

**Universidad Nacional
Escuela de Medicina Veterinaria
Facultad de Ciencias de la Salud**

**Epidemiología de la leucosis enzoótica bovina en hatos
lecheros especializados de Costa Rica.**

Modalidad: Tesis de Grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Keren Gabriela Beita Carvajal

**Campus Presbítero Benjamín Núñez
2008**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Nombre _____

Decano _____

Nombre _____

Director _____

Nombre _____

Tutor _____

Nombre _____

Cotutor _____

Nombre _____

Lector _____

Nombre _____

Lector _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A Dios y sus ángeles por ser lo mejor y la alegría en mi vida.

A mi familia, por ser las únicas personas en este mundo con las cuales uno puede contar incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su gran amor, gracia, fidelidad, bendiciones y cobertura angelical a lo largo de toda mi vida.

A mis padres, Jeannette y Moisés, por su amor incondicional y siempre apoyarme durante toda mi vida y mi carrera, los amo muchísimo.

A mis hermanos mayores, Esteban y Gina, por su gran amistad, apoyo y ayuda, los amo mucho y “hermanos por siempre”.

A mi tutora, la Dra. Gaby Dolz, por ser excelente tutora en muchas formas, me regaló su amistad, confianza, ayuda y conocimiento.

Al Laboratorio de Virología, en especial a Jorge Prendas (Pin), el cual fue mi apoyo en el laboratorio, siempre me atendió con una gran sonrisa y una broma, muchísimas gracias!

Al Laboratorio de Entomología, en especial a Rodolfo Pereira, por su ayuda en este proyecto, desde la recolección hasta el procesamiento de las muestras.

Al Departamento de Medicina Poblacional, al Dr. Juan José Romero por su gran paciencia y ayuda en el análisis estadístico de los datos, muchas gracias doctor y a Miguel Bolaños, por una gran amistad y su colaboración.

A mis amigos del alma, Natalia, Anita, Daniel y Esteban, por saber ser excelentes amigos y siempre estar ahí cuando se necesitan, los quiero mucho!

A mi grupo de internado, Carlitos, Daniel, Anita, Jessica, Laurita y Pamela, por regalarme su amistad y uno de los mejores años de mi vida, disfrutamos mucho juntos.

A la Cooperativa Dos Pinos, en especial al Dr. Gonzalo Carmona y al Dr. Manrique Oviedo, por darme la oportunidad de realizar y apoyar este proyecto de investigación.

A todos mis profesores durante mi carrera, en especial al Dr. Leonel Navarro y al Dr. Mauricio Jiménez, que son grandes profesores y amigos.

A mis lectores, el Dr. Jaime Murillo y el Dr. Julio Murillo, por su amistad y colaboración.

A los doctores, Dr. Pablo Avilés y Dr. Edgar Bonilla, los cuales siempre me ayudaron y brindaron una gran amistad, gracias doc.

A todos los productores, veterinarios y agrónomos de los Almacenes Agroveterinarios Dos Pinos, por toda la ayuda brindada durante este proyecto.

A la Escuela de Medicina Veterinaria la cual me dio la oportunidad de estudiar la mejor carrera para mí.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Descripción de la leucosis bovina.....	1
1.1.2. Descripción del agente etiológico de la leucosis bovina enzoótica (LBE).....	2
1.1.3. Epidemiología de la LBE.....	4
1.1.4. Vías de transmisión del VLVB.....	5
1.1.5. Patogénesis de la LBE.....	8
1.1.6. Signos clínicos de la LBE.....	9
1.1.7. Diagnóstico de la LBE.....	11
1.1.8. Control y erradicación de la LBE.....	13
1.2. Justificación.....	15
1.3. Objetivos.....	16
1.3.1. Objetivo general.....	16
1.3.2. Objetivos específicos.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. Selección de hatos.....	17
2.2. Tamaño de la muestra y ejecución del sangrado.....	19
2.3. Procesamiento de las muestras (ensayo serológico).....	21
2.4. Recolección de	21

datos.....	
2.4.1. Resultados de las pruebas serológicas (ELISA).....	
2.4.2. Recolección de datos del VAMPP.....	
2.4.3. Aplicación de la encuesta (variables).....	
2.5. Análisis estadístico.....	
2.5.1. Estadística descriptiva e inferencial.....	
2.5.2. Determinación de los factores asociados con la prevalencia al VLVB.....	
2.6. Recomendación de medidas correctivas.....	
3.	
RESULTADOS.....	
4.	
DISCUSIÓN.....	
5.	
CONCLUSIONES.....	
6.	
RECOMENDACIONES.....	
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	
8.	
ANEXOS.....	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Frecuencia de los signos predominantes de la LBE determinados en 1100 casos clínicos.....	11
Figura 2:	Distribución de 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica según la prevalencia del VLVB y número total de animales presentes en cada finca.....	25
Figura 3:	Categorización según las prevalencias al VLVB determinadas en 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.....	26

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Fórmula para calcular el tamaño de muestra para estimar una proporción.....	17
Cuadro 2:	Número de animales a muestrear por finca, para determinar la prevalencia de VLVB dentro de cada hato.....	18
Cuadro 3:	Seroprevalencia del VLVB en diferentes provincias de Costa Rica.....	26
Cuadro 4:	Distribución de los casos de seropositividad al VLVB y límites, según los factores intrínsecos de 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.....	27
Cuadro 5:	Distribución de la seropositividad del VLVB según los factores de riesgo extrínsecos (medidas de manejo) en la transmisión del VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.....	28
Cuadro 6:	Factores de riesgo extrínsecos, positividad al VLVB y límites, en 55 fincas lecheras especializadas de Costa	29

	Rica.....	
Cuadro 7:	Determinación de los factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos, relacionados a la seropositividad al VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica, determinado mediante análisis univariado.....	32
Cuadro 8:	Resultados del análisis multivariado de los factores de riesgo extrínsecos asociados a seropositividad al VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.....	33
Cuadro 9:	Seroprevalencia del VLVB en 76 fincas lecheras especializadas en Costa Rica..	53

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGID: inmunodifusión en gel de agarosa

ARN: ácido ribonucleico

CRIPAS: Centro Regional de Informática en Producción Animal Sostenible

DO: densidad óptica

ELISA: inmunoensayo enzimático

EMV-UNA: Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional

I.A: inseminación artificial

IgM: inmunoglobulina M

LBE: leucosis bovina enzoótica

LI: límite inferior

LP: linfocitosis persistente

LR: regresión logística

LS: límite superior

LTR: repeticiones largas repetidas

ME: microscopía electrónica

OR: razones de probabilidad

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

TR: transcriptasa reversa

VLVB: virus de la leucosis viral bovina

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación participaron 76 fincas lecheras especializadas, localizadas en las principales zonas lecheras de Costa Rica, en las provincias de San José, Cartago, Heredia, Alajuela y Guanacaste. La población total bovina muestreada fue de 8518 animales, de diferentes razas y edades (lactancias). Se determinó una seroprevalencia de la LBE del 41,0% a nivel de animales y de 97,4% a nivel de hatos lecheros, en donde se determinaron seroprevalencias desde 0,0% hasta 90,7%. Se determinó una alta seroprevalencia y riesgo del VLVB en la raza Holstein a diferencia de las demás razas lecheras. Se determinó que la seroprevalencia y riesgo de la LBE aumenta, conforme aumenta el número de lactancias en las vacas. Se determinaron que los factores asociados a la positividad al virus fueron: la no desinfección del equipo de identificación, el no utilizar un guante y aguja individual, el no utilizar únicamente I.A, el comprar animales a otras fincas, el no calentar el calostro, el no utilizar reemplazador y el no separar físicamente las vacas con mastitis. Los resultados obtenidos muestran un alto porcentaje de animales y hatos infectados con el VLVB y que el porcentaje de positividad al VLVB se encuentra asociado a prácticas inadecuadas de manejo que favorecen su diseminación dentro de los hatos lecheros.

ABSTRACT

The following investigation presents the results obtained from 76 dairy farms located in the main zones of dairy production, in the provinces of San José, Cartago, Heredia, Alajuela y Guanacaste of Costa Rica. The total bovine population sample was from 8518 animals from different breeds and ages (lactancies). The results obtained showed a seroprevalence to bovine leukosis virus (BLV) of 41,0% at animal level and a seroprevalence to BLV of 97,4% at herd level, ranging from 0,0% to 90,7%. According to breed, it was determined that Holstein cows had a higher seroprevalence and risk to BLV infection than the other breeds analyzed. Also with increasing number of lactancies, the seroprevalence and risk to BLV infecting the cows tended to increase. It was demonstrated that, the risk factors associated to the positivity of BLV in the herds were: not disinfecting the equipment for calf identification, not using of an individual obstetrical sleeve or needle, not using only artificial insemination in reproduction, not having a close herd (buying foreign animals), not heating the colostrum or not using milk replacer in calves and not separating animals with mastitis from the herd. The results obtained in the present study determined a high percentage of infected animals and farms with BLV in Costa Rica, and this was associated to inappropriate management practices in the farms which contribute to disseminate the virus.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Descripción de la Leucosis Bovina

El concepto de leucosis se utiliza para definir un trastorno patológico que se caracteriza por una proliferación o crecimiento descontrolado del tejido formador de leucocitos (Jiménez, 1990). La leucosis bovina fue reportada por primera vez en Alemania en 1871 por Leisering, el cual describió la presencia de unos nódulos amarillentos en el bazo agrandado de una vaca. Dos tipos de leucosis bovina pueden ser diferenciados con base en su epidemiología: la leucosis bovina enzoótica (LBE), una enfermedad causada por un retrovirus llamado el virus de la leucosis viral bovina (VLVB) y la leucosis bovina esporádica, la cual no es transmisible (Gillet et al., 2007; Radostits et al., 2002).

La leucosis bovina esporádica afecta a animales menores de 3 años de vida y comprende tres manifestaciones:

- Una forma juvenil en terneros menores de 6 meses de vida, caracterizada por un aumento de tamaño de múltiples ganglios linfáticos.
- Una forma tímica en reses menores de 2 años, caracterizada por una tumefacción del cuello que provoca inflamación y edema.
- Una forma cutánea en reses de 1-3 años, caracterizada por el desarrollo de nódulos y placas en la piel.

El VLVB no puede cultivarse a partir de muestras obtenidas de animales afectados por la leucosis bovina esporádica y estos animales tampoco desarrollan anticuerpos contra el virus. Hasta la fecha no existen pruebas de que estas formas de leucosis bovina esporádica se deban a un agente infeccioso (Radostits et al., 2002).

