

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, XCV

JORDI CASAL I FÀBREGA

De la Societat Catalana de Biologia

CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI
DE LA LEUCOSI BOVINA.
MÈTODES DE DIAGNÒSTIC
I PREVALENÇA A CATALUNYA

PREMI BOFILL I POCH, 1985

BARCELONA

1990



**CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI DE LA
LEUCOSI BOVINA.
MÈTODES DE DIAGNÒSTIC
I PREVALENÇA A CATALUNYA**

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, XCV

JORDI CASAL I FÀBREGA

De la Societat Catalana de Biologia

CONTRIBUCIÓ A L'ESTUDI
DE LA LEUCOSI BOVINA.
MÈTODES DE DIAGNÒSTIC
I PREVALENÇA A CATALUNYA

PREMI BOFILL I POCH, 1985

BARCELONA

1990

LA GENERALITAT DE CATALUNYA
HA CONTRIBUÏT GENEROSAMENT
A L'EDICIÓ D'AQUEST VOLUM

ISBN 84-7283-151-5
Dipòsit legal: B. 17.053 - 1990

© Jordi Casal i Fàbrega
La present edició és propietat de l'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

A proposta d'una ponència formada pels senyors Carles Bas i Peired i Ramon Margalef i López, agregats a la Secció de Ciències de l'INSTITUT, i la senyora Mercè Durfort i Coll, de la Institució Catalana d'Història Natural, l'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS, en sessió plenària tinguda el dia 14 de juny de 1985, acordà per unanimitat de concedir el Premi Artur Bofill i Poch al senyor Jordi Casal i Fàbrega pel seu treball *Contribució a l'estudi del virus de la leucosi bovina. La seva prevalença a Catalunya i proposta d'un mètode de lluita.*

En la sessió plenària del 15 de gener del 1987 l'INSTITUT prengué l'acord de publicar la dita obra, la qual, amb el títol *Contribució a l'estudi de la leucosi bovina. Mètodes de diagnòstic i prevalença a Catalunya*, és editada a cura del senyor Ramon Margalef i López.

This One



3EQT-G4C-ORJ5

*A la Montse, la Maria del Mar,
l'Èster i en Nicolau.*

AGRAÏMENT

Al Veterinäruntersuchungsamt de Hannover (Alemanya) per la informació i les orientacions donades i per la cessió de sèrums positius.

A la Conselleria d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat per les facilitats donades per a l'ús del Laboratori de Sanitat Ramadera de Salt i per la cessió de sèrums sanguinis.

I

INTRODUCCIÓ

La leucosi bovina és un conjunt de malalties en què es presenta una proliferació tumoral del teixit leucopoietic.

La leucosi enzoòtica bovina és la que té més importància epidemiològica i econòmica; és produïda pel virus de la leucosi bovina (VLB) i és objecte actualment de nombrosos treballs d'investigació en els països més avançats d'entre els que en pateixen les conseqüències (Alemanya, Bèlgica, Estats Units, França, Japó). Aquest esforç està justificat per les pèrdues econòmiques que suposa i pel perill potencial que la seva possible expansió representa.

Aquesta malaltia, juntament amb la tuberculosi, la brucel·losi, la glosopeda, la ràbia i la pesta porquina clàssica, té un interès prioritari a la C.E.E., i tots els països que la integren tenen un programa de lluita més o menys intens (207). A causa de la nostra recent entrada a la Comunitat Econòmica Europea, cal tenir molt en compte aquesta malaltia, ja que tard o d'hora els altres països pressionaran per a l'establiment a Espanya d'un programa de lluita i control.

Bé que fins fa poc la leucosi era pràcticament ignorada en el nostre país, darrerament hom li està concedint molta importància, tant al nivell científic, amb la publicació de diversos treballs (6, 38, 71, 73, 152), com al nivell polític amb l'establiment de certes mesures de control.

Al nivell polític, algunes comunitats autònomes, entre elles la catalana (vegeu l'annex I) dictaren durant el 1985 una sèrie de mesures encaminades a controlar i a erradicar aquesta malaltia. Posteriorment, el mes de març de 1986, es dictà una ordre d'abast estatal sobre campanyes de sanejament, en la qual s'inclou la leucosi com a malaltia a erradicar.

Nogensmenys, no havia estat dut a terme cap estudi en relació a la situació d'aquesta malaltia al nostre país. El present treball constitueix doncs una contribució a l'estudi de les característiques de la leucosi bovina, sobretot en els seus aspectes epidemiològics, i alhora una valoració de la seva importància actual a Catalunya, a través d'una investigació del nivell d'infecció al Principat, necessari per a l'estudi i l'aplicació d'un programa de lluita i control de la malaltia que sigui realista i tingui possibilitats d'èxit.

II

LES LEUCOSIS DELS ANIMALS

Les leucosis són un conjunt de malalties neoplàstiques produïdes per una multiplicació anormal de cèl·lules limfàtiques o hematopoïètiques i que s'han descrit en diverses espècies animals i en l'home. En ocasions es fa servir, sobretot per autors de llengua anglesa, el terme de "leucèmia" com a sinònim de leucosi, bé que aquest darrer terme està molt més difòs en la nomenclatura veterinària.

Les leucosis es poden dividir en les derivades dels teixits limfàtics (leucosis limfoides, limfomes, limfosarcomes) i les derivades de teixits hematopoïètics (leucosis mieloides, leucosis mieloproliferatives). En els animals domèstics les leucosis limfoides són molt més freqüents que les mieloides i seran doncs les que discutirem en aquest capítol.

Les leucosis limfoides són tumors dels més freqüents a totes les espècies domèstiques. Malgrat aquesta relativa freqüència de presentació, encara desconeixem nombrosos aspectes d'aquests tumors.

Les leucosis de la gallina, del ratolí, del gat, de la vaca i d'algunes espècies de primats són d'etiologia vírica, en concret degudes al virus de la subfamília *Oncovirinae* (inclosa a la família *Retroviridae*). La malaltia de Marek, una leucosi de les gallines, està provocada per un Herpesvirus. La resta de les leucosis limfoides dels animals domèstics (gos, porc, ovella) són d'etiologia desconeguda.

En relació a llur presentació clínica, les leucosis limfoides dels animals domèstics es poden agrupar en quatre formes clíniques diferents, que són les següents:

a) *Forma multicèntrica*. S'afecten la gran majoria de ganglis limfàtics, la melsa o els òrgans no limfàtics (per ex., fetge, ronyó, budell).

b) *Forma tímica*. El timus és el principal, i en ocasions, l'únic òrgan afectat.

c) *Forma digestiva*. Les lesions predominants es localitzen en el tracte gastrointestinal i en els ganglis mesentèrics.

d) *Formes extranodals o atípiques*. Aquesta forma es caracteritza per l'afecció d'òrgans no limfàtics, com la pell, el quall o el cor.

A part d'aquestes generalitats, les leucosis tenen característiques diferents en les diverses espècies. La leucosi limfàtica del gos és un dels tumors

més freqüents d'aquesta espècie. És de causa desconeguda, bé que es sospita la participació d'algun virus en l'etiologia. Acostuma a presentar-se en animals de 5 a 11 anys d'edat; generalment el procés presenta la forma multicèntrica, i en ocasions amb un increment notable del nombre de limfòcits circulants. El diagnòstic sempre és fatal, i la mort es produeix en un temps de 6 a 12 mesos.

En el gat la leucosi limfoide és el tumor que s'observa més sovint. L'etiologia d'aquest procés és vírica, essent-ne el responsable un Retrovirus. La forma clínica usual és la digestiva i en menor freqüència la tímica. El limfosarcoma del gat sol presentar-se en animals joves (de menys de 5 anys) i també acaba, en un breu període de temps, amb la mort de l'animal.

En el cavall i l'ovella la leucosi limfoide és un tumor poc corrent, d'etiologia desconeguda i presentació multicèntrica.

En el porc les leucosis limfoides es presenten més freqüentment que en les espècies anteriors, bé que les característiques del procés són semblants.

Les aus domèstiques poden patir diversos tipus de leucosi; les més freqüents i importants són la malaltia de Marek i el complex leucosi-sarcoma. La primera d'elles és produïda, com ja hem dit, per un Herpesvirus, i normalment es presenta amb la forma extranodal. El complex leucosi-sarcoma és produït per un Retrovirus; normalment s'afecta la bossa de Fabrici i també altres òrgans. Aquest virus també pot provocar, bé que amb menor freqüència, leucosi dels teixits hematopoiètics i sarcomes.

III

LA LEUCOSI BOVINA

La leucosi bovina és un conjunt de malalties caracteritzades per la proliferació tumoral del teixit leucopoiètic, és a dir, els centres productors de les cèl·lules blanques de la sang (nòduls limfàtics, melsa, medul·la òssia i eventualment altres òrgans). Sovint s'acompanya d'un augment en el torrent circulatori de les cèl·lules afectades més o menys madures. Cal diferenciar una leucosi de presentació enzoòtica amb diferents casos en els ramats afectats, i una altra de tipus esporàdic.

Adoptarem la terminologia proposada per Ferrer (52) i Theilen i Madewell (200), en què hom reserva els noms de leucosi i leucèmia a les proliferacions malignes del teixit limforeticular, sense incloure-hi per tant la limfocitosi persistent ni la simple infecció pel virus de la leucosi bovina.

Aquesta malaltia també és coneguda amb els noms de leucèmia bovina, leucosi limfàtica bovina, limfosarcomatosi i limfosarcoma boví.

Fent un breu repàs històric, trobem que la primera descripció de leucèmia fou realitzada en l'home l'any 1845 per Virchow i per Bennet. Uns anys més tard (1874), Bollinger escriu un treball sobre la "leucèmia bovina" a Alemanya.

El terme de leucosi fou proposat el 1934 per Dobberstein. Gotze i col·laboradors, l'any 1954 (80), descobriren que la malaltia consta de dues fases: una de caracteritzada exclusivament per un augment del nombre de limfòcits i l'altra de tipus tumoral.

Bendixen establí nou anys més tard les característiques epidemiològiques de la malaltia, tot diferenciant la leucosi enzoòtica de la leucosi esporàdica que agrupa les formes juvenil, tímica, cutània i una forma adulta de presentació no enzoòtica.

El descobriment dels Oncornavirus de tipus C com a agents etiològics d'algunes leucèmies en altres espècies animals féu pensar en el possible paper d'un virus semblant com a causant de la leucosi bovina. Fou l'any 1969 quan Miller i col. (144) observaren la presència regular del virus en cultiu de limfòcits d'animals afectats de leucosi o de limfocitosi persistent. Aquest descobriment inaugura un nou període en les investigacions d'aquesta malaltia, que ha repercutit d'una manera molt acusada en els sistemes de diagnòstic i de lluita.

III. 1. LES FORMES ESPORÀDIQUES DE LEUCOSI

Les formes esporàdiques de limfosarcoma són de presentació rara i comprenen tres tipus clínicament i patològicament ben definits: la leucosi juvenil, la tímica i la cutània (fig. 1). Aquests tipus de leucosi no tenen cap relació epizootiològica amb l'existència de leucosi enzoòtica. L'etiologia és encara avui fosca, bé que es descarta que estiguin produïdes pel virus de la leucosi bovina, ja que tots els intents que s'han fet per a aïllar el VLB o els seus anticossos en animals amb algun tipus de leucosi esporàdica han estat infructuosos (24, 34, 43, 71, 111, 125, 161, 172).

1. *Leucosi juvenil*

Afecta els vedells de menys de sis mesos d'edat, ocasionalment els animals acabats de néixer, i és més freqüent en les races de llet que en les d'aptitud càrnica (29).

Es caracteritza per una tumoració simètrica i generalitzada de tots els ganglis limfàtics externs i interns, que presenten una grandària de 3 a 8 vegades superior a la normal (71). Normalment també hi ha una infiltració de la medulla òssia i dels òrgans interns. El fetge i la melsa estan afectats més sovint que en els animals adults.

Les cèl·lules neoplàstiques d'aquest tipus de leucosi, així com de la leucosi tímica, presenten unes característiques citoquímiques i enzimàtiques similars, que suggereixen que s'han originat a partir dels limfòcits T (228).

Possiblement el procés comença ja en la vida intrauterina, ja que els animals bessons solen estar afectats de manera igual (193). Diversos intents de transmetre experimentalment aquesta malaltia han tingut resultats contradictoris.

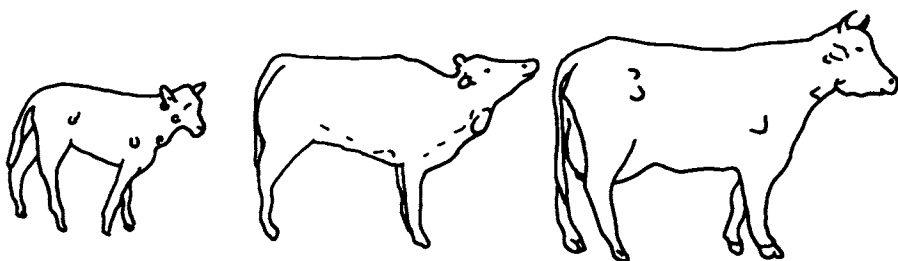


Fig. 1. Formes juvenil, tímica i adulta de leucosi bovina (Theilen i Madewell, 1979).

El quadre leucocitari és leucèmic en aproximadament el 50% dels casos i mostra predominantment cèl·lules immadures (194); també es pot presentar anèmia hipoplàstica, deguda a l'afecció de la medul·la òssia; tanmateix, en molts casos el quadre hemàtic resta invariable.

La simptomatologia clínica depèn dels òrgans que són afectats primer i és molt variable. La palpació ens mostra uns ganglis limfàtics de consistència ferma, llisos, mòbils i indolors (100).

2. *Leucosi tímica*

Se sol presentar entre els sis mesos i els dos anys d'edat i es caracteritza per la proliferació infiltrant de cèl·lules de tipus limfoide del timus cervical i toràcic. Els ganglis limfàtics estan afectats d'una manera irregular, a vegades hi ha limfocitosi, però a diferència de la leucosi juvenil, no presenta afecció de la medul·la òssia (200).

El percentatge de limfòcits T està fortament augmentat, fet que fa pensar que aquestes són les cèl·lules originàries de les tumorals, a diferència de la leucosi enzoòtica, en què les cèl·lules tumorals deriven dels limfòcits B (109).

Els símptomes són els d'una compressió al nivell del coll: dispnea, respiració ràpida, distensió de la jugular, sorolls cardíacs esmoreïts, edema de papada i en molts casos timpanisme i dificultats de deglució (100).

És possible que es produeixi l'afecció d'altres òrgans per via metastàsica, la qual cosa condicionarà el quadre simptomàtic i el curs de la malaltia (74).

El diagnòstic diferencial s'ha de fer amb la pericarditis traumàtica, els abscessos en la zona i la amiloïdosi (aquesta presenta també proteïnúria i baixa densitat de l'orina).

3. *Leucosi cutània*

És una altra forma de leucosi esporàdica, molt més rara que les anteriors. Es presenta en animals adults (193, 194, 200), bé que es pot donar en animals més joves, i fins i tot algun autor les considera més pròpies d'aquest tipus d'animals (100).

L'etiologia de la leucosi cutània resta indeterminada. Lange i col. (111) han observat al microscopi electrònic partícules víriques semblants a les del tipus C, però sense relació genètica ni serològica amb el VLB. Els autors conclouen que s'han de fer altres estudis per a establir la importància d'aquest virus en l'etiologia de la leucosi cutània.

El quadre clínic es caracteritza per l'aparició per tot el cos d'alteracions de la pell, inicialment de tipus urticariforme, que creixen fins a poder tenir la mida d'una mà. Són zones alopeciques i que presenten sovint hemorràgies degudes a irritacions mecàniques. Juntament amb aquestes lesions de la pell es presenta tumoració d'un o més nòduls limfàtics i/o òrgans.

Les alteracions cutànies poden desaparèixer temporalment, però en un període variable entre alguns mesos i dos o tres anys reapareixen. El quadre sanguini és leucèmic en un terç dels casos.

El diagnòstic diferencial es farà amb la dermatofilosi (per anàlisi microscòpica de la pell), la urticària i amb els mastocitomes i papilomatosi.

4. Altres formes

Alguns autors han citat altres formes de leucosi com la leucosi esporàdica monocitoïdal o la leucosi esporàdica de mastòcits (193), però llur presentació és excepcional.

IV

LA LEUCOSI ENZOÒTICA BOVINA. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La leucosi enzoòtica bovina (LEB o EBL en la literatura anglosaxona) és una malaltia neoplàstica maligna del teixit reticuloendotelial, que afecta animals d'ambdós sexes i de totes les races, especialment les d'aptitud lletera. La malaltia té dos estadis: un de limfocitosi persistent, en el qual els animals estan clínicament sans, i l'altre, a vegades posterior a aquest, de limfosarcoma o leucosi pròpiament dita amb manifestacions clíniques i patològiques variables. L'agent etiològic és el virus de la leucosi bovina (VLB), un virus ARN de la família *Retroviridae*. El període d'incubació és llarg (entre 200 dies i 7 anys). La transmissió de la malaltia és horitzontal, bé que també és possible la transmissió vertical.

IV.1. ETIOLOGIA

Durant molt de temps l'etiologia de la leucosi bovina fou una incògnita. Wiesner (226) resumeix les teories existents fa uns anys: un possible agent infecciós, factors ambientals (grandària de l'explotació, clima, alimentació, substàncies carcinogenètiques) i possibles factors genètics.

L'any 1964 s'observaren unes partícules víriques en la llet concentrada d'animals de ramats amb casos de leucosi, partícules que no pogueren ésser detectades en mostres de llet d'animals pertanyents a ramats lliures de la malaltia (45).

Altres autors feren observacions semblants, i finalment Miller i col. (144) aconsegueixen aïllar el virus en cultius de limfòcits preparats a partir de vaques amb limfosarcoma, vaques pertanyents a ramats amb casos de leucosi i animals inoculats experimentalment. Les partícules descobertes eren similars als virus de tipus C productors de leucèmia en altres espècies.

L'any 1976 hom reconeix oficialment que el VLB és essencial en l'etiologia de la leucosi enzoòtica bovina (91).

1. Classificació del virus

Els virus amb propietats oncogèniques poden ésser virus DNA (malaltia de Marek i limfomes malignes en ocells i primats) i virus RNA; d'aquests, només els oncornavirus tenen propietats oncogèniques (productors del complex leucèmia-sarcoma en ocells, rates, gats, vaques i alguns primats) (200).

Els retrovirus amb poder cancerós reben el nom d'oncornavirus (subfamília *Oncovirinae*), que a la vegada es poden diferenciar en tres tipus (vegeu el quadre I).

Quadre I. Classificació del virus (segons Rolle i Mayr, 183)

Família Retroviridae

Subfamílies: Oncovirinae

Lentivirinae: Virus Visna-Maedi

Virus de l'artritis encefalitis de la cabra

Spumavirinae: Virus sincítics

No classificats: Anèmia infecciosa equina

Oncovirinae. Gèneres:

• Oncovirus B – Productors d'adenocarcinomes

• Oncovirus C – Subgèneres

x Aviaris

– reticuloendoteliosi aviària

– complex leucosi-sarcoma

x Rèptils: sarcoma de l'escurçó

x Mamífers:

– Leucosi felina, bovina

– Complex leucèmia-sarcoma del ratolí, de les mones.

Després de dur a terme experiències d'hibridació molecular, encaminades a detectar seqüències del genoma del VLB en altres espècies amb resultat negatiu, hom arribà a la conclusió que el VLB no està fortament relacionat amb una sèrie de virus tipus C provats (33). Tampoc no s'han trobat relacions antigèniques amb altres oncornavirus (43, 56), de manera que hom pot considerar el VLB inclòs en un grup propi dins la família *Retroviridae* (153).

2. Propietats del VLB

En relació a la morfologia, les partícules víriques productores de la leucosi bovina són gairebé esfèriques, amb un nuclèol opac als electrons i possiblement d'estructura helicoidal, col·locat en el centre del virus i rodejat per un embolcall de doble membrana (43, 144); en alguns casos s'ha detectat la presència de petites espícules que es projecten de la superfície del viurs. Alguns autors citen l'existència d'una membrana intermèdia addicional que cobreix el nuclèol (153).

El virus mesura entre 85 i 120 nm de diàmetre, i el nuclèol uns 75-85 nm.

Els oncornavirus tenen un coeficient de sedimentació de 600 - 700 S i llur densitat en gradient de sacarosa és de 1,15-1,18 g/ml (52, 116).

Químicament, el virió està compost d'un 60% de proteïna, 35% de lípids, 2,2% d'àcids nucleics (dels quals el 0,04% és DNA) i un 0,5% d'hidrats de carboni (153).

El VLB conté una cadena simple d'ARN amb una constant de sedimentació de 60-70 S, i una ADN-polimerasa ARN-dependent o transcriptasa reversa com els altres oncornavirus, bé que la del VLB té la propietat de mantenir una activitat màxima en presència d'ions Mg^{++} (153). La inhibició de l'activitat d'aquest enzim es pot utilitzar com a mètode de detecció del VLB en sobrenedants de cultius cel·lulars.

S'han identificat diverses estructures proteïques en el virió (14, 82, 116, 145, 154), les més importants de les quals són dues proteïnes amb propietats antigèniques, la p-24 i la gp-69. Altres estructures d'interès que s'han trobat en el VLB són la p-65 (diferent de la gp-69) i la p-15.

El virus de la leucosi bovina és inactivat ràpidament per solvents lipídics (èter, cloroform...) a causa de la composició del seu embolcall. Segons Lucas i Roberts (118) la pasteurització inactiva el virus. La partícula vírica es destrueix en poques hores a temperatura ambient si està fora de cèl·lules viues (200); la temperatura de 56° C durant 30 minuts destrueix la infectivitat, sense afectar els anticossos neutralitzants (52). Els raigs UV l'inactiven en 30 minuts, l'hidròxid sòdic al 0,5% necessita també mitja hora, mentre que el formol al 0,05% i a 37° C l'inactiva en 8 hores (5).

Bé que el VLB té moltes propietats morfològiques, biològiques i biofísiques en comú amb virus leucèmics d'altres espècies, les seves propietats antigèniques són diferents, ja que els antígens coneguts són immunològicament diferents de proteïnes anàlogues d'altres oncornavirus (52).

La primera estructura amb propietats antigèniques que hom obtingué fou la proteïna interna del virió, detectada per immunofluorescència en pre-

paracions de virus tractades amb èter (140). Aquesta proteïna té un pes molecular de 24.000-25.000 daltons i hom la designa com a p (polipèptid)-24 o p-25.

L'altra estructura antigènica important és una glicoproteïna sensible a l'èter i que està situada en la paret externa del virió, concretament en les prominències que aquesta presenta (200). El seu pes molecular és de 51.000-70.000 i normalment hom la designa com a gp-51 o gp-69.

També s'ha aïllat una estructura proteica anomenada p-15, d'un pes molecular de 14.800 daltons i contra la qual s'han detectat anticossos precipitants en animals infectats amb el VLB (153). Finalment una altra proteïna d'un pes de 65.000 i èter resistent (per tant diferent de la gp-69) fou descoberta per Gupta i Ferrer (82). Aquesta proteïna té determinats antigènics comuns amb les proteïnes p-15 i p-25, o sia que podria ésser-ne un precursor.

D'aquests antigens el més important pel seu valor diagnòstic és la glicoproteïna, ja que la taxa d'anticossos en animals infectats és més alta que l'obtinguda amb la p-24.

En relació a la producció de partícules víriques en cultius cel·lulars, s'ha vist que els cultius de limfòcits bovins no són un substrat gaire interessant, ja que produeixen una quantitat baixa de virus, per curt espai de temps i amb excessives restes cel·lulars. S'utilitzen en canvi diverses línies cel·lulars en què el VLB es replica de manera abundant i constant. Les línies més emprades són les de ronyó de fetus oví (FLK-fetal-lamb-kidney), la de melsa de fetus ovi (FLS) i una a base de cèl·lules de pulmó de rat penat (Tb 1 Lu). Aquesta última està lliure de contaminants, mentre que les altres poden estar contaminades amb el virus del BVD (52). També s'han emprat altres tipus de cèl·lules en què el virus es multiplica més lentament (cèl·lules de boví, oví, cabra, gos, primats i home) (153).

La infecció d'un cultiu no produeix efecte citopàtic del cultiu, però pot produir en determinats cultius (cèl·lules de gat infectades amb el virus del sarcoma CC 81, cèl·lules de pulmó d'embrió humà...) un efecte de formació de sincitis, efecte en el qual es basa un dels mètodes de diagnòstic directe.

Per passades ràpides en cultius no s'aconsegueix una variació en la virulència del virus, però sí una disminució del temps d'incubació.

Segons la relació genètica amb l'hoste, els oncornavirus han estat classificats en dos grups: els endògens i els exògens. Els virus endògens són aquells els genomes dels quals s'inclouen en l'ADN de les cèl·lules somàtiques o germinals i es divideixen amb aquestes, de manera que es poden transmetre de pares a fills. La formació del virió complet es pot produir espontàniament o per inducció. En els virus exògens, per contra, no es produeix la integració del genoma en la cèl·lula i per tant aquests virus no es poden transmetre per la mitosi ni per la meiosi (o sia que no pot haver-hi transmissió de pares a fills per via germinal).

Callahan i col. (33), utilitzant tècniques d'hibridació d'àcids nucleics, arribaren a la conclusió que el VLB és un virus exogen, fet que ja se sospitava en base a les investigacions epidemiològiques.

IV.2. RELACIÓ ENTRE EL VLB I L'HOSTE

1. Relació entre el VLB i la leucosi

La leucosi bovina i la infecció pel VLB no són sinònims, sinó que aquella, així com la limfocitosi persistent, són respostes poc freqüents a la infecció vírica.

Per tant una part dels animals clínicament i hematològicament sans d'un ramat són portadors del virus; segons Venker i Rossler (219) i Ferrer i col. (60) aquests animals representen entre el 28 i el 33% dels animals hematològicament normals pertanyents a un ramat amb casos de leucosi (aquests valors són però molt variables segons els ramats). D'altra part, no tots els animals que presenten limfosarcomes estan afectats de limfocitosi: de 20 casos amb lesions histopatològiques examinats per Chander (34), només 15 foren positius hematològicament, 4 foren dubtosos i un negatiu.

Els treballs realitzats per Ferrer i col. (60) mostren que només un 29% dels animals infectats presenten limfocitosi persistent, i la limfomatosi encara és més rara, ja que el nombre d'animals positius amb tumors és menor al 5%; altres autors donen percentatges encara més baixos, inferiors al 3% (100) i fins del 0,85% (165).

D'altra banda, més del 90% dels animals amb LP o amb tumors presenten anticossos fluorescents contra el VLB (57). És possible que els animals restants representin una baixa temporal d'anticossos, o que la tècnica utilitzada no tingui prou sensibilitat. A la figura 2 s'han representat esquemàticament aquests percentatges.

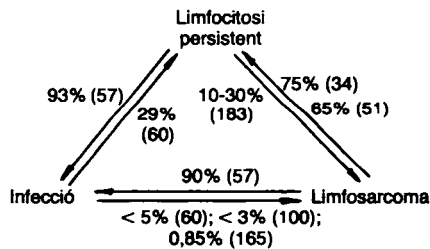


Fig. 2. Relacions entre VLB, LP i leucosi. Les fletxes indiquen la probabilitat que es presenti la patologia.

Sense excloure que altres factors (dosis diferents de virus, *stress*, depressió immunològica, ...) puguin fer evolucionar els animals infectats cap a la presentació de LP o de leucosi, s'ha comprovat que els factors genètics hi tenen un paper important. Hofirek (86) observà que la LP es presenta més sovint en vaques filles d'altres que també sofreixen limfocitosi persistent i que en la descendència d'un determinat brau la incidència de la LP fou més elevada que a la resta del ramat (36% i 15,3% respectivament). En un altre treball es comparen vedells descendents de famílies i ramats amb alta incidència de LP amb altres descendents d'animals amb baixa incidència: bé que l'índex d'infecció és força semblant (92% i 82%), la presentació de LP és molt més elevada en el primer grup (88% i 21% respectivament) (60). Resultats molt semblants obtenen Ernst i Shishkov (46).

L'aparició de limfosarcomes també està lligada a una predisposició genètica: de 73 casos histològicament comprovats de leucosi en un ramat amb alta incidència, tots excepte un s'han produït en membres de famílies ben definides (52); és per això que alguns autors recomanen seleccionar el bestiar boví de cara a obtenir genotips resistents a la leucosi. També sembla que existeix un efecte genètic sobre la resistència a la infecció, car s'ha observat una relació entre la resistència al VLB i la freqüència dels al·lels W_5 i W_{12} , bé que la prova s'ha realitzat sobre un nombre massa petit d'animals per a treure'n conclusions definitives (21).

2. Relació immunològica amb l'hoste

La presència del VLB a l'organisme produeix en aquest una reacció immunològica amb producció d'anticossos que reaccionen específicament amb els antígens p 15, p 24 i gp 69.

L'aparició dels primers anticossos després de la infecció, detectables per la tècnica del RIA, es produeix entre els quinze dies i els 30 dies (172) o, en algun cas excepcional, al cap d'uns mesos (100). Si s'utilitza l'AGID la resposta serològica es produeix més tard. Miller i col. (146), després d'infectar experimentalment 17 vaques, observaren que en 9 la seroconversió es realitzà al mateix temps i en la resta l'interval entre la detecció d'anticossos amb el RIA i amb l'AGID fou de menys de 10 dies. En altres experiments realitzats sobre animals infectats naturalment, la diferència és més grossa, entre un i tres mesos en el 50% dels casos (85), o en el 30% dels casos (146); això pot ésser perquè en els animals infectats experimentalment la infecció es produeix més ràpidament, ja que les quantitats de virus administrades són més altes que si es tracta d'una infecció natural.

Els animals infectats presentaran tota la vida anticossos al plasma.

La resposta immunològica dels animals amb LP o amb leucosi és més elevada que en animals infectats sense cap simptomatologia (57, 106, 219); la taxa d'anticossos en animals amb LP és normalment més baixa que en vaques amb tumors (57), però vuit o nou vegades més alta que en els portadors asimptomàtics (219); aquestes variacions també s'han observat en altres tumors produïts per oncornavirus, i podrien estar relacionades amb un augment de la producció del virus (219).

Els animals joves poden adquirir una immunitat passiva per la ingestió de calostre procedent de vaques positives. La taxa d'anticossos dels vedells mostra una correlació directa amb el nivell d'anticossos en el sèrum de llurs mares (107); segons els mateixos autors la vida mitjana dels anticossos calostrals és d'uns 20 dies. Thurmond (203) per la seva banda l'estableix en 27,1 dies.

La taxa d'anticossos va baixant fins a ésser inapreciable per la tècnica de l'AGID entre les 6 i les 22 setmanes (104), entre els 2 i els 6 mesos (amb una mitjana de 3,8 mesos) (30), i entre 4 i 6 mesos (217). La tècnica del RIA, que és molt més sensible, permet detectar els anticossos durant un període 2,2 mesos més llarg que amb l'AGID, fins als 4-9 mesos (30). Aquestes dades s'han de tenir en compte en aplicar tècniques serològiques en animals d'aquesta edat, ja que es poden donar resultats falsament positius.

Immunosupressió. El VLB afecta invariablement els limfòcits: això ha fet pensar a alguns autors que el virus pot influir en l'activitat del sistema immunitari i provocar una minva de la capacitat de resposta immunològica. Altres virus leucèmics, com per exemple el virus de la leucèmia felina, poden produir una forta immunosupressió (40).

Ressang i col. (177), després d'una sèrie d'experiències en què comparen bovins indemnes i animals infectats clínicament sans, arribaren a la conclusió que no hi ha cap alteració del sistema immunitari humoral, però sí de la immunitat cel·lular, que baixa d'una manera significativa en els animals infectats. Altres autors no han trobat variacions significatives en el títol d'anticossos normals, d'immunoglobulines G i M ni d'heterohemaglutinines entre els animals infectats i no infectats (110).

S'ha estudiat també la possible relació entre mastitis i infecció pel VLB, sense resultats significatius, o sia que no es detectà que els animals infectats presentessin una deficiència immunitària que afavorís la presentació de mastitis (62); tampoc no s'observen variacions significatives en el nivell d'anticossos entre un grup d'animals seropositius i un de seronegatius després de vacunar de glossopeda (151).

