

INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

**Presentado al programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias
Agrarias de la Universidad de Pamplona**

Por Madary Yurley Galvis Acevedo

®Derechos reservados 2017

INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

**Presentado al programa de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias
Agrarias de la Universidad de Pamplona**

Tutor:

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DMV M. Sc.; Ph. D.

Por Madary Yurley Galvis Acevedo

®Derechos reservados 2017

Contenido

	Págs.
INTRODUCCIÓN.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	8
1. OBJETIVOS.....	9
1.1 Objetivo general.....	9
1.2 Objetivos específicos.....	9
2. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE PASANTÍA.....	10
Ubicación.....	10
Distribución del área.....	11
Matriz de levante de terneras.....	12
Distribución del hato lechero.....	13
3. CASUÍSTICA.....	14
3.1 Casuística y actividades.....	14
3.1.1 Enfermedades pódalas.....	15
3.1.2 Mastitis.....	16
3.1.3 Enfermedades reproductivas.....	17
3.1.4 Enfermedades digestivas.....	18
3.1.5 Enfermedades respiratorias.....	19
3.1.6 Onfalitis.....	20
3.1.7 Abscesos.....	20
3.1.8 Hipocalcemias.....	21
3.1.9 Conjuntivitis.....	21
3.1.10 Dermatitis fúngica.....	22
3.1.11 Mal de alturas.....	22
IDENTIFICACIÓN DEL CALOSTRO Y LA LECHE COMO VEHÍCULO DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE VLB DE VACAS HOLSTEIN A TERNERAS MEDIANTE ELISA Y PCR.....	23
Resumen.....	23
Abstract.....	24
Introducción.....	25
4.1 Revisión de literatura.....	28
4.1.1 Tipos de LVB.....	28
4.1.2 Historia.....	29

4.1.3	Etiología	30
4.1.4	Huéspedes susceptibles	32
4.1.5	Transmisión	33
4.1.6	Distribución	36
4.1.7	Patogenia	37
4.1.8	Sintomatología.....	39
4.1.9	Lesiones	42
4.1.10	Diagnóstico.....	46
4.1.11	Prevención, Control y Erradicación.....	48
4.1.12	Tratamiento.....	49
4.1.13	Importancia.....	50
4.2	Materiales y métodos	51
4.2.1	Toma de muestras de calostro y leche	51
4.2.2	Toma de muestras de sangre.....	53
4.3	Resultados	56
4.4	Análisis de resultados y discusión	61
4.5	Conclusiones	68
4.6	Recomendaciones	69
CONCLUSIONES GENERALES		70
REFERENCIAS DE LITERATURA		71

Lista de Figuras

Figura 1: Localización del Centro Agropecuario Paysandú, Medellín, Colombia.....	10
Figura 2: Imágenes de la distribución de ganado de leche en la Estación Agraria Paysandú.....	11
Figura 3: Imágenes del programa de ganado de carne en clima frío BON, Angus y sus cruces.....	12
Figura 4: Casuística manejada en la Estación Agraria Paysandú durante los últimos cuatro meses.....	14
Figura 5: Lavado y desinfección de la pezuña del miembro posterior derecho en el que se evidencio pododermatitis séptica.	15
Figura 6: Realización de “california mastitis test” en vacas de producción.	17
Figura 7 : Ternera de 2 meses de edad con diarrea sanguinolenta.	19
Figura 8: Ternera de 65 días de nacida, la cual presentó una masa dura e indolora en el área del maxilar.....	21
Figura 9: Imagen de vaca con mal de altura en el que se observa edema submaxilar y en el pecho.....	22
Figura 10: Genes que componen la estructura de un retrovirus, gag, pol y env.....	31
Figura 11: Estructura del virus de la Leucosis Viral Bovina.	32
Figura 12: Mecanismos de transmisión de Leucosis bovina.	34
Figura 13: Ciclo de replicación del retrovirus de la VLB.....	38
Figura 14: muestra de calostro día 0, en tubo de 50 ml, con Bronopol conservante antimicrobiano.	51
Figura 15: Toma de muestra de la vena yugular con sistema al vacío vacutainer (DBvacutainer ®).....	53
Figura 16: Toma de muestra de la vena coccigea.....	54
Figura 17: Resultados en prueba diagnóstica ELISA.	57
Figura 18 : Gel de electroforesis.....	60

Lista de Tablas

Tabla 1. Resultados obtenidos por medio de ELISA y PCR a muestras tomadas de vacas y terneras Holstein puras.....	58
Tabla 2. Resultados obtenidos de las muestras de sangre tomadas a la madre de la ternera elegida para el seguimiento	59
Tabla 3. Resultados de seguimiento de ternera para determinación día exacto de la infección.....	59
Tabla 4. Resultados de las frecuencias para PCR positivos y PCR negativos en 7 terneras Holstein.	59
Tabla 5. Análisis de OR para la infección por VLB dado el consumo de calostro.	60

INTRODUCCIÓN

Las universidades generalmente en el último semestre de la carrera profesional tienen una asignatura denominada trabajo de grado, en la cual los estudiantes pueden decidir si realizan tesis o pasantía con el fin de obtener su título profesional. Comúnmente se inclinan por la pasantía debido a que esta ofrece la oportunidad de poner en práctica los conocimientos adquiridos durante la formación académica y a su vez obtener experiencia para desempeñarse satisfactoriamente en el campo laboral de su elección.

Los estudiantes de medicina veterinaria han sido capacitados, para observar, interpretar y analizar la información que se encuentra en su entorno al momento del ejercicio de la práctica profesional; por este motivo se encuentran facultados para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades que afecten a los animales.

La pasantía se realizó en la Estación Agraria Paysandú perteneciente a la Universidad Nacional sede Medellín ubicada en el corregimiento de Santa Elena, en la cual el pasante realizó diversas funciones las cuales se describen en el presente informe. Además se incluye un caso clínico que fue revisado, estudiado y atendido por el pasante durante su permanencia en la Estación Agraria Paysandú.

JUSTIFICACIÓN

La práctica profesional permite a los estudiantes consolidar los conocimientos adquiridos e integrarlos al ejercicio profesional, con el fin de desarrollar habilidades y destrezas, que le permitan desenvolverse adecuadamente en un futuro en el ámbito profesional, esto se logra con la ayuda de los tutores y personal capacitado en el área.

El propósito de la pasantía fue involucrar al estudiante en el manejo clínico de bovinos. La práctica profesional en la Estación Agraria Paysandú tuvo una duración de cuatro meses, en los que el pasante definió un perfil profesional propio y creó las bases para fortalecer su criterio como médico veterinario.

La labor como pasante en la Estación Agraria Paysandú consistió en llevar registros, verificar las buenas prácticas de ordeño (BPO), revisión continua de los animales, examen clínico, diagnóstico y tratamiento de los animales enfermos y realizar necropsias para dar un dictamen médico.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Aplicar los conocimientos adquiridos durante la formación académica, en la práctica profesional realizada en la Estación Agraria Paysandú.

1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar habilidades y mejorar las capacidades médico veterinarias propias del ejercicio profesional.
- Realizar un correcto abordaje al paciente, con especial énfasis en la anamnesis y examen físico resolviendo de manera acertada las diferentes patologías presentadas.
- Fortalecer los conocimientos adquiridos mediante retroalimentación con los médicos veterinarios y trabajadores del sitio de pasantía.

2. DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE PASANTÍA

Ubicación

La Estación Agraria Paysandú, es uno de los centros de investigación de la Universidad Nacional, está ubicado en el corregimiento de Santa Elena, área rural del municipio de Medellín, Departamento de Antioquia a una distancia de 18 km al oriente de la ciudad (Figura 1). Sus coordenadas geográficas son 6° 12' 37'' de latitud norte y 75° 30' 11'' de longitud oeste. Ecológicamente, se encuentra en la zona de vida bosque muy húmedo montano bajo (bmh – MB), con una temperatura anual promedio de 14°C y una precipitación media anual de 2.600 mm. Posee suelos franco arenosos y franco arcillosos, su topografía es ondulada y el pasto que predomina kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), aunque también hay ray grass (*Lolium perenne*), falsa poa (*Holcus lanatus*) y azul orchoro (*Dactylis glomerata*).

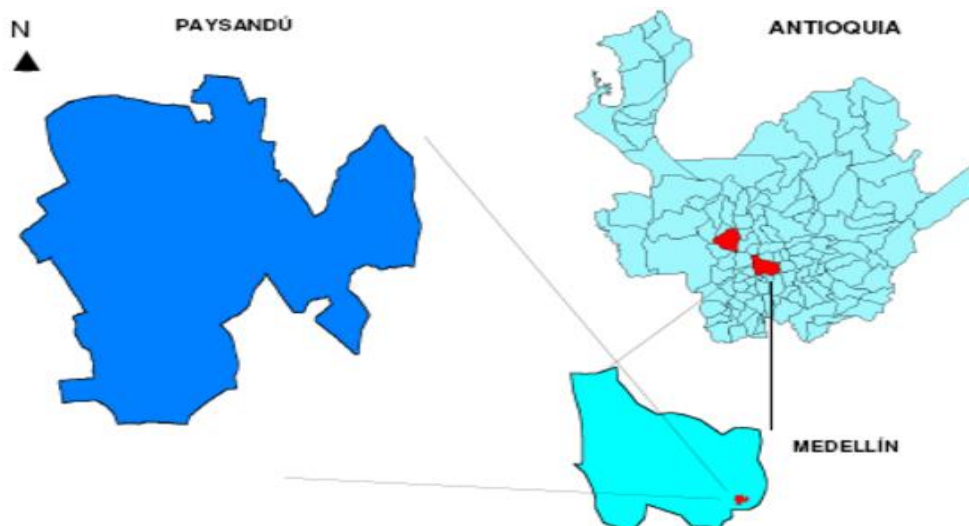


Figura 1: Localización del Centro Agropecuario Paysandú, Medellín, Colombia.

Fuente: Ríos, Gallego, Vélez, Agudelo, Toro, Lema, & Acevedo, (2004).

Distribución del área

La Estación Agraria cuenta con 140 hectáreas de las cuales 70 son área forestal donde se adelanta un programa de protección de cuencas hidrográficas, nacimientos y bosques que son aprovechadas por estudiantes y expertos para reconocer los bosques nativos propios del trópico alto, los bosques de pino pátula, cipreses, eucaliptos y acacias, y donde además se cuenta con 40 hectáreas para manejo de ganado de leche (Holstein, Jersey y sus cruces) (Figura 2) y 30 hectáreas para ganado de carne (BON, Angus y los cruces de Angus x Holstein y Angus x BON) (Figura 3) con la finalidad de iniciar el programa de ganado de carne en clima frío.



Figura 2: Distribución de ganado de leche en la Estación Agraria Paysandú. a) Lote de ganado en producción, b) Lote de ganado horro.

Fuente: Galvis, (2017).

Las actividades académicas, de investigación, extensión y de producción más importantes del Centro Agropecuario Paysandú giran en torno al programa de ganado de leche.

La finca se inició con el ganado Holstein en el año 50 y ganado BON (blanco orejinegro) el cual fue introducido en el año 90 en un comodato con el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) para tratar de establecer la raza, ya que era una de las 5 razas criollas que estaban en vía de extinción, posteriormente se comenzó hacer

cruzamientos entre la raza BON y la Holstein para vender animales para clima medio gracias a las bondades del BON de adaptabilidad y resistencia, se han llevado f1,3/4 para ordeñar y llegando hasta 5/8 y 3/8.

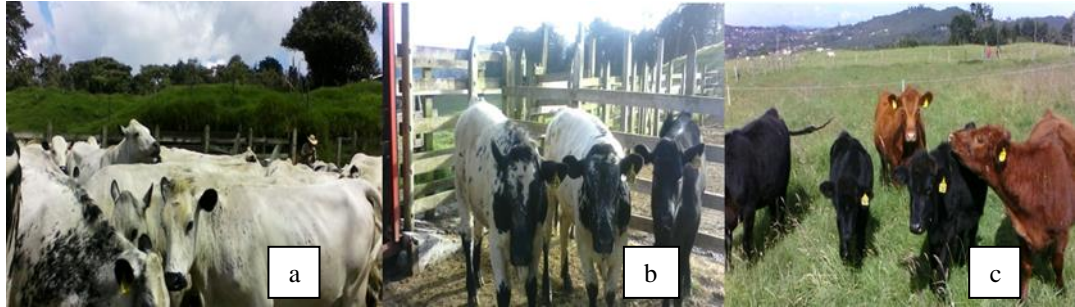


Figura 3: Imágenes del programa de ganado de carne en clima frío BON, Angus y sus cruces. a) BON, b) Cruce Angus x BON (Bongus), c) Angus.

Fuente: Galvis, (2017).

Matriz de levante de terneras

- Las terneras nacen y a partir del cuarto día se rompe el vínculo madre-hija, y se pasan a sala cuna o individuales hasta los tres meses de edad. En esta etapa, una de las más críticas ya que se presentan algunas enfermedades entre las que se pueden destacar problemas respiratorios, diarreas, onfalitis entre otras. El plan nutricional consiste en el suministro de 4 litros de leche diarios, heno y concentrado a voluntad. Con el objetivo de que los animales desarrollen el rumen lo más pronto posible.
- Posteriormente se pasan a colectivos 1 donde están dos meses que es la etapa de destete, en la cual se consumen dos kilos de concentrado día.
- A los 5 meses de edad pasan a colectivos 2 hasta los 9 meses de edad. Su alimentación se basa en pastoreo y dos kilos de concentrado por día.

- Luego pasan a levante 1 hasta los doce meses de edad y se les suministra un kilo de concentrado por animal día.
- En levante 2 se encuentran novillas de los 12 a los 18 meses, esta es la edad del primer servicio que generalmente es a los 16 meses de edad o por peso (Holstein a los 350kg, Jerhol y cruce de Holstein por BON a los 320kg).
- A levante 3 llegan las novillas preñadas. Estas al cumplir ocho meses de gestación se bajan al lote de maternidad y son llevadas al establo para acostumbramiento a la rutina de ordeño.

Los terneros generalmente se descartan aunque algunas veces son vendidos como reproductores debido a la buena genética que poseen.

Distribución del hato lechero

Las vacas en producción se encuentran divididas en tres lotes el de alta, media y baja.

Las vacas llegan al lote de alta a los ocho días posparto, observando que tengan las siguientes características: buena involución uterina sin residuos placentarios, que sean negativas a mastitis con la leche totalmente blanca. En este lote se observan celos, lo ideal es inseminar a 60 días post parto. El promedio del lote de alta es de 30 litros de leche, cuando la producción baja a 20 litros pasan al lote de media y todo animal preñado en alta y media pasa al lote de baja, generalmente se secan a los siete meses de gestación o cuando la producción es menor a seis litros de leche a estas se les denominan vacas horras y cuando están próximas al parto se llevan al área de maternidad. La alimentación se basa en pastoreo, suplementación con sal y de acuerdo a

la cantidad de leche que produzcan se les administra el concentrado a razón un kg de concentrado por cuatro litros de leche.

3. CASUÍSTICA

Las funciones del pasante en la Estación Agraria Paysandú, consistieron en revisión diaria de las terneras en individuales y vacas en maternidad, curación de ombligos, manejo de registros, tratamientos a vacas y terneras enfermas, desparasitaciones y traslado de animales a otros lotes.

