

**AVANCES DE INVESTIGACION EN
SANIDAD ANIMAL**

Título: AVANCES DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL

Serie: FPTA 01

© 2000, INIA

ISBN: 997-38-106-1

Editado por la Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA. Título:

INDICE

Página

EVALUACION DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS	5
---	---

FPTA 35

A. Nari; M. Franchi; E. Rizzo; E. Mármol; G. Mautone

INFLUENCIA DE LA INFECCION POR LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA SOBRE LA PRODUCCION Y REPRODUCCION DE RODEOS LECHEROS	21
--	----

FPTA 199

R. Sierra; H. Guarino, A. Gil

EVALUACION DE TECNICAS SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FASCIOLASIS ANIMAL	39
--	----

FPTA 25

*J. Maisonnave; S. Rossi; D. Acosta; S. Hernández; A. Terzaghi;
G. Pignataro; R. Colina*

DESARROLLO Y EVALUACION DEL DIAGNOSTICO DE ADN PARA HEMOPARASITOS (<i>BABESIA BOVIS</i> Y <i>BABESIA BIGEMINA</i>) EN VACUNOS Y EN <i>BOOPHILUS MICROPLUS</i>	53
---	----

FPTA 31

M. Solari

EL FONDO DE PROMOCION DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos seleccionados para ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

Nari A. (1)
Franchi M. (2)
Rizzo E. (3)
Mármol E. (4)
Mautone G. (3)

(1) DMV, Bsc, MSc-División Parasitología.
DILAVE "Miguel C Rubino".

(2) DVM. Centro Regional del Norte.
DILAVE. "Miguel C Rubino".

(3) Per. Agr. / Asistente Laboratorio
División Parasitología. DILAVE. "Miguel
C Rubino".

(4) Asistente Laboratorio DILAVE.
"Miguel C Rubino".

1. INTRODUCCION

La Resistencia antihelmíntica (RA) es un fenómeno común en poblaciones de nemátodos gastrointestinales de ovinos, y se caracteriza por tener una base

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en la aplicación del Programa "Matalombriz", destinado al control de las especies de nemátodos más prevalentes y patógenas del ovino en Uruguay. En su implementación, se buscó reducir la presión con drogas de amplio/mediano espectro, aún eficientes, como medida para dilatar la selección de poblaciones resistentes a los antihelmínticos (RA).

El Programa fue planificado sobre la base de un diagnóstico de situación previo en cada establecimiento, así como también al conocimiento epidemiológico local, una baja frecuencia de administración de drogas, una rotación lenta de antihelmínticos de amplio espectro, su combinación con drogas de espectro reducido y medidas puntuales de manejo.

Fue ejecutado (Plan Piloto) durante 26 meses, en tres establecimientos (Lat 32° Sur/Long 56° Oeste) del departamento de Tacuarembó. Integró un total de 10.777 ovinos Corriedale de todas las categorías, las cuales fueron monitoreadas mensualmente, para determinar la evolución del parasitismo.

Se detectó RA en majadas de los tres establecimientos. El grupo bencimidazole controló en un rango de 0-73%, según establecimiento; el levamisole 73-100% y el avermectina un 100%. Para mantener la rotación lenta de grupos químicos, en uno de los predios, se integró la droga naftalofos (organo-fosforado / mediano espectro) la cual controló un 96%.

EVALUACION DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS

MEDIDAS PARA DILATAR LA APARICION DE RESISTENCIA ANTIHELMINTICA

FPTA 35

Período Ejecución: Ago., 1994-Abr., 1997

genética y estar directamente relacionada a las prácticas de manejo y la frecuencia de dosificaciones del establecimiento agropecuario (4) (24) (25).

Su relevancia productiva y económica, es una consecuencia del impacto que los parásitos internos pueden producir en un área en particular y de la prevalencia/incidencia de las especies de nemátodos patógenos involucradas (13). En Uruguay, el país con la mayor dotación ovina de América Latina, ambos factores han sido suficientemente estudiados, lo que ha posibilitado estimar su importancia relativa y determinar la necesidad de utilizar nuevas estrategias de control.

El clima templado de todo el territorio nacional, permite que se desarrollen, entre otros, especies de nemátodos patógenos como el *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Ostertagia circumcincta* y *Nematodirus spathiger* (18) (21). Su prevalencia a nivel nacional es usualmente alta, aunque la incidencia en el ámbito de predio, está condicionada a las condiciones meteorológicas y al manejo de las majadas que realice el productor (18).

Durante el período experimental, se logró abatir las parasitosis en todas las categorías ovinas. En los tres establecimientos, los niveles promedios de parasitismo, nunca sobrepasaron los límites de una infestación ligera. El control de H. contortus fue excelente, lo que permitió mantener una frecuencia de cuatro dosis combinadas por año, para controlar.

T. colubriformis, es el nemátodo con mayor prevalencia de RA en Uruguay. Estos resultados son especialmente relevantes en uno de los establecimientos, el cual contaba con antecedentes de diez dosificaciones año y un solo grupo antihelmíntico de amplio espectro eficaz. Se discute la aplicación del "Matalombriz" en forma conjunta con la utilización de pasturas seguras, sus problemas operativos y los peligros derivados de la variable humana (aptitud/actitud).

Dentro de este escenario epidemiológico, el impacto potencial de las parasitosis en categorías ovinas susceptibles, es de 50% de mortalidad, 23.6% en el peso vivo y 29.4 % sobre el peso del vellón sucio (5). Si la majada es mantenida en pastoreo continuo, no existe crecimiento compensatorio (peso vivo/tamaño corporal) durante toda la vida del animal, aunque el peso del vellón sucio, se recompone lentamente hacia el final del ciclo productivo (7).

Basados en los datos anteriormente mencionados y en otras referencias internacionales, técnicos del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) evaluaron recientemente las pérdidas potenciales anuales por parásitos gastrointestinales en todo el stock ovino del Uruguay. Dichas pérdidas han sido estimadas en 18.335.130 kilos de lana base sucia (23).

El productor evita llegar a este piso productivo a través de la utilización de antihelmínticos, los cuales han demostrado ser herramientas relativamente económicas, de gran flexibilidad en su aplicación y de resultados rápidamente apreciables. Lamentablemente, su utilización indiscriminada, ha provocado, en el ámbito regional y mundial, la aparición de RA a los tres núcleos químicos de amplio espectro, disponibles actualmente. (4) (24) (26).

En Uruguay, un Proyecto realizado en el ámbito regional (TCP/FAO/RLA 2364) ha demostrado que el 92.5% de los establecimientos agropecuarios uruguayos,

tienen poblaciones de nemátodos con algún grado de RA (20).

Resulta claro, entonces, que la RA involucra en Uruguay especies altamente patógenas y prevalentes, capaces de producir importantes pérdidas productivas y económicas. Esto inhabilita al productor a utilizar parcial o totalmente su herramienta más práctica y eficaz.

Frente a esta situación, países altamente tecnificados en producción ovina como Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, han investigado estrategias para lograr un control eficiente de nemátodos con una mínima frecuencia en la administración de drogas (3).

Australia ha desarrollado diferentes programas de control, adaptados a la realidad epidemiológica de sus distintas regiones climáticas. El más conocido de estos programas es el denominado "Wormkill", ejecutado por el CSIRO, División de Salud Animal y el Departamento de Agricultura y Protección de Pasturas en Nueva Gales del Sur (9) (24).

En dicha región, se establecieron cuatro momentos (agosto, noviembre, febrero y abril) para dosificar la majada. En agosto y noviembre se aplicaron dosificaciones combinadas de antihelmínticos de amplio espectro más closantel (CLT) a toda la majada; en febrero se aplicó la combinación a los corderos y solo CLT a los adultos; en abril, CLT a los corderos.

Dicho concepto de control, cuenta con antecedentes de utilización en el ámbito experimental en Uruguay (Berdie, J; comunicación personal, 1990).

Existe la posibilidad de utilizar la información parasitológica nacional generada en los últimos años, para diseñar un programa destinado al control de las poblaciones parasitarias, capaz de ser adaptado a las condiciones de manejo locales.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es implementar un Programa de Control de nemátodos gastrointestinales del ovi-

no, tendiente a disminuir la presión de selección antihelmíntica a favor de las drogas de amplio espectro. Los objetivos específicos son:

- Planificar en los establecimientos involucrados, una estrategia de control (Plan Piloto) basada en un diagnóstico de situación de la eficacia antihelmíntica, la epidemiología parasitológica local, una baja frecuencia de administración de drogas y medidas puntuales de manejo ("Matalombriz").
- Ejecutar la estrategia de control en establecimientos cooperadores previamente capacitados, abarcando dos estaciones climáticas de máximo desarrollo de las especies prevalentes de nemátodos.
- Evaluar a través de técnicas parasitológicas, la evolución de la eficacia antihelmíntica y la estrategia de control aplicada en el Plan Piloto.

3. MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron tres establecimientos (Lat. 32° Sur / Long. 56° Oeste) de la 9ª sección policial del departamento de Tacuarembó (Plan Piloto), los cuales debieron cumplir con los siguientes requisitos:

- * manejar un mínimo de 2.000 ovinos (todas las categorías).
- * ciclo completo, en pastoreo continuo/mixto con bovinos.
- * manejar los ovinos preferentemente en pasturas nativas.
- * encontrarse dentro de un radio no mayor a los 50 km, a efectos de facilitar los muestreos y permitir el intercambio de información (reuniones de avance) entre productores.

En el cuadro 1 se resumen las principales características de los establecimientos cooperadores que integraron el "Plan Piloto".

CUADRO 1. Descripción general de los establecimientos integrantes del Programa "Matalombriz"

Establecimiento:	San Luis	El Ombú	El Galpón
Propietario	Sr. Germán Staehle	Dr. Manuel Gago	Dr. Mario Gago
Paraje	"Cerro del Ombú"	"Las Veras"	"La Hilera"
Superficie (ha)	1.300	2.168	1.395
Suelo predominante	Luvisoles/Brunosoles	Brunosoles/litosoles	Brunosoles/vertisoles
I.productividad	84-103	91	98
Total de ovinos	3.081	4.863	2.833
Ovinos/ha	2.4	2.2	2
Total bovinos	667	890	851
Relación O/B	4.6	5.4	3.3
Encarnerada	Mzo/Abr 45d	Mzo 20d	Mzo/Abr 50d
Parición	Ago/Set	Ago	Ago/Set
Destete	Ene	Ene	Ene
Antecedentes de utilización de antihelmínticos	Grupos BZ/LVM. Previo al proyecto (1994) se administraron entre enero y junio 9 dosificaciones (5 BZ + 4 CLT)	Grupo BZ. Previo al proyecto (1994) se comienza a utilizar grupo AVM por sospecha de falta de eficacia del grupo BZ (sin constatación). Entre enero y mayo se administraron 2 dosificaciones de AVM y una de BZ.	

Cada establecimiento se constituyó en una "Unidad de Control de Parásitos", con la aplicación de una estrategia común ("Matalombriz") pero respetando los antecedentes parasitológicos, las posibilidades de manejo y la aptitud-actitud de cada uno de los propietarios.

Todas las categorías ovinas de cada establecimiento fueron integradas al Programa, el cual contó con un total de 10.777 ovinos. De acuerdo a la información epidemiológica nacional, que describe el perfil de presentación de las especies de nemátodos, se instauraron cuatro dosificaciones anuales que combinaban antihelmínticos de amplio/mediano espectro, manteniendo el uso de closantel (CLT) contra *H. contortus*.

La estrategia comenzó a ser ejecutada al final de la época invernal, momento en que las poblaciones de *H. contortus* (animal/refugio) se encuentran naturalmente deprimidas.

El intervalo entre dosificaciones combinadas, fue definido en 90 días, buscando minimizar las poblaciones en refugio de *H. contortus* y disminuir la frecuencia relativa de dosificaciones contra *T. colubriformis*.

Cuando fue posible, los establecimientos SAN LUIS y EL GALPON utilizaron pasturas seguras para el destete de los corderos.

3.1. Implementación de la estrategia

Algunas reglas básicas debieron ser respetadas en cada establecimiento del "Plan Piloto":

* Antes de comenzar el programa, los corderos de un año de edad, fueron sometidos a un "Lombritest" (nombre con el

que se conoce en Uruguay la técnica de Reducción de Contaje de Huevos). Esto se hizo para determinar qué grupo antihelmíntico de amplio espectro mantenía una eficacia mayor a 95%. Dentro del (los) grupos eficaces, el propietario seleccionó la droga a utilizar, la cual debía ser combinada con CLT.

* Los antihelmínticos de amplio/mediano espectro fueron aplicados oralmente, a las dosis registradas para cada producto comercial:

Grupo Levamisole (LVM)		7.5 mg/kg
Grupo Bencimidazole (BZ)	febendazole (FBZ)	5 mg/kg
	albendazole (ABZ)	3.8 mg/kg
Grupo Avermectina (AVM)	ivermectina (IVM)	200 mcg/kg
Grupo Organo-fosforado (OF)	naftalofos (NTF)	50 mg/kg

El CLT fue administrado en formulación oral a la dosis de 10 mg/kg, a efectos de asegurar una persistencia mayor a 60 días contra *H. contortus*. (8) (10). La persistencia de la droga, sumada al período prepatente del parásito, fue utilizada para disminuir las tasas de contaminación/infección entre dosificaciones.

* Dichas dosificaciones se efectuaron en un plazo máximo de 7 días en toda la dotación ovina del establecimiento, a efectos de evitar la contaminación de animales/categorías no dosificados.

* No ingresó ningún ovino al establecimiento sin haber sido previamente dosificado con un antihelmíntico de amplio espectro eficaz.

* Todas las dosificaciones fueron de acuerdo al animal más pesado de la categoría.

* Se rotaron, con base anual, los grupos de antihelmínticos de amplio/mediano espectro que mantuvieron una buena eficacia.

3.2. Toma de muestras y análisis de Laboratorio

En dos de los establecimientos del "Plan Piloto" se realizaron muestreos coprológicos individuales, en tres categorías ovinas (corderos, borregos y ovejas de cría). En el establecimiento SAN LUIS se le sumó la categoría capones.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas individualmente para determinar el número de huevos por gramo en las materias fecales (hpg) a través de la técnica de Mac Master. El total de muestras procesadas fue:

$$3 \text{ (establecimientos)} \times 25 \text{ (animales categoría)} \times 3 \text{ (categorías)} \times 26 \text{ (visitas/mes)} = 5.850$$

A esto deben agregarse los muestreos de capones del establecimiento SAN LUIS lo que suma un total de 6.500 muestras procesadas en el seguimiento del programa "Matalombriz".

A efectos de determinar en el tiempo las especies de nemátodos actuantes, se realizó un "pool" de materias fecales por categoría ovina, el cual fue procesado por cultivo de larvas por la técnica de Corticelli y Lai (7). El total de muestras procesadas fue:

$$3 \text{ (establecimientos)} \times 3 \text{ (categorías)} \times 26 \text{ (visitas mensuales)} = 234$$

Incluidas las muestras de capones, suma un total de 260 cultivos de larvas para todo el seguimiento.

El diagnóstico de eficacia antihelmíntica en las poblaciones parasitarias de cada establecimiento, se realizó a través de la técnica de Reducción de Contaje de Huevos ("Lombritest") (1). Se procesaron 10 muestras coprológicas individuales para el grupo control, así como para los tratados con los grupos químicos de amplio espectro, BZ, LVM y AVM. El total fue:

$$10 \text{ (animales por grupo)} \times 4 \text{ (grupos)} \times 3 \text{ (establecimientos)} = 120$$

Durante el siguiente año del "Plan Piloto", se repitió el "Lombritest" en el establecimiento SAN LUIS en el que se incluyó un grupo de ovinos tratados con NTF.

3.3. Procesamiento de datos

Los datos del "Lombritest" fueron procesados por el programa estadístico RESO, a través del cual se compara la reducción media de los contajes de huevos (efecto global y/o de la especie de nematode) de los grupos de animales tratados con el testigo (1).

Para lograr el objetivo del proyecto todos los ovinos debieron integrarse a la misma estrategia, por lo cual no fue posible utilizar grupos testigos. Los criterios utilizados para los distintos niveles de infestación por categoría, fueron los descriptos por Hansen y Perry (13).

3.4. Reuniones técnicas con productores

Previo al inicio del Plan Piloto, se realizó una reunión técnica con los propietarios y el personal técnico del INIA, para discutir en forma conjunta los alcances del programa y el nivel de dificultad para la realización de los muestreos en cada establecimiento. Fueron realizadas dos reuniones de avance y una de presentación de los resultados finales.

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico de situación

El cuadro 2 muestra los resultados del "Lombritest" expresados en porcentajes de control (% C) obtenidos para cada establecimiento del Plan Piloto, previo a la iniciación del programa.

Cuadro 2. Porcentaje de Control (todas las especies) para drogas de Amplio Espectro.

Establecimiento	Grupo Antihelmíntico (% C)		
	Bencimidazole	Levamisole	Avermectina
SAN LUIS	66	73	100
"EL OMBU"	73	99	100
EL GALPON	0	100	100

Para los tres establecimientos los grupos de corderos controles del "Lombritest" detectaron la presencia de los géneros *Trichostrongylus sp* (rango=26-89%) y *Haemonchus sp* (rango=1-38%), además de la presencia esporádica de *Ostetagia sp*; *Cooperia spp* y *Oesophagostomum spp*. La disminución de la eficacia del grupo antihelmíntico BZ, se presentó fundamentalmente en *Trichostrongylus sp* (SAN LUIS 31%; EL OMBÚ 87% y EL GALPÓN 0%) y en mucho menor grado para *Haemonchus spp* (90%, 100% y 100% respectivamente). Sobre la base de este diagnóstico inicial, el establecimiento SAN LUIS comienza a utilizar por un año, la combinación AVM+CLT y los establecimientos EL OMBÚ y EL GALPÓN la combinación LVM+CLT.

Durante el segundo año, el perfil de eficacia de las drogas de amplio espectro en el "Lombritest" se mantuvo en porcentajes similares de control; en el establecimiento SAN LUIS se detectó un 96% de control para la droga NTF.

4.2. Evolución del parasitismo

La figura 1 muestra la evolución general del parasitismo (todas las especies) en las cuatro categorías ovinas estudiadas en el establecimiento SAN LUIS (corderos, borregos, capones y ovejas de cría). Dicha figura marca, en el primer año, la utilización del grupo de amplio espectro (AVM) y en el segundo año, su rotación con la droga de mediano espectro (NTF). Incluye, asimismo, una dosificación con BZ (setiembre 1994) administrada antes de disponer los datos del "Lombritest"

Los datos obtenidos en cada categoría ovina, muestran que durante los 27 meses de seguimiento, raramente se registraron más de 300 hpg (infección ligera). No obstante, se registraron promedios máximos de 740 hpg en la categoría corderos (cuadro 3) (noviembre 1994); 712 hpg en la categoría borregos (julio 1996); 1180

hpg en capones (marzo 1996) y 927 hpg en ovejas de cría (marzo 1996). Durante el periodo experimental, el único registro promedio que sobrepasó los límites de una infestación ligera (300-800 hpg) fue el correspondiente a la categoría capones.

La figura 2 muestra para la categoría más susceptible del establecimiento SAN LUIS, la evolución del parasitismo en relación a las dos especies de nemátodos más prevalentes. Durante el período setiembre 1994 setiembre 1996 la postura correspondiente a *Haemonchus sp* nunca sobrepasó los 200 hpg (marzo de 1996) Durante el mismo período, *Trichostrongylus sp* mantuvo contajes relativos por debajo de 200 hpg (infestación ligera) con un pico en julio de 1996 de 600 hpg.

La figura 3 muestra la evolución general del parasitismo (todas las especies) en las tres categorías ovinas estudiadas del establecimiento "EL OMBÚ" (corderos, borregos y ovejas de cría). Dicha figura, marca la rotación entre los dos grupos antihelmínticos de amplio espectro eficaces (LVM + AVM) determinados por el "Lombritest". Los resultados obtenidos en cada categoría ovina muestran que durante los 26 meses de seguimiento, los valores promedio de hpg se mantuvieron dentro de los límites de una infección ligera y solo ocasionalmente superaron los 300 hpg.

El cuadro 4 muestra los valores máximos promedios en la eliminación de huevos de nemátodos, que presentaron la categoría corderos (576 hpg / enero 1995) la categoría borregos (523 hpg/enero1996) y las ovejas de cría (180 hpg).

Cuadro 3. Composición de valores promedio máximos de hpg en todas las categorías ovinas del establecimiento SAN LUIS. Período setiembre 1994-noviembre 96.

Categoría ovina	Fecha de muestreo	Valor Medio	Rango de valores individuales	% de valores mayores a la media	Principal nemátodo
Corderos	11/94	790	<100-2700	32	Trich.
Borregos	07/96	712	<100-2400	28	Trich.
Capones	03/96	1180	<100-2800	32	Haem.
O.Cría	03/96	927	<100-4100	36	Haem.

