

ESTUDIO DE LEUCOSIS VIRICA BOVINA EN HATOS LECHEROS DEL VALLE CENTRAL DE COSTA RICA

Luis Rodríguez*
Ramón Esquivel**
Jorge Alvarado***

RESUMEN

Se obtuvieron muestras de sangre de 478 animales en siete hatos lecheros del Valle Central de Costa Rica, donde se sospechaba la presencia de Leucosis Vírica Bovina (L.V.B.). Sobre cada muestra se realizó un hemograma clasificando los animales en: positivos, sospechosos y negativos, según las claves de Götze, Göttingen y por la morfología de los linfocitos. También se realizó la prueba de inmunodifusión en agar gel (G.I.D.). El método hematológico se comparó con el método serológico de inmunodifusión en agar gel (G.I.D.). Además se estudió la relación epidemiológica entre madres e hijas, así como la prevalencia de la enfermedad por edad. En uno de los hatos muestreados, se encontró una prevalencia de 39% por G.I.D., 23% por la clave de Götze, 26% por la clave de Göttingen y 34% por la morfología de los linfocitos.

Se corroboró la existencia de la Leucosis

Vírica Bovina en Costa Rica, presentándose en su forma enzoótica. La prueba de inmunodifusión en agar gel demostró ser un método más exacto, económico y rápido que las clásicas pruebas hematológicas en el diagnóstico de la Leucosis Vírica Bovina.

INTRODUCCION

Los nombres leucosis, linfosarcoma, linfocitosis persistente, linfocitoma y otros, han sido problemáticos durante mucho tiempo. Actualmente se sabe que todos ellos son nombres de diferentes estadios o formas de la enfermedad

* Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina Veterinaria, UNA. Apdo. 86, Heredia, Costa Rica.

** Consorcio Médico Veterinario Pavas, Costa Rica.

*** Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.

causada por el virus B.L.V. (Bovina Leukemia virus).

La primera descripción de leucosis en bovinos, fue hecha en 1878; desde entonces numerosos reportes de la enfermedad han aparecido en muchos países. Esta enfermedad era ya bien conocida en ciertas áreas del este de Alemania y del Báltico antes de la primera guerra mundial. Durante las décadas 30 y 40, se diagnosticó en amplias áreas de Alemania, Suecia y Dinamarca, y después de la segunda guerra mundial se encontró en todos los distritos a lo largo del mar Báltico.

La diseminación parece ser principalmente por el intercambio de animales de cría y actualmente se sabe que este mal se presenta en casi todos los países de Europa. En Norteamérica se sabe que es enzoótica y en América Latina se cree que está diseminada por todos los países debido a la importación de animales de zonas afectadas de Estados Unidos (11).

En Costa Rica, la L.V.B. fue diagnosticada y reportada por primera vez en la Escuela de Medicina Veterinaria en el año 1976, realizándose el diagnóstico en forma clínica, por examen histopatológico y por examen serológico de inmunofluorescencia, en muestras enviadas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería a la Universidad de Pennsylvania*(7). Posteriormente han llegado al Departamento de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, 18 casos, diagnosticados por histopatología como linfoma maligno, provenientes de diferentes zonas del país.

Se ha comprobado en numerosos estudios la etiología vírica de la leucosis (12). El virus

causal es un ARN perteneciente a la familia Retroviridae y del tipo C; sin embargo, varios autores consideran que es morfológicamente diferente a los típicos virus tipo C, ya que su tamaño varía de 90 a 120 nm, presentando un espacio entre núcleo y cápside más ancho que el observado en los virus C de otras especies (8). Su forma es variada, aunque algunas veces parece ser vagamente poligonal, se encuentra en baja cantidad en la sangre de los animales leucósicos y es muy lábil. Se han aislado hasta el momento dos antígenos virales a saber: Una proteína básica con un polipéptido simple que presenta reacción cruzada con antiseros de leucosis ovina y bovina (9). Es un antígeno interno, estable a éter y actualmente designado como p-24 aunque también se le ha llamado p-25 y p-23, de acuerdo a su peso molecular, además se ha identificado un segundo antígeno que es una glicoproteína, la cual se separa de la p-24 por medio de diferentes métodos como la cromatografía de afinidad (8, 9). Se cree que el BLV es idéntico al virus de leucosis ovina debido a que poseen antígenos proteicos en común (p-24) (14).

