

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico
Veterinario

Trabajo de investigación

**Evaluación de cambios hematológicos en bovinos infectados
con el virus de Leucosis Enzoótica Bovina**

Tello D'Elia, Facundo

37.737.785

Director: Mació, Mauro

Co-Director: Magnano, Gabriel

Río Cuarto - Córdoba

Junio 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: **Evaluación de cambios hematológicos en bovinos infectados con el virus de Leucosis Enzoótica Bovina**

Autor: **Tello D'Elia, Facundo**

DNI: **37.737.785**

Director: **Mació, Mauro**

Co-Director: **Magnano, Gabriel**

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Benzoni, Anabela _____

Sticotti, Erika _____

Mació, Mauro _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en principio, a la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme permitido la posibilidad de estudiar la carrera de medicina veterinaria en una universidad pública y de excelencia.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria y al Consejo Interuniversitario Nacional, por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar mi trabajo final de grado.

A la cátedra de Enfermedades Transmisibles y Tóxicas de los Rumiantes por el espacio y haberme mostrado el cariño y el compromiso con el que ejercen la docencia.

A mis evaluadoras, Erika y Anabela, por la paciencia y la dedicación que me mostraron. Además por haberme enseñado y compartido cosas, de las cuales estoy muy agradecido, para este y otros trabajos.

A Analía Macias por haberme ayudado y enseñado tanto.

Un agradecimiento especial a Mauro Macio y Gabriel Magnano, mi director y co-director, por las posibilidades, la ayuda y el cariño que me han dado en estos años, en lo profesional y en lo afectivo.

A mis padres, por su ayuda y amor incondicional.

Por último, agradecer a mi familia, amigos y amigas por el apoyo y la compañía que me han brindado todo este tiempo.

A todos y todas ustedes, ¡muchas gracias!.

ÍNDICE

Resumen	Pág. III
Introducción	Pág. 1
Generalidades de la enfermedad	Pág. 1
Etiología	Pág. 1
Importancia	Pág. 1
Patogenia	Pág. 2
Figura 1	Pág. 3
Epidemiología	Pág. 3
Síntomas	Pág. 5
Linfocitosis persistente	Pág. 6
Patología macroscópica	Pág. 6
Citología	Pág. 10
Diagnóstico	Pág. 12
Antecedentes	Pág. 12
Leucograma	Pág. 13
Hipótesis	Pág. 14
Objetivos	Pág. 14
Materiales y métodos	Pág. 15
Resultados	Pág. 18
Gráfico 1	Pág. 18
Tabla 1	Pág. 19
Gráfico 2	Pág. 19
Gráfico 3	Pág. 20
Figura 2	Pág. 20
Gráfico 4	Pág. 21
Discusión y conclusiones	Pág. 23
Bibliografía	Pág. 25

RESUMEN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad de carácter enzoótico y de alta transmisibilidad, causada por un virus de la familia retroviridae que afecta a bovinos de todas las edades y genera un alto impacto económico especialmente en la ganadería de leche, por los altos costos en tratamientos sintomáticos, muertes prematuras, reemplazo de animales enfermos, decomisos en frigoríficos, disminución de la producción láctea y restricciones en la exportación (Erskine *et al.*, 2012). Tradicionalmente se estima que un 60 al 70% de los animales infectados sólo expresan anticuerpos; alrededor de un 30% de los infectados presentan linfocitosis persistente (LP) y un 2 al 10% pueden llegar a presentar linfosarcomas. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los cambios en el leucograma de animales naturalmente infectados por el virus de la leucosis bovina (VLB) en bovinos de la raza Holando Argentino. Para ello, se seleccionaron 143 animales de 4 establecimientos lecheros ubicados en las provincias de Córdoba y Santa fe. A los animales muestreados se les extrajo sangre con y sin anticoagulantes para evaluar su leucograma y realizarles una prueba de ELISA indirecto, respectivamente. Se observó que el 100% de los establecimientos presentaban al menos un animal positivo y dentro del total de bovinos muestreados, 120 (84%) estaban infectados. Con respecto al leucograma, de los 120 animales infectados 28 (23%) presentaron linfocitosis, en cambio, en el grupo de los animales no infectados solo 1 (4%) presentó linfocitosis. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una prevalencia de LEB mayor y una proporción de bovinos infectados con linfocitosis menor a lo esperado. Además, estos resultados se basan en una única muestra, por lo que es esperable que de haber repetido el leucograma para corroborar la persistencia de la linfocitosis el porcentaje final sería menor a 23%, debido a que algunos animales pueden estar cursando una linfocitosis debido a causas ajenas a LEB. También, se observó una marcada diferencia en la población leucocitaria y principalmente linfocitaria entre animales infectados y no infectados por VLB. El hecho de que existan animales no infectados por el virus de VLB que presentan linfocitosis y bovinos infectados que no presentan linfocitosis muestra que es importante continuar aportando datos sobre esta enfermedad y su dinámica en las poblaciones leucocitarias.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la enfermedad

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una de las enfermedades neoplásicas más importantes de los bovinos presentándose con mayor frecuencia en animales mayores a 2 años y más en rebaños lecheros que en los de carne (Trono, 2011).

Etiología

La LEB es producida por un virus (virus de la leucemia bovina -VLB-), que pertenece a la familia Retroviridae. Es un delta retrovirus tipo C que afecta principalmente a los linfocitos B (Della Libera *et al.*, 2012), integrando su genoma al de la célula hospedadora, pudiendo alterar la morfología de la célula (Schwartz y Levy, 1994; Murakami *et al.*, 2011).

El virus es muy poco resistente a las influencias exteriores, por lo que tiene escasa viabilidad (menos de cuatro horas fuera del animal). Los rayos ultravioleta, la congelación-descongelación repetidas y la pasteurización inactivan el virus, al igual que los desinfectantes utilizados habitualmente (Orloff *et al.*, 1993).

Importancia

El impacto de la enfermedad radica en la limitación que genera la infección para la exportación de vacunos y la comercialización de semen y embriones, las pérdidas por aumento de los reemplazos, menores ingresos por decomisos de carcasas a causa de los linfomas, disminución de la eficiencia reproductiva y de la producción de leche (Erskine *et al.*, 2012).

Por otro lado se generan pérdidas indirectas, derivadas del efecto del virus en el sistema inmune. Debido a los cambios que se producen en las poblaciones linfocitarias, disminuye la capacidad del animal enfermo de resistir al desarrollo de otras enfermedades, o de generar una inmunidad adecuada post inmunización. Esto fue demostrado en un estudio desarrollado sobre la respuesta a la vacunación con *E. coli* j5 (Erskine *et al.*, 2011); además permite inferir que podría afectar la respuesta a otros inmunógenos. En 2011, Azedo *et al.*, realizó una evaluación funcional *in vitro* de monocitos de bovinos categorizados en infectados por VLB con linfocitosis persistente (LP), infectados sin LP y no infectados. Los monocitos de animales con LP mostraron los índices más bajos de viabilidad, de fagocitosis y también una menor producción de H₂O₂ que los no infectados y los de animales sin LP.

El efecto del virus sobre el sistema inmune es debido a los cambios que se producen en las poblaciones leucocitarias, lo que no permite calificar al BLV como inmunosupresor, pero si muestra una vulnerabilidad funcional, principalmente en animales con LP (Azedo *et al.*, 2011).

Patogenia

La llegada del virus a un individuo susceptible se realiza mediante la transferencia de células de un individuo infectado, las cuales contienen el genoma viral. Una vez ingresado al organismo el objetivo del virus son los linfocitos B que expresan la IgM. La infección viral es seguida por una expansión policlonal (SPC) de una gran y diversa población de linfocitos portadores de uno a cinco provirus integrados (Gillet *et al.*, 2007).

El aumento de la carga viral en el animal infectado ocurre principalmente por la mitosis de las células huésped infectadas. La forma de infección de nuevas células a través de viriones o por el ciclo replicativo normal del virus ocurre casi exclusivamente durante un pequeño período de tiempo después de la inoculación viral (también llamada infección primaria) (Gillet *et al.*, 2007).

Durante el primer mes post infección las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las 2 semanas, alcanzan un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente, lo que sugiere que el virus está entrando a nuevas células huésped en otros tejidos (Fulton *et al.*, 2006). Lo que ocurre inmediatamente después no está del todo claro. La primera indicación de la infección es la aparición de la respuesta inmune humoral dentro de las 8 semanas post inoculación. Los anticuerpos reconocen antígenos virales y son líticos para las células productoras del virus. Casi al mismo tiempo de la seroconversión temprana aparecen linfocitos T citotóxicos en sangre periférica. Esta respuesta persiste y se amplifica durante la vida del animal, indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el virus (Gillet *et al.*, 2007).

Sobre la patogenia de los tumores se puede observar que en el comienzo del período de cronicidad de la enfermedad el genoma de la célula huésped evidencia modificaciones genéticas: hiperdiploidía, pequeños cromosomas adicionales, trisomías, traslocaciones y reacomodamientos isocromáticos (Kettmann *et al.*, 1982; Dequiedt, 1997). Es importante destacar que el perfil genético del genoma huésped predispone el desarrollo de los tumores. El factor más importante en la progresión clínica de la enfermedad es el complejo mayor de histocompatibilidad. Los tumores se producen a causa de la infiltración de linfocitos B transformados que se acumulan en tejidos tales

como bazo (que es una de las mayores manifestaciones clínicas de LEB), hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y ganglios linfáticos (Gillet *et al.*, 2007).

En relación a la exposición al virus, el animal puede responder de las siguientes formas: sin desarrollo de infección por probable resistencia genética, desarrollando la infección con niveles de anticuerpos detectables, desarrollando la infección con LP y como animales infectados que desarrollan linfoma (figura 1) (Johnson y Kaneene, 1992).