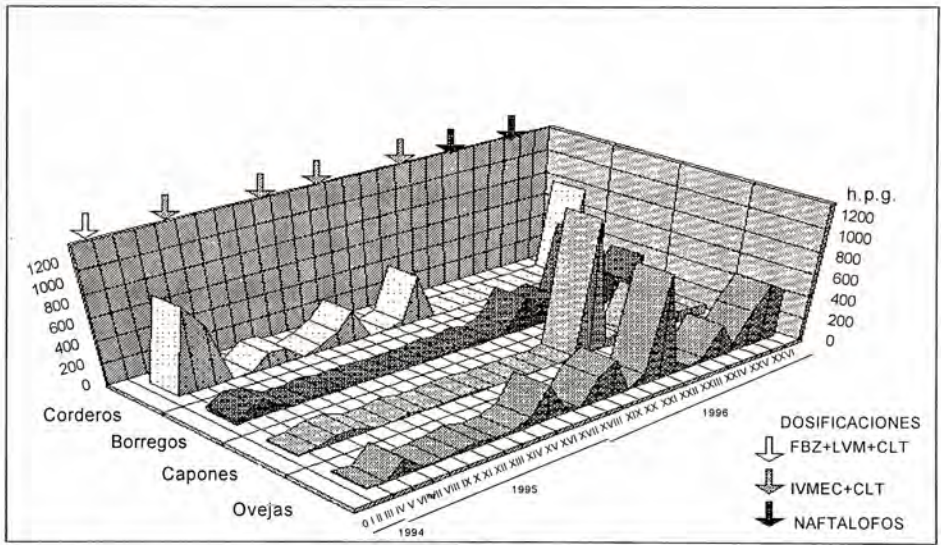


Figura 1. Evolución del parasitismo en distintas categorías del establecimiento "San Luis" (período octubre 1994-noviembre 1996).

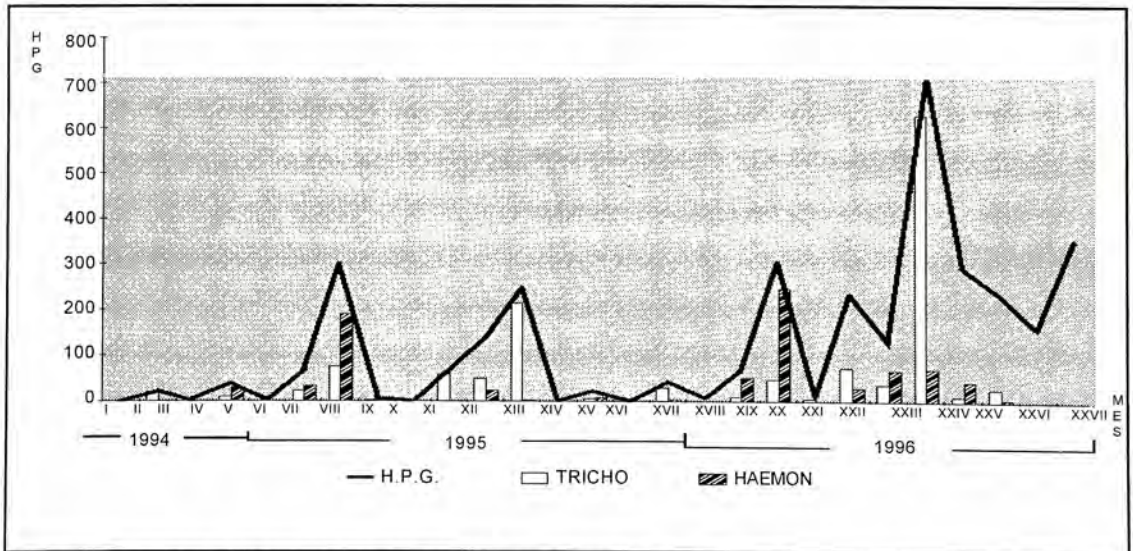


Figura 2. Evaluación del parasitismo por especie de nematodos en categoría borregos. Establecimiento "San Luis" (período setiembre 1994-noviembre 1996).

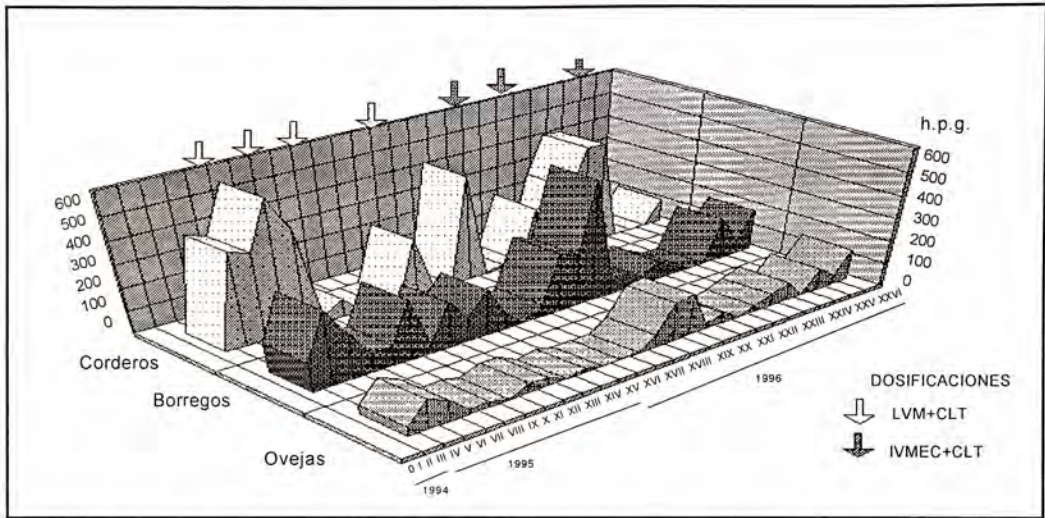


Figura 3. Evolución del parasitismo en distintas categorías del establecimiento "El Ombú" (período octubre 1994-noviembre 1996).

La figura 4 muestra para la categoría más susceptible del establecimiento EL OMBÚ, la evolución del parasitismo en relación a las dos especies de nemátodos más prevalentes. Durante el período setiembre 1994 setiembre 1996 la postura correspondiente a *Haemonchus sp* nunca sobrepasó los 300 hpg, excepto por un pico en julio de 1996. Durante el mismo período, *Trichostrongylus spp* mantuvo contajes relativos por debajo de 200 hpg con un único pico en enero de 1996 de 480 hpg.

La figura 5 muestra la evolución general del parasitismo (todas las especies) en las tres categorías ovinas muestreadas del establecimiento EL GALPÓN (corderos, borregos y ovejas de cría). Dicha figura, marca la rotación entre los dos grupos antihelmínticos eficaces (LVM + AVM) determinados por el "Lombritest". Los resultados obtenidos en cada catego-

ría ovina, muestran que durante los 26 meses de seguimiento, los valores promedio de hpg se mantuvieron dentro de los límites de una infección ligera y solo en dos oportunidades superaron los 200 hpg.

El cuadro 5 muestra los valores máximos promedios en los contajes, que desarrolló la categoría corderos (592 hpg/abril 1995) la categoría borregos (284 hpg/mayo1996) y el correspondiente a ovejas de cría (172 hpg).

La figura 6 muestra para la categoría más susceptible del establecimiento EL GALPÓN, la evolución del parasitismo en relación a las dos especies de nemátodos más prevalentes. Durante el período setiembre 1994 setiembre 1996 la postura promedio correspondiente a *Haemonchus spp* nunca sobrepasó los 30 hpg (marzo de 1996). Durante el mismo período, *Trichostrongylus spp* mantuvo contajes relativos por debajo de 100 hpg.

Cuadro 4. Composición de valores promedios máximos de hpg en todas las categorías ovinas del establecimiento EL OMBÚ. Período setiembre 1994- noviembre 96.

Categoría principal ovina y nemátodo	Fecha de muestra	Valor medio	Rango de valores individuales	% de valores superiores a la media
Corderos <i>Haemonchus sp</i>	01/95	576	< 100 -1600	24%
Borregos <i>Trichostrongylus sp</i>	01/96	523	< 100 - 2600	24%
Oveja de cría <i>Trichostrongylus sp</i>	01/96	180	< 100 1700	24%

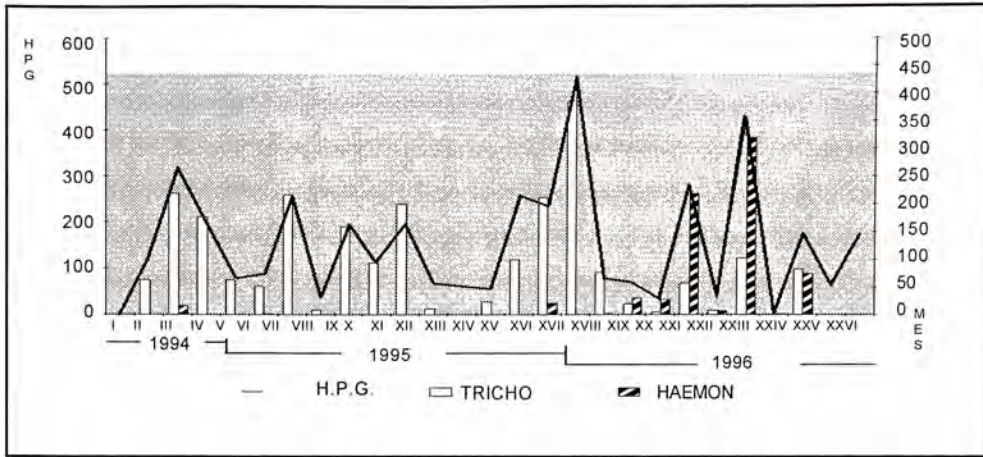


Figura 4. Evaluación del parasitismo por especie de nematodos en categoría borregos. Establecimiento "El Ombú" (período setiembre 1994-noviembre 1996).

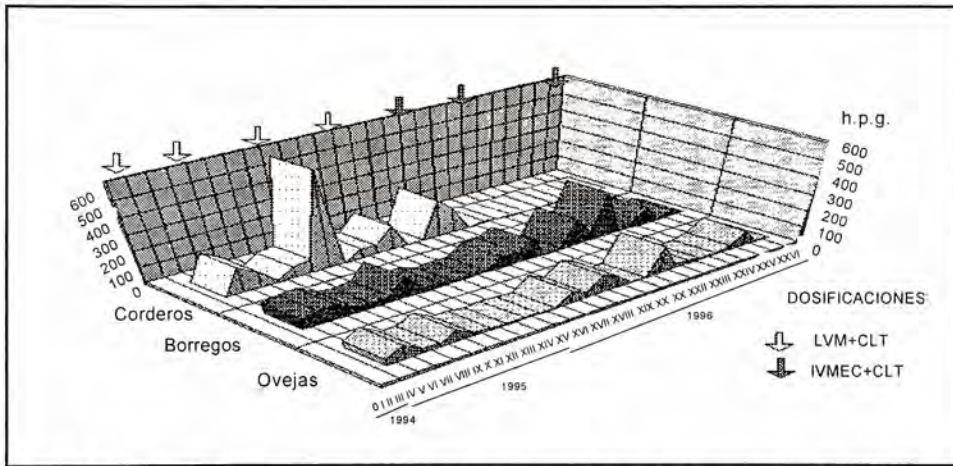


Figura 5. Evolución del parasitismo en distintas categorías del establecimiento "El Galpón" (período octubre 1994-noviembre 1996).

Cuadro 5. Composición de valores promedios máximos de hpg en todas las categorías ovinas del establecimiento EL GALPON. Período setiembre 1994- noviembre 96.

Categoría principal ovina y nemátodo	Fecha de muestra	Valor medio	Rango de valores individuales	% de valores superiores a la media
Corderos <i>Haemonchus sp</i>	04/95	592	< 100 - 2400	24%
Borregos <i>Haemonchus sp</i>	05/96	284	< 100 - 2600	20%
Oveja de cría <i>Haemonchus sp</i>	03/96	172	< 100 - 800	32%

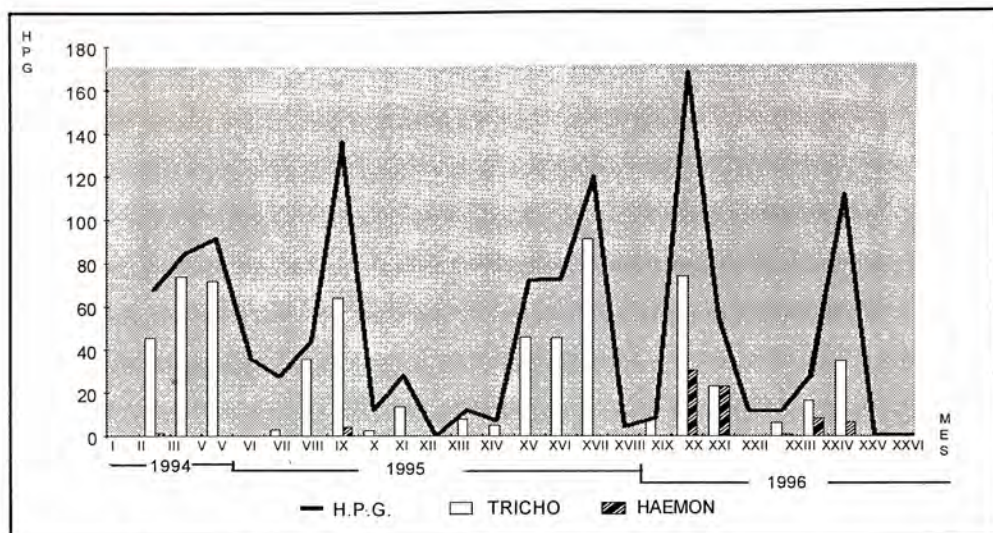


Figura 6. Evaluación del parasitismo por especie de nematodos en categoría borregos. Establecimiento "El Galpón" (período setiembre 1994-noviembre 1996).

5. DISCUSION

El desarrollo de RA y su alta prevalencia en la mayoría de los países ovejeros del mundo, exige un importante cambio de mentalidad del productor agropecuario y su asesor profesional, en cuanto al enfoque sobre cuáles deben ser las medidas de control aplicadas a nivel de establecimiento agropecuario.

La RA no permite la universalización de la eficacia en grupos químicos de antihelmínticos que, hace veinte años, eran efectivos en todo el territorio nacional y que ahora pueden serlo en un establecimiento y fallar en el lindero.

Una prueba de ello, son los resultados obtenidos a través del Proyecto Regional TCP / FAO 2364, el cual demuestra no sólo una gran dispersión territorial del problema de RA, sino también una acción diferencial de los distintos grupos químicos. Dicho estudio estableció que el 86% de las majadas presentaban poblaciones de nemátodos con algún grado de RA al grupo BZ, el 71% con RA al grupo LVM y el 1,2% con RA al grupo AVM. La prevalencia fue similar en el norte argentino y aún más crítica en el sur de Brasil y Paraguay (12) (10) (15).

Las poblaciones de parásitos involucradas en la RA corresponden a los

de máxima incidencia (*H. contortus*, *T. colubriformis*, *O. circumcincta*). En sistemas reales de producción, estos géneros/especies de nemátodos son controlados globalmente con drogas de amplio espectro. Sin embargo, existen diferencias biológicas entre las especies parásitas, que influyen en la actitud del productor cuando decide realizar dosificaciones con antihelmínticos de amplio espectro.

Un ejemplo claro es *H. contortus*, nemátodo capaz de provocar una sintomatología clínica fácilmente apreciable por el productor (anemia, muertes, visualización directa en abomasum) y que además tiene gran capacidad de postura (5000-15000 huevos/hembra/día). Esto le permite, frente a condiciones climáticas favorables, aumentar rápida y peligrosamente sus poblaciones en refugio sobre las pasturas. En otras palabras, es casi el único nemátodo que "ataca y mata cualquier categoría ovina" y al cual el productor teme y refiere, cuando busca el hallazgo de "lombrices", ya sea en un animal de consumo o en uno muerto con sintomatología clínica.

El potencial biótico diferencial de *H. contortus* frente a *T. colubriformis* y *O. circumcincta* (100-200 huevos/hembra/día) ha hecho que el productor tienda a abandonar estrategias basadas en una

baja frecuencia de dosificaciones con drogas de amplio espectro, por tratamientos casi mensuales. Dicho manejo, ha provocado una selección genética innecesaria, no sólo sobre *H. contortus*, sino sobre otras especies de nemátodos que parasitan simultáneamente al ovino y que poseen mucho menor capacidad para contaminar el refugio e infectar la majada.

Frente a esta situación epidemiológica, el nemátodo de más difícil control es *T. colubriformis* ya que una vez establecida la RA a los grupos químicos de amplio espectro, las drogas de espectro reducido son incapaces de controlarlo. Dicha situación ha ocurrido por lo menos en Australia y en Uruguay, donde *T. colubriformis* es el nemátodo con mayor prevalencia de RA en los grupos BZ y LVM. (25) (20).

De acuerdo a la epidemiología parasitaria de cada zona, una de las posibles opciones de control debería estar dirigida a preservar la susceptibilidad de *T. colubriformis* a los antihelmínticos de amplio espectro, a través de una drástica disminución de su frecuencia de aplicación. Asimismo, debería proporcionar el máximo control para *H. contortus* (drogas de acción específica y manejo) ya que debido a su alta patogenicidad y potencial biótico, es el nemátodo que más preocupa al productor y es el eje a través del cual establece la frecuencia de dosificaciones anuales. Esta ha sido, precisamente, la base conceptual de la aplicación del Programa "Matalombriz" ejecutado en el "Plan Piloto".

El éxito de la aplicación de una estrategia de control, depende de su desempeño en sistemas reales de producción, evitando que las poblaciones parásitas aumenten desmesuradamente en todas las categorías ovinas (9).

En este caso, la evolución general del parasitismo (todas las especies) en los tres establecimientos del Plan Piloto nunca sobrepasó los límites de una infección ligera. Raramente se superaron valores de 300 hpg en el establecimiento SAN LUIS y EL OMBÚ y 200 hpg en el establecimiento EL GALPÓN (figuras 1, 3 y 5).

Del análisis de los picos de eliminación de huevos registrados durante los 26 meses de seguimiento (Cuadros 3, 4 y 5) surge que los máximos promedios registrados en los tres establecimientos, estuvieron compuestos por un escaso número de contajes individuales (rango 20-36%) considerados como medianos o altos. Este es un fenómeno común a nivel de campo, cuando se trata un gran número de animales y en donde en forma independiente a la buena eficacia de la droga, existen individuos que mantienen y aportan la mayor contaminación a la pastura (18). A pesar de los cuidados tomados en los tres establecimientos, existen momentos (ejecución de otras tareas, cambio de personal, falta de un control efectivo del propietario) en donde el factor humano (actitud/aptitud) se transforma en una importante variable en el resultado de cualquier estrategia de control. La utilización de medias aritméticas y no geométricas en la expresión de los resultados, permitió al Plan Piloto visualizar con mayor claridad los picos de infección de la majada y discutir con los propietarios las posibles causas del aumento puntual de la eliminación de huevos.

Cuando se considera el aporte del programa en el control de las dos especies parasitarias más prevalentes, se observa que en los tres establecimientos, el efecto logrado sobre *H. contortus* fue excelente (figuras 2, 4 y 6). Por momentos, esta especie casi desapareció de los cultivos de larvas, fenómeno coincidente con lo ocurrido en establecimientos de Nueva Gales del Sur, Australia, donde luego de varios años de aplicación del programa, prácticamente ha desaparecido (Waller, P., comunicación personal 1996). En este sentido, cabe recordar que el clima de esa región australiana es bastante más seco (400-800 mm de precipitación anual) hecho que fue tenido en cuenta al planificar la estrategia para Uruguay (2).

A pesar de la gran eficacia y buena persistencia de CLT contra *H. contortus*, es necesario considerar que su inclusión no está exenta de riesgos.

Uno de ellos es su persistencia en tejidos animales, por lo que es necesario mantener el periodo de espera establecido (28 días) en la extracción de animales destinados a faena y/o consumo del establecimiento. Un programa planificable como el "Matalombriz", permite escalar la dosificación del consumo.

Otro riesgo a considerar es el desarrollo de RA ya que su lenta eliminación desde las proteínas plasmáticas, puede ser un factor predisponente al desarrollo de RA, principalmente en la última etapa de eliminación de la droga (9). El fenómeno ha sido descrito en Uruguay y en la mayoría de países con importante producción ovina (Nari, A; Lorenzelli, E; Macchi, I; datos no publicados, 1994). No obstante esto, en Australia, país donde se han aplicado programas con la utilización de CLT por más de 12 años (solo en Nueva Gales del Sur con 10 millones de ovinos), se ha observado que la prevalencia de RA a CLT no ha sido relevante a pesar del desafío impuesto a la droga (Waller, P; comunicación personal, 1995). Nuevamente, un programa planificable como el "Matalombriz", tiene algunas ventajas sobre la actual utilización indiscriminada de la droga, en donde no se presta atención a la relación nivel de dosis vs. periodo interdosificación.

El control de *H. contortus*, ha permitido organizar con menos urgencias el control de *Trichostrongilus spp* con un máximo de cuatro dosificaciones anuales con antihelmínticos de amplio espectro (EL GALPÓN, utilizó tres en el segundo año). Se ha logrado en consecuencia, reducir la presión de selección de los grupos de amplio espectro, ya que el CLT no tiene eficacia sobre este género de nemátodo.

Un análisis global de los resultados obtenidos, permite determinar que en los tres establecimientos se logró abatir las parasitosis internas en todas las categorías ovinas. Esto ha sido especialmente importante en el establecimiento SAN LUIS, el cual contaba con un solo grupo químico de amplio espectro efectivo y antecedentes de diez dosificaciones anuales. Por esta razón, se utilizó en rotación anual la droga NTF, un antihel-

míntico de mediano espectro del grupo químico organo-fosforado, que a la dosis de 50 mg/kg, cuenta con buena eficacia contra el género *Trichostrongilus spp* (14).

El proceso dinámico de diagnóstico-evaluación-adequación (estratificación epidemiológica) debe ser mantenido, por lo menos conceptualmente, a nivel de establecimiento, a efectos de realizar adecuaciones que no perjudiquen globalmente al programa. Se debe tender a reducir las dosificaciones de CLT e incluso las de mediano/amplio espectro, luego que el programa se establezca y lo considere la evaluación profesional. Esto se ha hecho en Nueva Gales del Sur, Australia, donde se ha intentado reducir las aplicaciones de ambos tipos de drogas.

