



ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN GANADO LECHERO

**Collazo, L.; *Sienna, R.; *Inabuenza, O.;
*Guarino, H., Navarro, M.; *Lavarello.*

* Facultad de Veterinaria. † Lab. Inmunología R.N.
+INLACSA.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en establecimientos de la cuenca lechera de Salto, a fin de disponer de información epidemiológica, establecer los factores de riesgo más importantes involucrados en el contagio de la enfermedad y promover medidas de control. Durante 1997-2000 se estudiaron 4 establecimientos con un total de 534 animales de la raza Holando, a los que se realizaron 1231 muestreos sanguíneos. A estas muestras se les efectuaron las siguientes determinaciones: por ELISA: 1231 muestras, por Recuento Leucocitario Total (RLT): 741 muestras, por Recuento leucocitario diferencial (RLD): 215 muestras y por PCR: 86 muestras. Fueron positivos 238 animales (45%) al ELISA, por lo menos en un muestreo. La proporción de animales seropositivos fue significativamente diferente entre los tambos ($p < 0.001$) La media del RLT fue significativamente mayor en las muestras positivas por ELISA ($P < 0.001$) La media del número de linfocitos de las muestras positivas fue mayor a las negativas. ($p < 0.001$). De las muestras que se realizaron PCR 24 % fueron positivas. En suma, los resultados muestran la dinámica de la enfermedad en el tiempo, así como posibilidad de implementar medidas de control basadas en la combinación de estudios serológicos y hematológicos.

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad contagiosa del ganado bovino, producida por un Oncornavirus tipo C (2,6). Como resultado de la infección la mayoría de los animales presentan una seroconversión como única respuesta. La LBE constituye una enfermedad sujeta a control o erradicación en muchos países y puede llegar a constituir una importante barrera comercial (6). El logro de una significativa disminución en la incidencia de la enfermedad, en base a una estrategia de descarte selectivo de aquellos animales potencialmente más peligrosos para el contagio, que estarían representado especialmente por aquellos animales con alteraciones hematológicas y serológicas constituye una alternativa de interés. El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en establecimientos de la cuenca lechera de Salto, a fin de disponer de información epidemiológica, establecer los factores de riesgo más importantes involucrados en el contagio de la enfermedad y promover medidas de control.

MATERIALES Y METODOS

A) Establecimientos y Animales:

El estudio se realizó durante 1997-2000 en 4 establecimientos de la cuenca lechera de Salto. La población estudiada fue de 534 animales, raza Holando comprendiendo 380 vacas, 39 vaquillonas y 115 terneras. A todos los animales se realizaron extracciones de sangre mediante punción de la vena coccígea o yugular. La sangre extraída fue colocada en dos tubos, uno sin anticoagulante para serología y otro con anticoagulante (EDTA) para estudio hematológico. Las muestras una vez identificadas fueron transportadas hasta la Facultad de Veterinaria a temperatura ambiente. Las destinadas a hematología fueron procesadas el mismo día y las destinadas a serología fueron centrifugadas, y los sueros se congelaron a $-20^{\circ}C$ hasta su procesamiento. Durante dos años se recolectaron 1231 muestras de sangre a los 534 animales en forma seriadas según los resultados serológicos y hematológicos distribuidos de la siguiente forma: a 177 animales se muestrearon una sola vez, a 172 animales se realizaron dos muestreos, a 103 se realizaron 3 muestreos, a 37 animales se realizaron 4 muestreos, a 23 animales 5 muestreos y a 23 animales 6 muestreos.

B) Técnicas de laboratorio:

Técnica de ELISA: 1231 muestras fueron analizadas por esta técnica según Guarino y col (1989) utilizando un kit comercial Instituto Pourquier, Mopntpollier, Francia de ELISA indirecto.

Hematología: Se realizó RLT a 741 muestras, según la técnica convencional de contaje en cámara de Neubauer y 215 RLD comprendiendo las muestras que presentaron RLT igual o mayor que 10000, así como un porcentaje representativo de las menor de 10000. El estudio de la morfología de las células de la línea blanca se efectuó en lámina por el método de tinción rápida Laboratorio QCA Tarragona, España, estableciéndose un porcentaje sobre 100 células.

PCR: Se analizaron 86 muestras de sangre entera para extracción de ADN utilizando un kit comercial (Puregene, Genra Inc.). Los ADN extraídos fueron amplificados por la técnica de PCR utilizando secuencias conservadas de la región pol y gag del genoma viral.

C) Análisis estadísticos:

Se realizaron chi cuadrado de homogeneidad de las distribuciones de: a) resultado serológico según categoría, b) resultado serológico según tambo, c) variación de resultado positivo según tambo y un test chi cuadrado de independencia de la distribución del RLT y resultado de ELISA.

Se efectuaron test t de diferencia de medias: a) RLT entre seropositivas y seronegativas, b) RLT entre seropositivas y seronegativas para los recuentos mayores de 10000 leucocitos por mm^3 , c) recuento linfocitario entre positivos y negativos.