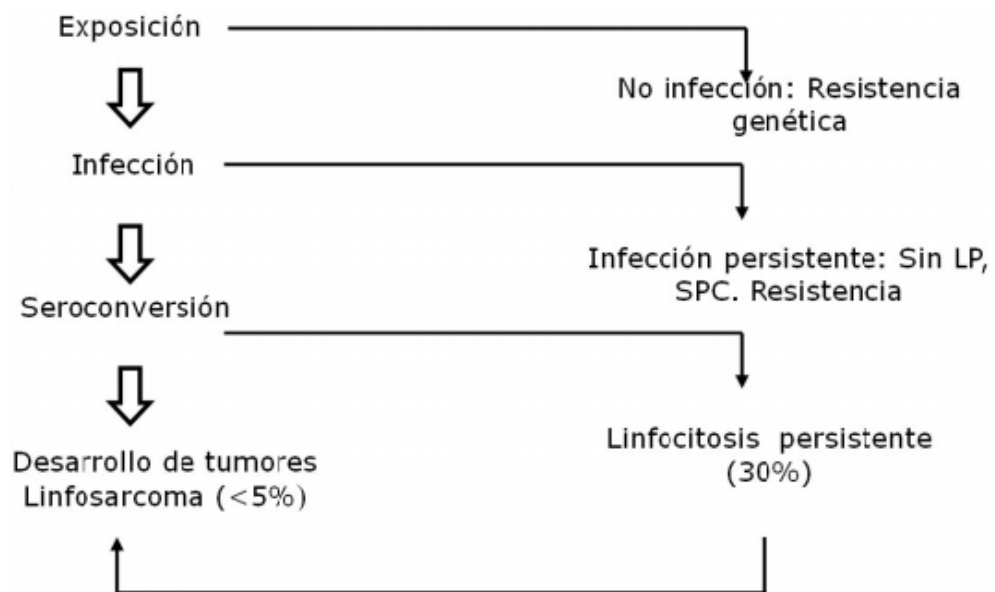


Figura 1. Posibles respuestas a la exposición con VLB (Benavides y Laverde, 2012).

Epidemiología

Se considera que el virus infecta naturalmente a los bovinos, búfalos y capibaras (OIE, 2008) y en forma inducida a los ovinos. Actualmente hay evidencia de la posibilidad de infección natural en humanos, como lo observado por Ochoa Cruz *et al.* (2006), donde encontraron que en un 7% de muestras de carcinomas caniculares, estuvo presente una proteína viral de VLB.

En nuestro país, trabajos de investigación realizados por el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) ponen de manifiesto que alrededor del 10 % de los animales nacen infectados, y que no hay progresión de la infección hasta los 12 meses de edad. A partir de entonces, el nivel aumenta paulatinamente hasta alcanzar el 24 % de animales infectados a los 2 años de edad, para luego elevarse abruptamente al 60 % a

los 30 meses, coincidiendo con el ingreso a la lactancia. Esto muestra que el parto y el ingreso al tambo son puntos críticos en la evolución de esta infección (Trono, 2011).

El virus se transmite en forma horizontal y vertical, siendo la primera la más importante. El contagio se produce por la inoculación de linfocitos que contienen el virus desde animales infectados a animales susceptibles. Estos linfocitos, se encuentran en sangre, calostro, leche, saliva, secreciones nasales, semen y orina. Son un factor clave para el contagio las maniobras tales como la extracción de sangre, vacunaciones y tacto rectal, en las cuales se trabaja con un elevado número de animales utilizando el mismo instrumental repetidamente (imagen 1) (Johnson y Kaneene, 1992; Gillet *et al.*, 2007; Trono, 2011).

En aquellos lugares donde la carga de insectos chupadores es alta se considera que éstos pueden contribuir a la expansión de la enfermedad. (Johnson y Kaneene, 1992; Gillet *et al.*, 2007; Panei *et al.*, 2019).

La transmisión vertical puede ocurrir durante la gestación o en el parto. La infección de terneros en el útero se ha reportado en frecuencias variables que oscilan entre 3.8 a 26%, según las condiciones naturales o experimentales utilizadas (Schwartz y Levy, 1994). Se comprobó que el riesgo es mayor en los casos donde la madre desarrolla linfocitosis persistente o linfosarcoma (Benavides y Laverde, 2012). En el parto, la transmisión puede ocurrir por la ingestión de calostro y leche de madres infectadas, aunque esta relación aún no es clara, ya que se sugiere un mayor riesgo de infección en terneros que ingieren calostro infectado (Johnson y Kaneene, 1991); por otro lado, se ha demostrado que los anticuerpos calostrales son protectivos para la infección neonatal por VLB (Johnson y Kaneene, 1991).

A su vez, cuando se estudian los niveles de infección en sangre o carga proviral, se detecta que hay una fracción de los animales, alrededor del 30 %, que tiene niveles muy bajos de virus en sangre, lo que lleva a inferir sobre su menor potencial de contagio. El resto, los de alto nivel, serían los responsables de transferir eficientemente la infección a todos aquellos animales con quienes cohabitan (Trono, 2011).

MECANISMOS DE TRANSMISION LEUCOSIS BOVINA

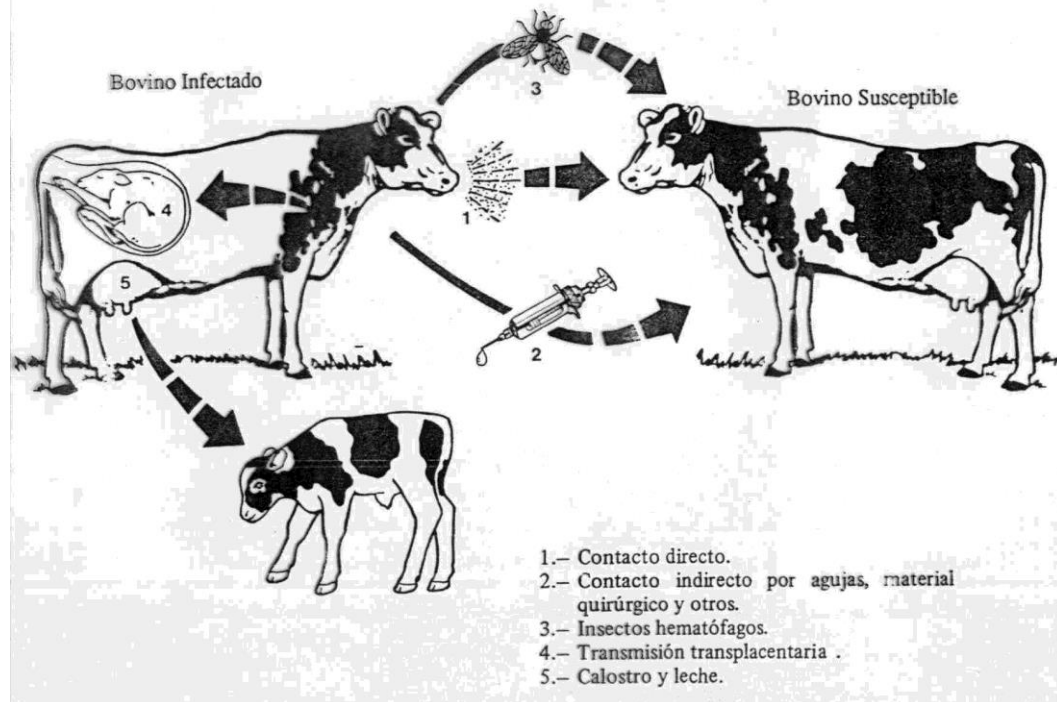


Imagen 1. Mecanismos de transmisión del VLB (Castelli *et al.*, 1999).

Síntomas

Los síntomas se aprecian mayoritariamente después de los 2 años de edad y el periodo de mayor frecuencia es entre los 5 y 8 años. En estudios realizados en ganado lechero, la mayor frecuencia de presentación del linfosarcoma (LS) fue entre las edades de 6 a 10 años (Chamizo Pestana, 1997). La mayoría de los síntomas son inespecíficos y variables, puesto que van a responder a la ubicación de las formaciones neoplásicas y según el grado de afectación de los órganos. Se ha descrito anemia, emaciación e infertilidad, entre otras. También se han reportado momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos. El signo más frecuente que lleva a pensar en la enfermedad es el agrandamiento bilateral y más o menos simétrico de los ganglios explorables (Schell *et al.*, 2004). La exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, es bastante específico como signo de la enfermedad (Malatestinic, 2003). La presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad.

Linfocitosis Persistente

Tradicionalmente se estima que un 60 al 70% del total de animales infectados sólo expresan anticuerpos antiVLB, alrededor de un 30% de los infectados presentan LP y un 2 al 10% pueden llegar a presentar LS (Ferrer *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 2003).

La LP ha sido definida por el Comité Internacional de Leucosis Bovina (1968) como “un incremento en el número absoluto de linfocitos de tres o más desviaciones estándar sobre la media normal determinada para la raza respectiva y el grupo etario de animales en un rebaño libre de leucosis. Este concepto debe ser aplicado al incremento de linfocitos circulantes que persisten por más de tres meses (Chamizo Pestana, 2005).

Para considerar que un bovino tiene LP se requieren 2 muestras pareadas con un intervalo de 90 días, donde se repita el aumento de linfocitos (Chamizo Pestana, 2005).

En los bovinos la LP no se debe a un aumento de la producción de los linfocitos B, sino a una disminución en la tasa de recambio de los mismos debido a la reducción de la apoptosis, la cual es inhibida de alguna manera por la acción del virus (Baruta *et al.*, 2011).