La utilización de "Pasturas Seguras" para el destete de los corderos, ha demostrado ser otra medida eficaz para extender en el tiempo las dosificaciones con antihelmínticos de amplio espectro, y disminuir la presión química en categorías altamente susceptibles (6) (16) (17) (22). Debería ser, por tanto, el complemento idóneo para utilizarlo en programas como el "Matalombriz".

A pesar de la comprensión de su importancia por parte de los propietarios de los tres establecimientos del "Plan Piloto", esta medida de manejo, sólo pudo ser utilizada en forma parcial en los establecimientos SAN LUIS y EL GALPÓN. Los inconvenientes prácticos encontrados para su aplicación fueron la no-disponibilidad de potreros de acuerdo a otras prioridades del establecimiento, problemas de alambrados y de calidad de pasturas, que puedan soportar durante tres meses una categoría con alta selectividad en el consumo de forraje.

Aunque no se logró una utilización adecuada de las "Pasturas Seguras" para los corderos, existe un hecho que demuestra la baja infestación de las pasturas, a nivel de establecimiento. De acuerdo al protocolo de trabajo propuesto, se debía realizar un segundo "Lombritest" antes de decidir la rotación anual de grupos químicos. Luego que los corderos experimentales fueron individualizados y

mantenidos sin dosificar, existieron problemas para lograr que incrementaran el grado de parasitismo. En los establecimientos EL OMBÚ y EL GALPÓN la prueba debió ser postergada, debido a la muy baja carga parasitaria.

6. CONCLUSIONES

Es posible implementar y ejecutar en nuestro país programas de control de nemátodos gastrointestinales tendientes a disminuir la frecuencia de tratamientos con antihelmínticos de amplio espectro, preservándolos, al menos, para las dos especies de nemátodos más prevalentes.

A pesar de las ventajas del programa (práctico, programable en el tiempo, flexible frente a distintas estructuras de majada y relaciones ovino/bovino) no debe ser considerado como la "última palabra" en el control de las parasitosis gastrointestinales.

El productor puede verse tentado a utilizarlo bajo cualquier circunstancia, ya que el esquema de trabajo se parece mucho a una "receta" (cuatro dosis combinadas por majada por año, pasturas seguras, etc.) fácilmente programable en un "almanaque" de estancia. Como se ha visto, no es tan sencillo lograr que el productor y especialmente el personal involucrado, participen conceptualmente del "cómo", "cuándo" y sobre todo el "porqué" de las acciones, existiendo el peligro que frente a la desaparición del problema parasitario, se hagan modificaciones capaces de hacer fracasar el programa en el largo plazo.

Este es un camino común con otras acciones sanitarias organizadas a nivel masivo (por ejemplo campañas sanitarias) para lo cual es necesario contar primero con un profesional capacitado, que realice un buen diagnóstico de situación a nivel de establecimiento; además, se necesita implantar medidas de control específicas (no necesariamente el "Matalombriz"), monitorearlas en el tiempo y hacer las adecuaciones necesarias.

Esto es especialmente válido en países en vías de desarrollo como Uruguay,

donde es cada vez más importante que se priorice el conocimiento adecuado sobre el recurso abundante.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANON (1989). Anthelmintic resistance. Report of the Working Party for the Animal Health Committee of the Standing Committee on Agriculture, SCA. Technical Report Series N° 28. Canberra, Australia.
2. ANON (1992). Australia's climate and weather. In: National Farmer Federation (ed). "Australian Agriculture. The complete reference on rural industry". pp.62-76, Victoria, Australia.
3. ANON (1995). Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. In: "Program and Abstracts International Conference Organized by the University of New England" Armidale, Australia. p.61.
4. BORGSTEEDE, FHM. (1993). Anthelmintic resistance in nemátodos of sheep and goats. In: Coles, GC. (ed). "Anthelmintic resistance in nemátodos of farm animals" pp1-16. European Commission for Agriculture. Brussels, Belgium.
5. CASTELLS, D. *et al.* (1993). Incidencia de los nemátodos gastrointestinales en la producción de lana y carne. En: "Jornadas de Sanidad Ovina, SUL". Editorial Hemisferio Sur, p.43.
6. CASTELLS, D. Y NARI, A. (1996). Sanidad Animal en la producción de carne ecológica. **Ovinos**. Seminario sobre Producción de Carne Ecológica. 24-25 octubre de 1996, Montevideo, Uruguay.
7. CASTELLS, D. y NARI, A. (1996). Efecto de los nemátodos gastrointestinales sobre diversos parámetros productivos en ovinos de recría y su impacto sobre el desempeño posterior. Primer Congreso Uruguayo de Producción Animal. 2-4 de octubre de 1996. Montevideo, Uruguay.
8. CORTICELLI, B. and LAI, M. (1963). Ricerche sulla tecnica di cultura delle larve infestive degli strongili gastrointestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria* 9 (5-6).
9. DASH, KM., NEWMAN, R. and HALL, E. (1985). Recommendations to minimise selection for anthelmintic resistance in nematode control programmes. In: Anderson, N. and Waller,

- P. (ed) "Resistance in nemátodos to anthelmintic drugs" pp. 161-169. CSIRO, Division of Animal Health / Australian Wool Corporation, NSW, Australia.
10. ECHEVARRIA, F. *et al.* (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*. **62** (3-4): 199-206.
 11. EDDI, C. (1985). Efecto residual terapéutico del closantel en ovinos infectados con *Haemonchus contortus*. X Congreso Panamericano de Veterinaria y Zootecnia. Buenos Aires, República Argentina. 23 al 27 de setiembre.
 12. EDDI, C. *et al.* (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Veterinary Parasitology*. **62** (3-4): 189-197.
 13. HANSEN, J. and PERRY, B. (1994). The epidemiology diagnosis and control of helminth parasites of ruminants (Handbook) FAO / ILRAD. Nairobi, Kenya. p171.
 14. LORENZELLI, E. *et al.* (1996). Prueba controlada de eficacia de naftalofos en establecimientos con antecedentes de resistencia antihelmíntica. *Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria Argentina*. **77** (3): 173-180.
 15. MACIEL, S. *et al.* (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Veterinary Parasitology*. **62** (3-4): 207-212.
 16. NARI, A.; *et al.* Manejo parasitario del cordero de destete en campo natural. II. Pastoreo alterno con bovinos en un área de basamento cristalino. *Veterinaria*. **23** (97): 15-22. 1987
 17. NARI, A.; *et al.* (1987). Manejo parasitario del cordero de destete en campo natural. III Pastoreo rotativo alterno con bovinos en un área de basalto superficial. *Veterinaria*. **23** (97): 23-30.
 18. NARI, A. Y CARDOZO, H. (1987). Enfermedades causadas por parasitos internos. En: Bonino, J., Duran del Campo, A. y Mari, J. (eds). *Enfermedades de los Lanares*. pp: 1-57. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo.
 19. NARI, A. y SALLES, J. (1995). La utilización adecuada de antihelmínticos en ovinos. Responsabilidad del Medico Veterinario. *Veterinario*. **31**. 128:20-24.
 20. NARI, A. *et al.* (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Veterinary Parasitology*. **62** (3-4): 213-222.
 21. NARI, A. Parasitosis provocadas por nemátodos gastrointestinales en ovinos del Uruguay. VI Congreso Nacional de Veterinaria. 13-15 de noviembre de 1996. Montevideo. Uruguay.
 22. QUINTANA, S. *et al.* (1987). Manejo parasitario del cordero de destete en campo natural I. Pastoreo alterno con bovinos en un área de basalto superficial. *Veterinaria* **23** (97): 6-14.
 23. SUL (1996). Pérdidas por parásitos internos. Grupo Veterinarios. p5.
 24. WALLER, P.J. (1994). The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. *Acta Tropica*. **56**: 233-243.
 25. WALLER, P.J. (1995). Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *The Veterinary Record*. **136**: 411-413.
 26. WALLER, P. J. *et al.* (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nemátodos parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*. **62**:181-187.

Sienra R. (1)
Guarino H. (2)
Gil A. (3)

(1) DV, MMV. Departamento de Rumiantes y Suinos: Facultad de Veterinaria.

(2) DV, MSc. Area de Virologia. Facultad de Veterinaria.

(3) DV, MSC., PhD. Area de Biostatística. Facultad de Veterinaria.

INFLUENCIA DE LA INFECCION POR LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA SOBRE LA PRODUCCION Y REPRODUCCION DE RODEOS LECHEROS

FPTA 199

Período Ejecución: Dic., 1993-Dic., 1997

1. INTRODUCCION

1.1 Características generales de la Enfermedad

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad contagiosa del ganado bovino que se manifiesta clínicamente

por el desarrollo de neoplasias malignas del tejido linfoide ^(2,25,35). La LBE en condiciones naturales afecta exclusivamente a la especie bovina, y en particular al ganado lechero, debido a condicionantes de manejo, exigencias productivas, estratificación etaria y, probablemente, predisposición genética ^(25,35).

La enfermedad se encuentra distribuida en prácticamente todo el mundo, con variados grados de prevalencia, según regiones y establecimientos. Se observa en países tan disímiles como EE.UU. ⁽⁶⁾, Canadá ⁽¹⁷⁾, Brasil ⁽¹⁾, Israel ⁽³⁾, Argentina ⁽²¹⁾, Australia ⁽¹²⁾ y Chile ⁽²²⁾. En Uruguay sucede algo similar, con establecimientos en condición de negativos y otros con prevalencia superior al 60% ^(8,16,45).

Las pérdidas económicas directas por la forma tumoral de la enfermedad son, en general, de escasa importancia, salvo en algunos rodeos individuales en que se ha

RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) constituye una importante enfermedad del ganado, que ha concentrado el interés de muchos países en los últimos años. Su importancia económica radica en las restricciones que ciertos mercados imponen al ganado en pie o material genético infectado, así como en posibles pérdidas de productividad de los animales infectados.

Con la finalidad de estudiar este último aspecto se realizó un estudio prospectivo sobre cuatro establecimientos lecheros, que abarcó un período de tres años. Para el diagnóstico de la enfermedad se utilizaron las técnicas serológicas IDGA (Inmunodifusión en gel de agar) y ELISA (enzima ligada a un inmunoabsorbente). Los parámetros productivos analizados fueron: producción total de leche y grasa por lactancia ajustada, concentración de proteínas y recuento de células somáticas. Los indicadores reproductivos evaluados fueron: intervalo interparto, intervalo parto-primer servicio y servicios por concepción.

También se consideró la tasa de refugos y la ocurrencia de enfermedades asociadas al parto, así como aspectos relevantes de la epidemiología de la infección.

Los resultados indicaron que las vacas seropositivas presentaron un intervalo interparto significativamente más prolongado que las negativas (416,6 ± 63,9 días frente a 389,1 ± 46,34 días), lo que se asoció a una marcada tendencia a requerir un mayor número de servicios por concepción (2,02 y 1,67 respectivamente). Ninguna otra diferencia significativa pudo ser detectada entre ambas subpoblaciones de vacas. Desde el punto de vista epidemiológico se destaca la ausencia de la condición de la madre o de la cría al nacimiento con la posterior adquisición de la infección. Los anticuerpos pasivos de origen calostroal se mantuvieron hasta el 7^{mo}. mes de edad y la alimentación precoz con mezcla de calostro pareció influir en la seropositividad de un cierto porcentaje de terneras hijas de vacas negativas. Estos resultados son discutidos en relación a los observados en otras investigaciones y al encare de las posibles medidas de control a aplicar en los establecimientos infectados.

Se concluye la necesidad de profundizar la investigación nacional sobre el tema y de sensibilizar a las autoridades sanitarias sobre las posibles consecuencias negativas derivadas de la ausencia de una política contra esta enfermedad.

Palabras Clave: Bovinos, Leucosis, Retrovirus, Enfermedades Infecciosas.

evidenciado una inusual frecuencia de casos clínicos ^(6,37). Ello ha sido observado en un tambo del departamento de Soriano, que culminó con la clausura de la explotación como consecuencia de la alta incidencia de casos de linfosarcoma¹.

La LBE ha adquirido especial importancia como consecuencia de las restricciones impuestas por el mercado internacional, así como por el costo de los programas de control que se instrumentan en numerosos países ⁽²⁵⁾. A partir de 1988 la Unión Europea (en ese tiempo, Comunidad Económica Europea) ha instrumentado una campaña obligatoria de erradicación en todos sus países miembros (Directivas n.88.406 del 14 de junio de 1988 y n.90.422 del 26 de junio de 1990) ^(9,32). Como consecuencia de esa política, la incidencia ha disminuido a niveles muy bajos en la mayoría de los países miembros: Alemania 0,01% ⁽²⁵⁾, Bélgica 0,7% ⁽²⁶⁾ y Francia 0,9% ⁽⁹⁾. Dinamarca se encuentra libre desde 1990,

Irlanda y Holanda desde 1992, y Austria desde 1993 ⁽²⁾. Programas voluntarios de control se realizan en numerosos países, incluyendo EE.UU. y Canadá ⁽⁶⁾, Australia ⁽¹²⁾ y Chile ⁽⁴⁴⁾.

Resulta claro que la LBE es una afección relacionada directamente con sistemas de manejo intensivo, con estrecho contacto físico entre los animales y una importante participación del ser humano ⁽³⁵⁾.

Existe una clara tendencia a que la tasa de infección se incremente con la edad, siendo escasa, en general, la incidencia en individuos menores de dos años ^(3,17). Ello supone un índice importante de seroconversión asociado con la madurez sexual e inclusive con el parto ⁽²⁰⁾. Una mayor susceptibilidad en animales con alto potencial lechero también ha sido demostrada ⁽¹¹⁾. La transmisión natural en rodeos lecheros se produce en forma más lenta en aquellos en los que existe una baja prevalencia, mientras que difunde mucho más rápidamente en establecimientos con alta tasa de infección ⁽⁷⁾. La edad a la que se contagian los animales está influida por la situación epidemiológica dentro del rodeo, ya que en aquellos con altas prevalencias, se favorece la aparición de la infección en individuos más jóvenes ⁽²⁵⁾.

En condiciones naturales el virus de la Leucosis Bovina (vLB) se presenta íntimamente asociado a linfocitos, siendo muy raro encontrarlo en forma libre ^(4,14,25). La vía más importante de transmisión es el contacto, ya que el agente puede estar presente en prácticamente todas las secreciones y excreciones ^(12,18,29). Sin embargo, sólo la sangre y, en menor grado, la leche y el calostro, pueden contener concentraciones de virus importantes como para transmitir la enfermedad ⁽²⁵⁾.

Desde el momento en que el agente se encuentra en las células sanguíneas, todas los materiales que puedan contener sangre representan factores de riesgo. Prácticas de manejo que facilitan la transmisión horizontal incluyen el estrecho contacto entre las categorías y maniobras que puedan vehiculizar sangre

¹ Dr. R. Saavedra, comunicación personal.

contaminada de un animal a otro: inyecciones, castración, descorne, tatuajes, caravanas, premunición, cirugía ^(18,35).

El rol de la leche y del calostro como vías de contagio de la LBE está sujeto a algunas controversias. La ingestión de anticuerpos calostrales maternos en hijos de vacas positivas ejercería, en términos generales, un rol protector ⁽¹⁹⁾. Estos anticuerpos pasivos se mantienen en niveles detectables por las técnicas de rutina hasta los 8-10 meses de edad aproximadamente ^(25,35,52). Por otra parte, se ha demostrado que la administración de leche de vacas positivas a terneros de madres negativas favorece la instalación de nuevas infecciones ⁽¹²⁾. La transmisión vertical de la enfermedad posee un rol secundario, siendo responsable de entre 8 y 14 % de los casos ^(3,18,52).

Existen además factores genéticos relacionados con la susceptibilidad individual frente al vLB, al igual que para el desarrollo de linfocitosis persistente (LP), lo que está en relación con el antígeno linfocitario bovino (BoLA) ⁽²⁵⁾. El vLB es un ARN virus oncogénico exógeno, perteneciente a la familia *Retroviridae*, y dentro de ella conforma un grupo junto al HTLV-I y HTLV-II humanos ⁽¹⁴⁾.

En la actualidad el agente ha sido secuenciado en su totalidad, es decir, se conoce toda la secuencia de nucleótidos del genoma viral y las zonas que codifican para las distintas proteínas virales. Las secuencias más conservadoras son las que se utilizan para los iniciadores en la técnica de PCR, como las de los genes GAG, y POL (genes del virus de LBE).

Se posee un gen codificado por una proteasa que relaciona los genes GAG y POL, que se lee en los *open reading frame* SOR-LOR, activando la transcripción de los ARN mensajeros virales ⁽¹⁹⁾. Los elementos antigénicos de mayor interés son la proteína interna del virión, o antígeno p24, y la glicoproteína de la cubierta, antígeno gp51. Luego del contagio, el virus se aloja en los linfocitos, integrado en el genoma bajo forma de provirus, y la infección persiste de por vida. En la gran mayoría de los casos no se observa ninguna respuesta por parte

del huésped, salvo el desarrollo de anticuerpos específicos (seroconversión) ⁽²⁵⁾. En ciertas circunstancias, aproximadamente en el 30% de los seropositivos se produce una linfocitosis persistente (LP) debida especialmente a un incremento de linfocitos B ⁽⁷⁾. El desarrollo de la forma neoplásica de la enfermedad, linfosarcoma, es un resultado relativamente raro de la infección y se observa tan solo en el 3 al 5% de los animales infectados ⁽³⁵⁾.

De las numerosas técnicas utilizadas en el diagnóstico de la LBE, las más importantes son la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y de enzima ligada a un inmunoabsorbente (ELISA) ^(14,25). La técnica de ELISA ha demostrado ser más sensible que la IDGA, con la ventaja de que puede realizarse además en *pool* de muestras de suero o leche ^(5,8,26,41). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la identificación del provirus, y constituye un método directo de detección, sumamente importante para los estudios epidemiológicos de la enfermedad ⁽¹⁸⁾. Al no disponerse hasta el presente de vacunas eficaces, el control de la LBE se debe hacer mediante identificación de positivos e instrumentación de medidas de manejo tendentes a evitar la difusión ⁽⁶⁾.

Dependiendo de las tasas de infección y de las limitantes económicas, se han postulado estrategias de control de la enfermedad mediante pruebas serológicas y eliminación, segregación o descarte selectivo ⁽³³⁾. Esta última, que se basa en la eliminación de los animales de mayor riesgo de contagio, puede constituir una opción interesante a considerar en la actual situación epidemiológica de la LBE.

En el Uruguay, la primera observación de Leucosis Bovina fue realizada por Quiñones y Casas (1963). Estudios clínicos y hematológicos fueron posteriormente efectuados por el Dr. Marco Podestá y col. (1971). A partir de entonces se constató un creciente interés por el tema, en particular luego de la introducción de la IDGA (1977) como técnica de diagnóstico. La preocupación de productores y autoridades sanitarias, rela-

cionadas fundamentalmente con restricciones en la exportación de bovinos lecheros (especialmente hacia el Brasil), centró la atención sobre la LBE a fines de la década del '80 e inicios del '90.

Las investigaciones nacionales realizadas hasta el presente se han centrado en la descripción de casos clínicos (Sienna, Bonnevaux, Martino 1983)⁽⁴⁵⁾, caracterización de nuevas técnicas de diagnóstico (Guarino, Saizar y Sienna, 1989)⁽¹⁵⁾, estudios de *cross section* sobre prevalencia (Guarino, Capano y Gil, 1991; Sienna y Guarino, 1991; Collazo y col., 1996; Mederos y col. 1998)^(8,16,31,41), alteraciones citogenéticas (Llambí y col. 1996)⁽²⁸⁾; seguimiento epidemiológico (Sienna y col. 1996a y 1996b)^(46,47) y caracterización hematológica (Sienna y col. 1998)⁽⁴⁹⁾. No existen hasta el presente en el Uruguay, antecedentes de publicaciones referidas al posible impacto productivo y reproductivo de la enfermedad.

1.2. Importancia Económica de la LBE

El efecto de la enfermedad sobre la producción ha sido objeto de discusión y con frecuencia se han observado resultados experimentales contradictorios. Las posibles pérdidas económicas pueden ser directas e indirectas. Las pérdidas directas son los costos asociados a la infección: disminución de la producción en animales clínica y subclínicamente afectados, costos de asistencia técnica para el diagnóstico de LBE y costos de los reemplazos por causas de muerte o refugio. Las pérdidas indirectas se relacionan con la disminución de los ingresos por trabas a la exportación de ganado o material genético y costos derivados de los sistemas sanitarios de regulación e investigación sobre la enfermedad⁽³⁷⁾.

Existen pocas dudas respecto a las pérdidas económicas que ocasiona la forma clínica de la enfermedad. Sin embargo, y salvo casos excepcionales, la incidencia de linfosarcoma es muy baja aún en establecimientos con elevada prevalencia de LBE⁽⁶⁾. Con respecto al real

impacto de la infección subclínica sobre los principales parámetros productivos y reproductivos, la bibliografía presenta informaciones contradictorias⁽³⁷⁾.

1.2.1. Producción de Leche

En un estudio realizado en dos rodeos lecheros de pedigree, Langston y col. (1978) encontraron que las vacas seropositivas presentaron una mayor producción por día y por lactancia frente a las negativas, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas⁽²⁷⁾. El seguimiento de un rodeo lechero durante 4 años realizado por Huber y col. (1981) no permitió establecer diferencias en producción con relación a la enfermedad, eficiencia reproductiva y longevidad⁽²⁰⁾.