1.1.2. Descripción del agente etiológico de la leucosis bovina enzoótica

Desde 1961, Olson y Enke plantearon la sospecha de un agente infeccioso involucrado en la LBE. Sus sospechas se basaban en la ocurrencia de tumores en ciertos hatos después del uso de sangre fresca como inmunizante contra la piroplasmosis (*Babesia bovis*) en el ganado. La sangre utilizada provenía de una vaca, en la cual se reportó simultáneamente el desarrollo de una leucosis linfática, y por consiguiente se sospechó de la transferencia de un agente infeccioso a través de esta práctica (Johnson y Kaneene, 1991a). En el año 1969 se identificó por primera vez el VLVB mediante microscopía electrónica, en donde se observaron partículas retrovirales tipo-C en linfocitos cultivados de vacas con linfosarcoma (Kahrs, 1981).

El VLVB es un oncovirus que pertenece a la familia Retroviridae, género Deltaretrovirus e infecta sobre todo linfocitos B en bovinos (Dinter et al., 1990). Los viriones del VLVB son esféricos, de 80-100nm de diámetro, y su estructura está organizada en tres capas: la envoltura con proyecciones (glicoproteínas) que recubre la cápside icosaédrica de 60nm de diámetro, la cual contiene el complejo genoma-nucleoproteína de simetría helicoidal (Radke, 1999). El genoma viral está compuesto por dos moléculas de ácido ribonucleico (ARN) de una hebra positiva que son idénticas, las cuales son traducidas en ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de la enzima transcriptasa reversa (TR) (Monti, 2005). El ADN formado puede ser integrado en el genoma de ciertas células huésped (provirus) produciendo infección persistente del animal afectado (Fields, et al., 1996).

El genoma viral contiene los genes *gag*, *pro*, *pol* y *env*, que son comunes para todos los retrovirus con replicación competente (Radke, 1999). A diferencia de la mayoría de virus que producen tumores, el VLVB no contiene oncogenes celulares, no se integra en sitios específicos del genoma del huésped, ni tampoco transforma las células por medio de la activación de secuencias específicas transformadoras ubicadas cerca del sitio de integración (Van der Maaten

y Miller, 1990). El VLVB contiene el gen *tax*, el cual codifica para una proteína reguladora de la transcripción de la expresión viral, la cual es capaz de activar genes celulares, que controlan el crecimiento celular, a cierta distancia de su sitio de integración y por lo tanto conlleva a la transformación maligna (Van der Maaten y Miller, 1990; Gillet et al., 2007). La región *gag* del genoma viral codifica para las proteínas estructurales internas no-glicosiladas, que son: la proteína de matriz (p15), la proteína de cápside (p24) y la proteína de nucleocápside (p12). Estas proteínas están involucradas en la formación de la cápside viral. La proteasa se deriva de la región *pro* que está en medio de *gag* y *pol*. La región *pol* codifica la TR y una integrasa. La envoltura viral está compuesta por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera, en la cual se insertan las glicoproteínas derivadas de la región *env*. Estas son las proteínas de transmembrana (gp30) y de superficie (gp51), las cuales se adhieren mediante puentes de disulfuro. La gp51 es el ligando que se fija al receptor celular (Monti, 2005) y es un potente antígeno, principal responsable de la respuesta humoral del huésped (González et al, 2001). Se cree que los anticuerpos contra la gp51 son responsables de la mayor actividad neutralizante contra el virus (Van der Maaten y Miller, 1990). Las proteínas p24 y gp51 son de especial interés, porque son usadas para fines de diagnóstico. Los anticuerpos anti gp51 se detectan generalmente con títulos más altos, que aquellos dirigidos contra la proteína p24 (González et al, 2001).

La replicación del VLVB es como la de muchos retrovirus, las proteínas en la envoltura viral se fijan a la superficie de las células blanco, luego el virión penetra mediante fusión o endocitosis, en donde enzimas digestivas remueven la cápside del virus (desnudamiento). La TR produce en el citoplasma ADN doble hebra y secuencias reguladoras transcripcionales virales llamadas repeticiones largas repetidas (LTR), ésto a partir de la cadena simple de ARN, las

cuales se integran en el núcleo de la célula hospedera (provirus). Una vez integrado, LTR utiliza los mecanismos de replicación de la célula para producir ARN viral y las proteínas de envoltura, cápside y TR. Los viriones son ensamblados y geman de la célula, dando como resultado viremia e infección de otras células. A diferencia de otros retrovirus, en donde la viremia ocurre rápidamente y puede persistir, la viremia del VLVB ocurre solamente en etapas tempranas de la infección (Monti, 2005).

El virión es muy frágil en el medio ambiente, se inactiva por exposición a rayos ultravioleta, calor durante 30 minutos a 56°C o por 1 minuto a 60°C y por pasteurización. La envoltura viral está conformada por lípidos, haciéndola susceptible a solventes orgánicos. El VLVB no persiste en el medio ambiente durante un periodo significativo de tiempo. En el laboratorio su infectividad disminuye considerablemente a causa de manipulaciones de rutina como ultracentrifugación y sometiénolo a ciclos de congelación y descongelación (Van der Maaten y Miller, 1990).

1.1.3. Epidemiología de la LBE

Después de la Segunda Guerra Mundial surgieron varios reportes de la LBE en varios países de Europa. A finales del siglo XIX el ganado europeo, posiblemente infectado con el VLVB, fue exportado desde Europa hacia Estados Unidos. La infección se ha esparcido en el ganado estadounidense y canadiense; hoy en día es altamente prevalente en muchos hatos lecheros de estos países. El ganado canadiense y estadounidense infectado con el VLVB pudo haber contribuido a la diseminación del agente al ganado de otros países de América Central y América del Sur (Johnson y Kaneene, 1991a).

Se calcula que la infección con el VLVB afecta en Estados Unidos a por lo menos al 20%, en Canadá al 6-11%, en Francia al 27% y en Venezuela al 37% de la población adulta de vacas lecheras (Radostits et al., 2002). En la actualidad, la Comunidad Europea ha declarado libres de LBE a países como Bélgica, Irlanda, Noruega, Austria, Alemania, Suecia y Holanda (Idexx, 2006).

En Costa Rica, la LBE se diagnosticó por primera vez en 1976 en la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional (EMV-UNA), basándose en hallazgos clínicos e histopatológicos (Jiménez et al., 1995). En 1980, Rodríguez y colaboradores realizaron investigaciones sobre el VLVB, determinando un 39% de seroprevalencia en hatos lecheros del Valle Central de Costa Rica (Rodríguez et al., 1980). En 1995, los resultados de un estudio casuístico realizado por el Laboratorio de Virología, EMV-UNA, con sueros recolectados entre 1983 a 1993, hallaron que de 22463 sueros procesados, 4153 (18.4%) tuvieron una reacción positiva a la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (AGID). Estos sueros provenían de 1867 hatos, encontrándose en 953 hatos (51.0%) reactores positivos al VLVB (Jiménez et al., 1995). En una investigación realizada por Mora en 1997, se encontró una seroprevalencia del VLVB de 38% en 15 fincas utilizando una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) (Mora, 1997).

1.1.4. Vías de transmisión del VLVB

La transmisión del VLVB ocurre principalmente por vía horizontal (80-95%), siendo necesaria la transferencia de células infectadas (linfocitos B) para una infección efectiva. Los principales materiales biológicos infecciosos son la sangre y la leche (Fuente, 1989). El hecho, de que el VLVB se encuentra infectando persistentemente los linfocitos, hace que la sangre de

animales infectados se considere como la principal fuente de infección. Los procedimientos rutinarios de manejo dentro del hato, tales como inyecciones, transfusiones de sangre, toma de muestras de sangre, descornes, tatuajes, muesqueados y rectopalpación, entre otros, en los que se usan materiales y equipos para más de un animal sin una adecuada desinfección e higiene (transmisión iatrogénica) se consideran las principales rutas de infección (Chapizo, 2005).

La transmisión a través de insectos picadores ha sido reportada, especialmente por mordeduras de insectos pertenecientes a la familia *Tabanidae* (Monti, 2005). Sin embargo, la transferencia de sangre por insectos no parece tener relevancia en condiciones naturales (Chapizo, 2005), debido a que el virus puede ser parcialmente inactivado en el intestino del insecto dando como resultado una dosis infectiva final baja (Monti, 2005). La eficiencia de la transmisión del VLVB por estos vectores mecánicos es más una función de la prevalencia de la infección dentro del hato, que una función de la habilidad propia del vector de transmitir el virus (Johnson y Kaneene, 1991b).

El calostro de madres seropositivas contiene anticuerpos contra el VLVB, los cuales proveen protección contra la infección durante los primeros 4 a 7 meses de vida. Se ha reportado, que el riesgo de infección a través del consumo oral de calostro es significativo, solo si la madre es una novilla de primer parto con un calostro de mala calidad (Johnson y Kaneene, 1991d).

Con respecto a la leche, es probable que la infección con el VLVB ocurra, si la leche de una vaca positiva se usa en la alimentación de una ternera sin defensas contra el virus o si una gran cantidad de linfocitos es administrada después de que las terneras pierden su protección materna (anticuerpos). Se recomienda tener precaución con la leche proveniente de vacas

seropositivas que presentan mastitis clínica o subclínica, porque esta leche contiene gran cantidad de linfocitos y por consiguiente puede ocasionar infección (Yoshikawa et al., 1996).

La saliva, el semen, la orina, las heces y las secreciones nasales, bronquiales y oculares pueden jugar un papel en la transmisión del VLVB, pero, sin duda, son de menor importancia (Fuente, 1989).

También el contacto físico prolongado entre el ganado es un factor de riesgo para la transmisión de la LBE. La etapa del parto puede ser un periodo, donde el riesgo de transmisión del VLVB aumenta en las vacas y las novillas lecheras (Hopkins y DiGiacomo, 1997). A la hora del parto, los animales son confinados a lotes o apartos maternos para la parición y el cuidado posparto. Durante el confinamiento materno, existen más oportunidades para su exposición a sangre (Gatei et al., 1989), tejidos, y fluidos uterinos de otras vacas en el área. Además, los anticuerpos circulantes contra el VLVB disminuyen; inclusive hasta niveles no detectables por las pruebas serológicas (Hopkins y DiGiacomo, 1997). Por lo tanto, la expresión viral puede estar aumentada en las vacas infectadas con el VLVB, incrementando su potencial de infectividad (Monti, 2005).