La mayor parte de las células involucradas de los animales con LP son morfológicamente linfocitos normales, aunque también se han descrito células atípicas y anormales, lo cual se ha considerado como indicativo de un estado pre-leucémico (Levkut *et al.*, 1994). El incremento en el conteo de linfocitos corresponde con el incremento en los linfocitos B (Beyer *et al.*, 2002).

Se ha observado que de un cuarto a un tercio de linfocitos B en estos casos se encuentra afectado por el virus. Los bovinos con LP presentan títulos más elevados de anticuerpos específicos que aquellos infectados sin LP (Ferrer *et al.*, 1978).

Patología macroscópica

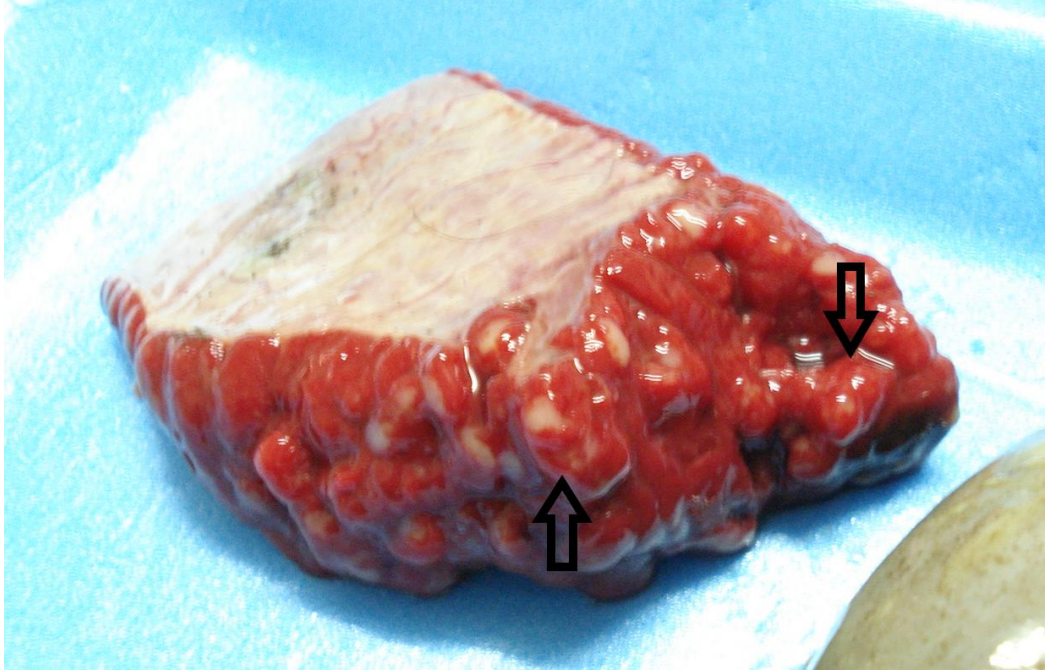
Con respecto a las lesiones macroscópicas, la principal afección se encuentra localizada en los ganglios linfáticos describiéndose como generalizada (76 a 100 %), diseminada (26 a 75 %) y localizada (1 a 25 %). Los mismos aparecen aumentados de tamaño; externamente su aspecto es liso o nodular, sin adherencias con los tejidos circundantes, consistencia blanda o edematosa o bien firme, turgente y friable (imagen 2). Al corte se pierden los detalles de la estructura anatómica por infiltración de tejido lardáceo. En algunos casos se pueden observar hemorragias o pequeños focos de necrosis de color amarillento (Chamizo Pestana, 1995).



Imagen 2. Ganglios linfáticos normales (derecha) y ganglios linfáticos aumentados de tamaño compatibles con LEB (izquierda). Fuente: Dr. Gabriel Magnano, grupo sanidad de rumiantes, Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV-UNRC).

La médula ósea puede aparecer infiltrada por un tejido color blanco grisáceo reemplazando el color rojo normal que se observa en la médula hematopoyética. Hematológicamente se debe distinguir leucemia de linfocitosis persistente. La leucemia hace referencia a la presencia de células tumorales o anormales detectadas en la corriente sanguínea indicando transformación neoplásica de la médula ósea (Ferrer *et al.*, 1978).

El bazo puede presentar un ligero aumento de tamaño o una esplenomegalia tumoral; la superficie de corte seca y con nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima (imágenes 3 y 4). En el corazón, como se observa en la imagen 5, pueden aparecer nódulos o áreas infiltrativas, difusas de color blanquecino (Chamizo Pestana, 1995). El espesor de las paredes uterinas puede estar engrosado por la aparición de tejido lardáceo de color blanco grisáceo (Chamizo Pestana, 2005). En riñones aparecen lesiones infiltrativas que producen hemorragias en la superficie del órgano, o bien nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal (imagen 6) (Chamizo Pestana, 1995).



Imágenes 3 y 4. Bazo aumentado de tamaño y con lesiones nodulares (flechas) compatibles con LEB. Fuente: Dr. Gabriel Magnano, grupo sanidad de rumiantes, FAV-UNRC

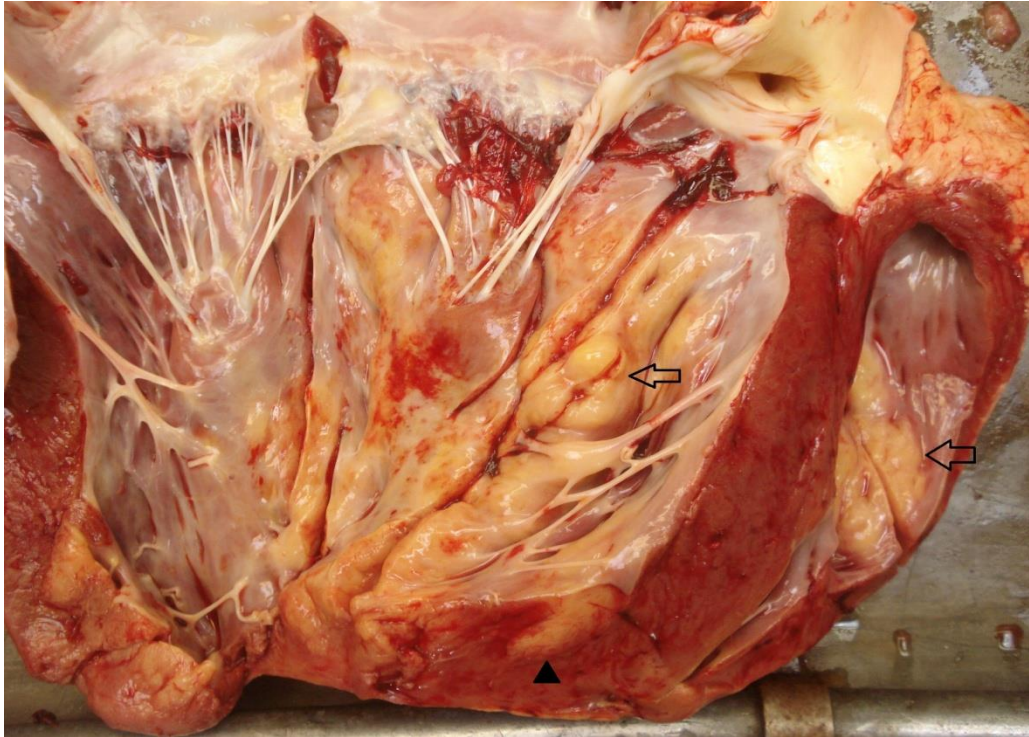


Imagen 5. Corazón con lesiones nodulares (flechas) y áreas infiltrativas (puntas de flecha) compatibles con LEB. Fuente: Dr. Gabriel Magnano, grupo sanidad de rumiantes, FAV-UNRC.

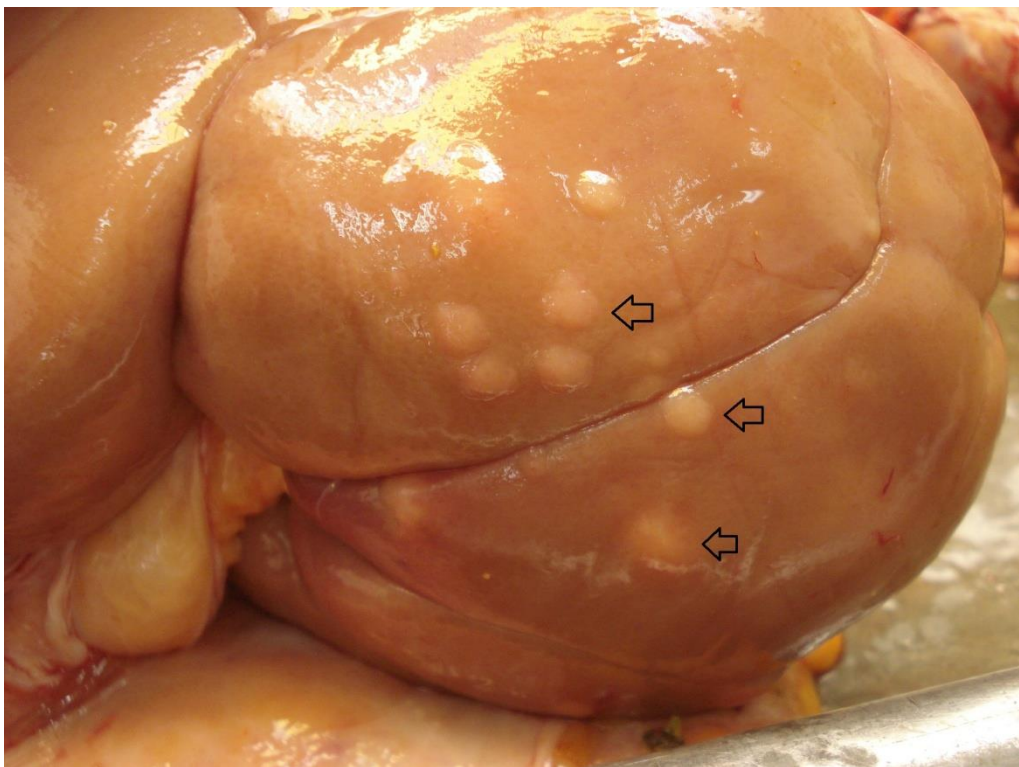


Imagen 6. Riñón con lesiones nodulares (flechas) compatibles con LEB. Fuente: Dr. Gabriel Magnano, grupo sanidad de rumiantes, FAV-UNRC.

