

**SEROPREVALENCIA DE LA LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA Y SU ASOCIACIÓN
CON SIGNOS CLÍNICOS Y FACTORES DE RIESGO EN REBAÑOS LECHEROS
DEL ESTADO BARINAS, VENEZUELA**

***Seroprevalence of Enzootic Bovine Leukosis and its Association with Clinical Signs
and Risk Factors in Dairy Herds from Barinas State, Venezuela***

Zoraida Nava^{*1}, César Obando^{**}, Magaly Molina^{**}, Magaly Bracamonte^{**} y Olga Tkachuk^{*}

**Cátedra de Microbiología e Inmunología, Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela. **Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sanidad Animal, Apartado 70, Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela*

Correo-E: zomnav@gmail.com

Recibido: 16/12/10 - Aprobado: 22/07/11

RESUMEN

Se realizó un estudio sobre la seroprevalencia de la leucosis enzoótica bovina (LEB) en 360 bovinos lecheros, representativos de los municipios Pedraza y Barinas del estado Barinas, Venezuela, durante el periodo comprendido entre julio y noviembre 2007. En todos ellos se evaluó la presencia de signos clínicos compatibles con LEB (caquexia, decaimiento, y tumefacciones en los ganglios linfáticos supraescapulares e inguinales superficiales). Se recolectaron muestras de sangre, para la detección de anticuerpos y la proporción de linfocitos, lo cual se hizo mediante la prueba de ELISA y por conteo de linfocitos, respectivamente, relacionándose el porcentaje de animales seropositivos con el hallazgo de signos, tumefacciones en los ganglios y valores linfocíticos. Adicionalmente, se evaluó la seropositividad entre sexos, grupos etarios y número de partos, como factores de riesgo, mediante la prueba de *Chi* cuadrado (X^2). Se detectaron 219 de 360 (60,83%) bovinos con anticuerpos específicos contra el virus de la LEB (VLEB), indicando una prevalencia elevada de distribución uniforme, en ambos municipios. La proporción de animales seropositivos con signos

ABSTRACT

An investigation was conducted to study the seroprevalence of enzootic bovine leukosis (EBL) in dairy cattle from the municipalities of *Pedroza* and *Barinas*, located at the State of *Barinas*, Venezuela, from July to November 2007. A total of 360 dairy cows were used. In all animals, the presence of clinical signs compatible with EBL, such as emaciation, weakness, tumefaction in suprascapular and superficial inguinal lymph nodes, were assessed. Blood samples positive to antibodies against EBLV were collected, specific antibodies to EBLV and lymphocyte proportion in samples were determined through the ELISA test and lymphocyte count, respectively. The percentage of positive animals was related to clinical findings, tumors, and lymphocytes values. Additionally, seropositivity among sex, age groups, and calving number, considered as risk factors, were also analyzed using the Chi square (X^2) test. Of a total of 360 animals, 219 (60.83%) were positive to EBLV antibodies, indicating an elevated prevalence of uniform distribution in both municipalities. The proportion of seropositive animals with clinical signs was slightly higher (33.79%), when compared

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

clínicos resultó ligeramente superior (33,79%) a la de los seronegativos (19,86%), aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos. De igual manera, no se encontraron diferencias entre los seropositivos y seronegativos, en cuanto a las tumefacciones detectadas en los ganglios detectados, indicando que la ausencia de ellas no implica ausencia de infección. Las elevadas proporciones de linfocitos en los bovinos seropositivos y seronegativos resultaron similares, revelando no estar relacionadas con la infección por el VLEB. Con respecto a los factores de riesgo, la edad y el número de partos, mostraron estar asociados con la presencia de anticuerpos ($P=0,0030$ y $P=0,0001$, respectivamente), mientras que para el sexo no se detectaron. Estos resultados representan una contribución al conocimiento del comportamiento de la LEB en Venezuela.

(Palabras clave: Leucosis bovina, seroprevalencia, linfocitosis, factores de riesgo, rebaños, ELISA, Barinas)

to seronegative animals (19.86%), although these values were not statistically significant. Likewise, no differences were found between seropositives and seronegatives regarding tumefaction detected, indicating that absence of such tumefaction does not imply lack of infection. The elevated amount of lymphocytes in both seropositive and seronegative animals was similar, reflecting no relationship with the infection through the EBLV. Concerning risk factors, age and calving number showed to be associated with the presence of antibodies ($P=0.0030$ and $P=0.0001$, respectively). In contrast, such association was not found for the variable sex. These results represent a contribution to the comprehension of EBL behaviour in Venezuela.

(Key words: Bovine leukosis, seroepidemiologic studies, lymphocytosis, risk factors, flocks, ELISA, Barinas)

INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una patología infecciosa, de curso crónico e inaparente, ampliamente distribuida, ocasionada por el virus de la LEB (VLEB), un Deltaretrovirus tipo C oncogénico. Este virus tiene marcado tropismo por los linfocitos B del bovino, donde prolifera trayendo como resultado un animal seropositivo e infectado de por vida (OIE, 2004). Se ha descrito una fase inicial de la enfermedad con seroconversión positiva de anticuerpos (Acs) contra el antígeno (Ag) de superficie del virus, la glicoproteína (gp 51), en la cual no hay manifestación clínica ni linfosarcomatosis (LS) o linfocitosis persistente (LP); posteriormente, el 30% genera LP o LS (Swartz y Levi, 1994).

