

**CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS EN RELACION A LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA EN GANADO LECHERO (Resultados preliminares).**

*Sienna, R. (1). Nuñez, A. (1). Gonzalez, A. (2).
Covatta, M. E. (2). Guarino, H. (1). Morán, C. (3)*

RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una importante enfermedad del ganado, producida por un *Oncomavirus* tipo C. Como resultado de la infección la mayoría de los animales presentan seroconversión como única respuesta. Aproximadamente una tercera parte de los individuos afectados desarrollan alteraciones en los glóbulos blancos, caracterizadas por linfocitosis persistente. Este ensayo tuvo por finalidad evaluar la relación existente entre la infección por LBE y la hematología. La población estudiada correspondió a 122 vacas lecheras, pertenecientes a tres establecimientos de la zona de Villa Rodríguez (depto de San José). El diagnóstico de la enfermedad fue realizado mediante la técnica indirecta de ELISA. El recuento leucocitario total (RLT) y la fórmula leucocitaria (FL) fueron realizados mediante los métodos hematológicos convencionales. La FL sólo fue realizada en aquellas muestras que evidenciaron un RLT superior a 9000 leucocitos/mm³. La prevalencia de la infección resultó muy elevada, ya que 59 animales (48%) resultaron positivos al test de ELISA. No se observaron diferencias en el RLT entre los animales seropositivos y seronegativos (9209 vs 8606 leucocitos/mm³). Sin embargo, en los 40 individuos con RLT elevado, -19 seropositivos y 21 seronegativos-, existió una diferencia importante (12595 vs 10629/mm³, $p < 0,03$). El grupo seropositivo presentó un número significativamente mayor de linfocitos en relación al seronegativo (8492 vs 6050/mm³). No se observaron diferencias en los recuentos de neutrófilos, monocitos y eosinófilos entre ambos grupos. Estos resultados son discutidos respecto a la importancia de los individuos seropositivos con alteraciones en el hemograma en relación a la epidemiología de la LBE.

INTRODUCCION

La Leucosis Bovina Enzoótica es una enfermedad infecciosa del ganado producida por un oncomavirus tipo C (6). En la gran mayoría de los bovinos la infección cursa en forma totalmente asintomática, y la única respuesta al agente es la producción de anticuerpos específicos. En aproximadamente la tercera parte de los individuos que seroconvierten se pueden detectar en el tiempo alteraciones hematológicas, caracterizadas especialmente por la existencia de una linfocitosis persistente (LP) (2,5). La subpoblación de linfocitos B es la que se encuentra primordialmente involucrada, aunque también se han reportado alteraciones en los T (12). El desarrollo de tumores linfáticos, que suelen ser linfosarcomas multicéntricos, constituye la consecuencia fatal de la enfermedad, la cuál se verifica sólo en un pequeño porcentaje de los individuos infectados (2,10).

En numerosos países se han implementado campañas de control o erradicación de LBE. En la Unión Europea la campaña de erradicación es obligatoria y se encuentra ya en su etapa final (6). Dinamarca, Austria, Irlanda, Holanda y Suiza ya se han declarado libres, mientras que en Francia, Ale-

mania e Inglaterra los índices de infección están en cifras muy inferiores al 0,1%. Otros países poseen campañas menos radicales, que incluyen limitaciones en las importaciones, declaración voluntaria de predios libres, restricciones en centros de toros, etc.(3,10,11)

Durante muchos años las alteraciones hemáticas fueron consideradas como fase pretumoral de la LBE y constituyeron la base del diagnóstico en los planes de control y erradicación de la enfermedad (10). Las modificaciones en el hemograma de los animales infectados permitió establecer las llamadas claves hematológicas, que en base al recuento leucocitario total y diferencial permitían diferenciar animales negativos, sospechosos y positivos. La más conocida de las claves hematológicas es la de Bendixen (1965), ampliamente utilizada en los programas de erradicación de la LBE en Dinamarca y Alemania en la década del '60. Otras claves hematológicas utilizadas han sido las de Goetze, Seeleman & Heeschen, y Tolle (2).