En animals amb limfosarcoma es presenta sovint (80% dels casos) una absència total o parcial d'IgM del sèrum, mentre que altres immunoglobulines mantenen els nivells sèrics normals (209).

3. *Persistència del virus*

El virus apareix en els limfòcits circulants dels animals infectats experimentalment al cap d'una o dues setmanes de l'encomanament (182, 214). És interessant destacar que aquests animals encara tardaran dues o tres setmanes a presentar anticossos circulants, o sia que durant aquest període els animals poden encomanar la malaltia tot i que ells siguin serològicament negatius (182).

Els animals infectats resten en aquest estat durant tota la vida. Hom ha suggerit la possibilitat d'infeccions temporals pel VLB, però no s'ha realitzat cap estudi que demostrï que els animals infectats puguin realment quedar lliures del virus (52); en canvi, amb els estudis fets en diversos grups d'animals, tant infectats abans com després del naixement, tots ells han restat infectats durant tot el període en què han estat sotmesos a observació (59, 170).

IV.3. PATOGÈNIA

La malaltia es caracteritza per un període d'incubació molt llarg, comprès entre 200 dies i set anys, temps durant el qual els animals són portadors asimptomàtics del virus.

En un treball de Van der Maaten i Miller (214), consistent a infectar vedells experimentalment i sacrificar-los a intervals regulars entre els 8 i els 55 dies, els autors observaren que als 8 dies només pogueren aïllar el virus en la melsa; als 14 en la melsa i els leucòcits de sang circulant i més tard en ganglis i eventualment al plasma. No s'aïllaren en cap moment del timus. Aquests resultats indiquen el paper important de la melsa en els principis de la replicació del VLB. Roberts i col. (182) aïllen el virus en sang circulant als 7, 10 i 14 dies segons que la dosi inoculada sigui de 10^7 , 10^5 i 10^4 limfòcits provinents d'animals infectats.

Durant el període preclínic, els virus estan en els limfòcits de forma reprimida.

Posteriorment es pot presentar una limfocitosi persistent, caracteritzada per un augment del nombre de limfòcits entre un 55 i un 71% (63); aquest augment correspon als limfòcits B, ja que els T estan més aviat disminuïts. La producció d'immunoglobulines també està alterada, ja que les IgM estan significativament disminuïdes; els nivells d'Ig G1 i Ig G2 no presenten variació (192).

Aquesta resposta benigna pot durar uns quants anys, fins a la mort dels animals o fins a la presentació del limfosarcoma.

El limfosarcoma és un procés tumoral de conseqüències fatals. Els limfòcits sofreixen una transformació neoplàstica i es multipliquen en ganglis i altres teixits; les causes d'aquesta transformació no són conegudes, però se sap que els factors genètics hi tenen un paper important.

IV.4. QUADRE CLÍNIC

1. Limfocitosi persistent

La limfocitosi persistent (LP) és l'augment anormal en el nivell de limfòcits de la sang, determinat sobre dues mostres sanguínies recollides en un interval de tres mesos o més (100).

Gotze i col. (80) observaren que en els ramats afectats de leucosi hi havia una part dels animals amb LP i establiren que aquest és un estadi previ a l'aparició de la leucosi bovina, o sia que la LP és un estadi preleucòsic de la malaltia.

Actualment no es considera la limfocitosi persistent com un estat preleucèmic o una forma subclínica de la LEB, sinó com una proliferació limfocitària benigna i deguda al virus de la leucosi bovina (52). Aquest mateix autor indica que és possible que la presentació de LP i de limfosarcoma estiguin sota control de factors genètics independents, ja que només una petita part dels animals que presenten LP desenvoluparan posteriorment tumors i, contràriament, un 30% d'aquests animals no han presentat limfocitosi persistent prèvia.

La LP cursa sense símptomes clínics, lesions macroscòpiques, ni minves en les produccions. Els animals afectats amb LP presenten un quadre hematològic qualitativament normal; a cops s'observen limfòcits de morfologia atípica, però aquesta troballa no té cap significació, ja que també es presenta en la sang d'animals normals (60). L'augment del nombre de cèl·lules és degut exclusivament a l'augment del nombre de limfòcits B, que estan en una quantitat molt superior a la dels animals sans o amb leucosi (106, 220).

Aquesta resposta de l'organisme al virus es pot establir en un temps molt variable (normalment entre els tres mesos i els dos anys) després del contacte amb l'agent etiològic, i dura generalment força anys, fins a la mort de l'animal o la presentació de limfosarcomatosi.

El diagnòstic de la LP s'estableix a través de les anomenades claus hematològiques, de les quals parlarem més endavant, que foren molt usades

fins fa uns anys, ja que eren l'únic mètode conegut de diagnòstic de la leucosi.

El diagnòstic diferencial de la LP s'ha d'establir amb la limfocitosi transitòria per causes inflamatòries i amb la limfomatosi deguda al pas a la sang de limfòcits neoplàstics o aneuploides, que es presenta en un terç (60) o en la meitat (200) dels casos de limfosarcoma.

És interessant remarcar que els animals amb leucosi esporàdica no presenten limfocitosi persistent en un sentit estricte; ja que, bé que en alguns casos s'hi observa una leucocitosi, aquesta sempre cursa amb variacions qualitatives de les cèl·lules i acompanyant la presentació de tumors (115).

2. *Limfosarcoma*

El limfosarcoma afecta els animals de més de dos anys d'edat, preferentment els de 5-6 anys. La seva presentació és enzoòtica, és a dir, afecta animals pertanyents a ramats infectats pel VLB. La incidència del limfosarcoma és relativament baixa, ja que menys d'un cinc per cent dels animals infectats patiran aquest procés (60); segons Kahrs (100) el limfosarcoma afecta anualment menys del 3% dels animals pertanyents a un ramat infectat.

Es tracta d'un procés de presentació lenta amb proliferació tumoral dels nòduls limfàtics i dels òrgans. Es produeix de manera lenta i pot passar desapercebut durant unes setmanes o alguns mesos, en els quals no es produeixen alteracions que repercutixin en una disfunció.

En els primers estadis, la simptomatologia es limita a un creixement dels ganglis limfàtics diagnosticable per palpació dels nòduls accessibles externament o per exploració rectal.

La figura 3 ens mostra quins són aquests ganglis i la manera de palparlos.

L'augment de mida (el doble o el triple de la normal) de més d'un d'aquests ganglis, sense cap símptoma de procés inflamatori que en pogués ésser la causa, es pot considerar com una lesió tumoral. Si l'increment de mida és menor que el citat, es considerarà un símptoma de sospita de limfosarcoma (193).

En la leucosi enzoòtica l'augment de mida dels ganglis no és generalitzat, i en moltes ocasions es asimètric.

Els nòduls limfàtics afectats presenten una fermesa o tensió moderada (en comptes de la consistència normal elàstica-tova), són indolors i en la majoria dels casos desplaçables en relació als teixits veïns; al mateix temps estan tumefactes els nòduls limfàtics accessoris normalment inapreciables.

De 439 casos de leucosi limfàtica estudiats per Stöber (193, 194), només un 35% presentaren augment de mida dels ganglis palpables externament i

un 48% del dels explorables per via rectal. D'això resulta que només un 58% dels casos poden ésser diagnosticats per palpació. O sia que molts dels animals afectats per aquest procés només es poden diagnosticar en el següent estadi, quan es produeixen disfuncions d'òrgans veïns degudes a la compressió (per ex. els ganglis mesentèrics dificultats en el passatge intestinal, els mediastínics o retrofaringis dificultats en el remugament i en l'eructe, etc.) o quan algun òrgan que presenta metàstasi no compleix adequadament la seva funció.

En el quadre II hom pot veure la freqüència de tumors en relació als òrgans afectats i les alteracions funcionals d'aquests.

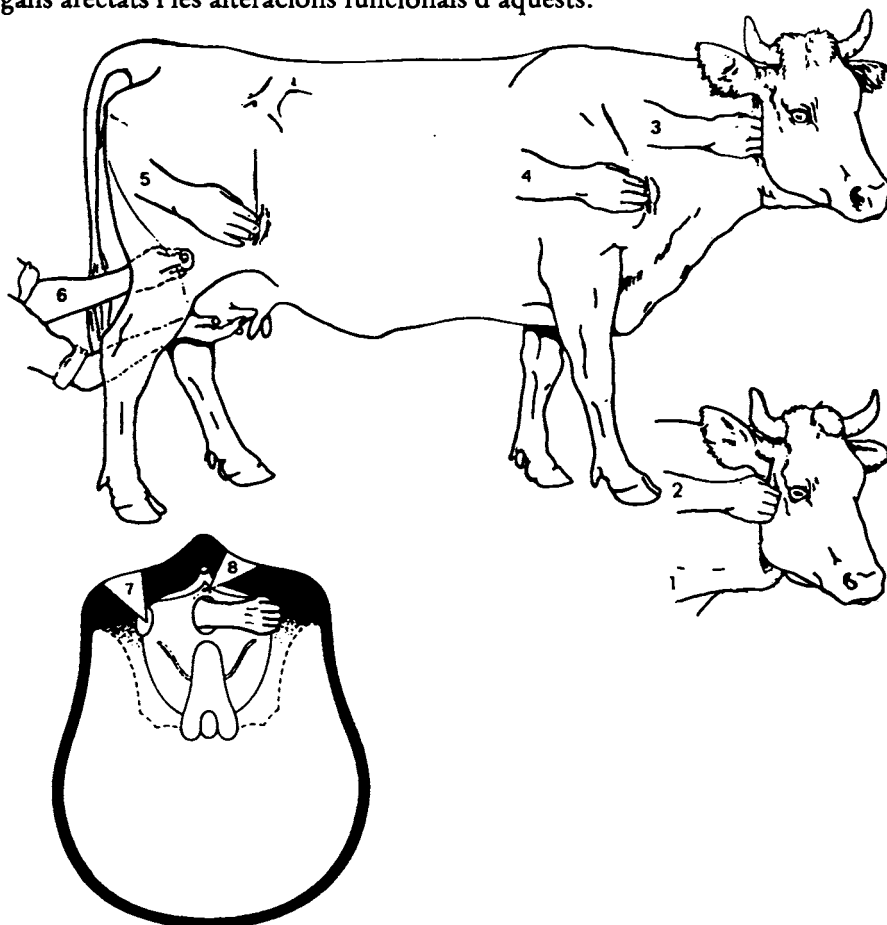


Fig. 3. Palpació dels ganglis limfàtics accessibles: 1) submaxil·lars; 2) subparotidis; 3) retrofaringis; 4) preescapulars; 5) precrurals; 6) supramamaris; 7) ilíacs interns i 8) de la bifurcació de l'aorta (aquests dos per exploració rectal) (segons Stöber, 193).

Quadre II. Freqüència de tumors en diversos òrgans i llurs repercussions funcionals en la leucosi bovina enzoòtica (en %).

Òrgan	Alteracions macroscòpiques i histològiques (Theilen i Madewell-200)	Alteracions macroscòpiques (Stöber-193)	Alteracions funcionals
Melsa	40	10	2
Cor	87	80	> 50
Pulmó	1	< 5	< 1
Seroses parietals	—	20	< 1
Preestómacs	—	20	< 10
Quall	92	80	60
Budells	48	40	< 1
Fetge	16	10	< 5
Oment	—	60	
— Ronyó	45	25	} 5
— Urèters	—	20	
— Bufeta	—	20	
Matriu i vagina	54	33	< 5
Esp. epidural de medul·la espinal	52	40	15
Múscul	36	15	< 1
Medul·la òssia	15	—	
Nòduls limfàtics	95		
Espai retrobulbar	10	20	

Tal com queda reflectit al quadre II, les alteracions funcionals poden afectar diversos òrgans; per tant, la simptomatologia produïda és molt variable i en molts casos inespecífica (quadre III).

Les alteracions del quadre sanguini consisteixen en un increment dels limfòcits immadurs o anormals, a causa del pas a la circulació general de cèl·lules tumorals. L'anèmia que es presenta en part dels animals és de tipus normocític i normocròmic, i no és deguda a una afectació de l'eritropoesi sinó que té origen hemorràgic (normalment per hemorràgies de quall o més rarament per ruptura de melsa).

Independentment de la simptomatologia presentada, el curs de la malaltia sempre és fatal. Es produeix debilitat progressiva, pèrdua gradual de pes, anorèxia en grau variable, que condueixen a la mort o al sacrifici d'urgència. Ocasionalment la mort es pot presentar de forma ràpida, per raó de la infiltració limfocitària del múscul cardíac, dessagnament per ruptura esplènica (100, 193) o peritonitis per ruptura de la paret del quall (200).

Schlam (189) cita un cas de remissió temporal de la simptomatologia amb recuperació de la mida normal dels nòduls limfàtics afectats, però als 11 mesos es produí una davallada de l'animal amb conseqüències fatals.

Quadre III. Freqüència de símptomes clínics (Stöber, M. 194).

Augment de mida de més d'un gangli limfàtic accessible	58%	
– externament		35%
– per exploració rectal		48%
Variacions en el quadre sanguini	64%	
Símptomes circulatoris	64%	
Anèmia hemorràgica	52%	
Indigestió per tumors i úlceres de quall	62%	
Sobrecàrrega o timpanisme de rumen	19%	
Exoftàlmia (amb lesions secundàries de l'ull)	9%	
Tumors de matriu, vagina o teixit perivaginal	33%	
Paràlisi o parèsia del terç posterior	16%	
Tumoració de la melsa (per percussió)	9%	

IV.5. LESIONS

1. *Lesions macroscòpiques:* Poden presentar-se aïllades o bé de forma generalitzada en el teixit limforeticular. Els ganglis limfàtics estan augmentats de mida amb superfície llisa i consistència ferma. A la secció són de color blanc mat o gris brut uniforme; en ocasions poden presentar taques roges corresponents a focus hemorràgics i zones de reblaniment degudes a necrosi (63).

Diversos òrgans poden presentar també una infiltració limfocitària difusa o masses tumorals. El cor i el quall són els més afectats, però també es poden trobar a la melsa, al ronyó, a les seroses, a la paret intestinal... Els òrgans afectats prenen un aspecte nodular o hipertrofiat. En aquests focus metaplàstics també es pot presentar reblaniment i necrosi.

2. *Lesions histològiques:* El procés neoplàstic es presenta en els òrgans afectats com una proliferació infiltrant massiva de cèl·lules de tipus limfoide, possiblement originades a partir dels limfòcits B, ja que gran part de les cèl·lules neoplàstiques presenten activitat ATPasa, com les àrees dependents dels limfòcits B en els ganglis limfàtics normals (228).

Les cèl·lules tumorals poden ésser limfòcits madurs, prolimfòcits o limfoblasts. Normalment un d'aquests tipus cel·lulars predomina sobre els altres (200); també s'hi observen ocasionalment elements hístio-reticulars. És freqüent l'observació d'anisocitosi i de mitosi, i en aquestes un alt percentatge són anormals.

Els ganglis limfàtics afectats presenten una morfologia monòtona per proliferació cel·lular massiva i per la desaparició de les estructures ganglionars normals, de manera que és impossible diferenciar la cortical de la medul·lar. El teixit neoplàstic pot estar mancat d'una trama fibril·lar de sosteniment o bé pot disposar de fibres reticulars neoformades (131).

Unes poques cèl·lules limfoides dels animals infectats presenten estructures nuclears en forma de bossa; hom ha suggerit que llur presència pot ajudar en el diagnòstic de la leucosi bovina, però l'existència d'aquestes estructures en limfòcits d'animals sans les invalida per al diagnòstic de la infecció per VLB (105); de tota manera, aquestes estructures tenen relació amb la leucosi, ja que sembla que una proporció elevada de cèl·lules amb aquestes estructures comporta una major infectivitat de la sang (224).

IV.6. TRANSMISSIÓ EXPERIMENTAL

Ja abans del descobriment del VLB i dels mètodes de diagnòstic, es feren gran nombre d'estudis inoculant teixits neoplàstics o sang de vaques leucòsiques en animals de diverses espècies (200). No parlarem de tots aquests experiments, atès que llur interpretació actualment és difícil perquè no es podia saber si l'animal infectat tenia prèviament el virus, i perquè el fet d'haver d'esperar l'aparició de simptomatologia clínica podia induir a error.

En un estudi consistent a inocular 41 vedells experimentalment amb el virus purificat, al cap de cinc anys d'estudis s'observaren sis animals amb leucosi i tres amb limfocitosi persistent; en tots els animals, s'hi evidencià el virus (162).

Mammerickx i col. (125) infectaren vedells administrant-los sang d'animals positius per via oral i intradèrmica; la primera resposta serològica al RIA es produí entre els 15 i els 30 dies, sense diferències entre les dues vies. Altres investigadors (180) no aconsegueixen de transmetre la leucosi a quatre vedells d'un any als quals s'administraren $5 \cdot 10^6$ leucòcits en vaques infectades per via oral, però si a d'altres a les quals s'administrà la mateixa quantitat per via intratraqueal (4 vedells), subcutània i intradèrmica. Per via uterina només s'infectà un animal dels quatre inoculats. En tots els casos positius s'aïllà el virus o foren positius per la prova de l'AGID a les tres setmanes de la inoculació.

Es considera el bestiar oví com un bon model experimental per a l'estudi de la leucosi bovina. La primera transmissió a una ovella data del 1929. Els xais acabats de néixer inoculats amb el VLB presenten una proporció alta de limfomatosos: 4 de 5 animals infectats entre els 12 i 24 mesos (169), 9 abans dels 22 mesos (199), dos de sis entre els 24 i 34 mesos (76), un 50-58% en un període de tres anys (52). En aquests estudis tots els animals presenten anticossos contra el VLB.

Hom ha observat que després de passar el virus per l'ovella continua essent infecció per a la vaca (125) i per a l'ovella (77).

També s'han inoculat cèl·lules infectades amb el VLB en altres espècies

animals: en el porc, el conill domèstic, el gat i el cabirol es presentà una reacció immunològica persistent; en el gos i la rata s'observaren anticossos durant un període curt de temps. No es demostraren anticossos en el ratolí, l'esquirol, la gallina, el conill, el bestiar porquí i la guatlla, ni en xais inoculats amb cultius cel·lulars provinents d'aquests animals (11).

V

MÈTODES DE DIAGNÒSTIC

V.I. MÈTODES DIRECTES

Es basen en la detecció del virus o dels seus antígens en els limfòcits de la sang perifèrica i requereixen el cultiu *in vitro* d'aquestes cèl·lules. Aquests mètodes tenen gran interès científic, però poca importància pràctica per al diagnòstic de rutina, ja que són complicats i cars. L'interès pràctic radica principalment en el fet que permeten de discernir entre un animal infectat i un animal portador d'anticossos calostrals; per tant, aquestes proves (sobretot la basada en l'efecte sincític) són les recomanades en casos d'animals de menys de sis mesos (58).

1. *Observació del virus amb microscopi electrònic.* Aquest mètode presenta força inconvenients per a la detecció del virus, ja que és massa complicat, lent i relativament poc sensible; a més, no és específic, ja que el VLB pot ésser confós amb diverses estructures subcel·lulars.

2. *Mètodes immunològics.* Tracten de descobrir l'antigen en els cultius cel·lulars a partir d'anticossos existents en sèrums d'animals infectats.

El primer mètode immunològic emprat fou la immunofluorescència directa (56).

També s'ha usat l'assaig radioimmunològic, que ha demostrat ésser una tècnica molt sensible (52), la immunodifusió i l'ELISA.

3. *Observació de l'efecte sincític.* Hom ha fet nombrosos estudis per a determinar les alteracions citològiques produïdes en cèl·lules de nòduls limfàtics o en limfòcits de sang perifèrica infectades amb el VLB, i no s'ha demostrat mai l'existència de cap efecte sobre la cèl·lula infectada atribuïble a la infecció del VLB, però sí que s'ha demostrat que el cocultiu de determinades línies cel·lulars amb limfòcits procedents d'animals leucòsics provoca un efecte sincític, és a dir, la producció de cèl·lules multinucleades. S'ha demostrat que aquest efecte és específic del VLB (52, 153).

Els cultius que presenten formació de sincicis en contacte amb cèl·lules infectades pel VLB són els de cèl·lules embrionàries pulmonars humanes o bovines, els de cèl·lules embrionàries de melsa bovina (EP-BESP), i els de

cèl·lules felines infectades pel virus del sarcoma del ratolí (CC-81). Les cèl·lules s'han d'incubar conjuntament durant quatre-vuit dies per a donar temps a l'aparició dels sincicis. Aquest mètode és més sensible i menys costós per a la detecció del VLB que el microscopi electrònic i que la immuno-fluorescència (52, 54).

4. *Altres mètodes.* Són la comprovació de l'activitat de la transcriptasa reversa i les proves d'infectivitat, aquestes darreres consistents en la inoculació del material sospitós en animals sensibles (bovins o ovins); pel seu cost i per la durada de la prova, només s'utilitza amb finalitats científiques.

V.2. MÈTODES SEROLÒGICS

La detecció d'anticossos específics en sèrums és un dels mètodes més pràctics i més usats en el diagnòstic de les infeccions virals. Per a establir la validesa d'aquest mètode és necessari, però, demostrar que tots els animals seropositius són hostes del virus i que els seronegatius no, o establir en quines condicions això es compleix. Aquest aspecte referent a la leucosi bovina ha estat estudiat en diversos treballs (59, 82) en què s'ha constatat que en els animals de més de sis mesos d'edat els mètodes serològics són totalment vàlids (91).

Respecte a possibles variacions temporals del nivell d'anticossos, Matthaeus i Straub (136), no detectant cap minva del nivell d'immunoglobulines sèriques en els moments propers al part, esmentaren només que en alguns animals el títol era més elevat abans del part que després. Posteriorment s'ha comprovat que es poden produir oscil·lacions capaces d'afectar el resultat de proves relativament poc sensibles. Aquestes minves de la taxa d'anticossos es produeixen sobretot en els moments propers al part, entre les 8 setmanes d'abans del part i les 12 de després, i provoquen en un 18% dels animals infectats uns resultats dèbilment positius o negatius a l'AGID en algun moment (12); uns altres autors estableixen un període més curt (entre 15 dies abans i 15 dies després del part), però amb major incidència sobre el bestiar ja que un 40% hi reaccionaren negativament (78).

També s'ha d'evitar de prendre mostres just després d'una vacunació, ja que pot haver-hi una petita minva del nivell d'anticossos: un de 16 animals vacunats de glossopeda per Straub (197) presentà una minva del títol d'anticossos el quart dia de la vacunació.

És interessant també de tenir en compte, sobretot en escollir el mètode de diagnòstic, que en animals que ja estan en procés de sanejament el títol d'anticossos és més baix que el dels animals d'explotacions que s'analitzen per primera vegada (130).

En els animals de menys de sis mesos d'edat es poden donar resultats falsament positius deguts a una immunització passiva adquirida a través dels anticossos materns presents en el calostre de les vaques seropositives, i cal doncs realitzar el diagnòstic en aquests animals per mètodes directes.

A més de llur sensibilitat, els mètodes serològics tenen l'avantatge que són pràctics i que permeten la investigació de grans quantitats de mostres d'una manera ràpida i fiable.

1. Immunodifusió en gel d'agar

Aquesta tècnica fou realitzada per primera vegada, com a prova diagnòstica de la leucosi, per Miller i Olson (140) i es basa en la difusió concurrent d'un antigen i un anticòs a través d'un medi semi-sòlid. Quan coincideixen les dues molècules es forma un immunoprecipitat que queda atrapat en el gel i es fa visible en forma de línia o banda de precipitació.

La composició de l'agar varia segons els autors. Sol contenir una concentració alta de clorur sòdic per a afavorir la formació del precipitat.

Es fon l'agar i es posa en plaques de Petri, en les quals es fan quatre grups de forats; cada grup té un forat central on es posa l'antigen i sis de laterals equidistants en els quals es posen els sèrums problema i els controls (dos o tres segons els autors). A continuació s'incuba a temperatura ambient.

La prova es llegeix a les 24 i 48 hores, bé que en alguns casos (8%) cal esperar a les 72 hores, per a poder aclarir els resultats que eren dubtosos a les 48 hores (93).

Diversos autors han comparat els diferents antígens de la partícula vírica per a establir quin d'ells és més fiable.

D'un total de 263 sèrums analitzats per Miller i col. (145), hi hagué un 36% de discordances entre l'antigen glicoproteic i el p-24, totes degudes a un resultat positiu al primer i negatiu en aquest; uns altres autors obtenen un 25% de diferències, també degudes exclusivament a resultats positius a la gp-69 i negatius a la p-24 (121). En un altre treball hom cita un cas de positivitat a l'antigen proteic i resultats negatius a la glicoproteïna; d'altra banda, de 24 animals positius a aquesta només 7 ho foren a la p-24 (187). Holmen-Andersen (88) només obté 44 animals positius a l'AGID p-24 mentre que 79 ho foren amb l'antigen glicoproteic.

Altres autors han aconseguit també millors resultats amb la glicoproteïna: un 17,6% d'animals positius contra un 7,4% en un total de 984 mostres (225), un 80% contra un 46% d'un ramat de 89 animals amb alta incidència de leucosi (169), un 81,5% contra un 0,6% en 307 animals positius (210) i un 38,8% d'animals gp-positius i p-24 negatius d'un total de més de 10.000 proves realitzades per Forschner (64). Frenzel i col. (69) també obte-

nen resultats evidentment millors amb la glicoproteïna. Aquests autors també estudien els resultats de la immunodifusió amb p-15, que són millors que els obtinguts amb la p-25, però força inferiors als de la gp-69 (9 animals positius a la p-15, 2 a la p-25 i 60 a la gp-69).

En conclusió, es recomana doncs l'ús de la glicoproteïna en la prova de la immunodifusió, ja que la proteïna interna del virió és poc sensible i fins i tot donà resultats negatius en casos amb expressió clínica de leucosi (121, 187). A pesar d'això, s'ha vist que existeix una correlació entre la presència d'anticossos contra l'antigen p-24 i la presentació de limfosarcoma, i fins s'ha proposat com a mètode indicador de la possible presència de tumors (137).

Alguns autors, basant-se en l'aparició en alguns casos de mostres positives a la p-24 i negatives a l'antigen glicoproteic, recomanen la utilització d'un preparat amb els dos antigens barrejats (72); però, tenint en compte que la proporció d'animals positius a la p-24 i negatius a la gp-69 és molt baixa, es considera totalment vàlid treballar només amb l'antigen glicoproteic, que és el que es comercialitza.

S'ha descrit una prova d'immunodifusió indirecta, doble i enriquida amb àcid tànic; segons els autors és vuit vegades més sensible que l'AGID normal, i, bé que més laboriosa i lenta, es pot utilitzar amb avantatge sobre la tècnica convencional àdhuc en diagnòstics a gran escala (222).

Un dels inconvenients de la immunodifusió és que la interpretació dels resultats és subjectiva. Lorenz i Straub (117) estudiaren les diferències entre els resultats obtinguts per 11 persones diferents: els resultats que donaren als sèrums amb títols alts foren unànimement positius, però en sèrums de baixa titulació d'anticossos i en sèrums negatius s'observaren variacions entre les persones; hi havia una forta correlació inversa entre els percentatges obtinguts per cada observador de resultats falsament positius i falsament negatius. Uns altres autors comparen els resultats obtinguts per 55 laboratoris sobre 20 mostres; només un 45,5% coincidiren en tots els resultats; la majoria dels errors, com en el treball anterior, consistiren a donar com a negatives mostres feblement positives (157).

Autors alemanys (16, 17, 65), després de comparar la immunodifusió i l'ELISA, arriben a la conclusió que els sèrums que reaccionen de manera "dubtosa" o "positiva dèbil" a la primera d'aquestes proves són positius a l'ELISA, o sia que realment són sèrums portadors d'anticossos contra el VLB i es poden considerar positius.

L'AGID és una prova senzilla i automatitzable, per tant és apta per a anàlisis de gran quantitat de mostres (67). Actualment és la prova més utilitzada en la pràctica, ja que és econòmica (72), simple (121, 141), específica i sensible, però té alguns inconvenients: la interpretació dels resultats és sub-

jectiva; en no presentar una sensibilitat gaire elevada es poden obtenir resultats falsament negatius en animals infectats recentment o bé en èpoques properes al part, i finalment la consecució dels resultats és lenta ja que cal esperar tres dies per a poder confirmar la negativitat dels sèrums. És l'única prova reconeguda actualment per les reglamentacions de la C.E.E. (*)

2. ELISA

La prova d'ELISA (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) fou descrita per primera vegada l'any 1971 i des de llavors ha estat aplicada a multitud de disciplines (patologia infecciosa i parasitària, immunopatologia, endocrinologia, estudi d'hormones i fàrmacs, agricultura, ...).

Hi ha tres tipus bàsics de proves d'ELISA: el mètode competitiu, semblant a l'utilitzat normalment amb el RIA, el mètode de doble anticòs o de "Sandwich", i el mètode indirecte, que és el més utilitzat per a diagnosticar la leucosi bovina.

El mètode indirecte consisteix bàsicament (figura 4) en la fixació de l'antigen del VLB, normalment la gp-69, en el suport sòlid (generalment microplaques de material plàstic) (vegeu la fig. 4.a). A continuació es renta per eliminar l'antigen que no s'ha absorbit i s'hi afegeix el sèrum, ja sigui problema o control (b), i es deixa en contacte un cert temps a una temperatura determinada, per tal que, en cas d'haver-hi anticossos en el sèrum, aquests s'uneixin a l'antigen.

El següent pas (c), després de rentar la placa, consistirà en l'addició d'una antiimmunoglobulina que reaccionarà amb l'anticòs (en cas que aquest resti a la placa unit a l'antigen). Aquesta proteïna està conjugada amb un enzim (normalment peroxidasa o fosfatasa alcalina).

Finalment s'hi afegeix un substrat sobre el qual actuarà l'enzim (d); el substrat és incolor, i en reaccionar s'obté un producte colorat, de manera que es pot observar el canvi a simple vista i es pot quantificar amb un colorímetre.

Com hem pogut observar, la base del mètode consisteix, igual que en la immunofluorescència i en l'assaig radioimmunològic, en la unió del reactiu immunològic amb un marcador (en aquest cas de tipus enzimàtic); d'aquesta manera s'obtenen una sensibilitat i una especificitat molt més elevades.

Els primers que aplicaren la prova d'ELISA al diagnòstic del VLB foren Ressang i col. (176); aquests autors obtingueren el mateix nombre de positius i negatius que amb la immunodifusió, amb una discordança del 0,5%. Posteriorment obtenen uns resultats semblants i recomanen la utilit-

(*) Des de 1988 també es reconeix l'ELISA.

