos.
- Porcentaje de animales positivos.

3.2.9.3. De acuerdo al número de linfocitos

- Porcentajes de animales negativos.
- Porcentaje de animales positivos.

3.2.10 Toma de Datos

Se elaboraron registros para cada variable en estudio y los datos se tomaron de acuerdo al número de animales a investigar, lo cual se estableció en un tiempo estimado de 12 semanas.

3.2.11 Análisis Estadístico Descriptivo

Se evaluó mediante cuadros de frecuencia, gráficos y figuras, de acuerdo a cada una de las variables estudiadas y a través del método porcentual, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia Real (PR)} = \frac{\text{PA} + (\text{ESP} - 1)}{\text{SE} + (\text{ESP} - 1)}$$

3.2.12 Manejo de los Animales

Los animales investigados fueron separados e identificados para la extracción y toma de muestras de sangre, y sus datos fueron tomados en los registros de campo para su posterior diferenciación.

3.2.13 Método de Recolección de Muestras

- **Recolección de sangre**

Hematológicos: las muestras se recolectaron de la vena yugular con agujas y tubos vacutainer tapa lila. Los exámenes se llevan a cabo en muestras sin coagular, con EDTA para hemogramas.

Serológicos: Estos test se efectuaron generalmente en suero, requiriéndose en este caso muestras de sangre coaguladas (vacutainer tapa roja) para la centrifugación. El suero puede sobrevivir máximo 4 horas a temperatura ambiente, aproximadamente 3 meses de temperatura 2 a 8°C, e indefinidamente a menos 180°C.

En la centrifugación, para lograr determinar el tiempo de centrifugado, se coloca el tubo en la centrifuga y se debe hacer que gire a la velocidad deseada (3000 – 3200 rpm) por un tiempo dado (30 minutos). Para la toma de muestra de sangre y la obtención de suero sanguíneo se requirió de agujas y tubos vacutainer con y sin anticoagulante.

Se extrajo sangre de la vena yugular previo a desinfección con alcohol; se utilizó agujas esterilizadas y tubos vacutainer con vacío para que la sangre llene por presión; se utilizaros 2 tubos uno tapa lila con EDTA anticoagulante para el Elisa y el otro tapa roja sin anticoagulante para el examen hematológico.

3.2.14 Protocolo del Ensayo para Elisa

Se dejó todos los reactivos a temperatura ambiente (18-26°C) antes de usarlos. Estos se mezclaron invirtiéndolos y/o agitándolos en un Vortex suavemente. Los controles fueron dispensados en la microplaca en forma pareada.

Luego se tomó las microplacas tapizadas y se marcó la posición de las muestras en una hoja de trabajo.

1. La distribución de las muestras y los controles depende del protocolo de incubación de las muestras y controles que se utilizó; el cual fue:

Protocolo de Incubación corta (1 hora (\pm 5 min) a + 37°C (\pm 3°C)):

- Se debe Dispensar 190 μ l de solución tampón de dilución n° 2 en cada pocillo.
 - Luego Dispensar 10 μ l de control negativo NO DILUIDO en un pocillo.
 - Después Dispensar 10 μ l de control positivo NO DILUIDO en dos pocillos.
 - Luego Dispensar 10 μ l de cada muestra a analizar NO DILUIDA por pocillo.
 - Homogenizar el contenido de los pocillos con el agitador de microplacas.
 - Y Cubrir la microplaca (papel de aluminio, etc.) e incubar 1 hora (\pm 5 min) a 37°C (\pm 3°C)
2. Se lavó cada pocillo con aproximadamente 300 μ l de solución de lavado 3 veces. Luego aspiramos los contenidos líquidos de todos los pocillos después cada lavado. Tras la aspiración final, se eliminó el líquido de lavado residual de cada microplaca golpeándola firmemente sobre material absorbente. Evitando que las microplacas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.

3. Se Dispensaron 100 μ l de conjugado diluido en cada pocillo.
4. Después se Cubrio la microplaca (papel de aluminio, etc.) e incubo por 30 minutos (\pm 3 min.) a + 37°C (\pm 3°C).
5. Se repitió el paso n° 2.
6. Se dispenso 100 μ l de substrato TMB n° 13 en cada pocillo.
7. Luego se incubo 20 min (\pm 3 min) a 18-26°C protegida de la luz
8. Después se dispensaron 100 μ l de solución de frenado n° 3 por pocillo. Agitar suavemente para homogenizar el contenido de los pocillos. Secar la base de la microplaca.
9. Se Calibro el lector en blanco con aire
10. Luego se leyó las densidades ópticas a 450 nm (OD. 450)
11. Después de procedió a calcular los resultados.

3.2.14.1. Lectura de resultados

La reacción se considerada valida si la media del control positivo (CPx) tiene un valor mínimo medio de OD 450 de 0,350 y si el coeficiente entre la media del control (CPx) y el control negativo (CN A450) es igual o superior a 3,00.

3.2.14.2. Cálculos

Calculo de la media del control positivo (CPx)

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A450 + CP2 A650}{2}$$

Calculo del porcentaje M/P% de las muestras analizadas

$$M/P\% = 100X \frac{\text{Muestra A450} - CN\bar{x} A450}{CP\bar{x} - CN\bar{x} A450}$$

3.2.14.3. Interpretación de resultados

- Las muestras con porcentaje M/P inferior o igual al 85% se consideran negativas a la presencia de anticuerpos frente a BLV.
- Las muestras con porcentaje M/P superior al 85% e inferior al 115% se consideran dudosas y deben analizarse de nuevo.
- Las muestras con un porcentaje M/P superior o igual al 115% deberán considerarse positivas a la presencia de anticuerpos frente a BLV.

3.2.15 Protocolo para el Hemograma

3.2.15.1. Preparación del frotis de sangre

Para extender la preparación:

Se seleccionó láminas limpias, libres de grasa, cuyos extremos estén lisos no rotos, se colocó una lámina sobre el mostrador u otra superficie horizontal. Se dejó caer una gota de sangre del extremo derecho de la lámina, equidistando de los bordes largos de la misma; sosteniendo la lámina por su extremo izquierdo con el pulgar y el índice y presionando hacia abajo luego se extendió la sangre, deslizando la lámina encargada de

extender hasta que entre en contacto con la gota de sangre y se detuvo en este punto dejando que la sangre difunda por dicho ángulo, por capilaridad. Antes de que la gota alcance los bordes de la lámina horizontal se desplazó la lámina extensora hacia la izquierda en un movimiento rápido. Los frotis deben ser delgados y uniformes. Para esta prueba se utilizó la sangre con EDTA.

3.2.15.2. Para teñir la preparación

Se colocó la lámina sobre la gradilla de tinción; cubriéndose la totalidad de la misma con colorante de Wright mediante un gotero se esperó 1 a 5 minutos, se debe asegurar una cantidad de agua destilada para lavar las placas sin haber quitado el colorante de Wright.

Se esperó que seque completamente, una vez seca, se colocó una gota liberal de aceite de inmersión sobre la superficie de la preparación y se procede a su examen con el objetivo de inmersión. Debe examinarse una gran parte del frotis; se empieza por el borde, se continúa hacia el centro y se regresa de nuevo realizando el método de las almenas. Hay que cerciorarse de incluir los bordes durante este examen. Se continuará en esta forma hasta haber logrado cubrir un área representativa, anotando los elementos en la forma que se expone en el capítulo precedente.