Con el desarrollo y difusión de las técnicas modernas de diagnóstico de la enfermedad, y especialmente luego de la introducción de la IDGA a partir de los años 70, se pudieron evidenciar las importantes limitaciones de sensibilidad y especificidad de las claves hematológicas (Johnson & Kaneene, 1992). A partir de entonces las alteraciones hematológicas de la leucosis perdieron casi totalmente el interés en la investigación sobre la enfermedad, tanto desde el punto de vista de diagnóstico, epidemiología y control.

Sin embargo en los últimos años se han realizado constataciones experimentales que obligan a conceder una atención creciente respecto a las alteraciones hemáticas resultantes de la infección. Ello es debido a que la expresión del antígeno viral parece ser mucho mayor en individuos infectados que presentan alteraciones hematológicas -linfocitosis-, frente a aquellos que poseen un hemograma normal (6,7,8).

Ello posee una enorme importancia desde el punto de vista epidemiológico, puesto que los individuos con LP representarían una subpoblación clave dentro del rodeo, a la que correspondería la mayor participación en el contagio de la LBE (9). De ser ello así, la eliminación selectiva de los animales positivos con altas cargas infecciosas sería una alternativa mucho más viable que la simple eliminación de todos los seropositivos. Ello en nuestro medio, así como en la gran mayoría de los países, resulta una medida antieconómica e imposible de concretar en la práctica (6,11).

Esta es la hipótesis de trabajo que estamos desarrollando y que asocia serología, hematología y detección del provirus mediante PCR, dentro de la estrategia de estudio de la epidemiología de la LBE en las condiciones propias de la lechería en el Uruguay.

El objetivo de la presente comunicación es ofrecer los primeros resultados serológicos y hematológicos del proyecto de seguimiento de establecimientos lecheros iniciado en marzo del presente año.

1= Docente, Facultad de Veterinaria.

2= Ayudante de Investigación, Facultad de Veterinaria

3= Veterinario de la Regional de V. Rodríguez (Conaprole)



MATERIALES Y METODOS

a. Establecimientos y Animales.

Los materiales proceden de tres establecimientos lecheros localizados en villa Rodríguez (depto de San José). La muestra comprendió un total de 122 vacas Holando pertenecientes al grupo de parición de otoño.

De éstos animales se tomaron muestras de sangre mediante punción yugular sin anticoagulante para serología y con EDTA para hemograma. Los materiales se transportaron a temperatura ambiente hacia la Facultad de Veterinaria y los hemogramas se realizaron en el mismo día. Las muestras para serología fueron centrifugadas y los sueros se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

b. Diagnóstico de laboratorio.

Hematología.

En las 122 muestras con anticoagulante se efectuó Recuento Leucocitario Total (RLT) según la técnica convencional de conteo en cámara de Neubauer. El recuento se efectuó en dos cuadrantes opuestos y el resultado se multiplicó por 100 para expresar el número de leucocitos por mm³. En los 40 animales en los que se evidenció un RLT superior a 9000 se realizó el Recuento Leucocitario Diferencial (RLD) o fórmula leucocitaria. Para ello se utilizó la técnica rápida en lámina mediante kit comercial en base a hexametil-p-rosanilina, xanteno tamponado, tiazina tamponado (*). La lectura se efectuó mediante inmersión a 1000 X, estableciéndose el porcentaje en base al recuento de 100 células de la línea blanca por frotis.

(*) Reactivo Panóptico Rápido Concentrado. Laboratorio QCA Tarragona, España

Serología.

La detección anticuerpos por infección con el virus de la LBE se realizó mediante la técnica indirecta de ELISA (Guarino y col 1989), ateniéndose a las recomendaciones del kit comercial utilizado (**), efectuándose la lectura con un lector automático de microplacas (***). Se consideraron sueros positivos aquellos que a la densidad óptica de 405 nm evidenciaron lecturas superiores a la del suero control positivo correspondiente (límite de positividad).

Análisis Estadístico.