3.1 Casuística y actividades

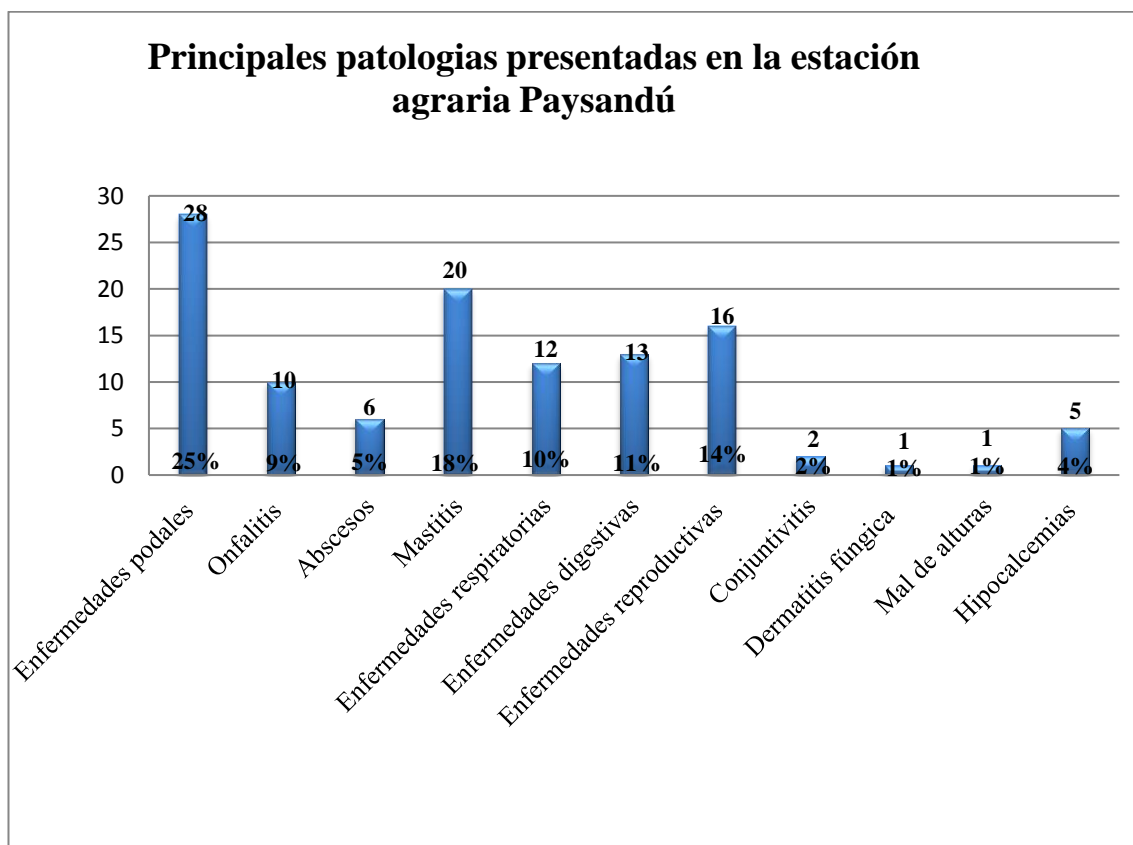


Figura 4: Casuística manejada en la Estación Agraria Paysandú durante los últimos cuatro meses.

Fuente: Galvis, (2017).

3.1.1 Enfermedades pódales: correspondió a la patología más común que se presentó en la práctica diaria, representó el 25% (28 casos) (Figura 4), generalmente se relacionó con problemas metabólicos asociados a la cantidad de concentrado que se les suministró, esto parece llevar a un aumento en la cantidad de ácido láctico y posible desarrollo de laminitis, igualmente esta patología puede deberse a lesiones en las cuales hay proliferación bacteriana a lo que se le denomina pododermatitis séptica (Figura 5) causada especialmente por el *Fusobacterium necrophorum*.



Figura 5: Lavado y desinfección de la pezuña del miembro posterior derecho en el que se evidencio pododermatitis séptica.

Fuente: Galvis, (2017).

El tratamiento que se manejó se basó en lavado del miembro afectado con agua y luego en el área de la pezuña se desinfectó con yodo y agua oxigenada, posteriormente se aplicó un ectoparasiticida en aerosol como Negasunt® (Propoxur, Coumaphos, Sulfanilamida) que además de su acción de larvicida, insecticida y acaricida es bacteriostático, antiséptico, repelente y cicatrizante; también se utilizó rutinariamente Curagan® (Cipermetrina, Violeta de genciana) por su acción desinfectante y antiséptica para controlar insectos y larvas en caso de heridas abiertas. Dependiendo de la causa de la lesión se modificó la dieta y se aplicó antibiótico Ceftiovet ® (Ceftiofur sódico a dosis de 2mg/kg IM) ó Tylan® (Tilosina a dosis de 10mg/kg IM) y antiinflamatorio

Ankofen® (Ketoprofeno a dosis de 3mg/kg IM) este tratamiento tuvo una duración de tres a cuatro días donde se observaron resultados satisfactorios independientemente del antibiótico utilizado de los dos mencionados.

3.1.2 Mastitis: la inflamación de la glándula mamaria, que provoca cambios en la composición bioquímica de la leche y en el tejido de la glándula, es una patología muy común en los hatos lecheros. Se presentó en un 18% equivalente a 20 casos en relación con la casuística presentada (Figura 4). Como método de prevención se realizó el “California Mastitis Test” (CMT) cada 15 días a todas las vacas de ordeño (Figura 6), lo que permitió diagnosticar mastitis subclínica e instaurar el tratamiento oportuno. Los cuartos que dieron positivos al test con dos cruces o más se les aplicó antibiótico como Mastishot® (Cloxacilina sódica, Ampicilina sódica, 5ml por cuarto enfermo cada 12 horas hasta completar 3 administraciones vía intramamaria). Esta asociación antibiótica de amplio espectro bactericida que cubre las principales bacterias Gram positivas y Gram negativas involucradas en los procesos de mastitis, cuyo efecto ha sido comprobado contra *Staphylococcus aureus* resistente a betalactamasa. Además de su acción contra Coliformes para casos de mastitis severas. En algunas ocasiones y dependiendo de la disponibilidad se administró Uniclav® Imm (Amoxicilina, Ácido Clavulánico, Prednisolona a dosis de una jeringa de 3 g por cuarto enfermo cada 12 horas hasta completar 3 administraciones vía intramamaria) esta, tiene acción contra una amplia gama de bacterias como: *Staphylococcus*; *Streptococcus*, (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*), *Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium spp.* y *Escherichia coli*.



Figura 6: Realización de “california mastitis test” en vacas de producción. a) Reactivo utilizado para CMT (Lauril sulfato de sodio), b) Toma de muestra de leche, c) Prueba positiva a mastitis subclínica.

Fuente: Galvis, (2017).

3.1.3 Enfermedades reproductivas: representaron el 14% lo que corresponde a 16 casos (Figura 4). Se presentó generalmente por metritis y endometritis que es una inflamación del útero normalmente debido a una infección microbiana causada por *Arcanobacterium pyogenes*, ya sea sola o junto con otros microorganismos patógenos: *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides* spp. y *Escherichia coli*, se producen durante los 21 días posteriores al parto. Se observa casi siempre después de un parto anormal o una retención placentaria. Esta patología se trató con lavados uterinos con Oxitetraciclina® (Oxitetraciclina se diluyó 20 ml en 100 ml de agua destilada y se introdujo por medio de un catéter al útero) ó Metricure® (Cefapirina benzatínica, se introdujo el contenido de la jeringa en el lumen uterino mediante un catéter desechable). También se utilizó este último para tratar vacas repetidoras al día siguiente de la inseminación artificial. Otra patología que se observó fue dificultad para entrar en celo para ello se utilizó un estimulante del proceso reproductivo a base de minerales Calfosvit® (Fosforilcolamina, Sulfato de zinc, Yoduro de potasio, Selenito de sodio a dosis de 1 mL/20 kg IM por 5 días) es un estimulante del proceso reproductivo, gracias a su combinación de minerales cuyas deficiencias están relacionadas con trastornos reproductivos como: baja fertilidad por celos suprimidos o irregulares, trastornos en el proceso reproductivo de la hembra desde el celo al parto y lactancia.

Además estimula la función reproductiva y la maduración folicular mejorando la tasa de concepción.

3.1.4 Enfermedades digestivas: correspondió al 11% de la casuística presentada lo que equivale a 13 casos (Figura 4). Diarreas y diarreas sanguinolentas (Figura 7) causadas por bacterias (*E. coli*, *Salmonella*) y parásitos (*Cryptosporidium sp.* o coccidias). Debido a la anamnesis se dedujo que la principal causa de estos trastornos digestivos, era posiblemente debido a que el agua que se suministraba, ya que no recibía ningún tipo de tratamiento, por lo que probablemente esta se encontraba contaminada. El diagnóstico se basó en la sintomatología. El tratamiento inicial consistió en terapia de sostén mediante rehidratación con electrolitos, glucosa y aminoácidos, lo que redujo la deshidratación causada por la diarrea. Y dependiendo de la etiología se les administró en caso de diarreas producidas por bacterias, antibióticos de amplio espectro como Tribissen® (Trimetoprim, Sulfadiazina a dosis de 1ml/30kg IM) o Tripen® (Penicilina procaínica, Penicilina benzatínica, Penicilina potásica a dosis de 1ml/10kg IM) y antiinflamatorios como Finadyne® (Flunixin meglumina a dosis de 2ml/45kg IM) o Ankofen® (Ketoprofeno a dosis de 3mg/kg IM) y en caso de diarreas producidas por parásitos como coccidias se les administró anticoccidial Coccigan® (Amprolio a dosis de 1ml/20kg durante cinco días VO) y en caso de *Cryptosporidium sp.* se maneja tratamiento sintomático y antibiótico de los ya mencionados para controlar infecciones secundarias. A su vez se utilizó antidiarreicos como Adiarrez® (Dihydrostreptomicina, Caolin, Pectina, Alumina a dosis de 15g/30kg diluidos en un litro de agua, VO) que gracias a su combinación con antibiótico dio muy buenos resultados y Bismo-pet® (Subsalicilato de bismuto a dosis de 20mg/ kg tres veces al día, VO).



Figura 7 : Ternera de 2 meses de edad con diarrea sanguinolenta.

Fuente: Galvis, (2017).

3.1.5 Enfermedades respiratorias: la enfermedad respiratoria es la principal causa de muerte, después de la diarrea, en las terneras de leche no destetadas. Representó el 10% de la casuística presentada correspondiente a 12 casos (Figura 4). Esto puede ser debido a baja inmunidad pasiva, factores del medio ambiente, microorganismos o agentes virales. El diagnóstico se basó principalmente en anamnesis, sintomatología y examen físico mediante observación, inspección, palpación y toma de constantes fisiológicas, posteriormente se instauró el tratamiento en el cual se utilizó medicamentos dependiendo de la disponibilidad de los mismos. El antibiótico de elección fue Florfenicol®300 (Florfenicol a dosis de 20 mg/kg se aplicó dos dosis con intervalo de 48 horas, IM) es una molécula antibiótica obtenida por síntesis, que pertenece al mismo grupo químico que el Cloranfenicol, la pequeña diferencia en su estructura química anula las propiedades negativas del Cloranfenicol como es la producción de aplasia medular, pero mantiene las propiedades antibióticas, contra enfermedades infecciosas del aparato respiratorio o Ceftiovet® (Ceftiofur sódico a dosis de 2mg/kg IM cada 24h por 4 días) y antiinflamatorios Finadyne® (Flunixin meglumina a dosis de 2ml/45kg IM), Ankofen® (Ketoprofeno a dosis de 3mg/kg IM), Azium® (Dexametasona a dosis

de 5-20 mg totales IM por 3 días). Al hacer un análisis comparativo con los antibióticos que se utilizaron no se observó diferencias significativas en el proceso de recuperación de los pacientes.

3.1.6 Onfalitis: es la inflamación del ombligo causada principalmente por *Streptococcus*, *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli* que ingresan por esta puerta de entrada y proliferan, generalmente se presentó por mal curación del mismo en los primeros días de vida. Se presentó diez casos que correspondió al 9% de la casuística total. Para evitar esta patología, inmediatamente después de nacidas las terneras se desinfectó el ombligo con iodo al 10% y se continuó durante los cuatro días siguientes dos veces al día. El tratamiento se basó en antibiótico, dependiendo la disponibilidad del mismo Tribriksen® (Trimetoprim, Sulfadiazina a dosis de 1ml/30kg IM), Tripen® (Penicilina procainica, Penicilina benzatinica, Penicilina potásica a dosis de 1ml/10kg IM) y antiinflamatorio Finadyne® (Flunixin meglumina a dosis de 2ml/45kg IM).

3.1.7 Abscesos: se encontró una deformación dura, indolora, que aumentaba paulatinamente de tamaño en el área del maxilar (Figura 8), característico de lesiones producidas por actinomicosis o por bacterias piógenas, esta patología se presentó en seis terneras que correspondió al 5 % de los casos presentados. Se trató con antibiótico Tripen® (Penicilina procaínica, Penicilina benzatínica, Penicilina potásica a dosis de 1ml/10kg IM) y antiinflamatorio Azium® (Dexametasona a dosis de 5-20 mg totales IM por 3 días).



Figura 8: Ternera de 65 días de nacida, la cual presentó una masa dura e indolora en el área del maxilar.

Fuente: Galvis, (2017).

3.1.8 Hipocalcemias: es un trastorno metabólico que padecen los bovinos cuando presentan deficiencias en los niveles de calcio en la sangre. Generalmente se presentó en vacas mayores de 6 años de edad, correspondió al 4% de los casos, se les realizó suplementación con calcio y otros minerales como Calmafos® (Gluconato de calcio, Hidroxido de magnesio, Ácido hipofosforoso, Ácido bórico, Dextrosa a dosis de 150 ml por cada 100 kg de peso IV lenta) y Calfon® oral (Formiato de calcio, Cloruro de magnesio, Ácido propionico a dosis de 1 frasco de 350ml, minutos después del parto y un frasco 12h después del parto, VO). Se observó buenos resultados, con efectos casi inmediatos.

3.1.9 Conjuntivitis: se presentó como aumento notable en secreciones y enrojecimiento a nivel ocular. Se trató con ungüento oftálmico Oxyoftal® (Oxitetraciclina y Polimixina B, vía tópica, durante tres días), cuya asociación sinérgica de dos antibióticos uno bactericida y otro bacteriostático eliminan la mayoría de los microorganismos oculares sensibles. La Oxitretaciclina inhibe el desarrollo y crecimiento (efecto bacteriostático) de los microorganismos, aunque pueden actuar también como bactericida al alcanzar concentraciones elevadas en ciertos tejidos y La Polimixina se utiliza en infecciones superficiales del ojo que incluyen la córnea, la blefaritis, la conjuntivitis y la queratitis ocasionadas por gérmenes susceptibles

especialmente la *Pseudomona aeruginosa*. Se observó buen resultado solo con la aplicación del ungüento.

3.1.10 Dermatitis fúngica: se observó inicialmente pequeñas costras a nivel del pabellón auricular externo que posteriormente se fueron extendiendo a nivel del lomo. Se utilizó un antimicótico de amplio espectro a base de Imaverol® (Enilconazole se diluyo una parte de la solución en 50 partes de agua tibia y aplicó externamente de 3 a 4 veces a intervalos de 3 a 4 días).