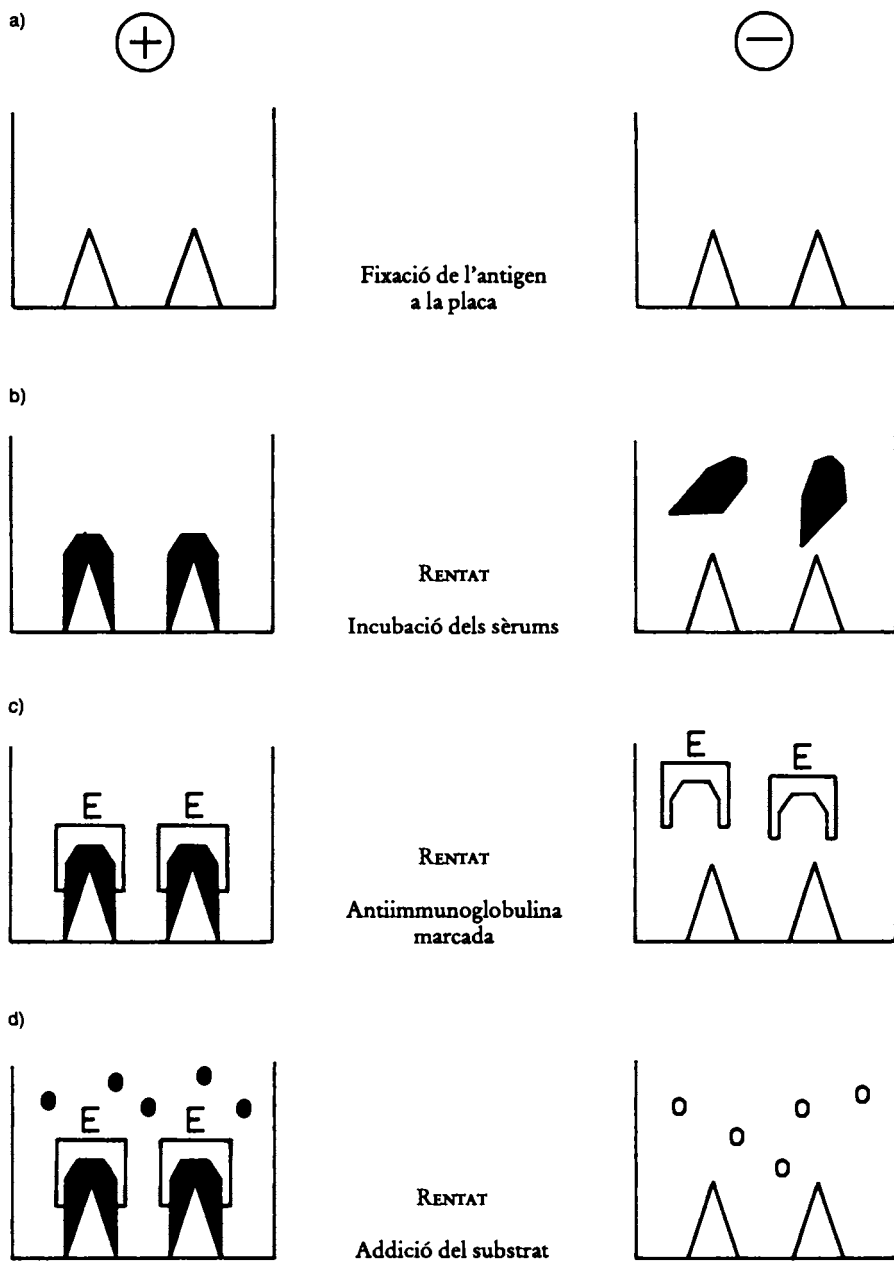


Fig. 4. Principi de la tècnica d'ELISA.

zació de l'ELISA en els casos en què s'obté una reacció dubtosa a la immunodifusió (178).

Altres autors que han emprat aquesta tècnica la consideren tots ells més sensible que la immunodifusió (9, 15, 20, 129, 134, 139, 206, 221). Behrens i col. (15) afirmen que el 70% dels animals infectats naturalment presenten anticossos a la prova d'ELISA abans que a la immunodifusió; en alguns casos, l'interval entre la positivitat d'ambdues proves pot arribar a ésser de 12 setmanes.

Aquest mateix equip (16) determinà que totes les mostres amb titulacions superiors a 1:128 a l'ELISA són positives a l'AGID i contràriament, les que oscil·len entre 1:8 i 1:128 són normalment negatives o com a màxim dubtoses a aquesta darrera prova.

Autors belgues (126, 171) han modificat aquesta tècnica, per a poder utilitzar un anticòs monoclonal específic contra la glicoproteïna; l'anticòs es fixa a la placa i es fa reaccionar amb antigen, de manera que aquest queda fixat, encara que indirectament, a la placa. D'aquesta manera, s'aconsegueix disminuir la resposta inespecífica i per tant augmentar la sensibilitat.

Posteriorment, aquests mateixos autors (127, 128) han aplicat aquesta prova a barreges de sèrums, i els resultats obtinguts han estat realment bons, sempre que no es barregin més de 75 sèrums per cada determinació per tal de detectar taxes d'infecció superiors a l'1% (127).

Aquesta modificació permet de reduir despeses i treball de laboratori, així com una uniformitat del tractament i una centralització dels resultats, fins i tot en el cas d'estudis de poblacions grosses, sempre que la taxa d'infecció sigui baixa, ja que si és elevada, l'eficàcia és menor.

Altaner i col. (1) modifiquen la fase sòlida, canviant les microplaques per uns tubs de polistirè, de manera que la lectura es pot realitzar amb un colorímetre normal, o àdhuc a simple vista, amb uns resultats molt satisfactoris segons els autors.

La major sensibilitat de la prova d'ELISA en relació a la immunodifusió permet detectar les noves infeccions més precoçment (i per tant poder fer extraccions de sang més seguides i aconseguir d'aquesta manera l'eradicació de la malaltia més ràpidament), utilitzar la llet com a material de recerca per a la detecció d'animals positius (apartat 5) i fins i tot utilitzar barreges de sèrums. L'inconvenient més gran n'és el preu, ja que es tracta d'una prova més cara que l'AGID.

En relació a la immunofluorescència i al RIA, cal dir que tenen una sensibilitat semblant, però aquestes presenten uns inconvenients que no té l'ELISA: la IF és molt laboriosa i la seva lectura és subjectiva, i el RIA presenta els inconvenients d'haver de treballar amb isòtops radioactius de maneig difícil i amb una problemàtica complexa i de necessitar aparells molt cars (223).

3. Assaig radioimmunològic

L'assaig radioimmunològic (RIA) consisteix en el marcatge del reactiu immunològic amb una substància radioactiva (normalment, I_{125}), i la seva incubació amb el sèrum problema, per tal de determinar a continuació la radioactivitat del precipitat format amb un comptador de raigs gamma. Hom sol utilitzar el mètode competitiu.

Aquesta tècnica té força avantatges: dades quantitatives, alta sensibilitat i capacitat d'automatització (73, 175); els inconvenients més grossos són l'alt preu dels aparells necessaris, que el fan prohibitiu per a molts laboratoris, i els problemes que suposa l'ús de material radioactiu.

Un dels punts a tenir en compte per al desenvolupament de la tècnica és la determinació del grau mínim de precipitació atribuïble a anticossos específics. Bex i col. (19) consideren positius els sèrums capaços de precipitar el 50% del màxim precipitable, amb una sensibilitat semblant a la prova de l'AGID. Altres autors consideren ja positius uns títols del 20% (43, 85), del 15% (146) o del 10% (114), amb la qual cosa la prova guanya sensibilitat, sense perdre en canvi especificitat.

En aquesta tècnica s'han usat tant l'antigen glicoproteic com el proteic: tots els treballs en què s'han comparat els dos antígens han demostrat que la glicoproteïna és més sensible que la p-24 (19, 85, 114, 146).

Zajac i Altaner (229) descriuen la tècnica del RIA en fase sòlida, i consideren que, amb la mateixa sensibilitat i especificitat que el RIA clàssic, el mètode és més simple.

Força autors han estudiat comparativament els resultats obtinguts amb el RIA i amb la immunodifusió; els primers de fer-ho foren Devare i col. (43): d'un total de 46 animals amb títols alts a la tècnica del RIA, tots, excepte 3, foren positius a l'AGID, i dos que eren positius a aquesta prova foren negatius al RIA, fet que expliquen els autors per la presència en aquests animals de gp-69 però no de p-24; les conclusions dels autors són que el RIA és una mica més sensible i que té l'avantatge d'ésser quantitatiu.

Uns altres autors consideren l'AGID més pràctic, ja que aproximadament presenta la mateixa sensibilitat (o més i tot, si es compara amb el RIA p-24) i és més senzill, però cal tenir en compte que es consideren uns títols del RIA molt elevats, que baixen per tant la sensibilitat de la prova (19).

Gupta i Ferrer (83, 85) en dues experiències diferents estableixen que el RIA p-24 és un 10% més sensible que l'AGIP gp-69, sobretot a causa de la menor sensibilitat d'aquesta última prova en els primers estadis de la infecció. Altres autors consideren, després d'obtenir uns resultats semblants, que l'AGID és totalment vàlid per a la detecció de ramats infectats, però no per a la de casos aïllats (72). Miller i col. (146) obtenen 12 sèrums falsament

negatius de 188 positius al RIA, que corresponen als que tenen títols més baixos en la prova radioimmunitària; el percentatge més elevat d'errors es dona en animals infectats recentment i en els moments propers al part.

En un estudi realitzat sobre la presència d'anticossos calostrals comparant les dues tècniques s'obté que el RIA és molt més sensible, ja que detecta anticossos als 9 mesos d'edat i l'AGID només fins als sis mesos.

Els anticossos precalostrals sembla que també es detecten millor amb el RIA: de tres animals positius obtinguts per Jacobsen i col. (93), un fou negatiu a la ID i dos mostraren una reacció positiva molt feble, possiblement perquè els animals infectats *in utero* tenen uns títols menors.

4. Altres mètodes serològics

Fixació del complement. Aquesta tècnica té l'inconvenient que molts sèrums tenen activitat anticomplementària, particularment si les mostres han estat extretes sense cura (52), i en la pràctica no s'utilitza. Els estudis que s'han fet comparant-la amb l'AGID han donat uns resultats pitjors que amb aquesta prova, ja que a part del treball de Paulsen i col. (169), que obté uns resultats lleugerament millors per la fixació del complement, els altres consideren que l'AGID és més sensible en un 15% (141, 145), un 16% (81) i un 17% (121).

Immunofluorescència. És un mètode sensible i específic per a la detecció d'anticossos contra el VLB; tot i el seu interès en exàmens especials, no és pràctic en el treball de rutina ni en el diagnòstic a gran escala (153). Els millors resultats s'aconsegueixen amb la IF indirecta i amb la anticomplementària (97). La reacció de fluorescència és deguda sobretot a la presència de la proteïna interna del virió (p-24). És, de tota manera, una prova menys sensible que l'AGID (210).

Immunoperoxidasa indirecta. Aquesta tècnica s'aplicà al diagnòstic de la leucosi bovina per primera vegada l'any 1976. Es considera que té una sensibilitat semblant a la immunofluorescència. Segons Musgay i Kaaden (153) avantatja aquesta tècnica en el fet que es pot avaluar amb un microscopi òptic normal i perquè les preparacions es poden guardar a temperatura ambient durant força temps.

Seroneutralització. També anomenada inhibició de l'efecte sincític. Es basa en la capacitat del VLB de produir la formació de sincicis en determinats cultius cel·lulars. Si hom administra un sèrum problema amb anticossos contra el VLB, aquests neutralitzaran el virus i s'inhibirà l'efecte sincític. Aquest mètode és molt sensible, però requereix un període d'incubació de 5 a 7 dies. Modificant la tècnica amb l'ús d'un pseudotipus de Rhabdovirus, hom pot obtenir resultats en 24-36 hores (52).

Inhibició de la transcriptasa reversa. Alguns sèrums de vaques leucòsiques tenen una fracció d'IgG sèriques que actua inhibint l'activitat de la transcriptasa reversa; aquesta propietat ha estat aprofitada per a establir una tècnica diagnòstica. La seva sensibilitat és força baixa, bé que Rossler i col. (185) després de modificar-la obtenen uns resultats bons.

Immunoelectroforesi. Es basa en els mateixos principis que l'AGID, però es realitza en un camp elèctric, amb la qual cosa s'aconsegueix d'escurejar el temps necessari per a establir el diagnòstic fins a les 2-4 hores; té l'inconvenient de necessitar una tècnica més acurada (135, 171).

Hemoaglutinació indirecta. S'obtenen uns resultats pràcticament iguals a la immunodifusió, amb l'avantatge d'ésser semi-quantitativa, i els resultats s'obtenen més ràpidament, però, en contrapartida, és una tècnica més delicada, que exigeix més temps que l'AGID (88).

5. La llet com a substrat del diagnòstic serològic

Com que a moltes explotacions de vaques lleteres es fan controls periòdics sistemàtics de la llet per a avaluar la producció i la qualitat d'aquesta, diversos autors han estudiat la possibilitat de realitzar el diagnòstic de la leucosi bovina sobre aquest material, car així hom podria reduir les despeses dels estudis epidemiològics i de les possibles campanyes d'erradicació.

Straub i col. (198) foren els primers de comparar el mètode d'immunodifusió en sèrum i en llet, i obtingueren en aquesta percentatges d'animals positius molt més baixos; desaconsellaren per tant la utilització de mostres de llet en l'estudi de la leucosi. Nougayrede i Gayot (156), que obtenen uns resultats semblants, també estudien la presència d'anticossos en el sèrum lacti, sense trobar diferències significatives amb els resultats obtinguts a les mostres de llet. Uns altres autors no detecten anticossos, utilitzant aquest mateix mètode, en la llet de cap dels 360 animals seropositius estudiats (50).

Bex i col. (19) comparen mostres de llet i sèrum procedents de nou animals positius analitzades amb la tècnica del RIA, i bé que les mostres de llet són positives, els títols són molt més baixos (en una "ratio" dels títols sèrum/llet que oscil·la entre 117 i 4, usant l'antigen gp-69). Atribueixen els baixos títols en la llet a la menor concentració d'immunoglobulines en aquesta secreció que en el sèrum. Bán i col. (7) consideren que és un substrat apte, però que la reproductivitat de les proves és baixa a causa de les interferències produïdes pel greix de la llet.

La prova d'ELISA aplicada a la llet ha estat utilitzada darrerament per a diagnosticar la leucosi amb uns resultats interessants, ja que ha demostrat ésser més (9, 129, 130, 221) o com a mínim tan (208) sensible com la immunodifusió en sang; pot ésser per tant una prova interessant en la pràctica. Els

títols que s'obtenen utilitzant la llet com a substrat són unes 10 o 15 vegades menors als obtinguts en sèrum sanguini (7, 130, 208).

Havent-se estudiat també la possibilitat d'aplicar aquesta prova a una mostra de llet de tota l'explotació, s'han obtingut uns resultats positius si el 10% de la llet total és d'animals seropositius (9).

Altres autors (174, 208) obtingueren resultats semblants, i àdhuc una mica millors, però observaren, d'altra banda, que algun ramat amb una taxa d'infecció superior, fins i tot del 40%, donava resultats negatius.

Si els animals pertanyen a granges que ja estan en procés de sanejament, aquesta prova no té cap fiabilitat, ja que el percentatge d'animals infectats i llurs títols d'anticossos solen ésser baixos (130).

El calostre és capaç de provocar en els vedells acabats de néixer una immunitat passiva (cap. 4.2.2.), car és molt ric en anticossos i per tant pot servir per a diagnosticar els animals positius àdhuc mitjançant la prova de l'AGID (12, 78). Cal tenir en compte aquesta circumstància, ja que pot ésser molt útil en un període en què, com ja hem vist, baixa molt el títol d'anticossos en el sèrum sanguini.

V.3. MÈTODES HEMATOLÒGICS

Bé que actualment estan en desús, durant molt anys els mètodes hematològics foren els únics de què es disposava per al diagnòstic i la lluita contra la leucosi.

Aquests mètodes es basen en el diagnòstic dels animals amb un quadre hemàtic alterat, o sia dels que tenen limfocitosi persistent, i donen per tant com a negatius els animals portadors que no presenten variacions hemàtiques, que en un ramat infectat poden representar el 28-33% dels efectius (60, 219).

Després d'una sèrie d'exàmens hematològics anuals a Alemanya, hom constatà que les pèrdues per tumors baixaren clarament, però no el nombre de ramats infectats, que restà pràcticament igual (64); no tingueren per tant cap utilitat en l'eradicació de la leucosi (67, 87, 104, 175).

Per a l'establiment d'un diagnòstic es féu necessari definir els valors pels quals es considerava que un animal era positiu o dubtós a la leucosi; aquests valors es reuniren sota la forma de "claus hematològiques". Totes elles tenen en comú l'establiment d'un diagnòstic (negatiu, dubtós o positiu a la leucosi) segons l'edat i el nombre de limfòcits o leucòcits.

Les claus més usades han estat (36):

– de Goetze (Alemanya): és la més antiga; tenia l'avantatge de referir-se al nombre de limfòcits, però és poc precisa, ja que només designa dos tipus d'edat.

- de Bendixen (Dinamarca): és més precisa que l'anterior.
- de Göttingen (Alemanya): consta de dues taules, una relaciona l'edat amb els leucòcits i l'altra amb els limfòcits.
- de Wusterhausen (R.D.A.): és semblant a la de Bendixen.
- de Rademacher i Kraus: és més tolerant que la de Göttingen, però s'assemblen força.
- L'emprada a la URSS: és complicada.
- L'emprada a França: a diferència de les anteriors, es presenta en forma de gràfica amb el nombre de limfòcits i leucòcits a les ordenades i l'edat a l'eix d'abscisses.
- La de la C.E.E.: l'any 1978 hom estudià comparativament els paràmetres de les diverses races europees i s'establí una clau oficial per als països de la Comunitat (122) (quadre IV).

Quadre IV. Clau hematològica de la C.E.E.

Edat	Hematol. negatius	Valors a reexaminar	Hematol. positius
Menys d'1 any	11.000	11.000 - 13.000	13.000
1 - 2 anys	10.000	10.000 - 12.000	12.000
2 - 3 anys	8.500	8.500 - 10.500	10.500
3 - 4 anys	7.500	7.500 - 9.500	9.500
4 - 5 anys	6.500	6.500 - 8.500	8.500
5 - 6 anys	6.000	6.000 - 8.000	8.000
més de 6 anys	5.500	5.500 - 7.500	7.500

Els valors es refereixen al nombre de limfòcits per mm³.

Els animals considerats "dubtosos" (menys de 2.000 limfòcits per sota de la línia de "positius") es tornen a examinar immediatament, i en cas de passar la barrera dels "positius" es consideren com a tals.

VI

EPIDEMIOLOGIA

VI.1. EPIDEMIOLOGIA DESCRIPTIVA

1. *Espècies susceptibles*

El bestiar boví és l'hoste natural del virus de la leucosi bovina; s'accepta que les races de llet són més propenses a estar infectades pel VLB que les races d'aptitud càrnica. En un estudi realitzat a Florida sobre més de 10.000 caps, s'observà un 47,8% de vaques de llet infectades, mentre que en les races d'aptitud càrnica el percentatge era del 6,7% del total d'aquesta població (29). McGuire i col. (138) observen que entre els animals infectats el percentatge de vaques d'aptitud lletera és molt superior al de la població total de la zona.

En relació a altres espècies, Paulsen i col. (169) detectaren anticossos reaccionants amb l'antigen del VLB i partícules del virus C en un ramat d'ovelles que havia presentat espontàniament 14 casos de limfosarcoma. Les partícules víriques aïllades en aquests animals presentaven una relació molt estreta, sinó total, amb les que es troben en el boví.

També Marin i col. (132) a Veneçuela obtingueren reaccions serològiques positives en ovelles que pasturaven juntament amb un ramat de vaques amb alta incidència de leucosi. Tanmateix no hi ha de moment evidència de la transmissió horitzontal de la malaltia en l'espècie ovina (52, 118).

Marin i col. (133), després d'examinar serològicament 11.711 sèrums de diverses races de zebú (*Bos indicus*), trobant un 18,5% d'animals positius, alguns dels quals presentaven canvis histològics de tipus limfosarcomatós, conclogueren que aquesta espècie pot patir la malaltia. També en búfals (*Bubalus bubalis*) i en capibares (*Hydrochoerus hidrocheris*) detectaren animals seropositius (85 de 1072 búfals i 9 de 120 capibares examinats); aquesta darrera troballa té un interès especial per raó de la gran distància filogenètica d'aquesta espècie amb els bovins.

Atribueixen Marin i col. aquests alts nivells d'infecció a l'especial ecologia dels tròpics i a l'elevada població d'insectes hematòfags que poden actuar com a vectors en la transmissió de la malaltia.

En els nombrosos estudis realitzats en l'home no s'han trobat anticossos reaccionants contra l'antigen del VLB (52).

2. *Freqüència del limfosarcoma*

En zones enzoòtiques la leucosi bovina pot ésser un problema greu, i així, per exemple, durant els anys 1927 i 1928 a Saxònia (actualment a la R.D.A.) suposà un 31% dels animals sacrificats per malaltia. En estadístiques del 1934, en aquesta mateixa regió i a Brandenburg (també a Alemanya), el limfosarcoma afectà 108 i 177 / 100.000 animals sacrificats als respectius escorxadors (226).

Altres zones europees amb alta incidència són Polònia, el sud de Suècia, algunes zones de França, Holanda, etc. (226).

Als Estats Units suposa un 20 per 100.000 animals sacrificats i representa el 50% dels tumors observats en el boví (52).

3. *Freqüència i distribució del VLB*

El VLB és un virus que ha estat diagnosticat a gairebé tot el món. Una de les zones enzoòtiques de la malaltia ha estat, ja que actualment està molt controlada, el nord d'Europa.

A la Baixa Saxònia (nord d'Alemanya) en el primer any d'aplicació del diagnòstic serològic, després de 15 anys de sacrifici dels animals hematològicament positius, s'observà un 13,5% de ramats infectats, amb una incidència sobre el total de la població de l'1,9% (68). A Schleswig-Holstein (també al nord d'Alemanya), el percentatge d'explotacions afectades serològicament era del 16,2% (190).

Una altra zona enzoòtica de la leucosi és el sud de Suècia, on Hugoson i Brattstrom (89) trobaren un 27% d'animals serològicament positius.

A part d'aquests països, també ha estat diagnosticada, encara que amb una incidència menor, a Finlàndia (0,7% dels animals i 1% dels ramats) (155), a Bèlgica (0,4% dels ramats en una província examinada) (123), a Àustria (2,4% dels ramats estudiats per Burki) (25), a França (més del 25% del bestiar de la regió de les Landes) (165), a Txecoslovàquia (87), a Iugoslàvia (32% dels ramats-94), a Itàlia (11,5% dels efectius del Laci (2) i 10,8% dels de l'Emília (75)), a Gran Bretanya (0,23% dels animals-179), a Irlanda (en animals d'importació i els seus descendents-101) i a Portugal (39). Altres països amb leucosi són Noruega, Holanda i Bulgària (175). En canvi Suïssa està virtualment lliure de la malaltia: un animal positiu de 95.000 examinats (221).

A Espanya les primeres comunicacions de la malaltia es presentaren en el Congrés de Patologia Bovina del 1982: Badiola i col. (6) trobaren un focus a Navarra, Cifuentes (38) detectà 3 animals seropositius en un ramat d'Astúries, Monge i col. (152) en 20 vaques d'un total de 104 pertanyents a dues explotacions de la zona de Madrid i finalment en un estudi realitzat recentment al País Basc s'ha trobat una prevalència del 0,95% dels ramats i de l'1,22% dels animals (73).

A Nord-amèrica també és un problema important. Olson (159) afirma que més de la meitat dels ramats d'algunes zones dels Estats Units presenten animals seropositius. A Florida, Burrridge i col. (29) trobaren un 47,8% dels bovins de llet positius. A Iowa el 22% dels 10.600 caps examinats fou positiu (149).

Al Canadà la situació és semblant a la dels Estats Units: segons Reed (175), un 45% dels ramats de llet i un 14% dels de carn contenen animals positius, i segons Kellar (102) un 20% dels ramats i un 3,6% dels animals reaccionaren positivament a la immunodifusió.

Sud-amèrica tampoc no està lliure de leucosi enzoòtica: 37,5% d'animals positius a Veneçuela (132) i 50,2% en una província argentina (23).

Al Japó, Onuma i col. (161) trobaren un 32,2% i un 3,3% d'animals positius en dos districtes diferents. També s'ha diagnosticat a la Xina (44) i a Austràlia (37), mentre que Nova Zelanda resta de moment lliure (95).

La URSS és una altra zona amb problemes de leucosi: en una enquesta citada per Burrridge (29) sobre un total de 5.294 caps hom trobà un 20% d'animals positius.

VI.2. EPIDEMIOLOGIA ANALÍTICA

Per a estudiar l'epizootiologia de la leucosi enzoòtica s'ha de tenir en compte que la leucosi i la limfocitosi persistent només són una punta d'iceberg, ja que representen una petita proporció dels animals infectats pel VLB, i que les leucosis juvenil, tímica i cutània són de presentació esporàdica (100).

1. Factors intrínsecs i extrínsecs de receptivitat

Un dels factors extrínsecs a tenir més en compte és la intervenció de l'home: l'aparició de nous focus de la malaltia va lligada a la introducció d'animals portadors del virus en ramats o zones indemnes.

Al nivell de països o regions, el moviment a gran distància d'animals ha estat la causa principal de l'expansió de la malaltia (per ex. les importacions,

de les quals parlarem més endavant, o els moviments de bestiar després de la segona guerra mundial) (212).

Entre els animals d'una mateixa zona, l'encomanament es produeix majoritàriament per transaccions comercials, per repoblament d'explotacions després del sanejament de brucel·losi i per factors associats a relacions familiars entre propietaris de ramats (p. ex. pastures comunes, cessió de sementals o altres animals, partició de ramats, ...) (123).

La grandària de l'explotació és un altre factor que té importància, bé que segons les condicions d'explotació pugui afavorir en un sentit o l'altre: en un estudi realitzat a la zona de les Landes, on dominen les explotacions tradicionals i on la leucosi és enzoòtica, les granges de menys de 15 vaques tenen una taxa d'infecció doble de la de les explotacions de més de 15 animals adults. Això és degut al fet que les explotacions petites són les de tipus tradicional, i el tipus de gestió d'aquestes afavoreix la presència del VLB (188).

En canvi, a Itàlia, que és una zona infectada recentment per importació d'animals, el percentatge de ramats infectats augmenta de manera directament proporcional a la grandària de l'explotació (2); això està lligat al fet que les explotacions més grosses són les que han tingut més interès per a modernitzar-se i han introduït animals, a cops d'importació, per millorar la genètica de la granja.

Altres factors que influeixen en la taxa d'infecció dels ramats són l'antiguitat del focus, el *stress* (p. ex. el *stress* produït per la calor del tròpic és segons Martin i col. (132) una de les causes de la gran incidència de la malaltia en aquestes regions), les condicions de maneig (pastura o estabulació, presència de materials contaminats) i la presència d'insectes hematòfags; finalment, també cal tenir en compte, a l'hora de fer la valoració, el mètode diagnòstic utilitzat.

Entre els factors intrínsecs tenim bàsicament els genètics i l'edat. Pel que fa als factors genètics, Hofírek (86) comparà la descendència de tres toros i observà que la d'un d'ells tenia un percentatge més baix d'animals positius als 2-3 anys d'edat; l'autor en treu la conclusió que determinats factors genètics poden dificultar o facilitar la incorporació del DNA viral a la cèl·lula o possiblement la seva replicació; d'altra banda, i sempre segons aquest autor, la influència d'aquest factor és temporal, ja que després d'un contacte llarg amb animals portadors es produeix gairebé sempre la infecció. Els factors genètics també tenen importància en punt a la propensió dels animals infectats a presentar limfocitosi persistent o leucosi (21, 52, 86).

La possible relació entre l'edat i el nivell d'infecció ha estat un altre motiu d'interès, i els resultats obtinguts per diferents autors han estat a voltes contradictoris.

En general s'accepta que les edats més crítiques són entre els dos i tres anys, o sia quan l'animal entra a formar part del ramat adult i per tant en contacte amb els animals infectats.

A partir dels quatre anys, el percentatge d'animals infectats continua augmentant, però d'una manera molt més lenta; així els animals més vells són els més afectats, però poc per sobre dels de tres o quatre anys; alguns autors (68, 70), obtenen de totes maneres uns resultats diferents, ja que per ells l'augment més alt és a partir dels 6 anys.

Els percentatges d'infecció segons les edats citats pels diferents autors són resumits al quadre V.

Un altre treball compara l'edat mitjana dels animals seropositius (5,4 anys) i d'un grup control (5,2 anys) sense obtenir diferències significatives; aquestes dades no contradiuen, però, les altres, ja que per exemple els resultats citats per (47) i (170) tampoc no mostrarien possiblement variacions significatives.

S'han publicat diversos treballs sobre la velocitat de transmissió entre els animals d'un ramat. A Itàlia, Famigli i col. (48) repetiren la prova de la immunodifusió en 1.410 vaques de diversos ramats positius; s'observà que en el primer examen hi havia 147 vaques positives, mentre que al cap d'un any foren 183, de les quals 97 havien estat negatives al primer control (s'obtingueren també 61 animals positius en el primer examen i posteriorment negatius).

Kaaden i col. (98) estudiaren l'evolució de la malaltia en un ramat de 286 caps: els anys 1974-75 la incidència fou del 4,8%, el 1976 del 9,7%, el 1977 del 34,2% i finalment el 1978 del 52,6%. En una altra experiència realitzada com l'anterior a Alemanya es passà en 27 mesos d'un percentatge del

Quadre V. Percentatge d'animals infectats segons les edats, recollits per diversos autors.

Ref.	nombre d'animals	anys								
		1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	5 - 6	6 - 7	7 - 8	8 - 9	> 9
29	7.768 a	37	38	48	47	52	60	60	61	67
29	4.911 b	1	2	1	8	7	5	6	8	7
47	323	13	27	33	27	20	← 23 →			
49	765	—	43	72	—	—	—	—	—	—
68	108.604	—	9	14	15	15	← 47 →			
70	791	—	← 8 →	—	← 22 →	—	← 45 →			
36	175 c	25	36	68	93	84	93	← 100 →		
133	1.072 d	5	5	10	6	4	8	9	9	13
159	126 c	6	31	53	65	80	← 100 →			
170	52	56	100	—	—	—	—	—	—	—

a. races de llet

b. races de carn

c. % respecte als animals infectats

d. búfals.

6,1% al 34,5% d'animals infectats, car el ramat ja tenia un llarg historial de leucosi; els autors suposen que es tracta d'un increment de la virulència del virus (227). Olson (159) controlà tres ramats durant set anys: en el primer es passà del 54% al 79% (amb valors intermedis de 40% i 87%); en el segon, del 53% al 71%, i en el darrer ramat del 24% al 22% (amb un valor intermedi màxim del 31%). Finalment, Van der Maaten i Miller (215) en un ramat de 53 vaques obtingueren 23 animals negatius; al cap de 7 mesos es féu una nova anàlisi en què 9 dels 16 animals que encara restaven en el ramat i que originàriament eren negatius foren positius (un 56%).

D'aquestes dades es desprèn que la leucosi és una malaltia que es transmet d'una manera més o menys lenta però contínua entre els animals del ramat. La diversitat dels resultats obtinguts es pot explicar possiblement per les variacions en el maneig dels ramats estudiats (164) i per les diferents condicions de *stress* a què estan sotmesos els animals.

VI.3. SISTEMES DE TRANSMISSIÓ NATURALS

Els sistemes de transmissió d'un agent infecciós es poden dividir en dos grans grups: la transmissió horitzontal i la vertical; la primera és aquella en què l'encomanament es produeix entre els animals d'una mateixa generació, mentre que en la vertical, els animals d'una generació encomanen la malaltia als de la següent, o sia que inclou la transmissió a través dels gàmetes, la transplacentària, per la ingestió de la llet i pel contacte entre pares i fills.

Alguns autors, aplicant el terme de transmissió vertical d'una manera més restringida, el reserven exclusivament a la transmissió a través de cèl·lules germinals. Per evitar possibles interpretacions errònies nosaltres dividirem les formes de transmissió en prenatales i postnatales.

El coneixement de les formes de transmissió és imprescindible per a establir mesures de control i d'eradicació de qualsevol malaltia. En el cas de la leucosi aquest coneixement és molt recent i en alguns punts encara és imprecís, a causa del llarg període d'incubació de la malaltia i del fet que no s'ha pogut investigar en aquest camp en profunditat fins que s'han posat a punt els mètodes serològics de diagnòstic.

1. Transmissió prenatal

Durant molts anys s'ha cregut que la via més important d'infecció era la transmissió vertical per una particular disposició hereditària. La demostració que el VLB és un virus de caràcter exogen ha fet perdre validesa a aquesta teoria, ja que la transmissió pels gàmetes és exclusiva dels virus endògens.

La transmissió prenatal també es pot produir per via transplacentària i aquesta sí que s'ha demostrat en el virus de la leucosi.

Thurmond i col. (205) observen en 120 vedells fills de mares positives un 6,4% d'animals positius per la tècnica del RIA abans de la ingestió de calostre. Altres autors (92), utilitzant la mateixa tècnica, observen un 3,8% d'animals infectats abans de néixer.

Piper i col. (170) estudiaren, en un ramat amb diversos casos de limfosarcoma, la presència de virus o d'anticossos virals des del naixement fins a l'estat adult. Es comprovà que un 18% dels vedells fills de mares positives presentaven partícules víriques detectables per la prova d'inhibició de l'efecte sincític abans de la ingestió de calostre. En aquests animals també es detectaren anticossos (per la prova de neutralització), fet que demostra que la infecció es produeix més tard de l'adquisició de competències immunològiques per part del fetus (o sia a partir dels 3 mesos).

La taxa més elevada d'infecció prenatal és l'observada per Kono i col. (107): un 26% dels animals nascuts de mares positives són positius a la tècnica de la virus-neutralització; aquest percentatge elevat es deu al fet que en un dels ramats el nivell d'infecció fou del 47%, però hom desconeix la causa d'aquest alt nivell de transmissió.