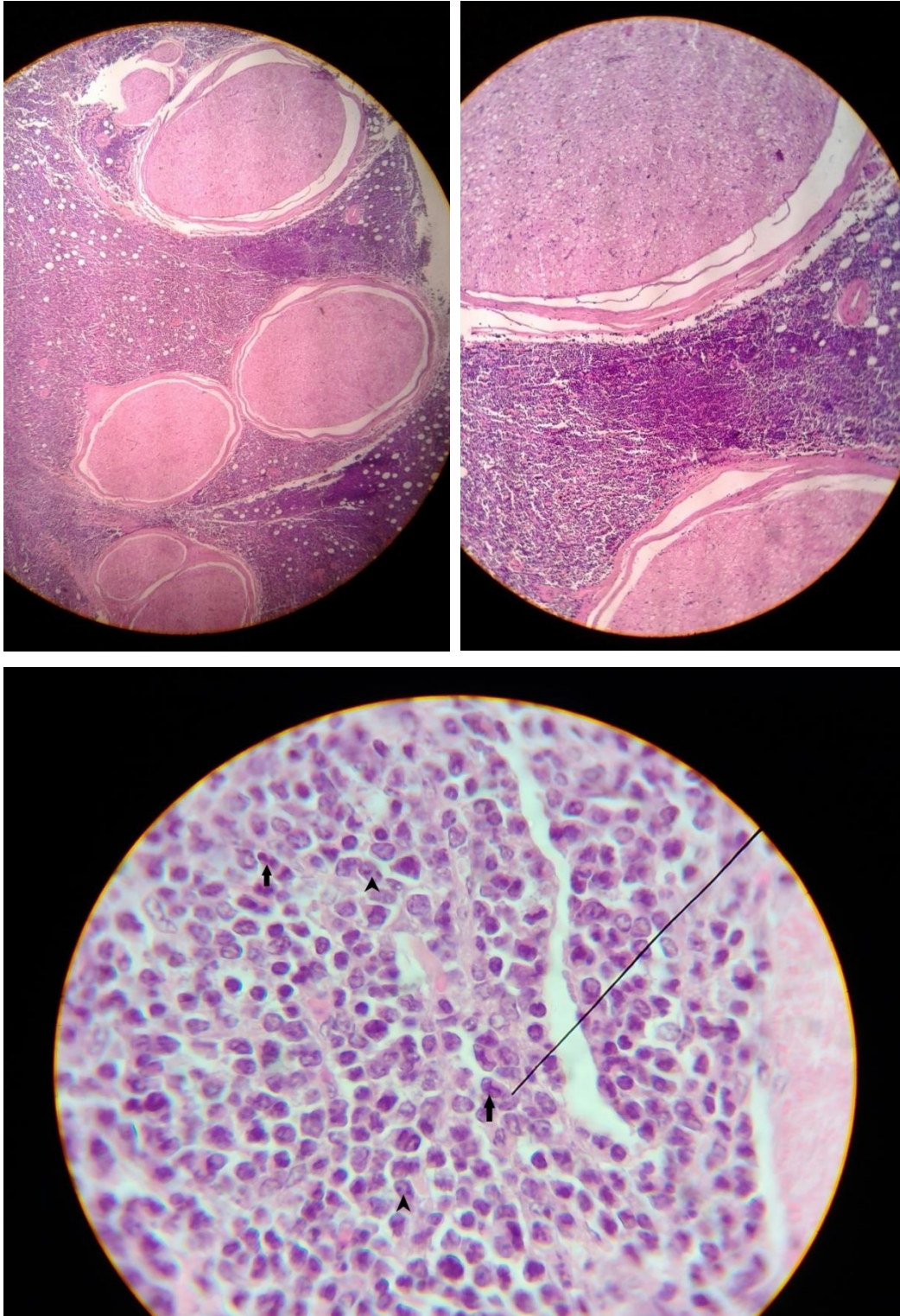
Dentro del sistema digestivo los principales órganos afectados son el abomaso, que aparece infiltrado por tejido tumoral, incrementando el grosor de su pared y en algunas ocasiones presencia de úlceras; el intestino, donde se encuentran lesiones similares con mayor predisposición de úlceras en la mucosa; y el hígado. La afección hepática es más significativa en los animales adultos que en los jóvenes con un aumento de tamaño, consistencia blanda y coloración pálida difusa del órgano (Chamizo Pestana, 1995).

También puede verse afectado el tejido retro-ocular y provocar con su crecimiento protrusión del globo ocular o exoftalmo; además puede observarse infiltración tumoral en la córnea y la aparición de tumores en la cámara anterior del ojo (Chamizo Pestana, 1995). En el pulmón las lesiones son raras, pudiéndose presentar en la forma infiltrativa, difusa y nodular (Chamizo Pestana, 1997).

Citología

En la citología la característica morfológica más destacada es la presencia de LS correspondiendo a una neoplasia de linfocitos B. El tejido neoplásico crece en forma difusa o más raramente nodular en todos los órganos afectados (imágenes 7, 8 y 9), particularmente en los ganglios linfáticos.

Al inicio del desarrollo neoplásico, las células tumorales de la sangre periférica se acumulan en el área del centro marginal del ganglio, proliferan, infiltran el tejido y presionan los folículos, desarrollando así, los signos clínicos del LS.



Imágenes 7, 8 y 9. Corte histopatológico de linfosarcoma en nervios raquídeos en 50x, 100x y 400x, respectivamente. Se observa infiltrado linfocítico entre el endoneuro y el epineuro. En la imagen 7 también se observan nucléolos prominentes (puntas de flechas), núcleos pleomórficos y algunas figuras mitóticas (flechas). Fuente: Dr. Gabriel Magnano, grupo sanidad de rumiantes, FAV-UNRC.

Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por VLB es un factor importante en el control y erradicación en poblaciones de bovinos infectados (Ruppaner *et al.*, 1983).

Las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de LEB son: seroneutralización (SN), radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* indirecto (ELISA) (Gonzalez *et al.*, 2001)

. La AGID ha sido por muchos años la prueba de elección por su alta especificidad y aceptable sensibilidad, además de ser menos costosa y más fácil de realizar. En cambio, las pruebas RIA y ELISA son más sensibles que la prueba AGID (Gonzalez *et al.*, 2001).

Recientemente se han desarrollado distintos equipos comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche. Además, la prueba ELISA resulta más ventajosa para realizar el diagnóstico a un gran número de animales (Gonzalez *et al.*, 2001).

PCR es una prueba conveniente para detectar DNA proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano (Ballagi-Pordány *et al.*, 1992).

Antecedentes en Argentina y en el mundo

La enfermedad está reportada en casi todo el mundo. En América en general se considera que la enfermedad está presente en forma clínica (OIE, 2008), en tanto que en la Unión Europea si bien existe, se encuentra en proceso de erradicación. (Gillet *et al.*, 2007)

En Argentina, Trono, K. (2001) encontró que un 84% de los predios presentaban al menos un animal positivo y 32,8% de los individuos eran positivos; Lovera *et al.* (1997) determinaron una prevalencia de 42% para establecimientos de la cuenca de Moldes; 29% para la cuenca de Canals; 20% para la cuenca de Ucacha y 6% para la cuenca de Carlota. Este estudio involucró un total de 3.989 animales y de los cuales el 33% resultó positivo.

Animales infectados con LEB también se encontraron en pequeñas producciones de agricultura familiar. En un estudio realizado por Schneider *et al.* (2005) en la provincia de Misiones, de 357 bovinos, el 4,2% fueron positivos y de los 148 establecimientos un 8,1% presentaron al menos un animal reaccionante.

Mació *et al.* (2019), realizaron un muestreo en 24 tambos ubicados al sur de la provincia de Córdoba donde encontraron que el 78% de la totalidad de los bovinos muestreados eran positivos a LEB y que todos los establecimientos tenían al menos un animal infectado.

Leucograma

Leucograma es el conjunto de pruebas de laboratorio que informan sobre la cantidad y calidad de los glóbulos blancos circulantes en sangre. En hematología constituye una herramienta imprescindible para tipificar infecciones e inflamaciones, pues permite diferenciarlas en agudas y crónicas, brindando también pistas sobre probables etiologías tóxicas, neoplásicas, metabólicas, alérgicas, parasitarias y endocrinológicas (Scaglione, 2006).

Según Weiss *et al.* (2010), de 5.000 a 11.000 leuc./ μ l de sangre sería el rango normal de leucocitos en bovinos mayores de 2 años. Es importante tener en cuenta que existen factores fisiológicos y ambientales que modifican estos valores como: edad, sexo, estado fisiológico, estrés, sistema productivo, temperatura, hidratación y parasitismos.

En el bovino, la leucocitosis generalmente es la consecuencia reactiva de una infección viral o bacteriana, localizada o generalizada. Por lo general, el aumento de leucocitos se mantiene en valores inferiores a 20.000/ μ l de sangre, incluso pese a la existencia de procesos purulentos graves (peritonitis purulento-icorosa, pulmonía abscedante), sólo se comprueba leve reacción leucocítica (con o sin desvío a la izquierda). En cambio, el vuelco de agentes bacterianos al torrente sanguíneo en general cursa con leucocitosis notable (Swenson y Reece, 1999).