3.1.11 Mal de alturas: se presentó edema cutáneo en el pecho (Figura 9), fiebre y diarrea, se encontró a una altura de 2700 msnm. El tratamiento y control estuvo orientado a disminuir la presión arterial pulmonar. Primero se bajó a una altura de 2600 msnm, se puso en área de cuarentena con el fin de evitar el ejercicio excesivo. Se suministró antiinflamatorios Ankofen® (Ketoprofeno a dosis de 3mg/kg IM por 3 días) y antibióticos evitar infecciones secundarias Ceftiovet ® (Ceftiofur sódico a dosis de 2mg/kg IM cada 24h por 3 días).



Figura 9: Imagen de vaca con mal de altura en el que se observa edema submaxilar y en el pecho.

Fuente: Galvis, (2017).

IDENTIFICACIÓN DEL CALOSTRO Y LA LECHE COMO VEHÍCULOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE VLB DE VACAS HOLSTEIN A TERNERAS MEDIANTE ELISA Y PCR

Resumen

La Leucosis bovina es una enfermedad crónica, viral y contagiosa del ganado bovino adulto, con mayor incidencia en los hatos lecheros. Se caracteriza por presentaciones asintomáticas, linfocitosis persistente y linfosarcomatosis. La leche y calostro son considerados como un vehículo de transmisión vertical para la LVB. Es importante identificar si las terneras Holstein puras nacidas de madres portadoras y no portadoras adquieren el virus a través del calostro o consumo de leche, proveniente de vacas positivas. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del virus de Leucosis Bovina (VLB) y anticuerpos contra el mismo, utilizando PCR y ELISA en muestras de calostro, leche y sangre de vacas y su potencial transmisión a sus crías. Inicialmente se recolectaron muestras de calostro, leche (50 ml con Bronopol) y sangre de 8 terneras Holstein puras y sus respectivas madres, en los días 0, 15, 30, 45 y 60 después del parto. Además se seleccionó una de las terneras para realizarle seguimiento desde el día 0 hasta el día 15, con la finalidad de determinar el momento exacto de la infección por VLB. De las muestras analizadas la seroprevalencia en vacas fue 87,5% para ELISA en sangre, 87,5% para ELISA en leche, adicionalmente se determinó la presencia del virus en 75% utilizando una PCR en sangre. En el caso de las terneras para el día 0 la prevalencia antes del consumo de calostro fue 0 % hasta ese momento, en el día 15 la prevalencia subió a 87,5% para ELISA y 25% en PCR; y en el día 30 hasta el 60 la prevalencia se mantuvo en 87,5% para ELISA y 37,5% en PCR.

Palabras claves: Leucosis bovina, Terneras Holstein, Calostro, Leche, Linfocitosis persistente, PCR, ELISA

Abstract

Bovine leucosis is a chronic, viral and contagious disease of adult cattle, with higher incidence in dairy herds. It is characterized by asymptomatic presentations, persistent linfocitosis and linfosarcomatosis. Milk and colostrum are considered as a vertical transmission vehicle for bovine leukosis. It is important to identify whether pure Holstein calves born from carrier and non-carrier mothers acquire the virus through colostrum or milk consumption from positive cows. The objective of the present study was to determine the presence of bovine leukosis virus (VLB) and antibodies against it, using PCR and ELISA in samples of colostrum, milk and blood of cows and their potential transmission to their offspring. Initially samples of colostrum, milk (50 ml with Bronopol) and blood of 8 pure Holstein heifers and their respective mothers were collected on days 0, 15, 30, 45 and 60 after delivery. In addition, one of the calves was selected to follow up from day 0 to day 15, in order to determine the exact moment of VLB infection. Of the analyzed samples the seroprevalence in cows was 87.5% for ELISA in blood, 87.5% for ELISA in milk, additionally the presence of the virus in 75% was determined using a PCR in blood. In the case of the calves for day 0, the prevalence before consumption of colostrum was 0% until that moment, at day 15 the prevalence rose to 87.5% for ELISA and 25% in PCR; and on day 30 to 60 the prevalence was maintained in 87.5% for ELISA and 37.5% in PCR.

Key words: Bovine leucosis, Holstein calves, colostrum, milk, persistent Linfocitosis, PCR, ELISA

Introducción

La presente investigación se realizó en Medellín, corregimiento de Santa Elena en la Estación Agraria Paysandú, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, cuyo principal programa es la ganadería de leche. Se estudió la prevalencia de la enfermedad conocida como Leucosis Bovina cuyo agente etiológico es un virus que pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Deltaretrovirus*, denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). La Leucosis Viral Bovina (LVB), llamada también leucemia o linfosarcomatosis, es una enfermedad infecciosa, crónica, insidiosa y específica del ganado bovino, presentando un bajo porcentaje de enfermos con manifestaciones clínicas (Resoagli et al., 1999). Luego de un prolongado período de incubación, en general de 3 a 5 años, solo una baja proporción de animales desarrollan tumores (0,1 – 5 %) (González et al., 2001).

Esta enfermedad se caracteriza porque una vez establecida la infección, no puede ser eliminada, manteniéndose los animales como portadores asintomáticos de por vida o durante muchos años. Genera una enfermedad infecciosa y contagiosa de alta morbilidad y baja mortalidad, que se caracteriza por tener dos fases la primera tiene un curso crónico e inaparente ya que es asintomático, y estos animales portadores sin manifestación clínica son la principal fuente de contagio en los establos lecheros (Gutiérrez, 2010), en ellos solo se observa linfocitosis persistente presentándose como un estado pre-leucémico y afecta aproximadamente del 30 al 70% de los animales infectados y en la segunda fase se observa la aparición de acumulaciones de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, afectando principalmente el sistema linfático de los hatos lecheros (Oliva, 1990), esta fase sintomática se observa solamente en el 0,5 al 5% de los animales infectados. En los otros casos, los animales tienen anticuerpos sin

ninguna manifestación clínica. Esta es una enfermedad cuya distribución es mundial, tiene una prevalencia variable según la región, explotación y tipo de ganado (Bautista, Nova, Pulido & Andrade, 2013).

De acuerdo a lo anterior los bovinos infectados con LVB no presentan ninguna sintomatología específica hasta un estado muy avanzado de la enfermedad cuando los linfosarcomas empiezan a hacerse visibles. Según Dubarry, Alvarez, Errea, Vera & Vespoli (1999) y Bonifaz, & Ulcuango (2015), las lesiones anatomopatológicas se encuentran en ganglios linfáticos, hígado con tumores de tamaños variados desde 2 hasta 23 cm de diámetro, pulmones, riñón, corazón, músculos, estomago, bazo, glándula mamaria, útero, ojos y lengua. Adicionalmente se pueden encontrar varias lesiones en diferentes órganos del mismo animal.

Esta enfermedad se transmite verticalmente en animales jóvenes, por infección transplacentaria o a través del consumo de calostro y leche. La forma más común de transmisión es la horizontal por causas iatrogénicas (Úsuga, Echeverri, & López, 2015), donde la diseminación del virus está ligado principalmente a las malas prácticas sanitarias durante la producción como vacunación, uso de agujas y equipo quirúrgico contaminado, descorné (Darlington, DiGiacomo & Evermann, 1985), castración y palpación rectal (Divers, Batrtholomew & Gallingan, 1995), o por vectores como *Tabanus* spp (Manet, Guilbert, Roux, Vuillaume, & Parodi, 1989). En un cuadro hemático se puede determinar que este virus afecta principalmente los linfocitos de las células, y por medio de otras pruebas se puede identificar en sangre, leche y fluidos corporales como el semen, secreción nasal, saliva y orina (Ochoa, Uribe & Gutiérrez, 2007); (Gutiérrez, 2010).

Según lo observado por Cadavid (2012), los síntomas dependen del lugar en que aparecen los tumores y pueden incluir; desarreglos digestivos, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general y a veces, manifestaciones neurológicas. Los ganglios linfáticos superficiales pueden verse inflamados y se pueden palpar bajo la piel o por examen rectal. Los órganos implicados con más frecuencia son la cuarta cavidad del rumen, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, la tercera cavidad del rumen, los pulmones y el útero. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizá también el desarrollo del propio tumor. (p. 14)

Esta patología se caracteriza por una disminución en el rendimiento del animal que se refleja en pérdidas económicas para el sistema de producción (Bautista et al., 2013). En algunos estudios se demostró que los hatos con VLB presentaban menor producción láctea (2,5-3% a nivel de hato) y un aumento en la tasa de pérdidas selectivas, así como una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, del tipo de la mastitis, diarrea y neumonía, pero el efecto sobre la fertilidad fue escaso (OIE, 2008). La LVB se trata de una enfermedad económicamente importante para la industria bovina mundial y si bien en Colombia no han sido estimadas las pérdidas, en países como Estados Unidos, las mismas ascienden a \$ 86 millones de dólares al año (Mohammadabadi, Soflaei, Mostafavi, & Honarmand, 2011).

Las pérdidas económicas son el resultado del descarte de canales en los mataderos, el descarte de animales a temprana edad o la muerte de individuos con linfoma, igualmente la barrera de exportación de animales vivos y sus productos (carne, leche, semen y embriones) y el incremento en gastos de medicinas y asistencias del veterinario (De Souza, 2008).

Además de lo mencionado anteriormente recientes estudios han demostrado, que la leche y la carne de animales positivos al virus, pueden ser responsables en gran medida

de la aparición de cáncer de mama en mujeres (Ochoa et al., 2007), lo que representa un gran problema y preocupación en el área de la salud pública, puesto que estos alimentos son de consumo diario y de gran valor nutricional. Además crear hatos libres del virus representaría sacrificar más del 70% de la población bovina del país.

4.1 Revisión de bibliografía

La Leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad viral, crónica y contagiosa de distribución mundial con un largo periodo de incubación, que afecta a los bovinos y especialmente los dedicados a producción de leche, y está causada por el VLB, el cual pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Deltaretrovirus* posee un genoma RNA de cadena sencilla y ocho genotipos.

4.1.1 Tipos de LVB

La LVB tiene dos orígenes:

Leucosis bovina esporádica, que afecta animales menores de tres años de edad y que incluye:

- Forma juvenil, que afecta animales menores de seis meses de edad, que se caracteriza por un aumento de tamaño de múltiples ganglios linfáticos.
- Forma tímica en animales menores de dos años caracterizada por hinchazón en el cuello que causa timpanismo y edema.
- Forma cutánea en bovinos de uno a tres años de edad, que se caracteriza por la aparición de nódulos y placas en la piel.

La LVB, se describe como un proceso neoplásico mortal, sistémico y maligno del sistema reticuloendotelial, caracterizada por la aparición de acúmulos de linfocitos neoplásicos en casi cualquier órgano, con una variedad correspondiente de los signos

clínicos, (Blood & Radostits, 1992, citado en Cadavid, 2012), describen tres formas clínico-patológicas:

- Infección permanente con anticuerpos detectables. Portadores asintomáticos
- Linfocitosis persistente (LP), que es un proceso linfoproliferativo benigno
- Linfosarcoma maligno

4.1.2 Historia

Las primeras descripciones de la LB 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 enfermedad con tumores en Alemania y otros países del este de Europa, lo que originó una línea de investigación en esta área. 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. Según Johnson & Kaneene, (1992 citado en Baruta, Ardoino, Brandan, Sosa, Mariani & Albretch, 2011, p. 9) los países de América probablemente adquirieron el virus a través de importaciones para mejorar los rebaños de los mismos.

En Colombia, LVB se identificó por primera vez en 1957 a partir de casos clínicos y de necropsia llegados a centros veterinarios de diagnóstico (Mariño, 1984, citado en Cadavid, 2012). En 1978, se reportó un caso de la forma juvenil de la Leucosis esporádica en un animal de 21 meses proveniente del municipio de Facatativá, departamento de Cundinamarca. En el año siguiente se reportó un caso de la forma adulta de linfosarcoma.

4.1.3 Etiología

El agente etiológico de la LB es un virus ARN, el virus de la leucemia bovina (VLB).

El VLB es un retrovirus exógeno, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *delta retrovirus*. Los retrovirus tienen la capacidad de producir una transformación neoplásica a la célula hospedadora y posteriormente linfoma, leucemia o ambas (Cadavid, 2012), infectan principalmente los linfocitos B pero también tienen la capacidad de infectar otras células como los linfocitos T y monocitos (Felmer, Zúñiga & Recabal, 2006). Al ser las células blanco de éste virus los linfocitos B, se observa un impacto negativo sobre el sistema inmune de los bovinos ya que los hace más susceptibles a otras enfermedades de origen infeccioso, además las vacas lecheras presentan una menor producción respecto al hato (2,5 a 5 %). El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARN de polaridad positiva unidos por su extremo 5' e integrado por tres genes estructurales: *gag*, *pol* y *env* (Figura 10), los cuales son necesarios para su síntesis, además comparte con otros deltaretrovirus la región X. (OIE, 2008).

El genoma ARN del retrovirus es copiado a ADN por una enzima viral (ADN-polimerasa-ARN dependiente) y la copia de ADN es insertada en los cromosomas del huésped, esta copia de ADN llamada provirus, es transcrita a ARN genómico viral y ARN mensajero viral por enzimas del huésped (González, Oliva, & Etcheverrigaray, 1988). Al quedar integrado al cromosoma puede conservarse en el núcleo de diversas células del individuo, haciéndose persistente, y prolongándose durante toda la vida del organismo hospedero (Andujar, 2004).

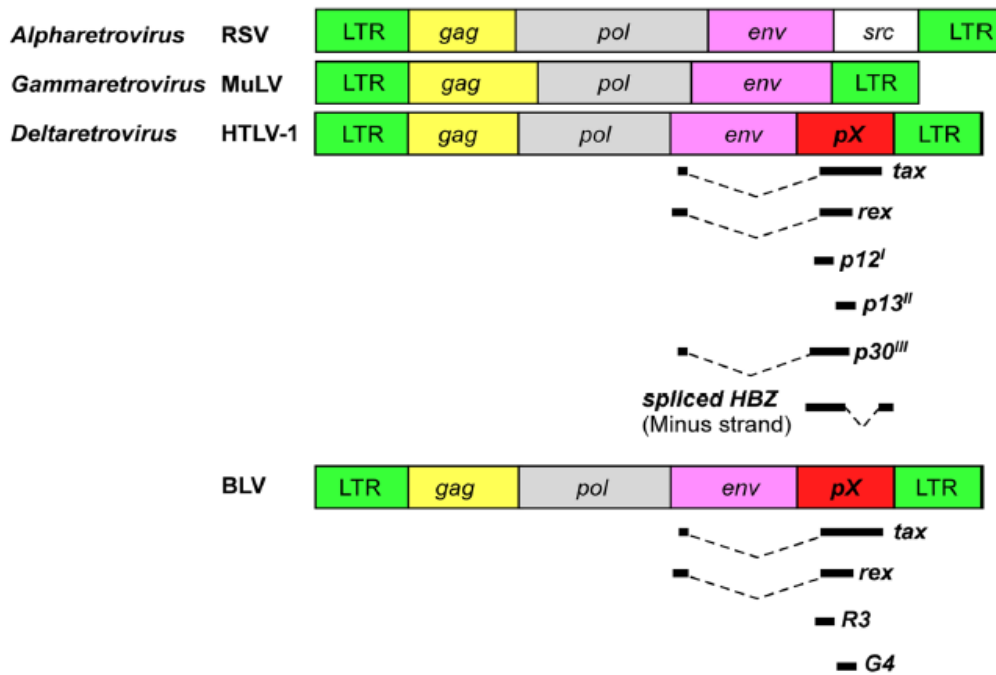


Figura 10: Genes que componen la estructura de un retrovirus, gag, pol y env.