Otra vía de contagio es la transmisión del VLVB a los terneros por vía intrauterina (5-20%). Tanto el virus como los anticuerpos son detectados en los terneros recién nacidos, lo cual indica que éstos son infectados durante la segunda mitad de la gestación. La transmisión transplacentaria ocurre principalmente cuando la madre se encuentra en el estado de linfocitosis persistente (Monti, 2005) o con linfosarcoma (Agresti et al., 1993). Un reporte demostró además, que la infección intrauterina es más común en machos nacidos de madres positivas (Thurmond et al., 1983). Sin embargo, a pesar de que las infecciones intrauterinas pueden

perpetuar el VLVB de una generación a otra, ésta no es considerada la ruta principal de transmisión del agente (Van der Maaten y Miller, 1990).

1.1.5. Patogénesis de la LBE

Las células blanco del VLVB son sobre todo los linfocitos B; sin embargo, recientemente se reportó también la infección de linfocitos T y células epiteliales de la ubre, aunque se desconoce su importancia en la patogénesis de la enfermedad (Trainin y Brenner, 2005).

La viremia solamente es detectable en las primeras 2 semanas post infección; después el animal monta una respuesta inmune principalmente contra las proteínas gp51 y p24 (Van der Maaten y Miller, 1990). Se ha reportado que los anticuerpos específicos contra el VLVB son detectables 2 a 4 semanas post infección experimental, pero en infecciones naturales puede durar más tiempo, especialmente cuando son transferidas pequeñas cantidades de virus (Radke, 1999). En el animal infectado, el VLVB se encuentra en forma de linfocitos infectados y no como viriones libres (Van der Maaten y Miller, 1990).

Los cuatro posibles resultados tras la exposición natural de una vaca al VLVB son:

- Que el animal no se infecte, probablemente debido a su resistencia genética.
- Que el animal presente una infección persistente con desarrollo de niveles detectables de anticuerpos (seropositivos y fuente de contagio).
- Que el animal presente una infección persistente (seropositivo) y además desarrolle una linfocitosis persistente (LP), un proceso linfoproliferativo benigno (Radostits, et al., 2002). Alrededor del 30% de los animales infectados desarrollarán LP (Chapizo, 2005).

- Que los animales persistentemente infectados, con o sin LP, desarrollen tumores malignos (linfosarcoma) (Radostits, et al., 2002). Dependiendo de factores hereditarios, aproximadamente un 10% del ganado infectado desarrollará linfosarcoma (Jimenez, 1990).

La probabilidad de que un animal se infecte o desarrolle cualquiera de las distintas formas de la enfermedad dependerá de su constitución genética. El resultado final depende además del estado de inmunidad del animal y la dosis infectiva del virus (Radostits, et al., 2002).

1.1.6. Signos clínicos de la LBE

Como otros retrovirus, la infección con el VLVB resulta en una alteración del sistema inmunológico del hospedador, tanto a nivel humoral como a nivel celular (Trainin y Brenner, 2005). A pesar de que se ha reportado, que el VLVB puede persistir en otros tipos de células, la célula blanco por excelencia para el virus son los linfocitos B, que expresan en su superficie la inmunoglobulina M (IgM) (Gillet et al., 2007). La respuesta primaria de defensa en vacas infectadas está alterada; debido a que producen menos anticuerpos IgM activos, observándose una reducción de células productoras de IgM en el bazo y linfonodos (Trainin y Brenner, 2005). Alrededor del 80% de los animales con linfosarcoma presenta una disminución notable de las inmunoglobulinas IgM (Radostits, et al., 2002).

El 30% del ganado infectado desarrolla LP, en donde el conteo linfocitario absoluto está significativamente aumentado con respecto a los valores promedios para la edad y la raza (Radke, 1999). La mayoría de las células involucradas en LP son desde el punto de vista morfológico linfocitos normales (Chapizo, 2005). Se define como LP una linfocitosis que

persiste por al menos 3 meses consecutivos y en la que no se determinan manifestaciones clínicas debido a lesiones neoplásicas linfoproliferativas (Johnson y Kaneene, 1991a).

La enfermedad inicia con la manifestación clínica del linfosarcoma y los síntomas se deben al desarrollo de linfosarcomas multicéntricos, los cuales pueden ser detectados entre 1 a 8 años post infección y ocurren en un 5 a 10% de la población infectada (Monti, 2005). Los tumores se desarrollan con rapidez produciendo una gran variedad de signos y síntomas, dependiendo de la localización u órgano afectado (Radostits, et al., 2002). En la Figura 1 se muestra la frecuencia de los signos predominantes de la LBE. El desarrollo de tumores es invariablemente fatal y la muerte ocurre usualmente 3 a 6 meses después de la aparición de los síntomas clínicos (Trainin y Brenner, 2005).

En la vaca adulta, las lesiones pueden aparecer en casi todos los órganos, pero son más frecuentes en abomaso, corazón y ganglios linfáticos viscerales y periféricos. El compromiso de la pared abomasal afecta el apetito y causa alteración de la digestión con diarrea persistente (Radostits, et al., 2002). Otro de los órganos frecuentemente afectado es el corazón, especialmente el atrio derecho (Van der Maaten y Miller, 1990). Cuando las lesiones se encuentran en la pared de las aurículas, se produce una insuficiencia cardiaca congestiva derecha. En el 75-90% de los casos se produce un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos superficiales, con frecuencia un hallazgo clínico inicial. El aumento de tamaño de los ganglios linfáticos viscerales es frecuente, pero no suele producir manifestaciones clínicas, salvo que compriman a otros órganos, como el intestino o un nervio. En el tejido nervioso, la lesión primaria afecta las raíces de los nervios periféricos y se propaga a lo largo del nervio hacia las meninges y los nervios raquídeos, lo cual induce el desarrollo progresivo de una parálisis posterior.

La piel, el aparato reproductor (útero) y los tejidos periorbitarios son asimismo localizaciones frecuentes de la enfermedad. En la forma cutánea se produce un engrosamiento intradérmico, por acumulación de linfocitos neoplásicos, que persiste sin provocar ruptura del epitelio. La infiltración de los tejidos periorbitarios suele provocar exoftalmos (Radostits, et al., 2002).

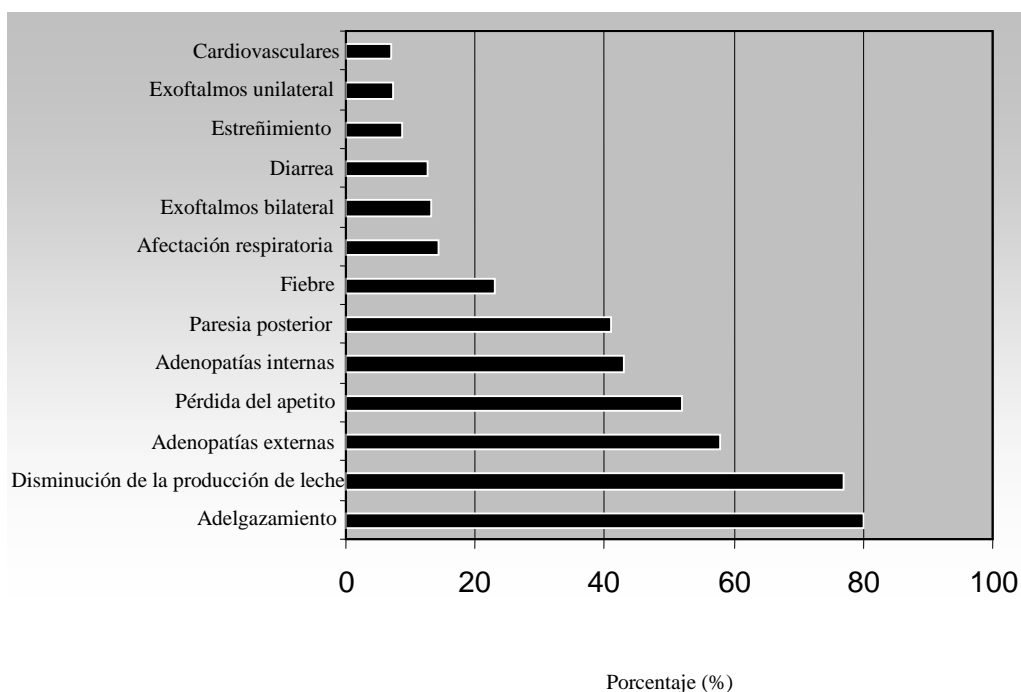


Figura 1. Frecuencia de los signos predominantes de la LBE determinados en 1100 casos clínicos (Radostits, et al., 2002).

1.1.7. Diagnóstico de la LBE

El diagnóstico de la infección es importante para controlar o erradicar la infección con el VLVB en el ganado bovino (Chapizo, 2005). El diagnóstico definitivo depende del estudio analítico del animal. Existen varias técnicas diagnósticas aplicables y es importante seleccionar la más adecuada para cada fase concreta de la enfermedad:

- El diagnóstico de la infección viral se realiza mediante técnicas serológicas o técnicas directas.
- La LP se identifica mediante el estudio hematológico (leucograma).
- Los tumores neoplásicos (linfoma) se diagnostican mediante las manifestaciones clínicas y el estudio histológico de las muestras de biopsia (Radostits, et al., 2002).

Las pruebas serológicas o métodos indirectos (AGID, ELISA y “western blotting”) buscan la detección de anticuerpos contra el VLBV (Moreno y Dolz, 1990). Las dos pruebas serológicas comúnmente usadas son AGID y ELISA (Chapizo, 2005).

La prueba de ELISA tiene alta especificidad y sensibilidad (Moreno y Dolz, 1990) y ha sido adaptada para detectar anticuerpos en el suero o leche de un individuo o de un grupo de individuos (Monti, 2005). Esta prueba consiste en absorber antígenos a una placa de microtítulo de poliestireno, agregar el suero de los animales y hacer una reacción de “sándwich” usando un conjugado enzimático (ejemplo un anticuerpo de conejo anti-anticuerpos de vaca, el cual está ligado a una enzima), el que se une a los anticuerpos bovinos que reaccionan con los antígenos virales de la placa. Finalmente el ensayo se revela usando el sustrato específico para la enzima, el cual da una reacción de color medible en un espectrofotómetro de luz. Por su alta sensibilidad, relativa simplicidad, rapidez, facilidad de procesar un gran número de muestras, lectura objetiva y automatización, el ELISA es considerado como la prueba más adecuada para futuros muestreos y programas de control en Costa Rica (Dolz y Moreno, 1999). La desventaja del ELISA es que pueden aparecer resultados falsos positivos, sobre todo cuando se está iniciando un programa de control (Straub, 1990).

Las pruebas directas para el diagnóstico del VLBV incluyen métodos donde se detecta la presencia del virus o algún producto del virus, ya sea una enzima, una proteína o el genoma del

virus. Dentro de los métodos directos se reportan: la microscopia electrónica (ME), que fue la primera técnica en utilizarse (Moreno y Dolz, 1990), la actividad de la TR, el “dot-blot” (detección del provirus) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual consiste en amplificar varios millones de veces el genoma del virus en las células infectadas (Chapizo, 2005).