Clásicamente se ha descrito dos formas de la enfermedad: la del adulto, que puede ser enzoótica o esporádica, y la de animales jóvenes, que puede presentarse bajo la forma tímica o juvenil simple (2). Sin embargo, actualmente se ha visto que ésta y otras formas clínicas de la enfermedad, dependen del estado inmunológico y genético del animal y de la dosis infectante del virus. Al entrar en contacto el virus con el animal, existen varias posibilidades: Que éste sea portador del virus sin presentar ningún síntoma. Esto puede suceder hasta en un 60% de los casos (4); que limite la enfermedad a una linfocitosis persistente, lo cual puede representar la fase subclínica de la forma tumoral o una forma benigna de la enfermedad. Estos animales representan cerca del 30% de los casos (4); y que de-

* PEREZ CH., E. Comunicación personal.

sarrolle la fase tumoral o linfosarcoma. Esto se da en menos del 10^o/o de los casos, y es la forma letal de la enfermedad (4).

Otro aspecto importante de la patogenia es el efecto inmunosupresor de los virus tipo C. Este efecto, reportado por varios autores, se explica por una disminución de las IgM en los animales leucósicos (16). Clásicamente se habla de la existencia de dos tipos de transmisión, a saber: vertical y horizontal. Dentro de la transmisión vertical, se puede hablar de transmisión prenatal, ya sea a través de las gametas (genética o cromosómica), o por vía transplacentaria y posnatal, a través del calostro o leche. Estudios recientes demuestran que aunque existen vías de transmisión vertical, no son tan importantes como las vías de transmisión horizontal (1,5,6). Estas últimas han sido estudiadas a fondo por diferentes autores que han demostrado su importancia (3,5,14). Además existen estudios sobre la transmisión por insectos hematófagos y se han aislado linfocitos infectados con el virus de leucosis bovina de dichos insectos (12).

Con base en todo lo anterior, podemos deducir la importancia de identificar en forma rápida y segura los animales infectados en vista a cualquier programa de control. Los programas de erradicación europeos usaron por mucho tiempo los parámetros hematológicos para el diagnóstico y sacrificio de animales infectados; sin embargo, estos programas fallaron a causa de la baja sensibilidad de estos parámetros. Actualmente usan la inmunodifusión en agar gel. Sin embargo, existen otros métodos más exactos que el G.I.D., tanto serológicos como de diagnóstico directo en cultivos celulares. Estos últimos aunque son de gran exactitud, requieren de personal especializado y equipo adecuado para realizar dichos cultivos celulares. Por lo tanto, quedan las pruebas serológicas como las más adecuadas para cualquier programa de control

dada su exactitud, economía y facilidad de realización. Entre ellas, la de RIA se reporta como la más exacta, siguiéndole G.I.D. (6). En el presente trabajo decidimos usar la G.I.D. por lo simple de la técnica y por el hecho de no requerir equipo sofisticado.

MATERIALES Y METODOS

Se usaron 478 muestras de sangre y sueros de vacas de la raza Holstein provenientes de 7 hatos del Valle Central. Las edades variaron de 1 día a 12 años, siendo en su mayoría animales entre los 0 a 5 años. Todos los animales fueron examinados hematológicamente y algunos lo fueron serológicamente.

Hematología. Las muestras de sangre se tomaron por punción yugular, usando EDTA como anticoagulante. Se usaron las técnicas de rutina para realizar los hemogramas, los cuales se hicieron el mismo día de la toma de la muestra. La interpretación de los resultados fue hecha con base en las tablas de Götze, Göttingen y la morfología de los linfocitos.

Serología. Se llevó a cabo inmunodifusión en gel de agar (G.I.D.), usando Leukassay-B de Laboratorios Pitman-Moore^R. Los sueros se mantuvieron a -20°C hasta la realización de la prueba.