Fuente: Aida, Murakami, Takahashi, & Takeshima, (2013).

La presencia de anticuerpos en sangre constituye un marcador de la infección con el VLB, al ser un retrovirus B-linfocitotrópico genera una respuesta inmune persistente en los animales infectados, especialmente en los genes que codifican para la producción, entre otras, de la proteína estructural p24 de la cápside, y de las proteínas de la envoltura, la p51 y p30 (Figura 11) (Johnson & Kaneene, 1992, citado en Baruta et al., 2011, p. 9) (Lomónaco, Martínez, Alvarez, Gutiérrez, Politzki, & Trono, 2013). La partícula viral tiene un diámetro que varía entre los 60 y los 125 nm, está constituida por un núcleo electrodenso central rodeado por la envoltura viral (Gillet et al., 2007).

El virus es muy poco resistente a las influencias exteriores por lo que tiene escasa viabilidad, de menos de cuatro horas fuera del animal. Los rayos ultravioleta, la congelación-descongelación repetida y la pasteurización inactivan el virus, al igual que los desinfectantes utilizados habitualmente (Orloff, Wallingford, & McDougal, 1993).

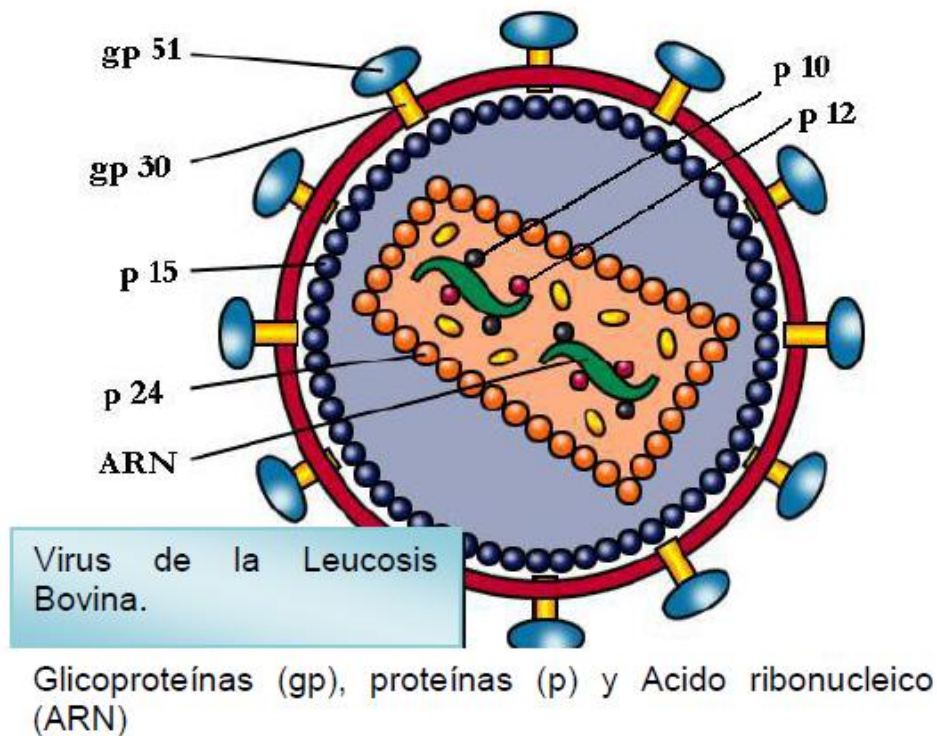


Figura 11: Estructura del virus de la Leucosis Viral Bovina.

Fuente: Felmer et al., (2006).

4.1.4 Huéspedes susceptibles:

Se considera que el virus infecta naturalmente a los bovinos, búfalos y capibaras (OIE, 2008) y en forma inducida a los ovinos. Actualmente hay evidencia de la posibilidad de la infección natural en humanos.

In vitro es posible infectar experimentalmente cultivos celulares en monocapa provenientes de diversas especies: humano, chimpancé, canino, ovino, bovino, caprino y murciélagos (Graves & Ferrer, 1976), conejos y pollos (Gillet et al., 2007).

Principalmente se ve afectada la ganadería de leche y en animales mayores de dos años donde se presenta mayor incidencia de esta enfermedad, dados los factores de riesgo, que están relacionados en gran parte con las prácticas de manejo en las diferentes regiones, o según el ganado que se está trabajando, en lo que se refiere a la raza y tipo de producción. Por lo anterior se puede deducir que el ganado de clima

caliente (generalmente ganado de carne), por características de raza, costumbres de la región y condiciones geográficas, no son frecuentes estos procedimientos, comparados con el manejo que se le da al ganado de clima frío.

Además, es importante tener en cuenta que el ganado aumenta los niveles de estrés al momento de ser sometido a cualquier tipo de procedimiento de los ya mencionados; las hembras sometidas a factores estresantes están expuestas a padecer formas más severas de la enfermedad.

Según Trono (2011) alrededor del 10 % de los animales nacen infectados, y no hay progresión de la infección hasta los 12 meses de edad. A partir de entonces, el nivel aumenta paulatinamente hasta alcanzar el 24 % de animales infectados a los 2 años de edad, para luego elevarse abruptamente al 60 % a los 30 meses, coincidiendo con el ingreso a la lactancia. (Trono, 2011)

4.1.5 Transmisión

El virus se transmite en forma horizontal y vertical, siendo la primera la más importante. El contagio se produce por el traspaso de linfocitos que contienen el virus, los cuales a su vez provienen de animales infectados. Estos se encuentran en sangre, calostro, leche, saliva, secreciones nasales, semen y orina (Figura 12) (Johnson & Kaneene, 1992, citado en Baruta et al., 2011, p. 9; Gillet et al., 2007; Trono, 2011).

4.1.5.1 Transmisión vertical:

Los principales mecanismos involucrados en la transmisión vertical son:

- Transmisión intrauterina
- Transmisión vía calostro y leche
- Transmisión por productos reproductivos (semen, óvulo, embriones)

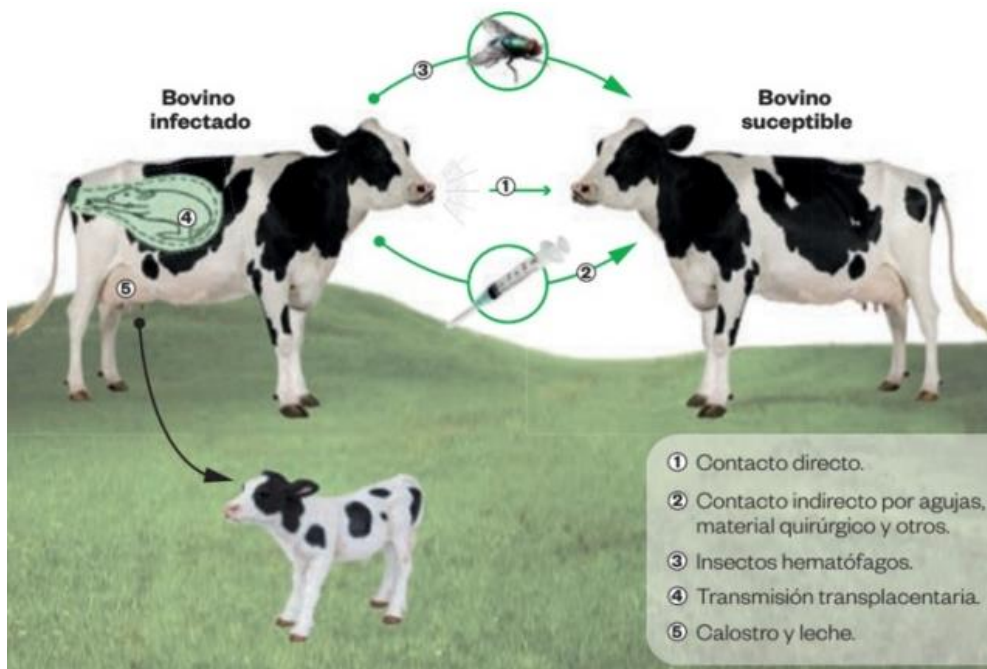


Figura 12: Mecanismos de transmisión de Leucosis bovina.

Fuente: Giraudo et al., (2010).

4.1.5.1.1 Transmisión intrauterina:

Las infecciones intrauterinas ocurren entre el 2 y el 10 % según el rodeo (dependiendo de la susceptibilidad, la línea genética, etc.) (Betancur & Rodas, 2008). La infección prenatal es menos frecuente presentándose hasta en el 20% de las madres infectadas (Occhi. et al., 2002). La transmisión transplacentaria puede producirse, ya que el virus es capaz de atravesar la barrera de la placenta, este tipo de infección puede ocurrir entre el 13 y el 18% de los terneros de vacas infectadas (Galdino de Lima, 1999).

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.

4.1.5.1.2 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.

En la transmisión vertical es importante la vía lactógena, en la cual el virus infecta los linfocitos B de las Placas de Peyer, y a partir de ahí se disemina.

4.1.5.1.3 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.

4.1.5.2 Transmisión horizontal:

La transmisión horizontal es la responsable de la mayoría de las infecciones por VLB en el ganado (Figura 12).

- ◆ Transmisión mediante contacto animal-animal
- ◆ Transmisión mediante secreciones y excreciones

Cualquier secreción o excreción contaminada con sangre (más específicamente linfocitos), puede servir como una fuente de transmisión del VLB.

4.1.5.3 Transmisión por sangre:

Es importante el contagio mediante maniobras tales como la extracción de sangre, vacunaciones y tacto rectal, en las cuales se trabaja con un elevado número de animales utilizando el mismo instrumental repetidamente (Rama, 2009).

La mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo que se deben tomar medidas de precaución durante las vacunaciones, cirugías, aplicación de inyectables, etc. (Gutiérrez, 2010; De Souza, 2008).

La inoculación intradérmica, subcutánea, intramuscular e intravenosa de linfocitos provenientes de animales infectados puede desarrollar infección. Al igual que en palpaciones donde se reutiliza guantes de animales infectados y animales sanos.

4.1.5.4 Transmisión por insectos:

Es posible la transmisión del VLB mediante insectos hematófagos (especialmente tábanos) bajo condiciones de campo. . En aquellos lugares donde la carga de insectos chupadores es alta se considera que éstos pueden contribuir a la expansión de la enfermedad. (Johnson & Kaneene, 1992, citado en Baruta et al., 2011, p. 10; Gillet et al., 2007).

4.1.6 Distribución

La enfermedad está reportada en casi todo el mundo. En Europa es una enfermedad de declaración obligatoria y lucha sanitaria, estimándose una prevalencia menor al 0,1%, salvo países como España, Francia e Italia, que tienen una tasa de infección del 1 al 5%. En Estados Unidos, las luchas sanitarias se encararon por estados o en forma individual, por rodeo (Resoagli et al., 2002). En virtud de la importancia que reviste toda enfermedad que pueda afectar en cierta medida la producción, pero puntualmente que comprometa en mayor grado la comercialización de animales en pie como ocurre con la LEB en estos países En América en general se considera que la enfermedad está presente en forma clínica (OIE, 2008), en tanto que en la Unión Europea si bien existe, se encuentra en proceso de erradicación. (Gillet et al., 2007).

4.1.7 Patogenia

Los primeros pasos en el establecimiento de la infección por el VLB, como así también de otros virus asociados (HTLV) no están del todo claros. La llegada del virus a un individuo susceptible se realiza mediante células de un individuo infectado, las cuales contienen el genoma viral. Estas células alogénicas contenidas en sangre, semen o leche cruda infectan las células del nuevo huésped. Una vez ingresado al organismo el objetivo del virus son los linfocitos B que expresan la IgM (Gillet et al., 2007). La infección viral es seguida por una expansión policlonal de una gran y diversa población de linfocitos portadores de uno a cinco provirus integrados (Gillet et al., 2007). Durante el primer mes post infección las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos (Fulton, Portella & Radke, 2006). Lo que ocurre inmediatamente después no está del todo claro. Posteriormente el genoma celular sufre modificaciones, que conducen a la proliferación de células con carácter neoplásico (Baruta et al., 2011).

La primera indicación de la infección es la aparición de la respuesta inmune humoral dentro de las semanas post inoculación. Los anticuerpos reconocen epitopes de gp51 y p24 y son líticos para las células productoras del virus. Casi al mismo tiempo de la seroconversión temprana aparecen linfocitos T citotóxicos para los epitopes *tax* y *env* en sangre periférica. Esta respuesta persiste y se amplifica durante la vida del animal, indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el virus (Gillet et al., 2007).

El aumento de la carga viral en el animal infectado ocurre por el ciclo replicativo normal del virus (Figura 13), y también por la mitosis de las células huésped infectadas, en un proceso conocido como expansión clonal. La aparición de clones (linfocitos B

infectados procedentes de linfocitos B con partículas provirales) que evolucionan hacia la monoclonalidad, es decir evolucionan hacia una célula híbrida producto de la fusión entre un clon de linfocitos B descendientes de una sola célula tumoral. Esta evolución conduce a anomalías cromosómicas. Una vez el virus se integra al DNA permanece en él de por vida (Leite et al., 2004 citado en Villegas, 2015).

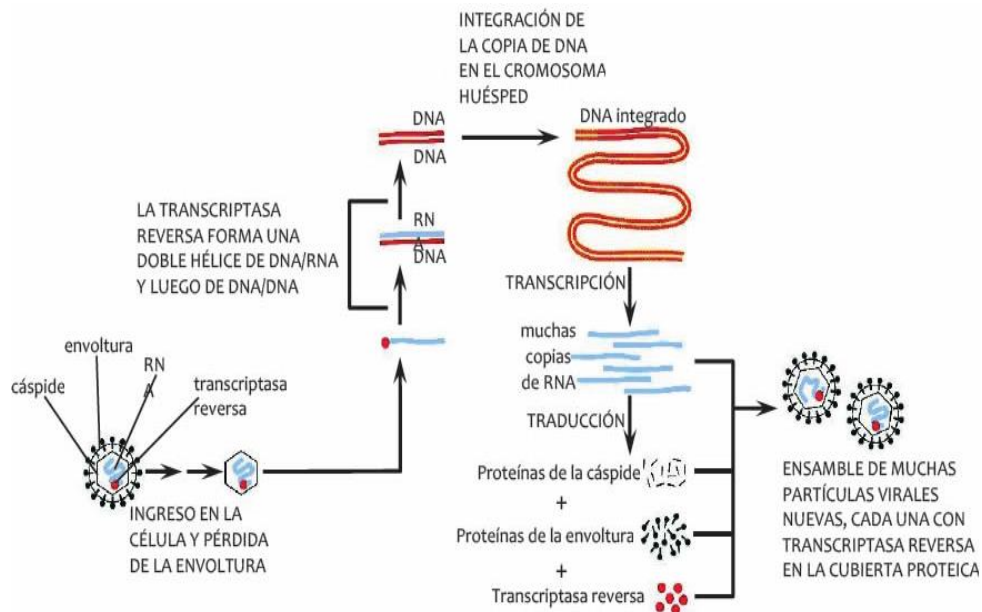


Figura 13: Ciclo de replicación del retrovirus de la VLB.