En Chile, Reinhardt y col. (1988) constataron una reducción en la producción total por lactancia de 3,5% de las seropositivas frente a las negativas. Brenner y col. (1989), en un estudio caso-control apareado en edad y establecimiento, observaron una disminución similar de 3,5% en las vacas seropositivas que resultó ser estadísticamente significativa⁽⁴⁾. En un ensayo sobre 219 vacas servidas por 50 diferentes toros, Wu y col. (1989) no observaron diferencias en producción entre vacas positivas y negativas a la infección por el vLB. Sin embargo, aquellas vacas seropositivas que presentaron linfocitosis produjeron menos leche que lo esperado de su potencial lechero⁽⁵²⁾.

Luego de analizar 14 diferentes variables en un total de 61 rodeos tomados al azar, Jacobs y col. (1991), no pudieron detectar diferencias que fueran originadas como consecuencia de la infección por el vLB⁽²⁴⁾. Emanuelson y col. (1992) analizaron retrospectivamente un total de 14.424 establecimientos lecheros en Suecia y concluyeron que la producción lechera en aquellos establecimientos infectados resultó ser 2,5% inferior en relación a los negativos⁽¹³⁾. En otro estudio retrospectivo sobre un rodeo donde periódicamente se realizaban estudios hematológicos y serológicos (IDGA) para LBE, Da y col. (1993) evidenciaron que

los animales con LP presentaron menor producción de leche en relación al resto, aunque no observaron diferencias entre seropositivos sin LP y seronegativos ⁽¹⁰⁾.

1.2.2. Composición de la leche

Rusov y col. (1989) encontraron un incremento en el recuento de células somáticas (RCS) en vacas positivas y con LP frente a aquellas libres de la infección ⁽⁴²⁾. En un estudio retrospectivo, que abarcó un período de 8 años, Scott y col. (1990) también destacaron que las vacas positivas presentaron un RCS significativamente superior frente a sus congéneres negativas ⁽⁴³⁾. Similares observaciones fueron comunicadas por Jacobs y col. (1991), quienes destacaron que las diferencias desaparecieron luego de realizar los correspondientes ajustes por edad, días de lactancia y establecimiento ⁽²³⁾. En el ensayo de Heald y col. (1992) no pudieron detectar las diferencias en RCS previamente comunicadas por otros autores, entre las vacas positivas y negativas a la enfermedad ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, Jacobs y col. (1995), en un importante relevamiento realizado en un total de 150 establecimientos, verificaron RCS superiores en la subpoblación de vacas seropositivas ⁽²⁴⁾.

Respecto a la composición de la leche, Wu y col. (1989) concluyeron que las vacas seropositivas y con LP presentaron un significativo descenso en la concentración de grasa butirométrica ⁽⁵³⁾. Similares resultados fueron obtenidos por Da y col. (1993) respecto al tenor graso de aquellas vacas infectadas que presentaron LP ⁽¹⁰⁾.

1.2.3. Desempeño Reproductivo

Los relevamientos realizados por Langston y col. (1978), y Huber y col. (1981) no evidenciaron ningún efecto de la infección sobre el desempeño reproductivo ^(19,27). En el estudio efectuado en Israel por Brenner y col. (1989) se constató un intervalo parto-concepción 48 días mayor en las vacas seropositivas, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ⁽⁴⁾. Similares observaciones fueron comunicadas por Ema-

nuelson y col. (1992), al analizar el desempeño reproductivo entre rodeos positivos y negativos ⁽¹³⁾.

Por otra parte Heald y col. (1992), en un estudio sobre un millar de vacas y 268 establecimientos, detectaron que las vacas positivas poseían un intervalo interparto 0,47 meses significativamente mayor que el de las seronegativas ⁽¹⁷⁾. Idénticas observaciones habían sido ya formuladas por Reindhart (1988) y Jacobs y col. (1995) ^(24,41).

1.2.4. Refugos

Ensayos realizados por Huber y col. (1981) y Heald y col. (1992) no pudieron detectar diferencias atribuibles a la enfermedad con relación a la tasa de refugo entre vacas positivas y negativas ⁽¹⁹⁾. Sin embargo, Thurmond y col. (1985), en un estudio retrospectivo de un rodeo con alta prevalencia de infección por el vLB, establecieron que las vacas seronegativas tenían una permanencia significativamente mayor en el rodeo, señalando que ello indicaba un incremento de refugos en el grupo positivo ⁽⁵⁰⁾.

Brenner y col. (1989) encontraron una tasa de refugo muy superior en las positivas (38,6%) frente a las negativas (10,7%), la cual resultó altamente significativa ⁽⁴⁾. También Emanuelson y col. (1992) destacaron una mayor tasa de refugo en los rodeos infectados frente a los negativos a la enfermedad ⁽¹³⁾.

Pollari y col. (1992) comunicaron que el grupo de refugo seropositivo y con linfosarcoma, tenía mayor producción que el refugo negativo durante su última lactación; pero aquellas con linfocitosis presentaban una producción inferior ⁽³⁸⁾. En un nuevo estudio Pollari y col. (1993) señalaron que el riesgo de ser refugado se incrementaba con la edad en el grupo seropositivo, lo que no acontecía en el negativo ⁽³⁹⁾. Finalmente Jacobs y col. (1995) constataron que el ganado adulto seropositivo era refugado a una tasa mayor con relación al negativo, aunque dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa ⁽²⁴⁾.

El objetivo de la presente investigación fue establecer el efecto de la infección por

el vLB sobre el comportamiento reproductivo, la producción y la composición de la leche, y la incidencia de enfermedades asociadas y tasa de refugos. Asimismo, fueron analizados algunos aspectos epidemiológicos referidos a la dinámica de la enfermedad dentro de los rodeos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Establecimientos

El ensayo se realizó en 4 establecimientos lecheros comerciales, que fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

- Existencia de antecedentes de LBE en el predio.
- Disponibilidad de adecuados registros reproductivos y productivos.
- Motivación del productor que ofrece el establecimiento y colabore en la toma de muestras y de información.
- Contar con asesoramiento veterinario permanente.

Los establecimientos eran remitentes a la Cooperativa Nacional de Productores de Leche, y se ubicaban en Maldonado y Soriano.

2.2. Animales

En el estudio de los parámetros reproductivos y productivos se incluyeron solamente vacas, excluyéndose las vaquillonas de primera cría. Las vacas, debidamente identificadas, fueron distribuidas en dos grupos según su condición serológica: seronegativas y seropositivas. Ambos grupos fueron objeto de un seguimiento que se extendió por un período de tres años.

Con la finalidad de establecer aspectos epidemiológicos relevantes de la dinámica de la enfermedad, se realizó el seguimiento de las terneras nacidas de las vacas incluidas en el ensayo.

2.3. Técnicas de Laboratorio

2.3.1. Diagnóstico de la Infección

El diagnóstico de la infección por el virus de la LBE se realizó mediante las técnicas de IDGA y ELISA (Guarino, Saizar y Sienra, 1989) ⁽¹⁵⁾:

-InmunoDifusión en Gel Agar (IDGA). Se realizó en suero sanguíneo, mediante el método en placa con el empleo de kits comerciales² en base a antígeno dual p24 y gp 51. Las lecturas se efectuaron mediante apreciación visual a las 48 horas.

- EnzimoInmunoAnálisis (ELISA). Tanto en suero como en leche, se usaron kits comerciales³ para técnica indirecta en microplaca de 96 pocillos, realizando la lectura mediante lector automático de microplacas⁴. Se consideraron sueros positivos a aquellos que a 405 nm evidenciaron lecturas superiores a la del suero control positivo (límite de positividad).

2.3.2. Composición de la leche

Al momento del control lechero se tomaron muestras de leche, con Bronopol como conservador, para estudiar en laboratorio los siguientes parámetros: conteo de células somáticas, proteínas y tenor de grasa. Para proteínas y materia grasa se utilizó la técnica automática mediante Milkoscan \hat{a} ⁴, mientras que el RCS se realizó con el método de Wisconsin.

2.3.3. Perfiles Metabólicos

Al inicio del ensayo, se efectuaron en las vacas las determinaciones séricas de los siguientes parámetros, mediante las técnicas de rutina: albúminas, globulinas, calcio, fósforo, proteínas totales, lípidos y urea.

2.3.4. Inmunoglobulinas séricas

Las concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) de las terneras, fueron evaluadas mediante las técnicas de turbidez del Na₂SO₃ e InmunoDifusión Radial (IDR).

² Instituto Pourquier (Francia).

³ Elisa Test bovino Leucosis Serodiagnosis, Instituto Pourquier (Francia).

⁴ Multiskan MS., ver 08, LabSystem (Finlandia).

2.4 Registros Reproductivos y roductivos

Durante el ensayo se realizó un continuo seguimiento de los animales, incluyendo todos los registros individuales de sanidad y producción. La producción lechera se ajustó en base al programa de control lechero de la Asociación Rural del Uruguay (ARU).

2.5. Análisis Estadístico

El estudio se realizó en base al seguimiento prospectivo de cohortes (grupos de individuos que poseen un factor distintivo, en este caso el carácter positivo o negativo a la enfermedad; a diferencia de los estudios llamados caso-control, en los que primero se determina presencia o ausencia de la enfermedad para conformar los grupos, en los estudios de cohorte primero se selecciona la población y luego se establece su condición de sano o enfermo.

Se validaron los datos correspondientes a lactancias completas sin modificaciones de la condición serológica. Aquella lactancia de vacas que seroconvirtieron durante el transcurso de la misma fueron eliminadas del estudio. Para la producción de leche se realizó un análisis de varianza a través del uso de modelos lineales. Se ajustaron los datos por número de lactación y establecimiento, que podrían actuar como factores de confusión.

La producción de grasa y el contenido proteico se evaluaron a través de modelos lineales generales. Los datos se ajustaron por establecimiento y número de lactancia, para remover los efectos residuales de lactación que podían generar diferentes estructuras productivas en los establecimientos.

En el análisis de conteo de células somáticas se categorizaron los animales en dos grupos: menos de 200.000 y mayor o igual a 200.000 células/ml. Se relacionó en una tabla de 2 x 2 condición serológica y RCS.

Para el intervalo parto-primer servicio se realizó un análisis de varianza a través

del uso de modelos lineales. Se ajustaron los datos por número de lactación y establecimiento, los cuales podrían actuar como factores de confusión. Debido a que el factor establecimiento no tuvo significación, éste fue posteriormente considerado en el modelo de la evaluación del factor enfermedad. Se comparó el número de servicios necesarios por preñez en los animales positivos y negativos mediante el test de Chi cuadrado.

Se analizó la relación entre servicios y lactaciones, así como entre lactación y leucosis. Al demostrarse que actuaban independientemente unos de otros, no fue necesario estratificar para estos factores y pudieron ser tratados en forma cruda.

Para el intervalo interparto (IIP) se realizó un análisis de varianza a través del uso de modelos lineales. Se ajustaron los datos según número de lactancia y establecimiento, elementos que podrían actuar como factores de confusión.

Para la comparación del efecto de la infección con respecto a los perfiles metabólicos en las vacas y a los niveles de IgG en terneras, se utilizó el test de t de Student para muestras independientes.

Las otras variables discretas, tales como refugos y enfermedades asociadas al parto, también fueron evaluadas mediante el test de Chi cuadrado. En todos los casos se consideraron como niveles de significación estadística aquellos con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Producción y composición de la leche

3.1.1. Producción Lechera

La producción de leche de las vacas fue ajustada por edad y por días de lactancia, mediante el programa de Control Lechero de la ARU. En total, fueron validadas 473 lactancias, 211 de vacas negativas y 262 de positivas. En un análisis simple de varianza la producción total por lactancia ajustada fue de

6173.5±1535.1 litros para las negativas y 6333.3±1618.3 litros para las positivas (F = 1,19 correspondiendo a p = 0,28 n.s.).

A los efectos de determinar la influencia de los diferentes factores se realizó un análisis de regresión lineal, en el que se determinó el efecto de la enfermedad, el establecimiento y el número de lactación (cuadros 10 y 11). Como resultado del mismo se observó una F = 0, lo que indica que no se constató ninguna influencia de la enfermedad sobre la producción de leche. Por el contrario, y tal como era de esperar, se apreció una influencia significativa del factor establecimiento.

3.1.2. Grasa Butirométrica

La producción total de grasa ajustada por lactancia fue analizada en 260 vacas, 98 negativas y 162 seropositivas. En un análisis inicial general de varianza se observó una producción de 218,51±45,7 kg para las negativas y 218,49±54,3 kg en las positivas, lo que fue equivalente a F = 0 (n.s.).

En el análisis más detallado, utilizando los modelos lineales se verificó que, igual a lo sucedido con la producción total de leche, existió un claro efecto de establecimiento, e independencia respecto a lactación y enfermedad (F = 1.09 n.s.).

3.1.3. Proteínas Totales

La determinación de las proteínas lácteas totales corresponde al seguimiento de 96 animales negativos y 83 positivos. Se realizó una determinación mensual de cada animal durante 4 meses, y el promedio individual constituyó la base

del cálculo para comparar el efecto de la enfermedad.

El análisis general de varianza evidenció una concentración de proteínas de 3,157±0,249g % en las negativas, y 3,111±0,216 g % en las positivas, lo que correspondió a F=1,73 (n.s.). A los efectos de un estudio más profundo, con la finalidad de establecer el grado de influencia de las diferentes variables, se efectuó un análisis de regresión lineal, considerando el efecto de la enfermedad, el establecimiento y número de lactancia. Como resultado del mismo se obtuvo una F = 1,04, lo que indica ausencia de significación estadística. Ello expresa que en el estudio realizado no se detectó ningún efecto derivado de la condición serológica de los animales sobre las concentraciones de proteínas lácteas totales. Tampoco aquí se observó un efecto atribuible a los establecimientos, aunque sí existió influencia derivada del número de lactancia.

La relación entre producción total por lactancia, producción de materia grasa y porcentaje de proteínas con relación a la enfermedad se presenta en el cuadro 1.

3.1.4. Recuento de Células Somáticas

Para el estudio de las células somáticas en leche se hicieron un total de cuatro observaciones por vaca, y se realizaron luego los correspondientes promedios individuales. Posteriormente los datos individuales se distribuyeron en dos grupos: grupo 0 correspondiendo a contajes menores a 200.000 células, y grupo 1 con contajes de 200.000 células/ml o mayores.

Cuadro 1. Principales parámetros productivos en relación a la condición serológica de las vacas.

Parámetro	Condición serológica		p
	Negativa	Positiva	
Lactancia Total (l) ($\bar{x}\pm s$)	6.173± 1.535	6.333± 1.638	n.s.
Grasa Total (kg) ($\bar{x}\pm s$)	218 ± 45,7	218 ± 54,3	n.s.
Proteínas (g %) ($\bar{x}\pm s$)	3,16 ± 0,3	3,11 ± 0,2	n.s.

Cuadro 2 Asociación entre recuento de células somáticas en leche y condición serológica de las vacas.

RCS Somáticas (n° /ml)	Condición serológica	
	Negativa	Positiva
< 200.000	42	4
200.000 o >	49	2

Chi-cuadrado 0,97; p = 0,33

El análisis de Chi-cuadrado evidenció ausencia de asociación entre contaje celular en leche y condición serológica de las vacas (cuadro 2).

3.2. Parametros reproductivos

3.2.1. Parto Primer Servicio

El intervalo entre el parto y el primer servicio (PPS) fue analizado en 217 vacas, 91 negativas y 126 positivas. Dicho período se presentó similar en ambos grupos: $92,3 \pm 41,2$ días en las negativas frente a $96,4 \pm 47,3$ días para las positivas. En un análisis preliminar de varianza se verificó que las diferencias detectadas entre ambas poblaciones de vacas carecen de significación estadística. En el análisis de regresión lineal se verificó la ausencia del efecto de la infección sobre el intervalo PPS, arrojando una $F = 0,44$ que corresponde a $p = 0,51$ (n.s.)

3.2.2. Servicios por Concepción

La relación Servicios/Concepción fue establecida con la información proveniente de aquellas vacas en las cuales se realizó diagnóstico de preñez por palpación

rectal y que, posteriormente, parieron en la fecha prevista. Ello determinó la no-consideración de animales incluidos en el cronograma de seguimiento y que completaron una única lactancia. Tampoco se incluyeron vacas refugadas por diferentes causas -a pesar de tener resultado positivo al tacto-, ni las que seroconvirtieron durante el período de servicios (cuadro 3).

Se incluyeron en el registro 151 vacas, 66 seronegativas y 85 seropositivas. En el análisis crudo de la información se observa que en las vacas seronegativas se requirieron 1,67 servicios por preñez, mientras que en las positivas la relación fue de 2,02 lo cual en una primera evaluación resultó en una diferencia manifiesta. Para su análisis más detallado los datos fueron agrupados en dos categorías: vacas que requirieron uno o dos servicios, y animales con tres o más servicios por concepción. Como se puede observar en el cuadro 4, existió un chi-cuadrado de 3,65 que se encuentra muy próximo a la significación estadística y que refleja una clara tendencia de las vacas seropositivas a requerir un mayor número de servicios por preñez. Ello representó un $OR=2,20$.

Cuadro 3. Vacas que requirieron menos de 3 y más de 2 servicios por concepción, según condición serológica.

Número de Servicios	Condición Serológica	
	Negativa	Positiva
1 - 2	56	61
> 2	10	24

Chi-cuadrado 0,37; p = 0,

Cuadro 4. Efecto de la infección por el vLB sobre los principales indicadores reproductivos.

Parámetro	Condición serológica		p
	Negativa	Positiva	
Parto – 1er Servicio (x±s)	92,3 ± 41,2	96,4 ± 47,3	n.s.
Servicios / Concepción.	1,67	2,02	n.s.
Intervalo Interparto (x±s)	389 ± 46	417 ± 64	0,02

El análisis de la relación entre número de lactación y servicios/concepción reveló que éste no fue un factor asociado que influyera significativamente. Para su análisis, las lactancias fueron agrupadas en menos de tres y más de tres, resultando un Chi-cuadrado de 0,74 equivalente a $p = 0.38$.

3.2.3. Intervalo Inter Parto (IIP)

Las observaciones validadas para analizar este parámetro correspondieron a un total de 142 vacas (70 negativas y 72 positivas), sobre las cuales se efectuó el seguimiento durante dos lactancias completas. En la estadística descriptiva general, se observó que la población de vacas negativas presentó un IIP de 389,1 ± 46,34 días, mientras que en el caso de positivas el mismo fue de 416,6 ± 63,9 días. En un análisis más detallado, mediante la aplicación de regresión lineal, se investigó la participación de los diferentes factores sobre el IIP. Los resultados indican la influencia de los factores establecimiento y enfermedad, así como la independencia del número de lactancia. Realizados los ajustes correspondientes, se obtuvo que la enfermedad con relación a IIP presenta una $F = 5,58$ lo cual es altamente significativo y representa $p = 0,02$. Los principales parámetros reproductivos con relación a la con-

dición serológica de las vacas se presentan en el cuadro 4.

3.3. Enfermedades asociadas y tasa de refugos

3.3.1. Enfermedades Asociadas

Si bien se estableció la incidencia de las principales patologías registradas en las vacas durante sus lactancias, sólo se reportan como de interés -por su frecuencia- aquellas asociadas con el parto. El análisis incluye las observaciones obtenidas de un total de 331 partos, correspondientes a 122 vacas negativas y 209 positivas.

Las alteraciones presentaron una frecuencia general de 7,6% y se distribuyeron en tres grupos: Retención de Placenta, Distocia y Mastitis Aguda Posparto (cuadro 5). Aquellos problemas que determinaron la muerte de animales no se incluyen, ya que se encuentran considerados dentro de las muertes en la sección de refugos.

3.3.2. Tasa de Refugos

En un primer análisis se incluyen como refugos todas aquellas vacas que, estando presentes al inicio del ensayo, no concluyeron el periodo de seguimien-

Cuadro 5. Frecuencia de alteraciones Posparto con relación a la condición serológica de las vacas.

Grupo de Vacas	Nº	Ret. Placenta	Distocia	Mastitis	Total
Seronegativo	122	6	2	1	9
Seropositivo	209	8	6	2	16
Total	331	14	8	3	25

to. En este sentido amplio se encuentran tanto animales que murieron o que fueron eliminados del tambo por diferentes motivos. El número de refugos se presentó superior en el lote seropositivo, pero la prueba de Chi cuadrado evidenció la ausencia de asociación significativa entre los refugos verificados en cada grupo de vacas ($p=0,18$) (cuadro 6). Si bien no existieron variaciones de significación respecto a los refugos, las causas - especialmente la infertilidad- no se presentaron similares entre ambos grupos (cuadro 7).

3.4. Perfiles metabólicos e inmunitarios

3.4.1. Perfiles Metabólicos de las Vacas

Los principales parámetros metabólicos fueron estudiados en un total de 144 vacas en ordeño (64 seronegativas y 80 seropositivas) de un mismo establecimiento. En la totalidad de los parámetros analizados no se verificó ninguna diferencia significativa entre los grupos negativo y positivo (cuadro 8).

Cuadro 6. Número de vacas refugadas con relación a su condición serológica.

Condición del ganado	Seronegativas	Seropositivas	Total
Permanencia en el rodeo	88	99	187
Refugadas	17	30	47
Total	105	129	234

Chi-cuadrado = 1,80 $p < 0,18$.

Cuadro 7. Motivos de Refugo según la condición serológica de las vacas.

Grupo	Causa del Refugo						Total
	Muerte	Infert.	Ubre	Patas	Otras	Edad	
Seronegativo	6	1	2	0	2	6	17
Seropositivo	8	6	4	3	4	5	30
Total	14	7	6	3	6	11	47

Cuadro 8. Parámetros serológicos analizados en el perfil metabólico de ambos grupos de vacas.