1.1.8. Control y erradicación de la LBE

Los programas de erradicación de la LBE se han basado en 3 diferentes estrategias de acción (Chapizo, 2005). En la primera estrategia, los animales infectados con el VLVB son identificados mediante pruebas serológicas como AGID o ELISA. Los bovinos seropositivos son descartados y destinados al sacrificio, pagando una indemnización al ganadero (Digiacomio, 1992). El remover todos los animales seropositivos del hato reduce rápidamente la prevalencia del VLVB (Johnson y Kaneene, 1991d). La ventaja es que la infección se logra eliminar en varios meses, inclusive en hatos con alta prevalencia. La desventaja es el gran impacto económico, por lo que se recomienda solamente para hatos con bajas prevalencias (Digiacomio, 1992).

Una segunda estrategia se basa en la realización de pruebas serológicas y segregación de animales seropositivos de negativos. Las vacas seropositivas se conservan pero se mantienen separadas. El éxito de este programa depende de la distancia física entre el ganado infectado y el no infectado (Digiacomio, 1992). Estudios previos demostraron, que una distancia mínima de al menos 200m entre los grupos es suficiente para evitar la transmisión del virus (Monti, 2005). La ventaja de este método es que el ganado infectado no se descarta prematuramente del hato. Las desventajas son, que se necesitan instalaciones adecuadas para mantener separados los dos

grupos y que se requiere un muestreo frecuente de los animales. Dependiendo de la prevalencia inicial y distribución de la infección, puede tomar años en eliminar la infección del VLVB del hato (Digiacomio, 1992).

La tercera estrategia para eliminar la infección del VLVB es a través de pruebas serológicas y el uso de medidas correctivas de manejo (Digiacomio, 1992). Esta opción es recomendada para hatos cuya prevalencia del VLVB es considerada muy alta para descartar los animales seropositivos (Johnson y Kaneene, 1991d). La ventaja es el impacto económico relativamente bajo en el hato, con respecto a las dos estrategias mencionadas con anterioridad. Las vacas seropositivas no tienen que ser descartadas o segregadas, sin embargo deben implementarse cambios en el manejo de la finca y se requieren sangrados periódicos. Dependiendo de la prevalencia y distribución de la infección, la eliminación de la infección del VLVB puede tomar años. Para prevenir la transmisión del VLVB dentro de un hato se debe evitar la transferencia de células (linfocitos B) de animales infectados a animales no infectados (NYSCHAP, 2007). Algunas de las medidas de manejo recomendadas son:

1. Usar una aguja individual (Mora, 1997).
2. Lavar y desinfectar cualquier instrumento potencialmente contaminado con sangre, como equipo de tatuaje, areteadoras, nariceras, renetas y equipo quirúrgico(NYSCHAP, 2007).
3. Realizar el descorne preferiblemente con la descornadora eléctrica en edades tempranas, en lugar de usar sierra o cuchilla, ya que ambos causan hemorragias (Johnson y Kaneene, 1991d; NYSCHAP, 2007).
4. Usar un guante individual (Mora, 1997).
5. Usar inseminación artificial (IA) con semen negativo (NYSCHAP, 2007).

6. Usar toros seronegativos (Mora, 1997).
7. Limpiar el parto de maternidad después de cada parto o usar un parto diferente, para que la sangre de la vaca recién parida no pueda infectar animales susceptibles (NYSCHAP, 2007).
8. Criar las terneras en corrales separados (Mora, 1997).
9. No utilizar leche de vacas seropositivas al VLVB ni leche mastítica en la cría de terneras (Mora, 1997).
10. Si es un área problemática por gran densidad de insectos, entonces instaurar un programa de control de vectores que sea eficiente; especialmente controlar la población de tábanos (Johnson y Kaneene, 1991d).
11. Separar animales con bronconeumonías o mastitis (Mora, 1997).
12. Realizar análisis periódicos de sangre para detectar el virus en los animales del hato, a partir de los seis meses de edad (Johnson y Kaneene, 1991d).
13. Realizar el examen serológico a animales comprados (Mora, 1997).

1.2. Justificación

Las implicaciones de la LBE son múltiples. Por un lado, el VLVB disminuye las defensas de los animales infectados, con lo cual se predispone a la presentación de otras enfermedades, ya sea de tipo parasitario, bacteriano o viral, que repercuten negativamente en la producción y la reproducción de esos animales, además obligan al ganadero a desembolsar recursos en servicios veterinarios especializados y tratamientos adecuados. Otra consecuencia importante de esta enfermedad es la muerte de animales, que puede oscilar entre un 10% y 20% por año en un hato, siendo estos animales generalmente de alto valor genético y productivo.

Finalmente restricciones en la exportación, disminuyen la entrada de divisas a nuestro país y el decomiso de carcasas contaminadas en el matadero (Jiménez, 1990).

El presente trabajo pretendió determinar la prevalencia actual del VLVB a nivel de animal, finca, raza y edad en hatos lecheros especializados de Costa Rica; además determinar los factores asociados a la seropositividad del VLVB, para recomendar medidas de manejo que reduzcan su propagación dentro de los hatos lecheros y así procurar el bienestar animal y máxima productividad.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Investigar la epidemiología de la LBE en hatos lecheros especializados de Costa Rica.

1.3.2. Objetivos específicos

- ❖ Determinar la seroprevalencia de la LBE a nivel de finca y a nivel de animal en 76 hatos lecheros especializados de Costa Rica mediante la prueba de ELISA.
- ❖ Determinar la seroprevalencia de la LBE a nivel de número de lactancia (novillas, vacas de 1 a 3 lactancias y vacas de más de 3 lactancias) y en diferentes razas bovinas.
- ❖ Determinar mediante una encuesta los principales factores asociados a la seroprevalencia del VLVB en los hatos participantes.
- ❖ Recomendar medidas correctivas de bajo costo y fáciles de realizar para disminuir la propagación del virus dentro las fincas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de hatos

Para la investigación se seleccionaron un total de 76 fincas lecheras especializadas, cuyos propietarios estuvieron anuentes a participar en el proyecto y cumplieron con los siguientes requisitos: debían tener y utilizar el programa VAMPP Bovino, contestar una encuesta para obtener información sobre el manejo general de la finca y enviar una muestra de sangre representativa de los animales del hato mayores de 6 meses. La ubicación geográfica de las fincas no fue relevante, debido a que el virus es endémico en Costa Rica.

2.2. Tamaño de la muestra y ejecución del sangrado

El número total de 76 fincas resultó de la aplicación de la fórmula para calcular el tamaño de muestra necesaria con una población base de 1600 fincas lecheras, y asumiendo un 90% de prevalencia, 5% error aceptado y 90% confianza, según Noordhuizen *et al.*, 1997 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Fórmula para calcular el tamaño de muestra para estimar una proporción (Noordhuizen *et al.*, 1997).

$$n = \frac{Z\alpha^2 * DE^2}{L^2}$$

En donde:

- n = número de animales a muestrear
- $Z\alpha$ = se determina con el valor de confianza y con éste se determina el número correspondiente (Z) de unidades de desviación estándar (DE)
- DE = desviación estándar para una distribución binominal, la cual es $p * (100-p)$ cuando se calcula en porcentaje
- L = intervalo, en donde con una probabilidad X% el verdadero promedio de la población se va a encontrar dentro del intervalo del promedio $\pm L$.

Dentro de cada finca se muestreó un número de animales suficiente para comprobar una prevalencia mínima esperada del 10%, 5% error aceptado y 95% de confianza, según la fórmula de cálculo de muestra para una distribución binominal (Cuadro 1). Para la toma de las muestras se dividió el hato en tres grupos representativos: el grupo de novillas mayores de seis meses, el grupo de vacas con tres lactancias o menos y el grupo de vacas con más de tres lactancias. Las muestras de sangre de los animales se tomaron de manera aleatoria y equitativa en cada grupo tomando en cuenta la totalidad de vacas presentes en el hato (Cuadro 2), ésto con el fin, de que la prevalencia fuera lo más cercano a la realidad del hato.

Cuadro 2. Número de animales a muestrear por finca, para determinar la prevalencia de VLVB dentro de cada hato (10% prevalencia esperada, 5% error aceptado y 95% confianza).

N° animales en el hato	N° animales requeridos
< 30	28
30-39	28-35
40-49	36-42
50-59	43-49
60-69	50-56
70-79	57-63
80-89	63-68
90-99	69-74
100-119	75-85
120-139	85-94
140-159	95-103
160-179	103-111
180-199	111-118
200-229	119-128
230-259	128-137
260-289	137-145
290-320	145-152
320-370	152-162
370-450	162-176
> 450	176

Las muestras fueron tomadas de la vena coccígea media para facilitar el proceso y minimizar el estrés de los animales, con previa desinfección del sitio de sangrado, mediante torundas de yodo-alcohol, y con vacutainer. Las muestras se depositaron en tubos al vacío sin anticoagulante, debidamente identificadas y se transportaron en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Virología de la EMV-UNA.

2.3. Procesamiento de las muestras (ensayo serológico)

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm con el fin de separar el suero de la sangre y luego ser analizadas para detectar anticuerpos contra el VLVB mediante las pruebas de ELISA de las casas comerciales VMRD® y Svanova, siguiendo las instrucciones que las compañías recomiendan. En el caso del ELISA de VMRD®, el procedimiento consistía en agregar a la placa con antígeno (gp51) 50 µl de los sueros a analizar y sueros controles diluidos 1:25 en buffer de dilución e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó el lavado de la placa, agregando 200 µl de solución de lavado a cada pocito, repitiendo 3 veces. Seguido, se agregaron 50 µl del conjugado (anticuerpos de cabra contra inmunoglobulinas de vaca conjugados con peroxidasa) a cada pocito de la placa, previamente diluido 1:100 en solución de lavado, y se volvió a incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el procedimiento de lavado de la placa descrito anteriormente, se agregó a cada pozo 50 µl de solución de sustrato (TMB) y se volvió a incubar por 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 50 µl de la solución de parado a cada pocito y se determinó la densidad óptica (DO) de cada pocito a 620 nm en un espectrofotómetro. El promedio de los controles negativos tenía que mostrar una DO menor de 0.200 y la DO promedio de los controles positivos debía de caer en el rango entre \geq

0.250 y < 2.000 para poder validar los resultados. Las muestras que mostraron una DO mayor o igual al promedio de la DO de los controles positivos se debían de considerar positivas al VLVB, muestras con una DO menor al promedio de la DO de los controles positivos se debían de considerar como negativas al VLVB. Sin embargo, en el presente estudio se consideraron como sospechosas muestras con $DO \pm 0.200$ con respecto al promedio de los controles positivos y se volvieron a muestrear y analizar 15 días después. La compañía VMRD® reporta un 98% de sensibilidad y un 100% de especificidad para esta prueba (VMRD, 1999).