Segons Burridge i Thurmond (27) aquests casos amb alta incidència de transmissió prenatal (més del 6%) podrien ésser deguts a una predisposició genètica. Altres autors suggereixen que aquests índexs elevats de transmissió placentària podrien ésser deguts al fet que part de les mares no devien ésser només portadores del virus, sinó a més afectades de lesions neoplàstiques (158).

En un experiment consistent a injectar sang d'animals amb leucosi a 15 vaques prenyades lliures de leucosi, només uns vedells bessons foren positius en el moment de néixer (216, 218). Altres autors que han examinat animals abans de la ingestió de calostre obtenen de 23 fills de vaques amb VLB, un de positiu (104), i cap de 59 examinats (55), bé que en aquest darrer treball s'apunta la possibilitat que tres animals positius als 5 mesos fossin infectats per via uterina amb poca quantitat de virus o just al final de la gestació.

En un estudi epidemiològic sobre la infecció *in utero* hom observà que aquesta és independent de la raça, de l'edat de la vaca i del moment de produir-se la infecció (abans de la gestació o durant aquesta). D'altra part, s'observà una possible relació entre el sexe del fetus i la seva infecció, ja que aquesta és més freqüent en mascles que no en femelles (205).

El diagnòstic dels animals infectats *in utero* té interès cara a aïllar-los dels indemnes per a evitar la infecció d'aquests, però l'extracció de sang abans de la ingestió del calostre en la pràctica és difícil; per això Kono i col.

(107) suggereixen les següents proves: a) anàlisi abans de la ingestió de calostre; b) comparació dels títols d'anticossos en dues mostres preses en un interval d'un mes (si no hi ha descens vol dir que l'animal està infectat); c) títol d'anticossos als 5-6 mesos (han d'ésser baixos); d) prova als 7 mesos o més tard.

2. Transmissió postnatal

De l'apartat anterior, hom pot treure la conclusió que la transmissió del VLB es produeix generalment després de néixer l'animal. Les vies d'encomanament poden ésser a través de la llet o per contacte (directe, per vectors o per objectes contaminats).

2. a. Transmissió per contacte directe

Hofírek col·locà un animal infectat experimentalment en una quadra; al cap d'un temps hi havia quatre animals més positius, tres d'ells just al davant de l'animal introduït (a l'altre costat del passadís). També s'ha aconseguit retardar la infecció deixant un espai lliure entre els animals estabulats (86).

En una experiència realitzada en condicions lliures d'insectes i consistent a mantenir en dues gàbies 8 animals, tres d'ells infectats experimentalment, s'observà que al cap de tres mesos un dels animals s'havia infectat; els altres quatre restaren negatius durant un any (107).

Uns altres investigadors comparen tres grups de vedells: aïllats, parcialment aïllats i en contacte amb vaques positives al VLB. Tots ells eren fills de vaques positives i havien pres calostre de llurs mares. Només 6 dels 41 vedells dels dos primers grups foren positius (els quals es pogueren infectar per la llet, intra-uterinament o fins en els moments de contacte amb les seves mares); en comparació, tots els vedells que estaven en contacte amb animals infectats reaccionaren positivament als dos anys d'edat o abans (55). En un altre treball, després d'ajuntar vedells indemnes amb els animals adults d'una ramat amb alta incidència de VLB s'observà un 24% de les vedelles infectades al cap de tres mesos (204).

Per tant el contacte físic sembla que és el requisit més important de la transmissió de la leucosi i en conseqüència la separació de positius i negatius serà la primera norma a prendre en la lluita contra la infecció.

Segons Willesmith i col. (227) la malaltia es transmet especialment a la primeria d'hivern, quan els animals estan estabulats, fet que Straub (195) explica pel *stress* produït pel canvi de règim de pastura a estabulació i pel confinament dels animals que afavoreix el contacte directe.

Altres autors mantenen en canvi que la incidència és més alta a l'estiu degut a les picades d'insectes (13); d'ambdues observacions es pot treure la conclusió que hi ha una transmissió per contacte directe, encara que en algunes zones pot quedar emmascarada per una transmissió quantitativament més important deguda a insectes hematòfags.

La manera com es produeix aquesta transmissió és a través de l'orina, la femta, els fluids amniòtics i les secrecions oculars i nasals d'animals infectats (153). Gupta i Ferrer (84) observaren antígens del virus de leucosi en l'orina d'animals infectats naturalment. Roberts i col. (181) només aïllaren el virus de la secreció nasal d'una de 6 vaques infectades naturalment; en canvi, 6 de 9 vaques presentaren virus en la fracció cel·lular de rentats bronco-alveolars.

Straub (196) no aconsegueix detectar anticossos en xais inoculats al naixement amb diverses secrecions i excrecions; de tota manera els resultats no són fiables, ja que la tècnica utilitzada fou l'AGID p-24, que és una prova molt poc fiable.

La via d'entrada en el receptor no està del tot determinada. Van der Maaten i Miller (213) detectaren anticossos en animals infectats per via oral i respiratòria; Mammerickx i col. (125) també obtingueren resultats positius en infectar experimentalment per via oral. Roberts i col. (180) en canvi no aconsegueixen produir la infecció en administrar $5 \cdot 10^6$ leucòcits infectats per via oral, i sí que obtenen resultats positius en administrar-los intratràquealment.

2.b. Transmissió per via oral

La possibilitat que el VLB es transmeti per la llet ja es plantejà quan, l'any 1964, s'observaren partícules víriques en llet de vaques d'un ramat amb alta incidència de leucosi (45). Posteriorment s'han realitzat una sèrie de treballs encaminats a estudiar la incidència d'aquesta via d'encomanament.

Parfanovich i col. (162) observaren en la llet partícules dels tipus dels oncornavirus antigènicament iguals al VLB. Posteriorment s'estudià la presència del virus en la llet mitjançant la inoculació en xais (61, 103): després de la inoculació de llet de vaques positives a xais es detectà la presència del virus en els xais que havien estat inoculats amb la llet de 8 de les 16 vaques utilitzades. En una segona prova el 91% dels xais inoculats exclusivament amb el component cel·lular de llet infectada presentaren reaccions serològiques positives i/o s'identificà el virus.

Cal tenir en compte que la simple presència del virus en la llet no significa que en condicions naturals els vedells s'infectin al beure calostre o llet, ja que hi ha certs mecanismes que dificulten aquesta possible infecció, com

són la capacitat de la mucosa intestinal d'absorbir macromolècules només en les primeres hores de vida, o quan està alterada.

Aquesta immunitat passiva es demostrà en l'experiència realitzada per Olson i Kaja (160), en què, dels 7 xais que havien rebut calostre d'ovelles infectades i foren inoculats als 15 dies amb el VLB, 5 no s'infectaren, mentre que en altres grups que foren inoculats als 4, 17 i 54 mesos tots els animals foren positius.

Dels 70 vedells nascuts de mares positives, examinats per Ohsima i col. (158), només 5 presentaren anticossos als 66 mesos, després d'haver pres el calostre i d'haver estat separats de llurs mares abans de les 24 hores i mantinguts en els lots de pocs animals. D'aquests 5, un ja presentava anticossos abans de prendre el calostre i un altre possiblement fou infectat de manera horitzontal per algun dels altres vedells.

Segel i Morgan (191) controlaren dos grups de vedells: un alimentat amb un *pool* de calostre de les vaques i l'altre privat de calostre: aquest grup presentà un 4% d'animals positius als 15 mesos mentre que en el primer el percentatge fou del 16%; de tota manera, els resultats obtinguts no són estadísticament significatius.

També el grup GELB, format per investigadors francesos, ha observat una major taxa d'infecció durant el primer any en els vedells fills de mares positives (13,5%) en comparació als fills de vaques negatives (4,4%), a pesar de no observar-se casos de transmissió prenatal (165). Tanmateix, cal tenir en compte que almenys part dels animals infectats ho han estat per altres vies, o sia que no es demostra el paper del calostre en la transmissió.

En el treball de Ferrer i Piper citat a l'apartat anterior (55), hom intentà establir la importància real de la llet i el calostre en la transmissió del VLB i s'observà, bé que l'encomanament per aquesta via en condicions normals és perfectament possible, que la seva importància real és petita, molt menor a la produïda per la transmissió per contacte directe en els animals infectats.

S'ha suggerit la possible infecció d'animals de fins a un mes d'edat en beure llet de vaques amb mamitis o calostre a causa de la inhalació de leucòcits en prendre-la (204).

Com es pot observar, aquest capítol no queda tancat i calen nous estudis per a determinar la possible importància del calostre i la llet en la transmissió del virus de la leucosi bovina als vedells i els factors que poden influir en aquest tipus d'infecció.

2.c. Transmissió a través del semen

La transmissió a través del semen pot tenir dos vessants: infectar la descendència i infectar la femella.

La transmissió vertical per cèl·lules germinals, tal com hem indicat no és possible, ja que es tracta d'un virus exogen. Baumgartener i col. (10), després d'estudiar 1180 caps, corroboren aquesta afirmació, ja que no troben variacions significatives entre els descendents de mascles positius i negatius; tampoc no se'n detecten en comparar 81 femelles descendents de 2 braus amb limfosarcoma i 91 animals control.

La transmissió horitzontal és més debatuda, ja que els resultats existents en la literatura són a voltes contradictoris. Lucas i col. (119) transmeten la malaltia a tres xais inoculats amb semen fresc d'un brau seropositiu, però posteriorment no aconsegueixen de transmetre la infecció a xais inoculats amb semen congelat del mateix brau (118).

Després d'instil·lar 1-2 ml de leucòcits, corresponents a uns 40 ml de sang entera, d'animals amb VLB en el tracte genital de 6 vaques, es produí la infecció en 4 d'elles (213). Un altre investigador, amb una quantitat semblant però afegint-hi 1 ml de semen, només pot infectar una de 4 vedelles instil·lades i cap dels 2 xais (180); aquests resultats suggereixen als autors la presència d'un factor inhibidor, en el semen, que inactiva el VLB.

Per tant, s'ha de tenir en compte aquesta via, però la seva incidència és possiblement molt petita, ja que tot i la presència del virus en el semen, la seva absorció en l'aparell genital és força qüestionable, a causa de la poca quantitat del virus. Pot tenir una certa importància en braus positius amb inflamacions del tracte genital.

La inseminació artificial, segons les dades de què es disposa actualment, no pot transmetre el VLB (8, 175).

Tampoc la transferència d'embrions sembla tenir importància en la transmissió del virus de la leucosi (166).

2.d. Transmissió per vectors

Diversos estudis experimentals han demostrat que la fracció cel·lular de la sang d'un animal infectat és virulenta fins i tot en poca quantitat. Van der Maaten i Miller (213) observaren que 2.500 limfòcits (equivalents a 0,5 µl de sang entera) provinents d'un animal positiu inoculats intradèrmicament són capaços de produir la infecció en l'animal receptor. Buxton i col. (31) necessiten quantitats més elevades de limfòcits: no obtenen cap èxit després d'inocular 1000 i 2000 limfòcits en 18 animals, en canvi la inoculació de 10^4 i $5 \cdot 10^4$ cèl·lules equivalents a una mitjana de 0,7 i 7,3 µl de sang entera, transmeten respectivament la malaltia al 12% i al 62% dels efectius inoculats. Aquests autors consideren que Van der Maaten i Miller aconseguiren uns resultats excepcionals que no són significatius de la quantitat del limfòcit necessari en condicions normals per a transmetre la infecció.

La capacitat dels limfòcits de transmetre la malaltia és més elevada si l'animal presenta limfocitosi persistent i també si fa més de 2 anys que està infectat o si la seva edat és de més de tres anys (31).

2.d.1. Transmissió per artròpodes hematòfags

S'ha demostrat que aquests invertebrats són capaços de transmetre d'un animal infectat a altres de sans malalties etiològicament semblants a la leucosi, com són l'anèmia infecciosa equina i la leucèmia del ratolí (52). Aquest fet, junt amb els resultats obtinguts en les experiències que acabem de citar, fa pensar que aquest tipus d'artròpodes poden actuar com a possibles vectors de la malaltia. Autors americans (13) observaren que 7 animals joves posats en contacte amb el ramat a l'estiu, quan hi ha gran abundància de tàvecs, presentaren tots la infecció als 4 mesos, mentre que si el contacte es produïa l'hivern, quan aquests insectes són pràcticament inexistents, només un era positiu al VLB al cap de 6 mesos.

Una experiència realitzada en condicions lliures d'insectes obtingué uns resultats semblants a aquest últim, ja que s'infectà un animal dels 5 mantinguts en contacte amb tres vedells inoculats amb VLB (108).

S'ha pogut aïllar el virus en limfòcits obtinguts de tàvecs (*Tabanus nigrovittatus*) que s'havien alimentat prèviament de vaques infectades (13).

Una experiència, realitzada en rèncs de l'espècie *Boophilus microplus* que afecten el boví dels països tropicals, consistí a inocular en 4 ovelles una suspensió de sang obtinguda d'artròpodes d'aquesta espècie que s'havien alimentat amb sang de vaques seropositives: dos dels animals presentaren anticossos al cap d'un mes i durant els 15 que durà la prova; els altres dos restaren negatius (184).

A Alemanya es realitzà una altra experiència, també amb rèncs, en aquest cas de l'espècie *Ixodes ricinus*, en què es comprovà que poden contenir el virus en estat infecció durant com a mínim dues setmanes i que poden transmetre per tant la malaltia a animals negatius per transmissió transestadial (infecció en fase de nimfa i transmissió de la malaltia en l'estat adult). De totes maneres els animals seronegatius infectats per aquests rèncs aconsegueixen produir una reacció serològica transitòria de 4-6 mesos. Els autors conclouen que la transmissió de la malaltia pot ésser possible en cas d'infestacions massives (99).

Finalment, cal parlar de les experiències dutes a terme per Buxton i col. (32), ja que són possiblement les que permeten d'avaluar millor el potencial dels insectes hematòfags en la transmissió del virus de la leucosi. Aquests autors inocularen subcutàniament en vedells i xais les parts bucals de mos-

ques (*Stomoxys calcitrans* i *Haematobia irritans*) i tàvecs (*Tabanidae*) que s'havien alimentat prèviament de sang de vaques afectades de LP. Per produir la infecció en vedells feren falta entre 50 i 100 insectes segons les espècies de mosques (en xais n'hi hagué prou amb 25), sempre que no passés una hora entre la ingestió de sang i la dissecció de l'aparell bucal dels insectes. A partir d'aquests resultats els autors discuteixen les possibilitats i les circumstàncies en què es poden donar aquestes condicions i conclouen que la transmissió del virus per aquesta via està possiblement limitada a zones localitzades, amb una gran infestació de mosques.

Marin i col. (132) atribueixen la gran incidència del VLB en el bestiar de Veneçuela, entre altres causes, a la gran abundància d'insectes hematòfags a les zones tropicals.

A tall de conclusió podem dir que els artròpodes hematòfags poden actuar com a difusors de la malaltia i que caldria portar a terme nous estudis per a determinar llur importància real i la relació entre la difusió de la malaltia i la quantitat d'artròpodes hematòfags.

2.d.2. Transmissió iatrogènica

Les transfusions de sang o injeccions de vacunes obtingudes a partir de sang entera poden transmetre la leucosi. A Suècia es produí un augment de la incidència de la leucosi després d'administrar vacunes contra la piroplasmosi elaborades amb sang entera contaminada amb el VLB (200).

Burki i col. (26), en proves seriades, obtingueren resultats estadísticament significatius en comparar els animals recentment infectats veïns d'un o dos animals ja prèviament infectats amb els que no estaven en contacte amb animals positius. Altres autors amb un disseny semblant obtenen un major nombre d'animals infectats prop d'altres també positius, encara que els resultats no són estadísticament significatius, a diferència d'una experiència anterior dels mateixos autors, en la qual els resultats foren significatius (227). Ambdós grups d'autors atribueixen aquest fet a la infecció a través de l'agulla en vacunacions seriades; tanmateix, aquestes observacions no demostren que la transmissió sigui per causes iatrogèniques, ja que també pot haver-se produït per contacte directe.

Thurmond (203) no trobà cap relació estadística entre la vacunació contra malalties infeccioses i la taxa d'infecció pel VLB.

En una granja amb alta incidència de leucosi, en la qual moltes vaques eren tractades amb oxitocina per via endovenosa sense canviar l'agulla, s'observà una diferència significativa ($p < 0,025$) entre el nivell d'infecció de les vaques tractades i el de les que no rebien oxitocina (22).

Les extraccions rutinàries de sang amb finalitats diagnòstiques també són una font possible d'extensió de la malaltia. En un ramat de 22-24 vaques en feren extraccions trimestrals de sang; en les tres primeres hom emprà la mateixa agulla per a tots els animals, i la taxa d'infecció passà de 8 a 15 animals; posteriorment es feren nou extraccions amb agulles individuals, i en aquest interval de temps només s'infectà un animal (3).

També s'ha especulat sobre el possible paper de la prova de la tuberculina en la transmissió de la malaltia. Lucas i Roberts (118) utilitzaren agulles deliberadament contaminades per a realitzar la prova de la tuberculina en sis animals que posteriorment presentaren la infecció pel VLB, mentre que els controls restaren negatius. En la pràctica, aquesta prova no sembla tenir gaire incidència en la transmissió de la leucosi, ja que la contaminació de l'agulla amb sang és poc freqüent i es produiria per la punció accidental d'un capilar superficial (207).

També altres manipulacions com poden ser el tatuatge dels animals amb pinça pot provocar la transmissió de la leucosi: després d'observar que en condicions experimentals severes això era possible (167), s'ha observat que en condicions naturals aquest tipus de tatuatge suposa un risc veritable, ja que uns dos terços dels animals tatuats amb una pinça que ha servit, immediatament abans, per a tatuar un animal infectat pel VLB, es contaminen (168).

En conclusió, la via iatrogènica s'ha de tenir molt en compte en la transmissió de la leucosi; sobretot en relació a les campanyes d'eradicació de tuberculosi i brucel·losi que s'estan portant a terme actualment a Catalunya; ja que, si bé la transmissió a partir de la tuberculinització possiblement té una importància escassa, la realització d'extraccions de sang sense observar unes normes higièniques estrictes pot afavorir la disseminació de la malaltia en el ramat; també poden contribuir al contagi determinades pràctiques terapèutiques, sobretot les injeccions endovenoses, si no s'observa una higiene rigorosa.

VII

ASPECTES SANITARIS I ECONÒMICS

VII.1. ASPECTES SANITARIS

La possible relació entre la leucosi bovina i la leucèmia humana ha preocupat els investigadors des de fa molts anys, d'una banda perquè la llet i la carn són components bàsics de la dieta humana i, de l'altra, perquè certes professions (ramaders, veterinaris, personal de laboratori) estan en contacte amb animals portadors de VLB o amb llurs productes.

S'han realitzat un bon nombre d'estudis epidemiològics encaminats a estudiar l'existència d'una possible correlació entre la leucosi bovina i la humana (vegeu-ne revisions als treballs 52 i 175), però en cap d'ells no s'ha pogut trobar evidència d'una possible relació entre ambdues malalties.

La detecció d'anticossos anti-VLB en ximpanzés que havien estat infectats experimentalment per via parenteral féu pensar a alguns investigadors que l'espècie humana també podia reaccionar produint aquests anticossos. Cal, però, tenir en compte que la infecció fou experimental, possiblement amb una gran quantitat de material antigènic, i que difícilment es poden extrapolar els resultats a les condicions que es donen en condicions naturals (52); d'altra banda, no s'aconseguí aïllar el virus en els ximpanzés inoculats (175).

Diversos estudis realitzats en l'espècie humana no han aconseguit detectar anticossos contra el VLB, tot i que s'han analitzat sèrums de pacients cancerosos, de membres de famílies amb alta incidència de càncer, de personal de laboratori, de veterinaris, de ramaders, etc.

S'ha de tenir en compte que, bé que en el boví i oví adult la presència d'anticossos és sinònim d'infecció, en altres espècies es pot produir una relació cèl·lules infectades-VLB no productiva; per tant la no producció d'anticossos no és evidència suficient per a excloure la possibilitat d'infecció en l'home (52). Tampoc no s'ha pogut evidenciar el virus en cultius cel·lulars de persones afectades de leucèmia exposades al VLB.

En resum, no s'ha pogut evidenciar la infecció del virus de la leucosi

bovina en l'home, bé que les dades de què hom disposa actualment no són suficients per a establir una conclusió definitiva.

VII.2. ASPECTES ECONÒMICS

No s'han observat diferències entre la producció lletera i la fertilitat dels ramats amb leucosi i lliures de la malaltia (28, 79, 112).

Com que el VLB afecta els limfòcits, o sia cèl·lules del sistema immunitari, s'ha plantejat que la infecció pel VLB pot perjudicar la resistència dels animals en relació a altres malalties infeccioses per immunosupressió; però s'ha comprovat que aquesta no es produeix (vegeu l'apartat IV.2).

Per tant, es consideren només les pèrdues produïdes per l'aparició de casos clínics de limfosarcoma. Al Canadà s'han estimat en 529.000 dòlars anuals en el bestiar de llet i en 49.000 dòlars en el de carn (102). A la Baixa Saxònia (una de les zones més afectades d'Alemanya) les pèrdues degudes a limfosarcoma entre 1963 i 1976 foren de 53 milions de DM (212). Als Estats Units, entre 1976 i 1978 foren d'uns 3,9 milions de dòlars anuals (51).

S'ha de tenir en compte que, si aquestes quantitats no són exageradament elevades al nivell estatal, sí que poden ésser importants en granges concretes.

Altres pèrdues que produeix aquesta malaltia en alguns països estan relacionades amb l'exportació, ja que molts països exigeixen tests serològics negatius al VLB per a la importació de vedelles i de semen boví. Les pèrdues produïdes als Estats Units per la leucosi en l'exportació de boví són més elevades que les de qualsevol altra malaltia o infecció (amb la possible excepció de la llengua blava -*blue-tongue*) (52).

VIII

MÈTODES DE LLUITA I DE CONTROL

VIII.1. PRINCIPIS DE LA LLUITA I DEL CONTROL

Està totalment acceptat que la leucosi es pot eradicar de ramats infectats en base a proves serològiques i a determinades pràctiques de maneig, la majoria d'elles comunes a qualsevol malaltia infecciosa.

Les pràctiques de maneig necessàries per a evitar la contaminació entre ramats es basen a evitar la introducció de vaques provinents de ramats infectats, o bé a tenir-los en quarentena durant tres mesos i integrar-los al ramat en cas de resultats serològics negatius al final d'aquest temps. Actualment es considera que la inseminació artificial no suposa cap perill.

El control dins el ramat es basa també a evitar el contacte entre els animals positius i negatius, consistent en la segregació en grups o a eliminar els infectats (49, 212, 215), a reduir les possibles causes de transmissió per transferència de sang a través d'insectes hematòfags o d'instruments contaminats (8, 13, 51, 100), en la desinfecció i a evitar el contacte entre animals adults i les vedelles de cria (8). Ruppaner i col. (186), després d'observar estrictament tots aquests punts, aconseguen disminuir fortament la infecció de manera que en els animals de tres anys la taxa d'infecció del ramat és la meitat de la que presentaven els animals de la mateixa edat en el ramat abans d'establir-se aquestes mesures.

Alguns autors (8, 49) recomanen d'alimentar els vedells amb calostre i llet d'animals seronegatius, però a la vista dels resultats obtinguts per diversos autors (apartat IV.3.) sembla que aquesta mesura no és gaire important.

La segregació dels animals en grups seropositius i seronegatius és una mesura correcta, però en moltes ocasions molt difícil, ja que provoca seriosos problemes de maneig. Van der Maaten i Miller (215) aconseguen bons resultats separant els animals positius i negatius en corts i pastures diferents i munyint aquests primer, però sense mantenir cap altra mesura especial.

En determinades explotacions l'eradicació del VLB és problemàtica i lenta. Mammerickx (120) analitzà algunes d'aquestes explotacions i a totes hi trobà alguna causa que explicava aquests mancaments, com ara la desídia o la poca col·laboració d'algun dels estaments implicats en la lluita: ramaders (introducció d'animals malalts, amagar animals, canvi del nombre d'identificació d'animals), veterinaris clínics (utilització de la mateixa agulla amb diversos animals, poca cura en l'elaboració de llistes), laboratoris de diagnòstic i serveis oficials (lentitud, mala manipulació de les mostres).

La importació de bestiar és una porta d'entrada molt important de la infecció als països indemnes. Així s'ha detectat que en llocs sense incidència prèvia de leucosi (Gran Bretanya, Irlanda, Txecoslovàquia), els primers casos s'han detectat en animals importats o en explotacions on han estat en contacte amb aquests (35, 87, 101, 179) tres d'aquests treballs parlen en concret d'animals importats del Canadà. A Bèlgica, 6 dels 40 focus detectats fins al 1977 foren deguts a la importació de bestiar (123).

Per a importar animals no n'hi ha prou amb exigir un certificat que digui que l'animal està lliure de leucosi, ja que Miller (148) obté un 4,1% d'animals destinats a l'exportació (i seronegatius en el primer examen) que presenten resultats positius en anàlisis posteriors.

Per tant la importació és una via d'encomanament important i és essencial l'examen serològic no sols de l'exemplar en qüestió sinó de tot el ramat d'origen, i el seguiment posterior d'aquell (212).

Per al diagnòstic d'animals infectats hom empra actualment les proves serològiques. Cal però ésser crítics a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts en una prova serològica, atès que hi ha una sèrie de factors que condicionen la resposta. Aquests factors són l'edat de l'animal, el darrer contacte amb una vaca infectada, etc. En el quadre VI, extret d'un treball de Toma i col. (207), hi ha la interpretació a donar en els diferents casos possibles.

Actualment la prova que hom empra rutinàriament per al diagnòstic de la leucosi és la immunodifusió. Els avantatges d'aquesta prova són la simplicitat, el cost baix i les possibilitats d'automatització que permeten de fer un gran nombre de proves diàriament (67).

Diferents treballs ens parlen d'experiències d'eradicació basades en el sacrifici dels animals positius a la prova de l'AGID. Es considera que amb la col·laboració dels estaments implicats es pot aconseguir de sanejar els ramats en dues o com a màxim tres proves realitzades cada cinc-sis mesos (120, 124, 179, 215), és a dir, en mig any o un any.

Cal tenir en compte que la probabilitat d'eradicar la malaltia ràpidament va directament lligada amb el nivell d'infecció i la grandària del ramat.

Els títols d'anticossos contra el VLB en els moments que envolten el part baixen de manera que es poden produir resultats falsament negatius en

Quadre VI. Interpretació dels resultats serològics en el diagnòstic de la leucosi bovina (207).

Edat	Resultat serol.	Darrer cont. anim. infec.	Interpretació
< 7 mesos	+	nascut de mare infec.	possibilitat d'anticossos calostrals, reexaminar als 7 mesos
		nascut de mare indemne	animal infectat
	-	< 3 mesos	reexaminar als 3 mesos del darrer contacte amb animals infectats
		> 3 mesos	animal sa
> 7 mesos	+		animal infectat
	-	< 3 mesos	reexaminar als 3 mesos del darrer contacte amb animals infectats
		> 3 mesos	animal sa

aquest període; per això Bause i Schmidt (12) recomanen, sempre que sigui possible, no extreure sang en aquest període per a analitzar per la tècnica de la immunodifusió, o en cas contrari concentrar el sèrum quatre vegades o treure també una mostra de calostre els primers dies de post-part; una altra possibilitat és utilitzar amb aquests animals una prova més sensible.

Levy i col. (114) afirmen que la immunodifusió és una prova totalment vàlida per a establir una primera selecció de sèrums en anàlisi de rutina, però que la millor sensibilitat del RIA fa necessària aquesta tècnica en estudis més precisos, i convenient si es tracta de zones amb alta incidència. Ferrer també és un defensor del RIA (51, 53), ja que permet l'automatització i els resultats s'obtenen més ràpidament: dues proves en un interval de tres mesos són suficients per a eradicar la infecció (mentre que amb l'AGID es necessiten tres proves més separades, tres-sis mesos).

Un ramat no es pot considerar lliure de VLB fins que tots els animals són seronegatius en una sèrie de proves realitzades a intervals de tres-sis mesos.

VIII.2. MÈTODES DE LLUITA EN ALTRES PAÏSOS

Per raó de la importància econòmica de la leucosi bovina, sobretot en relació al comerç internacional, diversos països han establert unes mesures de control i eradicació d'aquesta malaltia.

El país pioner en aquest tipus de mesures fou Dinamarca, que l'any 1962 ja establí unes mesures de control basades en les proves hematològiques i en el sacrifici d'aquells ramats en què algun animal presentés limfocitosi persistent o limfosarcoma. Bé que aconseguiren de disminuir la incidència de la malaltia, no pogueren eradicar-la. Indubtablement això fou degut a la poca sensibilitat de les claus hematològiques; posteriorment han emprat la prova de l'AGID amb èxit.

Alemanya estableix dos anys més tard una campanya voluntària d'eradicació consistent en el sacrifici de tots els animals amb LP o leucosi; a partir del 1973 la campanya és obligatòria i els anys 1978-1979 el diagnòstic serològic substitueix les claus hematològiques i se sacrifiquen tots els animals positius i aquells que donen resultats dubtosos en dues proves seguides (190).

La República Democràtica Alemanya també ha començat recentment una campanya d'eradicació, consistent en la seva primera fase a sanejar tots els ramats selectes (dels quals s'obtenen els animals per inseminació artificial), els ramats de races càrniques i les estacions de cria de mascles i d'inseminació, mitjançant l'anàlisi serològica i la segregació dels animals positius (113).

A Àustria s'ha dut a terme una campanya voluntària d'eradicació de la leucosi, i en vista dels bons resultats obtinguts i de la poca incidència de la malaltia, s'està preparant una llei que farà obligatori aquest control (26).

França ha establert un programa de lluita només obligatori en aquelles explotacions en què s'han diagnosticat clínicament o a l'escorxador casos de leucosi, amb previsió de fer-lo més extensiu amb el temps (179).

La Gran Bretanya té un programa de control des del 1982, basat en el sacrifici dels animals seropositius; però a diferència dels anteriors, el ramader no rep cap compensació econòmica de l'estat.

Un altre model de control voluntari és el que porta a terme Suècia, consistent bàsicament en l'examen del ramat cada tres anys i en una quarantena de quatre mesos i una posterior prova serològica dels animals de nova adquisició (90).

El Canadà i els Estats Units no tenen programes de lluita i d'eradicació, ja que el VLB està molt estès en la cabanya d'aquests països i el cost de les possibles campanyes d'eradicació no es justifica econòmicament en base a les pèrdues produïdes per tumors (51, 175, 215).

Davant l'exigència de molts països d'importar animals lliures del VLB, als Estats Units s'ha establert un programa voluntari d'eradicació de la malaltia dels ramats al qual s'acullen aquells ramaders que estan interessats a exportar bestiar a països on s'exigeix certificació d'animals lliures del VLB (143).

VIII.3. CONSIDERACIONS PER A L'ESTABLIMENT D'UN PROGRAMA DE CONTROL

Per a l'establiment d'un programa de control i/o eradicació de la leucosi bovina és essencial el coneixement de la freqüència i la incidència de la infecció a la zona (164).

Per a la determinació d'aquests índexs és necessari conèixer, segons Davies (41):

- Nombre i dimensió dels ramats infectats.
- Proporció d'animals infectats en els ramats.
- Proporció d'animals amb simptomatologia clínica.
- Velocitat de difusió de la malaltia.

També cal realitzar un estudi econòmic consistent a analitzar les pèrdues produïdes per la malaltia i degudes a sacrificis d'urgència, minva del temps d'explotació dels animals, decomisos a l'escorxador i efectes relacionats amb l'exportació d'animals.

A diferència de les malalties en curs de sanejament al nostre país (tuberculosi i brucel·losi), la LBE no sembla presentar, amb les dades de què hom disposa actualment, un interès sanitari, ja que no és transmissible a l'home.

A aquesta informació bàsica, s'hi ha de sumar un estudi econòmic del cost d'endegar una campanya de sanejament, que consisteix bàsicament en:

- + cost de les anàlisis: extracció de sang, despeses de laboratori.
- + cost de les subvencions pel sacrifici d'animals positius (en cas de subvencionar-se).
- + perjudicis produïts a l'explotació.