Parámetro Estudiado	Grupo Seronegativo		Grupo Seropositivo	
	x + s	p	x + s	p
Albúmina	2,90 ± 0,33	ns	2,93 ± 0,50	ns
Calcio	8,87 ± 0,49	ns	9,10 ± 0,55	ns
Fósforo	4,48 ± 0,69	ns	4,33 ± 0,59	ns
Globulinas	3,76 ± 0,42	ns	3,85 ± 0,54	ns
Lípidos	3,99 ± 0,98	ns	3,87 ± 0,70	ns
Proteínas	6,66 ± 0,45	ns	6,78 ± 0,51	ns
Rel. Ca/P	2,05 ± 0,31	ns	2,14 ± 0,32	ns
Urea	0,226 ± 0,05	ns	0,230 ± 0,04	ns

3.4.2. Inmunoglobulinas Séricas en las Terneras

En la técnica del sulfito de sodio, de las 97 muestras analizadas, los resultados de precipitación frente a las tres diluciones de Na₂SO₃ son expresados en el cuadro 9. En la misma se observa que tan solo dos animales se diagnosticaron como serológicamente inmunodeficientes y ambos pertenecieron al grupo de terneras seronegativas.

Desde el punto de vista estadístico, la prueba de Chi cuadrado confirmó la inexistencia de asociación entre Inmunoglobulinas séricas evaluadas cualitativamente mediante sulfito de sodio y la condición serológica de las terneras al nacimiento (Chi-cuadrado= 2,15 p = 0,341).

En la técnica de la inmunodifusión radial, la determinación de las concentraciones de IgG fue efectuada mediante IDR sobre las mismas terneras que se evaluaron cualitativamente mediante sulfito de sodio. Las terneras negativas presentaron concentraciones de 4795 ± 1965 mg/dl, mientras que las positivas presentaron concentraciones algo superiores: 5184 ± 1507. Los dos animales evidenciados como inmunodeficientes con el sulfito también lo fueron en esta prueba, con concentraciones séricas < 800 mg/dl. El resto de los animales presentaron niveles normales de IgG, y no existieron diferencias significativas entre ambos grupos.

3.5. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad

3.5.1. Relación entre la condición Serológica de las madres y sus crías

La condición serológica de las terneras al nacimiento fue evaluada frente a la constatada en sus madres un mes antes del parto. Sobre un total de 138 terneras estudiadas, 70 descendían de madres seropositivas y 68 de seronegativas. La serología de las crías luego del nacimiento y del consumo de calostro en relación con la condición materna se presenta en el cuadro 10.

En el análisis estadístico, la prueba de chi-cuadrado mostró una asociación altamente significativa entre la serología materna y de la cría (chi-cuadrado = 39.86, p < 0,0005). Sin embargo, se debe destacar que un 25,7% de terneras hijas de madres positivas no evidenciaron presencia de anticuerpos pasivos luego del nacimiento. Por otra parte, el 20% de las terneras hijas de vacas seronegativas resultaron positivas a la IDGA.

3.5.2. Transmisión Vertical de la Enfermedad

De las 138 terneras incluídas en el ensayo, 7(5%) se mantuvieron seropositivas desde el nacimiento hasta el año de edad, lo que indica una persistencia se-

Cuadro 9. Prueba del Sulfito de Sodio en ambos grupos de terneras.

GRUPO	Nº	18%	16%	14%
Seronegativo	49	2	5	42
Seropositivo	48	0	4	44
TOTAL	97	2	9	86

Cuadro 10. Relación entre la condición serológica de las terneras respecto a sus madres.

Condición Serológica	Madre Positiva	Madre Negativa	Total
Ternera positiva	52	14	66
Ternera negativa	18	54	72
TOTAL	70	68	138

rológica originada por una infección activa. En 5 casos las madres fueron seropositivas, y en los 2 restantes seronegativas. Ello significaría que, al menos en algunos de estos casos, se trató de infecciones horizontales previas a la baja natural de los anticuerpos calostrales pasivos.

3.5.3. Persistencia de los Anticuerpos Pasivos Calostrales

El seguimiento de 51 terneras que fueron seropositivas al momento de la primera muestra, y que luego se negativizaron, permitió establecer el tiempo de persistencia de los anticuerpos calostrales. Utilizando la técnica de IDGA, los anticuerpos pasivos decrecieron con la edad de los animales, no siendo detectados más allá del 8° mes de vida. La relación entre la edad y la presencia de anticuerpos maternos se establece en el cuadro 11.

3.5.4. Nuevas Infecciones

Transmisión Horizontal. En el transcurso del primer año de vida, el seguimiento de las 138 terneras permitió detectar un total de 20 infecciones horizontales, caracterizadas por seroconversión a partir de su negatividad previa. Esta transmisión horizontal del agente de la LBE se presentó en forma independiente de la condición de la madre y de la cría al momento del parto (cuadro 12).

4. DISCUSION

Los resultados del presente estudio constituyen el primer aporte nacional respecto al efecto de la infección subclínica por el virus de la LBE sobre parámetros de importancia económica. La ausencia de relación entre producción lechera e infección está en coincidencia con observaciones previas de varios autores (Huber y col., 1981; Wu y col., 1989; Jacobs y col., 1991), y contrapone a lo comunicado por Reinhardt y col. (1988) y Brenner y col. (1989). La pequeña diferencia en producción total por lactancia a favor del grupo de vacas seropositivas, aunque estadísticamente no significativa, representa una circunstancia anteriormente mencionada por Langston y col. (1978). Ella podría estar relacionada, tal como lo ha observado Wu y col. (1989), con un eventual incremento en la susceptibilidad a la infección en individuos con mayor potencial lechero.

Debido a que en el presente estudio no se efectuaron estudios hematológicos a efectos de detectar a las subpoblaciones de seropositivas con y sin LP, no resulta posible descartar eventuales diferencias en su desempeño, tal como fuera observado por Pollari y col. (1992) y Da y col. (1993). Nuevos ensayos deberán ser emprendidos para incluir estas interrogantes sobre el posible detrimento productivo en individuos con LP. Ello abre un

Cuadro 11. Número y porcentaje de terneras con anticuerpos calostrales anti-LBE en función de la edad.

Mes de vida	1	2	3	4	5	6	7	8
n ^a con anticuerpos	51	49	41	31	13	3	2	0
% " "	100	96	80	61	25	6	4	0

Cuadro 12. Nuevas infecciones: Condición serológica de las madres y de las terneras al momento del nacimiento.

Serología Materna	Ternera Positiva	Ternera Negativa	Total
Positiva	6	2	8
Negativa	6	6	12
TOTAL	12	8	20

importante campo de investigación, ya que dichos animales representan, además, el factor de riesgo más importante para la transmisión de la enfermedad.

La ausencia de variaciones en proteínas y tenor butirométrico por efecto de la infección por el vLB, coincide con los resultados obtenidos por otros investigadores (Jacobs y col., 1991 y Heald y col. 1992). Ello se contrapone con lo informado por Wu y col. (1989), quienes determinaron una significativa disminución en el porcentaje de grasa asociado a la infección y a la LP.

Respecto al RCS, los resultados no conciden con los comunicados por Rusov y col. (1989), Scott y col. (1990), y Jacobs y col. (1995). Ello constituye una observación importante en razón del sistema de bonificación por calidad vigente en Uruguay para el pago de la leche. Si la enfermedad produjera un eventual incremento en el RCS en las vacas positivas, muchos productores del país con elevada prevalencia de la enfermedad en sus rodeos, podrían sufrir perjuicios económicos por calidad. La ausencia de tal asociación permite eliminar a la LBE como uno de los posibles factores que expliquen el problema de elevados RCS.

El efecto negativo de la infección sobre el intervalo interparto (IIP) constituye una constatación que, si bien ya ha sido formulada por otros autores (24,41), no deja de llamar la atención. La diferencia fue de elevada significación estadística y representa promedialmente un IIP prácticamente un mes mayor en el grupo de animales seropositivos. Este incremento es casi el doble del observado por Heald y col. (1992), quienes también verificaron diferencias significativas en el IIP entre ambos grupos de vacas.

El incremento del IIP en las vacas seropositivas no puede ser atribuido a un enlentecimiento en el retorno al servicio -anestro posparto-, debido a que el intervalo parto-primer servicio fue prácticamente idéntico en ambos grupos (92 vs. 94 días para las negativas y positivas, respectivamente). Por tanto, el motivo principal se relacionaría con la disminución en el índice de concepción, que en el presente estudio se presentó en el

límite de la significación estadística ($p=0.052$).

Probablemente deban profundizarse los estudios sobre los aspectos específicamente reproductivos, a fin de corroborar los presentes resultados y extraer conclusiones definitivas al respecto.

La incidencia de enfermedades asociadas al parto se presentó en porcentajes bajos y en forma independiente de la situación serológica de las vacas. Ello indicaría que la enfermedad no posee ningún efecto de predisposición frente a las patologías puerperales analizadas en el estudio.

En los establecimientos y animales en seguimiento el índice general de refugo fue bajo con relación a lo observado en otros países. La inexistencia de asociación entre refugo e infección coincide con lo comunicado por Huber y col. (1981), Heald y col. (1992) y Jacobs y col. (1995), en contraposición con lo observado por Thurmond y col. (1985), Brenner y col. (1989) y Pollari y col. (1993). Con respecto a las causas específicas de refugo, se debe destacar que la más importante fue la muerte, seguida por el descarte debido a la edad, circunstancia que se presentó similar entre vacas positivas y negativas. No obstante, importa señalar que el refugo por infertilidad fue mucho más frecuente en las seropositivas, aunque el número de observaciones efectuadas no permite plantear generalizaciones.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la condición serológica de las vacas y el refugo pueden ser independientes una de la otra, pero contener un factor en común que influya tanto a la susceptibilidad a la infección como el refugo (Heald y col., 1992).

La ausencia de efectos detectables de la infección por el vLBE sobre los parámetros productivos analizados constituye un resultado a destacar. El mismo representa la primera información generada a nivel nacional sobre el tema y aporta un elemento de juicio de interés que puede ser manejado tanto a nivel de predio como por parte de quienes tienen la responsabilidad de establecer las normas de control sanitario.

En el presente ensayo no se ha encontrado relación entre la infección por el VLB y los principales parámetros séricos relacionados con el metabolismo de vacas en producción, lo que confirma observaciones previas de otros investigadores ⁽²⁵⁾. Tampoco se han detectado alteraciones en los niveles de IgG séricas en las terneras en relación con su condición serológica. Ello debe ser atribuido a que en dicha categoría, la inmensa mayoría de los casos positivos son debidos a la absorción de anticuerpos colaterales maternos en ausencia de infección ^(2,22,36,48,52).

El estudio confirma que la condición serológica de la madre posee una fuerte influencia sobre la observada en las crías luego del nacimiento, circunstancia unánimemente observada por los investigadores ^(17,18,20,25). Sin embargo, cabe resaltar que el 25% de las terneras hijas de vacas positivas no evidenciaron la presencia de anticuerpos séricos de origen materno, lo que indica que no necesariamente en esos casos todas las terneras resultan positivas. El porcentaje se presenta similar al comunicado en Chile por Villouta y col. (1990). Sin embargo, es más llamativa y difícil de explicar la seropositividad evidenciada en el 20% de las terneras hijas de vacas seronegativas, circunstancia que ya ha sido discutida por otros autores ⁽¹²⁾. Si bien puede existir algún caso de error de identificación y registro, éstos no podían adquirir tal magnitud en los establecimientos estudiados. Otra posible explicación es la absorción de anticuerpos colostrales luego de que las terneras se retiraron de sus madres y pasaron a tomar mezcla de calostro y leche de varias vacas. Estos casos se relacionarían con una permanencia al pie de la madre inferior a las 36-48 h y a una prolongada capacidad intestinal de absorción de anticuerpos.

El ensayo permitió corroborar la prolongada persistencia (varios meses) de los anticuerpos pasivos en las terneras, en ausencia de infección. Los anticuerpos van declinando progresivamente, y al quinto mes desaparecieron en el 75% de los animales. Sin embargo, algunos de ellos se mantienen seropositivos hasta el séptimo mes. Tal circunstancia confir-

ma la recomendación formulada por los investigadores respecto a no interpretar como infectados a animales seropositivos menores de 8-10 meses de edad ^(2,6,17,25,35,36).

Se sospecha infección vertical o intrauterina al menos en 5 de las terneras nacidas de madres seropositivas; de lo contrario, se trataría de infecciones adquiridas luego del nacimiento, mientras todavía se mantenían presentes anticuerpos de naturaleza calostrales. Mediante las técnicas utilizadas en este ensayo no fue posible diferenciar ambas situaciones, y en próximos estudios se recurrirá a técnicas que pongan directamente en evidencia la presencia del provirus, como es el caso de PCR ^(28,34).

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio permiten establecer las primeras respuestas de la investigación nacional respecto al eventual impacto económico de la LBE, en establecimientos lecheros comerciales. La ausencia de repercusiones de la infección subclínica sobre los parámetros productivos permite orientar las investigaciones hacia otros aspectos fundamentales de la enfermedad. En tal sentido se recomienda profundizar las investigaciones en los aspectos relacionados con el desempeño reproductivo de los rodeos infectados, en un enfoque global de los problemas de infertilidad.

Las variaciones observadas en el IIP y servicios/concepción constituyen aspectos fundamentales y que deberán ser considerados prioritariamente. Asimismo, también sería conveniente evaluar el desempeño de las dos subpoblaciones seropositivas, a los efectos de evitar enmascarar los posibles impactos negativos de los animales con LP cuando se analizan junto al resto de los seropositivos. La inclusión de técnicas biomoleculares, como el PCR, posibilitará además detectar y cuantificar al provirus y establecer los grupos de riesgo más importantes dentro de los rodeos.

Para realizar las investigaciones propuestas, se deberá organizar un grupo de estudio multidisciplinario e interinstitucional, que perseguirá un mayor conocimiento epidemiológico de la enfermedad y permitirá ofrecer respuestas concretas sobre los reales efectos de la misma en los establecimientos afectados.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a todas aquellas Instituciones y personas que permitieron la realización del presente estudio. Un reconocimiento en particular para:

- El Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por su colaboración financiera;
- La Facultad de Veterinaria, por su apoyo institucional y operativo;
- A los Doctores Juan Villamil y Gabriel García Pintos, por su directa participación en las tareas de campo;
- A los señores González Victorica y a Viotti Hnos., y a aquellos otros que, solicitando el anonimato, permitieron concretar el desarrollo de la fase experimental;
- Al Dr. Alvaro Nuñez y a la Sra. Gladys González, por su colaboración en las actividades de laboratorio.
- A Conaprole, y en particular a los doctores Omar Landeira y Raquel Bianco, y al Ing. Quím. Dopesso por el procesamiento de las muestras de leche.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANGELINO, J.L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E.H. (1992). Estudio epidemiológico de la Leucosis Enzoótica de los bovinos en rebaño bovino lechero de la raza Holandesa Negra y Blanca. XIII Congr. Panam. Cien. Vet (Chile) 1992 P 196
2. ANUARIO DE SANIDAD ANIMAL (1994) n. 34. FAO-OIE-WHO. Roma 250p.
3. BRENNER, J. & TRAININ, Z. (1989^a). Bovine Leukosis Virus. A Review, with emphasis on Israeli aspects. Israel J. Vet. Med. 45(2):95-105.
4. BRENNER, J.; VAN-HAAM, M.; SAVIR, D.; TRAININ, Z. (1989b). The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. Vet. Immunol. Immunopathol. 22:299-305, 1989b
5. BRENNER, J.; MOOS, S.; MOALEM, U. (1994). A comparative study of the Elisa and Agid techniques for the detection of Bovine Leukosis virus antibodies in bovine serum and milk. Israel Vet. J. 49(4):165-167
6. BRUNNER, M.A.; LEIN, D.H.; DUBOVIE, J. (1997). Experiences with the New York State Bovine Leukosis virus eradication and certification program. Vet. Clin. North Am. 13(1):143-150.
7. CHIBA, T.; HIRAGA, M.; AIDA, Y.; AJITO, T.; ASAHINA, M.; WU, D.; OHSHIMA, K.; DAVIS, W.C.; OKADA, K. (1995). Immunohistologic studies of subpopulations of lymphocytes in cattle with Enzootic Bovine Leukosis. Vet. Pathol. 32(5): 513-520.
8. COLLAZO, L.; NAVARRO, M.; TONNA, T.; LAVARELLO, L.; MARTINICORENA, M.; BOTTA, G.; FORRISI, G.; GRIFFIN, C.; GARGANO, A.; SARKIS, M.; PEREYRA, R.; AGUIRRE, G. (1996). Leucosis Bovina Enzoótica en la Cuenca Lechera de Salto. VI Congr. Nal. Vet (Montevideo) 11-15 nov.
9. COUDERT, M.; FEDIDA, M. (1991). Actualites en Epidemiologie Animale: situation sanitaire de la France en Pathologie Bovine. Sci.Vét.Méd.Comp. 93(1/2):33-46.
10. DA, Y.; SHANKS, D.; STEWARD, J.A.; LEWIN, H.A. (1993). Milk and fat decline in bovine Leukemia virus-infected Holstein cattle with Persistent Lymphocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6538- 6541.
11. DETILLEUX, J.C.; FREEMAN, A.E.; MILLER, L.D. (1991). Comparison of natural transmission of bovine leukaemia virus in Holstein cows or two genetic lines selected for high and average milk production. AM.J.Vet.Res. 52(9):1551-1559.
12. DIMMOCK, C.K.; CHUNG, Y.S.; MACKENZIE, A.R. (1991). Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herd. Austr.Vet.J. 68(7):230-233.
13. EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. (1992). Relationship between herd Bovine Leukemia Virus infection status and reproduction, disease

- incidence and productivity in Swedish dairy herds. *Prev.Vet.Med* 12(3):121-131.
14. EVERMANN, J.F. & JACKSON, M.K. (1997). Laboratory diagnostic test for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet.Clin. North Am.* 13(1):87-106.
 15. GUARINO, H.; SAIZAR, J.; SIENRA, R. (1989). Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. XVII Jorn. Urug. Buiatría, Paysandú (Uruguay) c.c.4:1-7
 16. GUARINO, H.; CAPANO, F.; GIL, A. (1991). Leucosis Bovina Enzoótica: relevamiento serológico en establecimientos del sur del país. II Jorn.Téc.Fac.Vet. (Montevideo) Nov.14-16, p.40.
 17. HEALD, M.T.S.; WALTNER-TOEWS, D.; JACOBS, R.M. MCNAB, W.B. (1992). The prevalence of antibovine leukemia virus antibodies in dairy cows and association with farm management practices, production and culling in Ontario. *Prev.Vet.Med.* 14(1):45-55.
 18. HOPKINS, S.G. & DIGIACOMO, R.F (1997). Natural transmission of Bovine Leukemia virus in Dairy and beef cattle. *Vet.Clin. North Am.* 13(1):107-128.
 19. HUBER, N.L.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMANN, J.F.; STUDER, E. (1981^a). Bovine Leukemia virus infection in a large Holstein herd: cohort -analysis of the prevalence of antibody-positive cows. *Am.J.Vet.Res.* 42(9): 1474-1476.
 20. HUBER, N.L.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMANN, J.F.; STUDER, E. (1981^b). Bovine Leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. *Am.J.Vet.Res.* 42(9):1477-1481.
 21. HUCI, N.; SEGADE, G.; RAMIREZ, V.; GONZALEZ, A. Diagnóstico de Leucosis Bovina Enzoótica en Rodeo Lechero de Exportación. *Vet.Arg.* 12(121):17-22
 22. ISLAS, A.; LOPEZ, J.; MONTES, G.; BORQUEZ, F (1992). Detección de anticuerpos de la Leucosis Bovina Enzoótica en terneros de lechería alimentados con calostro de vacas seropositivas en los primeros meses de vida. *Avan.Cienc.Vet.* 7(1):51-55.
 23. JACOBS, R.M.; HEENEY, J.L.; GODKIN, M.A., LESLIE, K.E.; TAYLOR, J.A.; DAVIES, C.; VALLI, V.E.O. (1991). Production and related variables in Bovine Leukemia virus-infected cows. *Vet.Res. Commun.* 15:463-474.
 24. JACOBS, R.M.; POLLARI, F.L.; MCNAB, E.B.; JEFFERSON, B. (1995). A serological survey of Bovine Syncytial virus in Ontario. Associations with Bovine Leukemia and Immunodeficiency like viruses, production records and management practices. *Can. J. Vet. Res.* 59(4):271-278.
 25. JOHNSON, R. & KANEENE, B. (1992). Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet.Bull.* 62(4):278-312.
 26. KNAPEN, K.; KERKHOF, P.; MAMMERICKX, M. (1993). Eradication de la Leucose Bovine Enzootique en Belgique: bilan du déspistage de masse réalisé sur l'ensemble du chaptel national en 1989,1990 et 1991. *Ann.Méd.Vét.* 137(3):197-201.
 27. LONGSTON, A.; FERDINAND, G.A.; RUPPANNER, R. YCOL. (1978). Comparison of production variables of bovine leukemia virus antibody-negative and antibody-positive cows in two California dairy herds. *Am.J.Vet.Res.* 39:1093-1098.
 28. LLAMBI, S.; DIANA, V.; DE TORRES, H.; GUEVARA, K.; SKAPINO, M.; SAIZAR, J. (1996). Diagnóstico molecular (Técnica de DA-PCR) y aspectos citogenéticos de la Leucosis Bovina Enzoótica. VI Congr. Nal. Vet (Montevideo) 11-15 nov..
 29. LUCAS, M.H.; ROBERTS, D.H.; BANKS, J. Shedding of Bovine Leukosis virus in nasal secretions of infected animals. *Vet.Rec.* 132(11):276-278,1993
 30. MAMMERICKX, M.; ANTOINE, O.; BURNY, A.; DESMECHT, M.; KERHOF, P.; PALM, R.; PORTETELLE, D.; WELLEMANS, G.; WYFFELS, R. (1989). Etude des relations entre l'infection par le BLV (Bovine Leukemia Virus), la lymphocytose persistente et les infections par d'autres agents infectieux dans un troupeau de bovins. *Ann.Méd.Vét.* 133(6):515-524.
 31. MEDEROS, A. & IRIGOYEN, D. (1998). Relevamiento epidemiológico de diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina y leucosis bovina en predios lecheros del noreste de Uruguay XXVI Jor. Urug. Buiatría (Paysandú) 18-20 junio, pág.19-20.
 32. MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET, FRANCE. Decret n. 901223 du 31 dec. 1993. *J. Off. Republ.Francaise.* 1er. Janvier 1991 p.29-30
 33. MOLLOY, J.B.; DIMMOCK, C.K.; EAVES, F.W.; BRUYERES, A.G.; COWLEY, J.A.; WARD, W.H. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. *Vet. Microbiol.* 39: 323-333,1994