La transmisión del VLEB ocurre de manera vertical, cuando el becerro ingiere calostro o leche de madres infectadas, y horizontal, a través de artrópodos hematófagos, uso de agujas hipodérmicas, guantes ginecológicos o por contacto directo (Whetstone et al., 1990; Meas et al., 2002).

La seroprevalencia de la enfermedad en bovinos de leche osciló entre 32 y 49% en muchos países (Marín et al., 1978; Martín et al., 2000; Morris et al., 2001; Resoagli et al., 2001; Camargos et al.,

2003), quedando algunos países indemnes para el año 1999, tales como: Dinamarca, Bélgica, Alemania, España y Francia. Estos índices de seropositividad fueron obtenidos por inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ensayo inmunoenzimático (ELISA). Actualmente, estas son las pruebas oficiales más utilizadas para el diagnóstico y vigilancia de LEB (OIE, 2004; SENASA, 2004). Últimamente, se ha empleado una modalidad de reacción en cadena de la polimerasa, que detecta el ADN proviral en linfocitos de ternero, con fines diagnósticos de infección temprana (Felmer et al., 2006).

La importancia del estudio de esta patología radica en el cuantioso impacto económico, por muerte de animales o por decomiso de éstos a nivel de matadero, disminución en la producción de leche, en casos subclínicos y clínicos, segregación prematura de afectados; así como, disminución de la eficiencia reproductiva, imposibilidad de exportar reproductores o semen, por imposición de restricciones comerciales internacionales y el potencial zoonótico del virus (D'angelino et al., 1998; Sandev et al., 2004; Trainin y Brenner, 2005; Ochoa-Cruz et al., 2006). Recientemente, se ha detectado la presencia del antígeno gp 51 en el 7% de las pacientes con carcinoma canicular del seno, como consecuencia

de la ingestión de leche de vacas infectadas con el VLEB, lo que sugiere un potencial zoonótico del mismo (Ochoa-Cruz *et al.*, 2006).

Desde 1968, se fundó el Comité Internacional de Leucosis Bovina para establecer lineamientos para el control y la erradicación, basados en estrategias que incluyen pruebas serológicas, sacrificio, segregación y medidas correctivas de manejo. La inmunoprofilaxis en el campo experimental no ha tenido mucho éxito (Johnson y Kaneene, 1992). En Venezuela, después de 1980, luego de los estudios pioneros de Marín *et al.* (1978), no se han generado estudios de prevalencia, ni de las cepas virales circulantes, que incidan positivamente sobre las políticas de control y erradicación.

Por los antecedentes expuestos, se realizó esta investigación para determinar la seroprevalencia de LEB en los rebaños de los municipios Pedraza y Barinas del estado Barinas, una de las principales zonas ganaderas del país, y para relacionar la seropositividad con la presencia de signos clínicos, tumefacciones en ganglios linfáticos y proporción de linfocitos. Adicionalmente, se evaluó la asociación entre la presencia de anticuerpos específicos contra el virus y algunos factores de riesgo, sexo, edad y número de parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del muestreo, población y muestra

En el presente estudio se aplicó un muestreo por conglomerados o grupos en vacas de ordeño y reproductores, seleccionados al azar y mayores de dos años de edad, provenientes de fincas lecheras de los municipios, Pedraza y Barinas, en el estado Barinas, Venezuela, durante el lapso comprendido entre julio y noviembre de 2007. El diseño se hizo en dos etapas, dos municipios. Dentro de cada municipio se muestrearon fincas y dentro de cada finca se muestrearon animales. La población total de vacas en ordeño y machos reproductores susceptibles de padecer la LEB, se obtuvo de las reseñas de vacunación contra la Fiebre Aftosa del año 2006 e informes contentivos de datos correspondientes al número total de establecimientos ganaderos y población por grupo etario y por municipio (información suministrada por el INSAI Barinas). Adicionalmente, hubo algunos criterios óptimos de selección, a saber: 1. Recolección de muestras

a 10 vacas y un toro por finca lechera, para lograr el procesamiento de datos, utilizando estadística no paramétrica; 2. Escogencia de las fincas con facilidades de acceso; 3. Disposición del propietario o encargado de aportar los animales para muestreo y de suministrar la información epidemiológica que le fuera solicitada en una encuesta. Para lograr este objetivo, se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Barinas e INIA Pedraza; 4. Determinación de una muestra estadísticamente representativa de la población (n), realizando el cálculo de la misma el cual se describe a continuación, tomando en cuenta la población total de susceptibles (N) y la prevalencia estimada (P), con base en la tabla de relaciones modificada por Cannon y Roe (Thrusfield, 1990):

a. Probabilidad estimada de encontrar animales con LEB: 37,5% (P = 37,5%).

b. Error permitido o tolerado de 0,05 (h = ± 5%), es decir, que el valor (%) de LEB no se aleje por encima o por debajo del verdadero valor poblacional.

c. Confiabilidad de los resultados (repetibilidad) del 95% (K = 1,96)

d. Número de vacas en ordeño y toros reproductores (N) en los dos municipios evaluados = 220.468 animales.

e. Probabilidad de no encontrar animales con LEB, q = 62,5%.

f. Esto produjo una muestra de 360 animales, 193 en el municipio 1 y 167 en el 2, distribuidos en seis sesiones de toma de muestras (viajes).