A partir de totes aquestes dades s'ha d'elegir un sistema d'eradicació.

a. Campanya obligatòria amb sacrifici de tots els animals d'aquells ramats on hi hagi algun animal seropositiu.

b. Campanya obligatòria amb sacrifici dels animals positius i subvenció.

c. Campanya voluntària basada en l'examen dels animals i sacrifici dels positius amb subvenció.

d. Íd., més campanya obligatòria en les explotacions amb casos clínics.

e. Com la modalitat c, sense subvencions.

f. Controls d'animals a la importació i en canvis de ramats i localització dels focus a partir de casos clínics.

g. Renúncia a qualsevol mesura.

a) Aquest tipus de mesures és molt car i innecessari actualment atesa la lentitud de transmissió de la malaltia i els mètodes diagnòstics existents.

b) Pot tenir interès en països econòmicament forts, amb vocació exportadora i alta incidència de la malaltia. En un estudi econòmic d'aquests tipus de campanya realitzat a Gran Bretanya es calculà que els beneficis serien de 4,8 milions de lliures, i el cost de 23,6 milions (41).

c) d) e) Són interessants com a primer pas per a l'execució d'un programa més ambiciós i en casos en què la malaltia tingui una incidència menor o interessi una menor despesa pública. En aquesta modalitat és important el marcatge dels animals i la prohibició de la venda dels positius, ja que en el cas contrari es pot afavorir la disseminació de la malaltia (ramaders que es venen els animals positius per a sanejar la pròpia granja) (175).

f) Té interès en països amb poca incidència de la malaltia. És important en països com el nostre en què s'està repoblant en moltes explotacions en procés de sanejament (123).

g) Aquesta decisió es pot prendre després d'un estudi econòmic exhaustiu de la malaltia i en funció dels resultats obtinguts. Hugoson i Wold-Troell en un estudi econòmic fet a Suècia consideren avantatjosa aquesta mesura si menys de 25 ramats es dediquen a l'exportació i la grandària mitjana de l'explotació és petita (menys de 18 caps) (90).

VIII.4. TRACTAMENT I VACUNA

1. *Tractament.* El limfosarcoma és un neoplasma maligne i de conseqüències fatals, sense terapèutica específica. Els animals afectats poden tractar-se simptomàticament i per curts períodes mitjançant una bona alimentació i l'extirpació quirúrgica dels teixits tumorals que provoquen disfuncions per pressió sobre altres òrgans (100). L'ús de citostàtics en bovins afectats dóna resultats positius (154), però no s'empra en el boví degut al seu cost excessiu (200).

2. *Vacunació.* La presència d'anticossos en tots els animals infectats simultàniament al propi virus de la leucosi demostra una protecció incompleta o inexistente per part d'aquests anticossos (100); paral·lelament, no hi ha cap correlació aparent entre la resposta immunitària i una hipotètica protecció contra la leucosi (42).

D'altra part, els vedells fills de vaques positives presenten una immunitat passiva adquirida a través del calostre i que persisteix durant uns mesos.

S'han fet diversos experiments encaminats a obtenir una vacuna. Miller i Van der Maaten (142, 147) han provat una vacuna amb virus inactivats, amb uns resultats discretament positius. Investigadors de la Universitat de Califòrnia han vacunat amb suspensió de cèl·lules limfoides no productores del VLB, procedents d'un vedell amb limfosarcoma i han obtingut uns re-

sultats preliminars interessants (201, 202). Aquesta vacuna tindria l'avantatge de no produir anticossos contra el virus de la leucosi bovina en animals vacunats, que és un dels inconvenients a tenir en compte en l'establiment de campanyes de vacunació en cas d'obtenir una vacuna eficaç (96, 175). Autors russos han obtingut també certs resultats inactivant el virus amb compostos aminometilats (163).

En conclusió, doncs, no hi ha actualment cap vacuna eficaç, però s'està investigant per a obtenir-ne una en un temps més o menys llarg.

IX

NIVELL D'INFECCIÓ A CATALUNYA

IX.1. INTRODUCCIÓ

Un dels passos previs a l'establiment d'un programa de control de la leucosi bovina és el coneixement de la prevalença d'aquesta malaltia a la zona (41, 164).

Està totalment acceptat que les importacions de bestiar són el factor més importat de l'establiment de la infecció a zones indemnes (123, 212). Catalunya ha importat un bon nombre de vaques procedents de països amb alta incidència de leucosi; per tant, és lògic suposar l'existència del VBL en el nostre bestiar.

No s'ha descrit, a pesar d'això, cap cas d'aquesta malaltia al Principat, encara que sí en altres zones de l'estat espanyol (38, 152).

La intenció d'aquest capítol és estudiar una mostra de la població bovina a Catalunya per a establir el nivell d'infecció en el bestiar del nostre país del virus de la leucosi bovina.

IX.2. MATERIAL I MÈTODE

1. Sèrums. De la població dels bovins en procés de sanejament ramader existents a Catalunya s'ha examinat un total de 863 mostres sèriques, extretes entre l'octubre de 1983 i el juliol de 1984, procedents de 99 ramats (figura 5).

No s'ha considerat la població bovina de les comarques de Tarragona i del sud de Barcelona, atès que totes plegades només representen el 6,5% del cens total català (figura 6).

El tipus de mostreig emprat ha estat per conglomerats, consistent en l'examen d'una sèrie de ramats obtinguts aleatòriament, dels quals s'ha analitzat una submostra a l'atzar del 20 al 25% dels efectius.

Sèrums control. Els sèrums positius utilitzats com a controls, proce-



Fig. 5. Situació geogràfica dels ramats examinats i dels infectats.

dents de sang de vaques positives alemanyes, foren cedits pel Veterinäruntersuchungsamt de Hannover (Rep. Federal Alemanya).

2. *Antigen.* S'ha utilitzat el "Rinderleukose-Antigen Behringwerke für die Immunodiffusion", lot 418074A.

3. *Mètode.* El diagnòstic s'ha realitzat per la prova de la immunodifusió en gel d'agar descrita per Forscher i col. (66).

– Preparació de l'agar:

Per 1000 cc:	6,05 g sol. puffer Tris – Merck 8387
	95 g de ClNa
	0,01 g de NaN ₃
	9 g d'agar-agar



Fig. 6. Percentatge comarcal de bestiar boví en relació al total de Catalunya.

El pH s'ha fixat a 7,2 amb solucions normals de ClH i NaOH . S'ha mantingut 10-15 minuts en ebullició (per una quantitat de 200-300 ml) i posteriorment s'ha disposat en Plaques de Petri de manera que el gruix de l'agar fos de 2,5 mm (15 cc d'agar per plaques de 88 mm de diàmetre).

– Preparació de les cavitats.

S'han excavat en l'agar "rosetes" amb sis forats exteriors de 6 mm de diàmetre i un de central de 4 mm, tal com ho indica la figura 7.

Els forats s'han fet amb un tub d'acer del diàmetre corresponent, connectat a una bomba de buit per a aspirar l'agar sobrant (operació que es completa posteriorment amb una punta de micropipeta connectada a la bomba de buit).

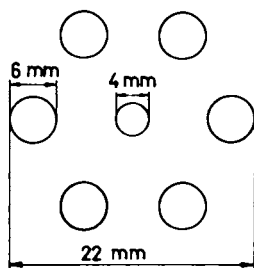


Fig. 7. Esquema i mides de les cavitats de la "roseta".

– Emplenat de les cavitats.

Les cavitats estan destinades a sèrums problemes (quatre), a controls (dues) i a antigen (la central). S'omplen amb micropipeta fins que queden enrasades amb l'agar, la qual cosa suposa una capacitat aproximada de 70 μ l les cavitats exteriors i 30 μ l la interior.

– Protocol.

A cada placa, s'hi excaven quatre rosetes, els forats superior i inferior de cada una de les quals es destinen a controls, de manera que s'obtenen 16 forats destinats a les proves.

Les plaques s'incuben a temperatura ambient (15-20°C), es fan les lectures a les 24 i 48 hores, i s'anoten els resultats als fulls de protocol, tal com s'indica a la figura 8.

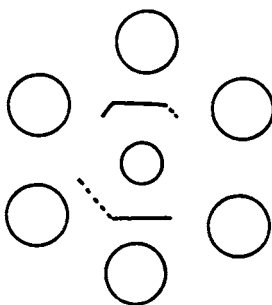


Fig. 8. Interpretació dels resultats i transcripció als fulls de protocol.

— banda clarament marcada

..... banda poc marcada (resposta feble)

— · — · resposta feble, només visible a les proximitats dels controls.

Als fulls de protocol hi figuren:

- Les quatre rosetes amb les cavitats destinades a sèrums problema numerades horitzontalment de l'1 al 16, i on s'escriuen les observacions fetes a les 24 i 48 hores.

- A la part central, hi figuren el nombre de registre de l'explotació, el poble i la comarca, així com el color amb què s'han marcat els resultats a les 24 i 48 hores.

- A la zona inferior, s'hi escriu la referència de les 16 mostres i s'assenyalen les positives.

Posteriorment, els resultats es passen a un altre full on consten les dades del quadre VII més el poble i el veterinari de l'explotació.

L'examen estadístic s'ha realitzat amb un ordinador personal Texas Instruments, model Ti 99/4A.

IX.3. RESULTATS

Del total de 863 mostres de sèrums estudiades, procedents de 99 ramats, 17 (2%) han donat resultats positius, procedents de 4 ramats (4%) (quadre VII).

Al quadre VIII hem agrupat aquests quatre ramats que tenen algun animal portador del virus.

Les explotacions afectades són de les més grosses de la mostra estudiada, tal com es pot veure al quadre IX.

Per a determinar la proporció d'animals infectats dins la població estudiada, cal determinar l'interval de probabilitat.

Respecte als animals, l'interval de probabilitat per $\alpha = 0,05$ està comprès entre 0,012 i 0,031, o sia que la població de bovins de Catalunya presenta un nivell d'infecció pel virus de la leucosi bovina, acceptant un risc d'error del 5%, que pot oscil·lar entre l'1,2 i el 3,1%.

En relació als ramats, s'obté que la taxa d'infecció de la població estudiada se situa entre l'1% i el 10% dels ramats, també considerant un interval de probabilitat $\alpha = 0,05$.

Quadre VII. Explotacions examinades i resultats obtinguts.

Placa	Proves	Caps	% analitzat	Comarca	Referència	Resultats
1- 2	7	30	23	Ripollès	2.721	—
1- 2	7	25	28	Ripollès	2.722	—
2- 3	7	29	24	Gironès	2.736	—
4	7	30	23	Cerdanya	2.709	—
4	7	29	24	Ripollès	2.719	—
4- 5	13	53	25	Cerdanya	2.707	—
5- 6	11	45	24	Cerdanya	2.708	—
6	9	36	25	Cerdanya	2.683	—
6 a 8	16	64	25	Ripollès	2.725	—
8	9	40	23	Ripollès	2.723	—
9-10	25	103	24	Gironès	2.745	13 + (52%)
10-11	5	21	24	Maresme	2.791	—
11	12	73	16	Cerdanya	2.797	—
12-13	14	55	25	Selva	2.794	—
13	3	12	25	Alt Empordà	2.795	—
13	6	24	25	Baix Empordà	2.786	—
13	1	4	25	Baix Empordà	2.785	—
14	11	45	24	Baix Empordà	2.780	—
14-15	11	44	25	Ripollès	2.805	—
15-16	14	58	24	Alt Empordà	2.807	—
16-17	16	67	24	Gironès	2.800	1 + (6,5%)
17	11	44	25	Alt Empordà	2.957	—
17-19	26	128	20	Baix Empordà	2.789	—
19-20	15	59	25	Alt Empordà	2.891	—
20-21	8	33	22	Gironès	2.969	—
21	3	13	23	Garrotxa	2.848	—
21	8	30	23	Gironès	2.974	—
21-22	5	19	26	Baix Empordà	3.026	—
22	13	54	24	Gironès	2.967	—
22	2	11	18	Garrotxa	2.845	—
23-24	19	83	23	Alt Empordà	2.829	—
24	5	25	23	Selva	2.852	—
24	3	13	23	Gironès	2.985	—
24-25	8	52	16	Alt Empordà	2.958	—
26	3	13	23	Osona	0-4	—
26	13	52	25	Osona	0-1	—
27	7	30	23	Vallès Oriental	Vor-1	—
27	5	20	25	Osona	0-8	—
27-28	5	19	26	Osona	0-9	—
28	5	21	24	Garrotxa	3.033	—
28-29	10	40	25	Alt Empordà	3.003	—
29	8	34	24	Selva	3.017	—
30	5	20	25	Osona	0-3	—
30	5	19	26	Osona	0-5	—
30	6	24	25	Osona	0-6	—

Quadre VII. Explotacions examinades i resultats obtinguts (continuació).

Placa	Proves	Caps	% analitzat	Comarca	Referència	Resultats
31	10	42	24	Osona	0-2	—
31	5	20	25	Berguedà	Be-2	—
31-32	6	24	25	Berguedà	Be-1	—
32	3	11	27	Berguedà	Be-3	—
32	5	21	24	Osona	0-7	—
32-33	11	47	23	Garrotxa	3.058	—
33	4	18	22	Garrotxa	3.056	—
34	5	21	24	Vallès Occidental	Voc-1	—
34	5	20	25	Osona	0-13	—
34-35	7	30	23	Osona	0-10	—
35	5	20	25	Vallès Oriental	Vor-2	—
35	5			Vallès Occidental	Voc-2	—
36	7			Osona	0-11	—
36	4			Osona	0-12	—
36-37	8	33	24	Selva	3.108	—
37	4	17	24	Selva	3.088	—
38	16	62	26	Alt Urgell	AU-A	—
39	6	25	24	Alt Urgell	AU-B	—
39-40	11	42	26	Alt Urgell	AU-C	—
40	11	44	25	Alt Urgell	AU-D	—
40-41	15	62	24	Alt Urgell	AU-E	—
41-42	12	50	24	Noguera	AU-F	—
42-43	12	49	25	Alt Urgell	AU-H	1 + (6,5%)
43-44	8	31	26	Alt Urgell	AU-I	—
44	10	42	24	Alt Urgell	AU-J	—
44-45	8	32	25	Alt Urgell	AU-K	—
45	8	33	24	Alt Urgell	AU-L	—
45-46	12	50	24	Segrià	224	2 + (16%)
46	4	14	29	Pallars Jussà	206	—
46	6	24	25	Pallars Sobirà	211	—
47	4	14	28	Pallars Sobirà	220	—
47-48	4	15	27	Noguera	218	—
48	9	35	26	Pallars Sobirà	210	—
48	5	19	26	Pallars Jussà	213	—
49	6	23	26	Pallars Sobirà	219	—
49	4	16	25	Segrià	237	—
49-50	15			Osona	0-15	—
50-51	10			Osona	0-16	—
51-52	25			Osona	0-17	—
52-53	7	29	24	Selva		—
53	7	26	27	Baix Empordà	3.311	—
53	5	22	23	Baix Empordà	3.308	—
54	9	37	24	Bages	V-213	—
54	6	24	25	Bages	V-215	—
54-55	9	38	24	Vallès Oriental	Vor-5	—

Quadre VII. Explotacions examinades i resultats obtinguts (continuació).

Placa	Proves	Caps	% analitzat	Comarca	Referència	Resultats
55-56	10	43	23	Vallès Oriental	Vor-4	—
56	12	49	24	Vallès Oriental	Vor-3	—
56-57	5	23	22	Bages	V-214	—
57	3	15	20	Gironès	3.785	—
57-58	11	43	26	Baix Empordà	3.803	—
58	11	47	23	Alt Empordà	3.791	—
58-60	27	134	20	Alt Empordà	3.790	—
60-61	10	41	24	Gironès	2.624	—
61	6	42	14	Baix Empordà	2.621	—

Quadre VIII. Ramats amb exemplars amb anticossos contra el VLB.

Comarca	Caps	Caps examinats	Positius	% positius	Referència explotació
Gironès	103	25	13	52,0%	S-2748 (+)
Gironès	67	16	1	6,2%	S-2800 (+)
Alt Urgell	49	12	1	8,3%	A.U. -H
Segrià	50	12	2	16,7%	P-224

(+) Les dues explotacions no tenen cap relació de veïnatge ni d'altre tipus.

Quadre IX. Resultats de l'enquesta serològica segons la grandària dels ramats.

Grandària ramats	animals examinats	animals positius	percentatge infecció	ramats examinats	ramats positius
1-30	261	—	—	51	—
31-45	230	—	—	24	—
>46	372	17	4,5	24	4

IX.4. DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

La mostra estudiada no correspon exactament a la població bovina catalana, sinó a la població bovina catalana en procés de sanejament, que inclou en general les explotacions més avançades, per tant aquelles que han

tingut una inquietud de millorar la genètica de l'explotació, en alguns casos amb importacions de bestiar.

Atès el perill que suposen les importacions de bestiar (123, 212), es pot considerar que la taxa d'infecció de la població total catalana és lleugerament inferior a la determinada en aquest treball.

Les quatre explotacions que presenten algun animal amb anticossos contra el VLB tenen una mitjana de 67,2 caps, força superior a la mitjana de la mostra (35,8); aquestes dades, juntament amb les que s'observen al quadre IX, concorden amb les conclusions d'Ammadeo i col. (2), que el percentatge de ramats positius augmenta proporcionalment al nombre de caps de l'explotació.

Per raó del poc nombre de ramats estudiats i dels resultats obtinguts no es pot constatar que hi hagi cap comarca ni àrea més afectada que les altres, ja que les dades obtingudes al Gironès no són estadísticament significatives.

Els resultats obtinguts indiquen que la taxa d'infecció a Catalunya és baixa, cosa que permet dues formulacions totalment oposades:

A) Ja que la incidència és baixa, no suposa pèrdues importants i per tant no cal prendre cap mesura.

B) Ja que la incidència és baixa i és previsible que augmenti amb el temps (98, 215), ara és el moment d'establir un pla d'eradicació paral·lel al de la brucel·losi.

El plantejament A, a la nostra manera de veure no és encertat, ja que:

- L'entrada a la C.E.E. (on es porten a terme programes de lluita i es tendeix a l'eradicació de la malaltia) suposarà en un temps més o menys llarg l'establiment d'aquest tipus de programes.

- L'augment d'incidència de la leucosi, lent però constant, fa que la lluita contra aquesta infecció resulti cada vegada més cara.

El plantejament B està limitat per la capacitat econòmica i tècnica, així com per la voluntat política de l'Administració d'establir uns mètodes de lluita sens dubte cars i normalment impopulars.

Una mesura de compromís podria ésser l'establiment de mesures només a la importació, consistents en l'obligació de certificats garantint que els animals importats estan lliures de leucosi i exigint la comprovació als tres mesos amb anàlisi de sèrums per la tècnica de l'AGID. Acompanyat d'una divulgació del coneixement de la malaltia i de la conscienciació de ramaders i tècnics.

X

COMPARACIÓ DE MÈTODES DIAGNÒSTICS

X.1. INTRODUCCIÓ

Per a l'establiment d'un programa de control contra qualsevol malaltia cal determinar el mètode diagnòstic més apropiat a les condicions de camp (sensible, específic, ràpid, econòmic, ...).

Per al diagnòstic de la leucosi bovina, les proves més emprades en l'actualitat, i les úniques que s'utilitzen en el diagnòstic rutinari, són la immunodifusió en gel d'agar i l'ELISA.

En aquest capítol ens hem proposat de comparar aquestes dues tècniques i de determinar quina pot ésser més apropiada per a emprar-la com a prova diagnòstica per a grans quantitats de sèrums.

Amb aquesta intenció hem comparat la immunodifusió i dues tècniques diferents d'ELISA, en concret els "kits" comercials Enzygnost de la casa Behring i l'ELISA del laboratori Dr. Bommeli.

X.2. MATERIAL I MÈTODE

Sèrums. S'han emprar un total de 322 sèrums de diverses procedències:

- 36 sèrums negatius corresponents a animals d'una explotació controlada en els darrers vuit anys sense que s'hi hagi enregistrat cap animal positiu.

- 36 mostres dèbilment positives obtingudes en barrejar els sèrums anteriors amb una mostra positiva prèviament titulada (títol 1:320); les barreges s'han fet diluint la mostra positiva entre 1:5 i 1:16 en les negatives.

- 2 mostres positives prèviament titulades (1:320 i 1:1280).

- 248 mostres procedents de vaques de tres explotacions amb elevada prevalença de leucosi.

Prova d'immunodifusió en gel d'Agar

S'ha seguit el mètode ja descrit en el capítol anterior. L'única diferència introduïda és el sèrum control, ja que en aquest cas s'ha emprat un sèrum comercial (Behringwerke-Marburg (Alemanya)).

Prova d'Elisa

S'han emprat dos "kits" comercials d'Elisa: Enzygnost Rinderleukose de Bering (Beringwerke AG, Marburg, Alemanya Federal) citat des d'ara com ELISA-FA i Rinderleukose—Elisa dels laboratoris Dr. Bommeli (Berna, Suïssa) citat com ELISA-PO. Per a la realització de les proves hom ha seguit bàsicament les instruccions del fabricants, bé que s'hi han introduït algunes petites variacions.

Mètode ELISA-FA

El fabricant subministra les plaques amb l'antigen ja fixat en tots els forats o només en els de les columnes senars (la resta són controls sense antigen); nosaltres hem emprat els dos tipus indistintament.

Normalment hem fet les proves dobles (dos forats per cara sèrum). La part superior de les dues columnes de l'esquerra de la placa s'han reservat per als controls negatiu (4 forats), positiu (2 forats) i positiu i negatiu de la firma Bommeli (2 forats respectivament).

Aquest mètode empra antiimmunoglobulina bovina obtinguda en conill i marcada amb fosfatasa alcalina, a la qual hom addiciona p-nitrofenil-fosfat com a substrat cromogen (en les mostres positives pren un color groc).

Hem fet la lectura amb un fotòmetre MR 600 Microplate Reader (Dynatech) a una longitud d'ona de 410 nm.

Mètode ELISA-PO

Les plaques de Bommeli estan preparades amb control de placa: els forats de les columnes parells contenen l'antigen fixat, però els de les columnes senars són lliures (no s'hi ha fixat cap antigen).

Els sèrums control s'han diluït a 1:40 (com els sèrums problema) malgrat que el fabricant recomana una dilució d'1:160, ja que a aquesta última dilució s'obtenen uns valors molt baixos.

La antiimmunoglobulina en aquest cas està marcada amb peroxidasa, i el substrat emprat és l'ABTS diluït en tampó acetat i addicionat amb H_2O_2 . En aquesta prova, a diferència de l'ELISA-FA i de les pròpies instruccions del fabricant, no aturem la reacció al cap d'un temps determinat sinó quan la densitat òptica del control positiu arriba a un valor d'absorbància de 0,35-0,40 (en uns cinc minuts remenant-ho constantment), mesurat en un fotòmetre Microelisa MR-590 (Dinatech).

Per a frenar les reaccions no hem emprat la solució del fabricant sino H_2SO_4 (10%) (50 µl en cada forat). La lectura es fa de la mateixa manera que en el mètode ELISA-FA (també a 410 nm).

En la interpretació de la prova hom considera positives les mostres que tenen una extinció neta (absorbància de la prova amb antigen menys la del control de placa) superior o igual al 115% del valor del control positiu, negatives les que són menors del 85%, i la resta dubtoses.

En totes dues tècniques, la dilució de sèrums i la colocació a les plaques s'han fet amb micropipetes (10-100 µl i 50-250 µl) canviant la punta per a cada mostra, i l'emplenat de la placa amb el conjugat, el substrat i la solució de frenat amb pipeta multicanal (50-250 µl).

Tractament estadístic. Per al tractament estadístic s'ha emprat el paquet de programes SPSS.

X.3. RESULTATS

Immunodifusió en gel d'Agar

199 mostres (61,8%) han donat resultat positiu a la tècnica d'immunodifusió, mentre que les 123 mostres restants (38,2%) han estat negatives (figura 9).

Per comparar aquesta prova amb les altres hem establert uns valors semiquantitatius:

- 0. Negatiu. No s'observa cap línia de precipitació a les 48 hores (120 mostres).
- 1. Dubtós. Petita zona de precipitació que no es distingeix amb claredat a l'extrem de la línia del control. A efectes del còmput total les considerem negatives (3 mostres).
- 2. Positiu dèbil. Línia de precipitació inexistente a les 24 hores i molt tènue o incompleta a les 48 hores (20 mostres).
- 3. Positiu. Línia incompleta a les 24 hores o línia de precipitació prima i propera al forat de l'anticòs (27 mostres).
- 4. Positiu. Línia clarament marcada, ja a les 24 hores (152 mostres).

ELISA-FA

De les 322 mostres analitzades amb la tècnica d'ELISA segons el sistema Fostatasa alcalina hem obtingut un total de 210 mostres positives (65,2%) i la resta (123 mostres, 34,8%) negatives (figura 9).

A part de considerar la positivitat o negativitat de les mostres podem estudiar els valors de l'absorbància d'una manera quantitativa. Els termes estadístics que ens defineixen els valors d'aquesta variable es poden observar al quadre X.

Les mostres obtingudes a partir de la dilució d'un sèrum positiu en sèrums negatius (tres mostres per cada dilució, repetides tres vegades) presenten com és lògic una disminució de l'absorbància en diluir el sèrum positiu en els sèrums negatius. A la figura 10 podem veure la mitjana dels valors per cada dilució. La línia que uneix aquests punts recorda una hipèrbole.

Hem usat indistintament les plaques amb control de placa i sense, de manera que, de les mostres, 117 les hem examinat en plaques amb control sense antigen. D'aquestes, el 95% de les mostres ha provocat un color de fons inespecífic de menys de 0,14; les mostres amb valors superiors corresponien a tres sèrum negatius i dos de positius; un d'aquests darrers era negatiu a les altres dues proves i és per tant presumible que fos realment negatiu.

Amb l'objectiu de determinar la repetitivitat de la prova, 77 dels sèrums s'han examinat dues vegades.

Considerant la variable com a dicotòmica (positiva o negativa) observem que només 2 dels 77 sèrums repetits (2,6%) han donat resultats diferents en les dues anàlisis. La intensitat de relació, en definitiva la repetitivitat, mesurada pel paràmetre phi és de 0,930.

Quadre X. Absorbància dels sèrums positius i negatius segons el mètode d'ELISA-FA.

	Positives	Negatives
Nombre de sèrums	210,00	123,00
Mitjana	53,80	8,94
Variància	204,71	14,96
Màxim	82,00	21,00
Mínim	22,00	4,00

Si portem a terme la comparació considerant les absorbàncies (figura 11) obtenim una correlació (R) de 0,932, i una línia de regressió definida per la següent equació:

$$\text{Abs. Rep} = 0,9 \times \text{Abs} + 2,66$$

ELISA, Mètode PO

S'han examinat 320 mostres amb la prova d'ELISA amb peroxidasa; d'aquestes mostres, 183 (57,2%) han estat positives, 17 dubtoses (5,3%) i 120 negatives (37,5) (figura 9).

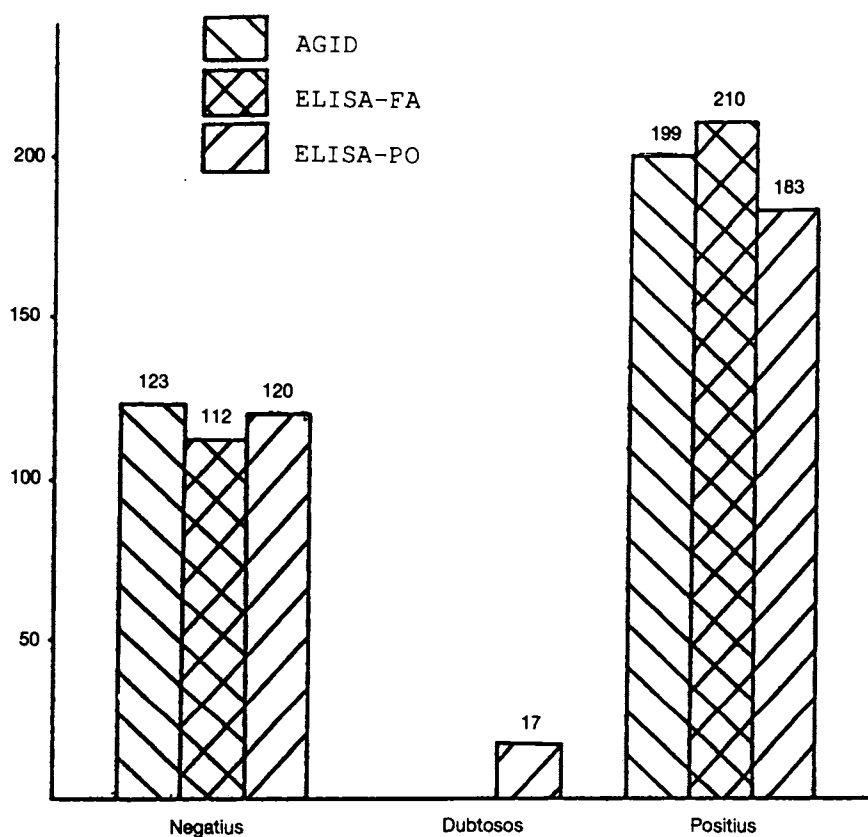


Fig. 9. Resultats qualitatius obtinguts amb cada una de les proves en examinar els 322 sèrums (320 a la prova PO).

Quadre XI. Absorbància dels sèrums positius, dubtosos i negatius segons el mètode d'ELISA-PO.

	Positives	Negatives	
Nombre de sèrums	183	17,0	120,0
Mitjana	219	99,8	17,7
Variància	5883	101,0	533,0
Màxim	487	113,0	82,5
Mínim	116	87,0	-26,1

A partir dels resultats quantitatius, expressats en el percentatge d'absorbància en relació al control dèbil positiu estandarditzat, hem obtingut els valors estadístics reflectits al quadre XI.

Les mostres obtingudes a partir de les dilucions presenten una disminució de l'absorbància en augmentar la dilució semblant a la que obteníem amb l'altre mètode d'ELISA.

Ja he dit a l'apartat de material i mètodes que aquesta casa comercialitza les plaques amb controls sense antigen. Hem estudiat els valors inespecífics d'absorbància que es presenten en aquests forats control. Els resultats, que es poden observar en l'histograma de la figura 12, indiquen que hi ha una gran variabilitat individual, ja que el 95% dels valors d'absorbància oscil·len entre 0,18 i 0,73 (mitjana de 0,38).

Amb la intenció de determinar la repetitivitat en termes quantitatius obtenim una correlació semblant ($R = 0,820$); la recta de regressió és definida per la següent equació:

$$NBomm = 0,178 + 0,987 \times ReNBo$$

Comparació dels tres mètodes

En comparar la immunodifusió i els dos mètodes d'ELISA, hom observa que en 289 sèrums (90,3%) hi ha una concordança total, mentre que en els 31 restants (9,7%) alguna de les proves dóna resultats diferents; normalment, excepte en un cas, les diferències són degudes a una resposta positiva a la tècnica ELISA-FA i un resultat negatiu o dubtós en alguna de les altres proves. Els valors totals obtinguts es poden observar al quadre XIII.

En aquest quadre també es poden observar les dades recollides en considerar els valors obtinguts en repetir la prova d'ELISA-PO per als sèrums dubtosos; la concordança entre les proves augmenta en aquest cas fins al 94,0%.

Al quadre XIV hi ha agrupats els 31 sèrums que donen resultats diferents en alguna de les proves. A part de la referència de cada sèrum hi ha representat el valor obtingut a les tres proves i a la repetició de l'ELISA-PO.