Se efectuó test de t de Student para el análisis estadístico de los diferentes parámetros en los grupos de seropositivos y seronegativos. Se aceptó como límite de significación estadística a $p < 0,05$

RESULTADOS

La tasa de infección fue elevada en la población estudiada, ya que sobre un total de 122 animales se detectaron 59 seropositivos (48%). Al analizar la influencia de la infección sobre el RLT, se observó que no existieron diferencias de significación estadística en el número total de linfocitos entre ambos grupos (Figura 1). Cabe recalcar la mayor dispersión que se constató en el grupo seropositivo, lo que se evidencia por un desvío estándar mayor que en el seronegativo.

Figura 1. Relación entre condición serológica a LBE y recuento leucocitario total (en mm³)

Grupo	nº	Recuento Leucocitario Total	x	s
Seronegativo	63	8.606	±	1.975
Seropositivo	59	9.209	±	3.158

t = 1,25 p = 0,21

En el estudio de los individuos con contajes mayores al límite considerado normal de 9000 leucocitos /mm³ se observa que 21 de ellos perteneció al grupo de seronegativos y los 19 restantes al seropositivo. El RLT se vuelve diferente en ambos grupos, presentando los seropositivos un número significativamente mayor de leucocitos circulantes (Figura 2). En el estudio del hemograma se comprueba que esa diferencia está basada en el número de linfocitos presente, con una diferencia estadística sumamente importante entre ambos grupos. En los demás elementos blancos no se observan variaciones de significación. Cabe destacar las importantes oscilaciones en el número de monocitos, lo que explica el elevado desvío estándar.

Figura 2. Hemograma de los animales con leucocitosis según su condición serológica (x±s /mm³)

Parámetro	Seronegativos	Seropositivos	t	p
Leucocitos	10629+1032	12595+3566	2,32	0,03
Linfocitos	6050+1019	8492+3283	3,11	0,005
Neutrófilos	3488+1292	3120+1651	0,78	n.s.
Eosinófilos	1009+741	943+572	0,32	n.s.
Monocitos	80+99	39+76	0,50	n.s.

(**) Elisa Test Bovine Leucosis Serodiagnosis, Instituto Pourquier, Montpellier, Francia

(***) Multiskan MS Versión 08, Labsystem, Finlandia.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en estos estudios preliminares coinciden con lo observado por otros investigadores respecto a las modificaciones en el hemograma en relación a la infección por el virus de la LBE (1). En tal sentido la leucocitosis no representa una alteración constante en respuesta a la infección, ya que suele aparecer en el 20-30% de los casos (10). Además el incremento de leucocitos puede deberse a muy diversas causas, que en ocasiones pueden ser difícil identificar en condiciones de campo (5).

Paralelamente no resulta simple establecer un número estricto por encima del cuál se consideren los recuentos como francamente patológicos. Tanto es así que, aún con los ajustes por edad, las diferentes claves hematológicas consideren límites superiores muy diferentes. Mas aún, Jain (1993) establece una media de leucocitos en bovinos adultos de 8.000/mm³, pero acepta como rango entre 4.000-12.000, reconociendo una amplia variación dentro de la normalidad.

El incremento de leucocitos totales debido a linfocitosis es una hecho observado y reconocido por los investigadores como una respuesta benigna por parte del huésped en relación a la infección por el virus de la LBE (1,2,6,10).

Los resultados presentados aquí se refieren exclusivamente a linfocitosis, lo que obviamente no es sinónimo de linfocitosis persistente. El seguimiento permitirá establecer en definitiva



si la leucocitosis observada se mantiene como mínimo durante tres meses para confirmar que realmente persiste en el tiempo (5). De cualquier forma mediante el hemograma ha sido posible identificar claramente dos subpoblaciones de seropositivos. Aquellos animales con recuentos elevados presentan un cuadro hematológico cuantitativamente diferente al observado en los negativos. En ellos se supera ampliamente el límite superior del rango de linfocitos postulado por Jain (1995), que es de 7.500 mm³, mientras que en los segundos raramente se alcanzan dicha cifra.