La prueba de Svanova también fue diseñada para detectar anticuerpos específicos contra la gp51 del VLVB en suero y en leche. El procedimiento consistió en colocar 100 μ l del buffer de dilución en cada pozo de la placa con antígeno (gp51), luego se agregó 4 μ l de suero de las muestras y de los controles (por duplicado) y se incubó en una cámara a 37°C durante 60 minutos. Se realizó el lavado de la placa con 200 μ l de buffer de lavado por pocito, repitiendo 3 veces, luego se agregó 100 μ l del conjugado (anticuerpos monoclonales anti IgG bovina conjugados con peroxidasa) a cada pozo y se volvió a incubar durante 60 minutos a 37°C. Se repitió el lavado de la placa como descrito arriba, se le agregó 100 μ l de la solución de sustrato (TMB) y se incubó durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se le agregó a cada pozo 50 μ l de la solución de paro (ácido sulfúrico) y se determinó la DO de cada pocito a 450 nm en un espectrofotómetro. La prueba fue válida, si el promedio de la DO de los controles positivos era mayor a 1.0 y la DO promedio de los controles negativos era menor a 0.1. Los resultados se reportaron como porcentajes de positividad (PP), multiplicando la DO de la muestra o del control negativo por 100 y dividiéndolo entre la DO promedio de los controles positivos. Si el PP de la muestra era $< 10\%$ se consideró negativa y muestras con $PP \geq 10\%$ se

consideraron positivas al VLVB. La compañía reporta un 100% de sensibilidad y 99.7% de especificidad para esta prueba (Svanova, 2007).

2.4. Recolección de datos

2.4.1. Resultados de las pruebas serológicas (ELISA)

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas, se transfirieron a una hoja en Excel en la cual se generó la base de datos llamada estatus, donde estaba recopilada la siguiente información: finca, animal, estatus y fecha de sangrado.

2.4.2. Recolección de datos del VAMPP

Otra base de datos que se utilizó fue la del programa VAMPP existente en el Centro Regional de Informática en Producción Animal Sostenible (CRIPAS) de la EMV-UNA. La base de datos de CRIPAS fue utilizada para extraer algunos datos (animales por finca, identificación de la vaca, raza y lactancia) y crear otra base de datos.

2.4.3. Aplicación de la encuesta (variables)

Al propietario o encargado de la finca se le entrevistó para obtener información relevante sobre las prácticas de manejo en la misma. La encuesta fue diseñada de forma que fuera fácil de entender, práctica y rápida de contestar (Anexo 1). Las preguntas de la encuesta se basaron en recopilar información básica de la finca e información sobre las prácticas de manejo realizadas en las diferentes fincas, que representan un riesgo en la transmisión del VLVB. La encuesta estaba estructurada de la siguiente manera:

- ❖ Información de la finca (altitud, número total de animales).

- ❖ Conocimiento acerca de leucosis (si realizaban exámenes serológicos, implementaban medidas de control).
- ❖ Reproducción (si utilizaban monta natural, realizaban palpaciones rectales).
- ❖ Manejo de terneras (si utilizaban calostro de vacas positivas y leche mastítica).
- ❖ Manejo de los animales (desinfección de equipo quirúrgico, inyectables).
- ❖ Manejo de vectores (tábanos, vampiros).
- ❖ Historia clínica de la finca (mastitis).
- ❖ Comentarios (para alguna anotación extra).

Los resultados de la encuesta fueron codificados, pasando las respuestas a números, para realizar el análisis estadístico. A partir de ésta se generó un archivo ASCII con las variables (prácticas de manejo) en estudio, el cual fue procesado utilizando los paquetes de cómputo que se detallarán posteriormente.

2.5. Análisis estadístico

2.5.1. Estadística descriptiva e inferencial

La estadística descriptiva se realizó mediante distribución de frecuencias y medidas de tendencia central y de dispersión, utilizando el proceso PROC FREQ del paquete estadístico SAS/STAT® (ver 8.01), para determinar la prevalencia del VLVB a nivel de animales (absoluta), de finca, de grupos por lactancias, de razas y de variables (factores de riesgo).

Asimismo, se utilizó el programa EpiInfo 6.0, donde se utilizó el muestreo simple aleatorio para calcular los límites superior e inferior (binomio exacto 95% IC) de los datos. Los resultados son estadísticamente significativos si los datos y sus límites respectivos no se entrecruzan entre sí.

Se hizo una categorización de la prevalencias, tomando como referencia la prevalencia absoluta determinada. Las categorías fueron prevalencia muy alta (81%-100%), alta (61%-80%), media (31%-60%), baja (11%-30%) y muy baja (0%-10%); también se determinó la prevalencia por provincias.

2.5.2. Determinación de los factores asociados con la prevalencia al VLVB

Para evaluar la relación de la positividad al VLVB con los factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos (características de las vacas y los factores asociados a la transmisión del VLVB, respectivamente), por medio del estudio de casos y controles, se utilizó la regresión logística (LR) con efecto aleatorio, utilizando el programa EGRET®, siendo la variable estatus la que confiere el efecto. El procedimiento logístico consistió de dos fases: un análisis univariado y un análisis multivariado, que buscaron la determinación de las razones de probabilidad (Odds Ratios) crudos y ajustados, respectivamente.

En el análisis univariado, se determinó la magnitud y la dirección de la asociación de cada variable independiente con la variable dependiente, mediante el cálculo de los Odds Ratio (OR).

En el análisis multivariado se tomaron las variables que en el análisis univariado presentaron un valor de $p < 0.25$. El proceso de exclusión-inclusión de cada variable en el modelo multivariado permitió la evaluación de la presencia de confusión y modificación de efecto por comparación de los coeficientes estimados en el nuevo modelo, con los coeficientes estimados y la razón de verosimilitud (likelihood ratio) del modelo precedente. Se estimó que una variable es confusa cuando el coeficiente de alguna variable de exposición cambió más de 0.1 (si el coeficiente tuvo un valor entre -0.4 y 0.4) o si al menos un coeficiente cambió más de un

25% (si el coeficiente tuvo un valor <-0.4 o >0.4). Finalmente, las variables que fueron excluidas en la primera fase fueron revisadas para determinar la existencia de colinearidad con las variables presentes en el modelo final por medio del cálculo de correlaciones simples. Si la correlación fue superior o igual a 60% y el valor de $p < 0.05$ se estimó que ambas variables tuvieron similar dirección y magnitud en la asociación con la positividad al VLVB. Las variables confusoras se mantuvieron en el modelo final, y las que produjeron modificación del efecto de las variables de exposición fueron analizadas desde la interacción.

Se calculó además la fracción atribuible en los expuestos y la fracción atribuible en la población, para determinar los factores con mayor efecto y priorizar las medidas de intervención a recomendar.

2.6. Recomendación de medidas correctivas

Una vez analizados los resultados, tanto del estudio serológico como de la encuesta, se procedió a comunicar a los propietarios o encargados acerca de las medidas correctivas a ejecutar en la finca para disminuir la transmisión del VLVB, además se les entregó a los productores un documento, en el cual se les dieron algunos consejos prácticos para controlar la transmisión del VLVB dentro del hato (Anexo 2). Es importante recalcar que quedó a criterio del propietario si deseaba seguir las recomendaciones y no se controló la implementación de las mismas en las fincas.

3. RESULTADOS

Se recolectó un total de 8518 sueros en 76 fincas lecheras especializadas entre enero del 2006 hasta diciembre del 2007. Los resultados obtenidos muestran, que de las 76 fincas analizadas, 74 poseían al menos un animal positivo al VLVB, obteniéndose una prevalencia de 97,4% hatos positivos al VLVB. Únicamente en 2 fincas (2,6%) no se encontraron reactores positivos. Una de estas fincas pertenecía a un médico veterinario, que inició con un programa de control y erradicación de la LBE en su finca hace aproximadamente 15 años. En la otra finca se determinó la utilización de medidas de manejo adecuadas aunado a la realización de exámenes serológicos periódicos para el control de la LBE. De este total de 8518 sueros analizados mediante ELISA, 3496 animales resultaron positivos, determinándose una prevalencia absoluta del VLVB del 41,0% en hatos lecheros especializados de Costa Rica.

La distribución de las prevalencias determinadas en las 76 fincas se muestra en la Figura 2. Las prevalencias del VLVB a nivel de fincas no mostraron tendencia a un valor en común y se distribuyeron dentro de un amplio rango, desde un 0% (mínima) hasta un 90,7% (máxima). Los resultados de las prevalencias determinadas en cada finca se detallan en el Anexo 3.

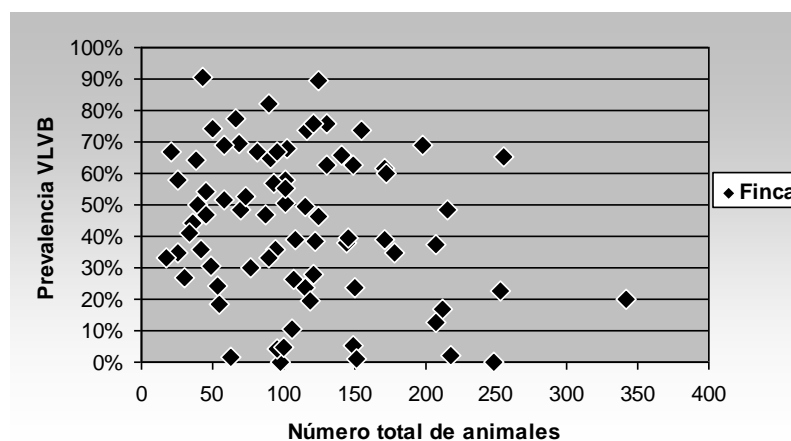


Figura 2. Distribución de 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica según la prevalencia del VLVB y número total de animales presentes en cada finca.

La clasificación de las 76 fincas participantes en las 5 categorías, según las prevalencias obtenidas, determinó un 10,5% de fincas con prevalencia muy baja, un 18,4% con prevalencia baja, un 27,6% con prevalencia media, un 39,5% con prevalencia alta y un 4,0% con prevalencia muy alta (Figura 3).