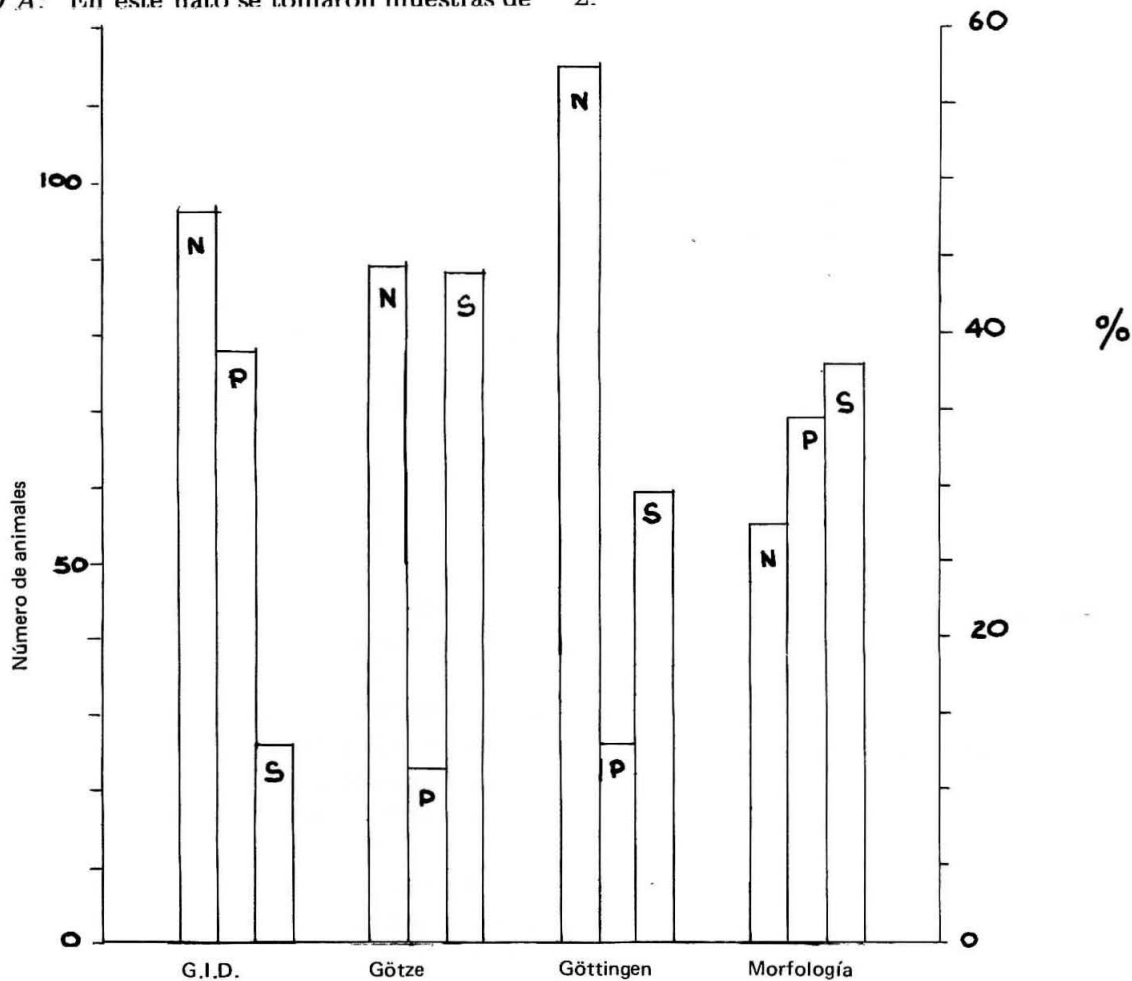
La venipuntura se realizó con agujas 18 x 1 1/2 y jeringas de 12 c.c. De los hatos muestreados, sólo en uno se examinó el total de animales, tanto por hematología como por G.I.D. (hato A); en otro de los hatos se muestreó el total de animales por hematología y 5 animales por G.I.D. (hato B). En el resto de los animales provenientes de diferentes fincas, se realizó la prueba hematológica a 10 y la prueba serológica a 2 animales de cada hato.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los 7 hatos muestreados son los siguientes:

HATO A: En este hato se tomaron muestras de

un total de 200 animales. Los resultados obtenidos por hematología y serología se observan en la figura N° 1. La correlación entre los diferentes parámetros hematológicos con la prueba G.I.D. se puede observar en las tablas 1 y 2.



N = negativos.