Fuente: Villegas, (2015).

Patogenia de la linfocitosis: en los bovinos la linfocitosis no se debe a un aumento de la producción de los linfocitos B, sino a una disminución en la tasa de recambio de los mismos, debido a la reducción de la apoptosis, la cual es inhibida de alguna manera por la acción del virus.

Patogenia de los tumores: en el comienzo del período de cronicidad de la enfermedad el genoma de la célula huésped evidencia modificaciones genéticas: hiperdiploidía, pequeños cromosomas adicionales, trisomías, traslocaciones y reacomodamientos isocromáticos (Dequidiet et al., 1997).

El perfil genético del genoma huésped predispone el desarrollo de los tumores. El factor más importante en la progresión clínica de la enfermedad es el complejo mayor de histocompatibilidad. Los tumores se producen a causa de la infiltración de linfocitos B transformados que se acumulan en tejidos tales como hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y ganglios linfáticos (Gillet et al., 2007).

4.1.8 Sintomatología

Muchas vacas permanecen en el estado preclínico de la enfermedad durante años, con frecuencia durante toda la vida productiva, sin ninguna reducción aparente en su rendimiento, aunque los animales pueden infectarse con LVB a cualquier edad, los tumores (linfosarcoma) se observan típicamente en animales de más de tres años de edad (Kahn et al., 2007, citado en Cadavid, 2012) y el periodo de mayor frecuencia es entre los 5 y 8 años. En estudios realizados en ganado lechero, la mayor frecuencia de presentación del linfosarcoma fue entre las edades de 6 a 10 años (Chamizo, 2005).

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 explorable (Baruta et al., 2011).

Se ha informado de ganglios pre-escapulares que llegan a pesar 1.8 kilos (Chamizo, 2005). La exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, es bastante específico como signo de la enfermedad (Malatestinic,

2003). La presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad (Gatti, 2007, citado en Cadavid, 2012). Junto a los ganglios linfáticos, los tejidos afectados con mayor frecuencia incluyen el abomaso, corazón, bazo, riñones, útero, meninges y tejido linfático retrobulbar. Los tonos cardíacos están frecuentemente apagados, y son obvias otras alteraciones cardíacas. La linfomatosis neural puede conducir al comienzo gradual de parálisis posterior durante varias semanas (Gatti, 2007, citado en Cadavid, 2012).

Las formas de los terneros, tímica y cutánea son denominadas Leucosis bovina esporádica. Los síntomas clínicos del linfosarcoma del ternero incluyen pérdida 25 de peso, aumento generalizado y súbito del tamaño de los nódulos linfáticos y debilidad; fiebre, taquicardia y paresia posterior son síntomas menos frecuentes. La muerte se produce entre los dos a ocho meses. Igualmente síntomas como presión en órganos internos por las masas tumorales e insuficiencia cardíaca. Asimismo se ha descrito necrosis del hueso y médula ósea, con debilidad e inactividad, ataxia posterior, aumento de nódulos linfáticos, cojeras y disnea asociadas (Kahn, et al., 2007, citado en Cadavid, 2012).

El linfosarcoma tímico es un hallazgo frecuente en animales de 1-2 años de edad y se caracteriza por aumento masivo del timo en el área de la papada y lesiones en la médula ósea y nódulos linfáticos. También son frecuentes la congestión de la vena yugular y el edema marcado de la papada y la región submandibular, puede aparecer un timpanismo moderado a causa de la incapacidad para eructar debido a compresión esofágica por ganglios mediastínicos de la cavidad torácica, las masas tímicas normalmente no son palpables. La forma tímica es más común en ganado tipo carne que en ganado tipo leche. (Blood & Radostits, 1992, citado en Cadavid, 2012) De otra parte la forma

cutánea es más común en ganado vacuno de 1-3 años de edad, siendo rara y manifestándose por placas en la piel de 1-5 cm de diámetro que se harán presentes en cuello, parte posterior de los muslos y la grupa; estas placas pueden desaparecer espontáneamente y transcurridos 1-2 años reaparecer y expresar afectación de órganos internos (Kahn, et al., 2007, citado en Cadavid, 2012).

Linfocitosis persistente: en rebaños con alta incidencia de linfosarcoma, un número variable de animales clínicamente normales desarrolla linfocitosis persistente.

Una proporción variable de animales infectados estimada en el 30% desarrolla linfocitosis persistente (Ferrer, Marshak, Abt, & Kenyon, 1978). 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. Se ha observado que de un cuarto a un tercio de linfocitos B en estos casos se encuentra afectado por el virus (Ferrer et al., 1978). Los bovinos con linfocitosis persistente presentan títulos más elevados de anticuerpos específicos que aquellos infectados sin linfocitosis persistente. (Ferrer et al., 1978).

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 (Ferrer et al., 1978). La presencia de anormalidades en el cariotipo, aneuploidía con aparición de cromosomas adicionales, es prueba del carácter neoplásico de estas células. Estas anormalidades celulares varían de un animal a otro, pero no en el mismo animal, por lo que demuestra que el tumor es monoclonal (Knapen, Kerkhofs, Thiry, & Mammerickx, 1994).

El Linfoma (LS). Es común en adultos de más de cuatro años, se observa el agrandamiento de los linfonodos, se presenta taquicardia, pulso yugular positivo, timpanismo ruminal con reflujo abomasal, indigestión, diarrea, exoftalmos, mucosas pálidas, heces oscuras y malolientes, tumoraciones en útero, vagina y región perivaginal, disminución paulatina de la producción de leche hasta el cese total, disminución de parámetros reproductivos, disminución progresiva de la condición corporal, finalizando con la muerte del animal (Chamizo, 2005).

La linfomatosis: es una neoplasia de todo el sistema linforeticular, nunca es benigna y las lesiones aparecen a un ritmo variable en los distintos animales, (Odrizola, 2009, citado en Cadavid, 2012).

4.1.9 Lesiones

La principal afección se encuentra localizada en los ganglios linfáticos describiéndose como generalizada (76 a 100 %), diseminada (26 a 75 %) y localizada (1 a 25 %). Los ganglios más afectados son los ilíacos, seguidos de los intratorácicos y mesentéricos, y con menor frecuencia los pres-escapulares, precurales y de la región cervical.

Los mismos aparecen aumentados de tamaño; externamente su aspecto es liso o nodular, sin adherencias con los tejidos circundantes, consistencia blanda o edematosa o bien firme, turgente y friable (Chamizo, 2005).

La médula ósea puede aparecer infiltrada por un tejido color blanco grisáceo reemplazando el color rojo normal que se observa en la médula hematopoyética. La afección tumoral de la médula ósea implica la presencia de leucemia, o sea aparición de células tumorales en la corriente sanguínea (Ferrer et al., 1978) (Cañibano, 2011, citado en Cadavid, 2012).

El bazo puede presentar un ligero aumento de tamaño o una esplenomegalia tumoral; la superficie de corte seca y con nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima. En el corazón pueden aparecer nódulos o áreas infiltrativas, difusas de color blanquecino (Chamizo, 2005).

El abomaso aparece infiltrado por tejido tumoral, incrementando el grosor de su pared y en algunas ocasiones presencia de úlceras. En el intestino se encuentran lesiones similares con mayor predisposición de úlceras en la mucosa. En riñones aparecen lesiones infiltrativas que producen hemorragias en la superficie del órgano, o bien nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal (Chamizo, 2005).

También puede verse afectado el tejido retro-ocular y provocar con su crecimiento protrusión del globo ocular o exoftalmo. Se ha observado infiltración tumoral de la córnea y la aparición del tumor en la cámara anterior del ojo (Chamizo, 2005).

La afección hepática es más significativa en los animales adultos que en los jóvenes, con un aumento de tamaño, consistencia blanda, y coloración pálida difusa del órgano.

En el pulmón las lesiones son raras, pudiéndose presentar en la forma infiltrativa, difusa y nodular (Chamizo, 2005).

En los riñones, las lesiones aparecen en 50% de los casos y pueden tener carácter infiltrativo, produciéndose hemorragias visibles en la superficie del órgano, o pueden presentarse nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal. La vejiga puede presentar su pared engrosada y su mucosa ulcerada debido a la infiltración tumoral.

Las lesiones tumorales en el pulmón son raras pero puede presentarse de forma infiltrativa difusa y nodular. Se nota la presencia de masas tumorales en el tejido subcutáneo de la región abdominal (Chamizo 2005).

En neonatos y animales jóvenes, los sitios más comunes son los riñones, timo, hígado, bazo y ganglios periféricos e internos; en los adultos el corazón abomaso y medula espinal están a menudo afectados. En el corazón, las masas tumorales invaden particularmente el atrio derecho, aunque se pueden encontrar por todo el miocardio y se extienden al pericardio (Kahn, et al., 2007, citado en Cadavid, 2012).

Citología: Morfológicamente la característica más destacada de la LBE es la presencia de linfosarcoma o linfoma maligno que se corresponde con la neoplasia a linfocitos B. El tejido neoplásico crece en forma nodular en todos los órganos afectados, particularmente en los ganglios linfáticos.

En un comienzo las células tumorales de la sangre periférica se acumulan en el área del seno marginal del ganglio linfático, proliferando e infiltrando el tejido, presionando los folículos linfoides para desarrollar los signos clínicos del linfosarcoma.

Linfosarcoma multicéntrico de adultos: la mayoría de los animales cursan con signos inespecíficos durante una semana o varios meses: pérdida de peso, anorexia,

disminución de la producción, anemia, palidez, debilidad, marcha tambaleante, dificultad para incorporarse y algunos pueden presentar fiebre cuando el tumor crece rápidamente. Cuando el animal presenta estos signos clínicos, la muerte se produce generalmente después de dos ó tres semanas (Blood & Radostits, 1992, citado en Cadavid, 2012).

Linfadenectasia superficial: en la mayoría de los casos el aumento del tamaño de los ganglios linfáticos superficiales es un signo inicial. Aumentan de tamaño los ganglios palpables rectalmente, que a menudo se extienden al peritoneo y a las vísceras pelvianas, los hemolinfáticos del periné y los flancos, los de la cabeza o la sínfisis mandibular. En muchos animales todos los ganglios están afectados, y en muy raras ocasiones la superficie corporal está cubierta con masas subcutáneas múltiples, de 5 a 10 cm de diámetro. (Cañibano, 2011, citado en Cadavid, 2012).

Linfosarcoma abomasal: la afectación de la pared del abomaso causa: apetito voraz, diarrea acuosa y persistente y melena debido a una úlcera hemorrágica que puede romperse y convertirse en un caso hiperagudo (Kahn, et al., 2007, citado en Cadavid, 2012).

Linfosarcoma cardíaco: la afectación de la pared del ventrículo derecho causa insuficiencia cardíaca congestiva derecha, y se perciben los tonos cardíacos amortiguados por el hidropericardio, disnea por hidrotórax, congestión venosa yugular, edema en el pecho y el espacio intermandibular, taquicardia y arritmia, soplo sistólico asociado con un aumento exagerado del pulso yugular, aumento del tamaño del hígado y diarrea debida a la hipertensión portal (Blood & Radostits, 1992, citado en Cadavid, 2012).

Afección del sistema nervioso: se manifiesta con la aparición gradual de parálisis en las extremidades pelvianas durante varias semanas y, a veces, en una extremidad más que en la otra. Comienza por la flexión del menudillo, marcha tambaleante y dificultad para incorporarse; y por último postración (Blood & Radostits, 1992, citado en Cadavid, 2012).

4.1.10 Diagnóstico

En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: seroneutralización (SN), radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión (ID), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Western Blot* (WB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (González et al., 2001) (Trono, 2011).

En varios países existen programas oficiales para el control y erradicación de la LEB. El diagnóstico se realiza rutinariamente por métodos serológicos.

Los anticuerpos que primero se detectan son los dirigidos contra gp51 y p24 de la envoltura del virus (Rama, 2009). 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:

La prueba diagnóstica de inmunodifusión en gel de agar o IDGA es la más utilizada, debido a su excelente especificidad, buena sensibilidad, bajo costo y facilidad de ejecución. Su desventaja principal consiste en la subjetividad en la lectura (Lomónaco et al., 2013), que se traduce en la obtención de resultados erráticos y/o inconclusos, y provoca en el veterinario o propietario, la decisión de utilizar un método alternativo,

sobre todo con animales de alto valor económico, cuyo destino o el de sus sub-productos, es la comercialización.

Recientemente se desarrollaron distintos equipos comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche (González et al., 2001). En la prueba diagnóstica de ELISA se establece una competencia por el antígeno entre los anticuerpos del suero problema y otros anticuerpos, de la misma especificidad, fijados a los pocillos de la placa. De esta forma, cuantas más inmunoglobulinas haya en la muestra menos antígeno habrá disponible para unirse a los anticuerpos adsorbidos a la placa. La adición de anticuerpo específico para el antígeno conocido, marcado enzimáticamente, y su reacción con el sustrato adecuado, revelan la existencia o no de antígeno libre, en una relación inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos en el suero problema (Hernández, 2010). En este caso menor intensidad de color (DO) indica menos antígeno libre y, por tanto, mayor presencia de anticuerpos.

Para el caso de la ELISA la desventaja radica en los factores fisiológicos del animal pueden influir sobre el nivel de anticuerpos y presentar falsos negativos, al igual que el cambio de temperatura y tiempo de incubación de las muestras, por este motivo y de acuerdo a lo investigado por (Lomónaco et al., 2013), se confirmó que los complejos de unión antígeno-anticuerpo, y las bajas temperaturas junto con el extenso tiempo de incubación, estarían aumentando la fuerza específica de unión y favoreciendo el equilibrio entre los anticuerpos presentes en la muestra y el antígeno, y asimismo, desfavoreciendo la unión de moléculas no relacionadas, que provocan la respuesta inespecífica o background (Lipschultz, Yee, Mohan, Li & Smith, 2002).

PCR es una prueba conveniente para detectar DNA proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un

diagnóstico rápido y temprano (González et al., 2001) (De Souza, 2008) (Beier, Blankenstain, Marquard & Kuzmak, 2001).

El método más sensible y rápido es la PCR doble (anidada) que permite un diagnóstico confiable en fases iniciales y en animales jóvenes (Benavides, Muñoz & Ceriani, 2017), seguida por electroforesis y tinción. El método descrito se basa en secuencias cebadoras del gen *env*, que codifica la gp51. Este gen está muy conservado, y tanto el gen como el antígeno están generalmente presentes en todos los animales infectados a lo largo de las fases de la infección (OIE, 2008).

La PCR ha sido utilizada para la detección temprana del VLB en animales menores de seis meses y evita reacciones de falso positivas, causadas por transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes, la sensibilidad es 96% y la especificidad 45%, con respecto a la prueba de IGDA. Esto demuestra que la PCR es más sensible que las otras pruebas (Felmer, et al., 2006).

En la mayoría de las explotaciones del país los productores no llevan a cabo pruebas diagnósticas para detección de enfermedades, ni realizan un diagnóstico inicial, observando signos y síntomas de manera detallada, y cuando la enfermedad se presenta suelen atribuirse a otras causas y diagnósticos desconocidos o equivocados, y a la vez se aplica tratamiento y control inadecuados.