34. MURTAUGH, M.P.; LIN, G.F.; HAGGARD, D.L.; WEBER, A.F.; MEISKE, J.C. (1991). Detection of Bovine Leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J.Virolog.Meth.* 33(1):73-85.
35. OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE) (1990). *Enfermedades Animales por Retrovirus: La Leucosis Bovina Enzoótica.* 58a Sesión, París. 33p.
36. PELZER, K.D. & SPRECHER, D.J. (1993). Controlling BLV infection on dairy operations. *Vet.Med.* 88(3):275-281.
37. PELZER, K.D. (1997). Economics of Bovine Leukemia virus infection. *Vet.Clin. North Am.* 13(1):129-141.
38. POLLARI, F.L., WAUGSUPHACHART, V.L.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMANN, J.F. (1992). Effects of Bovine Leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can.J.Vet.Res.* 56(4): 289-295.
39. POLLARI, F.L.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMANN, J.F. (1993). Use of survival analysis to compare cull rates between bovine leukemia virus seropositive and seronegative dairy cows. *Am.J.Vet.Res.* 54(8):1400-1403.
40. POLLARI, F.L.; HOPKINS, S.G.; DIGIACOMO, R.F.; EVERMANN, J.F. (1993). Periparturient transmission of Bovine Leukosis virus in dairy cattle. *Vet.Rec.* 132(8):190- 191.
41. REINHARDT, G.; HOCHSTEIN, C.; MINTZEL, V.; REIDEMANN, H.; LEAL, H.; NIEDDA, M. (1988). Estudio serológico de Leucosis Enzoótica bovina en un predio de la provincia de Valdivia y su relación a parámetros productivos y reproductivos. *J. Vet. Med.* 35:178-185.
42. RUSOV, C.; ZIVKOVIC, R.; JOJIC-MALICEVIC, J.; PESIC, O. (1989). A study of Persistent Lymphocytosis and somatic cell count in the milk of cows infected with the Enzootic Leukosis virus. *Folia Vet.* 33(1):55-61.
43. SCOTT, M.L.; SMITH, T.T.; KELLOGG, D.W.; MAUROMOUSTAKOS, A. (1990). Comparison of milk yield and quality of dairy cows that tested seropositive for bovine leukemia virus. *J. DairySci.* 73(suppl.1):262.
44. SERVICIO AGRICOLA GANADERO. MINISTERIO DE AGRICULTURA DE CHILE (1992). *Sistema de Certificación de Predios Libres de Leucosis Bovina Enzoótica.* 14p.
45. SIENRA, R.; BONNEVAUX, J.; MARTINO, P. (1983). Descripción de un caso clínico de Leucosis Bovina en una ternera de 10 meses de edad. *XI Jorn.Urug. Buiatría, Paysandú (Uruguay)* cc.4:1-7
46. SIENRA, R. & GUARINO, H. (1991). Prevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras de leche mezcla de tambos de Canelones, Colonia y San José. *II Jor. Téc. Fac. Vet. (Mont)* p.41..
47. SIENRA, R.; GUARINO, H.; GIL, A.; NUÑEZ, A.; VILLAMIL, J. (1996^a). Leucosis Bovina Enzoótica: efecto de la condición serológica de las vacas sobre las crías luego del nacimiento y a los 18 meses de edad. *XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET).* Campo Grande, MS (BRASIL) PN9-481.
48. SIENRA, R.; GUARINO, H.; GIL, A.; NUÑEZ, A.; VILLAMIL, J. (1996^b). Duración de los anticuerpos calostrales contra el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en terneros de campo. *VI Congr.Nal.de Vet. (Uruguay).*
49. SIENRA, R.; NUÑEZ, A.; GONZALEZ, A.; CERETTA, M.E.; GUARINO, H.; MORON, C. (1998). Características Hematológicas en relación a la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en ganado Lechero. *XXVI Jor.Urug.Buiatría, Paysandú (Uruguay).* p.23-25.
50. THURMOND, M.C.; MADEN, C.B.; CARTER, R.L.. Cull rates of dairy cattle with antibodies to leukemia virus. *Cancer Res.* 45:1987-1989, 1985.
51. THURMOND, M.C.; CARTER, R.L.; PICANSO, J.P.; STRALKA, K. (1990). Upper-normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with Bovine Leukemia virus. *Am.J.Vet.Res.* 51(3):466-470.
52. VILLOUTA, G.; SEGOVIA, P.; MONTES, G.; DURAN, Y. (1990). Duración y títulos de anticuerpos calostrales antiviral Leucemia Bovina y transmisión natural de la infección en terneras de un predio de la región Metropolitana, Chile. *Avances Cien.Vet.* 5(2):114-118.
53. WU, M-C.; SHANKS, R.D.; LEWIN, H.A. (1989). Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical Bovine Leukemia Virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(2):993-996.

Maisonnave J. (1)
Rossi S. (2)
Acosta D. (3)
Hernández S. (1)
Terzaghi A. (1)
Pignataro G. (1)
Colina R. (2)

(1) Dres. en Medicina Veterinaria.

(2) Bach.

(3) Técnico agrario.

EVALUACION DE TECNICAS SEROLOGICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FASCIOLOSIS ANIMAL

FPTA 25

Período Ejecución: Oct., 1991-May., 1995

RESUMEN

Fasciola hepática, vulgarmente conocida como «Saguaypé», es el agente de la fasciolosis, una de las zoonosis más importantes en el Uruguay. Las pérdidas ocasionadas por las infecciones en ovinos y bovinos han sido estimadas en el orden de los 30 millones de dólares anuales.

Las técnicas diagnósticas existentes (que utilizan métodos coproparasitológicos) son poco sensibles y detectan la parasitosis en la fase crónica. Por lo tanto, a pesar de que existen drogas fasciolicidas efectivas, el tratamiento se realiza en forma empírica en los períodos de mayor incidencia, lo que resulta muchas veces en gastos inútiles, dado que ya se ha producido el daño hepático.

Los trabajos de investigación realizados en el marco del presente proyecto han culminado en el desarrollo de las pruebas inmunodiagnósticas ELISA, como técnica de referencia, y DOT-BLOT, de aplicación masiva y a campo. Asimismo, los antígenos de Fasciola hepática se purificaron mediante técnicas de afinidad negativa con el propósito de disminuir la reacción cruzada con otras parasitosis.

Las pruebas inmunodiagnósticas desarrolladas permiten identificar los bovinos infectados con Fasciola hepática dos semanas post-infección, lo que permite identificar infección activa temprana y de esta forma facilitar la implementación de medidas de control eficientes por parte de los productores.

1. INTRODUCCION

La producción de carne, lana, leche y cueros, derivados de la actividad ganadera ovina y bovina, cumple un rol clave en la economía del Uruguay.

La importancia económica de la infección de *Fasciola hepática* en la producción pecuaria ha sido cuantificada en varios países, constatándose una reducción del 5.5% en la producción de leche y un 12 y 15% en la producción de carne ovina y bovina respectivamente; así como también importantes trastornos reproductivos y pérdidas por decomisos de hígados (2, 8).

Uruguay posee un stock de más de 15 millones de ovinos y 10 millones de bovinos, aproximadamente, explotados en un régimen de pastoreo mixto, más importantes y de mayor impacto económico en nuestro país. La infección animal se encuentra distribuida en forma endémica en todo el territorio nacional (9,10). Los datos de prevalencia en bovinos oscilan entre 50 y 60% (10,12). A partir de datos parciales de nuestro país (11) se estima que esta enfermedad causa enormes pérdidas eco-

nómicas, cuyo monto total se acerca a US\$ 30 millones anuales. Las pérdidas no se dan sólo por las vísceras decomisadas (muchos kilos de proteína no consumidos) sino además porque causa disminución de la producción. A las pérdidas por decomiso y baja producción se deberían agregar unos US\$ 3 millones anuales por compra de fasciolicidas.

En la actualidad el diagnóstico veterinario de fasciolosis se realiza utilizando métodos coproparasitológicos (conteo de huevos en las heces, que se evidencian a partir de 12 semanas post-infección). Dicha técnica tiene varios inconvenientes o desventajas: es poco sensible y diagnóstica solamente el estado crónico de la enfermedad en animales con alta carga parasitaria (20), lo que lleva muchas veces a la utilización de drogas costosas cuando la mayoría de los daños tisulares ya se han producido. Los exámenes coproparasitarios requieren de infraestructura (equipos de laboratorio) y de gente entrenada. Las pruebas de diag-

nóstico serológico pueden ser mucho más sensibles que las pruebas parasitológicas.

Estudios realizados en Bolivia han arrojado que las cifras de prevalencia determinadas con pruebas serológicas han aumentado hasta un 85% con respecto a cuando se emplean métodos coproparasitarios.

Los resultados obtenidos dentro del marco de este proyecto, han demostrado que 2 semanas post-infección es posible detectar bovinos infectados con *Fasciola hepática* utilizando pruebas serológicas.

Este hallazgo es de gran importancia dado que demuestra que es factible diagnosticar y tomar las medidas necesarias antes de que el parásito dañe al hígado.

Durante el desarrollo de este proyecto también se confirmó que lo más importante en el desarrollo de una prueba inmunodiagnóstica es la fuente de antígeno.

EPIDEMIOLOGIA Y CONTROL DE *Fasciola hepática* EN URUGUAY

Fasciola hepática es considerada en el mundo como una de las enfermedades parasitarias más importantes de los rumiantes domésticos. Se ha estimado que un 25% de la población total de ovinos y bovinos del mundo pastorean en áreas donde *Fasciola hepática* está presente y el medio es favorable para su mantenimiento y dispersión.

Los daños más notorios provocados por muerte de animales son sólo una fracción de las pérdidas económicas que produce el estado subclínico y crónico de la enfermedad, que se manifiesta en: reducción en la producción de carne, lana, y leche, decomisos de hígado, infecciones secundarias por bacterias, interferencias en la fertilidad y gastos derivados de su tratamiento antihelmíntico.

En el Uruguay, la elevada tasa de prevalencia (57%), la utilización de grandes áreas con pastoreo conjunto con ovino y el uso corriente de fasciolicidas como agentes químicos para el control de la enfermedad, en un marco de acelerado crecimiento de subsectores con características diferentes a la ganadería extensiva (feed-lot/lechería), motivaron la formación de grupos especializados en el tratamiento del tema.

El parásito y su ciclo biológico

Su biología es más complicada que la de los nematodos gastrointestinales. En su ciclo biológico pueden reconocerse por lo menos cuatro subpoblaciones, con la intervención de dos tipos de huéspedes, capaces de aumentar las poblaciones parasitarias a través de la producción de huevos (huésped definitivo) y cercarias (huésped intermediario). Las subpoblaciones de *Fasciola hepática* serán afectadas por distintos factores según la etapa de la vida en que se encuentren:

En el huésped definitivo. Esta etapa se extiende desde que el huésped ingiere la metacercaria hasta la producción de huevos por el parásito adulto. en el bovino dura de 8 a 14 semanas y está afectado por el estado inmunitario y por el número de metacercarias que ingiere.

Vida Libre I. Los huevos salen con las materias fecales al medio ambiente donde se desarrolla a miracidio. Esta etapa es regulada por la temperatura y humedad.

En el huésped intermedio. El miracidio penetra en un caracol del género *Limnaea* y evoluciona a esporocito, redia y cercaria en 4 a 10 semanas. Esta evolución depende del caracol, el grado de infección, humedad y temperatura.

Vida Libre II. Se produce luego de la expulsión de las cercarias por el caracol y su enquistamiento en formas infestantes denominadas metacercarias. La factibilidad de la *Fasciola hepática* complete su ciclo, está dada por la sobrevivencia de las metacercarias y su coincidencia con el huésped definitivo.

Todos estos factores actúan regulando las poblaciones de *Fasciola hepática* y determinan los distintos aspectos epidemiológicos de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es el desarrollo de una prueba inmunológica para el diagnóstico de *Fasciola hepática* en bovinos, de aplicación a campo. El trabajo planteó los siguientes objetivos específicos:

- a. Obtención de antígenos (ags), estandarización de su producción y determinación de la mejor época de recolección del parásito.
- b. Identificar y caracterizar primariamente ags de valor diagnóstico, mediante las técnicas de ELISA y Electroinmunotransferencia (Western-Blot). Esto implica:
 - * estandarizar las técnicas de ELISA y Western-Blot, como técnicas de referencia.
 - * Utilizar dichas técnicas en bovinos y conejos natural y experimentalmente infectados.
 - * Identificar y estudiar el rol de los epítopes de fosforilcolina, glucídicos y polipeptídicos contenidos en los antígenos de *Fasciola hepática*.
 - * Estudiar las posibles reacciones cruzadas con otras parasitosis bovinas comunes en nuestro país.
- c. Estudiar la cinética de la respuesta inmune-humoral en conejos infecta-

dos y re infectados con *Fasciola hepática* y dosificados con fasciolicidas.

Se trata de ver la cantidad o título de anticuerpos (acs) detectables que induce la infección, reinfección y qué sucede con el título de acs luego de la dosificación con fasciolicida, es decir cuándo comienza a bajar el título o cantidad de acs. Esto se hizo en conejos porque es más económico.

- d. Purificar los ags de *Fasciola hepática* con el propósito de disminuir al mínimo las reacciones cruzadas con otros parásitos que infectan normalmente a los bovinos en las condiciones de cría de nuestro país. Las reacciones cruzadas van en desmedro de la especificidad de cualquier técnica de diagnóstico.
- e. Seleccionar y estandarizar pruebas inmunodiagnósticas para fasciolosis en rumiantes de aplicación masiva.
- f. Evaluar la capacidad diagnóstica de dichos antígenos mediante las técnicas seleccionadas (punto 5) en animales infectados natural y experimentalmente.

En la ejecución del proyecto se mantuvo estrecha colaboración con técnicos de la Facultad de Veterinaria, el Departamento de Parasitología del DILAVE (Dirección de Laboratorios Veterinarios, MGAP) y del Laboratorio de Desarrollos Biotecnológico de Reactivos de

Inmunodiagnóstico de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química.

3. METODOLOGIA

3.1. Estandarización de la producción de ags de *Fasciola hepática*

3.1.1. Recolección de *Fasciola hepática* parásito

Se recolectaron parásitos en frigorífico durante todos los meses del año; se concurrió con periodicidad semanal. Se extrajeron antígenos de Excreción/Secreción (E/S) y de superficie únicamente con los parásitos que llegaban vivos al laboratorio y estaban enteros.

3.1.2. Estudios sobre condiciones de transporte del parásito desde el frigorífico al laboratorio

Los parásitos se extrajeron de hígados de bovinos en playa de faena y se transportaron en PBS y en bilis bovina a temperatura ambiente y a 37°C.

3.1.3. Identificador del inhibidor

Identificación del inhibidor de proteasas más conveniente para utilizar durante la preparación de antígenos.

3.1.4. Producción de antígenos

Producción de antígenos de *Fasciola hepática* (E/S y de superficie).

3.2. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

3.2.1. Estandarización de la técnica de ELISA para *Fasciola hepática* utilizando antígenos de E/S y de superficie.

- a. Se determinó mediante la técnica de Saturación con Peroxidasa la concentración de antígeno que satura cada pocillo en la microplaca. En base al valor de saturación obtenido se encontró la concentración de antígeno que diferencia mejor positivo de negativo, utilizando la técnica de damero.
- b. Se estudió el comportamiento de varias soluciones bloqueantes a efectos de elegir la que funcionara mejor en el sistema *Fasciola hepática*.

TECNICAS INMUNO ENZIMATICAS

Tanto la técnica de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Elisa) como de Dot-blot, tienen el mismo principio: el antígeno se pega (sensibilización) en placas de poliestireno de 96 hoyos o nitrocelulosa respectivamente. Luego se bloquean los espacios libres de antígeno con una proteína neutra, se incuban los sueros problema y luego se lava para remover los anticuerpos que no están unidos específicamente al antígeno.

Posteriormente se le agrega anti-inmunoglobulina bovina conjugada a peroxidasa y se lava nuevamente para remover los anticuerpos conjugados que no se pegaron específicamente a los anticuerpos bovinos.

Por último se le agrega sustrato y en los hoyos o lugares de la nitrocelulosa que sí existe enzima (peroxidasa conjugada a la anti-inmunoglobulina bovina) está degradada el sustrato y se desarrolla color. En los hoyos o lugares donde el suero bovino no contenía anticuerpos anti *Fasciola hepática*, no hay desarrollo de color.

- c. Se evaluaron distintas diluciones de sueros de bovinos y conejos para determinar la dilución óptima a utilizar en la técnica.

3.2.2. Evaluación de la reactividad

Evaluación en los sueros animales (vacunos y conejos) infectados natural y experimentalmente con *Fasciola hepática*, con antígenos del mismo parásito (E/S y de superficie) mediante la técnica de ELISA.

3.3. Técnica de electroinmunotransferencia (Western-blot)

3.3.1. Estandarización de la técnica de Western-blot para *Fasciola hepática*

Utilizando antígenos de E/S. Se estudió el comportamiento de 5 agentes bloqueantes, la dilución de sueros a usar y la concentración a utilizar para los conjugados de fosfatasa.

3.3.2. Identificación de fracciones antigénicas de posible valor diagnóstico

Se estudiaron las bandas de reacción de sueros de bovinos infectados con *Fasciola hepática* enfrentados a ags de E/S. También se estudió el comportamiento de sueros de conejos experimentalmente infectados con *Fasciola hepática* frente a ags de E/S. En ambos casos se utilizaron conjugados de fosfatasa específicos, preparados en laboratorio.

3.3.3. Determinación de la presencia e importancia de epítopes glucídicos

Se realizaron pruebas con antígenos de E/S de *Fasciola hepática* y de superficie de *Paramphistomum* spp. para determinar la presencia de epítopes glucídicos en los mismos. Para ello, los antígenos se trataron previamente con periodato de sodio. Dicho tratamiento se realizó antes y después del bloqueo. Los sueros

bovinos y de conejo (de infección experimental) se enfrentaron paralelamente a los antígenos tratados y no tratados. Posteriormente se compararon las bandas de reacción con los antígenos con y sin tratamiento.

3.3.4. Determinación de la presencia e importancia de los epítopes lipídicos

Las distintas preparaciones antigénicas se pasaron por una columna de heparina con el propósito de retener la mayoría del contenido lipídico de dichos antígenos. Luego ambos antígenos antes y después del pasaje por la columna fueron probados por las técnicas de ELISA y Western Blot.

3.3.5. Estudios de reacción cruzada

Se comenzaron los estudios de reacción cruzada con otras parasitosis comunes en rumiantes. Se estudió el comportamiento de sueros de bovinos y conejos infectados experimentalmente con metacercarias de *Fasciola hepática* frente a antígenos de superficie de *Paramphistomum* spp., mediante las técnicas de ELISA y Western blot. Se compararon los resultados con los de los antígenos de *Fasciola hepática*. También se estudiaron mediante la técnica de ELISA el comportamiento de sueros de bovinos de distintos grupos: bovinos con Quiste Hidático, animales provenientes de un área con problemas de paramfistomiasis y sin la presencia del huésped intermediario *Limnea viatrix*.

3.3.6. Purificación de los antígenos de superficie

Los antígenos de *Fasciola hepática* fueron purificados por afinidad negativa. Dichos antígenos fueron pasados por una columna de sefarosa activada con bromuro de cianógeno al cual se acopló la fracción gamaglobulina de suero de conejo hiperinmune a *Paramphistomum* spp. El antígeno de superficie de *Paramphistomum* spp. se purificó de la misma manera pero la columna tenía acoplado suero hiperinmune a *Fasciola hepática*. Con el propósito de reducir la

reacción cruzada observada con sueros de bovinos infectados con quiste hidático, en un segundo paso, ambos antígenos fueron repurificados por afinidad negativa con suero hiperinmune a quiste hidático. De aquí en más ambos antígenos doblemente purificados se indicarán con 2x.

3.4. Técnica de Dot-Blot

Las tiras de nitrocelulosa (NC) se sensibilizaron con gotas de 3 μ l a una concentración de 50 μ g/ μ l de ambos antígenos 2x. La gota del antígeno de superficie de *Fasciola hepática* se colocó en el extremo superior y la de *Paramphistomum* spp en el extremo inferior. Las tiras de NC se secaron a 37 °C durante 1 hora, luego se sumergieron en una solución de 5% de leche de soja en polvo en PBS y se dejan a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora, para saturar los lugares restantes. Una vez secas se almacenan a -20°C hasta su uso.