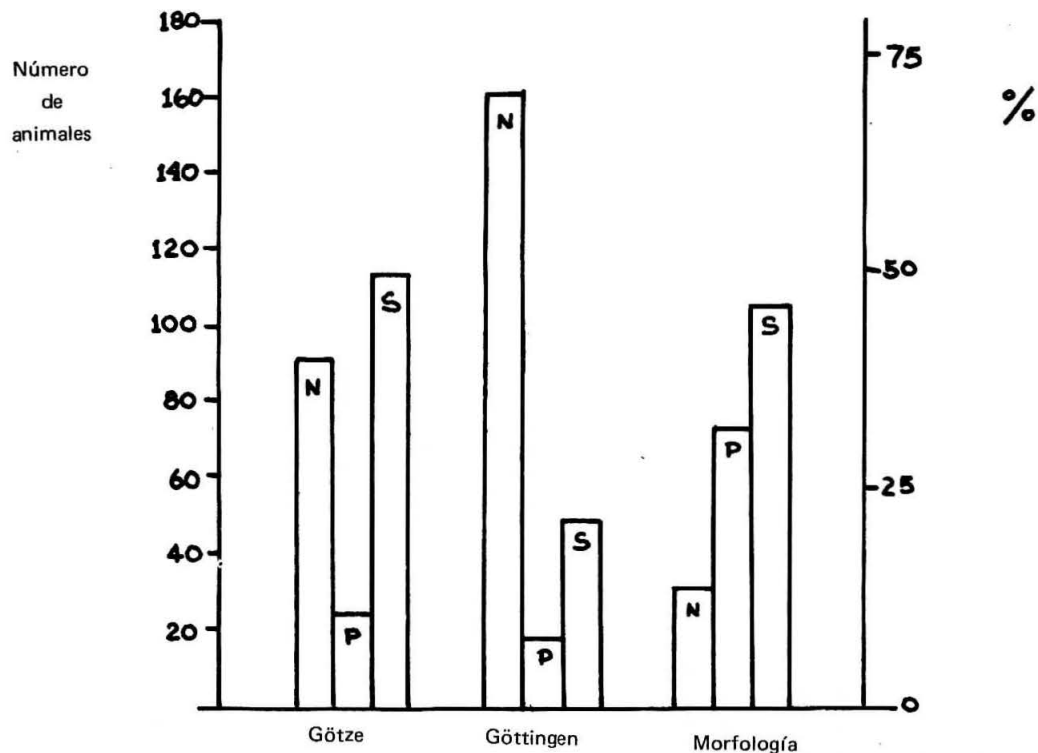
P = positivos.

S = sospechosos.

G.I.D. = inmunodifusión en gel de agar.

Fig. 1.

Resultados obtenidos en el hato A en 200 animales examinados, de acuerdo con la prueba de G.I.D., clave de Göttingen y morfología de los linfocitos. En el eje vertical izquierdo se observa el número de animales y en el derecho el porcentaje que representan en la población de 200.



N = negativos.

P = positivos.

S = sospechosos.