En la determinación del tamaño de la muestra se empleó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{K_2 \cdot N \cdot P \cdot q}{E^2 (N-1) + 4 \cdot P \cdot q} \Rightarrow n = \frac{(1,96)^2 \cdot 220468 \cdot 0,375 \cdot 0,625}{5^2 (220468-1) + (1,96)^2 \cdot 0,375 \cdot 0,625}$$

n = 360

El cálculo del tamaño de la muestra para cada municipio se efectuó como sigue:

$$\text{Pedraza } n = \frac{N_h}{N} \cdot n \Rightarrow n = \frac{118067}{20468} \cdot 360 \Rightarrow n = 193$$

$$\text{Barinas } n = \frac{N_h}{N} \cdot n \Rightarrow n = \frac{102401}{20468} \cdot 360 \Rightarrow n = 167$$

Se recolectaron muestras en 32 fincas escogidas aleatoriamente del listado inicial suministrado, cada una de ellas caracterizada en una base de datos, a razón de 17 en el municipio Pedraza y 15 en el municipio Barinas. En todas las fincas se muestrearon 11 animales/finca, excepto en dos de ellas, ubicadas una en cada municipio, en las cuales se recolectaron muestras en 17 y 13 animales, respectivamente.

Ubicación geográfica del muestreo

La investigación se realizó en los Municipios, Pedraza y Barinas, ubicados en el nor-occidente del estado Barinas, el cual representa a nivel nacional, porcentualmente, uno de los mayores estados ganaderos, a una altitud entre 200 y 600 m.s.n.m., temperatura promedio anual que oscila entre 26°C y 28°C y está conformado por 12 Municipios, distribuidos en 35.000 Km² de superficie (3,84% del total nacional).

Metodología

Toma de muestras

Previo a la recolección de muestras, cada uno de los 360 bovinos fue evaluado para signos clínicos compatibles con LEB y presencia de tumefacciones en los ganglios, mediante examen físico y palpación de los ganglios linfáticos inguinales, superficiales y supraescapulares. El registro de signos y hallazgos a la palpación, así como de los factores de riesgo (sexo, edad y número de partos), se llevó a cabo utilizando una planilla de captura de datos diseñada para tal fin. Posteriormente, se hizo la recolección de sangre, a través de punción de la vena yugular o coccígea, sin anticoagulante, para obtención de suero y con anticoagulante, ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), para realizar conteo de linfocitos, utilizando agujas y tubos estériles al vacío, (*Vacutainer*). Las muestras con anticoagulante fueron homogeneizadas suavemente y mantenidas en refrigeración, para luego proceder a la preparación de extendidos directos y su fijación con metanol, con la finalidad de conservar la morfología celular de los linfocitos y estimar, posteriormente en el laboratorio, el porcentaje de los mismos y su relación con la presencia o no de Acs contra el VLEB. Los extendidos fueron coloreados con Giemsa (*Harleco, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, EUA*), para cuantificar la proporción de linfocitos.

Los tubos sin anticoagulante se mantuvieron una

a dos horas a temperatura ambiente, seguidamente se colocaron en refrigeración hasta obtener los sueros sanguíneos, los cuales se distribuyeron en alícuotas y conservaron a -20°C (congelador vertical, REVCO, EUA), hasta su procesamiento, para determinar presencia de Acs contra el VLEB.

Detección de anticuerpos contra el VLEB

Para la detección de dichos Acs se utilizó un estuche de ELISA comercial (Pourquier PO2120, Francia), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se tomaron 200 µL de las muestras de suero y de los controles, diluidos 1/20, se agregaron por duplicado en pocillos pre-adsorbidos con antígeno de VLEB (columnas pares) y en los pocillos correspondientes a los controles de antígeno (columnas impares), en placas de microtécnica de 96 pozos. Las placas se incubaron a 37°C por una hora y se lavaron tres veces con buffer de lavado. Seguidamente, se añadieron 100 µL de conjugado por pozo, diluido 1/100 en buffer, se incubaron y lavaron tal como se describió anteriormente. Luego, se adicionaron 100 µL de solución sustrato por pozo, se dejó actuar por 20 min a 21°C y se frenó la reacción con 100 µL de solución de frenado. Posteriormente, se realizó la lectura a 450 nm en un espectrofotómetro (ELx800, Biotek Instrument, Inc). Los valores de densidad óptica (DO) de las muestras y sueros controles se corrigieron, restándole a los valores de DO de los pocillos pre-adsorbidos con antígeno (columnas pares), los valores correspondientes de DO de los controles de antígeno (columnas impares). Para hacer la interpretación correspondiente, se calculó para cada muestra el porcentaje de positividad con respecto al control positivo (% S/P), como sigue:

$$\% S/P = \frac{DO \text{ corregida del suero problema}}{DO \text{ corregida control positivo}} \times 100$$

Las muestras de suero con % S/P \geq 115% se consideraron positivas. Las muestras con % S/P entre 85% y 115% se consideraron dudosas y las muestras que resultaron \leq 85% se dieron como negativas.

Finalmente, se evaluó la asociación entre la seropositividad al VLEB y los siguientes factores de riesgo: sexo, edad y número de partos. Para ello, en relación al sexo, se cuantificó el número de bovinos hembras y machos incluidos en el estudio y se determinó la proporción de los mismos que presentaban Acs específicos contra el VLEB, comparando los resultados con la prueba de

Chi cuadrado. En cuanto a la variable edad, se establecieron dos grupos etarios 1-4 y ≥ 5 años, por estar reportado que en animales $>$ de 5 años se observa mayor número de casos clínicos. Se calculó el porcentaje de seropositivos por grupo y los resultados se compararon entre sí, de igual forma a la descrita para el factor edad. El procedimiento fue similar para la variable número de partos, pero se estableció con base al número de ellos (≤ 2 y ≥ 3 partos).