4.1.11 Prevención, Control y Erradicación

Realizar procedimientos médicos adecuados en la práctica veterinaria para evitar la transmisión viral:

- No reutilizar agujas, mangas de palpación, material quirúrgico, máquinas de marcación
- Desinfección de instalaciones
- Desinfección de medios de transporte
- Control de vectores biológicos

Diagnóstico del total de los animales del hato, así:

- Los terneros deben ser serotesteados no antes de seis meses de edad, ya que falsos positivos pueden ocurrir en animales jóvenes debido a la circulación de anticuerpos provenientes del calostro.
- Vacas en gestación deben ser analizadas al menos 6 semanas antes del parto para evitar falsos negativos esto por qué ocurre una disminución en anticuerpos circulantes por transmisión de los mismos al calostro y el periodo gestacional.
- Realizar muestreos a animales nuevos antes de ser incorporados al hato.
- Separación física de los animales seropositivos de los seronegativos.

4.1.12 Tratamiento

Por las características del virus y su mecanismo de integración al genoma del hospedero, no existe tratamiento. Y las medidas van dirigidas al control y la prevención de la enfermedad, si la erradicación no se plantea como opción (Rama, Pritsch, Adrien, Moratorio & Meikle, 2012). Para mejorar la calidad de vida y el estado de los animales en LBE avanzada o terminal se propone la modulación de la expresión viral, lo anterior se logra con el uso de fármacos capaces de disminuir los provirus, de esta manera se han probado fármacos como el valproato una sal sódica (ácido 2-propilpentanóico) en ovinos con leucemias y linfosarcomas con resultados parcialmente positivos. Otra

opción son los Interferones, esta molécula regula el crecimiento celular de linfocitos por lo que podría tener un efecto positivo durante el curso de la patología. El factor de necrosis tumoral (INF) también podría contribuir en el tratamiento paliativo de la enfermedad, dado que es capaz de disminuir la formación de sincitios de linfocitos infectados con el virus de la LBE (Konnai et al., 2005).

4.1.13 Importancia

Desde el punto de vista económico, la LBE no solo genera importantes pérdidas en las exportaciones que requieren ganado libre de ella, y en la comercialización de ganado y material genético, sino también por los costos en que se incurre para el diagnóstico, por la muerte prematura de algunos animales como resultado del linfosarcoma (Bautista et al., 2013), (Rama, 2009).

Las hembras bovinas son más susceptibles a adquirir la enfermedad que los machos, por lo tanto, las pérdidas económicas resultan en la merma de leche, el descarte de animales a temprana edad por la muerte de individuos con linfoma y además de descartes de canales en los mataderos (Bonifaz, & Ulcuango, 2015). Y según lo reportado por Bautista et al. (2013), la LVB tiene consecuencias asociadas a problemas reproductivos, disminución en la producción láctea, afecciones digestivas y susceptibilidad a diferentes enfermedades de etiología infecciosa.

También es importante en salud pública, existe un reporte sobre la presencia del antígeno gp 51 (glicoproteína de superficie) del virus de la LVB en el 7% de los casos de cáncer de seno, lo que sugiere que este virus sería capaz de infectar células humanas, pero es una teoría en investigación sin una conclusión final (Ochoa et al., 2007).

4.2 Materiales y métodos

Se tomaron muestras de calostro, leche y sangre de 8 vacas Holstein puras y sangre a partir de sus crías en la Estación Agraria Paysandú, ubicada en el corregimiento de Santa Elena, Medellín. En los días 0, 15, 30, 45 y 60 después del parto. Inicialmente en el día 0 se tomó una muestra de sangre y calostro de las vacas después del parto; y muestras de sangre de sus crías antes del consumo de calostro. Se seleccionó una de las terneras para realizarle seguimiento diario desde el día 0 hasta el día 15, con la finalidad de determinar el momento exacto de la infección por el VLB.

4.2.1 Toma de muestras de calostro y leche

Se tomaron muestras de calostro inmediatamente después del parto, para ello se limpió la ubre y los pezones con servilletas, y se recolectó en un tubo de 50 ml que contenía un conservante antimicrobiano (Bronopol). Las muestras se homogenizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C) para su posterior procesamiento el día siguiente al muestreo.



Figura 14: muestra de calostro día 0, en tubo de 50 ml, con Bronopol conservante antimicrobiano.

Fuente: Galvis, 2017

Se recolectaron los primeros chorros antes de colocar las pezoneras previo al inicio del ordeño. La leche se recolectó en tubos individuales de 50 ml (Figura 14), cada tubo tenía como conservante un antimicrobiano (Bronopol). Las muestras fueron marcadas por vaca y hato, se homogeneizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C) para su posterior procesamiento el día siguiente al muestreo.

4.2.1.1 Extracción de sueros de calostro y leche

Las muestras de calostro y leche se trasladaron a tubos de 15 ml y se centrifugaron a 1500 g por 10 minutos para separar la leche en fracción grasa y fracción clarificada o suero. Se retiró la fracción grasa y el suero se recolectó en tubos marcados de 1,5 ml. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis.

4.2.1.2 Prueba serológica ELISA

Para el diagnóstico de anticuerpos contra el VLB (gp51) en las muestras de leche se usó la técnica de ELISA. El procedimiento se realizó con un kit comercial (SVANOVIR® VLB gp51-Ab). Se adicionaron 4 µL del reactivo A (control positivo) y 4 µL del reactivo B (control negativo) en los pozos para los controles. Se adicionaron 100 µL de suero de leche o calostro de cada muestra en los otros pozos. Se agitó el plato y se incubó a 37°C por 1 hora. Se lavó el plato con la solución PBS-Tween en un lavador de platos y se adicionaron 100 µL del conjugado (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales anti-IgG bovino) en cada pozo y se incubó a 37°C por 1 hora. Se repitió el lavado con la solución PBS-Tween y se adicionaron 100 µL de solución de sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de sustrato con H₂O₂), se incubó 10 minutos a 25°C. Se adicionaron 50 µL de solución de parada (Ácido sulfúrico

2M). Se midió la densidad óptica (DO) de los controles y las muestras a 450 nm en un espectrofotómetro para microplatos (BioTek® ELx800)

4.2.1.3 Análisis estadístico

De acuerdo con la Densidad Óptica se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos contra la proteína del VLB (gp51) aquellas muestras que obtuvieron un valor positivo porcentual (PP) mayor o igual a 10 de acuerdo con los criterios del fabricante. Los resultados fueron tabulados en el programa SAS R versión 9.2 para Windows (SAS Institute Inc., Cary NC, USA), el análisis de los resultados se realizó de forma descriptiva.

4.2.2 Toma de muestras de sangre

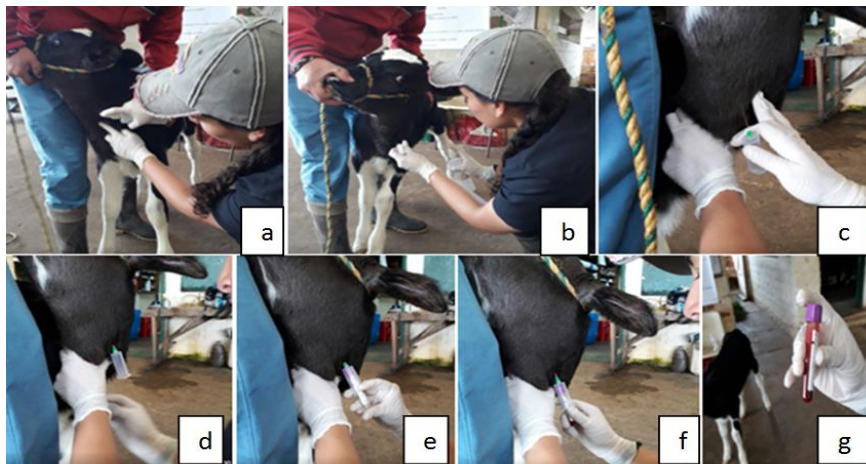


Figura 15: Toma de muestra de la vena yugular con sistema al vacío vacutainer (DBvacutainer®) y recolección en tubos con anticoagulante EDTA. a) y b) Limpieza y desinfección, c) y d) Punción en la vena yugular, e), f) y g) Toma de muestra en tubo con EDTA

Fuente: Galvis, (2017).

En terneras se tomó la muestra de sangre de la vena yugular (Figura 15) y en vacas se extrajo de la vena coccígea en la base de la cola (Figura 16), en ambos casos se utilizó aguja calibre 21G con sistema al vacío vacutainer (DBvacutainer®) y tubos con EDTA

(Ácido etilendiamintetracético) como anticoagulante; las muestras se homogenizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración para conservar la cadena de frío, mediante el uso de bolsas con gel hasta llegar a su disposición final en refrigeradores a 4 °C para realizar la recolección de plasma y la extracción de DNA al día siguiente del muestreo.



Figura 16: Toma de muestra de la vena coccígea con sistema al vacío vacutainer (DBvacutainer ®) y recolección en tubos con anticoagulante EDTA.

Fuente: Galvis (2017).

Las muestras de sangre recolectadas en los vacutainer se llevaron a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron durante 4 minutos 3000 rpm 4°C, se recuperó el plasma y se almaceno a -20°C hasta su uso. Para obtener el DNA de los leucocitos se realizó la técnica *salting out* y se resuspendió en buffer TE 1X pH 8.0 (Tris HCl 1 M y EDTA 0,5 M), el cual se almacenó a 4°C hasta el momento del análisis. La calidad y cantidad del DNA obtenido se evaluó en un espectrofotómetro (NanoDrop2000®, Massachusetts-Estados Unidos) y en gel de agarosa al 1%.

4.2.2.1 Prueba serológica ELISA

El método diagnóstico ELISA para la detección de anticuerpos contra el VLB (gp51) en el plasma bovino se realizó con un kit comercial (SVANOVIR® VLB gp51-Ab) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adicionaron 4 µL del reactivo A (control

positivo) y 4 μ L del reactivo B (control negativo) en los pozos para los controles. Se adicionaron 4 μ L de plasma de cada muestra en los otros pozos. Se agitó la placa y se incubó a 37°C por 1 hora. Se lavó la placa en un lavador de platos y se adicionaron 100 μ L del conjugado en cada pozo y se incubó a 37°C por 1 hora. Se repitió el lavado y se adicionaron 100 μ L de solución sustrato, se incubó 10 minutos a 25°C. Se adicionaron 50 μ L de solución de parada. Se midió la densidad óptica (DO) de los controles y las muestras a 450 nm en un espectrofotómetro para microplatos (BioTek® ELx800).

4.2.2.2 Análisis estadístico

De acuerdo con la Densidad Óptica se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos contra la proteína del VLB (gp51) aquellas muestras que obtuvieron un valor positivo porcentual (PP) mayor o igual a 15 de acuerdo con los criterios del fabricante. Los resultados fueron tabulados en el programa SAS R versión 9.2 para Windows (SAS Institute Inc., Cary NC, USA), el análisis de los resultados se realizó de forma descriptiva.

4.2.2.3 Detección molecular por PCR anidada

La prevalencia molecular por PCR anidada se determinó a partir del DNA de las muestras de células sanguíneas (leucocitos), de madres e hijas Holstein; se amplificó una región del gen env (gp51) viral para obtener un fragmento de 444 pares de bases en las vacas y terneras positivas. Los primers utilizados fueron descritos por Beier et al. (2001). env 5023 (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3') env 5608 (5'-AACAAACAACCTCTGGGGAGGGT-3') para la primera reacción y env 5099 (5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3') y env 5521 (5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3') para la segunda reacción.

Se siguió el siguiente protocolo: desnaturalización inicial fue a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Como control negativo se hicieron reacciones en ausencia de DNA y como control positivo se usó inicialmente el DNA de una vaca positiva para VLB por la técnica de ELISA, después de esto se utilizó el DNA de una de las vacas que resulto positiva para la prueba.

4.2.2.4 Electroforesis en geles de agarosa

El producto de la segunda reacción se verifico en un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X gel. En cada calle del gel se sembraron 10 µl de los productos de reacción se sembraron también 5 µl de un marcador de peso molecular de 50 a 700pb. La electroforesis se realizó a 100 Volts durante 15-20 min, en presencia de buffer TBE 1X corredor de DNA y los resultados se observaron en un documentador de geles (Biorad®).

4.3 Resultados

Es importante resaltar que solo se sangraron terneras, debido a que los terneros machos son vendidos durante la primera semana de vida por lo que no se les pudo realizar un seguimiento completo.

De las muestras de sangre pertenecientes a las ocho vacas analizadas, una sola presentó resultados negativos a ELISA en sangre, calostro y PCR en sangre, en todas las demás se observaron resultados positivos a la presencia del virus.

La muestra de calostro tomada a madres positivas al virus fue positiva a la presencia de anticuerpos por medio de ELISA (Figura 17).

Las muestras de leche tomadas después del día 0 siempre fueron positivas debido a que las terneras después de 4 días de nacidas se separaron de sus madres, y se les suministró leche recolectada de varias vacas portadoras y no portadoras.

Los resultados obtenidos en ELISA y PCR en sangre de todas las terneras en el día 0 y antes del consumo de calostro fueron negativos, pero al día 15 se observó que 2/8 de las terneras ya eran positivas al virus tanto en ELISA como en PCR (Tabla 1), las demás solo fueron positivas a ELISA con excepción de 1/8 que continuo siendo negativa. Al día 30 y hasta el 60 se observaron los mismos resultados que para el día 15 a excepción de una ternera que había sido negativa en PCR hasta el día 15 haciéndose positiva para el día 30.

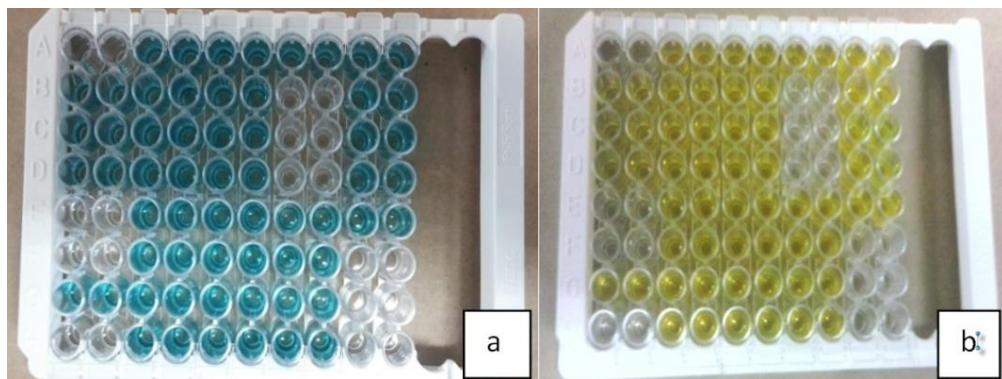


Figura 17: Resultados en prueba diagnóstica ELISA. a) Conversión del sustrato por parte del conjugado en muestras positivas, b) Muestras positivas después de aplicar solución frenadora.

Fuente: Galvis, (2017).

Se tomó la decisión de hacer un seguimiento diario durante los primeros 15 días de nacida a una ternera de madre positiva (Tabla 2), para determinar el momento exacto de la infección puesto que se había observado que en el día 15, ya algunas de las terneras eran positivas a la presencia de anticuerpos contra el virus en sangre. Con estos resultados se observó que al siguiente día del nacimiento ya presentaba anticuerpos en sangre aunque no se evidencio el virus en sangre en esos quince días (Tabla 3).

Tabla 1. Resultados obtenidos por medio de ELISA y PCR a muestras tomadas de vacas y terneras Holstein puras. Madres identificadas con *.