Con respecto a los linfocitos, el rango normal en bovinos mayores de 2 años va desde 3.000 a 6.500 linf./ μ l de sangre. Al igual que los leucocitos, los valores normales de los linfocitos también se ven afectados por factores fisiológicos y ambientales (Weiss *et al.*, 2010)

En los terneros recién nacidos los linfocitos son escasos, situación que perduraría hasta los 7 días de vida. El predominio de los neutrófilos se revertiría luego de la primera semana debido al ascenso de los linfocitos, para ser los glóbulos blancos más abundantes durante el resto de la vida del bovino. Es por esto que, comparado con los leucogramas de otras especies, el leucograma bovino se caracteriza por su elevado componente linfocitario (Scaglione, 2006).

Hipótesis

Aproximadamente un 30% de bovinos de tambo infectados con el VLB presentan un aumento en el recuento total de linfocitos (linfocitosis).

Objetivo general

Evaluar los cambios en el leucograma de animales infectados con VLB.

Objetivos específicos

- Clasificar animales en infectados y no infectados por VLB mediante una técnica de ELISA indirecto.
- Discriminar animales positivos a VLB según presenten o no linfocitosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo estuvo incluido en un proyecto marco denominado “Estudio de campo para investigar la relación entre Leucosis Enzoótica Bovina y Tuberculosis Bovina (TBB) en rodeos con altas prevalencias”. Para el mismo se seleccionaron 4 tambos, 3 ubicados en la zona de Arroyo Cabral (Córdoba) y el restante ubicado en la localidad de Suardi (Santa Fe). Todos los establecimientos presentaban una prevalencia de TBB mayor al 10% y, con respecto a LEB, se contaba con antecedentes de altas prevalencias en todas las cuencas lecheras.

Para el proyecto marco, en cada uno de los establecimientos, se utilizó la técnica de Intradermorreacción (IDR) para determinar la situación sanitaria frente a TBB de todos los bovinos mayores de 6 meses.

Por cada animal positivo a TBB se seleccionó un animal negativo de la misma categoría. Bajo este criterio, se seleccionaron 43 bovinos del establecimiento “A”, 39 del “B”, 42 del “C” y 19 del “D”. En total, se seleccionaron 143 muestras, se les realizó la técnica de ELISA indirecto y se evaluó su leucograma.

Todos los bovinos muestreados pertenecían a la raza Holando Argentino.



Imagen 10. Población de donde se tomaron las muestras. Fuente: Grupo sanidad de Rumiantes FAV-UNRC

A los animales seleccionados se les extrajo sangre sin anticoagulante (imagen 11) para evaluar la respuesta humoral contra el VLB mediante la técnica de ELISA indirecto (IDEXX Leukosis Serum Screening X2 Ab) que detecta anticuerpos frente a proteínas virales, con una sensibilidad (SE) de 97,2% y especificidad (SP) de 97,5% (Trono K. 2001). Esta técnica se realizó en el área de virología del INTA Castelar.

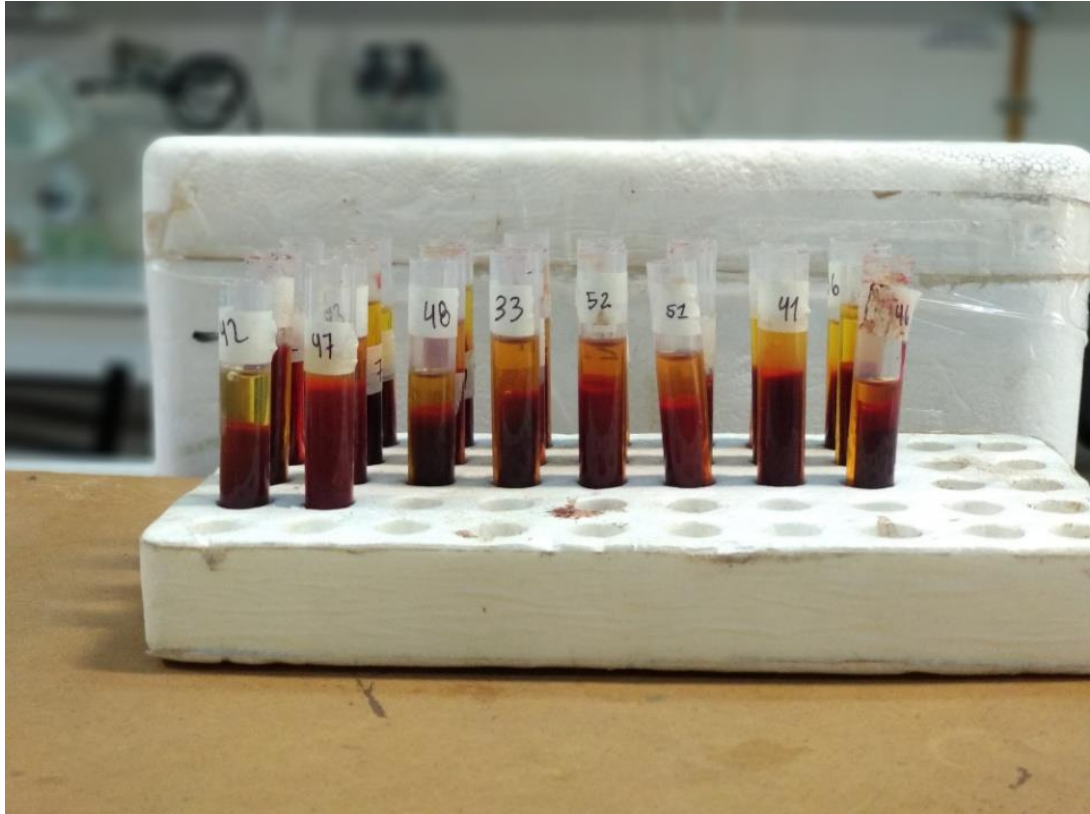


Imagen 11. Muestras de sangre para serología. Fuente: Grupo sanidad de rumiantes FAV-UNRC.

Al mismo tiempo, a esos mismos animales, se les extrajo sangre con una gota de anticoagulante (EDTA) para realizar un hemograma con el cual se determinó la presencia o ausencia de linfocitosis. Las muestras de sangre extraídas se procesaron en el Departamento de Patología Animal de la FAV-UNRC.

El recuento total de leucocitos se realizó en un laboratorio privado mediante el equipo Abacus Junior.

Los recuentos diferenciales, en cambio, se realizaron en la FAV-UNRC. Para ello, se hizo un extendido de una gota de sangre sobre un portaobjetos, se fijó con metanol y se tiñó con Giemsa.

La observación microscópica se realizó en las siguientes etapas: en 100x se examinó la calidad global del frotis; en 400x se seleccionó la zona correcta del extendido

donde los eritrocitos estaban superpuestos de 2 a 3, pero que la mayoría estaban separados entre sí, y finalmente en 1000x, se contaron y clasificaron 100 leucocitos y se informaron como porcentajes (valores relativos).

Para obtener el valor absoluto de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos; se calculó valor relativo de estos por el recuento absoluto leucocitario.

Según la leucometría se consideró a los animales con leucocitosis cuando el recuento superó los 11.000 leucocitos/ μ l y con linfocitosis cuando el recuento fue mayor a 9.000 linfocitos/ μ l (Schalm, 1974).

Por último, los resultados obtenidos se cargaron y procesaron con el programa Excel.

RESULTADOS

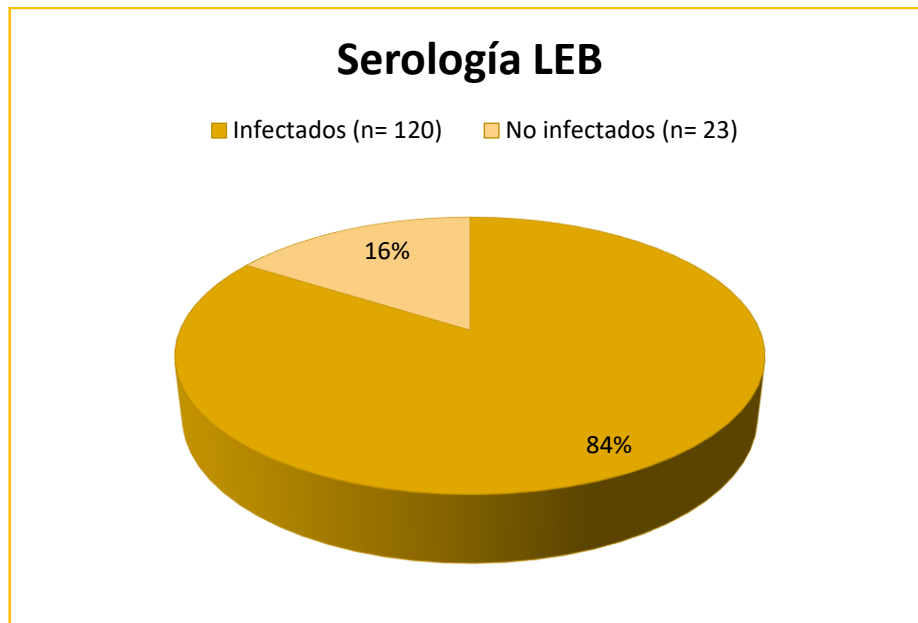


Gráfico 1. Resultados de la serología de todos los animales muestreados (n= 143).