Análisis de datos

El procesamiento estadístico de los datos incluyó el cálculo de los estadígrafos, media, desviación estándar, valor mínimo y máximo, porcentaje, frecuencia y frecuencia acumulada a través de un programa de estadística descriptiva. La asociación entre la positividad al VLEB y los factores de riesgo se analizó mediante la prueba de *Chi*-cuadrado (X^2), ambos procesos contenidos en el paquete estadístico *Statistix* (V7). Además, se usaron tablas de distribución de frecuencia y el gráfico de Caja y Bigotes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de Acs específicos contra el VLEB mediante la técnica de ELISA

Como se observa en la Tabla 1, 219 de los 360 bovinos evaluados resultaron con Acs específicos contra el VLEB. Al considerar la elevada sensibilidad y especificidad del ELISA para leucosis bovina (Martin *et al.*, 2000; Felmer *et al.*, 2006), además de la no aplicación de vacunas contra este agente causal y el resultado de animales seropositivos, éste es indicativo de que existe una elevada prevalencia serológica de LEB en los rebaños lecheros de la zona en estudio (60,83%). Al tomar en cuenta que la población bovina de los municipios Pedraza y Barinas es de 658.330 animales, es decir, el 33, 83% de la población total del estado Barinas (1.945.800 animales) es posible que el VLEB esté difundido en la ganadería del estado con igual magnitud.

Si bien es cierto que la prueba de ELISA es mucho más sensible y específica que el ensayo de IDGA (Simard, *et al.*, 2000; Felmer *et al.*, 2006), es difícil pensar que el incremento de la seroprevalencia sea debido únicamente a la técnica utilizada. De aceptar como cierto que la prevalencia de LEB en Venezuela estaba alrededor de 37,50%, en la década

de los 80, utilizando la prueba de IDGA (Marín *et al.*, 1982), este resultado sugiere que la difusión del virus ha aumentado en un 23,30%, en los rebaños de los municipios Pedraza y Barinas del estado Barinas. Este aumento pudo ser consecuencia de la no aplicación de medidas de control, en particular sobre los mecanismos de diseminación del VLEB (Alfonso *et al.*, 1998; Meas *et al.*, 2002; Kohara *et al.*, 2006), entre los más importantes: el uso de una misma aguja para inoculación o sangrado de varios animales, al igual que de guantes para palpación; así como, la acción de vectores naturales (insectos y mamíferos hematófagos). Además, estos hechos son de suma trascendencia, ya que las investigaciones recientes indican la posibilidad de que la LEB sea una zoonosis (Ochoa-Cruz *et al.*, 2006), siendo un riesgo de infección para los humanos, además del aumento en pérdidas económicas de las explotaciones ganaderas, debido al efecto nocivo de este virus sobre las fincas bovinas (Da *et al.*, 1993; D’angelino *et al.*, 1998).

Un estudio análogo efectuado en Argentina, (Alejo *et al.*, 2000), utilizando la técnica de ELISA en un grupo de muestras de leche, reportó un aumento del índice de animales positivos de 17,50%, con respecto a evaluaciones realizadas previamente, lo cual se acerca al obtenido en el presente monitoreo serológico (23,30%). Otros países de Sur América describen igualmente prevalencias elevadas de LEB; así, en Argentina, se señalan cifras que oscilan entre 52,50% y 89,50% (Alejo *et al.*, 2000) y de 32,53% a 93,93% (Resoagli *et al.*, 2001) en Brasil entre 28,70% y 52,80% (Morris *et al.*, 2001) y en Colombia entre 11,4% y 45,28% (Alfonso *et al.*, 1998; Betancur y Rodas, 2008). Sin embargo, el hecho de que en un país exista una prevalencia elevada del VLEB no implica que puedan existir

Tabla 1. Seropositividad al VLEB por ELISA en bovinos de leche del estado Barinas, durante el año 2007

LEB	Frecuencia		Porcentaje	
	Frecuencia	Porcentaje	Acumulada	Acumulado
0 ¹	141,00	39,17	141,00	39,17
1 ²	219,00	60,83	360,00	100,00

0¹: seronegativo a Leucosis Enzoótica Bovina (LEB)

1²: seropositivo a LEB.

áreas geográficas en las cuales la misma sea baja (VanLeeuwen *et al.*, 2001; Betancur y Rodas, 2008).

En la Tabla 2, se detallan los datos correspondientes a la distribución de animales seropositivos y seronegativos, por municipios y por fincas, observándose que en el municipio Pedraza, 118 de 193 (61,14%) resultaron con Acs, mientras que en el municipio Barinas, hubo 101 de 167 (60,48%) seropositivos, lo cual indica que

Tabla 2. Distribución de la seropositividad frente al VLEB, por municipios y por fincas, mediante ELISA, en bovinos del estado Barinas, 2007

Municipios	Condición	Nº de bovinos	%	Nº de Fincas	%
Pedraza	0 ¹	75	38,86	1	6,00
	1 ²	118	61,14	16	94,00
	Total	193	100,00	17	100,00
Barinas	0	66	39,52	1	7,00
	1	101	60,48	14	93,00
	Total	167	100,00	15	100,00

0¹: seronegativo por ELISA

1²: seropositivo por ELISA

el VLEB está uniformemente distribuido en ambos municipios y en casi la totalidad de las fincas de ambos municipios.