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

En todos los test se empleo nivel de significación 0,05. Los restantes resultados fueron presentados en forma solo descriptiva.

RESULTADOS

El resultado del estudio serológico demostró que 238 animales (45%) presentaron en algunos de los muestreos realizados, anticuerpos para el virus de la Leucosis bovina enzoótica.

Se presentó en los 209 animales considerados como positivo, variación en los resultados serológico (en la categoría vacas y vaquillonas). Esto llevo a establecer dos grupos: uno sin variación, aquel grupo que en todos los muestreos fueron positivos y otro grupo con variación, aquel que presentó diferencias (positivo o negativo) en los sucesivos muestreos.

Porcentajes similares a los obtenidos en animales se observaron cuando se analiza el total de las muestras, 585 de las muestras (48%) fueron positivas.

En el estudio de ambas poblaciones se distribuyeron los resultados en base al criterio establecido de RL_{Tn} (normal) y RL_{Ta} (anormal), tomando como base el límite de los 10000 leucocitos /mm³. Como resultado de ello se observa que la frecuencia de muestras con RL_{Ta} significativamente mayor en individuos seropositivos en relación a sus congéneres negativos, lo que ratifica el efecto de la infección por el virus de LBE sobre el hemograma. Con relación a los estudios de PCR se observa una concordancia de resultados con respecto al ELISA del 58% (50/86).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en éste estudio coinciden con los observados por otros autores relacionado a la tasa de infección por el virus de la Leucosis bovina enzoótica en el 45% de los animales estudiados (5). La tasa de infección varió con los diferentes tambos estudiados, 67% en rodeos donde la tasa de prevalencia es más alta que en aquellos que tienen menor prevalencia donde la tasa de infección solo alcanzo el 28% de los animales. Esta relación también fue observada a nivel de muestras. Esto confirma lo descrito por otros autores que la transmisión natural se produce en forma más rápida en establecimientos con alta prevalencia (3). La variabilidad de los resultados serológicas observadas en el 30 % de los casos positivos, permiten confirmar la necesidad de varios muestreos para considerar el animal negativo o positivo. Algunas de estas variaciones puede estar relacionadas a la seroconversion que se presenta un mes antes del parto descripta por numerosos autores (9). La cantidad de animales que presentaron variaciones serológicas fue mayor en el tambo 1 (45%) que en los otros tambos (21%, 30 %, 15 %). Alteraciones hematológicas se observaron relacionadas a la condición serológica de los animales, un 65% de los animales

seropositivos presentaron leucocitosis mayor a 10000 y solo se encontró en un 15 % de los seronegativos. Un RL_T elevado es orientativo en relación con la infección, este adquiere importante significación cuando se asocia al aumento de linfocitos, circunstancia que se observa específicamente en individuos seropositivos.

Los animales con RL_T elevados presentaron una linfocitosis mayor del 60 %, lo que no suceden en los que no presentaron RL_T aumentado.

En lo que refiere a posibles sugerencias para el eventual empleo de la hematología dentro de una estrategia de control, es posible proponer como grupo a prestar especial atención aquel que presenta RL_T superior a 10000 mm³ y más de 69% de linfocitos.

Considerando que la técnica de ELISA detecta anticuerpos y PCR detección viral, no en todos los animales que tienen una respuesta inmune, podemos detectar el virus en sangre circulante. La técnica de PCR, por ser una técnica más sensible detectaría la infección viral antes de la reacción inmunológica de los animales, lo que explicaría la presencia de los tres animales negativos a ELISA y positivos a PCR.

El estudio realizado permitió cumplir con los objetivos propuesto generándose en nuestras condiciones información objetiva y experimental respecto al efecto que produce la LBE en los establecimiento relacionados a la producción lechera, y sirve de base para poder tomar medidas a fin de controlar la enfermedad, ya que quedaron en evidencia en nuestras condiciones factores negativos que están permitiendo que el virus se propague dentro y fuera de un establecimiento. También se demostró la necesidad de la utilización de varias técnicas de diagnóstico para poder determinar los posibles animales diseminadores de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por CSIC, Facultad de Veterinaria Regional Norte Salto-Montevideo e Industrias Lácteas Salteñas (INLACSA)

SUMMARY

The objective was to study the epidemiological dynamic of enzootic bovine leukosis virus (BLV) infection on dairy farms in Salto, Uruguay to establish de most important risk factors involved in the dissemination of the disease and promote BLV control programmes. A total of 534 Holstein cows belonging to four dairy farms, were studied during 1997– 2000. 1231 samples were analysed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), 741 of these samples by LTC (total leucocyte count), 215 samples by LDC (differential leucocyte count) and 86 by PCR. The data showed that 238 (45%) animals were seropositive for ELISA in at least one of the samples. The proportion of seropositive animals was significantly different between the 4 dairy farms $p < 0,001$). The mean of LTC was significantly higher in ELISA positive samples ($p < 0,001$). The mean of total count of lymphocyte in positive samples was higher than in negatives ($p < 0,01$).