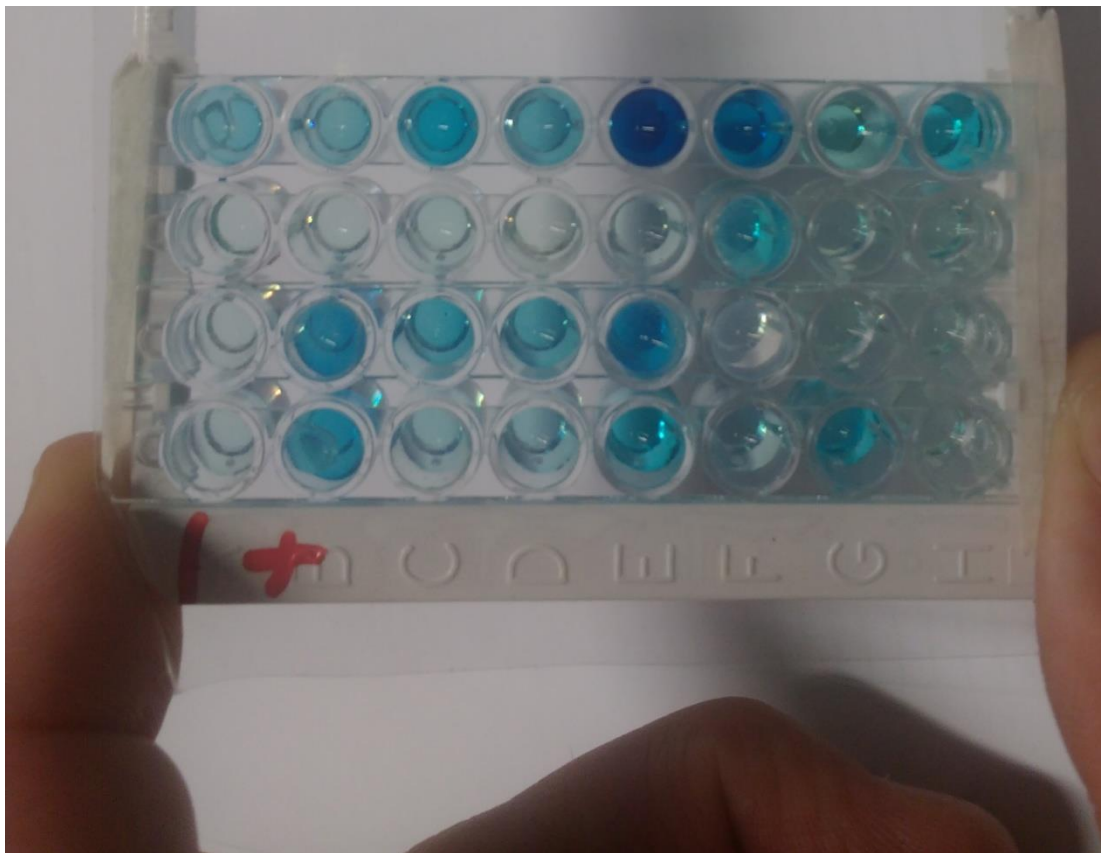


Imagen 12. Técnica de ELISA indirecto. Fuente: Grupo sanidad en rumiantes FAV-UNRC.

Establecimientos	Serología			Total
		n	%	
A	Inf.	38	88	43
	No inf.	5	12	
B	Inf.	34	87	39
	No inf.	5	13	
C	Inf.	33	78	42
	No inf.	9	22	
D	Inf.	15	79	19
	No inf.	4	21	
Total	143			

Tabla 1. Resultados de la serología totales (n) y en porcentajes (%) de cada establecimiento.

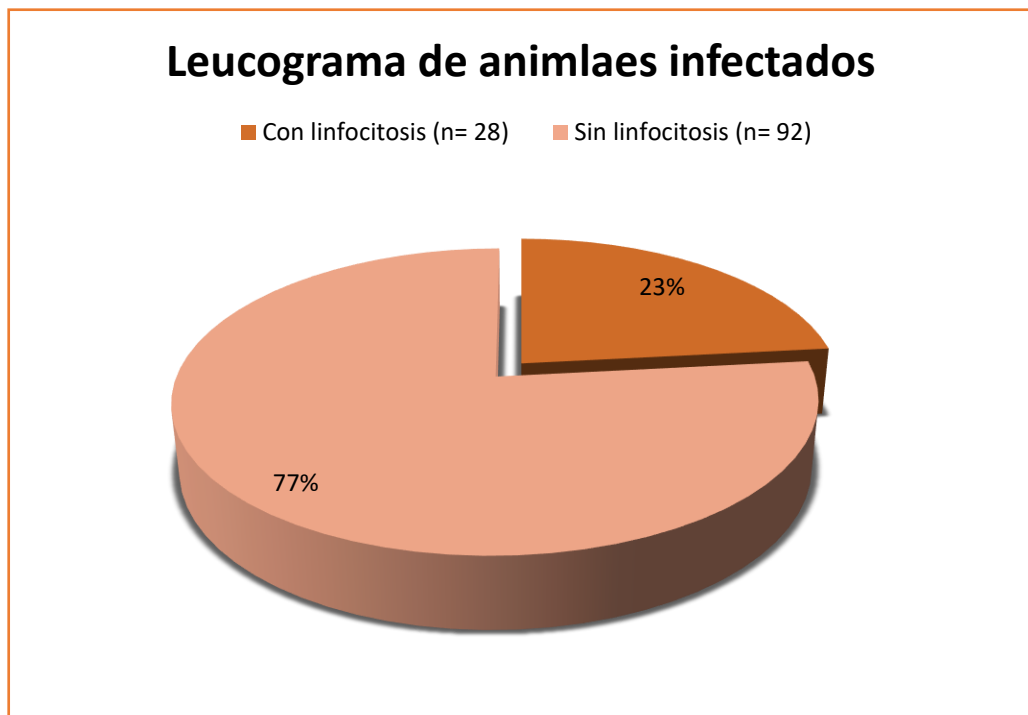


Gráfico 2. Clasificación de los animales infectados por VLB (n= 120), según si presentaron linfocitosis o no.

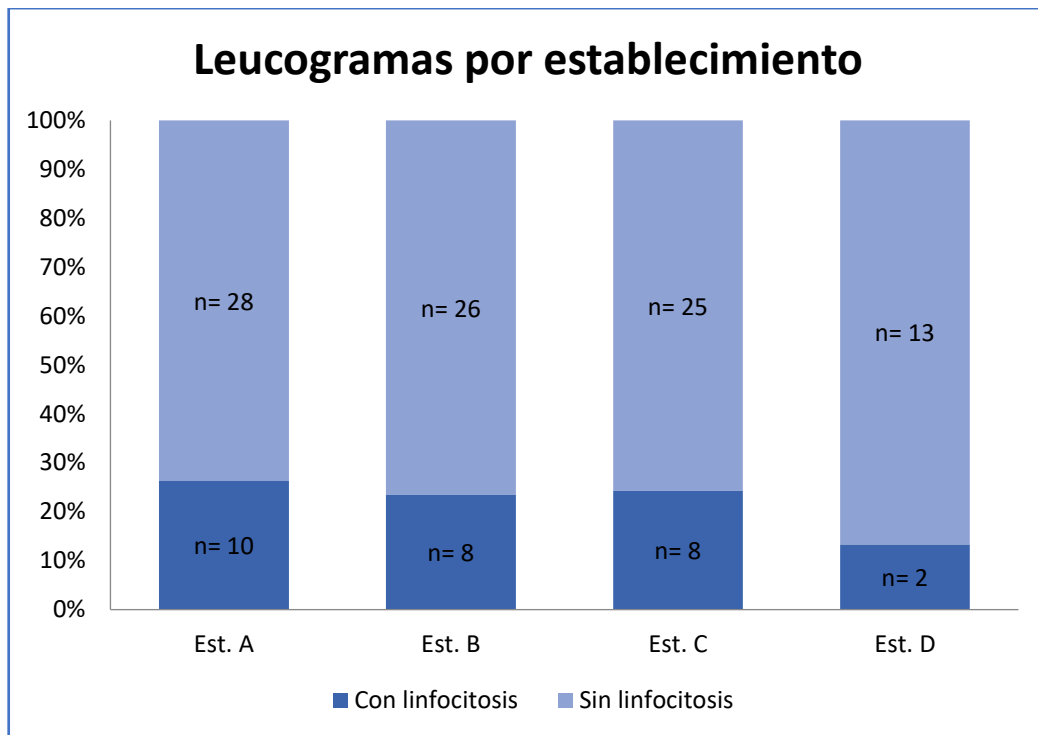


Gráfico 3. Clasificación de los animales muestreados de cada establecimiento, infectados por VLB, en animales con y sin linfocitosis.