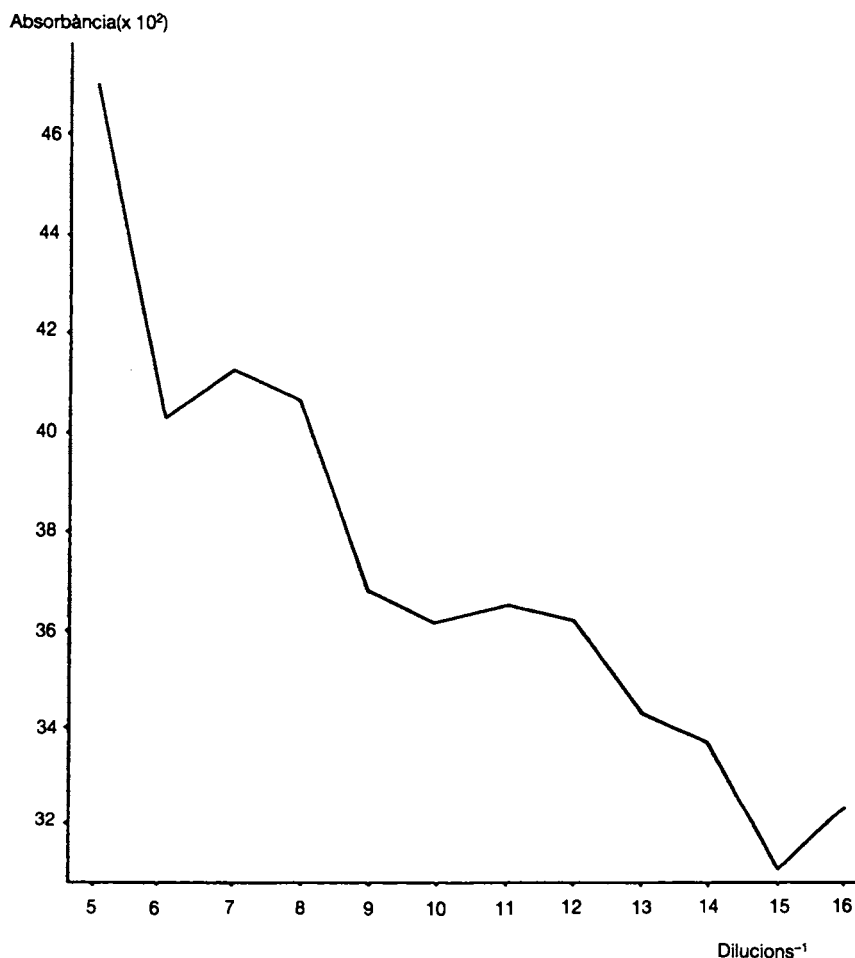


Fig. 10. Variació de l'absorbància en diluir sèrum positiu en sèrums negatius. Mètode ELISA-FA.

Quadre XII. Resultats obtinguts en repetir la prova d'ELISA-PO en 218 mostres (entre parèntesis el percentatge en relació al total).

	ELISA-PO		
	Negatiu	Dubtós	Positiu
Negatiu	19 (8,7)	2 (0,9)	7 (3,2)
Dubtós	7 (3,2)	2 (0,9)	5 (2,3)
Positiu	3 (1,4)	13 (6,0)	160 (73,4)

Dos dels sèrums (22432 i 2667) donen positiu dèbil amb ELISA-FA i clarament negatiu a les altres dues proves. Els sèrums 62 i 1953 són dubtoses a les dues proves d'ELISA-PO i els 36, 38 i 1951 donen resultats contradictoris en repetir aquest mètode, bé que en el primer la primera prova està just al límit amb els dubtosos (13) en la primera prova d'ELISA-PO donen en la segona un resultat més d'acord amb les altres dues proves.

També és interessant de notar que dos dels tres sèrums que hem definit dubtosos amb el mètode AGID són positius dèbils amb les proves d'ELISA.

Si en comptes de comparar els resultats de totes les proves estudiem només els resultats de les proves de camp (quadre XV), podem observar que la concordança entre tots tres mètodes es dona en el 91,2% dels casos (94,4% en considerar la repetició dels dubtosos amb la prova d'ELISA-PO).

En el grup de mostres que corresponen a dilucions (quadre XVI), els resultats, com és lògic, són més discordants: 61 sèrums (87,1%) donen els mateixos resultats amb les tres tècniques, i en canvi 9 (12,9%) donen resultats contradictoris. Aquestes discordances només es produeixen en les mostres positives amb les dilucions més baixes (1:12 a 1:16).

Quadre XIII. Resultats totals obtinguts amb els tres mètodes.

ELISA-FA	AGID	ELISA-PO			ELISA-PO*	
		+	dubtós	-	+	-
+	+	179 (55,9)	12 (3,8)	7 (2,2)	188 (59,1)	8 (2,5)
	-	4 (1,2)	4 (1,2)	3 (0,9)	8 (2,5)	3 (0,9)
-	+	-	-	-	-	-
	-	-	1 (0,3)	110 (34,4)	-	111 (34,9)

(*) ELISA-PO, considerant el valor obtingut en repetir les mostres dubtoses.

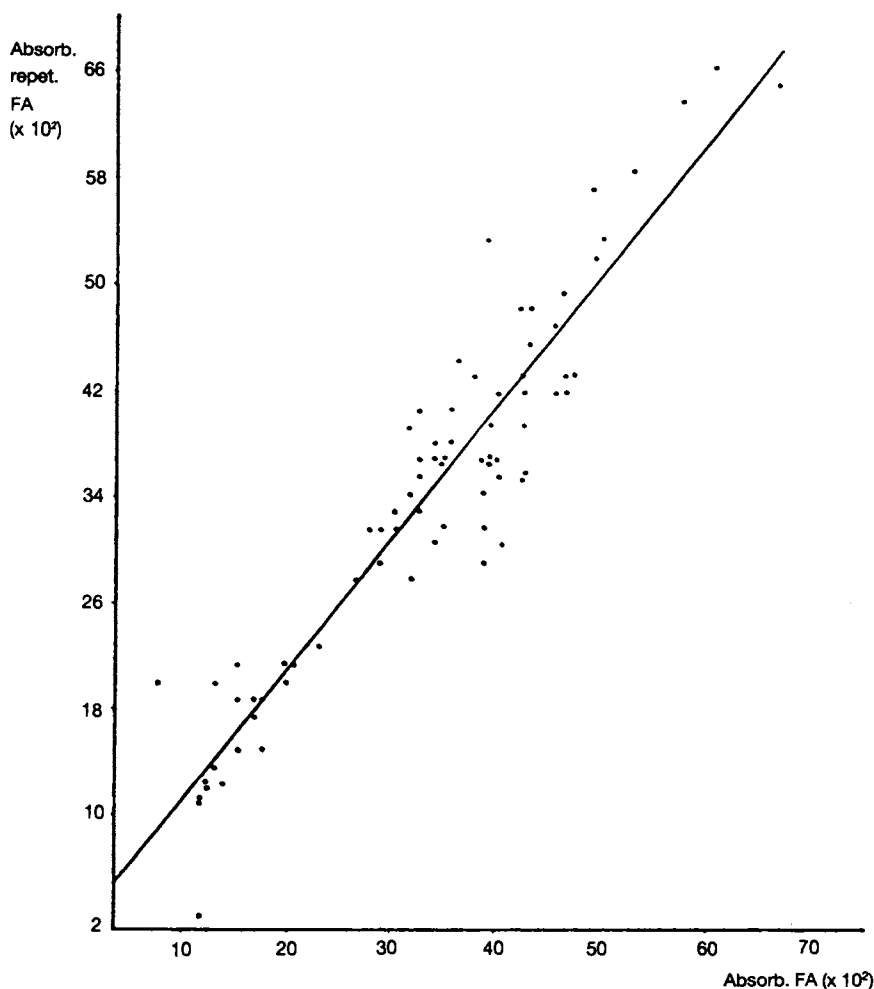


Fig. 11. Representació gràfica de les absorbàncies en repetir la prova d'ELISA-FA en 77 mostres.

La intensitat de relació entre els tres mètodes a la mostra total i a les dues submostres es pot observar al quadre XVII. En aquest quadre hi ha representats els termes estadístics que ens defineixen aquesta relació (phi si totes dues variables tenen dos valors i V de Cramer si almenys una en té més).

En tots els casos hom ha fet la prova del chi quadrat, i els resultats han estat, en totes les proves, altament significatius ($p < 0,00005$).

Analitzant cada una de les categories o grups en què hem dividit la immunodifusió, observem que el grup dels negatius és significativament diferent ($\alpha = 0,05$) dels altres grups excepte el dels dubtosos. D'altra part, els sèrums clarament positius (grup 4) tenen uns valors d'absorbància estadísticament diferents de tots els altres grups (quadre XVIII).

Si comparem l'AGID amb el mètode d'ELISA-PO obtenim uns resultats pràcticament idèntics.

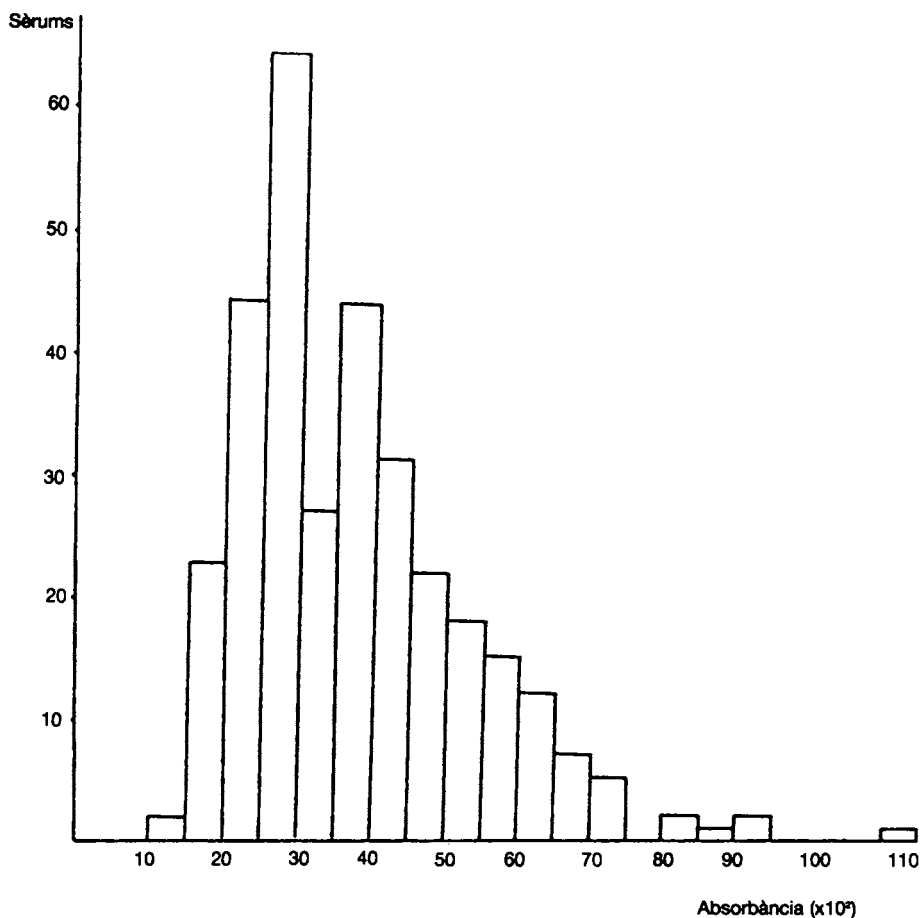


Fig. 12. Absorbància inespecífica dels forats de control d'antigen de la placa d'ELISA-PO.

Quadre XIV. Sèrums que han donat resultats no coincidents a les tres proves (+ = positiu, d = dubtós, - = negatiu)

Núm. sèrum	PO	Repetició PO	FA	AGID
15	0,93 d	1,49 +	35 +	0 -
20	0,88 d	1,15 +	28 +	2 +
26	0,90 d	0,70 -	62 +	4 +
28	0,95 d	0,95 d	33 +	3 +
36	0,83 -	1,58 +	44 +	4 +
38	0,75 -	1,24 +	30 +	0 -
73	0,34 -	1,04 d	33 +	3 +
86	0,66 -	1,06 d	28 +	2 +
62	0,77 -	0,98 d	37 +	4 +
1951	0,73 -	1,38 +	48 +	4 +
1952	1,08 d	1,51 +	45 +	4 +
1953	1,05 d	0,96 d	53 +	4 +
1071	0,63 -	1,11 d	33 +	3 +
1893	0,93 d	1,32 +	39 +	4 +
2615	0,70 -	1,11 d	26 +	3 +
2377	1,13 d	2,90 +	75 +	4 +
2432	0,30 -	0,07 -	22 +	0 -
2626	0,87 d	1,37 +	33 +	3 +
2628	1,13 d	1,47 +	42 +	4 +
2638	1,09 d	1,73 +	32 +	3 +
2667	0,70 -	0,53 -	32 +	0 -
3012	0,96 d	1,33 +	39 +	2 +
3030	1,27 +	1,24 +	43 +	1 -
3031	1,53 +	1,77 +	41 +	0 -
3033	1,16 +	1,54 +	29 +	1 -
3034	0,91 d	1,38 +	35 +	0 -
3039	1,26 +	1,95 +	34 +	0 -
3040	1,11 d	1,79 +	35 +	3 +
3041	1,11 d	1,73 +	40 +	0 -
3044	1,09 d	1,23 +	34 +	0 -
2604	0,87 d	0,53 -	19 +	0 -

Per comparar les absorbàncies dels dos mètodes d'ELISA hem cercat el coeficient de correlació (R) entre l'absorbància total de l'ELISA-FA i el percentatge d'absorbància en relació al control d'ELISA-PO és de 0,924 i la línia de regressió ve definida per l'equació

$$FA = 10,92 + 19,91 \times PO$$

Hom pot observar la línia de regressió, juntament amb els valors de les anàlisis, a la figura 13.

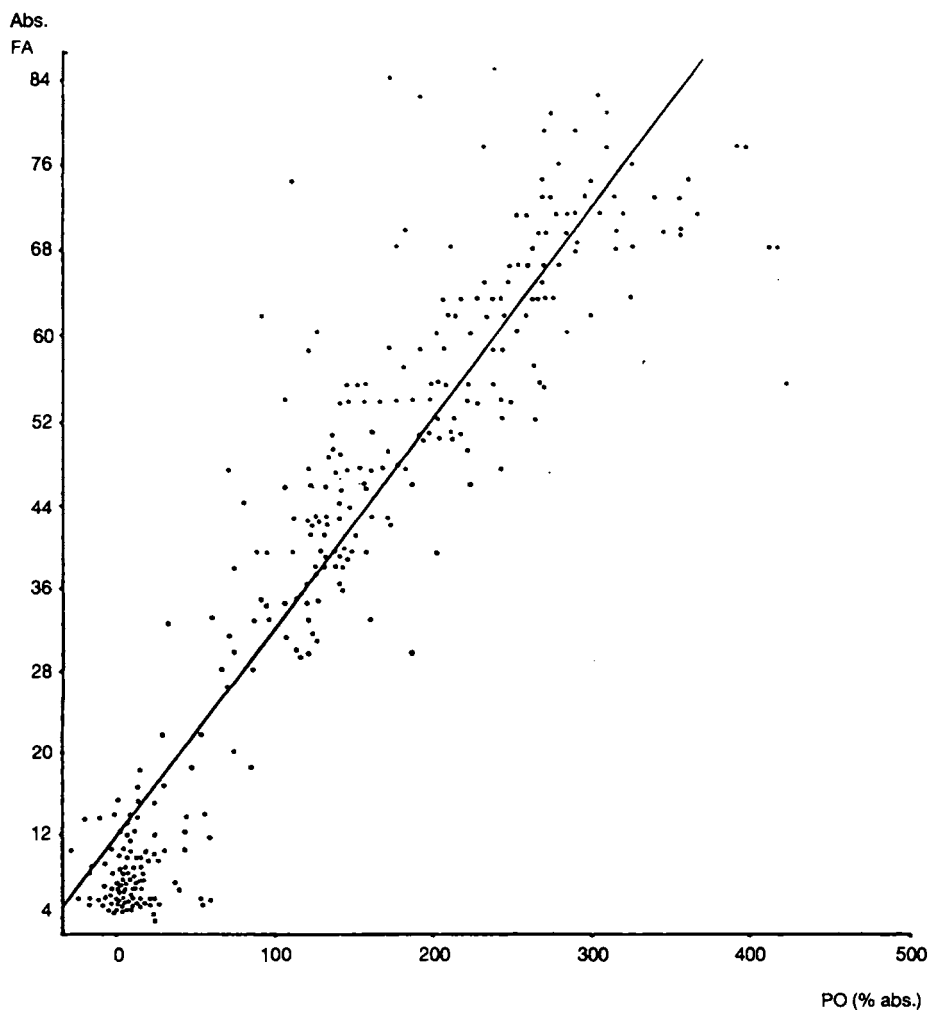


Fig. 13. Representació gràfica dels valors obtinguts per cada sèrum segons els mètodes FA i PO.

X.4. DISCUSSIÓ

Immunodifusió en gel d'Agar

La valoració semiquantitativa de l'AGID, tot i que no té gaire valor, ja que hem fet unes divisions totalment arbitràries, ens permet d'observar que el percentatge de sèrums dubtosos és molt baix (0,9%) i es presenta sobretot (2 dels tres casos) a les mostres obtingudes en diluir sèrum positiu en sèrums negatius.

A aquests sèrums hom pot afegir-hi 20 sèrums més (6,0%) que presenten una línia tènue o incompleta a les 48 hores i que, bé que es poden considerar plenament positius, cal potser una certa experiència per a detectar-los. La resta dels sèrums positius (93,1%) no presenten cap problema per a l'establiment del diagnòstic.

D'altra part el 90,5% dels sèrums positius ja presenten una línia de precipitació a les 24 hores.

ELISA-FA

La prova de ELISA segons el mètode FA ha donat 210 casos positius, o sia 11 més que la immunodifusió.

Les corbes que s'obtenen en representar gràficament la disminució de l'absorbància en relació a la dilució recorden una hipèrbole, bé que amb moltes irregularitats, degudes al fet que només s'han examinat tres negatius per cada valor de dilució, de manera que hi ha un fort component de variació individual entre els sèrums, que és el que provoca aquestes distorsions.

L'estudi de la reacció inespecífica que es dona en els forats sense antigen de les plaques FA ens permet d'observar que la majoria (95%) de les mostres provoquen un color de fons pràcticament menyspreiable (menor de 0,14).

També ens permet d'observar que un sèrum (el 2432) que ha donat resultat positiu a aquesta prova i negatiu a les altres dues ha presentat una reacció inespecífica de 0,20 i en la prova amb l'antigen el valor de l'absorbància ha estat de 0,22 i per tant ja es considera positiu. Això, junt als resultats obtinguts per l'ELISA-PO (30% i -7% en relació al control) permet d'afirmar amb gairebé tota seguretat que es tracta d'un fals positiu.

A causa de la baixa freqüència d'aquest fenomen (0,9%), podem concloure que les plaques sense forats de control on no s'ha fixat cap antigen es poden utilitzar amb una garantia gairebé total.

Quadre XV. Resultats obtinguts amb els tres mètodes de camp (250 sèrums)

ELISA-FA	AGID	ELISA-PO			ELISA-PO*	
		+	dubtós	-	+	-
+	+	153 (61,2)	10 (4,0)	7 (2,8)	160 (64,5)	8 (3,2)
	-	-	1 (0,4)	3 (1,2)	1 (0,4)	3 (1,2)
-	+	-	-	-	-	-
	-	-	1 (0,4)	75 (30,0)	-	76 (30,6)

(*) ELISA-PO, repetint els dubtosos i considerant el valor obtingut de la repetició.

També el sèrum 2667 (quadre XIV) pot ésser un fals positiu: en aquest sèrum no s'ha fet cap control de placa, però els valors obtinguts amb les altres proves són baixos (70% i 53% amb PO i negatiu amb immunodifusió.

Tanmateix, l'especificitat de la prova és molt elevada: 99,4% si assumim aquestes suposicions.

La repetitivitat de l'ELISA-FA per la mostra estudiada és del 97,4%. A causa de la mida relativament petita de la mostra només podem afirmar que amb un interval de confiança del 95% la repetitivitat de la prova oscil·la entre el 90 i el 100%. Els valors de les absorbàncies també presenten una correlació elevada. Per tant podem concloure que la repetitivitat de la prova és bona.

ELISA-PO

El mètode d'ELISA-PO ha detectat menys negatius i menys positius que les altres dues proves, per què aquesta prova considera una tercera categoria de dubtosos.

La repetitivitat de l'ELISA-PO és menor que la de l'ELISA-FA, en part a causa de la inclusió d'aquesta categoria de dubtosos. Ja en el seu mateix concepte els dubtosos són aquells sèrums que donen un resultat just al límit, i per tant s'aconsella de repetir la prova. Des d'aquest punt de vista la repetició és útil, ja que dels 17 dubtosos detectats a la primera anàlisi només 2 (12%) han restat dubtosos a la segon anàlisi.

Deixant de banda doncs els sèrums dubtosos, que ha calgut repetir per a definir si són positius o negatius, observem que 10 sèrums (4,6%) donen resultats contraris i 179 (94,5%) donen resultats iguals; la resta (0,9%) co-

rrespon als que donen dubtós tant a la primera prova d'ELISA-PO com a la seva repetició.

La intensitat de relació, definida pel terme estadístic phi, entre els valors de la prova en realitzar-la dues vegades és elevada, però menor que la que s'obtenia amb el mètode d'ELISA-FA. Prenent les dades d'aquesta mostra i extrapolant-les a la població general podem concloure que amb un interval de confiança del 95% la repetitivitat oscil·la entre el 92 i el 98%.

Així com amb les plaques d'ELISA-FA diem que no calia emprar les plaques amb control d'antigen, amb les plaques d'ELISA-PO és plenament justificada la decisió del fabricant d'incloure forats de control sense antigen, ja que la reacció inespecífica és elevada i si no es tingués en compte provocaria una disminució important de l'especificitat o la sensibilitat de la prova.

Comparació de mètodes

En comparar les dades obtingudes amb tots tres mètodes hom obté que la repetitivitat és del 90,3% i que augmenta fins al 94,0% si repetim els sèrums que han donat resultat dubtós amb l'ELISA-PO.

Al quadre XIII hom pot observar que els resultats contradictoris són deguts a 8 sèrums que donen negatiu a l'AGID i positiu a les dues proves d'ELISA, a 8 més que són negatius segons la prova d'ELISA-PO i positius segons les altres dues proves i a tres que són positius només per Behring.

Aquests resultats semblen indicar que la prova d'ELISA-FA és més sensible i menys específica que les altres. Tanmateix, l'especificat, valorant-la a partir dels resultats de les altres dues proves, sembla, tal com ja hem dit, molt elevada (99,4%), ja que, dels tres sèrums, dos són probablement

Quadre XVI. Resultats obtinguts amb els tres mètodes en les mostres de dilucions (35 sèrums diluïts i 35 de negatius)

ELISA-FA	AGID	ELISA-PO			ELISA-PO*	
		+	dubtós	-	+	-
+	+	26 (37,1)	2 (2,9)	-	28 (40,0)	-
	-	4 (5,7)	3 (4,3)	-	7 (10,0)	-
-	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	35 (50,0)	-	35 (50,0)

(*) ELISA-PO, considerant el valor obtingut en repetir els dubtoses.

falsos positius (sèrums 2432 i 2667) mentre que l'altre (sèrum 38) és possiblement positiu, ja que encara que a la primera prova d'ELISA-PO és negatiu, a la segona dona positiu.

Així doncs, la sensibilitat de les proves d'immunodifusió i d'ELISA-PO és menor mentre que l'especificat segons les dades de què disposem sembla millor.

A continuació discutirem els resultats de les proves realitzades en sèrums negatius als quals hom ha afegit una quantitat determinada de sèrum positiu. Aquestes proves tenen l'avantatge de permetre'ns de saber a priori que es tracta de mostres positives dèbils i per tant ens permeten de determinar la sensibilitat de les proves.

Hem pogut constatar, d'acord amb els resultats de tota la mostra, que la prova més sensible és l'ELISA-FA, ja que ha considerat tots els sèrums positius, o sia que la seva sensibilitat ha estat suficient per a detectar una mostra positiva diluïda fins a 1:16 en una de negativa.

Les altres proves són en canvi menys sensibles: el mètode PO no dona tampoc cap fals negatiu, però en canvi 5 dels animals (un terç de les dilucions entre 1:12 i 1:16) donen resultats dubtosos i cal repetir la prova per a aconseguir-ne determinar la positivitat.

La immunodifusió, tal com ja han considerat diversos autors (9, 15, 20, 129, 134, 139, 206 i 221), és menys sensible que l'ELISA, sobretot en mostres dèbilment positives; a la nostra prova, 7 de les 15 mostres fortament diluïdes (1:12 a 1:16) donen resultats falsament negatius.

Les proves de camp no permeten de treure tantes conclusions en la determinació de la sensibilitat de les proves, però ens permeten d'extrapolar els resultats a les condicions normals d'aplicació de les proves. A més, tenint en compte els resultats de la submostra anterior, considerem la prova ELISA-FA com a patró, ja que la sensibilitat n'és més elevada que la de les altres proves i la seva especificitat és força elevada.

Els resultats que s'obtenen en aquesta submostra presenten unes certes diferències amb els de la submostra de dilucions, ja que en aquest cas la prova d'immunodifusió presente, en relació a la prova d'ELISA-FA, una

Quadre XVII. Intensitat de relació entre cada parella de proves.

Proves comparades	Terme estadístic	Mostra total	Submostra camp	Submostra dilucions
AGID-FA	phi	0,929	0,964	0,778
AGID-PO	V Cramer	0,902	0,923	0,850
FA-PO	V Cramer	0,928	0,903	1,000

Quadre XVIII. Anàlisi de la variància entre la immunodifusió i l'absorbància de la prova ELISA-FA.

Grup AGID	nombre sèrums	mitjana	desviació estàndard	interv. conf. 95%	significació				
					neg.	dub.	+ deb.	+	+ fort
Negatiu	120	10,8	7,7	9,4 a 12,2					
Dubtós	3	26,0	18,7	-20,4 a 72,0					
Posit. dèbil	20	39,2	7,2	35,0 a 43,0	●				
Positiu	27	42,3	10,0	38,0 a 46,0	●				
Posit. fort	152	59,2	12,2	57,0 a 61,0	●	●	●	●	
Total	322	38,2	24,4	35,0 a 41,0					

● Parelles significativament diferents per $\alpha = 0,05$.

major coincidència de resultats que la prova d'ELISA-PO (246 sèrums, 98,4% i 228 sèrums, 91,2%, respectivament); àdhuc en repetir aquesta darrera prova per als animals dubtosos (236 sèrums, 95,2%) s'obtenen més casos de divergències que amb l'AGID.

En principi no hi ha cap explicació lògica que justifiqui aquestes diferències entre les mostres de camp i les dilucions en relació a la sensibilitat de les proves d'AGID i ELISA. Una possible explicació és que en relació a l'AGID els errors a les dilucions són deguts a la menor sensibilitat per a detectar nivells baixos d'anticossos (menys freqüents en les mostres de camp), mentre que les variacions en la tècnica d'ELISA-PO no anirien tant lligades a les taxes baixes d'anticossos com a problemes d'altra mena relacionats amb la realització de la prova (errors per no col·locar l'antigen en els forats corresponents, reacció inespecífica molt alta que emmascara una reacció positiva dèbil...).

En comparar el mètode d'ELISA Fosfatasa alcalina i la immunodifusió s'observa que el terme estadístic phi, que mesura la intensitat de relació, és de 0,929. Si en comptes de comparar tota la mostra només prenem les proves de camp, podem veure que aquesta relació és molt més intensa (phi = 0,964), ja que només un 1,6% dels sèrums presenten resultats negatius a l'AGID i positius a l'ELISA (quadre XIII).

Per tant podem concloure, tal com recomana Forschner (Com. personal Forschner 1987), que per a mostres de camp es pot emprar la prova d'immunodifusió amb una garantia gairebé total. Dels 4 sèrums que donen resultats diferents, dos són probablement d'animals infectats recentment o que han presentat una baixa en el nivell d'anticossos (ja que l'absorbància de

les dues proves d'ELISA és baixa) i els altres dos són els falsos positius que ja hem comentat.

En altres tipus de treballs en què calgui analitzar sèrums amb taxes d'anticossos baixes o mostres de llet no es pot en canvi emprar aquesta prova ja que la seva sensibilitat no és suficient, com ho indica el fet que gairebé el 50% de les mostres diluïdes entre 1:12 i 1:16 són negatives amb aquesta prova. Altres autors han arribat a les mateixes conclusions en diferents tipus de treballs (12, 16, 50, 198).

Els dos mètodes d'ELISA presenten una intensitat de relació molt semblant a l'existent entre ELISA-FA i l'AGID. En aquest cas les diferències es produeixen a les proves de camp (en aquesta submostra a V de Cramer és de 0,903, menor que el 0,964 que s'obtenia en el cas anterior), i per tant no van lligades a la sensibilitat en el sentit de detectar nivells baixos d'anticossos, sinó a altres factors, tal com ja hem comentat.

Les dades obtingudes en comparar la immunodifusió i el mètode Bom-meli ens indiquen que la intensitat de relació és menor que en les altres dues comparacions.

De totes aquestes dades hom pot concloure que la prova d'ELISA-FA és la més sensible i la immunodifusió la menys sensible.

De l'anàlisi de la variància entre els valors quantitatius dels mètodes d'ELISA i l'AGID valorat semiquantitativament es desprèn que hi ha una relació altament significativa entre la reacció colorimètrica de les proves d'ELISA i la formació de bandes més o menys marcades a l'AGID.

També és pot veure que el grup dels negatius i els de positius són diferents estadísticament i que el grup 1 (dubtosos) de la prova d'immunodifusió només és diferent estadísticament del grup 4, però no dels altres tres grups; això és perquè aquest grup és molt reduït i perquè part dels seus elements són positius a les altres proves i un és negatiu.

Finalment també hi ha una correlació forta ($r = 0,923$) entre les absor-bàncies dels dos mètodes d'ELISA.

CONCLUSIONS

– L'elevat nombre de treballs d'investigació publicats els darrers anys, així com les mesures preses en diversos països per al control de la infecció pel virus de la leucosi bovina, posen de manifest l'extraordinària importància de la malaltia produïda per aquest germen.

– L'enquesta serològica realitzada a Catalunya ha mostrat una taxa d'infecció pel virus de la leucosi bovina que oscil·la (per a $\alpha = 0,05$) entre l'1,2% i el 3,1% del cens boví català.

– Respecte als ramats, hom pot concloure que la taxa d'infecció (ramats que presenten un o més animals positius) està situada entre l'1% i el 10% (per a $\alpha = 0,05$).

– La infecció pel VLB afecta sobretot les explotacions grosses.

– Bé que la prevalença de la leucosi bovina és relativament baixa en el nostre país, representa un perill real que cal tenir en compte, i és necessari divulgar la seva incidència i establir programes de control adequats.

– El programa de sanejament, atesa l'epidemiologia de la malaltia, ha de consistir immediatament i com a mínim en el control dels animals importats.

– Posteriorment caldria implantar un programa d'eradicació adequat, que en la nostra opinió hauria de consistir en una campanya de control obligatòria a les explotacions on s'ha diagnosticat el procés i voluntària a la resta. En una segona fase caldria estendre l'obligatorietat a tot el cens boví de Catalunya.

– Els sèrums que presenten bandes tènues o incompletes a la immuno-difusió també són els que presenten unes absorbàncies menors amb les dues tècniques d'ELISA.

– La tècnica d'ELISA és més sensible que la immunodifusió.

– L'AGID és la prova d'elecció per a campanyes de control i eradicació de la leucosi bovina quan s'empra el sèrum com a substrat, ja que la seva sensibilitat és suficient per a les proves de camp, és senzilla, barata i apta per a grans quantitats de sèrums.

– En estudis d'altre tipus (determinació d'infeccions recents, estudis en mostres de llet...) és més indicat emprar la prova d'ELISA.

– En la prova d'ELISA-FA es poden emprar les plaques en què s'ha fixat l'antigen en tots els forats, amb una garantia gairebé total.

ANNEX I

NORMATIVA DE LA GENERALITAT DE CATALUNYA

(Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya. – Núm. 529. – 17-IV-1985)

RESOLUCIÓ

de 25 de febrer de 1985, sobre l'obligatorietat del sanejament contra la leucosi i peripneumònia en aquelles granges que ja el facin contra la tuberculosi i la brucel·losi.

Atès l'alt índex de reposició que, com a conseqüència del sacrifici per tuberculosi, es realitza a Catalunya;

Vista la Llei d'Epizooties de 20 de desembre de 1952 i el seu Reglament, aprovat per Decret de 4 de febrer de 1955;

D'acord amb l'informe presentat pel Servei de Sanitat Animal,

HE RESOLT:

Primer.— Totes les granges que facin sanejament contra tuberculosi i brucel·losi hauran de fer-lo, a més, contra la leucosi i la peripneumònia.