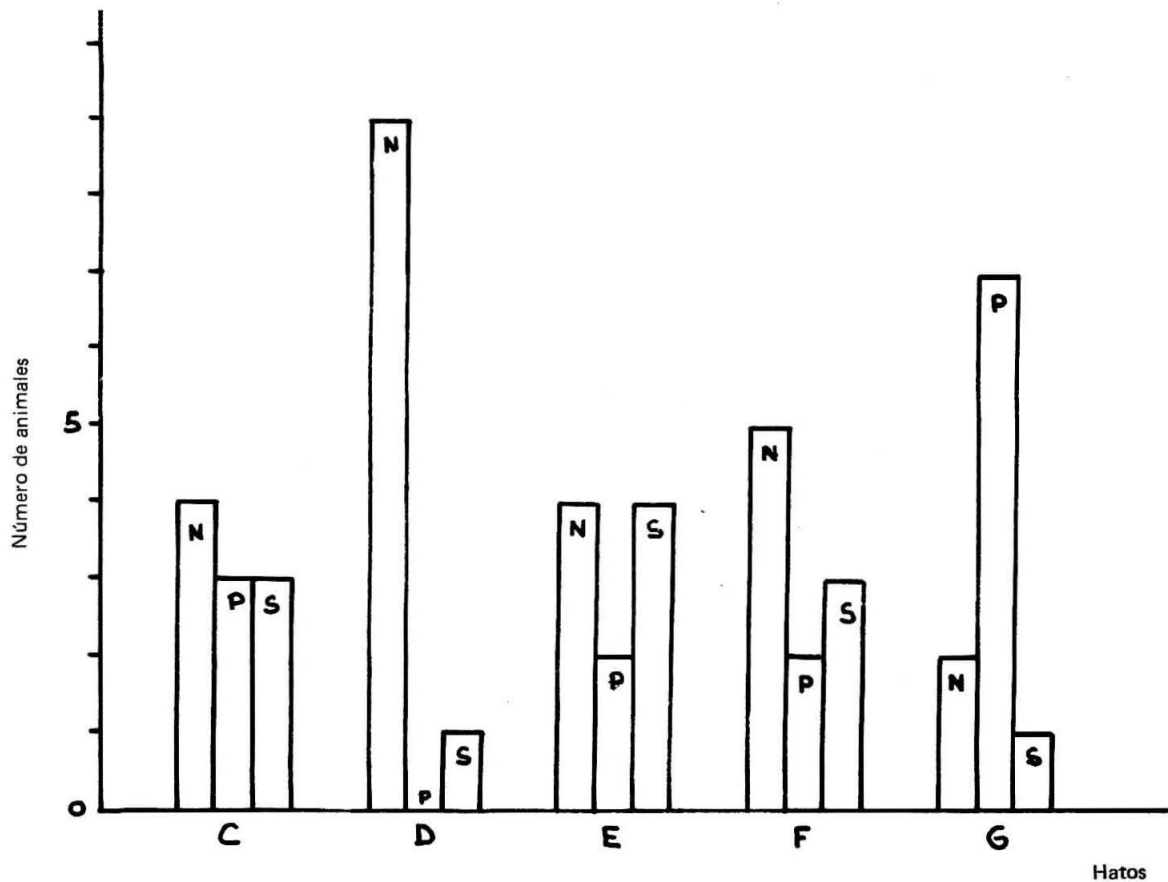
Fig. 2. Resultados obtenidos en el hato B en 228 animales examinados de acuerdo con las pruebas hematológicas de Götze, Göttingen y morfología de los linfocitos. En el eje vertical izquierdo se observa el número de animales y en el derecho el porcentaje con base en 228 animales.

Con el afán de determinar las posibles vías de transmisión, se hizo un estudio epidemiológico comparativo entre madres e hijas, basado en los resultados a la prueba de G.I.D., estos resultados se pueden observar en la tabla 3.

Además, se dividió el total de animales de este hato en grupos por edad desde 0-1 años has-

ta mayores de 8 años, determinándose el número de animales positivos por hematología según el parámetro de Göttingen y por la prueba de G.I.D., observándose los grupos de edad de mayor prevalencia, como se indica en la tabla 4.

HATO B: Se examinaron un total de 228 animales por hematología y 5 de ellos por la prueba



N = negativos.

P = positivos.

S = sospechosos.

Fig. 3. Resultados obtenidos en los hatos C, D, E, F, G, de acuerdo con la prueba hematológica de Göttingen, con base en 10 animales muestreados en cada hato al azar.

de G.I.D. Los resultados obtenidos por hematología se observan en la figura 2 y los 5 animales examinados por G.I.D. resultaron positivos y fueron escogidos entre los positivos al parámetro de Göttingen.

HATOS C, D, E, F, G: Se muestrearon diez animales en cada uno de estos hatos, con el fin de demostrar la posible presencia del virus en esta-

blecimientos pequeños y que presentan condiciones de manejo diferentes al hato A. Los resultados obtenidos por hematología se observan en la figura 3.