4. RESULTADOS

4.1 PREVALENCIA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE LOJA

Los resultados obtenidos mediante el test de Elisa para el diagnóstico de leucosis enzoótica bovina en la Hoya de Loja en hembras mayores a dos años de edad, por medio del método de Elisa se presentan en los siguientes cuadros

Cuadro 8. Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya De Loja en porcentaje.

| Nº de animales | Positivos | % | Negativos | % |
|----------------|-----------|-----|-----------|------|
| 150 | 3 | 4,5 | 147 | 95,5 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro ocho indica la los casos positivos y negativos de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja, presentándose 3 casos positivos y se considera una prevalencia del 4,5% de LEB como se muestra en la siguiente figura.

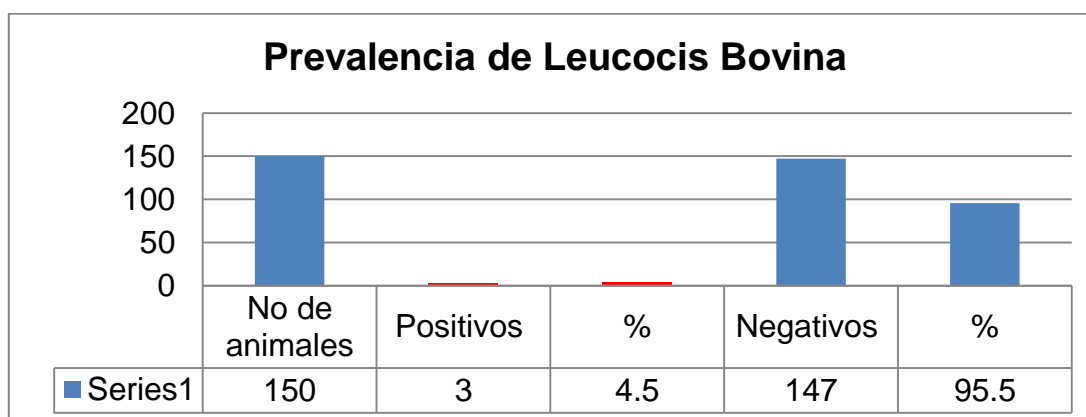


Figura 5. Porcentaje total de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja

4.1.1 Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja por Sectores.

Los resultados sobre la prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina en la Hoya de Loja por el método de Elisa se anotan en el siguiente cuadro y se grafican en la figura 6.

Cuadro 9. Prevalencia de Leucosis Enzootica bovina en la Hoya de Loja con muestras positivas y negativas por sectores.

| Sectores | Total muestras | Negativas | Positivas |
|----------|----------------|-----------|-----------|
| Norte | 82 | 81 | 1 |
| Sur | 28 | 26 | 2 |
| Este | 15 | 15 | 0 |
| Oeste | 25 | 25 | 0 |
| Total | 150 | 147 | 3 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

En el cuadro nueve se observa animales positivos y negativos de acuerdo a las zonas de estudio, siendo en la zona sur con la mayor prevalencia y la zona norte con menor prevalencia de Leucosis Bovina.

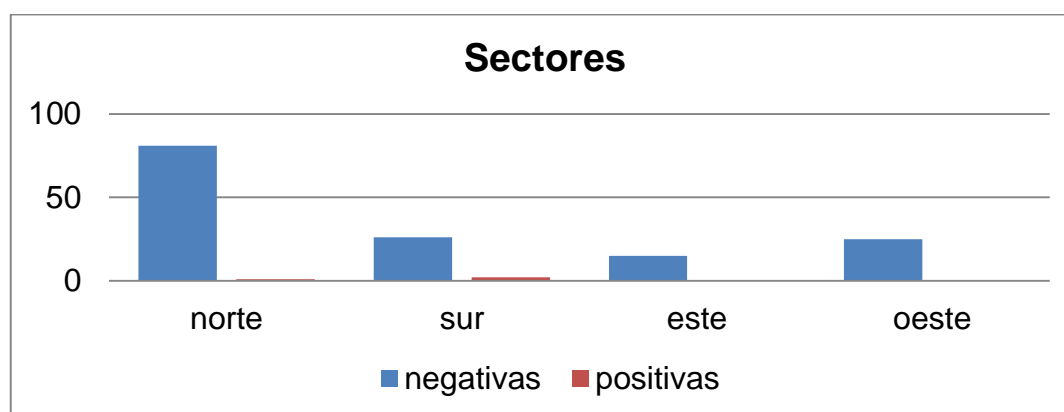


Figura 6. Prevalencia de Leucosis Bovina por sectores.

4.1. 2 Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Sur.

Los resultados sobre la prevalencia de Leucosis Enzootica bovina en el sector sur de la Hoya de Loja, se anotan en el cuadro diez y se esquematizan en la figura 7.

Cuadro 10. Prevalencia de Leucosis Enzootica bovina en casos positivos y negativos en los barrios del sector sur de la hoya de Loja.

| Sector | Barrios | Total de muestras | Positivas | Negativas |
|--------|----------------|-------------------|-----------|-----------|
| Sur | Santa Teresita | 4 | 1 | 3 |
| | Las minas | 1 | 0 | 1 |
| | Dos Puentes | 1 | 0 | 1 |
| | Pueblo Nuevo | 1 | 1 | 0 |
| | Punzara | 6 | 0 | 6 |
| | Argelia | 2 | 0 | 2 |
| | San Isidro | 1 | 0 | 1 |
| | Quillollaco | 5 | 0 | 5 |
| | El Capuli | 7 | 0 | 7 |
| Total | | 28 | 2 | 26 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro diez indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los barrios de estudio, donde 9 barrios son muestreados del sector sur de la Hoya de Loja, de 28 muestras recolectadas 2 muestras resultaron positivas, siendo el barrio Santa Teresita y Pueblo Nuevo donde se presenta prevalencia de la enfermedad.

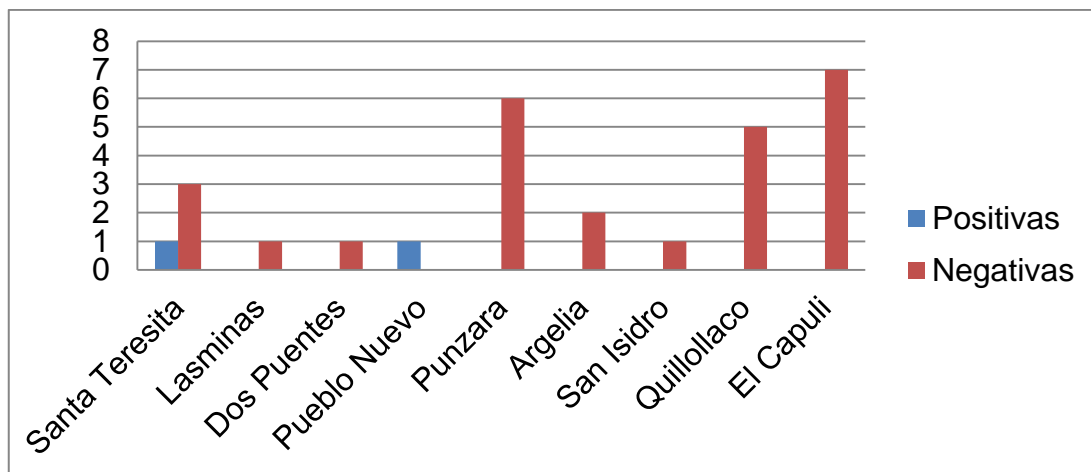


Figura 7. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector Sur de la Hoya de Loja.