Segon.— En lliurar la targeta verda d'acord amb la legislació vigent, s'hi farà constar que l'estable ha donat negatiu a leucosi i peripneumònia, assenyalant expressament la data de realització de les proves de laboratori.

Tercer.— Tot animal que entri en una explotació integrada en concert de sanejament, a més de procedir de granges lliures de tuberculosi i brucel·losi, haurà de donar negatiu a les proves de leucosi i peripneumònia.

Quart.— El propietari d'un estable en sanejament comunicarà a la Secció Territorial de Sanitat Animal corresponent l'entrada de noves vaques, qualsevol que en sigui la procedència, a fi que aquesta Secció doni les ordres oportunes per treure les corresponents mostres de sang i realitzar les proves necessàries per comprovar que els animals estan lliures de leucosi i peripneumònia.

Cinquè.— Les vaques que, en fer el sanejament de l'estable, donessin positiu a leucosi i/o peripneumònia, seran marcades, aïllades i sacrificades.

En aquest darrer cas les indemnitzacions que puguin correspondre se satisfaran d'acord amb els barems que regeixen en cada cas.

Sisè.— En els casos d'animals que donin resultats serològicament positius a la leucosi enzoòtica bovina i a la peripneumònia, sens perjudici d'altres normatives aplicades sobre aquestes malalties, seran d'aplicació en especial les normes següents:

a) L'article novè de la Llei d'Epizooties (Llei de 20 de desembre de 1952), ja que es tracta de malalties infecto-contagioses de caràcter exòtic.

b) L'article 209 del Reglament d'Epizooties (Decret de 4 de febrer de 1955), en referència a la venda d'animals malalts o sospitosos.

c) L'article 153 de l'esmentat Reglament d'Epizooties, en referència al pagament d'indemnitzacions per sacrifici obligatori.

Setè.— El Servei de Sanitat Animal adoptarà les mesures adients per dur a terme el que disposa la present Resolució.

Barcelona, 25 de febrer de 1985.

JORDI PEIX I MASSIP
Director General de Producció
i Indústries Agro-alimentàries

ANNEX II

NORMATIVA DEL GOVERN ESPANYOL

(B.O.E. – Núm. 52. – 1-III-1986)

5447 *ORDEN de 28 de febrero de 1986 por la que se establecen normas para el desarrollo de las campañas de saneamiento ganadero.*

Ilustrísimo señor:

La Orden de 25 de noviembre de 1978, estableció las bases para la realización de las campañas de saneamiento ganadero, que han alcanzado desde aquélla fecha un amplio desarrollo y un apoyo generalizado por parte del sector productor. La incorporación de España a la Comunidad Económica Europea hace necesario adecuar la actual normativa a las Directivas 64/432 relativa a los problemas de policía sanitaria en materia de intercambios comunitarios de animales y 78/52 que fija los criterios comunitarios aplicables a los planes nacionales para la erradicación de brucelosis, tuberculosis y leucosis.

Por todo ello y en virtud de lo dispuesto en el artículo 26 de la Ley de Epizootias,

Este Ministerio ha tenido a bien disponer:

Primero.— A partir de la entrada en vigor de la presente disposición serán de obligado cumplimiento en España las Directivas comunitarias 64/432 y 78/52, en lo que se refieren a la lucha contra tuberculosis, brucelosis y leucosis bovina.

Segundo.— Serán objeto de campañas oficiales de saneamiento ganadero y sometidas a planes nacionales de erradicación, la tuberculosis y leucosis enzoótica en los bovinos y la brucelosis en los bovinos, ovinos y caprinos.

El control diagnóstico en tuberculosis se extenderá a los animales de edad superior a las seis semanas; en brucelosis y leucosis bovina a los animales de más de doce meses y en brucelosis ovina y caprina a los de más de seis meses.

Tercero.— Queda prohibido todo tratamiento terapéutico contra estas tres enfermedades, así como los tratamientos desensibilizantes frente a tuberculosis y la vacunación contra leucosis y tuberculosis.

.

Octavo.— para el diagnóstico laboratorial de leucosis enzoótica bovina se realizará la prueba serán sacrificados en un período máximo de tres meses después de la notificación oficial. Excepcionalmente, los Servicios Oficiales podrán conceder plazos más amplios cuando los porcentajes de positividad así lo aconsejen y siempre que se establezca un programa de erradicación a fecha fija.

Noveno.— Todos los animales reaccionantes positivos a cualquiera de estas enfermedades serán marcados obligatoriamente en la oreja izquierda por los Servicios Oficiales, con una marca oficialmente aprobada en forma de T.

En las explotaciones en las que se encuentren animales positivos se mantendrá una vigilancia oficial, prohibiéndose todo movimiento de animales de esa explotación o hacia la misma, salvo las autorizaciones concedidas exclusivamente por los Servicios Oficiales para la salida de animales a matadero.

Décimo.— Finalizado el sacrificio de los animales positivos se procederá a la limpieza y desinfección de locales y utensilios bajo control de un Veterinario oficial.

La repoblación sólo podrá efectuarse con animales que hayan sido controlados oficialmente con resultados negativos a estas enfermedades y que procedan de explotaciones calificadas sanitariamente.

Undécimo.— Los ganaderos a los que se les sacrifiquen animales como resultado de las actuaciones llevadas a cabo en cumplimiento de esta disposición, tendrán derecho a percibir la correspondiente indemnización de acuerdo con los baremos aprobados.

Duodécimo.— Las importaciones de ganado se autorizarán exclusivamente con destino a explotaciones que hayan completado el saneamiento de acuerdo con lo dispuesto en esta Orden.

Decimotercero.— Queda derogada cualquier disposición de igual o inferior rango que se oponga a la presente disposición.

Decimocuarto.— Esta Orden entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el "Boletín Oficial del Estado".

Madrid, 28 de febrero de 1986.

ROMERO HERRERA

Il.mo. Sr. Director general de la Producción Agraria.

ANEXO C

Diagnóstico leucosis bovina enzoótica

1. El diagnóstico de leucosis bovina se efectuará mediante la realización de la prueba de inmunodifusión sobre placa de agar-gel.

2. El antígeno a utilizar deberá contener glicoproteínas del virus de la leucosis. El antígeno deberá ser estandarizado en comparación con un suero patrón, suministrado por el Statens Veterinære Serum Laboratorium de Copenhague.

3. En prueba podrá ser leída a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas, pero el resultado final deberá obtenerse a las setenta y dos horas de iniciada la incubación.

4. Criterios de interpretación:

a) Un suero problema es positivo cuando forma una curva de precipitación específica con el antígeno del virus de la leucosis bovina y si esta curva coincide con la del suero control.

b) Un suero problema es negativo si no forma una curva de precipitación específica con el antígeno del virus de la leucosis y no desvía la curva del suero control.

c) La reacción no será considerada como concluyente si:

i) Se desvía la curva del suero control hacia el pocillo del antígeno sin formar una curva de precipitación visible con el antígeno.

ii) Si no es posible interpretarla como negativa o positiva.

Para las reacciones no concluyentes, se puede repetir la prueba y utilizar suero concentrado.

5. El Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Madrid actuará como Centro Nacional de referencia para esta enfermedad.

(B.O.E. – Núm. 37. – 12-II-1987)

3803 *ORDEN de 3 de febrero de 1987 por la que se establecen normas complementarias para el desarrollo de campañas de saneamiento contra leucosis bovina enzoótica.*

La Orden de 28 de febrero de 1986 ("Boletín Oficial del Estado" de 1 de marzo) estableció las bases para el desarrollo de las campañas de saneamiento ganadero, incluyendo a partir de su entrada en vigor a la leucosis bovina enzoótica como enfermedad objeto de campaña oficial.

Ante el hecho de incluirse por vez primera dicha enfermedad en las campañas oficiales, se hace necesario dictar normas complementarias para la unificación de criterios de actuación en todo el territorio del Estado.

Por todo ello, y en virtud de lo dispuesto en el artículo 26 de la Ley de Epizootias.

Este ministerio ha tenido a bien disponer.

Primero.— Todas las explotaciones de ganado vacuno serán sometidas a control para la detección de leucosis bovina enzoótica de acuerdo con los siguientes criterios:

a) En las explotaciones calificadas como de Sanidad Comprobada, Diplomadas o inscritas en Libros Genealógicos, así como en aquellas otras que a juicio de los Servicios de Sanidad Animal se considere necesario, serán controlados serológicamente todos los animales de edad superior a doce meses.

b) En el resto de las explotaciones el control serológico se extenderá como mínimo a un 10 por 100 de los animales de edad superior a doce meses, debiendo llegarse al 100 por 100 en caso de reacciones serológicas positivas.

Segundo.— En los casos que excepcionalmente los animales positivos de una explotación no sean sacrificados en el período máximo de tres meses y de conformidad con lo dispuesto en la Orden de 28 de febrero de 1986 por la que se establecieron las normas para el desarrollo de las campañas de saneamiento ganadero, los Servicios Oficiales de Sanidad Animal podrán autorizar, siempre que existan garantías de separación suficiente y de manejo higiénico en las explotaciones afectadas, la segregación de los animales serológicamente negativos, considerándose este núcleo a todos los efectos como una explotación independiente y que podrá acceder a la calificación de oficialmente indemne de leucosis, una vez que supere las exigencias requeridas para alcanzar la misma.

Tercero.— Esta Orden entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el "Boletín Oficial del Estado".

Madrid, 3 de febrero de 1987.

ROMERO HERRERA

Ilmo. Sr. Director general de la Producción Agraria.

ANNEX III

NORMATIVA DE LA C.E.E. EN RELACIÓ A LA LEUCOSI I LA SEVA ERADICACIÓ*

(Consell directiu de 17 de maig de 1977 - 77/391/EEC)

CHAPTER IV. Specific provisions relating to enzootic bovine leukosis.

Article 21. Pending the entry into force of Community rules, and without prejudice to Article 4, third subparagraph of Directive 77/391/EEC, national provisions on the detection of leukosis and on the classification of herds with regard to leukosis shall apply.

Article 22. Member States shall ensure that, under a plan for the eradication of leukosis,

a) the presence and suspected presence of leukosis, and in particular tumours of the lymphatic system and other organs of cattle, are compulsorily and immediately notifiable to the competent authority;

b) therapeutic treatment or anti-leukosis vaccination of any kind is prohibited.

Article 23. Notwithstanding any measures adopted pursuant to national provisions in the event of leukosis being suspected, Member States shall, when the presence of leukosis is officially confirmed in a herd, take appropriate measures to prevent any spread of the disease and shall ensure in particular that:

– any movement of animals from this herd is prohibited, unless authorized by the competent authorities for the purpose of slaughter without delay,

– the herd in question is isolated so that the cattle cannot come into contact with cattle not belonging to this herd,

(*) S'està preparant una nova normativa, que substituirà aquesta.

- milk from infected cows may only be fed to animals after suitable heat treatment or delivered to a dairy to undergo such treatment; feeding animals with milk which has not undergone heat treatment may be authorized for herds where all animals are to be slaughtered pursuant to Article 24, point 1,

- carcasses, half-carcasses, quarters, pieces and offal from infected animals intended for use as feed for animals are prepared in such a way as to avoid contamination,

- official regulations for the control of establishments such as carcase disposal plants ensure that there is no danger of the material produced spreading leukosis,

- the farmer notifies the official veterinarian of the death or emergency slaughter of any cattle from his farm.

Article 24. Member States shall ensure that, within the framework of the eradication plan,

1. where such plan provides for the slaughter of all cattle belonging to a herd in which leukosis has been officially established, these animals are slaughtered within a period to be set by the competent authorities;

2. where such plan provides for the slaughter of only those cattle in which leukosis has been officially established and possibly those considered by the competent authorities to be infected, such slaughter takes place within a period of 30 days after their owner or the person in charge has been officially notified of the result of the examinations and of his obligation, under the eradication plan, to slaughter the cattle concerned within this period.

Article 25. Member States shall ensure that, in the event of slaughter pursuant to Article 24, point 2,

- no cattle may leave the herd concerned unless authorization has been given by the competent authorities for the purpose of slaughter without delay,

- leukosis tests are carried out on the herd concerned to confirm that the disease has been eliminated,

- only animals from herds considered by the competent authorities as not infected with leukosis may be used to re-stock the herd.

Article 26. Member States shall ensure that:

1. after the slaughter of the cattle referred to in Article 24 and prior to restocking, sheds and other herd quarters, and all containers, equipment and other articles used for the animals are cleaned and disinfected under official supervision, in accordance with the instructions given by the official veterinarian;

2. all means of transport, containers and equipment are cleaned and disinfected after the transport of animals or of materials from such animals or

of materials or substances which have been in contact with such animals. Loading areas for such animals are cleaned and disinfected after use;

3. the disinfectant to be used and its concentrations are officially authorized by the competent authority of the Member State concerned.

Article 27. Member States shall ensure that cattle from a herd classified as not suspect do not come into contact with cattle from herds which are not so classified.

CHAPTER V. Final provisions.

Article 28. Before expiry of the three-year period provided for in Directive 77/391/EEC, the Commission shall submit to the Council a report on the application of the plans provided for in that Directive, accompanied if necessary by proposals to achieve closer harmonization of national preventive measures.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTANER, C., ZAJAC, V., BAN, J.: A Simple and Inexpensive Method for Detection of BLV Infected Cattle Based on a Modified ELISA Principle. *Zbl. Vet. Med B29*, 583-590 (1982).
2. AMADDEO, D., PIRAGINO, S., VULCANO, G., ALEANDRI, M.: Inchiesta sieroepidemiologica sulla leucosi bovina enzootica negli allevamenti di razza Frisone nel Lazio. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 35, 766-767 (1981).
3. AMADDEO, D., FAGIOLO, A., PIRAGINO, S., ALEANDRI, M.: Osservazione pratiche sulla trasmissione endovenosa del virus della leucosi bovina enzootica in un allevamento di razza frisone. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 36, 592-594 (1982).
4. AURAM, N., PAUNESCU, G., GRANDIARU, D., LUNGEANU, A., SIRBULESCU, P.: Aspecte comparative in diagnosticul hematologic si serologic al leucozei enzootice bovine intro ferma infectata. *Lucrarile Inst. Cercet. Vet. Pasteur 15*, 15-26 (1979).
5. AURAM, N., PAUNESCU, G., GRANDIARU, D., LUNGEANU, A., MIRONESCU, D.: Resistance of BLV to some physical and chemical factors. *Lucratile Inst. Cercet. Vet. Pasteur 16*, 96-75. (1982). *En Vet. Bull.* 53, n. 7338. (1983).
6. BADIOLA, J.J., MUZQUIZ, J.L., ALONSO, J.L., SIMON, C., BASCUAS, J.A., JUARISTI, A., GALLEGO, M.: Leucosis bovina en la provincia de Navarra. I Congreso Nac. Patol. Bov. León. Octubre 1982.
7. BAN, J., ZAJAC, V., ALTANER, C., CERNY, L.: Early diagnosis of virus induced bovine leucosis in milk by a simple modified ELISA test. *Zbl. Vet.-Med. B 29*, 591-595 (1982).
8. BARTLETT, D.E.: Bovine leukosis and IA. *Bov. Pract.* 14, 111-114 (1979).
9. BAUER, T.: Einsatzmöglichkeiten der ELISA-metodik gegenüber der Agargel-immunodiffusion zur Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes. Vergleichende Untersuchungen an Blut- und Milchproben. *Tesi Doc. Fac. Vet. Univ. Giessen (Alemania)*. 1983.
10. BAUMGARTNER, L.E., CROWLEY, J., ENTINE, S., OLSON, C., HUGOSON, G., HANSEN, H., DREHEN, W.: Influence of sire on BLV infection in progeny. *Zbl. Vet.-Med. B25*, 202-210 (1978).
11. BAUMGARTNER, L.E., OLSON, C.: Host range of BLV: preliminary report. IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna (Italia). Ed. Straub 1982. 338-347 (1980).
12. BAUSE, I., SCHMIDT, F.-W.: Zur persistenz präzipitierende Antikörper im Blutserum leukoseinfizierter Rinder unter besonderer Berücksichtigung des Kalbezeitpunktes. *Tierärztl. Umsch.* 35, 642-649 (1980).

13. BECH-NIELSEN, S., PIPER, C.E., FERRER, J.F.: Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: Role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1089-1092 (1978).
14. BECKER, Y.: Bovine Leukemia virus: A virologist's point of view. *Bovine Leucosis. various methods of molecular virology.* Ed. A. Burny. C.E.C. Luxembourg. 1977, 435-458.
15. BEHRENS, F., ZIEGELMAIER, R., TOTH, T., v. KEYSERLING, M., FORSCHNER, E.: Rinderleukose-Diagnostik: ELISA, ein neues Verfahren. *Berl. Munch. Tierärztl. Wschr.* 92, 429-432 (1979).
16. BEHRENS, F., ZIEGELMAIER, R., FORSCHNER, E.: Comparison of ELISA and immunodiffusion-test in the diagnosis of enzootic bovine leucosis. *Proceed. II International Symposium of Veterinary laboratory diagnosticians.* Lucerne 1980. 248-249.
17. BEHRENS, F., ZIEGELMAIER, R., FORSCHNER, E., MANZ, D., WIEGAND, D.: Comparative studies on the linked immuno-sorbent assay and immunodiffusion-test in the diagnosis of enzootic bovine leucosis. *IV Int. Sym. bov. Leuk. Bologna.* Ed. Straub 1982. 173-184 (1980).
18. BENELBAS, L.: *Economia Agrària de Catalunya.* Ed. Ketres. Barcelona. 1981.
19. BEX, F., BRUCK, C., MAMMERICK, M., PORTETELLE, D., GHYSDAEL, J., CLEUTER, Y., LECLERQ, M., DEKEGEL, D., BURNY, A.: Humoral antibody response to BLV infection in cattle and sheep. *Cancer Research* 39, 1118-1123 (1979).
20. BIANCIFIORI, F., CENCI, G.: ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis virus. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna.* Ed. Straub 1982. 167-175 (1980).
21. BORTOLOZZI, J., HINES, H.C.: Antigenos limfocitarios e resistencia ao virus da leucose bovina. *Pesq. Agropec. Bras.* 20, 235-239 (1985).
22. BRIGHTLING, P., RADOSTITS, O.M.: Bovine leukosis virus infection in a dairy herd in Saskatchewan. *Can. Vet. J.* 24, 362-363 (1983).
23. BRUNEL, C., de MENDOZA, N., COLMAN, O., BULMAN, G.: Leucosis enzoótica bovina. Tasa de prevalencia en la provincia de Formosa (Rep. Argentina) mediante la prueba de inmunodifusión en agar. *Rev. Med. Vet. (BsAS.)* 62, 486-490 (1981).
24. BUNDZA, A., GREIG, A.S., CHANDER, C., DUKES, T.: Sporadic bovine leucosis. A description of eight calves received at Animal Disease Research Institute From 1974-1980. *Can. vet. J.* 21, 280-283 (1980).
25. BURKI, F.: Experiences gained and progress achieved with BLV elimination from Austrian livestock. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna.* Ed. Straub 1982. 516-531 (1980).
26. BURKI, F., MOSTL, K., KASPER, A., HORVARTH, E., KUNTNER, C.: Virologisch-serologische Feststellung der enzootischen Rinderleukose in Österreich und ihre gezielte freiwillige sanierung durch periodische Ermittlung und Keulung von seroreagenten. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 70, 1-14 (1983).
27. BURRIDGE, M.J., THURMOND, M.C.: An overview of modes of transmission of bovine leukemia virus. *Proceed. U.S. Anim. Health Ass.* 85, 165-169 (1981).

28. BURRIDGE, M.J., THURMOND, M.C., PUHR, M., WILCOX, C., SIMERL, N.A.: Preliminary studies on impact of bovine leukemia virus infection on dairy productivity. IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna. Ed. Straub 1982. 599-605 (1980).
29. BURRIDGE, M.J., PUHR, M., HENNEMANN, J.M.: Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179, 704-707 (1981).
30. BURRIDGE, M.J., THURMOND, M.C., MILLER, J.M., SCHMERR, J.M., VAN DER MAATEN, J.M.: Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. Am. J. Vet. Res. 43, 1866-1867 (1982).
31. BUXTON, B.A., SCHULTZ, R.D.: Factors affecting the infectivity of Lymphocytes from cattle with Bovine Leukosis Virus. Can. J. Comp. Med. 48, 365-369 (1984).
32. BUXTON, B.A., HINKLE, N.C., SCHULTZ, R.D.: Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: Potential for transmission by stable flies, horn flies and tabanids. Am. J. Vet. Res. 46, 123-126 (1985).
33. CALLAHAN, R., LIEBER, M.M., TODARO, G.I., GRAVES, D.C., FERRER, J.: Bovine leukemia virus genes in the DNA of leukemic cattle. Science 192, 1005-1007 (1976).
34. CHANDER, S., DEVARE, S.G., STEPHENSON, J.R.: Comparison of radioimmunoassay and Bendixen's hematological evaluation in adult and calf forms of bovine lymphosarcoma. Bovine Leucosis: Various methods of molecular virology. Ed. A. Burny. C.E.C. Luxembourg. 1977. 247-258.
35. CHASEY, D., WIBBERLEY, G., MARKSON, L.M., ROBERTS, D.H.: Diagnosis of enzootic bovine leucosis in Great Britain. Ann. Rech. Vét. 9, 777 (1978).
36. CHEVRIER, L.: Aspect hématologique de la leucose bovine. Application au dépistage hématologique. Rec. Méd. Vét. 151, 145-152 (1975).
37. CHUNG, Y.S.: Isolation of bovine leukosis virus from cattle. Austr. Vet. J. 56, 42-43 (1980). Citat per Cifuentes. Ref. 38.
38. CIFUENTES, D.: Identificación de un foco de leucosis enzoótica bovina en Asturias. I Congreso Nac. Patol. Bov. León. Ed. Sobrino. 153-157 (1982).
39. COSTA DURAO, J.: Bovine leukosis in Portugal. Ann. Rech. Vét. 9, 779 (1978).
40. CRESPEAU, F., POUCHOLON, J.L.: L'infection du chat par le virus leucémogène félin (Fe.L.V.) Rec. Méd. Vét. 158, 741-754 (1982).
41. DAVIES, G.: The cost and benefits of erradicating enzootic bovine leukosis from Great Britain. Bull. Off. Int. Epizoot. 92, 325-329 (1980).
42. DESHAYES, L., LEVY, D., PARODI, A.L., LEVY, J.P.: Spontaneous immune response of bovine leukaemia-virus-infected cattle against five different viral proteins. Int. J. Cancer 25, 503-508 (1980).
43. DEVARE, S.G., CHANDER, S., SAMAGH, B.S., STEPHENSON, J.R.: Evaluation of radioimmunoprecipitation for the detection of B.L.V. infection in domestic cattle. J. Immunol. 119, 277-282 (1977).
44. DU, N.X., LI, R.J.: (Use of immunodiffusion tests for an epidemiological

- study of bovine leukosis virus infection). *J. Nanjing Agric. Col.*, Xina 1, 73-80 (1982). En *Vet. Bull.*, 53, n. 3427 (1983).
45. DUTCHER, R.M., LARKIN, E.P., MARSHAK, R.R.: Virus-like particles in cow's milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 33, 1055-1064 (1964).
 46. ERNST, L.K., SHISHKOV, V.P.: (Recent developments in selecting cattle for resistance to leukosis). *Soel' skokhozya. Biol.* 2, 96-104 (1984). En *Vet. Bull.* 54, n°. 3535 (1984).
 47. EVERMANN, J.F., DIGIACOMO, R.F., HUBER, N.L.: Prevalence of bovine leukemia virus antibody in seven herds of Holstein-friesian cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 177, 549-550 (1980).
 48. FAMIGLI, P., GIORDANI, L., PRATI, G., SOLDATI, G.: Ulteriori controlli sierologici per leucosi bovina in allevamenti infetti. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 34, 189 (1980).
 49. FERDINAND, G.A., LANGSTON, A., RUPPNER, R., DRLICA, S., THEILEN, G.H., BEHYMER, D.E.: Antibodies to bovine leukemia virus in a leukosis dairy herd and suggestions for control of the infection. *Can. J. Comp. Med.* 43, 173-179 (1979).
 50. FERREIRA, M.I.C., ROMERO, C.H., ROWE, C.A.: Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lamina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzootica bovina. *Pesquisa Vet. Brasil.* 2, 49-53 (1982).
 51. FERRER, J.F.: Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 175, 1281-1285 (1979).
 52. FERRER, J.F.: Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 1-68 (1980).
 53. FERRER, J.F.: Erradication of bovine leukemia virus infection from a high-prevalence herd, using radioimmunoassay for identification of infected animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 180, 890-893 (1982).
 54. FERRER, J.P., CABRADILLA, C.D.: The phenomenon of polycaryocytosis induced by BLV in mixed cultures: specificity, mechanisms and application to the diagnosis of BLV infection in cattle. *Ann. Rech. Vét.* 9, 721-728 (1978).
 55. FERRER, J.F., PIPER, C.E.: Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 41, 4906-4909 (1981).
 56. FERRER, J.F., AVILA, N.D., STOCK, N.D.: Serological detection of type C viruses found in bovine cultures. *Cancer Res.* 32, 1864-1870 (1972).
 57. FERRER, J.F., ABT, D.A., BHATT, D.M., MARSHAK, R.R.: Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia and persistent lymphocytosis in cattle. *Cancer Res.* 34, 893-900 (1974).
 58. FERRER, J.F., PIPER, C.E., BALIGA, V.: Diagnosis of BLV infection in cattle of various ages. *Bovine Leucosis: Various Methods of Molecular Virology*. Ed. A. Burny. C.E.C. Luxembourg, 1977. 323-336.
 59. FERRER, J.F., ABT, D.A., MARSHAK, R.R.: Diagnosis of bovine leukemia virus infection: evaluation of serologic and hematologic test by a direct infectivity detection assay. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1977-1981 (1977).

60. FERRER, J.F., MARSHAK, R.R., ABT, D.A., KENYON, S.J.: Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 175, 705-708 (1979).
61. FERRER, J.F., KENYON, S.J. GUPTA, P.: Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science* 213, 1014-1017 (1981).
62. FETROW, J., FERRER, J.F.: Bovine leukemia virus and mastitis. *J. Dairy Sci.* 65, 881-882 (1982).
63. FONDEVILA, N.A.: Leucosis bovina enzoótica. *Rev. Med. Vet. (Bs.As.)* 62, 135-147 (1981).
64. FORSCHNER, E.: Zur serologischen Feststellung der enzootischen Rinderleukose im ID-test -Möglichkeiten und Grenzen des Verfahrens, Prueftechniken. *Proceed. II Int. Sym. Vet. Laborat. Diagnost. Lucerne.* 1980. 46-69.
65. FORSCHNER, E., v. KEYSERLING, M.: Enzootische Rinderleukose: Aktuelle Verlaufskontrolle und Sicherung der Beurteilungskontinuität des ID-testes durch routinemaessigen Einsatz eines Pruefsets. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 87, 338-342 (1980).
66. FORSCHNER, E., SEIDLER, M.S., v. KEYSERLING, M.: Methodische Erfahrungen mit dem Agargelimmunodifusionstest (ID-test) bei der routinemaessigen Massenuntersuchung von blutproben zur Erkennung der enzootischen Rinderleukose. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wschr.* 91, 447-450 i 453-456 (1978).
67. FRANK, W., BUTKAMP, J.: Die serologische Leukose-Diagnostik in der Routineuntersuchung. *Blauen Hefte* 60, 526-531 (1979).
68. FRANK, W., EBERLE, G.: Fortschritte bei der Bekaemfung der Rinderleukose in Niedersachsen aus der Sicht der serologischen Uberwachuntersuchungen. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 87, 176-178 (1980).
69. FRENZEL, B., KAADEN, O.R., MUSGAY, M.: Nachweis von Antikoerpern gegen das Rinderleukose-virus und seine Strukturproteine p-15, p-24 und gp-69. *Forschrit. Vet-Med.* 28, 164-166 (1978).
70. FRENZEL, B., KAADEN, O.R., MUSGAY, M.: Untersuchung ueber die Haeufigkeit und Verteilung von antikoerpern gegen ein Glycoproteinantigen des Rinderleukosevirus in leukoseverseuchten Bestaenden. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 85, 45-47 (1978).
71. GALLEG0, M., BADIOLA, J.J., GARCIA DE JALON, J.A., GARCIA MARIN, J.F., ARNAL, C.: Leucosis esporádica bovina. *Med. Vet.* 1, 225-230 (1984).
72. GAUTHIER, T., GUILLEMAIN, B., ASTIER, T., MAMOUN, R.: Sensitivity of an immunodiffusion test for the detection and quantitation of bovine leukemia virus induced antibodies. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna.* Ed. Straub 1982. 151-166 (1980).
73. GELABERT, J.L., JUSTE, R.A., SAEZ DE OCARIZ, C., BASCONES, M.: Leucosis enzoótica bovina: incidencia en el ganado vacuno del país Vasco y estudio de una explotación afectada. *ITEA* 5, 434-436. *I Jornadas producción Animal.* Zaragoza, Oct. 1985.
74. GENTILE, G.: La leucosi bovina enzoótica. *Atti Giornata studio Leucosi Bovina Enzootica.* Brescia, maig 1981. 13-26.