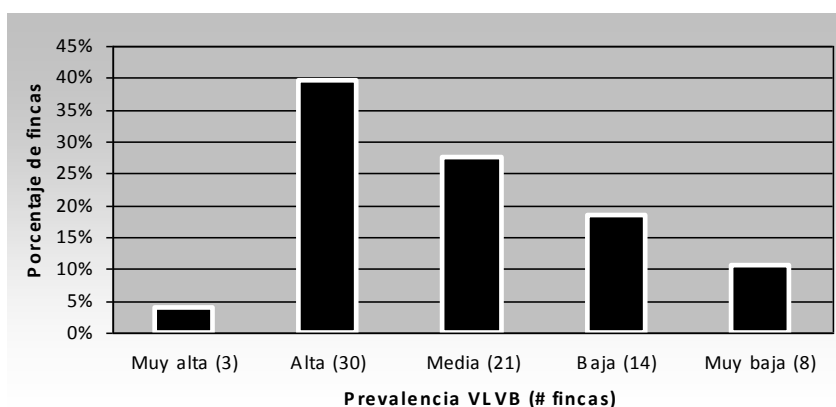


Figura 3. Categorización según las prevalencias al VLVB determinadas en 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.

Las fincas participantes se encontraban ubicadas en las principales zonas lecheras del país y distribuidas por provincias de la siguiente manera: 44 en Alajuela, 14 en Cartago, 10 en Heredia, 7 en San José y 1 en Guanacaste. Las prevalencias determinadas a nivel de provincias se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Seroprevalencia del VLVB en diferentes provincias de Costa Rica.

Provincia	Fincas	Animales	%
	Positivas / Total	Positivos / Total	
San José	7 / 7	270 / 503	53,7
Guanacaste	1 / 1	39 / 74	52,7
Alajuela	44 / 44	2398 / 4781	50,2
Heredia	9 / 10	417 / 1409	29,6
Cartago	13 / 14	372 / 1751	21,3
TOTAL	74 / 76	3496 / 8518	41,0

Los 8518 sueros bovinos analizados se distribuyeron por razas de la siguiente manera: 2174 Holstein, 1900 Jersey, 315 Holstein x Jersey (Chumeca) y 4128 otras razas o cruces. Los resultados de la prevalencia del VLVB obtenidos a nivel de razas se muestran en el Cuadro 4. Se determinó una alta prevalencia del VLVB en animales de la raza Holstein (50,6%) y una baja prevalencia en la raza Jersey (23,1%). Se establecieron únicamente diferencias significativas entre la prevalencia del VLVB de la raza Jersey con respecto a las demás razas analizadas (Cuadro 4).

La prevalencia del VLVB determinada en los diferentes grupos etarios fue un 21,2% para el grupo de las novillas, un 42,7% para el grupo de 1-3 lactancias y un 52,9% para el grupo de ≥ 4 lactancias. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia del VLVB en el grupo de novillas, con respecto a las prevalencias en los otros dos grupos de vacas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de los casos de seropositividad al VLVB y límites, según los factores intrínsecos de 76 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.

Variable	Estrato	N	Casos	%	LI	LS
Razas	Holstein	2174	1099	50,6	48,4	52,8
	Jersey	1900	438	23,1	21,2	25,0
	Holstein x Jersey	315	149	47,3	41,7	53,0
	Otras	4128	1810	43,9	42,3	45,4
N° de lactancias	0 lactancias	1347	286	21,2	19,1	23,5
	1-3 lactancias	2273	971	42,7	40,1	44,8
	≥ 4 lactancias	1075	569	52,9	49,9	55,9

* N: número total de animales muestreados, LI: límite inferior, LS: límite superior

El análisis de factores de riesgo asociados a seropositividad del VLVB se realizó con datos de 55 fincas (6287 animales), ésto debido a que no se pudo obtener encuestas del total de

los 76 productores participantes. En el Cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos en el análisis descriptivo de los factores de riesgo extrínsecos al animal en la transmisión del VLVB determinado en estas 55 fincas. Fincas que realizaban medidas de manejo como la no desinfección del equipo de identificación de las terneras, el no utilizar un guante por animal durante la palpación, el no utilizar una aguja por animal, el no utilizar únicamente I.A en la reproducción, el no realizar exámenes serológicos a los machos reproductores, el no tener un hato cerrado (comprar animales), el no calentar el calostro para las terneras, el no utilizar únicamente reemplazador en terneras y el no separar físicamente las vacas con mastitis, mostraron porcentajes de seropositividad del VLVB más altos que fincas que no realizaban estas medidas de manejo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de la seropositividad del VLVB según factores de riesgo extrínsecos (medidas de manejo) en la transmisión del VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.

Respuesta Factor de riesgo	SI				NO			
	N	Casos	%	#Fincas	N	Casos	%	#Fincas
Desinfectan equipo de identificación	4573	1504	32,9	37	1536	919	59,8	16
Utilizan guante individual al palpar	4646	1565	33,7	38	1641	977	59,5	17
Utilizan aguja individual	5137	1913	37,2	43	952	543	57,0	9
Utilizan únicamente I.A	3709	1193	32,2	31	2578	1349	52,3	24
Compran animales a otras fincas	892	459	51,5	12	5395	2083	38,6	43
Calientan el calostro	683	121	17,7	3	5604	2421	43,2	52
Utilizan reemplazador	3257	1208	37,1	28	2658	1154	43,4	24
Separan físicamente vacas con mastitis	343	63	18,4	2	5466	2333	42,7	47
Machos reproductores tienen examen VLVB	637	305	47,9	4	2113	1111	52,6	21
Alimentan leche mastitífica a terneras	2885	1254	43,5	25	2268	942	41,5	20
Presencia de murciélagos	3883	1475	38,0	31	2404	1067	44,4	24
Presencia de tábanos	1612	547	33,9	17	4577	1995	43,6	37

* N: número total de animales muestreados

El análisis estadístico inferencial de estos factores de riesgo, en donde se calcularon límites, determinó las siguientes variables como estadísticamente significativas: la no desinfección del equipo de identificación, el no utilizar un guante y aguja individual, el no utilizar únicamente I.A, el comprar animales de otras fincas, el no calentar el calostro, el no utilizar reemplazador y el no separar físicamente las vacas con mastitis. Las demás variables no resultaron estadísticamente significativas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Factores de riesgo extrínsecos, positividad al VLVB y límites, en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.

Variable	Estrato	(%)	LI	LS
Desinfectan equipo de identificación	SI	32,9	31,5	34,8
	NO	59,8	57,3	62,3
Utilizan guante individual al palpar	SI	33,7	32,3	35,1
	NO	59,5	57,1	61,9
Utilizan aguja individual	SI	37,2	35,9	38,6
	NO	57,0	53,8	60,2
Utilizan únicamente I.A	SI	32,2	30,7	33,7
	NO	52,3	50,4	54,3
Compran animales a otras fincas	SI	51,5	48,1	54,8
	NO	38,6	37,3	39,9
Calientan el calostro	SI	17,7	14,9	20,8
	NO	43,2	41,9	44,5
Utilizan reemplazador	SI	37,1	35,4	38,8
	NO	43,4	41,5	45,3
Separan físicamente vacas con mastitis	SI	18,4	14,4	22,9
	NO	42,7	41,4	44,0
Machos reproductores tienen examen VLVB	SI	47,9	43,9	51,8
	NO	52,6	50,4	54,7
Alimentan leche mastitíca a terneras	SI	43,5	41,6	45,3
	NO	41,5	39,5	43,6
Presencia de murciélagos	SI	38,0	36,5	39,5
	NO	44,4	42,4	46,4
Presencia de tábanos	SI	33,9	31,6	36,3
	NO	43,6	42,1	45,0

* LI: límite inferior, LS: límite superior

Los resultados del análisis univariado por medio de regresión logística de los factores intrínsecos (raza y lactancia) y extrínsecos (medidas de manejo) se muestran en el Cuadro 7. Con respecto a las razas se determinó, que la raza Jersey tiene 3.4 (IC95%: 3.0 – 3.9) veces menos probabilidades de ser seropositiva al VLVB que la raza Holstein, que el grupo demás razas (OR 1.3, IC95%: 0.9-1.5) y que el grupo media raza Holstein x Jersey (OR 1.1, IC95%: 0.9-1.5) (Cuadro 7).

Respecto a las lactancias se pudo determinar, que el riesgo de ser seropositivo al VLVB aumenta con el número de lactancias. El grupo de vacas de 1-3 lactancias tiene 2.8 veces (IC95%: 2.4 – 3.2) más probabilidades de ser seropositivo al VLVB, y en vacas de ≥ 4 lactancias (OR 4.2, IC95%: 3.5 – 5.0) esta probabilidad es casi el doble, con respecto al grupo de las novillas.

En relación con los factores de transmisión extrínsecos, se determinó que las vacas de las fincas en donde no hay desinfección del equipo de identificación, no se usa guante individual al palpar y no se utiliza aguja individual por animal tienen más probabilidades (OR 3.0, IC95%: 2.7 – 3.4, OR 2.9, IC95%: 2.5 – 3.2, OR 2.2, IC95%: 1.9 – 2.6, respectivamente) de ser positivas al VLVB.

En cuanto a la reproducción se determinó que los bovinos de fincas en donde se utiliza MN (ya sea solo MN o MN + IA), tienen un riesgo aumentado de ser seropositivos al VLVB comparado con vacas de fincas donde se utiliza únicamente IA (Cuadro 7).

En el caso de fincas que no poseen el sistema de hato cerrado, se pudo determinar que tienen un OR de 1.7 (IC95%: 1.5 – 1.9), lo cual se traduce en más probabilidades de que estos hatos presenten animales positivos al VLVB.

En el manejo de terneras se determinó que el no calentar el calostro de vacas positivas al VLVB y el no usar reemplazador, conlleva a un riesgo más alto de positividad al VLVB (Cuadro 7). En contraste, el uso de la leche de vacas con mastitis no resultó ser una práctica de riesgo significativa en la diseminación del virus.

En relación a la separación física de las vacas con mastitis, se determinó un riesgo aumentado (OR 3.3, IC95%: 2.5 -4.4) en los que no separan las vacas con mastitis de animales sanos.

Finalmente se determinó que la importancia de los vectores mecánicos (murciélagos y tábanos) en la transmisión del VLVB no es significativa, debido a que su presencia o ausencia conlleva a un riesgo más alto de positividad al VLVB en los animales (Cuadro 7).