4.1.3 Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Norte.

Los resultados sobre la prevalencia de Leucosis Enzootica bovina en el sector norte de la Hoya de Loja, se anotan en el cuadro once y se grafican en la figura 8

Cuadro 11. Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina con casos positivos y negativos en el sector Norte.

| Sector | Barrios | Total de muestras | Positivas | Negativas |
|--------|--------------|-------------------|-----------|-----------|
| Norte | Carigán | 8 | 0 | 8 |
| | Motupe | 1 | 0 | 1 |
| | Las Pitas | 1 | 0 | 1 |
| | La banda | 3 | 0 | 3 |
| | La Paz | 1 | 0 | 1 |
| | Jipiro | 11 | 0 | 11 |
| | Amable María | 7 | 1 | 6 |

| | | | | |
|-------|-----------------|----|---|----|
| | Zhucos | 10 | 0 | 10 |
| | Tenería | 7 | 0 | 7 |
| | Virgen Pamba | 4 | 0 | 4 |
| | Zalapa | 28 | 0 | 28 |
| | Los Molinos | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 82 | 1 | 81 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro once Indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los barrios de estudio, donde se puede observar que los 12 barrios muestreados del sector norte de la hoya de Loja, de 82 muestras recolectadas 1 muestras resultado positiva, siendo el barrio Amable María.

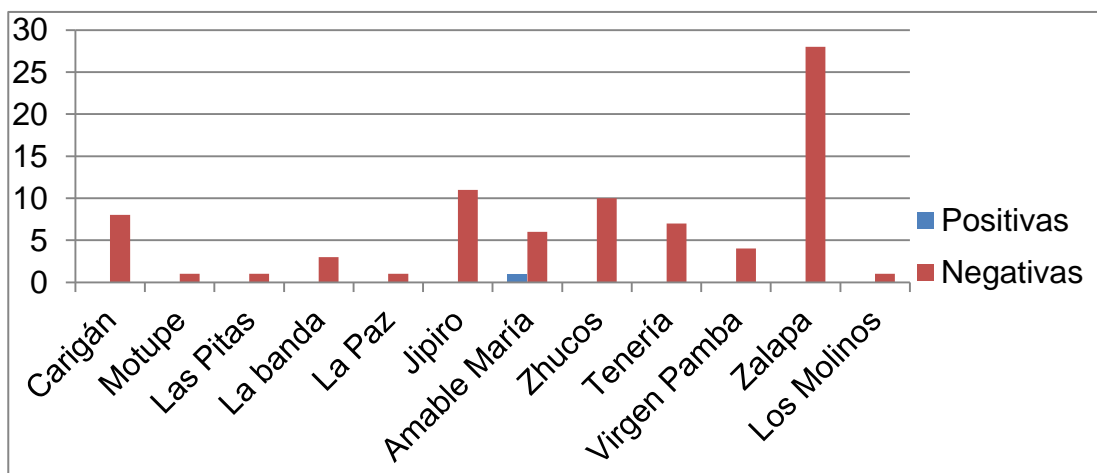


Figura 8. Prevalencia de Leucosis Bovina en el sector Norte.

4.1.4 Prevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en la Hoya de Loja Sector Oeste.

Los resultados sobre la prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina en el sector oeste de la Hoya de Loja, se anotan en el cuadro doce y se esquematizan en la figura 9.

Cuadro 12. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina en los barrios del sector Oeste.

| Sector | Barrios | Total de muestras | Positivas | Negativas |
|--------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|
| Oeste | Belén | 3 | 0 | 3 |
| | Eucaliptos | 6 | 0 | 6 |
| | Bolonia | 2 | 0 | 2 |
| | Obrapía | 1 | 0 | 1 |
| | Plateado | 1 | 0 | 1 |
| | San Francisco | 1 | 0 | 1 |
| | Colinas Lojanas | 1 | 0 | 1 |
| | La Victoria | 1 | 0 | 1 |
| | Miraflores | 1 | 0 | 1 |
| | Menfis | 3 | 0 | 3 |
| | Tierras Coloradas | 3 | 0 | 3 |
| | Payanchi | 2 | 0 | 2 |
| Total | | 25 | 0 | 25 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

Los datos presentados en el cuadro doce Indican los animales positivos y negativos de acuerdo a los barrios de estudio, donde se puede observar que los 12 barrios muestreados del sector Oeste de la hoya de Loja, de 25 muestras recolectadas ninguna resulto positiva donde no presenta incidencia de la enfermedad.

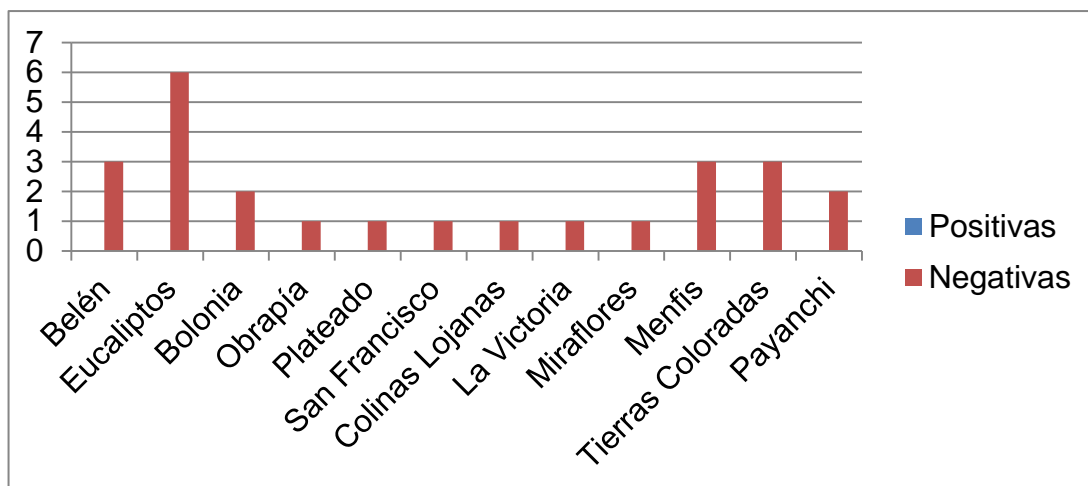


Figura 9. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector Oeste.

4.1.5 Prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en la Hoya de Loja Sector Este.

Los resultados sobre la prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina en el sector este de la Hoya de Loja, se anota en el cuadro trece y se grafica en la figura 10.