Se realizó inmunodifusión a 2 animales de cada hato, escogidos entre los positivos al parámetro de Göttingen, resultando por lo menos un reactor positivo en cada hato.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Hato A: Analizando la figura 1, podemos observar que de un total de 200 animales 78 (39^o/o), fueron positivos por G.I.D., 23 (11.5^o/o) por la tabla de Götze, 26 (13^o/o) por la tabla de Göttingen y 69 (34.5^o/o) por morfología. Dado que la prueba de G.I.D. no da falsos positivos, encontramos que es más específica debido a que en muchos casos hubo animales que presentaron título de anticuerpos detectados por ésta, sin presentar leucocitosis, linfocitosis, ni alteración morfológica de los linfocitos. El caso contrario sucedió en 6 animales, 3 de los cuales presentaron linfocitosis dando la prueba de G.I.D. negativa y otros 3 presentaron linfocitosis con prueba de G.I.D. sospechosa. Esto se explica por el hecho de que la linfocitosis puede ser causada por otra etiología además de la leucosis. La

TABLA 1. COMPARACION DE ANIMALES POSITIVOS A LOS PARAMETROS HEMATOLOGICOS CON RESPECTO A G.I.D.*

Parámetro	Número de positivos	Número de animales positivos al parámetro hematológico y a G.I.D.
Götze	25	15
Göttingen	26	20
Morfología	69	36
G.I.D.	78	

* Inmunodifusión en gel de agar.

morfología, tomando como positivos aquellos animales con más de 4^o/o de linfocitos afectados, pareciera ser un método de diagnóstico muy exacto, dado el alto número de animales positivos que reporta; sin embargo, de los 69 animales positivos a morfología, únicamente 36 lo fueron también a G.I.D. (Tabla 1). Entre los parámetros de Götze y Göttingen, el segundo parece tener mayor correlación con G.I.D., ya que de 26 animales positivos que reporta 20 lo fueron también a G.I.D., mientras que Götze de 23 animales positivos que reporta, sólo 15 de ellos fueron también a G.I.D. (tabla 1).

Mediante el G.I.D. se obtuvieron 26 animales sospechosos, por Götze 88, de los cuales 7 lo fueron también a G.I.D; por Göttingen 59, y 9 lo fueron también a G.I.D. y por morfología 76, y 13 lo fueron también a G.I.D. (Tabla 2). Observamos en esta tabla la gran cantidad de animales sospechosos que reporta la hematología y la poca correlación que guarda con el G.I.D. Esto significa que gran cantidad de animales presentaron leucocitos, linfocitosis o alteraciones morfológicas en sus linfocitos, que los hacían sospechosos; pero el G.I.D. da un número bajo de animales (26 animales) con reacciones débilmente positivas que podrían ser corroboradas con una prueba posterior. En este punto se debe coincidir con varios autores al decir que el método hematológico pierde poder para discriminar casos límites, mientras que el método serológico de G.I.D. define el estado de muchos de estos animales sospechosos (9).

En cuanto al estudio epidemiológico comparativo entre madres e hijas, usando la prueba de G.I.D., observamos que las madres positivas dieron tanto hijas positivas como negativas; mientras que las madres negativas dieron muy pocas hijas positivas y gran cantidad de negativas, como se puede ver en la tabla 3. En este punto, existen dos posibilidades: que las hijas

**TABLA 2. COMPARACION DE ANIMALES
SOSPECHOSOS A LOS PARAMETROS
HEMATOLOGICOS CON RESPECTO A
G.I.D.***

Parámetro	Número de sospechosos	Número de sospechosos al parámetro hematológico y a G.I.D.
Götze	88	7
Göttingen	59	9
Morfología	76	13
G.I.D.	26	—

* Inmunodifusión en gel de agar.

con resultado positivo provenientes de madres positivas reaccionaran al G.I.D. con sus propios anticuerpos o con anticuerpos maternos obtenidos en el calostro; esto último explicaría el hecho de que muy pocas terneras provenientes de madres negativas reaccionaran al G.I.D., ya que en el calostro de las madres negativas no se encuentran anticuerpos contra B.L.V.

Otro dato importante que se puede obtener de esta tabla, es que las cuatro hijas positivas provenientes de madres negativas, son una prueba de la existencia de la transmisión horizontal en animales jóvenes. Varios autores afirman que el calostro y la leche no son tan importantes como vía de transmisión; sin embargo, recomiendan calentar el calostro o leche, proveniente de vacas positivas a 56°C por 30 minutos antes de suministrarla a los terneros para obviar esta posible vía de transmisión (4, 5, 6, 14). Con respecto a la clasificación por grupos de edad, podemos notar que tanto por hematología de acuerdo con el

**TABLA 3. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO COMPARATIVO ENTRE
59 TERNERAS Y SUS RESPECTIVAS MADRES,
DE ACUERDO CON RESULTADO POR G.I.D.***