Clínica compatible, hallazgos en la palpación y su asociación con positividad frente al VLEB

El registro de bovinos que resultaron seropositivos y seronegativos a la LEB por ELISA, con relación a la presencia o ausencia de signos compatibles con la enfermedad, tales como: caquexia, decaimiento o ambos, así como a la presencia de tumefacciones ganglionares, se resume en la Tabla 3.

De los 219 bovinos seropositivos, 74 (33,79%) presentaron decaimiento y/o caquexia; 44 con caquexia y 30 con caquexia y decaimiento, mientras que de 141 bovinos seronegativos, 28 (19,86%) presentaron signos clínicos, 11 con caquexia, 1 con decaimiento y 16 con ambos signos, lo cual pareciera sugerir que en animales infectados con el VLEB, la mayoría presenta los signos clínicos descritos. Sin embargo, es de resaltar que al menos el 25% de los datos procesados, por condición evaluada, tanto para signos clínicos como para las tumefacciones en los

ganglios, es menor de cinco, limitando la validez de la prueba estadística. Además, hay que considerar que los signos clínicos descritos, como compatibles con la presencia del VLEB, son muy generales, pudiendo estar presentes en distintas patologías que no tienen ninguna relación con la leucosis. En consecuencia, estas observaciones clínicas no pueden ser correlacionadas con la seropositividad frente a LEB, puesto que debe incluirse otro tipo de diagnóstico para corroborar tal correlación.

En relación a las tumefacciones en los ganglios, en los bovinos seropositivos en 22 de 219 (10,4%) se evidenció la presencia del aumento de volumen correspondiente, dos en la región supraescapular; 14 en la región inguinal superficial y seis en ambas regiones, mientras que solo nueve (6,82%) de los bovinos seronegativos mostraron tumefacción en los ganglios, uno en supraescapulares, seis en ganglios inguinales superficiales y dos en ambos, cifras que no difieren significativamente al comparar animales seropositivos con seronegativos.

El bajo número de animales con LEB en su forma clínica, y que presentan tumoraciones LS, es similar a lo reportado para esta enfermedad, de hasta un 10%, lo cual es debido a que estos casos se presentan sólo cuando los animales tienen una edad avanzada y mueren súbitamente al cabo de 2 a 3 semanas, sin que éstos muestren signos previos de enfermedad (Stöber, 1981; Johnson y Kaneene, 1992). Esta forma de presentación es de evolución hiperaguda, debido a la condición de persistencia del virus en las células de defensa afectadas, al prolongado periodo de incubación para generar LS y a las escasas formas clínicas de presentación producidas por el VLEB (Thurmond, 1990).

El diagnóstico presuntivo de LEB en fincas lecheras, se ha basado en la historia clínica de los rebaños, edad de los animales, presencia de signos clínicos compatibles, disminución en la producción de leche y hallazgos histopatológicos a la necropsia (Grimshaw *et al.*, 1979; OIE, 2004; Clerc, 2008). En este sentido, Hungerford (1990) y Chamizo (2005), enfatizan que para efectos del diagnóstico de la LEB es importante tener presente que existe la forma clínica tumoral y la infección subclínica. De igual manera, mencionan que distintos factores pueden jugar un papel significativo en determinar cuáles animales del rebaño infectado van a estar clínicamente afectados, y que los signos clínicos y la duración de la enfermedad,

Tabla 3. Presencia o ausencia de signos clínicos compatibles con LE B y tumefacciones a la palpación en bovinos seropositivos y seronegativos, procedentes del estado Barinas, año 2007

Signos	N° de bovinos				Total	Tumefacciones	N° de bovinos				Total
	con C ¹	con CYD	con D ²	NP ³			con SE ⁴	on SE-IS	con IS ⁵	s NP	
Seropositivos NS ^a	44	30	0	145	219	Seropositivos NS	2	6	14	197	219
%	20,09	13,70	0,00	66,21		%	0,91	2,74	6,39	89,95	
Seronegativos NS	11	16	1	113	141	Seronegativos NS	1	2	6	132	141
%	7,80	11,35	0,71	80,14		%	0,71	1,42	4,26	93,62	

NS^a: no significativo.(p > 0,05) C¹: Caquexia D²: Decaimiento NP³: No presentan signos clínicos o tumefacciones de los ganglios; SE⁴: Supraescapulares IS⁵: Inguinales superficiales

varían de acuerdo al número e importancia de los órganos comprometidos, así como de la velocidad de crecimiento de las tumefacciones en los ganglios.

Por otro lado, a pesar de que el 75-90% de los casos clínicos de LS reportados generan un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos superficiales, éstos pudieran no comprimir o comprometer órganos vitales, tales como abomaso, intestino, nervios, corazón, etc, que estén asociados a la presentación de algún signo clínico (Grimshaw *et al.*, 1979; Stöber, 1981; Johnson y Kaneene, 1992; Swartz y Levi, 1994; SENASA, 2004). Se deduce que, valiéndose únicamente de los signos clínicos y hallazgos por palpación, no se puede establecer un diagnóstico definitivo del problema.