Cuadro 13. Prevalencia de Leucosis Enzootica bovina con casos positivos y negativos en los barrios del sector este de la hoya de Loja sector Este.

| Sector | Barrios | Total de muestras | Positivas | Negativas |
|--------|--------------|-------------------|-----------|-----------|
| Este | Zamora | 3 | 0 | 3 |
| | Huayco | | | |
| | San Cayetano | 1 | 0 | 1 |
| | Calvario | 3 | 0 | 3 |
| | Yanacocha | 5 | 0 | 5 |
| | Las Palmas | 1 | 0 | 1 |
| | El Churo | 1 | 0 | 1 |
| | El Rincon | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 15 | 0 | 15 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

Los datos presentados en el cuadro trece indican los animales positivos y negativos de acuerdo a los barrios de estudio, donde se puede observar que los 7 barrios muestreados del sector Este de la hoya de Loja, de 15 muestras recolectadas ninguna resulto positiva lo que representa que no hay incidencia de la enfermedad.

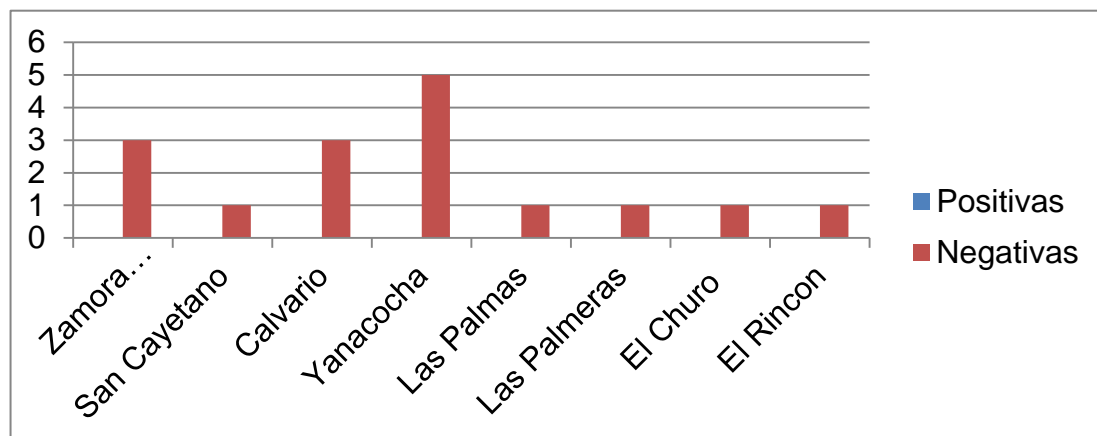


Figura 10. Prevalencia de Leucosis Bovina en los barrios del sector este de la Hoya de Loja.

4.1.6 Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio, Sector Sur.

Los resultados del conteo de linfocitos en el sector sur se muestran en el cuadro catorce.

Cuadro 14: Diferencia en el contaje de linfocitos entre animales positivos y negativos en el sector Sur.

| Sector | Barrios | Numero | Sexo | Edad | Nº. Linfocitos % | Positivo/ Negativo |
|--------|----------------|-------------|------|---------|------------------|--------------------|
| Sur | Santa Teresita | 1 Betty | H | >2 años | 70 | N |
| | | 2 Luisa | | | 70 | N |
| | | 3 Diana | | | 66 | N |
| | | 4 Alejandra | | | 81 | P |
| | Las Minas | 5 Rosa | H | >2 años | 69 | N |
| | Dos Puentes | 6 Ana | H | >2 años | 70 | N |
| | Pueblo Nuevo | 7 Cecilia | H | >2 años | 84 | P |
| | Punzara | 11 Carmen | H | >2 años | 63 | N |
| | | 12 Luna | | | 64 | N |
| | | 13 Manuela | | | 66 | N |
| | | 14 Ceci | | | 70 | N |

| | | | | | | |
|--|-------------|-------------------|---|---------|----|---|
| | | 15 Eliza | | | 65 | N |
| | | 16 Sali | | | 63 | N |
| | Argelia | 17 Mari | H | >2 años | 69 | N |
| | | 18 Elena | | | 68 | N |
| | San Isidro | 19 Lorena | H | >2 años | 63 | N |
| | Quillollaco | 20 Clemen- cia | H | >2 años | 68 | N |
| | | 21 Mireya | | | 63 | N |
| | | 22 Lupe | | | 67 | N |
| | | 23 Andrea | | | 66 | N |
| | | 24 Maruja | | | 63 | N |
| | El Capulí | 25 Cristy | H | >2 años | 63 | N |
| | | 26 Johana | | | 66 | N |
| | | 27 Lola | | | 67 | N |
| | | 28 Lesly | | | 68 | N |
| | | 29 Maura | | | 63 | N |
| | | 30 Sandra | | | 65 | N |
| | | 31 Adriana | | | 68 | N |
| | | Total | | | 28 | |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro catorce indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los al contaje del número de linfocitos siendo los de mayor aumento los animales positivos, como es el animal 4 de nombre Alejandra con un total de 81 linfocitos, y el otro número 7 con nombre Cecilia con un total de 84 linfocitos.

4.1.7 Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio, Sector Norte.

Los resultados del conteo de linfocitos en el sector sur se muestran en el cuadro quince.

Cuadro 15: Diferencia en el contaje de linfocitos positivos y negativos en el sector Norte de la hoya de Loja.

| Sector | Barrios | Numero | Sexo | Edad | Nº. Linfocitos % | Positivo/ Negativo |
|--------|-----------|------------|------|---------|------------------------|-----------------------|
| Norte | Carigán | 32 Gladis | H | >2 años | 64 | N |
| | | 33 Maggy | | | 63 | N |
| | | 34 Sandri | | | 66 | N |
| | | 35 Anahi | | | 63 | N |
| | | 36 Isabela | | | 64 | N |
| | | 37 Carlita | | | 60 | N |
| | | 38 Fey | | | 64 | N |
| | | 39 Yina | | | 65 | N |
| | Motupe | 40 Yanela | H | >2 años | 63 | N |
| | Las Pitas | 41 Deisy | H | >2 años | 68 | N |
| | La banda | 42 Blanca | H | >2 años | 66 | N |
| | | 43 Maritza | | | 66 | N |
| | | 44 Rocio | | | 63 | N |
| | La Paz | 45 Angeles | H | >2 años | 66 | N |

| | | | | | |
|-----------------|--------------|---|------------|----|---|
| Jipiro | 46 Pamela | H | >2 años | 66 | N |
| | 47 Cecibel | | | 70 | N |
| | 48 Estefany | | | 65 | N |
| | 49 Danha | | | 69 | N |
| | 50 Gaby | | | 65 | N |
| | 51 Eloisa | | | 62 | N |
| | 52 Marcia | | | 64 | N |
| | 53 Lourdes | | | 69 | N |
| | 54 Caridad | | | 66 | N |
| | 55 Agustina | | | 64 | N |
| | 56 Flor | | | 62 | N |
| Amable María | 57 Candela | H | >2 años | 65 | N |
| | 58 Frida | | | 65 | N |
| | 59 Antonia | | | 64 | N |
| | 60 Veronica | | | 70 | N |
| | 61 Carmelita | | | 65 | N |
| | 62 Alicia | | | 78 | P |
| | 63 Jhuly | | | 63 | N |
| Zhucos | 64 Dolores | H | >2 años | 65 | N |
| | 65 Maritza | | | 67 | N |
| | 66 Maya | | | 63 | N |
| | 67 Lula | | | 65 | N |
| | 68 Loreta | | | 67 | N |
| | 69 Nena | | | 64 | N |
| | 70 Janina | | | 69 | N |
| | 71 Julexi | | | 63 | N |
| | 72 Adriana | | | 63 | N |
| | 73 Yerly | | | 66 | N |
| Tenería | 74 Sonia | H | >2 años | 63 | N |
| | 75 Patricia | | | 64 | N |