Los sueros a estudiar y controles se utilizaron a una dilución de 1/50 y una tira de NC sensibilizada con ambos ags y lavada se sumergía en ellos. Luego se incuban en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos específicamente se remueven mediante 3 lavados, como se mencionó. Como segundo anticuerpo se utilizó conjugado a peroxidasa anti-IgG bovina. El conjugado no pegado se remueve mediante 3 lavados y luego se utiliza un cromógeno. Después de 5 minutos a temperatura ambiente en agitación y a oscuras, la reacción enzimática se detiene lavando las tiras de NC con agua de cañilla (cuadro 1).

4. RESULTADOS

4.1. Estandarización de la producción de ags de E/S (Excreción/Secreción) somáticos y de superficie de *Fasciola hepática* y *Paramphistomus* spp.

Luego de estudio sobre forma y medio de transporte más adecuado y de identificar el inhibidor de proteasas más conveniente para utilizar durante la preparación del antígeno, se obtuvieron patrones electroforéticos reproducibles bajo las siguientes condiciones:

4.1.1. Recolección de parásitos

Se ha determinado que la época más apropiada para la recolección de parásitos es durante los meses de agosto a diciembre. En estos estudios se consideraron las siguientes variables: máxima oferta de metacercarias y épocas tradicionales del uso de fasciolicidas, vitalidad de las fasciolas, patrón electroforético.

4.1.2. Medio y temperatura de transporte

Habiéndose estudiado el medio, la temperatura y el envase para el transporte, se determinó que lo más indicado es transportar los parásitos en bilis a 37°C, en bolsas de nylon cerradas.

4.1.3. Inhibidores

Se identificó el E-64 a una concentración de 30 μ M como el inhibidor de proteasas más adecuado.

Los ags producidos sin inhibidor de proteasas se degradaron, lo que se evidenció al comparar los patrones electroforéticos.

Cuadro 1. Sueros bovinos estudiados.

Nº	Grupo	Nº Bovinos	Descripción
1	<i>Fasciola hepática</i> infectados y libres de <i>Paramphistomum</i> spp. y <i>Echinococcus granulosus</i>	67	Terneros de 6 meses de edad (n=9) infectados experimentalmente con 500 metacercarias de <i>Fasciola hepática</i> y 58 bovinos naturalmente infectados criados en pasturas donde el huésped intermediario de <i>Paramphistomum</i> spp. no existía. Se verificó la presencia de <i>F.hepática</i> y de <i>E.granulosus</i> en frigorífico.
2	NEGATIVO: Libres de <i>Fasciola hepática</i> , <i>Paramphistomum</i> spp. y <i>Echinococcus granulosus</i>	40	Terneros (n=5) y adultos (n=4) nacidos y criados en boxes y controlados mensualmente de no tener huevos de <i>F.hepática</i> en heces. Bovinos adultos (n=31) de un área libre de los huéspedes intermediarios de <i>F.hepática</i> y <i>Paramphistomum</i> spp., en playa de faena se verificó que no existían ninguno de los 2 trematodes ni quistes hidáticos.
3	Infectados con <i>E. granulosus</i> y libres de <i>F.hepática</i> y <i>Paramphistomum</i> spp.	28	Recolectados en frigorífico de una tropa con 42% de prevalencia de quiste hidático y se confirmó en faena de que estaban libres de <i>F. hepática</i> y <i>Paramphistomum</i> spp.
4	Infectados con <i>E. granulosus</i> y libres de <i>Paramphistomum</i> spp.	35	Se seleccionaron al azar de una tropa de 151 bovinos con prevalencias de 42% de <i>E.granulosus</i> y 63% de <i>F.hepática</i> . En faena se confirmó que tuvieran quiste hidático y que los higados no tuvieran <i>F.hepática</i> ni sus cicatrices.
5	Infectados con <i>E. granulosus</i> y <i>F. hepática</i> y libres de <i>Paramphistomum</i> spp.	93	Fueron seleccionados al azar de una tropa de 300 bovinos con 18% de quistes hidáticos y 18 % de <i>F. hepática</i> . En faena en 27 bovinos (grupo 5a) se comprobó la presencia de <i>F. hepática</i> y la ausencia de quistes hidáticos. En los 66 restantes (grupo 5b) se encontraron quistes y <i>F. hepática</i> .
6	Infectados con <i>Paramphistomum</i> spp. y libres de <i>F. hepática</i> y <i>E. granulosus</i> .	11	Fueron seleccionados al azar de un rodeo pastando en campos libres del huésped intermediario de <i>F. hepática</i> y el establecimiento libre de <i>E. granulosus</i> .
7	Infección mixta con <i>F hepática</i> y <i>Paramphistomum</i> spp.	24	Seleccionados al azar de un establecimiento que tenía los huéspedes intermediarios de ambos trematodes y las infecciones fueron confirmadas por el hallazgo de huevos en heces.

4.1.4. La producción de ags se estandarizó y se utilizaron únicamente los lotes que mostraban el mismo patrón electroforético

En un principio se seleccionó el ag de E/S en vez del somático porque los distintos lotes del ag de E/S eran más

uniformes. En una segunda etapa se estudió la posibilidad de utilizar como ag para todas las pruebas los ags de superficie. Al no haber diferencia en las distintas pruebas se optó por el ag de superficie, dado que éste rinde 100 veces más.

4.2. IDENTIFICACION DE FRACCIONES ANTIGENICAS DE POSIBLE VALOR DIAGNOSTICO

4.2.1. Resultados Western-blot

Los sueros de bovinos infectados naturalmente, permitieron identificar tres grupos de bandas de reacción: por encima de 97 kda., entre 66 y 31 kda. y por debajo de 21 kda.. Se identificó una tríada de bandas de reacción por encima de 97 kda. enfrentando antígenos de E/S con los sueros de bovinos y conejos infectados experimentalmente entre la semana 2 y 8 post-infección (SPI). Esta tríada de bandas de reacción identificadas con ags de E/S podría ser útil para el diagnóstico de fasciolosis temprana, dado que son reconocidos entre 2 y 8 SPI.

En ambos antígenos y en ambas especies otras bandas por debajo de 66 kda que aparecen 5-6 SPI y se mantienen a lo largo de la infección (22 SPI en conejos y 12 SPI en bovinos) podrían utilizarse como marcadores de infección más avanzada. Ninguna de las bandas mencionadas anteriormente fue identificada por los sueros controles negativos.

4.2.2. Resultados ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay)

El ELISA se desarrolló para utilizar en el laboratorio como técnica de referencia. Se determinó que la concentración óptima de antígeno a ser utilizado para la sensibilización de las placas corresponde a 10 µg/ml (100 µl/pocillo) en PBS pH 7.2 para todas las preparaciones antigénicas utilizadas, incubándolas 2 h a 37°C y 14 h a 4°C.

El agente bloqueante más apropiado para el sistema *Fasciola hepática* y *Paramphistomum* spp. es la leche de soja al 5% en PBS, 150 µl/pocillo durante 1 h a 37°C.

La dilución óptima de los sueros bovinos para la técnica es 1/1000 y de los sueros de conejos 1/200, utilizando como

diluyente 5% de leche de soja en PBS-Tween 20 al 0.05%, incubando durante 1h a 37°C. La incubación del segundo anticuerpo (conjugado anti-IgG bovina o de conejo) es de 1h a 37°C debiéndose determinar la dilución óptima para cada lote.

Los conejos infectados con 50 metacercarias vía oral mostraron niveles de anticuerpos anti- *Fasciola hepática* a partir de 2 SPI, con un máximo a las 6 SPI. A partir de las 14 SPI el nivel de acs comienza a descender lentamente.

El estudio de los sueros bovinos de infección experimental (500 metacercarias vía oral) mostró que los sueros correspondientes a las semanas 2-3 SPI presentan concentraciones de acs importantes, estableciéndose un nivel estable (meseta) a partir de las semanas 5-6, que se mantiene a lo largo de la infección.

4.3. Cinética de la respuesta inmune humoral en conejos

El ELISA de titulación de los sueros de los conejos de los cuatro grupos permitió observar que 2 semanas después de los tratamientos con fasciolida, el título de anticuerpos caía bruscamente.

En el grupo de conejos infectados y reinfectados, también se observó que 1 semana post reinfección (SPR) se comenzaba a notar el efecto booster llegando al máximo 12 SPR (sube el título). Mientras, en el grupo de conejos infectados, tratados con fasciolida y reinfectados, el efecto «booster» (efecto refuerzo: sube el título de Acs luego de una segunda dosis de antígeno) se ve recién a las 3 SPR, posiblemente debido al efecto residual del fasciolida.

Estos hallazgos, una vez confirmados mediante la realización de esta misma experiencia en los huéspedes naturales de *Fasciola hepática* (bovinos u ovinos) podrían servir para evaluar el resultado de los tratamientos con fasciolida.

4.4. Determinación de la presencia y rol de los epitopes glucídicos

No se observaron diferencias relevantes en el tratamiento de los antígenos antes y después de la etapa de bloqueo, por lo que se optó por el segundo método.

Las pruebas realizadas con sueros de conejos infectados experimentalmente mostraron disminución en la intensidad de las bandas cuando los ags de *Fasciola hepática* son tratados con periodato.

En el caso del ag somático de *Paramphistomum* spp., el tratamiento con periodato eliminó la mayor parte de las bandas que reaccionaban con los sueros de conejos con fasciolosis experimental.

El estudio de epitopes glucídicos mediante la técnica de ELISA mostró, en general, que el tratamiento del antígeno de E/S con periodato de sodio, es significativo tanto para los sueros positivos como para los negativos ($p > 0.05$). Sin embargo, el tratamiento para eliminar epitopes glucídicos en el antígeno somático, es poco significativo ($p < 0.05$) para los sueros positivos, no así para los negativos.

En el estudio con la técnica de Western-blot, el tratamiento con periodato permitió observar que las bandas que se presentaban como comunes en las preparaciones de *Fasciola hepática* y *Paramphistomum* spp. no reaccionan con los sueros, mientras que las presentes únicamente en los ags de *Fasciola hepática* sólo disminuyen su intensidad.

4.5. Rol de los epitopes lipídicos

El pasaje de los ags por la columna de heparina (retención de lípidos) mostró que las preparaciones antigénicas tienen poco contenido lipídico.

4.6. Estudio de reacciones cruzadas con otras parasitosis

Cuando se realizó la prueba de Western-blot con antígeno somático de *Paramphistomum* spp. se observó en bovinos las mismas tres bandas de 66 kda que en el caso de los antígenos de *Fasciola hepática*, no así las de 97 kda.

En conejos no se observan bandas de reactividad compartidas entre los dos parásitos.

Mediante la prueba de ELISA con ag de superficie de *Fasciola hepática*, también se comprobó que ambos parásitos comparten epitopes dado que los sueros de bovinos de áreas con problemas de paramfistomiasis y sin *Limnea viatrix*, huésped intermediario de *Fasciola hepática*, dieron positivos en un 98%.

Asimismo, se observó reacción cruzada con los sueros de bovinos infectados con quiste hidático.

4.7. Purificación de los antígenos de superficie

Debido a que las infecciones de quiste hidático y *Paramphistomum* spp. son tan comunes en nuestros bovinos y a la reactividad cruzada observada (mencionada en el numeral 6), se decidió purificar por afinidad negativa los antígenos a utilizar.

Al utilizar el antígeno de *Fasciola hepática* depletado de epitopes compartidos con *Paramphistomum* spp. (ag Fh.1) la reactividad cruzada disminuyó de 62% a 38%.

Al depletar el ag Fh.1 de los epitopes compartidos con quiste hidático (ag Fh 2) disminuyó de 68% a 39%.

La sensibilidad del ELISA con ag Fh 2 es de 97% y la especificidad de 74%.

4.8. Resultados obtenidos con la prueba inmunodiagnóstica de aplicación a campo desarrollada (DOT-BLOT)

En una primera etapa se realizaron estudios para poner a punto una prueba de LATEX. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios por lo que se pasó en una segunda etapa al desarrollo de una prueba de DOT BLOT, para el diagnóstico a campo de infecciones con *Fasciola hepática* en bovinos.

El desarrollo de una mancha marrón indica una reacción positiva. La prueba de dot inmunoperoxidasa (DI) tiene una sensibilidad de 82% y una especificidad de 90%, con un intervalo de confianza de 95%, tiene una buena repetibilidad (kappa 0.74) y una buena correlación con la prueba de ELISA de referencia (kappa 0.62).

Es una prueba rápida que se realiza en 2 horas 15 minutos a temperatura ambiente, simple y de bajo costo, todas características convenientes para una prueba a ser utilizada en el campo.

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló y estandarizó una prueba de aplicación a campo, DOT-BLOT, para el diagnóstico de fasciolosis en bovinos, la cual tiene una alta repetibilidad y correlación con la técnica de ELISA de referencia (figura 1).

La técnica de DOT-BLOT desarrollada tiene las siguientes ventajas:

- Permite identificar en forma temprana (2 SPI) bovinos infectados con *Fasciola hepática*.
- No requiere de equipos sofisticados dado que:
 - la dilución del suero problema seleccionada (1/50) es factible de realizar en condiciones de campo (1 gota de suero y 49 de diluyente).
 - todas las incubaciones necesarias se realizan a temperatura ambiente.
 - los resultados son detectables a simple vista y se pueden archivar.
- Es una prueba de bajo costo.

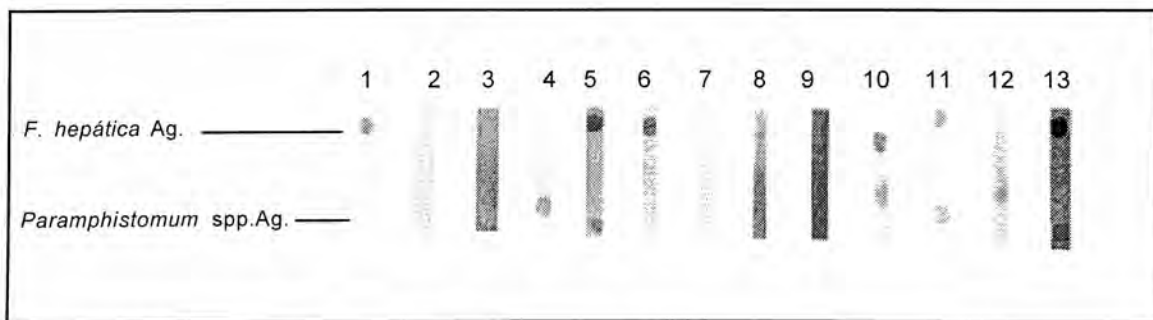


Figura 1. Reacciones de la técnica de Dot inmunoperoxidasa.

Controles (tiras 1 a 5): 1 = Suero control positivo para *Fasciola hepática* (F. hepática infectado y libre de *Paramphistomum* spp. & *Echinococcus granulosus*). 2 = Suero control Negativo (Libre de *F. hepática*, *Paramphistomum* spp. & *Echinococcus granulosus*). 3 = Suero control positivo para *E. granulosus* (Infectado con *E. granulosus* y libre de *F. hepática* & *Paramphistomum* spp.). 4 = Control positivo de *Paramphistomum* spp. (Infectado con *Paramphistomum* spp. y libre de *F. hepática* & *E. granulosus*). 5 = Suero control de infección mixta (infectado con *F. hepática* & *Paramphistomum* spp. y libre de *E. granulosus*).

Sueros estudiados (tiras 6 a 13), un representante de cada grupo: 6 = (grupo 1, infectado con *F. hepática*); 7 = (grupo 2 negativo); 8 = (Grupo 3 infectado con *E. granulosus*); 9 = (grupo 4 infectado con *E. granulosus*); 10 = (grupo 5a infectado con *F. hepática* & *E. granulosus*); 11 = (grupo 5b infectado con *F. hepática* & *E. granulosus*); 12 = (grupo 6 infectado con *Paramphistomum* spp.); 13 = (Grupo 7 infección mixta por *Paramphistomum* spp. & *F. hepática*).

Los sueros de bovinos que den un resultado dudoso con la técnica de DOT-BLOT se deben remitir al laboratorio para ser estudiados mediante las técnicas de referencia ELISA y Western-blot.

El objetivo de la investigación fue desarrollar una técnica de diagnóstico para *Fasciola hepática* de aplicación a campo (DOT-BLOT). Una de las ventajas de esta técnica es que se podría incluir el antígeno de *Paramphistomum* spp., lo cual brindaría información sobre el estado sanitario de los animales con respecto a otra parasitosis común de nuestros bovinos. Al igual que en el caso de fasciolosis, los sueros de animales dudosos deben remitirse al laboratorio para ser procesados mediante las técnicas de referencia ELISA y Western-blot.

Los resultados preliminares arrojados por el estudio de la cinética de la respuesta inmune humoral de conejos infectados, dosificados con fasciolicida y reinfectados con *Fasciola hepática* podrían verse confirmados si se continúan las investigaciones en los huéspedes naturales.

Los estudios de la cinética de la respuesta inmune humoral en los huéspedes naturales podrían contribuir a evaluar los tratamientos con fasciolicidas y permitir de futuro implementar medidas de control y prevención más adecuadas y eficaces.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACHA, P.N. ; SZYFRES, B. (Editors), 1987 Zoonosis and Communicable Diseases Comon to Man and Animals, 2, Pan American Health Organization, Washington, D.C., 660pp.
2. ARONSTEIN, W.S.; DALTON, J.P.; STRAND, M.A. 1985. Schistosoma mansoni surface glycoprotein cross-reactive with a Ti antigen of *Fasciola hepática*. Am. J.Trop.Med.Hyg. 24(5): 889-897.
3. BARBIERI, M.; STERLA, S.; BATTISTONI, J., NIETO, A. 1993. High performance latex reagent for hydatid serology using an Echinococcus granulosus lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. InternacionaI Journal for Parasitology, 23(5): 565-572.
4. BARDIE, J.; NARI, A.; CARDOZO, H. 1978. Correlación entre niveles de infección de *Fasciola hepática* y conteaje de huevos en ovinos. Veterinaria, 14:125-134.
5. BROFFIT, J.D. 1982. Nonparametric Classification, In: Krishnaiah, P.R. and Kanai, L.N. (Editors). Handbook of Statistics, 2. North-Holland, pp.138-168.
6. BURDEN, D.J.; HAMMET, N.C. 1978. Microplate enzyme linded immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepática* in cattle. Veterinary Record, 103: 158.
7. CABRERA BRAVO, M. 1991. Fascioliasis en pediatría. Comunicación de cinco casos. En: Proceedings del X Congreso Latinoamericano de Parasitología, 17-22 noviembre 1991, en Montevideo-Uruguay, 317 pp.
8. CHICK, B.F.; LOVERDALE, O.R.; JACKSON, A.R.B. 1980. Productions effects of liver fluke (*Fasciola hepática*) infection in beef cattle. Australian Veterinary Journal, 20: 123-127
9. CHIRINOS, A.R. Y DE CHIRINOS, N.I. 1991. Evaluación de los efectos de la Distomatosis hepática sobre la eficiencia reproductiva y producción lechera. En: Proceedings del X Congreso Latinoamericano de Parasitología, 17-22 noviembre 1991, en Montevideo-Uruguay, 318pp.
10. DALTON, J.; JOYCE, P 1987. Characterization of surface glycoproteins of different developmental stages of *Fasciola hepática* by surface radiolabelling. Int.J. Parasit. 73(6): 1281-1284.
11. DORSMAN, E. 1956. Fluctuation with a day in the liver fluke eggs count of rectal contents of cattle. Veterinary Record. 68: 571-524.
12. DUNN, O.J. 1977. Enumartion Data. In: J.Wiley & Sons (Editors), Basic Statistics: A primer for the Biomedical Sciences, 2. New York, USA, pp.122-135.
13. DUNNE, D.W. 1990. Shistosome carbohydrates.
14. FARRELL, C.J.; WESCOTT, R.B.; LANG, B.Z. 1981. An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepática* infection in cattle . American Journal of Veterinary Research, 42 (2): 237-240.
15. GIBBONS, J.D. 1985. Nonparametric Statistical Interference. Marcek Dekker (Editorial).