Estos antecedentes confirman que para establecer un diagnóstico de la enfermedad debe hacerse un uso simultáneo de técnicas histopatológicas, virológicas y serológicas (OIE, 2004; SENASA, 2004; Chamizo, 2005).

Recuento de linfocitos y su relación con la seropositividad al VLEB

En la Figura 1, la expresión gráfica de los datos estadísticos de caja y bigotes, se exhiben los resultados de los porcentajes de linfocitos obtenidos por lectura de frotis sanguíneos de 360 bovinos de los municipios del estado Barinas. El porcentaje de linfocitos fue de 83,78 y 81,33 para los municipios Pedraza y Barinas, respectivamente, ubicándose en ambos, una media porcentual de alrededor del 80%, valor que se encuentra por encima de los promedios normales (Rudolph, 1979; Clerc, 2008). Sin embargo, en esta figura, los datos del recuento linfocítico para el

municipio Barinas (2) se muestran uniformemente distribuidos alrededor de la media (80,92%), mientras que en el municipio Pedraza no se observa esta distribución (1), observándose una mayor variabilidad en los porcentajes de linfocitos.

En razón a que no se realizó conteo absoluto de leucocitos en los bovinos evaluados y a que el recuento de linfocitos se hizo sobre una sola muestra de sangre por animal, no en tres oportunidades consecutivas, como es requerido para poder considerar a un animal con LP (Rudolph, 1979; Marín *et al.*,1977; Clerc, 2008), los resultados no permiten afirmar que los bovinos evaluados presentaban LP. Sin embargo, las proporciones promedio de linfocitos detectadas, alrededor de 80%, aunado a la elevada seropositividad registrada, pudieran ser sugestivas de linfocitosis; particularmente, si se considera que sobrepasan los

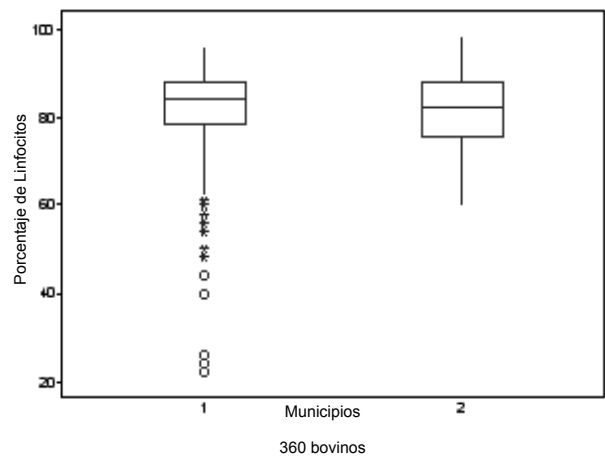


Figura 1. Contaje de linfocitos por frotis sanguíneos en 360 bovinos, en los municipios Pedraza (1) y Barinas (2), del estado Barinas, en el año 2007

valores máximos establecidos en la clave de Gotze o Bendixen (Marín *et al.*, 1977; Ruiz, 1971), para el mayor rango de leucocitosis.

Para facilitar el análisis entre las proporciones de linfocitos y presencia de Acs contra el VLEB, en la Tabla 4 se presentan los porcentajes de linfocitos y la distribución de bovinos seropositivos y seronegativos por municipio; así como la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes de linfocitos obtenidos. En la misma, se observa que las medias y desviaciones estándares para los animales seropositivos y seronegativos al virus, no difieren significativamente, indicando que el aumento de las proporciones de linfocitos en estos animales no está relacionada con la infección por el VLEB.

Estos resultados son indicativos de que el uso de la clave de Gotze, Bendixen o Tolle (Ruiz, 1971; Marín *et al.*, 1977), utilizadas para el diagnóstico indirecto de la LEB, con base a la evaluación hematológica de animales asignados en 2 o 3 grupos etarios, pudieran conducir a resultados poco confiables, ya que infecciones concomitantes pueden incrementar los linfocitos, como por ejemplo: infecciones por Trypanosomas, virus de la diarrea viral bovina, *Mycobacterium avium subs. paratuberculosis* o *Neospora caninum*, entre otros (Marín *et al.*, 1977; VanLeeuwen *et al.*, 2001). Adicionalmente, los valores normales de linfocitos por grupo etario, utilizados para la interpretación de la condición de los resultados obtenidos en las evaluaciones hematológicas, pudieran variar dependiendo de la ubicación geográfica del país estudiado (Ruiz, 1971).

Seroprevalencia del VLEB y su relación con determinados factores de riesgo

En la Tabla 5, se presenta el resultado del estudio de la asociación existente entre los factores de riesgo y la seropositividad frente al VLEB. Los factores de riesgo se describen en el siguiente orden: sexo, edad y número de parto.

Con relación al primero, de un total de 331 sueros de animales hembras y 29 machos, 201 (60,73%) y 18 (62,07%), respectivamente, resultaron con Acs específicos contra el VLEB, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la ocurrencia de infección por el VLEB. Este resultado coincide con lo reportado por Marín *et al.* (1978), Stöber (1981) y Clerc (2008), quienes no encontraron asociación entre sexos y la infección por el VLEB. Contrariamente, Betancur y Rodas (2008) encontraron diferencias significativas entre la seropositividad al VLEB en hembras y machos, 68,6% y 31,4%, respectivamente ($p \leq 0,05$); aduciendo que ello podría deberse a un mayor contacto del macho con hembras infectadas, a través del proceso de la monta natural.