| | | | | | |
|-----------------|---------------|---|------------|----|---|
| | 76 Yarita | | | 66 | N |
| | 77 Yomara | | | 66 | N |
| | 78 Janeli | | | 65 | N |
| | 79 Andreina | | | 66 | N |
| | 80 Enrriqueta | | | 70 | N |
| Virgen Pamba | 81 Elina | H | >2 años | 62 | N |
| | 82 Emilia | | | 69 | N |
| | 83 Marina | | | 63 | N |
| | 84 Ramona | | | 63 | N |
| Zalapa | 85 Mariana | H | >2 años | 64 | N |
| | 86 Eliana | | | 65 | N |
| | 87 Yolanda | | | 68 | N |
| | 88 Teresa | | | 67 | N |
| | 89 Esperanza | | | 66 | N |
| | 90 Camila | | | 62 | N |
| | 91 Yuly | | | 60 | N |
| | 92 Ferya | | | 65 | N |
| | 93 Susan | | | 62 | N |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro quince indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los al contaje del número de linfocitos siendo los de mayor contaje los animales positivos, el animal de numero 62 con nombre Alicia con un total de 78 linfocitos.

4.1.8 Diferencia en el contaje de linfocitos entre animales positivos y negativos por sectores de estudio, sector Oeste.

Los resultados sobre el conteo de linfocitos en el sector norte de la Hoya de Loja, se anotan en el siguiente cuadro.

Cuadro 16: Diferencia en el conteo de linfocitos en animales positivos y negativos en el sector Oeste.

| Sector | Barrios | Numero | Sexo | Edad | Nº. Linfocitos % | Positivos/ Negativos |
|--------|--------------------|----------------|------|------------|------------------------|-------------------------|
| Oeste | Belén | 122 Rosa | H | >2 años | 69 | N |
| | | 123Cuca | | | 64 | N |
| | | 124 Pintada | | | 65 | N |
| | Eucaliptos | 125 Vanessa | H | >2 años | 66 | N |
| | | 126 Xiomara | | | 64 | N |
| | | 127 Dome | | | 68 | N |
| | | 128 Kiara | | | 68 | N |
| | | 129 Fatima | | | 65 | N |
| | | 130 Irma | | | 67 | N |
| | | Bolonia | | | 131 Ines | H |
| | 132 Lina | | 69 | N | | |
| | Obrapia | 133 Mara | H | >2 años | 69 | N |
| | Plateado | 134 Nora | H | >2 años | 64 | N |
| | San Francisco | 135 Olga | H | >2 años | 70 | N |
| | Colinas Lojanas | 138 Norma | H | >2 años | 66 | N |

| | | | | | | | |
|--|----------------------|------------------|---|------------|----|----|---|
| | La Victoria | 139 Juana | H | >2 años | 67 | N | |
| | Miraflores | 140 Dunia | H | >2 años | 62 | N | |
| | Menfis | 141 Linda | H | >2 años | 63 | N | |
| | | 142 Oliva | | | 67 | N | |
| | | 143 Rita | | | 68 | N | |
| | Tierras Coloradas | 144 Tina | H | >2 años | 71 | N | |
| | | 145 Romina | | | 69 | N | |
| | | 146 Melissa | | | 65 | N | |
| | Payanchi | 147 Nardi | H | >2 años | 61 | N | |
| | | 148 Valentina | | | 66 | N | |
| | Total | | | | | 25 | 0 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro dieciséis Indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los al contaje del número de linfocitos siendo los de mayor contaje los animales positivos, como en el sector Oeste no se encontró ningún animal positivo todos los animales se encuentran dentro del rango normal de linfocitos del ganado bovino.

4.1.9 Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio, Sector Este.

Los resultados sobre el conteo de linfocitos en animales positivos y negativos en el sector este de la Hoya de Loja, se anotan en el siguiente cuadro.

Cuadro 17: Diferencia en el contaje de linfocitos en animales positivos y negativos en el sector Este.

| Sector | Barrios | Numero | Sexo | Edad | Nº. Linfocitos % | Positivo/ Negativo |
|--------|------------------|----------------|------|------------|------------------------|-----------------------|
| Este | Zamora Huayco | 8 Jesica | H | >2 años | 70 | N |
| | | 9 Virginia | | | 65 | N |
| | | 10 Naty | | | 67 | N |
| | San Cayetano | 112 Yuri | H | >2 años | 68 | N |
| | Calvario | 113 Julya | H | >2 años | 70 | N |
| | | 114 Beatriz | | | 70 | N |
| | | 115 Brandy | | | 67 | N |
| | Yanacocha | 117 Cisne | H | >2 años | 69 | N |
| | | 118 Coral | | | 68 | N |
| | | 119 Delia | | | 69 | N |
| | | 120 Karina | | | 70 | N |
| | | 121 Karola | | | 64 | N |
| | Las Palmas | 136 Yenny | H | >2 años | 69 | N |
| | Las Palmeras | 137 Yasmin | H | >2 años | 66 | N |
| | El Churo | 149 Aneli | H | >2 | 66 | N |

| | | | | | | |
|--|-----------|----------|---|------------|----|---|
| | | | | años | | |
| | El Rincón | 150 Lema | H | >2 años | 67 | N |
| | Total | | | | 15 | 0 |

Fuente: Investigación Directa

Elaborado por: El Autor

El cuadro diecisiete indica los animales positivos y negativos de acuerdo a los al contaje del número de linfocitos siendo los de mayor contaje los animales positivos, y los que se hayan dentro del rango normal son negativos.

5. DISCUSION

5.1 PREVALENCIA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE LOJA

En la Hoya de Loja, hasta la presente investigación no se han realizado trabajos similares sino sectorizados, por lo tanto no hay datos más que los presentes los resultados obtenidos durante la investigación se encontró la prevalencia de la LEB, siendo del 4,5%, distribuida en los barrios de los sectores sur con el 3% y norte con el 1,5% respectivamente.

5.1.1 Prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina en la Hoya de Loja por Sectores.

La presencia de Leucosis enzoótica bovina en los casos positivos y la prevalencia de la misma en la Hoya de Loja en el presente trabajo de investigación dio el 4,5%, que comparado con los resultados de Andrés Veintimilla (2013) en el Camal Frigorífico de Loja fue de 0%; la prevalencia del 4,5% de la leucosis bovina en la Hoya de Loja se atribuye presumiblemente al mal manejo de algunas explotaciones, las malas condiciones sanitarias, factores climáticos y deficiente alimentación.

Otros datos de la prevalencia de Leucosis Enzoótica bovina a nivel nacional como los referidos por Juan Ulcuango (2013), Cayambe, confirma el 5,6% de prevalencia de la enfermedad; también Mónica Puma y Wilson Yanza (2013), Azuay, confirma el 6,1% de prevalencia de la LEB. Considerando que los sectores positivos son altos, por consiguiente se asume que la prevalencia de la LEB esta presente en nuestro país debido a un mal manejo sanitario.