En el análisis multivariado se determinó que dentro de los factores extrínsecos, las variables de no desinfección del equipo de identificación, no uso de guante individual al palpar, no uso de aguja individual por animal, no uso únicamente de I.A, no tener un hato cerrado, no calentamiento del calostro de vacas positivas al VLVB y no separación física de las vacas con mastitis del resto del hato fueron los factores de riesgo para la transmisión del VLVB. En general, las magnitudes y direcciones de las asociaciones entre las variables de estudio con la variable positividad al VLVB que se observaron en el análisis univariado se mantuvieron durante el análisis multivariado. Las variables de alimentación de terneras con leche de vacas con mastitis y presencia de murciélagos, continuaron siendo no significativas. Las variables de presencia de tábanos, machos usados en reproducción tienen exámenes al VLVB y utilización de reemplazador en la cría de terneras salieron del modelo, pues perdieron significancia estadística (Cuadro 8).

Cuadro 7. Determinación de los factores de riesgo intrínsecos y extrínsecos relacionados a la seropositividad al VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica, determinado mediante análisis univariado.

Variable	Estrato	N	OR	IC 95%		P
				LI	LS	
Razas	Holstein	2174	-			
	Jersey	1900	0.3	0.3	0.3	<0.001
	Holstein x Jersey	315	0.9	0.7	1.1	0.3
	Otras	4128	0.8	0.7	0.8	<0.001
N° de lactancias	0 lactancias	1347	-			
	1-3 lactancias	2273	2.8	2.4	3.2	<0.001
	≥ 4 lactancias	1075	4.2	3.5	5.0	<0.001
Desinfectan equipo de identificación	Si	4573	-			
	No	1536	3.0	2.7	3.4	<0.001
Utilizan guante individual al palpar	Si	4646	-			
	No	1641	2.9	2.5	3.2	<0.001
Utilizan aguja individual	Si	5137	-			
	No	952	2.2	1.9	2.6	<0.001
	Aveces	198	1.3	1.0	1.7	0.08
Utilizan únicamente I.A	I.A	3709	-			
	MN	216	4.0	3.0	5.5	<0.001
	I.A + MN	2362	2.2	2.0	2.5	<0.001
Compran animales a otras fincas	Si	892	-			
	No	5395	0.6	0.5	0.7	<0.001
Calientan el calostro	Si	683	-			
	No	5604	3.5	2.9	4.4	<0.001
Utilizan reemplazador	Si	3257	-			
	No	2658	1.3	1.2	1.4	<0.001
	Aveces	372	1.5	1.3	2.0	<0.001
Separan físicamente vacas con mastitis	Si	343	-			
	No	5466	3.3	2.5	4.4	<0.001
	Aveces	396	1.3	0.9	1.9	0.1
Machos reproductores tienen examen VLVB	Si	637	-			
	No	2113	1.2	1.0	1.4	0.04
Alimentan leche mastitífica a terneras	Si	2885	-			
	No	2268	0.9	0.8	1.0	0.2
	Aveces	1134	0.6	0.5	0.7	<0.001
Presencia de murciélagos	Si	3883	-			
	No	2404	1.3	1.2	1.4	<0.001
Presencia de tábanos	Si	1612	-			
	No	4577	1.5	1.3	1.7	<0.001

* N: número total de animales muestreados, OR: razones de probabilidad, LI: límite inferior, LS: límite superior

Cuadro 8. Resultados del análisis multivariado de los factores de riesgo extrínsecos asociados a seropositividad al VLVB en 55 fincas lecheras especializadas de Costa Rica.

Variable	Estrato	N	OR	IC 95%		P
				LI	LS	
Desinfectan equipo de identificación	Si	4573	-			
	No	1536	2.0	1.7	2.3	<0.001
Utilizan guante individual al palpar	Si	4646	-			
	No	1641	2.5	2.0	3.0	<0.001
Utilizan aguja individual	Si	5137	-			
	No	952	0.4	0.3	0.5	<0.001
	Aveces	198	22.0	8.5	56.7	<0.001
Utilizan únicamente I.A	I.A	3709	-			
	MN	216	3.4	2.4	4.7	<0.001
	I.A + MN	2362	1.8	1.6	2.0	<0.001
Compran animales a otras fincas	Si	892	-			
	No	5395	1.6	1.4	1.9	<0.001
Calientan el calostro	Si	683	-			
	No	5604	2.0	1.6	2.5	<0.001
Separan físicamente vacas con mastitis	Si	343	-			
	No	5466	2.3	1.7	3.2	<0.001
	Aveces	396	0.1	0.0	0.2	0.1
Alimentan leche mastitífica a terneras	Si	2885	-			
	No	2268	0.8	0.7	0.9	0.005
	Aveces	1134	0.6	0.5	0.7	<0.001
Presencia de murciélagos	Si	3883	-			
	No	2404	1.6	1.4	1.8	<0.001

* N: número total de animales muestreados, OR: razones de probabilidad, LI: límite inferior, LS: límite superior

4. DISCUSIÓN

La prevalencia a nivel de animales (41,0%) está en concordancia con los resultados reportados previamente en Costa Rica por Rodríguez (39%) en 1980 y Mora (38%) en 1997, pero contrasta con los resultados reportados por Jiménez *et al.* en 1995, donde se reportó una prevalencia del VLVB del 18,4%. La diferencia en los resultados se puede deber, a que la mayoría de sueros analizados por Jiménez y colaboradores provenían de hatos de ganado de carne, que fueron remitidos al Laboratorio de Virología (EMV-UNA) para su diagnóstico con fines de exportación. Como se reporta en la literatura, el ganado lechero en explotaciones intensivas se mantiene durante más tiempo en el hato y en contacto más cercano con otras vacas, lo que aumenta el riesgo de la transmisión del VLVB y por lo tanto su prevalencia (Jiménez *et al.*, 1995). Es importante también recalcar, que se trató de un reporte casuístico de laboratorio, que aunque refleja los resultados obtenidos en un periodo de 10 años (1983-1993), representa un estudio sesgado y no representativo de la realidad del ganado lechero especializado, además se utilizaba la inmunodifusión en gel de agar (AGID) como prueba diagnóstica. Sin embargo, concuerda con lo descrito ahí, donde predice que la infección del VLVB aumentaría en años futuros, debido a la ausencia de un control oficial y una regulación en el movimiento de animales infectados con el VLVB dentro de Costa Rica (Jiménez *et al.*, 1995).

En relación a las prevalencias encontradas a nivel de fincas, donde un total de 40 fincas (52,6%) se ubicaron con prevalencias superiores a la prevalencia absoluta determinada; la literatura describe que la prevalencia del VLVB es influenciada sobre todo por tres factores: a) prevalencia inicial dentro del hato, b) incidencia de tasa de infección (debido al conocimiento de la enfermedad, medidas de manejo realizadas e interés del productor en controlar la LBE) y c) tasa de segregación de animales sero-positivos de sero-negativos (Pollari *et al.*, 1993; Pollari *et*

al., 2003). Durante la realización del presente trabajo de investigación se brindó información y charlas sobre la LBE a los productores participantes y se determinó, que un alto porcentaje no conocían de la enfermedad y mucho menos de su modo de transmisión. El conocimiento de los factores de riesgo, en la transmisión de una enfermedad infecciosa es crucial para el control y la erradicación de la misma (Johnson y Kaneene, 1991b).

Es importante analizar cuidadosamente la información obtenida de las seroprevalencias a nivel de provincias. Por un lado, se trató de un análisis descriptivo y por otro lado, la prevalencia del VLVB en un hato depende más de las prácticas de manejo que de factores ecológicos (Pollari et al., 2003). En Guanacaste, por ejemplo se muestreó únicamente una finca, obviamente los resultados obtenidos en ésta no representan a la provincia. La prevalencia más alta se determinó en la provincia de San José (53,7%), debido probablemente a que los hatos muestreados eran pequeños (20 a 50 animales). Lo que concuerda con lo descrito por DiGiacomo (1992) que hatos pequeños (menos de 50 vacas) tienden a tener una proporción más alta de animales infectados con el VLVB que hatos más grandes. Las razones son, por un lado que en hatos pequeños es más probable el contacto directo entre una vaca positiva y una negativa al VLVB, que en hatos donde existe gran cantidad de animales. Por el otro lado, probablemente es resultado de un manejo diferente en la separación de los animales con respecto a su edad. En fincas pequeñas los animales jóvenes, inclusive las novillas prontas, son mantenidas en los mismos apartos con vacas adultas en lactación y además el área disponible es reducida comparada con el área más amplia que poseen los hatos grandes (Trainin y Brenner, 2005). En la provincia de Alajuela (50,2%) también se determinó una alta prevalencia del VLVB, aunque la mayoría de los hatos eran grandes (100-200 animales). Sin embargo, en estas

fincas se determinó, mediante la encuesta realizada, un alto porcentaje (75%) de desconocimiento de la LBE y su modo de transmisión.

La alta seropositividad y riesgo determinada en vacas de la raza Holstein posiblemente se deba, a que esta raza Holstein es más susceptible a desarrollar LP al contraer la infección con el VLVB (Trainin y Brenner, 2005). Los linfocitos provenientes de bovinos infectados con el VLVB y padeciendo LP, son más infectivos a dosis menores que los linfocitos de bovinos infectados con el VLVB y sin haber desarrollado LP (Kettmann et al., 1980). Por consiguiente, la transmisión del virus ocurre más fácilmente en hatos donde están presentes animales con LP (vacas Holstein o cruces con Holstein), ya que poseen una carga más alta de linfocitos infectados, representando así las principales fuentes diseminadoras del virus en el hato. Por el otro lado, es posible que la raza Jersey sea genéticamente más resistente a la infección con el VLVB y a no desarrollar LP. Según se describe en la literatura, vacas seleccionadas por su alta habilidad de transmitir grasa más proteína, tienen un riesgo más bajo de ser seropositivas al VLVB y solamente ciertas razas como Holstein-Friesian son susceptibles a desarrollar LP y tumores linfoides en varios órganos (Detilleux et al., 1991; Burgu et al., 1990). Lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación la asociación determinada con la media raza (Holstein x Jersey) fue la más débil, posiblemente porque estos animales tienen la mitad de la composición genética de la Jersey, lo cual les confiere cierta resistencia genética en comparación con las demás razas, de las cuales no se determinó la proporción genética de Holstein presente.

Los resultados obtenidos a nivel de grupos de lactancias, demuestran por un lado, lo reportado en la literatura sobre el aumento significativo de la prevalencia del VLVB en el ganado a partir de los 24 meses de edad, que es aproximadamente la edad en que los bovinos

ingresan al hato en producción. La incidencia aumenta con la edad de los animales, ya que son sometidos a un manejo más intensivo, el cual conlleva a un riesgo de infección, ya sea por aumento de la intervención humana (transmisión iatrogénica) o por contacto directo y prolongado con animales infectados (transmisión horizontal). El contacto físico cercano, así como las prácticas intensivas de manejo, son factores importantes en la transmisión del VLVB al ganado joven. Por otro lado, confirma lo que se ha reportado repetidamente en la literatura, que las infecciones prenatales con el VLVB ocurren en bajos porcentajes del 6% al 10% (Johnson y Kaneene, 1991a).