En cuanto a la variable edad, en el grupo etario de 1 a 4 años, 47 de 97 (21,56%), resultaron seropositivos, mientras que el grupo ≥ 5 años, 172 de 262 (65,65%) fueron positivos a la prueba serológica, mostrando diferencias significativas ($P=0,0030$). Este resultado indica que existe asociación entre la edad de los bovinos y la positividad a la infección, es decir, que a mayor edad mayor es la probabilidad de que los animales resulten seropositivos, probablemente debido a que han tenido mayor exposición al virus,

Tabla 4. Distribución de frecuencia de 360 bovinos por seropositividad a LEB, mediante ELISA y por recuento de linfocitos en dos municipios del estado Barinas

Municipio	Condición serológica	N° de animales	Recuento de Linfocitos			Probabilidad ($\alpha = 0,05$)
			Media %	Desviación estándar	Coefficiente de variación	
Pedraza	0 ¹	75	75,21	17,94	23,86	NS ^a (P: 0,6880)
	1 ²	118	83,78	7,88	9,40	
Barinas	0	66	80,32	8,32	10,35	NS (P: 0,8759)
	1	101	81,33	8,17	10,04	

0¹: seronegativo a LEB 1²: seropositivo a LEB. NS^a: no significativo ($p > 0,05$)

Tabla 5. Factores de riesgo y su relación con seropositividad frente al VLEB en 360 animales procedentes de fincas lecheras del estado Barinas, 2007

Factores de Riesgo	N° de seropositivos		Total	Probabilidad ($\alpha = 0,05$)
	(Frecuencia)	Porcentaje		
Sexo				NS ^a (P: 0,8869)
Hembra	201	60,73	331	
Macho	18	62,07	29	
Edad/años ¹				P: 0,0030
1-4	47	21,56	97	
≥ 5	172	65,65	262	
N° partos				P: 0,0001
≤ 2	87	43,28	172	
≥ 3	114	71,70	159	

¹: A un animal no se le registró NS^a: no significativo(p > 0,05)

tal como se ha sugerido en la literatura (Hungerford, 1990; Johnson y Kaneene, 1992; Chamizo, 2005; Betancur y Rodas, 2008; Clerc, 2008).

En cuanto a la variable número de partos, en el grupo de vacas con ≤ 2 partos, 87 de 172 (43,28%), tuvieron Acs específicos contra el VLEB, registrándose en el grupo de vacas de ≥ 3 partos, 114 de 159 (71,70%) seropositivas, reflejando una asociación directa entre el número de partos y la positividad (P=0,0001), resultado similar a lo descrito por Chamizo (2005). Sin embargo, se considera que tal resultado debe estar más relacionado con el factor edad, ya que los animales más adultos son los que tienen mayor número de partos, y han tenido más riesgo de infección.

CONCLUSIONES

La seroprevalencia elevada de LEB (60,83%) sugiere la existencia de una fuerte actividad viral en la zona estudiada. La escasa presencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad y de tumefacciones ganglionares, no es indicativa de ausencia de infección por el VLEB, en otras palabras no hay correlación entre la presencia de la clínica y la infección por el virus. El aumento del porcentaje de linfocitos detectado en la mayoría de los bovinos evaluados, no pareciera estar relacionado con la infección por

el VLEB. La seropositividad al VLEB no está asociada al sexo de los bovinos, mientras que la edad constituye un factor de riesgo.

RECOMENDACIÓN

Es necesario continuar con esta línea de investigación, con el objeto de determinar los subtipos del VLEB circulantes en los rebaños bovinos de Venezuela y aplicar medidas de control, planificadas a corto, mediano y largo plazo, con la participación de instituciones oficiales y privadas que disminuyan los índices de prevalencia, aspectos éstos que son importantes para la implementación de un programa de vigilancia y prevención de esta enfermedad, actualmente difundida en la ganadería nacional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (UCV), por el apoyo financiero otorgado a través del Proyecto N°. PI 11-00-6776-2007-1, al Prof. Jorge Flores de la Cátedra de Estadística de la Facultad de Agronomía de la UCV, por el análisis de los datos, al Dr. Carlos Marín de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV por el aporte de referencias bibliográficas y a los ganaderos, propietarios de 32 fincas, quienes facilitaron los animales para realizar esta investigación.

REFERENCIAS

- Alejo, D.; Gutiérrez, S.; Dolcini, G.; Esteban, E.; Odeón, A.; Fernández Sainz, I.; Casaro, A. 2000. Prevalencia de la infección por el virus de la Leucosis Bovina (BLV) en tambos de los partidos de General Pueyrredón y Balarce. *Rev. Arg. Prod. An.*, 20: 77-83.
- Alfonso, R.; Almansa, J.E.; Barrera, J.C. 1998. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los valles de Ubate y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epz.*, 17:723-32.
- Betancur, C.; Rodas, J. 2008. Seroprevalencia del virus de la Leucosis Viral Bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev. MVZ. Córdoba*, 13:1197-1204.
- Camargos, M.; Stancek, D.; Lessa M.S.; Reis, J.K.;