Madres hijas	Madres positivas	Madres sospechosas	Madres negativas	Total
Hijas positivas	13	0	4	17
Hijas sospechosas	2	2	0	4
Hijas negativas	12	9	17	38
TOTAL	27	11	21	59

* Inmunodifusión en gel de agar.

parámetro de Göttingen, como por G.I.D., el grupo con mayor prevalencia fue el de mayores de 8 años (tabla 4). Esto se explica porque esta enfermedad es de tipo crónico, y mientras más tiempo esté el animal con animales infectados, mayores posibilidades tendrá de contagiarse.

En el grupo de animales de 0-1 año, el 34.5% reaccionó positivamente a G.I.D., no

detectándose alteraciones hematológicas. Esto sugiere que la reacción positiva a G.I.D. es producto de los anticuerpos maternos obtenidos por la ternera a través del calostro. También es importante hacer notar el hecho de que a partir del grupo 2-3 años, empieza a aumentar la prevalencia a ambas pruebas; esto coincide con los reportes de varios autores que afirman que el número de contagios aumenta cuando los animales en-

TABLA 4. NUMERO TOTAL Y % DE ANIMALES POSITIVOS POR GRUPOS DE EDAD, COMPARANDO DIAGNOSTICO SEROLOGICO Y HEMATOLOGICO

Edad	Nº y % en la población		Nº y % de positivos por hematología		Nº y % de positivos por G.I.D.*	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0-1	29	14.5	0	0	10	34.48
1-2	30	15	1	3.33	6	20
2-3	25	12.5	3	12	6	24
3-4	39	19.5	4	10.25	15	38.46
4-5	29	14.5	6	20.68	16	55.17
5-6	10	5	3	30	4	40
6-7	10	5	2	20	6	60
7-8	17	8.5	3	17.64	9	52.94
+ de 8	11	5.5	4	36.36	7	63.63
TOTAL	200	100	26		79	

* Inmunodifusión en gel de agar.

tran en la fase de reproducción, ya que el contacto entre ellos se hace más estrecho, aumentando las posibilidades de transmisión por contacto directo (6, 11).

HATO B: Los resultados hematológicos de este hato, como se puede observar en la figura 2, detectan 7.89% de animales positivos por el parámetro de Göttingen que, como dijimos anteriormente, es el que guarda más correlación con el G.I.D.; esto nos indica que este hato también presenta la enfermedad, lo cual se comprueba con los 5 animales de este hato que fueron examinados por el G.I.D. y dieron resultados positivos.

HATOS C, D, E, F, G. En la figura 3 se observan los resultados hematológicos de acuerdo con el parámetro de Göttingen en 10 animales de cada uno de estos 5 hatos. Se observa que en 4 de ellos, existen animales positivos a este parámetro, a excepción del hato D; sin embargo, en éste, como en los otros 4 hatos, se obtuvo por lo menos un resultado serológico positivo, lo cual demuestra también la presencia de la enfermedad en cada uno de ellos.

Finalmente podemos concluir lo siguiente: la enfermedad parece encontrarse en Costa Rica en su forma enzoótica. El método serológico de G.I.D. demostró ser un método más exacto, económico y rápido que el método hematológico. Además, el G.I.D. permite un diagnóstico más confiable y seguro de la enfermedad. Entre los parámetros hematológicos, el de Göttingen fue el que guardó mayor correlación con el G.I.D. Es imprescindible exigir que los animales importados de países que posean la enfermedad, procedan de hatos libres de ésta, así como también

una prueba serológica con resultado negativo. Es indispensable para nuestro país realizar un estudio amplio, profundo y exhaustivo, donde participen todas las instituciones responsables del control de este problema, como lo son el Ministerio de Agricultura y Ganadería, Ministerio de Salud Pública, instituciones académicas y otras. Dicho estudio debe determinar la situación real y exacta de B.L.V. en Costa Rica y con base en él, se deben tomar medidas sanitarias adecuadas para intentar el control de esta enfermedad.

SUMMARY

Blood samples from a total of 478 (four hundred and seventy eight) dairy cows were collected to detect the presence of B.L.V. in the Central Valley of Costa Rica. An hemogram of each sample was done and classified as positive or negative using the keys of Götze and Göttingen as well as by the morphology of the lymphocytes. Also a serological test by immunodiffusion in agar gel was done.