5.1.2 Diferencia en el Contaje de Linfocitos entre Animales Positivos y Negativos por Sectores de Estudio.

De acuerdo al contaje de linfocitos de todos los animales analizados se presentó aumento de los mismos, como se puede observar en los casos positivos de la presente investigación. Gonzalo Rama (2009) Uruguay, demuestra que el promedio de linfocitos aumenta significativamente en los animales infectados con VLB. En los dos casos existió el aumento de linfocitos en animales positivos para leucosis enzoótica bovina con la diferencia del número en el aumento de ambos trabajos por tal motivo dicho examen si demuestra la enfermedad aunque el aumento de los linfocitos puede ser variable.

6. CONCLUSIONES

Luego de haber analizado los resultados y discusión se llega a las siguientes conclusiones:

- De las 150 muestras analizadas por el método de Elisa se encontraron 3 positivas que representan el 4.5% de Prevalencia de Leucosis Bovina en la Hoya de Loja.
- Que el sector con mayor prevalencia es el sur con 2 muestras positivas que equivale al 3% de prevalencia de la enfermedad.
- La técnica de Elisa es una de las más adecuadas para realizar el diagnóstico de Leucosis Bovina gracias a la confiabilidad, facilidad y especificidad que representa.
- Se presume que existe desconocimiento de la enfermedad por parte de propietarios de los animales hace que se descuiden las medidas de sanidad haciendo que se propague más la enfermedad.

7. RECOMENDACIONES

- Expandir el estudio de esta enfermedad por todo el país. Con el propósito de presentar un reporte de prevalencia de Leucosis Enzootica Bovina.
- Realizar nuevas investigaciones sobre Leucosis Enzootica Bovina en zona aledañas, con la finalidad de determinar la presencia de esta enfermedad
- Incrementar las medidas de higiene, tales como una adecuada desinfección de agujas y enseres de manejo, el adecuado manejo de excretas y un control de vectores ayudaran a disminuir la difusión de esta enfermedad.
- Establecer planes de bioseguridad, y establecer registros sanitarios y de control de los animales.
- Exigir los respectivos certificados para la movilización y comercialización de los bovinos que garantice la ausencia de esta enfermedad en animales que son traídos de otros lugares.
- Por observación directa se pudo notar que una de las principales fuentes de contaminación es la vacunación de la fiebre aftosa, debido a que utilizan la misma aguja para varios animales.

8. BIBLIOGRAFIA

AGROCALIDAD (Agencia Ecuatoriana De Aseguramiento De La Calidad).2011. Informe de la campaña de vacunación de la aftosa 2011 y censo de los animales vacunados. Loja, EC.

BARUTA, D.; ARDOINO, S.; BRANDAN, J.; SOSA, R.; MARIANI, E. ALBRETCH, E.2011. Leucosis Bovina Enzootica. Cátedra Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116 (6360), General Pico. La Pampa. Argentina

BEIER, 2008. LABORATORIO VMRD cod 5505.20, WA; USA.

CAÑIBANO, B.; EMILIANO O.; SCHANG; GUTIÉRREZ. 2011. Tesis doctoral Leucosis Enzoótica Bovina. Tandil. Buenos Aires. Argentina. afaela.inta.gov.ar/revistas/inf0999.htm

COFFIN, D. 1959. Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. México.

OCHOA, D. 1998. Estudio Serológico sobre Leucosis Viral Bovina Enzootica a través de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel en tres fincas de ganado de cría El Parcela miento, El Pilar, La Democracia, Escuintla. Tesis. Guatemala.

E. T. GONZÁLEZ, G. A. OLIVA, M. E. ETCHEVERRIGARAY. 1988. Leucosis bovina: principales características del agente etiológico y enfermedad. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 10, No. 2. LA Plata. Argentina.

PALMA, E. 2011. Determinación de la Prevalencia de Leucosis Bovina en hatos lecheros en el Cantón Quevedo por la técnica de Inmunodifusión en Gel Agar (AGID). Tesis. Guayaquil.

MACARTHUR, E. 2005. Leucosis bovina enzoótica Instituto Agrícola PMB 8 Camden, Nueva Gales del Sur 2570 Australia.

MEZA, G. 2008. Leucosis Bovina y su Potencial Impacto en la Salud Humana. Universidad de Ciencias Aplicadas Y Ambientales (U.D.C.A.). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

GIRAUDO, J; BÉRGAMO E; SCHNEIDER M; MAGNANO G; MACIAS A; STICOTTI E; MACÍÓ, M. 2010. Leucosis Enzoótica Bovina Argentina.

MORATORIO, G. 2012. Aspectos genómicos y evolutivos del virus de la Leucosis Bovina. Uruguay, Montevideo.

GRAU, M; MONTI, G. 2010. med. vet. v.42 n.2 Valdivia.

GATTI, M. 2007. Leucosis Bovina, Enfermedad De Gran Importancia Y Limitante Para La Exportación De Ganado En Pie. Uruguay.

MAXIME, B. 1961. Compendio de Patología Clínica Veterinaria. México.

GRAU, M. 2009. Prevalencia de Leucosis Viral Bovina en Rebaños Lecheros de las Regiones de los Ríos y los Lagos y su Potencial Asociación con Medidas de Manejo Prediales. Tesis de Grado. Valdivia. Chile.

MORA, E. 1997. Evaluación de Practicas de Manejo asociadas al riesgo de la transmisión del virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en hatos lecheros de Costa Rica por el Método de Elisa. Costa Rica.

POBLETE, A. 1997. Estudio seguimiento de la Leucosis Enzootica Bovina en dos predios lecheros en la provincia de Ñuble utilizando el Método de Elisa.

PUMA, M; YANZA, W. 2013. Prevalencia de leucosis bovina en las parroquias Orientales del Cantón Paute de la Provincia del Azuay. Azuay.

RAMA, G. 2009. Aspectos sobre el diagnostico de Leucosis Enzootica Bovina. Uruguay.

ULCUANGO, J. 2013. Prevalencia de Leucosis Bovina mediante la prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) en la Comunidad Santo Domingo N° 1, Santo Domingo

VEINTIMILLA, A. 2013. Diagnostico de Leucosis Bovina por el Metodo Agar Gel Difusion (IDGA) y cuenta de leucositos en bovinos faenados en el Camal Frigorifico de Loja. Loja.

ZHINGRE, F. 2003. Diagnostico de Leucosis Bovina en el Camal Frigorifico de Loja. Loja.

Enlaces de Internet

BUENAS TAREAS. Leucosis Bovina. 2012.

<http://www.buenastareas.com/ensayos/Leucosis-Bovina/3994696.html>.

DESCRIPTORES EN CIENCIAS DE LA SALUD (DECS). 2012. Leucosis Bovina Enzoótica. <http://decs.es/enfermedades/leucosis-bovina-enzootica.3/>

MEDICINA PREVENTIVA y SALUD PÚBLICA. 2008. Leucosis bovina o linfosarcomaenzootico bovino.<http://es.scribd.com/doc/7262650/leucosis>.

ELISA COMPETITIVO

<http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=competitive-elisa-protocol>.