Animal	Día	ELISA sangre	ELISA leche o calostro	PCR sangre
Exótica*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Edilma	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Negativa
	30	Positiva	Positiva	Negativa
	45	Positiva	Positiva	Negativa
	60	Positiva	Positiva	Negativa
Pandora*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Pandi	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Positiva
	30	Positiva	Positiva	Positiva
	45	Positiva	Positiva	Positiva
	60	Positiva	Positiva	Positiva
Tijuana*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Tuna	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Positiva
	30	Positiva	Positiva	Positiva
	45	Positiva	Positiva	Positiva
	60	Positiva	Positiva	Positiva
Alkaeda*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Arca	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Negativa
	30	Positiva	Positiva	Positiva
	45	Positiva	Positiva	Positiva
	60	Positiva	Positiva	Positiva
Patricia*	0	Positiva	Positiva	Negativa
Panamá	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Negativa
	30	Positiva	Positiva	Negativa
	45	Positiva	Positiva	Negativa
	60	Positiva	Positiva	Negativa
Dorita*	0	Negativa	Negativa	Negativa
Dorotea	0	Negativa	Negativa	Negativa
	15	Negativa	Positiva	Negativa
	30	Negativa	Positiva	Negativa
	45	Negativa	Positiva	Negativa
	60	Negativa	Positiva	Negativa
Penélope*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Pera	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Negativa
	30	Positiva	Positiva	Negativa
	45	Positiva	Positiva	Negativa
	60	Positiva	Positiva	Negativa

Fuente: Usuga & Galvis, (2017).

Tabla 2. Resultados obtenidos de las muestras de sangre tomadas a la madre de la ternera elegida para el seguimiento

Anima l	Día	ELISA sangre	ELISA leche o calostro	PCR sangre
Anali*	0	Positiva	Positiva	Positiva
Anahi	0	Negativa	Positiva	Negativa
	15	Positiva	Positiva	Negativa

Fuente: Usuga & Galvis, (2017).

Tabla 3. Resultados de seguimiento de ternera para determinación día exacto de la infección

Ternera Anahí	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15
ELISA sangre	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR sangre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Usuga & Galvis, (2017).

Se determinó la frecuencia de PCR positivos y PCR negativos en las 7 terneras analizadas. Inicialmente 4 fueron negativas a la presencia del virus lo que equivale al 57,14% y 3 fueron positivas lo que correspondió al 42,86 (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de las frecuencias para PCR positivos y PCR negativos en 7 terneras Holstein.

Sistema SAS

Procedimiento FREQ

PCR	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia acumulada	Porcentaje acumulado
0	4	57.14	4	57.14
1	3	42.86	7	100.00

Fuente: Usuga & Galvis, (2017).

El método estadístico Odds Ratio permite determinar la oportunidad relativa en número de veces que puede estar expuesto a sufrir una patología un animal positivo al

virus respecto al que no lo está. Los animales que consumen calostro con anticuerpos contra el VLB tienen un OR=0.750 lo que significa que estos tienen mayor susceptibilidad de tener la infección por VLB. Los animales que consumen calostro sin anticuerpos contra el VLB tienen un OR>999.999 lo que significa que estos tienen un menor riesgo de presentar la infección por VLB (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de OR para la infección por VLB dado el consumo de calostro.

<i>Estimadores de cocientes de disparidad;</i>			
<i>Efecto</i>	<i>Estimador del punto</i>	<i>95% Wald Límites de confianza</i>	
<i>CALOSTRO 0 vs T</i>	<i>>999.999</i>	<i><0.001</i>	<i>>999.999</i>
<i>CALOSTRO 1 vs T</i>	<i>0.750</i>	<i>0.084</i>	<i>6.710</i>

Fuente: Úsuga & Galvis, (2017).

Para la identificación del provirus de LVB se realizó la PCR anidada y la técnica de electroforesis en gel de agarosa, lo que permitió observar una banda de 444 pares de bases en los animales positivos a la presencia del provirus (Figura 18). Así mismo se utilizó ADN de un control negativo y un control positivo que fueron identificados previamente mediante la técnica de ELISA

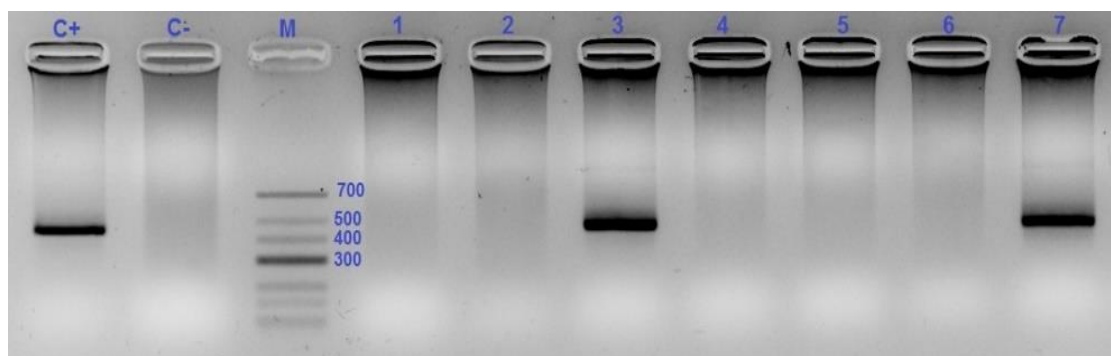


Figura 18 : Gel de electroforesis para un fragmento de 444 pares de bases del gen de la envoltura del VLB C+ control positivo, C- control negativo, M marcador de peso. 1,2, 4, 5, 6 muestras negativas a VLB y 3, 7 muestras positivas a VLB.

Fuente: Úsuga & Galvis, (2017).

4.4 Análisis de resultados y discusión

Se estudió la progresión de la infección natural con VLB, en ocho terneras de madres portadoras y no portadoras, con la finalidad de conocer el comportamiento de la infección desde el nacimiento, antes del consumo de calostro hasta el día 60 cuando ya se ha comenzado a formar la inmunidad activa mientras la pasiva dada por el paso de anticuerpos maternos ya está disminuyendo.

De las muestras analizadas la prevalencia para este estudio en vacas fue 87,5% para ELISA en sangre, 87,5% para ELISA en leche y 75% para PCR en sangre lo que no concordó con lo reportado por Bautista et al., 2013, donde la prevalencia de fue del 15%, aunque cabe destacar que este estudio se realizó en 100 animales de ganado de carne y solo fue utilizado la ELISA como método diagnóstico, lo que explicaría que la prevalencia fuera mucho más baja. Según lo reportado en algunos estudios sobre LBE (Betancur & Rodas, 2008), (Bonifaz, & Ulcuango, 2015), (Cadavid, 2012) el ganado lechero presenta mayor prevalencia de la enfermedad debido a la gran cantidad de manipulación a que son sometidas constantemente lo que encaja con la prevalencia tan alta que se presentó en este estudio. Alusivo a lo anterior es de suma importancia hacer un seguimiento continuo de ésta enfermedad en los hatos lecheros, que aporte y brinde elementos suficientes y constantes acerca de su presentación en el país. Y por tal motivo para este estudio se escogió a terneras Holstein puras.

Según Darlington et al. (1985), el tipo de explotación ganadera influye en la prevalencia de la enfermedad; cuando una ganadería es intensiva, los animales están expuestos a hacinamiento, a mayor contacto y, a la vez, a un aumento en la manipulación por los operarios.

En el caso de las terneras para el día 0 la prevalencia antes del consumo de calostro fue 0 % puesto que todas eran negativas hasta ese momento, en el día 15 la prevalencia fue 87,5% para ELISA y 25% en PCR; y en el día 30 hasta el 60 la prevalencia se mantuvo en 87,5% para ELISA y 37,5% en PCR. Según los resultados obtenidos las terneras en el día 15 ya presentaban anticuerpos contra el virus por lo que se realizó un seguimiento diario durante los primeros 15 días de nacida a una ternera de madre positiva, para determinar el momento exacto de la infección y se observó que en día 2, ya presentaba anticuerpos en sangre por medio de ELISA, aunque no se evidencio el virus en sangre por PCR en esos quince días.

Según los resultados obtenidos de las pruebas diagnósticas, realizadas a las terneras se observó, que efectivamente en el día del nacimiento y antes del consumo de calostro las muestras de sangre recolectadas salieron negativas a la presencia de anticuerpos por la prueba de ELISA como se esperaba puesto que la placenta de la vaca inicialmente es de tipo epiteliocorial y luego se transforma en sindesmocorial, y se mantiene a través de toda la gestación (Baruta et al., 2011) (González et al., 1988), y en ninguna de estas dos fases del tejido placentarios es posible el paso de anticuerpos o de otras proteínas de la madre al feto, sino vía calostro y leche. El PCR realizado a estas muestras también fue negativo, lo que indico que no hubo contagio del virus vía transplacentaria, ni en el canal de parto como lo reportan algunos autores (Gutiérrez, 2010), (Bautista et al., 2013), (Aida et al., 2013).

Es importante destacar que, al momento de la toma de muestras, en ningún animal se observaron síntomas compatibles con LEB, lo cual indicaría que los resultados positivos eran de portadoras asintomáticas de la enfermedad. Los animales infectados pueden mantenerse clínicamente sanos; en la mayoría de los casos la enfermedad es subclínica,

por lo que su diagnóstico se dificulta, la sintomatología específica se observa hasta un estado muy avanzado de la enfermedad cuando los linfosarcomas empiezan a hacerse visibles (Dubarry et al., 1999), (Bonifaz, & Ulcuango, 2015).

Según Resoagli et al. (1999) y Chamizo, (2005), la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en animales mayores de 3 años, que en algunos casos la pueden adquirir desde jóvenes pero sólo se manifiesta en la edad adulta. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde la prevalencia fue del 87,5% para ELISA y 75% en PCR en vacas adultas (entre 3 y 10 años de edad) y del 87,5% para ELISA y 37,5% en PCR en terneras; esto coincidió con otras investigaciones (Darlington et al., 1985) (De Souza, 2008), donde la mayor prevalencia se vio en vacas adultas. Estos animales representan un riesgo para los sanos, ya que son diversas las formas de transmisión de la enfermedad.

Diversos estudios han demostrado previamente que, es posible la transmisión del VLB de un animal a otro a través de los guantes de palpación (Divers et al., 1995) y del uso permanente de equipo quirúrgico, cuando se usa en numerosos animales sin tomar las debidas precauciones higiénicas (Bonifaz, & Ulcuango, 2015), (Resoagli et al., 2002), (Darlington et al., 1985).

La utilización de una aguja desechable por cada animal para aplicar los medicamentos, es indispensable para reducir la probabilidad de transmisión de enfermedades contagiosas dentro de la población bovina (Giraud et al., 2010), (Bautista et al., 2013).

La utilización de sólo un guante de palpación para la realización de tactos rectales, sin que dicho guante sea lavado, ni desinfectado entre cada ejercicio (Bonifaz, & Ulcuango, 2015), se presentó comúnmente en la práctica diaria, por lo que se consideró

una de las principales causas de la diseminación de infección a la mayor parte del hato. Además de esto hay que atribuir el hecho a la falta de asistencia profesional veterinaria permanente, para capacitar al personal encargado de la reproducción y disminuir así el riesgo de contagio.

Por lo que es importante, destacar hasta qué punto el porcentaje alto de infección encontrado se acompaña del desconocimiento que se tiene de los diferentes procesos y manejos sanitarios de una lechería especializada donde se manipulan constantemente gran cantidad de animales.

El testeo de VLB al nacimiento, podría reducir potencialmente la infectividad del VLB y prevenir futuras transmisiones del virus (Gutiérrez, 2010), con los datos obtenidos se demostró que al realizar sangrado al nacimiento y ofrecer calostro a las terneras de vacas negativas se puede controlar que el virus se siga propagando en el hato.

Todos los ensayos diagnósticos deberían minimizar la clasificación errónea de los animales. Un ensayo utilizado en análisis de rutina debe ser lo suficientemente exacto y preciso como para ser reconocido como válido. Debería haber estimadores fiables de sensibilidad y especificidad diagnóstica y se debería revalidar cada ensayo en el lugar en el que se va a utilizar, especialmente en los casos de kits importados (OIE, 2008). Por este motivo se escogió el método ELISA por ser rápido de realizar, la interpretación de los resultados es objetiva, y es más sensible que la IDGA en muchos casos (Resoagli et al., 1999), (González et al., 2001) (Hernández, 2010). Los bovinos infectados desarrollan anticuerpos contra la glicoproteína de envoltura gp51 y la proteína de cápside p24 del VLB (Galdino de Lima, 1999), (Fulton et al., 2006), por lo tanto ambas proteínas son obvias candidatas a ser utilizadas como antígenos en los kits

diagnósticos. Para este caso se utilizó kit comercial (SVANOVIR®) para el diagnóstico de anticuerpos contra el VLB (gp51).

La situación que se presentó con una de las muestras de una vaca, donde esta fue positiva a ELISA en sangre y en leche, pero negativa a PCR en sangre, podría estar también relacionada con una baja en la carga proviral que no fue detectada en PCR, pero contrario a lo reportado por Gillet et al. (2007), quienes propusieron que los animales con baja carga proviral no desarrollarían una respuesta de anticuerpos contra gp51 y/o a la presencia de algunas variantes provirales, no se dio ya que si se observó presencia de anticuerpos contra el virus en sangre y en leche por lo que se despiertan una respuesta inmune baja como lo reportó Felmer et al., (2006) para VLB.

La técnica molecular PCR es una metodología que confiere resultados altamente confiables sobre la presencia del genoma del VLB en los bovinos (Úsuga et al., 2015). Aunque no es la prueba recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008), se ha demostrado que la amplificación y detección de secuencias DNA o RNA de VLB mediante la PCR constituyen una metodología sensible de diagnóstico directo para la infección con VLB (Benavides et al., 2017). En contraste las pruebas serológicas AGID y ELISA aprobadas por la OIE (OIE, 2008) pueden verse afectadas por condiciones fisiológicas del animal que afecten el título de anticuerpos en sangre por ejemplo en vacas en periparto, animales inmunodeprimidos y terneros hasta aproximadamente los 6 meses de edad, o la infección con virus de la diarrea viral bovina (BVDV) que también disminuye el nivel de anticuerpos contra VLB (Gutiérrez, 2010).

La PCR para el virus de la LVB se basa en secuencias cebadoras del gen *env*, que codifica la proteína de superficie gp51. Este gen está muy conservado, y tanto el gen

como el antígeno están generalmente presentes en todos los animales infectados a lo largo de las fases de infección (Baruta et al., 2011) (Beier et al., 2001). La PCR es capaz de detectar los verdaderamente negativos, por tal motivo se decidió realizar las dos pruebas diagnósticas, con esto se pudo determinar no solo la presencia de anticuerpos con ELISA, sino que también la presencia del genoma del virus.

La diferencia entre las dos metodologías de diagnóstico radicó que para el caso de la ELISA los factores fisiológicos del animal pueden influir sobre el nivel de anticuerpos y presentar falsos negativos, mientras que la PCR anidada es una prueba de diagnóstico directo ya que detecta el provirus integrado en los linfocitos B, lo que hace el diagnóstico más sensible.