The hematologic and serologic results were compared, and the relationship between mother and daughter and age prevalence of the disease were studied. A prevalence of 39% by immunodiffusion, of 23% by Götze's key and 34% by lymphocyte morphology was found in one of the sample herds. The study confirmed the presence of the B.L.V. in its tumoral form and its benign or persistent lymphocytosis form. The immunodiffusion was found to be a more exact, economical and faster method to detect the presence of B.L.V. than the hematological methods.

Agradecemos la valiosa colaboración prestada para la realización de este trabajo al personal del Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica), al personal del Laboratorio de Microbiología (Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional), a los Drs.,

Edwin Pérez Chaverri, Manuel Guardia Tinoco, Esteban González G. y Marco A. Podestá; a los señores ganaderos dueños de los hatos muestreados y a todas aquellas personas que en una u otra forma nos ayudaron a llevar a feliz término el presente estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. BAUMGARTENER, L. E., CROWLEY, J., ENTINE, S., ALSON, C., HUGOSON, G., HANSEN, H. J. y DREHER, W. H. Influence of sire on B.V.L. infection in progeny. *Z.B.L. Vet. Med.* **25**: 202-210 (1978).
2. BLOOD, D.C., HENDERSON y J. A., RADOSTITS, D.M. *Veterinary Medicine*. 5 th ed. London, Balliere Tindall, 609-614 (1979).
3. CHARLES, P., ABT, D.A. y FERRER, J. F. Sero-epidemiological evidence for horizontal transmission of bovine C-type virus. *Cancer Res.* **35**: 2714-2716 (1975).
4. FERRER, J. F., MARSHAK, R., ABT, D. A. y KENYON, S. J. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **175**: 705-708 (1979).
5. FERRER, J. F. y PIPER, C. E. An evaluation of the role of milk in the natural transmission of B.L.V. *Ann. Rech. Vet.* **9**: 803-807 (1978).
6. FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **175**: 1281-1286 (1979).
7. GONZALEZ, E. Linfoma: descubren enfermedad mortal en el ganado. *Agro-industria.* **6**: 15-18 (1977).
8. GUILLERMAIN, B., LEVY, D., LASNERET, J., ASTIER, T., BOIRON, M. y PARODI, A. L. Large scale production and concentration of bovine C type virus. *Vet. Microb.* **1**: 185-192 (1976).
9. KAADEN, O. R., DIETZCHOLD, B., FRENZEL, B., MUSSGAY, M., STRAUB, O. C. y WEILAND, F. Isolation fo a precipitating antigen associated with bovine leucosis. *Vet. Microb.* **1**: 121-128 (1976).
10. MAMMERICKX, M., PORTETELLE, D., KETTMANN, R., GHYSDAEL, J., BURNY, A. y DEKEGEL, D. Comparative study of two diagnostic methods of de bovine leukosis: Hematology and inmunodiffusion. *Vet. Microb.* **1**: 203-210 (1976).
11. MARIN, C., DE LOPEZ, N., ALVAREZ LOZANO, O., ESPAÑA, W., CASTAÑOS, H. y LEON, A. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.* **9**: 743-746 (1978).
12. MILLER, J.M., MILLER, L.D. y OLSON, C. Virus like particles in phytohemagglutinin stimulat-

- ed lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Nat. Cancer Inst.* **43**: 1297-1305 (1969).
13. NIELSEN, S. B., PIPER, CH. E. y FERRER, J. F. Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects. *Am. J. Vet. Res.* **38**: 1089-1092 (1978).
14. PAULSEN, J. Comparative studies in bovine and ovine leukosis. *Vet. Microb.* **1**: 211-218 (1976).
15. STRAUB, O.C., LAURENZ, R. J. The influence of colostrum and milk on the development of lymphocytosis in the bovine. *Vet. Microb.* **1**: 327-336 (1976).
16. TRAININ, Z., NOBEL, T. A., KLOPFER, U. y NEWMAN, F. Absence of γ macroglobulin (IgM) in the sera of leukotic cattle and the diagnosis of bovine leukosis. *Refuah.* **25**: 185-187 (1968).
-