PRINCIPIOS BÁSICOS PARA ELISA COMPETITIVO. <http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=competitive-elisa>

CULTEK. FUNDAMENTOS Y TIPOS DE ELISAS. 2006.
<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>.

VICTOR COTRINO B. 2012. <http://www.lmvltada.com/blog/?p=14>.

Prevalencia: <http://www.definicionabc.com/salud/prevalencia.php>

9. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA



Figura 11: Recolección de muestras



Figura. 12: Centrifugación de muestras

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA



Figura 13: Ordenamiento de muestras en tubos eppendorf con su respectiva identificación

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA

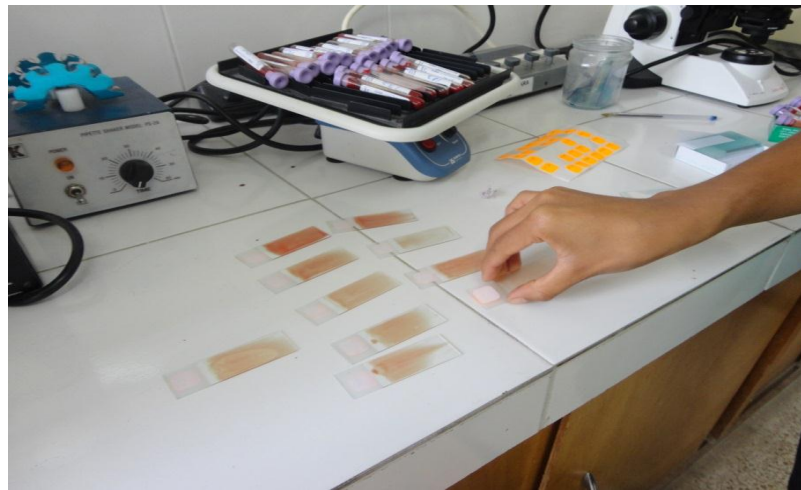


Figura 14: Elaboración de placas para exámenes hematológicos

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA



Figura 15: Kit de análisis de anticuerpos contra el virus de la Leucosis bovina

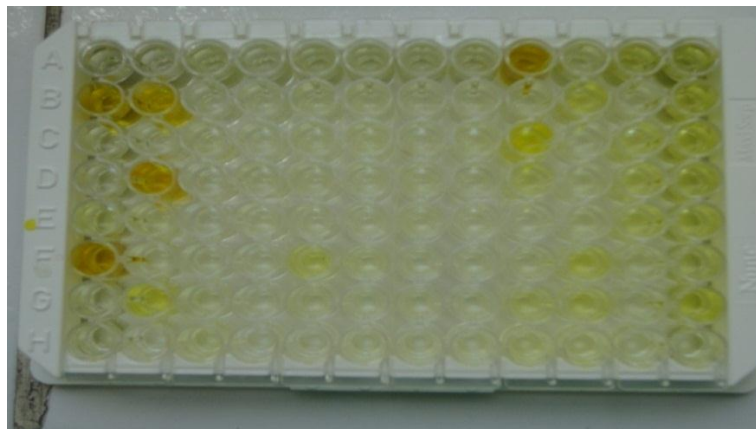


Figura 16: Placas recubiertas con VLB

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA



Figura 17: Tesista en el laboratorio



Figura 18: Lector de Microelisa

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA



Figura 19: Tesista y Director

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA

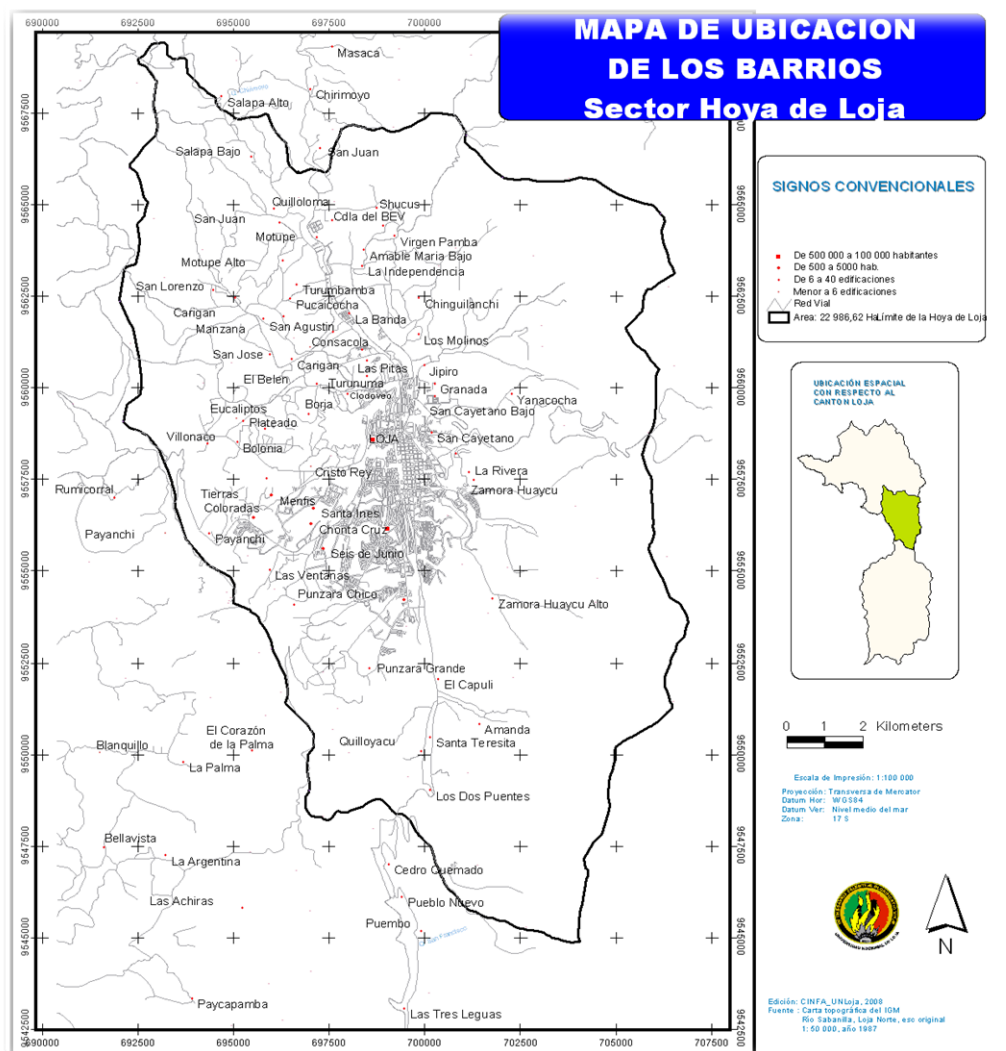


Figura 20: Sectores de la Hoya de Loja

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA.