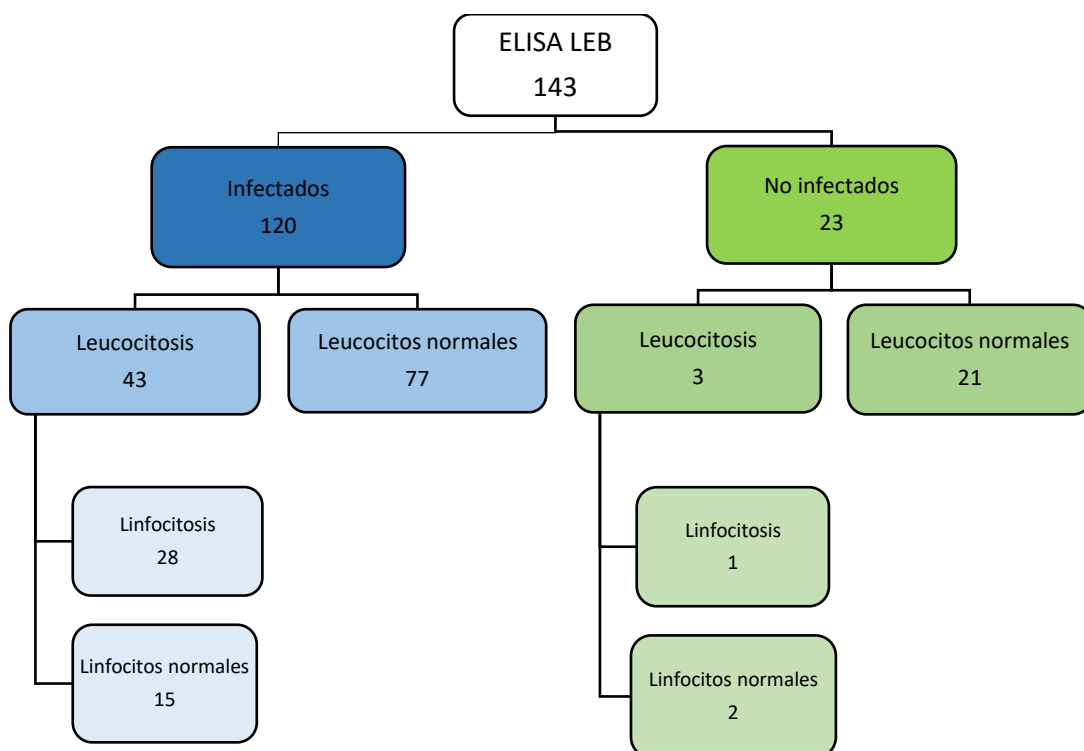


Figura 2. Clasificación de animales en infectados y no infectados por VLB, y su distribución según si presentan o no leucocitosis y/o linfocitosis.

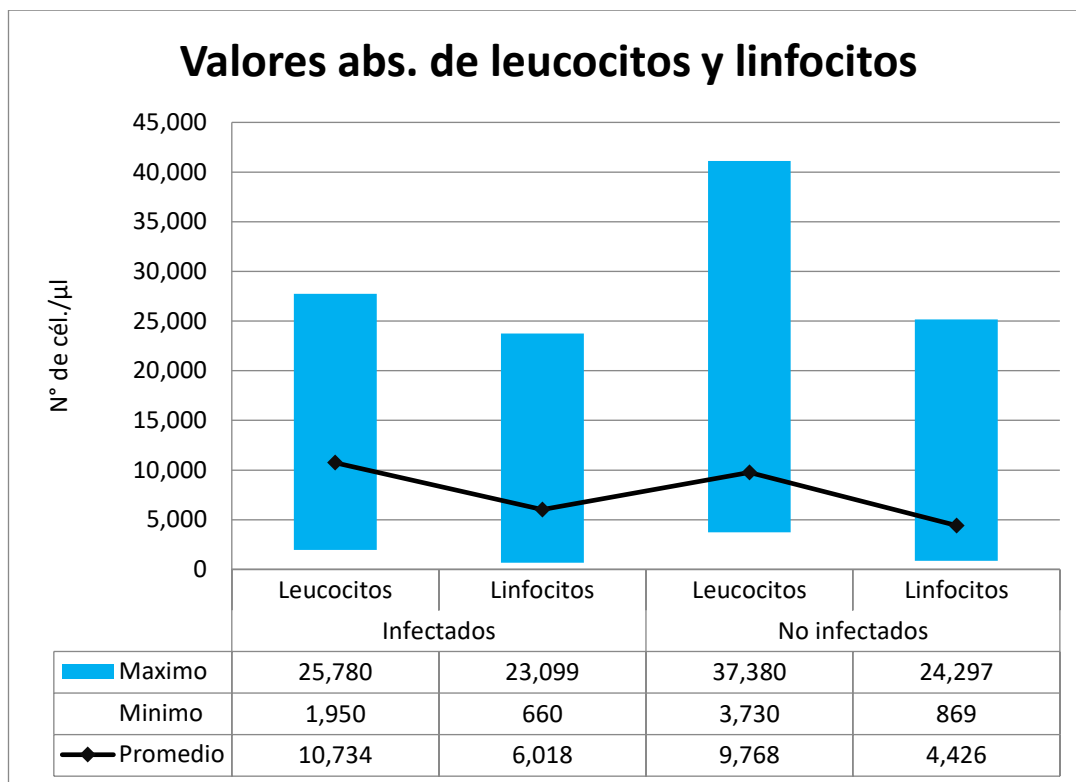


Gráfico 4. Valores absolutos de leucocitos y linfocitos en sangre (N° de cél/ μ) máximos, los mínimos (columnas) y los promedios (línea) de bovinos infectados y no infectados por VLB.

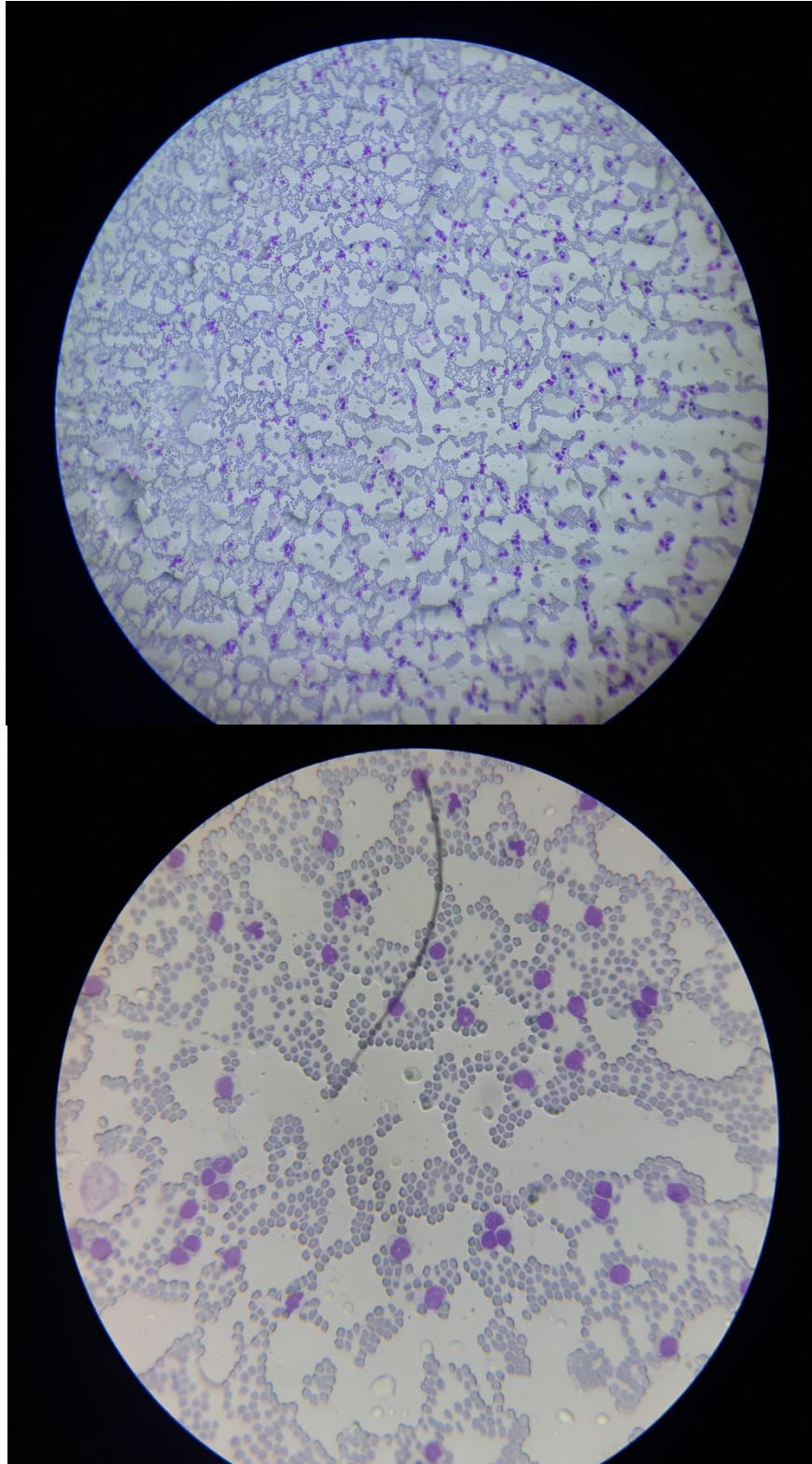


Imagen 13 y 14. Extendido de sangre de una muestra con linfocitosis en 100x y 400x, respectivamente. Se observa gran cantidad de linfocitos por campo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una prevalencia mayor a la consultada en la bibliografía, detallados en el gráfico 1 y en la tabla 1, donde se observa que el 84% de animales eran positivos y el 100% de los establecimientos tenían al menos un animal positivo.

Según lo demostrado por Mació *et al.* (2019), y por los resultados aquí obtenidos, se podría estimar que la prevalencia puede haber aumentado en este último tiempo, en comparación a las obtenidas por Trono, K. (2001) y Lovera *et al.* (1997), a tal punto que todos los establecimientos de nuestras cuencas lecheras pueden estar infectados y dentro de ellos, casi la totalidad de los animales.

Considerando el efecto de esta enfermedad en la merma de la producción de leche y el aumento de decomisos (Erskine *et al.* 2012) y que, al ser la prevalencia intra-predial muy alta, es importante investigar sobre nuevas herramientas de diagnóstico y de control.

La estrategia de erradicación de la enfermedad a través de la eliminación de animales positivos debería ser descartada, ya que si se usara, los tambos se verían obligados a cerrar por la incompatibilidad de la misma con la producción.

Con respecto a los animales que presentaron linfocitosis, la hipótesis que se planteó fue que aproximadamente un 30% de los bovinos infectados por el VLB presentan linfocitosis como lo observado por Ferrer *et al.* (1978) y Hamilton *et al.* (2003). Los resultados obtenidos (gráfico 2) muestran una menor proporción que la esperada, ya que solo se observó en el 23% del total de animales. Dentro de cada predio el porcentaje fue similar (gráfico 3).