Algunos investigadores han propuesto que el VLB está asociado con el cáncer de seno en el hombre, lo cual supondría un comportamiento zoonótico, ya que puede infectar también al ser humano e incluso se determinó que es posible *In vitro* infectar experimentalmente cultivos celulares en monocapa provenientes de diversas especies (Graves & Ferrer, 1976). Por lo anterior está adquiriendo mayor importancia, el controlar la expansión de este virus ya que se sospecha del posible contagio por medio de la leche que es un alimento de consumo diario lo que causaría un gran problema a la salud pública del país y de los colombianos. En algunos países de Europa la presencia de este virus es de declaración obligatoria y se busca erradicar completamente el virus.

Otra muestra del potencial zoonótico del VLB es su estrecha relación con el HTLV tipos 1 y 2, que atacan humanos (Andujar, 2004), de hecho estos tres virus constituyen un único subgrupo dentro de la familia de los retrovirus que está caracterizado por un contenido genético distinto a los demás retrovirus (Dequidiet et al., 1997).

Según estudios realizados por Ochoa et al. (2007), determinó la presencia del antígeno gp51 en el 7% de los casos de carcinoma canicular de seno, estos resultados sugieren que el virus de la LVB tiene carácter zoonótico y confirman que el virus es capaz de infectar células humanas, lo que pone al país en un gran alarmante ya que más de la mitad de los hatos colombianos son positivos a la presencia del virus.

Estos leucocitos podrían 1) ser clarificados de la circulación y eliminados algunos días post-ingestión, 2) activar la expresión viral y establecer una infección persistente con provirus circulante detectable, o 3) quedar arrestados en un estado símil latencia, sin expresión viral hasta la caída de los anticuerpos pasivos cuando el virus podría expresarse y causar una respuesta inmune detectable.

Futuros ensayos deberían enfocarse en estudiar el retardo en desarrollar una respuesta humoral detectable, ya que el tiempo de seroconversión como consecuencia de la exposición a bajas dosis infectivas ha sido propuesto desde 3 meses hasta 12 meses (Ferrer et al., 1978) y podría ser la razón de la ausencia de nuevos serorreactores durante el primer año de vida, no solo para aquellos animales potencialmente infectados por la vía oral si no para aquellos infectados por cualquier otra vía.

Es de gran importancia resaltar que todos los animales que resulten seropositivos a la LVB ya no lograrán una recuperación de la enfermedad, y que si bien, aunque no puedan presentar manifestaciones tan graves como el linfosarcoma, estos animales deberían ser sacrificados pues representan una gran fuente de contaminación para los otros animales, y se deberían tomar medidas para prevenir la diseminación de la enfermedad.

4.5 Conclusiones

La técnica de ELISA, demostró ser efectiva, y práctica para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína gp51 del virus de la LVB y por medio de PCR se confirmó la presencia del virus en el genoma del animal.

A pesar de que el área lechera estudiada tiene un alto grado de tecnificación, en aspectos relacionados con la sanidad animal, se encuentra muy descuidada, dado que no se dan capacitaciones sobre manejos sanitarios a los trabajadores de la Estación Agraria y la ausencia de controles serológicos para los animales que se incorporan a los hatos.

Se observó convivencia tanto de animales positivos como negativos en el mismo entorno a los cuales se les aplicaba el mismo manejo, por lo que se puede decir que los factores de riesgo que predisponen a la presencia de la enfermedad pueden estar dados principalmente por causas iatrogénicas.

Dada la alta prevalencia encontrada, se recomienda planear, promover e iniciar un programa de prevención y control de la Leucosis bovina enzoótica que incluya aspectos básicos de manejo sanitario y la promoción de contratación de servicios profesionales que incluyan no solo palpación, sino también la vigilancia de los diversos procesos patológicos que inciden en la producción y reproducción bovinas, afectando de paso las posibilidades comerciales internacionales.

La infección por LVB en el ganado vacuno no puede y no debe ser ignorado por los ganaderos y sus organizaciones, ni por las autoridades nacionales, que son responsables de la salud animal y pública en el país.

4.6 Recomendaciones

Se recomienda incrementar la cobertura del servicio de diagnóstico de la infección con la finalidad de controlarla e inclusive prevenirla para mejorar la condición actual de los datos colombianos.

Se recomienda continuar con estudios sobre la LVB para tener datos recientes de la su prevalencia y un conocimiento más claro de la situación del país, para que así se puedan tomar medidas sanitarias sobre esta.

CONCLUSIONES GENERALES

La Estación Agraria Paysandú, como sitio de pasantía presentó una buena casuística, que permitió el desarrollo y la aplicación de diversos tratamientos para correcta resolución de las patologías.

La pasantía en la Estación Agraria Paysandú permitió la adquisición de destrezas y conocimientos sobre el manejo adecuado tanto médicos como administrativos que se debe tener en una lechería especializada y la importancia del uso de registros para cada uno de los procedimientos que se llevan a cabo.

El grado de organización que posee la Estación Agraria, permitió tener una idea clara de cómo debe ser el correcto abordaje de este tipo de sistema para que sea productivo y la adecuada utilización de los potreros para cumplir con la demanda alimenticia de los animales.

Al ser la Universidad Nacional una entidad pública, se encontraron algunas limitantes, una de las más importantes fueron los medicamentos a la hora de hacer tratamientos, pero se aprendió a resolver este tipo de situaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M. & Takeshima, S. N. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-11. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/258830928_Mechanisms_of_pathogenesis_induced_by_bovine_leukemia_virus_as_a_model_for_human_T-cell_leukemia_virus
- Andujar, M. (2004). Virus y Cancer Biocancer. Recuperado de: <http://www.biocancer.com/journal/247/virus-y-cancer>
- Baruta, D.A., Ardoino, S.M., Brandan, J.L., Sosa, R.E., Mariani, E. L., Albretch, E.M. (2011). Leucosis bovina enzoótica. *Ciencia veterinaria*, 13, 9-16. Recuperado de: <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v13a02baruta.pdf>
- Bautista, N. A., Nova, Y. A., Pulido, M. O. & Andrade, R. J. (2013). Determinación serológica de leucosis bovina enzoótica en novillas de levante y vacas adultas de la vereda Morichal, Yopal, Casanare. *Ciencia y Agricultura*, 10, 31-37
- Beier, D., Blankenstain, P., Marquard, O. & Kuzmak, J. (2001). Identification of different BLV provirus isolates by PCR RFLPA and DNA sequencing. *Berl Munch Tierarztl*, 114, 252-256. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11505797>
- Benavides, B., Muñoz, S. & Ceriani, C. (2017). Molecular analysis of a fragment of bovine leukemia virus *env* gene by Nested-PCR in dairy cows from Pasto, Nariño. *Rev. Med. Vet*, 33, 67-75. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n33/0122-9354-rmv-33-00067.pdf>

- Betancur, H., & Rodas, G. (2008). Seroprevalencia de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev MVZ Córdoba*, 13, 1197-1204.
Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v13n1/v13n1a11.pdf>
- Bonifaz, N. & Ulcuango, F. (2015). Prevalence of bovine leucosis in the Santo Domingo community no. 1, Cayambe-Ecuador 2012. *La granja: revista de ciencias de la vida*, 22, 33-39. doi: 10.17163/lgr.n22.2015.03
- Cadavid, L. A. (2012). *Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche* (Tesis de maestría, Universidad Nacional, Palmira, Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/9308/>
- Chamizo, E.G. (2005). Leucosis bovina enzoótica - Revisión. *Revista Electrónica Veterinaria* 7: 1-25. Recuperado de: www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf
- Darlington, R. L., DiGiacomo, R. F. & Evermann, J. F. (1985). Bovine leukemia virus transmission by dehorning in dairy heifers. *Bovine Prac*, 19, 144-146.
- Dequiedt, F., Hanon, E., Kerkhofs, P., Pastoret, P.P., Portetelle, D., Burny, A., Kettmann, R. & Willems, L. (1997). Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis. *Journal of virology*, 71, 630-639. . Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985393>
- De Souza, D. (2008). *Efeito da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros*. (Tesis de maestría, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte). Recuperado de <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SSLA-7UUGEA>

- Divers, T. J., Batrtholomew, R. C., Galligan, D., & Little, C. (1995). Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in commercial dairy herd. *Prev Vet Med*, 23, 133-141
- Dubarry, J.R., Alvarez, A. R., Errea, A., Vera, A. & Vespoli, V. (1999). Leucosis bovina enzootica: Situación de la enfermedad en el norte de la provincia de la pampa. *Anuavet*, 40, 246-249. Recuperado de <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a40dubarry.pdf>
- Felmer, R., Zúñiga, J. & Recabal, M. (2006). Estudio Comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38, 137-141. Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200007
- Ferrer, J. F., Marshak, R.R., Abt, D.A., & Kenyon, S. J. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet.*, 9, 851-857. Recuperado de: https://scholar.google.com/scholar?oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&um=1&ie=UTF-8&lr&q=related:QKkNk5Mk8XsuZM:scholar.google.com/
- Fulton, B. E., Portella, M., & Radke, K. (2006). Dissemination of Bovine Leukemia Virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. *Journal of Virology* 80, 7873–7884. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1563808/>
- Galdino de Lima, P.R. (1999). *Prevalência da Leucose Enzoótica dos Bovinos no estado do Pará* (Tesis de maestría, Universidade Federal do Pará, Brasil). Recuperado de <http://www.ipades.com.br/publicacoes/IPADES-LEUCOSE-ENZOOTICA-BOVINOS-PARA.pdf>

- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R. & Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel antiretroviral therapies in human. *Retrovirology*, *16*, 4-18 Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1839114/>
- Giraudó, J., Bérghamo, E., Schneider, M., Magnano, G., Macias, A., Sticotti, E. & Mació, M. (2010). *Leucosis Enzoótica Bovina*. Recuperado de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/24-leucosis_enzootica.pdf
- González, E., Oliva, G., & Etcheverrigaray, M. (1988). Leucosis bovina: principales características del agente etiológico y enfermedad. *Monografías de Medicina Veterinaria*, *10*, 1-8. Recuperado de <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4918/4802>
- González, E., Oliva, G., Valera, A., Bonzo, E., Licursi, M. & Etcheverrigaray, M. (2001). Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-i, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria* *21*, 12-20.
- Graves, D.C. & Ferrer, J.F. (1976). *In Vitro* Transmission and Propagation of the Bovine Leukemia Virus in Monolayer Cell Cultures. *Cancer Research*, *36*, 4152-4159. Recuperado de: http://cancerres.aacrjournals.org/content/36/11_Part_1/4152.full-text.pdf
- Gutiérrez, G. (2010). *Estudio de la dinámica de infección perinatal con BLV en un rodeo de tambo de alta prevalencia* (Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires, Argentina). Recuperado de: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4809_Gutierrez.pdf

- Hernández, D. Y. (2010) *Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en razas criollas y colombianas* (Tesis de maestría, Universidad Nacional, Palmira). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2137/1/7408003.2010.pdf>
- Knapen, K., Kerkhofs, P., Thiry, E. & Mammerickx, M. (1994). Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting antibodies against bovine leukaemia virus in serum pools. *Epidemiol Infect.* 113, 563-569. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/.../epid infect00048-0171.pdf>
- Konnai, S., Usui, T., Ikeda, M., Kohara, J., Hirata, T., Okada, K., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. *Virology*, 339, 239–248. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682205003387>
- Lipschultz, C.A., Yee, A., Mohan, S., Li, Y. & Smith, S. J. (2002). Temperature differentially affects encounter and docking thermodynamics of antibody-antigen association. *Journal of Molecular Recognition*, 15, 44-52. doi: 10.1002/jmr.559
- Lomónaco, M., Martínez, C., Alvarez, I., Gutiérrez, G., Politzki, R. & Trono, K. (2013). Influencia de las condiciones de incubación en la detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis bovina por ELISA. *Rev. Med. Vet.* 94, 5-9
- Malatestinic, A. (2003). Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Can Vet J.* 44, 664-666. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC340243/>
- Manet, G., Guilbert, X., Roux, A., Vuillaume, A. & Parodi, A. (1989). Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet Immunol Immunop.* 22, 255-263.
- Mohammadabadi, M. R., Soflaei, M, Mostafavi, H, & Honarmand, M. (2011). Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Genet.*

- Mol. Res.*, 10, 2658-2663. Recuperado de:
<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2011/vol10-4/pdf/gmr1380.pdf>
- Occhi, H., Canal, A., Perez, E., Maletto, E., Gastaldi, R. & Esteban, E. (2002). Seropositividad a leucosis bovina enzoótica y procesos linfosarcomatosos en inspección de mataderos en vacas de descarte de la cuenca lechera central. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 1, 21-24. Recuperado de:
<http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/view/1372>
- Ochoa, A., Uribe, A. & Gutiérrez, M. (2007). Estudio del potencial zoonótico del virus de la Leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM, Revista de la Facultad de Ciencias*, 11, 31-40. Recuperado de:
<http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4968/3826>
- OIE. (2008). Enzootic Bovine Leukosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 1, 729-738. Recuperado de:
www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf
- Oliva, G.A. (1990). Leucosis Enzoótica Bovina. Un estudio sobre inmunidad humoral en vacas y terneras. *Rev. Med. Vet*, 75, 478-481
- Orloff, S., Wallingford, J. & McDougal, J. (1993). Inactivation of human immunodeficiency virus tipe I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasterurization. *J. Hum. Lact*, 9, 13-17. Recuperado de:
<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/089033449300900125>
- Rama, G. (2009). *Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina* (Tesis de maestría, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay). Recuperado de
<http://www.spluy.com/documentos/tesis/GonzaloRama.pdf>

- Rama, G., Pritsch, O., Adrien, M., Moratorio, G., & Meikle, A. (2012). Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*, 48, 11-17. Recuperado de <http://www.revistasmvu.com.uy/component/content/article/53-current-users/170-cientifico-analisis-del-descenso-de-anticuerpos-en-el-periparto-y-su-impacto-en-el-diagnostico-serologico-de-la-leucosis-enzootica-bovina.html>
- Resoagli, J. P., Jacobo, R.A., Storani, C.A., Cipolini, M.F., Deco, M. & Correa, E. (1999). Resultados Serológicos de Leucosis Enzoótica Bovina en la Zona N.O. en Rodeos de Cría de la Provincia de Corrientes, Argentina. Catedra de enfermedades infecciosas. Recuperado de: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/veterinarias/v-050.pdf>
- Resoagli, J. P., Jacobo, R.A., Storani, C.A., Cipolini, M.F., Stamatti, G.M., Deco, M. & Alfonzo, D. (2002). Seroprevalencia de leucosis enzoótica bovina en rodeos lecheros de la región noroeste de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Rev. Vet.*, 13, 1-2. Recuperado de: <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/viewFile/669/577>
- Ríos, J., Gallego, A., Vélez, L., Agudelo, J., Toro, L., Lema, A. & Acevedo, L. (2004). Caracterización y evaluación de agroecosistemas a escala predial. Un estudio de caso: centro agropecuario Paysandú (Medellín, Colombia). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 57, 1-23. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/26584/1/24196-84716-1-PB.pdf>
- Trono, K. (2011). Leucosis Bovina; una amenaza silenciosa. *Producir XXI*, 19, 44- 46. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones.../bovinos.../56-leuco.pdf
- Úsuga, C., Echeverri, J. & López, H. (2015). Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina en una población de vacas Holstein, Colombia. *Arch. Zootec.* 64, 383-388.

Villegas, V. (2015). *Leucosis bovina enzoótica* (Trabajo de grado, Universidad de la Salle, Colombia). Recuperado de http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17577/14092042_2015.pdf?sequence=3