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO
LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

| | | | |
|--------------------------------------|-------------------|---|-----------------|
| CASO: | N-934 C | MUESTRAS: | Suero bovino |
| CLIENTE: | Agustín Contento | ESPECIE: | Bovina |
| DIRECCION DEL CLIENTE: | Amable María-Loja | RAZA: | No informa |
| HACIENDA: | No Informa | SEXO: | H |
| DIRECCION DEL PREDIO: | Amable María-Loja | EDAD: | 2 años |
| TELEFONO: | No Informa | RESPONSABLE: | C. Montalvo |
| MEDICO REMITENTE: | Segundo Barragán | CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO: | 18 ° C – 25 ° C |
| FECHA DE RECEPCION: | 2013-06-31 | | |
| FECHA DE ANALISIS: | 2013-06-03 | | |
| FECHA DE EMISION DEL INFORME: | 2013-06-06 | | |

| | |
|--|---|
| Pruebas Solicitadas: Serología para Leucosis Bovina-Elisa | Tratamientos antes de la toma de muestra: NR |
|--|---|

| | |
|------------------------------------|--|
| Prueba: LEUCOSIS BOVINA | Método: ELISA (LVX / MAL/ 088-00) |
| Unidad: Negativo / POSITIVO | |

| No | IDENTIFICACIÓN | % PP | RESULTADO |
|----------|----------------|------|-----------|
| N-934-01 | Muestra 61 | 95 | POSITIVO |

INTERPRETACION – LEUCOSIS BOVINA- ELISA:

Por medio de la técnica de ELISA para Leucosis Bovina en suero, valores (%) < 20 % se considera Negativo a anticuerpos contra Leucosis bovina, y valores con un valor (%) ≥ 20% se considera POSITIVO a anticuerpos contra Leucosis bovina.

DESIGNACION: Según Resolución 11270 del MIPRO (MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD) a través de la secretaría de la calidad, resuelve DESIGNAR como Organismo de Evaluación de Conformidad al Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB CIA LTDA, para que realice el ensayo de Leucosis bovina, por la técnica de ELISA (Detección de anticuerpos frente a la glicoproteína GP51 del virus de la BLV).

*Este informe no podrá ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación de la Gerencia.

*NOTA: ESTE RESULTADO ES ÚNICAMENTE VALIDO PARA LA MUESTRA EXAMINADA

ATENTAMENTE,



Micrb. Cristina Montalvo
DIRECTORA LIVEXLAB

L VX / FOR / MC 2301 - 01 Página 3 de 3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
METODO DE ELISA

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

| | | | |
|---|-------------------|--|-----------------|
| CASO: | N-934 B | MUESTRAS: | Suero bovino |
| CLIENTE: | Angel Macas | ESPECIE: | Bovina |
| DIRECCION DEL CLIENTE: | Dos Puentes-Loja | RAZA: | No Informa |
| HACIENDA: | No Informa | SEXO: | H |
| DIRECCION DEL PREDIO: | Dos Puentes -Loja | EDAD: | 2 años |
| TELEFONO: | No Informa | RESPONSABLE: | C. Montalvo |
| MEDICO REMITENTE: | Segundo Barragán | CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO: | 18 ° C - 25 ° C |
| FECHA DE RECEPCION: | 2013-06-31 | | |
| FECHA DE ANALISIS: | 2013-06-03 | | |
| FECHA DE EMISION DEL INFORME: | 2013-06-06 | | |
| Pruebas Solicitadas: Serología para Leucosis Bovina-Elisa | | Tratamientos antes de la toma de muestra: NR | |

| | | | |
|---------|---------------------|---------|---------------------------|
| Prueba: | LEUCOSIS BOVINA | Método: | ELISA (LVX / MAL/ 088-00) |
| Unidad: | Negativo / POSITIVO | | |

| No | IDENTIFICACIÓN | % PP | RESULTADO |
|----------|----------------|------|-----------|
| N-934-01 | Muestra 7 | 57 | POSITIVO |

INTERPRETACION - LEUCOSIS BOVINA- ELISA:

Por medio de la técnica de ELISA para Leucosis Bovina en suero, valores (%) < 20 % se considera Negativo a anticuerpos contra Leucosis bovina, y valores con un valor (%) ≥ 20% se considera POSITIVO a anticuerpos contra Leucosis bovina.

DESIGNACION: Según Resolución 11270 del MIPRO (MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD) a través de la secretaria de la calidad, resuelve DESIGNAR como Organismo de Evaluación de Conformidad al Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB CIA LTDA, para que realice el ensayo de Leucosis bovina, por la técnica de ELISA (Detección de anticuerpos frente a la glicoproteína GP51 del virus de la BLV).

*Este informe no podrá ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación de la Gerencia.

*NOTA: ESTE RESULTADO ES UNICAMENTE VALIDO PARA LA MUESTRA EXAMINADA

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
DIRECTORA LIVEXLAB

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
 RENOVABLES
 CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
 DIAGNOSTICO DE LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA EN LA HOYA DE
 LOJA EN HEMBRAS MAYORES A DOS AÑOS, POR MEDIO DEL
 METODO DE ELISA

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO
LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
 Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
 e-mail: resultados@livex.com.ec Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

| | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---|-----------------|
| CASO: | N-934 A | MUESTRAS: | Suero bovino |
| CLIENTE: | Miguel Riofrío | ESPECIE: | Bovina |
| DIRECCION DEL CLIENTE: | Santa Teresita-Loja | RAZA: | No Informa |
| HACIENDA: | No Informa | SEXO: | H |
| DIRECCION DEL PREDIO: | Santa Teresita-Loja | EDAD: | 2 años |
| TELÉFONO: | No Informa | RESPONSABLE: | C. Montalvo |
| MEDICO REMITENTE: | Segundo Barragán | CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO: | 18 ° C – 25 ° C |
| FECHA DE RECEPCION: | 2013-06-31 | | |
| FECHA DE ANALISIS: | 2013-06-03 | | |
| FECHA DE EMISION DEL INFORME: | 2013-06-06 | | |

| | |
|--|---|
| Pruebas Solicitadas: Serología para Leucosis Bovina-Elisa | Tratamientos antes de la toma de muestra: NR |
|--|---|

| | |
|------------------------------------|--|
| Prueba: LEUCOSIS BOVINA | Método: ELISA (LVX / MAL/ 088-00) |
| Unidad: Negativo / POSITIVO | |

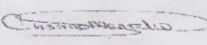
| No | IDENTIFICACIÓN | % PP | RESULTADO |
|----------|----------------|------|-----------|
| N-934-01 | Muestra 4 | 59 | POSITIVO |

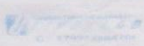
INTERPRETACION – LEUCOSIS BOVINA- ELISA:
 Por medio de la técnica de ELISA para Leucosis Bovina en suero, valores (%) < 20 % se considera Negativo a anticuerpos contra Leucosis bovina, y valores con un valor (%) ≥ 20% se considera POSITIVO a anticuerpos contra Leucosis bovina.

DESIGNACION: Según Resolución 11270 del MIPRO (MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD) a través de la secretaría de la calidad, resuelve DESIGNAR como Organismo de Evaluación de Conformidad al Laboratorio de Diagnóstico LIVEXLAB CIA LTDA, para que realice el ensayo de Leucosis bovina, por la técnica de ELISA (Detección de anticuerpos frente a la glicoproteína GP51 del virus de la BLV).

*Este informe no podrá ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación de la Gerencia.
 *NOTA: ESTE RESULTADO ES ÚNICAMENTE VALIDO PARA LA MUESTRA EXAMINADA

ATENTAMENTE,


 Micrb. Cristina Montalvo
 DIRECTORA LIVEXLAB



LVX/FOR/MC2301-01 Página 1 de 3

Figura. 21: Informe de resultados Positivos