La determinación directa del provirus en las muestras con y sin linfocitosis permitirán cuantificar la expresión viral en las dos subpoblaciones de seropositivos, tal como ha sido planteado por Molloy y col (1994). Los estudios a realizarse en base a la utilización de la técnica de reacción en cadena a la polimerasa (PCR), que constituyen parte fundamental del proyecto actual, permitirán aclarar algunos de estos aspectos claves para caracterizar la transmisión de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores dejan expresa constancia de su agradecimiento hacia las instituciones, establecimientos y personas que colaboran con el proyecto.

SUMMARY

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is an important disease of cattle produced by a Oncornavirus C-type. As a result of the infection most of the animals present seroconversion as unique response. About one third of the infected cattle can develop white blood cell changes, characterized by a persistent lymphocytosis. This study was conducted to evaluate the relationship between EBL infection status and haematology. One hundred and twenty two dairy cows from three farms of Villa Rodríguez (San José) were evaluated. The diagnosis of the infection was performed using a commercial indirect ELISA test. Conventional haematological analysis were used to establish total leukocyte count (TLC) and leukocyte formula (LF). The LF was only performed in cases with more than 9000/mm³ of TLC. The prevalence of the infection was very high, with 59 animals (48%) positive to the ELISA test. No significant differences were observed in TLC between seropositive and seronegative animals (9209 vs 8606 leukocytes/mm³). However in the 40 animals with increased TLC, - 19 seropositives and 21 seronegatives -, an important difference was detected (12595 vs 10629 /mm³, p < 0,03). The seropositive group had a very significantly greater number of lymphocytes related with the negative herdmates (8492 vs 6050 mm³, p < 0,005). No differences were observed in percentage of neutrophils, monocytes or eosinophils between the two groups. These results are discussed in view of the importance of seropositive animals with abnormally high lymphocyte counts on EBL epidemiology.

BIBLIOGRAFIA

1. Batmar, H.; Carli, K.T.; Kahraman, M.; Cetin, C.; Kenneman, E. Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in Turkey. *Vet. Rec.* 136(2):42-44, 1995
2. Bendixen, H.J. Bovine Enzootic Leukosis. *Adv. Vet. Sci.* 10:129-204, 1965
3. Di Giacomo, R.F. The epidemiology and control of Bovine Leukemia virus infection. *Vet. Med.* 87(3):248-257, 1992
4. Guarino, H.; Saizar, J.; Sienna, R. Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA) en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzootica. XVII Jor. Urug. Buiatría, Paysandú (Uruguay). cc. 4: 1-7, 1989
5. Jain, N.C. *Essentials of Veterinary Haematology*. Lea & Febiger. 1993 417p.
6. Johnson, R. & Kaneene, J.B. Bovine Leukemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet. Bull.* 62(4):287-312, 1992
7. Lewin, H.A.; Ming-Che, W.; Nolan, T.J. Stewart, J.A. Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of Bovine Leukemia virus infection. *J. Dairy Sci.* 71(9):2526-2534, 1988
8. Mamerickx, M.; Antoine, O.; Burny, A.; Desmecht, M.; Kerkhofs, P.; Palm, R.; Portetelle, D.; Wellemans, G.; Wyffels, R. Etude des relations entre l'infection par le BLV (Bovine leukaemia virus), la lymphocytose persistante et les infections par d'autres agents infectieux dans un troupeau de bovins. *Ann. Med. Vet.*, 1989, 133, 515-524.
9. Molloy, J.B.; Dimmock, C.K.; Eaves, F.W.; Bruyeres, A.G.; Cowley, J.A.; Ward, W.H. Control of Bovine Leukaemia virus transmission by selective culling of infested cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. *Vet. Microb.* 39:323-333, 1994.
10. Oficina Internacional de Epizootias (OIE). *Enfermedades Animales por Retrovirus: la Leucosis Bovina Enzootica*. 58ª sesión, Paris 14-18 de mayo, 1990 33p.
11. Pelzer, K.D. & Sprecher, D.J. Controlling BLV infection on dairy operations. *Vet. Med.* 88(3):275-281, 1993
12. Williams, D.L.; Ambrosi, G.F.; Davies, W.C. Enumeration of T and B lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle, using monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 49(7):1098-1103, 1988