16. HAPPICH, F.A.; BORAY, J.C. 1969. Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Australian Veterinary Journal*, 45:329-331.
17. HILLYER, G.V. ANDE DE WEIL, N.S. 1979. Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infection with *Fasciola hepática*. II. The enzyme-linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. *J. Parasitol.*, 65:680-684.
18. HRZENJAK, T.; CASTEK, A.; KIJAJIC, K., 1984. Characterization of the glycolipid complex isolates from *Fasciola hepática*. *Periodicum biologorum*, 86(4):327-334.
19. KLEINBAUM, F.G. AND LAWRENCE, L.K. (Editors), 1978. *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods*. Duxbury Press, North Scituate, Massachusetts, pp 20-23.
20. LACHEMBRUNCH, P.A.; GOLDSTEIN, M. 1979. Discriminant Analysis. *Biometrics* 35: 69-85.
21. LAINAT, L. 1962. Rieerche sulla distomatosi nei bovine. L'influenza del trattamento antiparasitario sulla produzione del late. *La Clinica Veterinaria*, 84:425.
22. MAISSONAVE, J.; CARBALLO, M.; BATTISTIONI, J.; BENAVIDEZ, U.; BERASAIN, P.; GONZALEZ, M.; PAZOS, A. 1991. Identificación, caracterización y evaluación de antígenos para el diagnóstico de la fascioliasis en rumiantes. En: *Proceedings de las XIX Jornadas Uruguayas de Buiatría*, junio, en Paysandú-Uruguay, c.c.3.1.-c.c.3.3p.
23. MAISSONAVE, J.; ROSSI, S.; ACOSTA, D.; BATTISTIONI, J.; BENAVIDEZ, U.; YARZÁBAL, L. 1991. Estudio preliminar de la respuesta inmune-humoral en la fascioliasis experimental. En: *Proceedings del X Congreso Latinoamericano de Parasitología*, 17-22 noviembre, en Montevideo-Uruguay, 311pp.
24. MAISSONAVE, J.; HERNANDEZ, S.; ROSSI, S.; ACOSTA, D.; YARZABAL, L. 1993. Inmunodiagnóstico de fascioliasis. (Poster). En: *Proceedings del III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI)*, 15-17 de abril, en Santiago-Chile, 101pp.
25. MAIZELS, R.M.; KENNEDY M.W.; MEGHJI, M.; ROBERTSON, B.D.; SMITH, H.V. 1987. Shared Carbohydrate Epitopes on distinct surface and Secreted Antigens of the Parasitic Nematode *Toxocara canis*. *The Journal of Immunology* 139 (1):207-214.
26. NARI, A.; CARDOZO, H. 1976. Prevalencia y distribución geográfica de la fascioliasis hepato-biliar en bovinos de carne del Uruguay. *Veterinaria*, 13(63):11-16.
27. OGUNRINADE, A.; BOLA, I.O. 1980. Economic importance of bovine fascioliasis in Nigeria. *Tropical Animal Health Production*. 12: 155-160.
28. OLDHAM, G. 1983. Antibodies to *Fasciola hepática* antigens during experimental infections in cattle measured by ELISA. *Veterinary Parasitology*, 13:151-158.
29. OLIVERA, N.; IRAOLA, J. 1979. Prevalencia de la fascioliasis hepato-biliar. *Veterinaria*: 55-60.
30. PLOEGER, H.W.; BOON, J.H.; PLAIZIER, J.C.B. ANDE VAN KEULEN, K.
31. ROJAS, M. 1969. Pérdidas económicas por decomisos de hígados con distomatosis en canales de la gran Lima. *Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y Alturas*. 373-375.
32. ROSEBY, F.B.; RUR, B. 1970. The effect of fascioliasis in the wool production of merino sheep. *Australian Veterinary Journal*. 46(8):361-366.
33. SANTIAGO, N.; HILLYER, G.V. 1988. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepática*. *The Journal of Parasitology*, 74(5):810-818.
34. SIMPSON, A.J.G. 1990. Schistosome surface antigens: developmental expression and immunological function. *Parasitology Today*, 6(2): 40-45.
35. SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. 1988. Serodiagnosis of *Fasciola hepática*, infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 27: 283-290.
36. STERLA, S.; LJUNGSTRUM, I Y NIETO, A. 1991. Immune diagnosis of hydatid disease. Modified ELISA: Phosphorylcoline and periodate treatment to increase sensitivity. En: *Proceedings del X Congreso Latinoamericano de Parasitología*, 17-22 noviembre 1991, en Montevideo-Uruguay, 375pp.
37. WELCH, R.D.; SMITH, P.H.; MALONE, J.B. 1987. Herd evaluation of *Fasciola hepática* infection levels in Louisiana cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*. 48: 345-347.

38. WYCKOFF, S.H.; BRADLEY, R.E. 1986. An optimized enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative diagnosis of bovine fascioliasis. *Journal of Parasitology*. 72: 439-444.
39. ZIMMERMAN, G.L.; JEN, L.W.; CERRO, J.E.; FARNSWORTH, B.S.; WESCOTT, R.B. 1982. Diagnosis of *Fasciola hepática* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research*. 43(12): 2097-2100.

7. CONGRESOS Y CONFERENCIAS

Los resultados obtenidos en la investigación se presentaron en los siguientes congresos.

Sobre la investigación preliminar:

- * Cuarta Reunión Científica de la Sociedad Uruguay de Inmunología (Diciembre 1990, Montevideo, Uruguay).
 - * XIX Jornadas Uruguayas de Buiatría (Junio 1991, Paysandú, Uruguay).
 - * Primer Congreso Nacional de Parasitología y X Congreso Latinoamericano de Parasitología (Noviembre 1991, Montevideo, Uruguay).
 - * Japan-Uruguay workshop on Echinococcosis and other parasitic diseases. Instituto de Higiene - Universidad de la República (Marzo 12, 1993, Montevideo, Uruguay).
- Sobre la prueba de campo dot-blot desarrollada:
- * VI Reunión Científica Anual de la Sociedad Uruguay de Inmunología (Diciembre 1992, Montevideo, Uruguay).
 - * Jornada de Biotecnología Agropecuaria. Estación Experimental Las Brujas, INIA (Diciembre 1992, Canelones, Uruguay).
 - * VI Congreso Nacional de Veterinaria, 1er. Congreso de Especialistas en Pequeños Animales (Noviembre, 13-15, 1996, Montevideo, Uruguay).
 - * XII Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología (octubre 21-27, 1995, Santiago, Chile).
 - * III Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria (octubre 5-7, 1994, Montevideo, Uruguay).
 - * XIV Panamerican Congress on Veterinary Sciences (PANVET) (octubre 9-15, 1994, Acapulco, México).
 - * International Workshop on Biology of Parasitism. Molecular Biology and Immunology of the Adaptation and Development of Parasites (Diciembre 13-16, 1993, Solís, Uruguay).
 - * III Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI) (abril 15-17, 1993, Santiago, Chile).

Solari Ma. A.(1)

(1) Dra. en Medicina Veterinaria.

DESARROLLO Y EVALUACION DEL DIAGNOSTICO DE ADN PARA HEMOPARASITOS (*BABESIA BOVIS* Y *BABESIA BIGEMINA*) EN VACUNOS Y EN *BOOPHILUS MICROPLUS*

FPTA 31

Periodo Ejecución: Jun., 1994-Jun., 1995

1. INTRODUCCION

La magnitud de las pérdidas económicas debidas a los hemoparásitos, ha sido estimada entre US\$ 6 y 9 anuales por vacuno (Guglielmo, A. *et al.*, 1991). Si bien a nivel nacional estas pérdidas no han sido cuantificadas, existe la convicción de que la garrapata y los hemoparásitos que ésta transmite implican pérdidas económicas graves (Ugarte, R. 1992).

Se están desarrollando planes tendientes a reforzar las actividades de control y erradicación de la garrapata (*Boophilus microplus*), ejecutados por la Dirección General de Servicios Ganaderos, (proyecto 840, Sanidad Animal/BID), por productores y por los profesionales no oficiales que trabajan en el área.

La estrategia que se está siguiendo se basa en el modelo conceptual desarrollado por la División de Parasitología, según el cual se pretende disminuir las poblaciones de garrapata en zonas endémicas (al norte del Río Negro) y eliminarlas totalmente en las no endémicas (al sur del Río Negro).

En el transcurso de la estrategia, siempre será necesario disponer de métodos diagnósticos apropiados, a los efectos

de mantener una vigilancia epidemiológica adecuada. Hasta el momento en que este proyecto fue planteado, las técnicas disponibles no satisfacían las necesidades existentes.

2. CARACTERIZACION DEL PROYECTO

Dados los antecedentes referidos, a comienzos de 1992 la División de Parasitología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) define la necesidad de complementar el diagnóstico de los hemoparásitos, con técnicas más precisas y automatizables que las convencionales.

Mundialmente, gracias al desarrollo de la investigación en el campo de la biología molecular, se están utilizando metodologías con las características antes mencionadas. Tal es el caso de la amplificación *in vitro* de ADN, PCR (Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Saiki, R.K. *et al.* 1985). Con la finalidad de cumplir con el cometido antes planteado, fue necesario trabajar conjuntamente con la Unidad de Biología Molecular de INIA, en la Estación Experimental «Las Brujas».

La ventaja práctica del diagnóstico realizado por PCR es que el ADN resiste muy bien la desecación, eliminándose por consiguiente la necesidad de mantener una cadena de frío para el transporte de la muestra hasta un centro de referencia. La estabilidad del ADN permite asimismo diferir el envío de estas según las dificultades de transporte existentes en algunas zonas del país.

Simplificando la obtención, mantenimiento y remisión de las muestras, se obviarían varios pasos tradicionales en la remisión de material (tubos, disponibilidad de anticoagulante, cadena de frío, urgencia de traslado), avance que es

especialmente trascendente. Por otro lado, dicha simplificación puede extrapolarse a otras patologías donde se realice el diagnóstico en el área de biología.

Con el desarrollo del presente proyecto, se buscó resolver el problema anteriormente planteado, lo cual será de gran utilidad a la ganadería nacional. A nivel predial, los productores también se verán beneficiados ya que podrán conocer realmente la situación de riesgo de sus animales y actuar en consecuencia, optimizando los recursos económicos y los esfuerzos.

BIOTECNOLOGIA Y SANIDAD ANIMAL

El estudio del material genético de agentes infecciosos a través de técnicas de ADN recombinante ha permitido grandes progresos en el área de diagnóstico, control epidemiológico y fabricación de vacunas.

Conocida parte de la secuencia de ADN de un agente infeccioso, es posible detectarlo en una muestra a través de la amplificación de ésta, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Centenares de grupos a nivel mundial se encuentran abocados a la secuenciación del ADN de agentes infecciosos y la información generada es recopilada en la base mundial de secuencias de ADN, el Gene-Bank. Esta base de datos es de libre acceso y por lo tanto la capacidad de aprovecharla depende exclusivamente de contar con técnicos formados en esta disciplina. El presente trabajo es un ejemplo en este sentido.

El mismo procedimiento se puede realizar con todos los agentes infecciosos de importancia económica. La gran sensibilidad de estos métodos permiten hacer diagnóstico en muestras obtenidas a través de técnicas poco invasivas como por ejemplo el diagnóstico de *Brucella ovis* a partir de muestras de orina. Esto permite controlar masivamente animales que concurren a exposiciones, remates u otros posibles focos de diseminación de agentes infecciosos.

La ventaja práctica del diagnóstico realizado por PCR es que el ADN resiste muy bien la desecación, eliminándose por consiguiente la necesidad de mantener una cadena de frío para el transporte de la muestra hasta un centro de referencia. La estabilidad del ADN permite asimismo diferir el envío de estas según las dificultades de transporte existentes en algunas zonas del país. Esto se demostró en un trabajo realizado en la Unidad de Biotecnología de INIA donde se consiguió diagnosticar *Babesia bovis* en papel con manchas de sangre de ganado infectado experimentalmente, luego de un año de haber sido colectadas. Asimismo, el estudio de la secuencia de ADN permite reconocer diferencias entre cepas de acuerdo a su origen geográfico. Esto ayuda a identificar fallas en los sistemas de control de la introducción de agentes exóticos o que han sido erradicados.

Al mismo tiempo, la evolución hacia la automatización y el aumento de la capacidad de recuperación y procesamiento rápido de muchas muestras, permitirá llegar a conclusiones epidemiológicas más rápido y acertadamente a partir de estudios poblacionales.

Para el grupo de trabajo de la División de Parasitología, el área de biología molecular era totalmente nueva, por lo que fue necesario comenzar un programa de capacitación (adiestramiento de laboratorio, diversos utilitarios informáticos, equipos sofisticados, etc.).

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Específicamente dentro del Orden Apicomplexa, se estudiaron las especies de hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* con múltiples herramientas disponibles en biología molecular. En este marco, se desarrollaron diversos objetivos, el principal de los cuales fue desarrollar y poner a punto un método de diagnóstico complementario de babesias en vacunos y garrapata que sea confiable y eficaz.

Paralelamente, se realizó un estudio aplicado en el análisis de la viabilidad de las poblaciones atenuadas en la garrapata.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, es su sigla en inglés) alude al proceso *in vitro* de amplificación de una o más secuencias de ADN, entendiéndose como amplificación a la generación de cadenas idénticas a la original.

El proceso se basa en dos tramos iniciadores («primers») complementarios a los extremos de la secuencia que se quiere amplificar. Una vez que los iniciadores se alinean a los extremos del tramo

referido, la polimerasa comienza a sintetizar el ADN que falta entre ambos tramos.

Este proceso se repite, resultando en determinado número de cadenas nuevas. El número de repeticiones se regula a través de la temperatura, que incide sobre la forma que adopta la molécula y -por lo tanto- en la posibilidad o no que el proceso continúe. Se usan polimerasas termoestables.

Los iniciadores -oligonucleótidos de alrededor de 20 nucleótidos de largo- son los que «identifican» el tramo de ADN que quiere amplificarse, el cual (en general) no es mayor a 3000 pares de bases. Una cadena puede reproducirse hasta un millón de veces, lo que facilita la determinación de su tamaño, secuencia de nucleótidos, etc..

La gran ductilidad y las amplias posibilidades de aplicación de la técnica la destacan como uno de los grandes avances científicos a nivel mundial, en los últimos años.

En este proyecto, la técnica sirve para diferenciar distintos parásitos, dado que se han identificado secuencias de ADN características y se cuenta con sus iniciadores.

Conceptualmente las actividades desarrolladas se pueden agrupar en:

- * definición de iniciadores específicos para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.
- * diagnóstico en bovinos y en garrapata (*Boophilus microplus*),
- * estudio de viabilidad en *Boophilus microplus* de las cepas atenuadas y
- * estudios de alternativas sencillas y prácticas para envío y procesamiento de material.

El trabajo en el área de biología molecular se desarrolló con el respaldo y apoyo de la Unidad de Biotecnología del INIA «Las Brujas». El área biológica y aplicada se ha desarrollado en la División de Parasitología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) «Miguel C. Rubino», del Ministerio de Ganadería y Agricultura (MGAP).

4.2. Definición de iniciadores («primers»)

Se buscaron secuencias de ADN de *Babesia bovis* existentes en los bancos de genes internacionales. Se seleccionó la secuencia BBMER60 (Carlos Suarez *et al.*, 1991) que codifica para una proteína de membrana de merozoito.

A partir de esa secuencia se diseñó un par de iniciadores de 25 nucleótidos de longitud, denominados BBMER#1 y BBMER#2 que amplificarían un segmento de ADN de 1056 pares de bases.

Un trabajo similar se hizo para *Babesia bigemina*, cuyos iniciadores fueron descritos por Figueroa J., *et al.*, 1992.

4.3. Puesta a punto del diagnóstico en vacunos

La identidad del fragmento amplificado de *Babesia bovis* fue corroborada, comparando el mapa de restricción supuesto, con el obtenido cortando el producto con determinadas enzimas de restricción.

Las bandas obtenidas en cada babesia son diferentes, por lo que cada iniciador es específico. Esto fue comprobado con material de ADN referencia de A. marginale, A. centrale, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y ADN de bovinos libres de hemoparásitos.

En el estudio de sensibilidad se determinó una banda visible a partir de 0,08 fentogramos de ADN y se estima que equivale a 40 parásitos.

Sensibilidad que detecta parasitemias de 0,0005 % de eritrocitos infectados tanto para *Babesia bovis* como para *Babesia bigemina*.

4.4. Puesta a punto del diagnóstico en el vector

Para el diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el vector se utilizaron los mismos iniciadores «externos», diseñados para vacunos y los resultados no fueron los mismos que se habían obtenido a partir de sangre infectada.

Por esto se decidió modificar la metodología utilizando iniciadores internos («nested primers»). Estos nuevos pares de iniciadores están comprendidos entre los externos, y fueron específicos para cada babesia, lográndose el objetivo planteado.

Se amplificó el ADN de *Babesia bovis/Babesia bigemina* de diferentes estadios de garrapata infectada (adultos, huevos y larvas), utilizando primero los iniciadores «externos» y con lo producido se reamplificó con los «internos», obteniéndose las bandas esperadas. Como control negativo se utilizó ADN de garrapatas (adultos, huevos y larvas) sin infectar, de una cepa mantenida en el DILAVE «Miguel C. Rubino» desde 1977.

4.5. Estudio de viabilidad de las cepas atenuadas en *Boophilus microplus*

Se ha estudiado la interrupción de la transmisión de determinadas poblaciones de babesias «atenuadas», que se utilizan rutinariamente en la producción de hemovacuna para la premunición del ganado. Estudios anteriores indican que no existe transmisión vertical de estas cepas en la garrapata. Dado que estos resultados surgen en condiciones restringidas (única parasitemia e infestación) se hace necesario ampliar esta información.

4.6. Obtención práctica del material para procesar

Se confirmó la posibilidad de obtener el material para estudiar de una forma práctica y al alcance de cualquier persona que está actuando en la campaña. Los hematozoarios en el vacuno están presentes únicamente en el eritrocito, por lo que el material para detectarlo es la sangre y es necesario mantenerla en ciertas condiciones hasta el momento del diagnóstico. Se ha probado en diversos tipos de papel y en tela mantenidos en temperatura ambiente, lográndose reproducir los resultados obtenidos con los materiales tratados en forma tradicional.

5. RESULTADOS

Al momento se cuenta con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que diagnostica ADN específico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* tanto en el bovino como en el *Boophilus microplus*.

Este método es el primero a nivel mundial con la sensibilidad y especificidad necesaria para verificar la transmisión vertical a través del vector, *Boophilus microplus*, y fue presentado en el Congreso Mundial de Veterinaria de 1994 y publicado en el *Brazilian Journal of Parasitology*.

El logro de este objetivo coloca al Uruguay en una posición destacada ya que es primero y único en la región en disponer de esta metodología. También es un aporte original a la comunidad científica ya que hasta el momento no había sido descrita la técnica de diagnóstico en la garrapata.

En cuanto al estudio aplicado en el análisis de la viabilidad de las poblaciones atenuadas en la garrapata, han surgido resultados alentadores respecto a la interrupción del ciclo natural en la garrapata de las cepas atenuadas. Estos resultados minimizan la interrogante actual, de los ganaderos que utilizan la hemovacuna, los cuales muchas veces manifiestan su temor de inmunizar el ganado por la posibilidad de infectar artificialmente las poblaciones de garrapata.

Está pendiente la fijación de parámetros de trabajo para lograr conocer tasa de infección, para lo cual se necesita realizar un seguimiento de la dinámica, con un número elevado de muestras para poder inferir estos resultados. A partir de la situación actual, se ha diseñado un nuevo proyecto y presentado a ser financiado, con el objetivo de avanzar en estas investigaciones ya que son fundamentales para la aplicación de éstas técnicas en el medio.

6. DIVULGACION

El equipo de investigación del proyecto, participó en jornadas de intercambio, con intervención de profesionales y miembros de laboratorios de la región, con el objeto de informar acerca del trabajo, intercambiar experiencia y programar tareas comunes de beneficio mutuo:

- * Jornadas auspiciadas por IICA-PROCISUR, INIA «Las Brujas» y CICV-INTA, Buenos Aires.
- * Jornada organizada por la Universidad de la República, Solís.
- * VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, 8-11 de noviembre de 1994. Bs. As, Argentina.
- * Presentación del poster «Use of the Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of *Babesia bovis* in cattle and in tick *Boophilus microplus*».
- * Mesa Redonda del Programa Hemoparásitos, Red de Laboratorios de Diagnósticos e Investigación en América Latina, FAO, presentación de logros.

También se redactaron cuatro artículos científicos, publicados en revistas indexadas y arbitradas.

7. ACCIONES DE FUTURO

Se ha desarrollado un nuevo método de diagnóstico de *Babesia bovis* en vacuno y en vector, a través de la amplificación *in vitro* de una secuencia de ADN de este parásito. Dicho método puede ser utilizado para diferenciar *Babesia bovis* de *Babesia bigemina* así como de otros hemoparásitos bovinos debido a su absoluta especificidad.

La interpretación de los resultados no es técnico-dependiente lo que disminuye los errores de interpretación y, además, permite una mayor capacidad de procesamiento de muestras. A partir de estos resultados, el grupo piensa llevar a cabo trabajos aplicados a:

- 1) estudios de epidemiología molecular en apoyo a las actividades de lucha contra la garrapata (campaña sanitaria),
- 2) identificar a nivel de establecimiento los animales enfermos en etapa prepatente y
- 3) estudiar el comportamiento de las cepas atenuadas utilizadas en hemovacunas (transmisión vertical en la garrapata).

Destacamos que este proyecto dio lugar a otro, financiado por IAEA (1996-1998) donde se acondicionó el laboratorio para el diagnóstico de PCR y se aplico

en la investigación de la viabilidad de diferentes babesias (virulentas y atenuadas) en la garrapata. El resultado de estas investigaciones contribuye en mejorar la utilización de las hemovacunas en la ganadería.

Este proyecto ha sido pionero y los resultados representan un importante aporte a la comunidad, siendo únicos en la región. La División de Parasitología continúa sirviendo de apoyo y referencia para los profesionales involucrados en éstos temas, con especial énfasis en el diagnóstico aplicado. Este rol ha sido especialmente destacado por la FAO.

Impreso en los Talleres Gráficos de
Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.
Montevideo, Uruguay

Depósito Legal 314.477/00
Edición Amparada al Decreto 218/996

INIA LA ESTANZUELA

COLONIA (0522) 2005

C.C. 39173

FAX (0522) 4061

INIA LAS BRUJAS

LAS PIEDRAS 367 76 41

C.C. 33985

FAX 367 76 09

INIA TACUAREMBO

TACUAREMBO (0632) 2407

C.C. 78086

FAX (0632) 3969

INIA TREINTA Y TRES

TREINTA Y TRES (0452) 2305

C.C. 42

FAX (0452) 5701

INIA SALTO GRANDE

SALTO (0733) 5156

C.C. 68033

FAX (0732) 9624

INIA

DIRECCION NACIONAL

MONTEVIDEO (02) 902 05 50

ANDES 1365 P.12

C.C. 11100

FAX 902 36 33