**Tabla 1:** Distribución de los animales seropositivos y seronegativos según el tambo

Grupo	TOTAL		TAMBO 1		TAMBO 2		TAMBO 3		TAMBO 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Negativa	296	55	53	33	85	70	78	77	80	52
Positiva	238	45	105	67	37	30	23	23	73	48
TOTAL	534	100	159	100	121	100	101	100	153	100

$\chi^2=60.47$ (P<0.001) La proporción de animales seropositivos difiere significativamente entre los tambos.

Tabla 2: Distribución de los animales seropositivos (pos) y negativos (neg)según categoría y él tambo

Grupo	TOTAL		TAMBO 1		TAMBO 2		TAMBO 3		TAMBO 4	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Vacas y vaquillonas	209	210	88	37	34	59	20	51	67	63
Termeras	29	86	17	17	3	25	3	27	6	17
TOTAL	238	296	105	54	37	84	23	78	73	80

Tabla 3: Distribución de los resultados positivos con y sin variación según él tambo

Grupo	TOTAL		TAMBO 1		TAMBO 2		TAMBO 3		TAMBO 4	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sin variación	146	70	48	55	27	79	14	70	57	85
Con variación	63	30	40	45	7	21	6	30	10	15
TOTAL	209	100	88	100	34	100	20	100	67	100

$\chi^2= 18.65$ (P<0.001) La proporción de animales con variación difiere significativamente entre los tambos.

Tabla 4: Recuento Leucocitario Total según condición serológica

Grupo	Nº de muestras	Media	Desvío st,	Máxima	Mínima
Negativa	139	8142	1766	13500	4500
Positiva	543	9207	3136	19800	3800

t=3.88 (P<0.001) La media de RLT es significativamente mayor en las muestras positivas.

Tabla 5: Nivel de leucocitos en animales con RLTa según condición serológica

Grupo	RLT>10000/mm ³		
	Nº de muestra	Media	Desvío st.
Negativo	21	11121	1044
Positivo	105	14420	3044

t=4.90 (P<0.001) La media de RLT es mayor en las muestras positivas que las negativas.



X Congreso Latinoamericano de Buiatría
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

Tabla 6: Porcentaje de Linfocitos en seropositivos y seronegativos

Grupo	Nº de muestra	Media	Desvío st.	Máxima	Mínima
Negativa	55	57.8	8.67	75	45
Positiva	188	63.43	12.03	95	30

$t=3.25$ ($P<0.001$) Las muestras positivas presentan mayor media de linfocitos que las negativas.

Tabla 7: Distribución de las muestras de PCR según resultado y el tambo

PCR	TOTAL	TAMBO 1	TAMBO 2	TAMBO 3	TAMBO 4
Negativo	65	34	10	4	17
Positivo	21	13	2	3	3
TOTAL	86	47	12	7	20

Tabla 8: Relación de resultado de ELISA y PCR

ELISA	PCR	
	Negativo	Positivo
Negativo	32	3
Positivo	33	18
Total	65	21

24% of all the samples analysed with PCR method were seropositive. Results show the dynamic of BLVV in dairy farms in Salto and the possibility of implementing control methods based on combined serological and haematological studies.

BIBLIOGRFIA

- Batmaz, H.; Carli, K.T.; Kaharaman, M.; Cetin, C.; Kennerman, E. Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet. Rec.* (2):44,1995
- Bendixen, H.J. Bovine enzootic leukosis. *Adv. Vet. Sci.* (10): 129-204, 1965
- Dimmock, C.K.; Chung, y.S.; Mackenzie, A. R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herd. *Austr. Vet.J.*68(7):230-233,1991
- Guarino, H.; Saizar, J.; Sienra, R. Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en El diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. XVII Jorn. Urug. Buiatría, Paysandú (Uruguay) c.c.4:1-7, 1989
- Guarino, H.; Capano, F.; Gil, A. Leucosis Bovina Enzoótica: relevamiento serológico en establecimientos del sur del país. II Jorn. Téc. Fac. Vet. (Montevideo) Nov. 14-16, p.40, 1991
- Johnson, R.; Kaneene J. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. *Veterinary Bulletin* 62,(4): 278-312, 1992
- Kabeya, H.; Ohashi, K.; Onuma, M. Host immune response in the course of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (7):703-708, 2001
- Murtaugh MP, Lin GF, Haggard D, et al: Detection de bovine leukemia virus in cattle by the polymerasa chain reaction. *J. Viral Methods* (33):73-85, 1991.
- Pollari, F.L.; Hopkins, S.G.; DiGiacomo, R.F.; Evermann, J.F. Periparturient transmission of Bovine Leukosis virus in dairy cattle. *Vet. Rec.* 132(8):190-191, 1993
- Thurmond, M.C.; Maden, C.B.; Carter, R.L. Cull rates of dairy cattle with antibodies to leukemia virus. *Cancer Res.* (45):1987-1989, 1985.