- Rocha, M.A.; Leite R.C. 2003. Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase e comparação com a imunodifusão em gel de agar na detecção de infecções pelo vírus da leucemia bovina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 40:341-348.
- Chamizo, E. 2005. Enzootic Bovine Leukosis: a review. *Revista electrónica Veterinaria, REDVET*. VI. [en línea]. Dirección URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html>. [Consulta: 12 de Nov. 2006].
- Clerc, K. 2008. Estudio Retrospectivo de la Leucosis bovina en la Estación Experimental "Santa María", FCV-UCV. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor agregado, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela. 75 p.
- Da, Y.; Shanks, R.; Stewart, J.A.; Lewis, H.A. 1993. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:6338-6341.
- D'angelino, J.L.; Garcia, M.; Birgel, E.H. 1998. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *J. Dairy. Res.*, 65:693-695.
- Felmer, R.; Zuniga, J.; Recabal, M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.*, 38:137-141.
- Grimshaw, W.T.R.; Wiseman, A.; Petrie, L.; Selman, L.E. 1979. Bovine Leukosis (Lymphosarcoma): a clinical study of 60 pathologically confirmed cases. *Vet. Rec.*, 105:267-172.
- Hungerford, T.G. 1990. Enzootic Bovine Leucosis (EBL). En: *Diseases of livestock*. Editorial Mc Graw Hill, USA. pp. 474-484.
- Johnson, R.; Kaneene, J. 1992. Bovine Leukemia virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet. Bull.*, 62:287-312.
- Kohara, J.; Konnai, S.; Onuma, M. 2006. Experimental transmission of bovine leukemia virus cattle via rectal palpation. *Jpn. J. Vet. Res.*, 54:25-30.
- Marín, C. 1977. La leucosis bovina en Venezuela. En: memorias del Primer Simposium Internacional sobre Leucosis Bovina. Caracas, Venezuela. pp. 83-89.
- Marín, C.; De López, N.; Lozano, O.; Palencia, L.; España, W.; Castaños, H.; León, A. 1978. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.*, 9:743-746.
- Marín, C.; De López, N.; De Álvarez, L.; Castaños, H.; España, W.; León, A.; Bello, A. 1982. Humoral spontaneous response to bovine leukaemia virus infection in Zebu, sheep, buffalo and capybara. En: *Fourth International Symposium on Bovine Leukosis. Curr. Topics Vet. Med. Ani. Sci.*, 15:310.
- Martín, A.; Arjona, I.; Soto, N.; Barquero, M.; Viana, L.; Gómez, L. 2000. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine Leukaemia virus. *J. Vet. Med.*, B.2:97-106.
- Meas, S.; Isui, T.; Ohaschi, K.; Sugimoto, C.; Onuma, M. 2002. Vertical transmission bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. *Vet. Microbiol.*, 84:275-282.
- Morris, W.; Robles, C.A.; Gutiérrez, S.E.; Farrat, G.J.; Petray, S.; Cabrera, R.; Rodríguez, N.; Esteban, E.N. 2001. Relevamiento serológico de la infección por el virus de Leucosis bovina en la Patagonia. *Rev. Med. Vet.*, 82:271-272.
- Ochoa-Cruz, A.; Uribe, A.; Gutiérrez, M. 2006. Estudio del potencial zoonótico del virus de la Leucosis Enzoótica Bovina y su presencia en los casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias de la Universidad Pontificia Javeriana*, 11:31-40.
- OIE (Organización Internacional de Epizootias). 2004. Manual de pruebas estándar para el diagnóstico y vacunas. Capítulo 2, 3 y 4, Leucosis Bovina Enzoótica. pp. 503-513.
- Resoagli, J.P.; Jacobo, R.A.; Storani, C.A.; Cipolini, M.F.; Stamatti, G.M.; Deco, M.E.; Alfonso, D.I. 2001. Seroprevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en rodeos de cría de la Provincia de Corrientes. *Rev. Med. Vet.* 82:71-73.
- Rudolph, W. 1979. Leucosis linfática enzoótica del bovino. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 1:37-53 p.
- Ruiz, C. 1971. Leucosis Enzoótica de los Bovinos a través de la Oficina Internacional de Epizootias. *Rev. Vet. Ven.*, 30:94-135.
- Sandev, N.; Koleva, M.; Binev, R.; Ilieva, D. 2004. Influence of enzootic bovine leucosis upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Vet. Arch.*, 74:411-416.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad). 2004. Manual de procedimientos para Leucosis Bovina Enzoótica. Dirección de Luchas Sanitarias. Argentina. 25 p.
- Simard, C.; Richardson, S.; Dixon, P.; Belanger, C.; Maxwell, P. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.*, 64:101-106.
- Stöber, M. 1981. The clinical picture of the enzootic and sporadic forms of bovine leukosis. *The bovine*

- Practitioner*, 16:119-129.
- Swartz, I.; Levi, D. 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Res.*, 25:521-536.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Segunda edición. Editorial Acribia, España. 339 p.
- Thurmond, M. 1990. Bovine Lymphosarcoma. En: Smith, B. "*Internal Medicine in Large Animals*". Segunda edición. Editorial Mosby, USA. pp. 1237-1242.
- Trainin, Z.; Brenner, J. 2005. Review the direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Isr. J. Vet. Med.*, 60:94-105.
- VanLeeuwen, J.A.; Keefe, G.P.; Tremblay, R.; Power, C.; Wichtel, J.J. 2001. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canadá dairy Cattle. *Can. Vet. J.*, 42:193-198.
- Whetstone, C., M. Van Der Maaten, Black, J. 1990. Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle. *J. Virol.*, 64:3557-3561.