Cabe aclarar que por motivos logísticos y presupuestarios del proyecto estos resultados se basan solo en una única muestra, por lo que es esperable que de haber repetido el leucograma para corroborar la persistencia de la linfocitosis, el porcentaje final sea menor a 23% ya que algunos animales pueden estar cursando una linfocitosis debido a causas ajenas a LEB como en infecciones virales, tripanosomiasis e inflamaciones crónicas; liberación de epinefrina o en leucemias linfocíticas (Weiss *et al.*, 2010).

Es interesante resaltar también que, como se observa en la figura 1, un solo bovino serológicamente negativo presentó linfocitosis. Esto se puede deber a otra causa que no sea por VLB, como las ya mencionadas, o a la SE y SP de la técnica ELISA.

Existen marcadas diferencias en las poblaciones leucocitarias entre animales infectados y no infectados, como se observa en el gráfico 4 y figura 2, donde 28 de los 12

animales infectados (23%) presentaron linfocitosis mientras que solo 1 animal de los 23 no infectados (4%) presentó linfocitosis. El hecho de que existan animales negativos al virus de VLB con linfocitosis muestra que es importante continuar aportando datos sobre estas poblaciones y sus dinámicas.

BIBLIOGRAFÍA

- AZEDO, M.R.; M.G., BLAGITZ; F.N., SOUZA; F.J., BENESI; A.M.M.P., DELLA LIBERA. 2011. Functional evaluation of monocytes in cattle naturally infected with the bovine leucosis virus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63 (5): 1131-1140.
- BALLAGI-PORDÁNY, A.;K., KLINTEVALL;M., MERZA;B., KLINGEBORN; S., BELÁK. 1992. Direct Detection of Bovine Leukemia Virus Infection: Practical Applicability of a Double Polymerase Chain Reaction. *J Vet Med B.* 39: 69-77
- BARUTA, D.A.; S.M., ARDOINO; J.L., BRANDAN; R.E., SOSA; E.L., MARIANI; E.M., ALBRETCH. 2011. Leucosis Enzoótica Bovina. *Ciencia Veterinaria.* 13 (1): 9-16.
- BENAVIDES, B.; L.M., LAVERDE TRUJILLO. 2012. Virus de leucosis bovina: un enemigo silencioso. *Journal of Agriculture and Animal Sicences.* 1 (1): 52-59
- BEYER, J. ; B., KÖLLNER ; J.P., TEIKFE ; E., STARICK; D., BEIER ; I., REINMANN ; U., GRUNWALD ; M., ZILLER. 2002. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49(6): 270-7.
- CHAMIZO PESTANA, E.G. 1995. *Patología Especial y Diagnóstico de las Enfermedades de los Animales Domésticos.* 1^{ra} Ed. UABC, Mexicali. p. 78-81.
- CHAMIZO PESTANA, E.G. 1997. *Patología Orgánica y Enfermedades de los Animales Domésticos.* 1^{ra} ed. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. p. 209.
- CHAMIZO PESTANA, E.G. 2005. Leucosis bovina enzoótica: Revisión. *Revista Electrónica Veterinaria.* 6 (7): 1-25.
- CASTELLI, M.; A., MANGOLD; M., MACIEL., A., ABDALA. 1999. LEUCOSIS BOVINA: Diagnóstico, transmisión, control y prevención. *Infotambo.* 128: 68.
- DEQUIEDT, F.; E., HANON; P., KERKHOFS; P., PASTORET; D., PORTETELLE; A., BURNY; R., KETTMANN; L., WILLEMS. 1997. Both wild-type and strongly attenuated bovine leukemia viruses protect peripheral blood mononuclear cells from apoptosis. *J. Virol.* 71 (1): 630-9.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P.; M.G., BLAGITZ; C.B., FREITAS; A.O., LATORRE; C.R., STRICAGNOLO; F.N., SOUZA. 2012. Quantification of B and T lymphocyte subsets in bovine leukemia virus infected dairy cows. *Semina: Ciênc. Agrár.* 33 (4): 1487-1494

- ERSKINE, R.J.; P.C., BARTLETT; K.M., SABO; L.M. SORDILLO. 2011. Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Veterinary Medicine International*. 2011: 1-5. Article ID 915747. doi:10.4061/2011/915747.
- ERSKINE, R.J.; P.C., BARTLETT; T.M., BYREM; C.L., RENDER; C., FEBYAY; J.T., HOUSEMAN. 2012. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 95 (2): 727-734. doi: 10.3168/jds.2011-4760.
- FERRER, J.F.; R.R., MARSHAK; D.A., ABT; S.J., KENYON. 1978. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 7: 705-708
- FULTON, J.B.E.; M., PORTELLA; K., RADKE. 2006. Dissemination of Bovine Leukemia Virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. *Journal of Virology*. 80 (16):7873-7884.
- GONZALEZ, E.T.; G. A., OLIVA; A.R., VALERA; E., BONZO; M., LICURSI; M.E., ETCHEVERRIGARAY. 2001. Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*. 21 (2): 12-20
- GILLET, N.; A., FLORINS; M., BOXUS; C., BURTEAU; A., NIGRO; F., VANDERMEERS; L., WILLEMS. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4 (18).
- HAMILTON, V.T.; D.M, STONE; G.H., CANTOR. 2003. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology*. 315 (1): 13547.
- JOHNSON, R.; J.B, KANEENE 1991. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. *Comp Cont Educ Proc Vet*. 13: 315-328.
- JOHNSON, R.; J.B, KANEENE. 1992. Bovine Leukemia virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet. Bulletin*. 62: 287-312.
- KETTMANN, R.; J., DESCHAMPS; Y., CLEUTER; D., COUEZ; A., BURNY; G., MARBAIX. 1982. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. NatL. Acad. Sci USA*. 79:2465-2469.

- LEVKUT, M.; L., PLANK; M., LEVKUTOVA; V., KONRÁD. 1994. Monoclonal cytoplasmic immunoglobulin and pathomorphological reactions in lymph nodes in spontaneous bovine leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 40 (2): 163-70.
- LOVERA, H.; R., YACIUK; J., GIRAUDO. 1997 Leucosis Enzoótica Bovina: situación prevalencial en cuencas lecheras del centro-sud de la Provincia de Córdoba. *Therios.* 26 (138): 318-327.
- MACIÓ, M.; G., MAGNANO; N., PORTA; M., PETERSEN; A., MACIAS; E., STICOTTI; V., RUIZ; M., SCHNEIDER; J., GIRAUDO. 2019 Seroprevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en tambos del sur de la provincia de Córdoba, Argentina. *Vet. Arg.* 36 (371).
- MALATESTINIC A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. 2003. *Can Vet J.* 44 (8): 664-6.
- MURAKAMI, H.; T., YAMADA; M., SUZUKI; Y., NAKAHARA; K., SUZUKI; H., SENTSU. 2011. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Res.* 156 (1-2): 107-112.
- OCHOA-CRUZ, A.; A., URIBE; M., GUTIERREZ. 2006. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum.* 11 (2): 31-40
- OIE. 2008. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 6° ed. v. 2. Ed. OIE Biological Standards Commission. Capítulo 2.4.11. Enzootic Bovine Leukosis. p. 729-738.
- ORLOFF, S.; J., WALLINGFORD; J., MCDUGAL. 1993. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J. Hum. Lact.* 9 (1): 13-17.
- PANEI, C.J.; A.E., LARSEN; N.A., FUENTEALBA; G.E., METZ; M.G., ECHEVERRÍA; C.M., GALOSI; A.R., VALERA. 2019. Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. *Open Veterinary Journal.* 9 (01): 33-37.
- ROSENBERGER, G. 1981. *Exploración clínica de los bovinos.* Ed. Hemisferio Sur SA. Buenos Aires, Argentina. p 463.
- RUPPNER, R.; D.E., BEHIMER; S., PAUL; J., MILLER; G.H, THEILEN. 1983. A strategy for control of bovine leukemia virus infection: test and corrective management. *Can Vet J.* 24: 192-195.

SCAGLIONE, M.C. 2006. *Variaciones cronobiológicas de parámetros sanguíneos en bovinos*. Tesis de doctorado. Fac. de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 203 p.

SCHNEIDER, M.; G., MAGNANO; J., GIRAUDO; E., BÉRGAMO; F., NAVARRO; S., NAVARRO; G., GOMEZ; A., QUIROGA; E., STIKOTTI; A., CARRANZA; G., DICOLA. 2015. Estudio serológico de Leucosis Enzootica bovina en la provincia de Misiones, Argentina. **12° Simposio internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD)**. Montevideo, Uruguay.

SCHALM, O.W.; N.C. JAIN; E.J. CARROLL. 1974. *Veterinary hematology*. 3^{ra} ed. Ed Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU. p. 541-550.

SCHELL M.; H.P., HECKERT; K.E., MULLER. 2004. Case report : lymphosarcoma in a cow. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 111 (1): 38-41.

SCHWARTZ, I.; D., LEVY. 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary Research*. 25 (6): 521-36.

SWENSON, M.J.; W.O., REECE. 1999. *Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes*. 2^{da} ed. Ed Limusa. Uteha, México. p. 925

TRONO, K. Leucosis Bovina, una amenaza silenciosa. 2011. *Producir XXI*. 19 (233): 44-46.

TRONO, K.; D., PEREZ FILGUEIRAS; S., DUFFY; M., BORCA; C., CARRILLO. 2001. Seroprevalence of Bovine Leukemia Virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol*. 83 (3): 235-248.

WEISS, D.J.; K.J., WARDROP; O.W., SCHALM. 2010. *Schalm's veterinary hematology*. 6^{ta} ed. Ed Wiley-Blackwell. Iowa, EE.UU. p. 310-311.