75. GENTILE, G., RUTILI, R., FERRARI, G.: Preliminari indagini sierologiche sulla presenza della leucosi bovina in allevamenti dell'Emilia. *Clin. Vet.* 103, 128-131 (1980).
76. GENTILE, G., RUTILI, R., ROSMINI, R., FERRARI, G.: Trasmissione sperimentale della leucosi bovina agli ovini. *Clin. Vet.* 103, 143-145 (1980).
77. GENTILE, G., RUTILI, R., FERRARI, G., CINOTTI, S.: Trasmissione sperimentale in serie deie BLV (bovine leukemia virus) in ovini. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 35, 510-511 (1981).
78. GENTILE, G., BERGAMINI, P.F., STEFANI, N.: Comportamento della sieropositività per BLV in rapporto all'evento parto. *Atti soc. Ital. Sci. Vet.* 36, 340-342 (1982).
79. GENTILE, G., GRASSELLI, A., GIORDANI, L., BERNOCCHI, G.: Positivita sierologica per BLV ed eventuale rapporto con alcuni parametri produttivi nelle bovine da latte. *Atti Soc. Ital. Buiatr.* 14, 335-336 (1982).
80. GOTZE, R., ROSENBERGER, G., ZIEGERHAGEN, G.: Die Leukose des Rindes. *Mh. Vet.-Med.* 9, 517-526 (1954).
81. GREIG, A.S., CHANDER, S., SANAGH, B., BOUILLANT, A.M.P.: A simple rapid syncytial-inhibition test for antibodies to bovine leukemia virus. *Can. J. Com. Med.* 42, 446-451 (1978).
82. GUPTA, P., FERRER, J.F.: Detection of a precursor of bovine leukemia virus structural proteins in purified virions. *Ann. Rech. Vét.* 9, 619-626 (1978).
83. GUPTA, P., FERRER, J.F.: A critical comparison of the virus neutralization, radioimmunoprecipitation and immunodiffusion test for the serological diagnosis of BLV infection. *Ann. Rech. Vét.* 9, 683-688 (1978).
84. GUPTA, P., FERRER, J.F.: Detection of bovine leukemia virus antigens in urine from naturally infected cattle. *Int. J. Cancer* 25, 663-666 (1980).
85. GUPTA, P., FERRER, J.F.: Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle. *Int. J. Cancer* 28, 179-184 (1981).
86. HOFIREK, B.: The development of antibodies to BLV in a Leukosis cattle herd. IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna. Ed. Straub 1982. 175-188 (1980).
87. HOFIREK, B., JAGOS, P., POLAK, L., RADEMACHER, R., TESAR, A., VAREJKA, F., ZAVADA, J.: Diagnostics of enzootic leukosis in cattle in Czechoslovakia and the methods of its suppression. *Ann. Rech. Vét.* 9, 739-742 (1978).
88. HOLMEN-ANDERSEN, T.: Indirect Hemagglutination test for detection of antibodies against bovine leukemia virus. *Ann. Rech. Vét.* 9, 675-682 (1978).
89. HUGOSON, G., BRATTSTROM, R.: Probable horizontal spread of bovine leukosis virus not followed by secondary disease outbreaks. *Zbl. Vet.-Med. B* 27, 304-313 (1980).
90. HUGOSON, G., WOLD-TROELL, M.: Benefit/cost aspects on voluntary control of bovine leukosis. *Nord. Vet.-Med.* 35, 1-17 (1983).
91. International Working Conference on Bovine Leukemia: Resolution accepted by all scientists attending the conference. Brussels. Oct. 1976.
92. JACOBSEN, K.L., BULL, R.W., MILLER, J.M., HERDT, T.H., KANEENE, J.B.:

- Transmission of the bovine leukemia virus: prevalence of antibodies in precolostral calves. *Preventive Vet. Med.* 1, 265-272 (1983).
93. JACOBSEN, K.L., KANEENE, J.B., MILLER, J.M., BULL, R.W.: Comparison of the commercial agar-gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1430-1433 (1985).
 94. JAZBEC, I., GREGOROVIC, V., SKUSEK, F.: Extent diagnosis and eradication of enzootic bovine leukosis in socialist republic of Slovenia (Yugoslavia). IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 384-396 (1980).
 95. JOHNSTONE, A.C.: Lymphoid leukaemia in a cow. *N Z. Vet. J.* 30, 145-146 (1982).
 96. KAADEN, O.R.: Aktuelle Fragen der Rinderleukoseforschung und -bekämpfung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 87, 41-43 (1980).
 97. KAADEN, O.R., FRENZEL, B.: Eine metode zum Direktnachweis des Rinderleukosevirus. *Forschrit. Vet.-Med.* 30, 184-187 (1980).
 98. KAADEN, O.R., NETH, R., FRENZEL, B.: Sequential studies of bovine leukemia virus antibody development in dairy cattle over a four-year period. *Ann. Rech. Vét.* 9, 771-776 (1978).
 99. KAADEN, O.R., FISCHER, W., MEERMANN, A., LIEBISCH, A.: Transmission of BLV by Ixodes ricinus ticks. IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 348-360 (1980).
 100. KAHRS, R.F.: Bovine leukemia virus. In "Viral diseases of cattle" Iowa State University Press. Ames/Iowa USA. 79-88 (1981).
 101. KAVANAGH, P.J.: Bovine leukosis ist now only a sporadic problem in Ireland. *Can. Vet. J.* 22, 396-397 (1981).
 102. KELLAR, J.A.: The economic impact of enzootic bovine leukosis in Canada. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 93, 879-891 (1981).
 103. KENYON, S.J., GUPTA, P., FERRER, J.F.: Presence of the bovine leukemia virus (BLV) in milk of naturally infected cows. IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 289-298 (1980).
 104. KEYSERLING-EBERIUS, M.F.v.: Untersuchungen zum Verhalten maternaler BLV-Antikörper im Blutserum von Kälbern und ihre Bedeutung in tierseuchenrechtlicher Sicht. *Tesi doctoral Esc. Sup. Vet. Hannover (Alemanya)* 1980.
 105. KIM, D.-H., ICHJO, S., KONISHI, T.: Incidence of lymphocytic nuclear pockets in bovine leukosis observed in Hokkaido. *Jap. J. Vet. Sci.* 45, 407-412 (1983).
 106. KONO, Y., HATAKEYAMA, H., ISHIKAWA, H., SENTSUI, H.: Antibody titers in cattle clinically and subclinically infected with bovine leukemia virus. *Vet. Microbiol.* 6, 167-170 (1981).
 107. KONO, Y., SENTSUI, H., ARAI, K., FUJIGAKI, A., ENOMOTO, CH., IWASAKI, H., ISHIDA, H.: Serological methods to detect calves infected in utero with BLV. *Jap. J. Vet. Sci.* 45, 453-461 (1983).
 108. KONO, Y., SENTSUI, H., ARAI, K., ISHIDA, H., IRISHIO, W.: Contact transmis-

- sion of bovine leukemia virus under insect-free conditions. *Jap. J. Vet. Sci.* 45, 799-802 (1983).
109. Koyama, H., Nakanishi, H., Kalikawa, O., Yoshikawa, H., Tsubaki, S., Yoshikawa, T., Saito, H.: T and B lymphocytes in persistent lymphocitic and leukemic cattle. *Jap. J. Vet. Sci.* 45, 471-475 (1983).
 110. LAGANOVSKII, S.Y., PRIEDNIEKS, O.K., MOZGIS, V.Y., VILYUMSONS, Z.R.: (Humoral and celular factors of immunity in bovine leukosis) *Veterinariya* 5, 32-33 (1983). En *Vet. Bull.* 53, n° 6606 (1983).
 111. LANGE, S., KAADEN, O.R., MOENNING, V., MARSCHALL, H.-J.: Neue Erkenntnisse zur Aetiologie der Hautleukose des Rindes. *Forsch. Vet.-Med.* 35, 301-304 (1982).
 112. LANGSTON, A., FERDINAND, G.A., RUPPNER, R., THEILEN, G.H., DRLICA, S., BEYMER, D.: 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 (1978).
 113. LEHNERT, E.: Grundsätze der Verhütung und Bekämpfung der Rinderleukose in der D.D.R. *Monatsheft. Vet.-Med.* 36, 881-884 (1981).
 114. LEVY, D., DESHAYES, L., PARODI, A.L., LEVY, J.P.: Bovine leukemia virus-specific antibodies in French cattle. III. Prevalence of the BLV gp51 radioimmunoassay for the detection of BLV-infected animals. *Int. J. Cancer* 25, 147-152 (1980).
 115. LIEBERMANN, H., RIEBE, R., GRANZOW, H., LIEBERMANN, H.T.: Zu einige differentialdiagnostischen Aspekten bei der Diagnose der enzootischen Rinderleukose. *Mh. Vet.-Med.* 38, 51-53 (1983).
 116. LIEBERMANN, H.T., DIETZ, G., STARICK, G., SOLISCH, P., KRUSCHKE, P., WITTMANN, W., KLUGE, K.H.: Struktur des virus der enzootischen Rinderleukose. *Arch. Exp. Vet.-Med.* 35, 149-160 (1981).
 117. LORENZ, R.J., STRAUB, O.C.: Versuche ueber die Sensitivitaet und Reproduzierbarkeit des Immunodiffusionstest zur Diagnose der Rinderleukose. *Tieraerztl. Umsch.* 35, 576-592 (1980).
 118. LUCAS, M.H., ROBERTS, D.H.: Transmission of bovine leukosis virus (BLV). IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 264-267 (1980).
 119. LUCAS, M.H., DAWSON, M., CHASEY, D., WIBBERLEY, G., ROBERTS, D.H., SAUNDERS, R.: Enzootic bovine leucosis virus in semen. *Vet. Rec.* 106, 128 (1980).
 120. MAMMERICKX, M.: L'erradication de la leucose bovine enzootique dans les foyets découverts en Belgique; Conditions du succès et raisons des échecs. *Ann. Méd. Vét.* 126, 227-236 (1982).
 121. MAMMERICKX, M., BURNY, A., DEKEGEL, D., GHYSDAEL, J., KETTMANN, R., PORTETELLE, D.: Comparative Study of four diagnostic methods of enzootic bovine leukosis. *Zbl. Vet. Med.* B24, 733-740 (1977).
 122. MAMMERICKX, M., LORENZ, R.M., STRAUB, O.C., DONNELLY, W.J.C., FLENSBURG, J.C., GENTILE, G., MARKSON, L.M., RESSANG, A.A., TAYLOR, S.M.:

- Bovine hematology. III. Comparative breed studies on the leucocyte parameters of several european cattle breeds as determined in the common reference laboratory. *Zbl. Vet.-Med. B* 25, 257-267 (1978).
123. MAMMERICKX, M., BURNY, A., DEKEGEL, D., PORTETELLE, D.: L'épidémiologie de la leucose bovine enzootique: nouvelles perspectives ouvertes par l'étude biochimique du virus BLV. *Ann. Méd. Vét.* 122, 351-360 (1978).
 124. MAMMERICKX, M., CORMANN, A., BURNY, A., DEKEGEL, D., PORTETELLE, D.: Erradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by the gp immunodiffusion test. *Ann. Rech. Vét.* 9, 885-894 (1978).
 125. MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., BURNY, A., LEUNEN, J.: Detection by immunodiffusion -and radioimmunoassay-test of antibodies to bovine leukemia virus antigen in sera of experimentally infected sheep and cattle. *Zbl. Vet.-Med. B* 27, 291-303 (1980).
 126. MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., BRUCK, C., BURNY, A.: Le diagnostic de la leucose bovine enzootique à l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. *Ann. Méd. Vét.* 128, 55-63 (1984).
 127. MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., BURNY, A.: La détection de la leucose bovine enzootique à l'aide d'un test immunoenzymatique (ELISA) effectué sur des mélanges de sérums. *Ann. Méd. Vét.* 128, 203-209 (1984).
 128. MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., NYS, J., BURNY, A.: Le dépistage de masse de la leucose bovine enzootique en Belgique à l'aide d'un test immunoenzymatique (ELISA) effectué sur mélanges de sérums. *Ann. Méd. Vét.* 128, 455-465 (1984).
 129. MANZ, D.: Die Milch als Untersuchungsmaterial fuer die Diagnostik der enzootischen Leukose des Rindes. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 88, 169-171 (1981).
 130. MANZ, D., BAUER, Th.: Ergebnisse serologische Untersuchungen auf enzootische bovine Leukose in Abhaengigkeit vom Stand des staatlichen Bekampfungsverfahrens. *Tieraerztl. Umsch.* 40, 155-160 (1985).
 131. MARCATO, P.S.: *Patologia sistematica veterinaria*. Ed. Edagricole. Bologna (Italia) 1974.
 132. MARIN, C., DE LÓPEZ, N., ALVAREZ, L., LOZANO, O., ESPAÑA, W., CASTAÑOS, H., LEÓN, A.: Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vét.* 9, 743-746 (1978).
 133. MARIN, C., DE LÓPEZ, N., ALVAREZ, L., CASTAÑOS, H., ESPAÑA, W., LEÓN, A., BELLO, A.: Humoral Spontaneous response to bovine leukemia virus infection in zebu, sheep, buffalo and capybara. IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 310-319 (1980).
 134. MARIS, P., NOUGAYREDE, P., PERRIN, G.: (Enzootic bovine leukosis; application of ELISA technique for the detection of antibodies). *Comp. Immun. Microbiol. Infectious Diseases* 6, 45-50 (1983). *En Vet. Bull.* 53, n° 2625 (1983).
 135. MATTHAEUS, W., STRAUB, O.C.: Detection of precipitating antibodies and

- identification of bovine leukemia virus antigens by micro-counter current immunoelectrophoresis. *ZBl. Vet.-Med. B* 27, 61-69 (1980).
136. MATTHAEUS, W., STRAUB, O.C.: Immunoglobulin amounts and leukosis-specific antibodies in colostrum, milk and serum in the periparturient period and their levers in the newborn. IV Int. Symp. Bov. Leuk. Bologna. 1982. Ed. Straub 112-122 (1980).
 137. MCGUIRE, S.J., CASTRO, A.E.: Relationship of the antigens of bovine leukemia virus to clinical enzootic bovine leucosis in cattle. *Bov. Practic.* 18, 179-183 (1983).
 138. MCGUIRE, S.J., CASTRO, A.E., MILLER, L.D.: Diagnosis of clinical leukosis in cattle and its correlation with BLV antigens using the AGID test. *Bov. Practic.* 16, 130-133 (1981).
 139. MEYER, U., SCHILOW, W.F., STARICK, E., KLUGE, K.H., HEIM, F.: Vergleich der Empfindlichkeit des Enzymimmunoassay und des Agargel-Immuno-diffusionstestes fuer die Bestimmung von antikoerper gegen das bovine Leukosevirus. *Arch. Experim. Vet.-Med.* 37, 661-666 (1983).
 140. MILLER, J.M., OLSON, C.: Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma, *J. Nat. Cancer Inst.* 49, 1459-1462 (1972).
 141. MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J.: Use of glicoprotein antigen in the ID test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer* 13, 1369-1375 (1977).
 142. MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J.: Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann. Rech. Vét.* 9, 871-877 (1978).
 143. MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J.: A review of methods to control bovine leukosis. *Proceed. U.S. Animal Health Assoc.* 86, 119-125 (1982).
 144. MILLER, J.M., MILLER, L.D., OLSON, C., GILLETTE, K.G.: Virus like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 1297-1301 (1969).
 145. MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J. PHILLIPS, M.: Studies of a glycoprotein associated with bovine leukemia virus. *Bovine Leukosis, various methods of molecular virology.* Ed. A. Burny. CEC. Luxemburg. 1977. 69-81.
 146. MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F., VAN DER MAATEN, M.J.: Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42, 5-8 (1981).
 147. MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J. SCHMERR, M.J.F.: Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 44, 64-67 (1983).
 148. MILLER, L.D.: Export testing for enzootic bovine leukosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177, 620-622 (1980).
 149. MILLER, L.D., YONES, N.K.: Serological testing for enzootic bovine leukosis in the United States. *Proceed. II Int. Sym. Vet. Laborat. Diagnost. Lucerne* 1980, 50-54.

150. Ministerio de Agricultura: Anuario de estadística agraria 1982. Secretaria Gral. Técnica, Madrid 1983.
151. MODENA, C.M.: Leucose enzootica bovina. Comparação entre métodos de diagnóstico. Evolução sorológica em bezerros, interferência com a vacina anti-febre-aftosa. Arquiv. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais 33, 624-625 (1981).
152. MONGE, a., RODRÍGUEZ, M., CASTAÑO, M., TESOURO, M., GONZÁLEZ, J.L.: Identificación del virus de la leucosis bovina enzoótica en el área de Madrid. I Congreso Nacional Patología Bovina. León. Ed. Sobrino. 159-167 (1982).
153. MUSSGAY, M., KAADEN, O.R.: Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. Curr. Topics Micr. Immunol. 79, 43-72 (1978).
154. MUSSGAY, M., STRAUB, O.C.: Enzootische Rinderleukose. Tieraerztl. Umsch. 35, 748-754 (1980).
155. NEUVONEN, E., EK-KOMMONEN, C., VEIJALAINEN, P.: (Bovine leukosis in Finland 1979-1981). Suomen Eläinlääkärilehti 89, 213-215 (1983). en Vet. Bull. 53, n° 4834 (1983).
156. NOUGAYREDE, P.H., GAYOT, G.: Leucose enzootique bovine: Resultats comparés de la recherche d'anticorps précipitants dans le lait, le lactosérum et le sérum de vaches laitières. Rec. Méd. Vét. 157, 283-286 (1981).
157. NOUGAYREDE, P.H., PELLEN, J.: Leucose bovine enzootique: étude commun de sérums par le test d'immunodiffusion en gélose. Epidémiologie et Santé Animale 2, 11-18 (1982).
158. OHSIMA, K., MORIMOTO, N., YAGAWA, Y., NUMAKUMAI, S., HIRANO, T., KAYANO, H.: A survey for maternal antibodies to bovine leukemia virus (BLV) in calves born to cows infected with BLV. Jap. J. Vet. Sci. 46, 583-586 (1984).
159. OLSON, C.: Progress for control of bovine leukosis. Bov. Pract. 14, 115-120 (1979).
160. OLSON, C., KAJA, R.W.: Influence of colostral antibody on susceptibility of sheep to bovine leukosis virus. IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna. Ed. Straub 1982. 101-111 (1980).
161. ONUMA, M., HONMA, T., MIKAMI, Y., YOSHIKAWA, H., YOSHIKAWA, T.: Survey for antibodies to bovine leukemia virus in dairy and breed cattle in Japan. Jap. J. Vet. Sci. 40, 691-696 (1978).
162. PARFANOVICH, M.I., ZHDANOV, V.M., KOLOMIETS, A.G., NOMM, E.M., SIMOVART, Y.A., BUSEL, V.A., KOLOMIETS, N.D., LAZARENKO, A.A.: Leukogenic properties of purified BLV and possible routes of its transmission with blood cells present in milk. Ann. Rech. Vét. 9, 603-607 (1978).
163. PARFANOVICH, M.I., ZHDANOV, V.M., LAZARENKO, A.A., NOMM, E.M., SIMOVART, Y.A., PARAKIN, V.K., LEMESH, V.M.: The possibility of specific protection against bovine leukemia virus infection and bovine leukemia with inactivated BLV. Br. Vet. J. 139, 137-146 (1983).

164. PARODI, A.L.: Synopsis -Third International symposium on bovine leucosis; Alfort. Ann. Rech. Vét. 9, 603-607. (1978).
165. PARODI, A.L.: Leucose bovine. Bilan de 10 années de travaux virologiques et epidemiologiques conduits par le Groupe d'Etude de la Leucose Bovine (GELB). Rec. Méd. Vét. 160, 1157-1165 (1984).
166. PARODI, A.L., MANET, G., VUILLAUME, A., CRESPEAU, F., TOMA, B., VÉVY, D.: Transplantation embryonnaire et transmission de l'agent de la leucose bovine enzootique. Bull. Acad. Vét. Fr. 56, 183-189 (1983).
167. PARODI, A.L., MANET, G., PICAT, D., CRESPEAU, F., DUFOUR, B., LHERMINIER, PH.: Transmissibilité du virus de la leucose bovine enzootique au mouton par tatouage à la pince. Bull. Acad. Vét. Fr. 57, 409-415 (1984).
168. PARODI, A.L., PICAT, D., DUFOUR, B., MANET, G., LHERMINIER, PH., CRESPEAU, F., YURARD, H.: Transmission du virus de la leucose bovine (LEB) par tatouage a la pince. Bull. Acad. Vét. Fr. 58, 389-396 (1985).
170. PIPER, C.E., FERRER, J.F., ABT, D.A., NARSHAK, R.R.: Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. J. Natl. Cancer Inst. 62, 165-168 (1979).
171. POLI, G., POZZA, O., PONTI, W., BALSARI, A., VACIRCA, G.: Application of counterimmunoelectrophoresis for a rapid serodiagnosis of enzootic bovine leukosis. Br. Vet. J. 136, 251-255 (1980).
172. PORTETELLE, D., MAMMERICKX, M., CLEUTER, Y., LEUNEN, J., BURNY, A.: BLV gp-51-specific antibodies in cattle and sheep. Studies and applications of the BLV gp-51 Radioimmunoassay. Arch. Int. Physiol. Bioch. 88, B-202 (1980).
173. PORTETELLE, D., BRUCK, C., MAMMERICKX, M., BURNY, A.: Use of monoclonal antibody in a ELISA test for the detection of antibodies of bovine leukemia virus. J. Virol. Meth. 6, 19-29 (1983).
174. PREVOST, PH.: Contribution a l'étude du dépistage de la leucose bovine enzootique par le test ELISA sur le lait. Tesi Doctoral. Esc. Nat. Vet. Alfort (França) (1984).
175. REED, V.I.: Enzootic bovine leukosis. Can. Vet. J. 22, 95-102 (1981).
176. RESSANG, A.A., GIELKENS, A.L.P., QUAK, S., MASTERBROEK, N., TUPPERT, C., DE CASTRO, A.: Studies on bovine leukosis. VI. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. Ann. Rech. Vét. 9, 663-666 (1978).
177. RESSANG, A.A., RUMAWAS, W., RONDHUIS, P.R., HAAGSMA, S., BERCOVICH, S.: Studies on bovine leukosis. VIII. The serologic response of leukotic cattle to injections with Aujeszky's disease and Bordetella vaccines, tetanus toxoid and porcine erythrocytes. The cutaneous reaction following affect of pokeweed and phytohaemagglutinin stimulation on leukotic lymphocytes. Zbl. Vet.-Med. B 27, 576-588 (1980).
178. RESSANG, A.A., GIELKENS, A.L.P., QUAK, S., MASTERBROEK, N.: Studies on bovine leukosis. VII. Further experience with ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. Vet. Q. 3, 31-33 (1981).

179. ROBERTS, D.H., BUSHNELL, S.: Herd eradication of enzootic bovine leukosis. *Vet. Rec.* 110, 487 (1982).
180. ROBERTS, D.H., LUCAS, M.H., WIBBERLEY, G., CHASEY, D.: An investigation into the susceptibility of cattle to bovine leukosis virus following inoculation by various routes. *Vet. Rec.* 110, 222-224 (1982).
181. ROBERTS, D.H., LUCAS, M.H., WIBBERLEY, G., BUSHNELL, S.: Detection of bovine leukosis virus in bronchoalveolar lung washing and nasal secretions. *Vet. Rec.* 111, 501-503 (1982).
182. ROBERTS, D.H., LUCAS, M.H., WIBBERLEY, G., SWALLOW, C.: Infectivity of enzootic bovine leukosis infected animals during the incubation period. *Vet. Rec.* 166, 310-313 (1985).
183. ROLLE, M., MAYR, A.: *Microbiologie, Infections –und Seuchenlehre*. V edició. Ed. Enke. Stuttgart (1984).
184. ROMERO, C.H., ABARACON, D., ROWE, C.A., SILVA, A.G.: Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Rec.* 115, 440-441 (1984).
185. ROSSLER, H., WERNER, Q., DRESCHER, B., WITTMANN, W., VENKEN, P., ROSENTHAL, S.: Ein verbesserter Test zum Nachweis der reverse Transkriptase des Rinderleukosevirus. *Arch. Exp. Vet.-Med.* 34, 595-615 (1980).
186. RUPPNER, R., BEHYMER, D.E., PAUL, S., MILLER, J.M., THEILEN, G.H.: A strategy for control of BLV infection: test and corrective management. *Can. Vet. J.* 24, 192-195 (1983).
187. RUTILI, D., SEVERINI, M., RAMPICHINI, L., TOTOLI, F.: Haematological, serological and electromicroscopical diagnosis of bovine leukemia. I. Preliminary investigation in some herds of Umbria. *Bovine Leukosis: Various Meth. Molec. Virol.* Ed. Burny. CEE Luxembourg. 171-177 (1977).
188. SARSAT, J.P.: Contribution personnelle a l'epidemiologie de la leucose bovine enzootique. *Tesi doctoral. Ecole Nat. Vet. Alfort (França)* (1981).
189. SCHALM, O.W.: The bovine leukocytes. Part IV: Lymphosarcoma. *Bov. Practice* 2, 14-17 (1981).
190. SCHLEGEL, H.L., IRMER, S.: Die Bekämpfung der wichtigsten Rinderseuchen in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 89, 36-39 (1982).
191. SEGEL, C.L., MORGAN, E.: Differential incidence of BLV antibody in yearling herdsmates nursed on milk replacer or pooled sour colostrum. *Bovine Leukosis: Various Meth. Molec. Virol.* Ed. Burny. CEE Luxembourg. 267-269 (1977).
192. SOBIECH, E.: (Serum IgG and IgM in cattle with bovine leukosis). *Zeszyty Naukowe Akad. Rolniczej. Wrocławiu. Weterinaria.* 39, 47-65 (1982). *En Vet. Bull.* 53, n° 2636 (1983).
193. STÖBER, M.: Die klinische Diagnostik der Leukosen des Rindes. *Tjdschr. Diergenesk* 105, 1006-1018 (1980).
194. STÖBER, M.: The clinical picture of the enzootic and sporadic forms of the bovine leukosis. *Bov. Pract.* 16, 119-129 (1981).

195. STRAUB, O.C.: Horizontal transmission studies on enzootic bovine leukosis. *Ann. Rech. Vét.* 9, 809-813 (1978).
196. STRAUB, O.C.: Transmission studies from leukotic cattle to sheep using secretions, excretions, breath and skin scrapings. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna*. Ed. Straub 1982. 299-309 (1980).
197. STRAUB, O.C.: Einfluss der Impfung gegen Maul- und Klauenseuche auf das Ergebnis des Immunodiffusionstestes zum Nachweis präzipitierender Rinderleukosevirus-Antikörper. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 90, 135-137 (1983).
198. STRAUB, O.C., FISCHER, W., FRERKING, H.: Ueber die Zunahme leukosepositiver Reagenten in einem haematologisch negative Rinderbestand. *Tierärztl. Umsch.* 33, 657-661 (1978).
199. SUNEYA, M., ONUMA, M., MIKAMI, T., IZAWA, H.: Humoral and cellular immune responses to BLV infection in sheep. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna*. Ed. Straub 1982. 77-89 (1980).
200. THEILEN, G.H., MADEWELL, B.R.: Leukemia-Sarcoma disease complex. *En Veterinary Cancer Medicine*. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 1979.
201. THEILEN, G.H., MILLER, J.M., HIGGINS, J., RUPPNER, R.N., GARRET, W.: Vaccination against bovine leukemia virus infection. *IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna*. Ed. Straub 1982. 547-560 (1980).
202. THEILEN, G.H., RUPPNER, R., MILLER, J.M.: Vaccination against bovine leukemia virus (BLV). *Proceed. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 277 (1982).
203. THURMOND, M.: Epidemiology of natural transmission of bovine leukemia virus infection (abstract). *Disert. Abstracts Int. B* 43, 1759 (1982).
204. THURMOND, M., BURRIDGE, M. J.: Application of research to control of bovine leukemia virus infection and to exportation of bovine virus-free cattle and semen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1531-1534 (1982).
205. THURMOND, M., CARTER, R.L., PUHR, D.M., BURRIDGE, M.J., MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F., VAN DER MAATEN, M.J.: An epidemiological study of natural in utero infection with BLV. *Can. J. Comp. Med.* 47, 316-319 (1983).
206. TODD, D., ADAIR, B.M., WIBBERLEY, G.: An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet. Rec.* 107, 124-126 (1980).
207. TOMA, B., ELIOT, M., PARODI, A.L.: Epidémiologie, diagnostic et prophylaxie de la leucose bovine enzootique. *Point Vét.* 16, 13-27 (1984).
208. TOMA, B., VUILLAUME, A., MANET, G., DURET, C., ELIOT, M., CRESPEAU, F., CHAIPPUIS, G., PARODI, A.L.: Dépistage de la leucose bovine enzootique par application du test ELISA sur le lait. *Rec. Méd. Vét.* 160, 53-60 (1984).
209. TRAININ, Z., HAIMOVICH, J., UNGAR-WARON, H., MEIRON, R., BARNEA, A.: Some immunological aspects of bovine leukemia. *Bovine Leukosis: Various Meth. Molec. Virol. E. Burny. CEE Luxembourg.* 291-295 (1977).
210. TRAININ, Z., MEIRON, R., GLUKMANN, A.: Comparison between the ID and the immunofluorescence in the diagnosis of bovine leukemia virus. *Ann. Rech. Vét.* 9, 659-662 (1978).

211. TRIAS TORRENT, R.: *Ganaderia vacuna*. El Campo 85, 108-117.
212. TYLER, L.: *Enzootic bovine leucosis*. Vet. Rec. 103, 194-198 (1978).
213. VANDER MAATEN, M.S., MILLER, J.M.: *Susceptibility of cattle to BLV infection by various routes of infection*. En *Advances in Comparative Leukemia Research*. Ed. Bentvelzen i altres. Elsevier, Amsterdam. 1978. 22-32. Citat per Ferrer. Ref. 52.
214. VANDER MAATEN, M.S., MILLER, J.M.: *Sites of in vitro replication of bovine leukemia virus in experimentally infected cattle*. Ann. Rech. Vét. 9, 831-835. (1978).
215. VAN DER MAATEN, M.S., MILLER, J.M.: *Appraisal of control measures for bovine leukosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 175, 1287-1290 (1979).
216. VAN DER MAATEN, M.S., MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F.: *Factors affecting the transmission of BLV from cows to their offspring*. IV Int. Sym. Bov. Leuk. Bologna. Ed. Straub 1982. 225-243 (1980).
217. VANDER MAATEN, M.S., MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F.: *Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves*. Am. J. Vet. Res. 42, 1498-1500 (1980).
218. VANDER MAATEN, M.S., MILLER, J.M., SCHMERR, M.J.F.: *In Utero transmission of bovine leukemia virus*. Am. J. Vet. Res. 42, 1052-1054 (1981).
219. VENKER, P., ROSSLER, H.: *Zur frage moglicher Zusammenhange zwischen der Replication des bovinen Leukaemievirus und der enzootischen Rinderleukose*. Mheft. Vet. Med. 34, 855-860 (1979).
220. VILLOUTA, G., JARA, M.A., CORREA, J., LAGUNAS, M.: *Poblaciones limfocitarias en sangre periférica de bovinos normales y con leucosis linfática enzoótica*. Zbl. Vet.-Med. B 31, 241-247 (1984).
221. VINCENZ, E., WYLER, R.: *Seroepidemiologische Untersuchung über das Vorkommen von enzootischer Bovine Leukose in der Schweiz mittels Agargel-Immunodiffusion und ELISA in Blut- und Milchserum*. Schweiz. Arch. Tierheilk. 127, 185-203 (1985).
222. VOEVODIN, A.F., LAPIN, B.A.: *An improved immunodiffusion test for antibodies to bovine leukemia virus antigens*. Vet. Microbiol. 5, 195-204 (1980).
223. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.: *Enzyme immunoassays in diagnostic medicine*. Bull. World Health Organ. 53, 55-65 (1976).
224. WEBER, A.F., SCHMERR, M.J., SORESENSEN, D.H., BINGHAN, C., POMEROY, K., MILLER, J.M., VANDER MAATEN, M.J.: *Infectivity in sheep of bood lymphocytes from bovine leukemia virus-infected cows with different nuclear pocket prevalences*. Am. J. Vet. Res. 44, 1912-1915 (1983).
225. WERNERY, U., ZIMMERMANN, T.: *Vergleich verschiedener Leukosevirus antigenkomponenten im Immunodiffusionstest zum Nachweis spezifischer Antikoerper im Blutserum und -Plasma*. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 85, 361-365 (1978).
226. WIESNER, E.: *Die Leukose des Rindes*. II Edició. Ed. Gustav Fischer. Jena (RDA). 1967.

227. WILLESMTIH, J.M., STRAUB, O.C. LORENZ, R.J.: Some observations on the epidemiology of bovine virus infection in a large dairy herd. *Res. Vet. Sci.* 28, 10-16 (1980).
228. YOSHIKAWA, T., YAMAMURA, T., HIROYASU, H., OYAMADA, T.: Enzyme histochemical studies on bovine leukemia cells. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46, 541-547 (1984).
229. ZAJAC, V., ALTANER, C.: Diagnosis of bovine leukosis virus infection by solid phase radioimmunoassay for virus antibody. *Neoplasma* 28, 661-668 (1981).

TAULA

I.	INTRODUCCIÓ	9
II.	LES LEUCOSIS DELS ANIMALS	11
III.	LA LEUCOSI BOVINA	13
	III.1. Les formes esporàdiques de leucosi	14
IV.	LA LEUCOSI ENZOÒTICA BOVINA. CARACTERÍSTIQUES GENERALS	17
	IV.1. Etiologia	17
	IV.2. Relació entre el VLB i l'hoste	21
	IV.3. Patogènia	24
	IV.4. Quadre clínic	25
	IV.5. Lesions	29
	IV.6. Transmissió experimental	30
V.	MÈTODES DE DIAGNÒSTIC	33
	V.1. Mètodes directes	33
	V.2. Mètodes serològics	34
	V.3. Mètodes hematològics	43
VI.	EPIDEMIOLOGIA	45
	VI.1. Epidemiologia descriptiva	45
	VI.2. Epidemiologia analítica	47
	VI.3. Sistemes de transmissió naturals	50
VII.	ASPECTES SANITARIS I ECONÒMICS	59
	VII.1. Aspectes sanitaris	59
	VII.2. Aspectes econòmics	60
VIII.	MÈTODES DE LLUITA I DE CONTROL	61
	VIII.1. Principis de la lluita i del control	61
	VIII.2. Mètodes de lluita en altres països	63
	VIII.3. Consideracions per a l'establiment d'un programa de control	65
	VIII.4. Tractament i vacuna	66

IX.	NIVELL D'INFECCIÓ A CATALUNYA	69
	IX.1. Introducció	69
	IX.2. Material i mètode	69
	IX.3. Resultats	73
	IX.4. Discussió	76
X.	COMPARACIÓ DE MÈTODES DIAGNÒSTICS	79
	X.1. Introducció	79
	X.2. Material i mètodes	79
	X.3. Resultats	81
	X.4. Discussió i conclusions	91
	CONCLUSIONS	97
	ANNEXI. Normativa de la Generalitat de Catalunya	99
	ANNEXII. Normativa de l'Estat Espanyol	101
	ANNEXIII. Normativa de la CEE en relació a la leucosi i la seva eradicació	105
	BIBLIOGRAFIA	109

ACABAT D'IMPRIMIR
A ROMARGRAF, S.A.,
DE L'HOSPITALET DE LLOBREGAT,
EL DIA 13 DE JUNY DE 1990