Los resultados obtenidos en los diferentes análisis estadísticos realizados con factores extrínsecos concuerdan con lo reportado en la literatura, sobre la importancia de la transmisión iatrogénica como principal ruta de transmisión del VLVB, y que ocurre, cuando los animales son manipulados sin el cuidado sanitario necesario (Monti, 2005). La no desinfección del equipo de identificación en terneras resultó estadísticamente significativo en el presente estudio y concuerda con lo reportado por Johnson y Kaneene (1991b) y Thurmond (1991) que describen, que los sitios (orejas y morro) usados frecuentemente para la identificación de terneras son altamente vascularizados y la presión aplicada durante el procedimiento puede fácilmente causar disrupción de la integridad de los vasos sanguíneos. El equipo puede actuar por consiguiente como fomite en la transferencia de sangre o linfocitos infectados y debe de ser desinfectado entre terneras.

Otro factor significativo determinado en la transmisión del VLVB fue el no utilizar un guante individual por vaca en la palpación rectal. Durante la palpación del ganado, frecuentemente ocurren hemorragias por lesiones de los vasos sanguíneos en la mucosa rectal, esta sangre puede contaminar el guante del examinador, por consiguiente la palpación rectal de

rutina con un solo guante para todos los animales es una forma efectiva de diseminación del VLVB en el ganado susceptible (Johnson y Kaneene, 1991b; Hopkins et al., 1988). La variable de no utilizar una aguja individual por animal también resultó significativa en el presente trabajo. La transmisión de volúmenes tan pequeños como 0,005ml (1000 células) de sangre mediante el uso de una aguja entre animales puede ocasionar la seroconversión de animales negativos, ya que permite el paso de linfocitos infectados (Mora, 1997).

En cuanto a la reproducción, se determinó que animales de fincas en donde se utilizaba únicamente I.A tenían prevalencias y riesgo más bajo que fincas donde se utilizaba monta natural (MN) o los 2 métodos juntos (MN + I.A). Esto se debe por un lado, a que la mayoría de los casos se desconoce el estatus sanitario de los toros utilizados en MN. El uso de toros seropositivos en la monta natural favorece la transmisión del VLVB por contacto físico directo del toro con vacas seronegativas (Jiménez, 1990). El VLVB no se disemina en el semen de un toro positivo sano, sin embargo, si este toro posee seminitis vesicular o alguna enfermedad reproductiva, el semen puede estar contaminado con linfocitos infectados con el VLVB (Choi et al., 2002; NYSCHAP, 2007). Por lo tanto el riesgo de transmitir el VLVB durante la I.A es limitado, si el equipo no se contamina con linfocitos infectados (Choi et al., 2002).

Las vacas de fincas donde compran animales tuvieron un porcentaje y riesgo de seropositividad más alto, debido probablemente a que estas fincas adquieren animales cuyo estatus sanitario es desconocido (Mora, 1997). Esto concuerda con lo citado por la literatura, donde se reporta una asociación significativa entre la introducción de animales nuevos al hato y brotes de LBE (Sargeant et al., 1997).

En fincas donde no calientan el calostro y no utilizan reemplazador en la crianza de terneras se determinó un porcentaje y riesgo de seropositividad más alto. El calentar el calostro

destruye la infectividad del virus, idealmente se debe de alimentar a las terneras solamente con reemplazador o con leche de vacas seronegativas (Sprecher et al., 1991; Thurmond, 1991).

La variable de no separación física de las vacas con mastitis resultó con un mayor porcentaje de seropositividad y riesgo. La razón es, que dependiendo del grado de mastitis la leche inclusive puede contener sangre, lo cual aumenta el número de linfocitos infectados en la leche, los cuales pueden ser transmitidos a otros animales por contacto físico (Mora, 1997). Una práctica de manejo que se recomienda para disminuir la transmisión del VLVB, es aislar las vacas infectadas con el VLVB con infecciones exudativas, en especial cuando esta condición puede resultar en exposición a otras vacas, sobre todo vacas con mastitis (DiGiacomo, 1992).

La transmisión del VLVB por medio de vectores no resultó ser significativa, ésto concuerda con lo reportado en la literatura, donde los contagios por insectos hematófagos se han demostrado posibles en el terreno experimental, pero no en condiciones naturales o son de poca importancia (Johnson y Kaneene, 1991b).

Se determinó un alto porcentaje de fincas y animales positivos al VLVB en la población bovina lechera de Costa Rica. Esta situación actual se pudo asociar positivamente a incorrectas medidas de manejo en las fincas y desconocimiento de la enfermedad y su forma de transmisión.

CONCLUSIONES

- Se determinó una seroprevalencia de la LBE del 41,0% a nivel de animales.
- Se determinó una prevalencia de la LBE del 97,4% a nivel de hatos lecheros.
- Se determinaron seroprevalencias de la LBE desde 0,0% hasta 90,7% a nivel de fincas lecheras especializadas.
- Se determinó una alta seroprevalencia de la LBE y riesgo en la raza Holstein en contraste con las demás razas lecheras analizadas.
- Se determinó que la seroprevalencia de la LBE y el riesgo aumenta conforme aumenta el número de lactancias de las vacas.
- Se determinaron que los factores de riesgo asociados a la positividad del VLVB fueron: la no desinfección del equipo de identificación, el no utilizar un guante y aguja individual, el no utilizar únicamente I.A, el comprar animales a otras fincas, el no calentar el calostro, el no utilizar reemplazador y el no separar físicamente las vacas con mastitis.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar medidas de manejo correctas (aguja y guante por animal, desinfección del equipo de identificación, etc.) para disminuir la incidencia de la LBE en las fincas.
2. Manejar adecuadamente los animales jóvenes, para así evitar su infección con el VLVB y tener reemplazos seronegativos al VLVB.
3. Realizar exámenes serológicos a los toros que se van a utilizar en MN.
4. Realizar exámenes serológicos a los animales que se van a comprar.
5. Realizar exámenes serológicos a todos los animales mayores de seis meses e ir descartando paulatinamente los animales positivos al VLVB.
6. Educar e informar a los productores acerca de la transmisión de la LBE mediante charlas informativas y así reducir su transmisión en los hatos lecheros.
7. Recomendar a los productores empezar con un programa voluntario de control y erradicación de la LBE para mejorar el estado sanitario de su hato.
8. Poner en vigencia un reglamento para el control y erradicación de la LBE en todos los hatos lecheros de Costa Rica.
9. Realizar estudios sobre la importancia de bovinos positivos con LP como principales diseminadores de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Agresti, A., W. Ponti, M. Rochi, R. Meneveri, A. Marozzi, D. Cavalleri, E. Peri, G. Poli & E. Ginelli. 1993. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves. *Am J. Vet. Res.* 54: 373-376.
- Burgu, Y., H. Urman, O. Kaaden, U. Truyen, Y. Akca, G. Alcigir, S. Berkin, F. Alkan & A. Atasever. 1990. Sero-epidemiological and pathological studies on enzootic bovine leucosis in Turkey. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 98:226-228.
- Chapizo. E. 2005. Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión [en línea]. REDVET. España.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html> (Consulta: 1 feb. 2007).
- Choi, K., D. Monke & J. Stott. 2002. Absence of bovine leucosis virus in semen of seropositive bulls. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(5): 403-406.
- Detilleux, J., A. Freeman & L. Miller. 1991. Comparison of natural transmission of bovine leukemia virus in Holstein cows of two genetic lines selected for high and average milk production. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1551-1555.
- Dolz, G. & E. Moreno. 1999. Comparison of Agar Gel Immunodiffusion Test, Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay and Western Boltting for the Detection of BLV Antibodies. *J. Vet. Med. Ser. B* 46: 551-558.

- Fields, B., D. Knipe & P. Howley. 1996. Virology: Retrovirus. 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, N.Y. p.p 40-52.
- Fuente, R., I. Simarro, E. Yus & J Ruiz. 1989. Leucosis bovina. Epidemiología y transmisión [en línea]. España. http://www.ucm.es/BUCM/compludoc/S/10605/11304804_6.htm (Consulta: 1 feb. 2007).
- Gillet, N., A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann & L. Willems. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4: 18
- González, ET., G. Oliva, A. Valera, E. Bonzo, M. Licursi & M. Etcheverrigaray. 2001. Leucosis Enzoótica Bovina: Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*. 2: 12-20
- Hopkins, S., J. Evermann, R. DiGiacomo, S. Parish, J. Ferrer, S. Smith & R. Bangert. 1988. Experimental transmission of bovine leucosis virus by simulated rectal palpation. *Vet. Rec.* 122: 389-391.
- Idexx. 2006. Enzootic bovine leukosis virus (BLV): Surveillance and eradication [en línea]. USA. www.idexx.com/production/livestockpoultrynews/200612.jsp (Consulta: 19 set. 2007).

- Jiménez, C. 1990. Incidencia, diagnóstico, control e impacto económico de la Leucosis Viral Bovina. p. 4-8. *In* Simposio sobre leucosis viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina. nov. 8-9. Heredia, Costa Rica.
- Jiménez, C., J. Bonilla, G. Dolz, L. Rodríguez, L. Herrero, E. Bolaños, M. Cortez & E. Moreno. 1995. Bovine Leukaemia-virus Infection in Costa Rica. *J. Vet. Med.* 42: 385-390.
- Johnson, R. & J. Kaneene. 1991a. Bovine Leukemia virus. Part I. Descriptive Epidemiology, Clinical Manifestations, and Diagnostic Tests. *The Compendium*. Vol. 13: 315-324.
- Johnson, R. & J. Kaneene. 1991b. Bovine Leukemia virus. Part II. Risk Factors of Transmission. *The Compendium*. Vol. 13: 681-690.
- Johnson, R. & J. Kaneene. 1991d. Bovine Leukemia virus. Part IV. Economic Impact and Control Measures. *The Compendium*. Vol. 13: 1727- 1737.
- Kahrs, R. 1981. Bovine Leukemia Virus. pp 84. *In* R. Kahrs. *Viral diseases of cattle*. Iowa State University Press, United States.

- Kettmann R., Y. Cleuter, M. Mammerickx, M. Meunir-Rotival, G. Bernardi, A. Burny & H. Chantrenne. 1980. Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with the lymph node tumor form of enzootic bovine leucosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 257-258.
- Mora-Medina. D. 1997. Evaluación de prácticas de manejo asociadas al riesgo de la transmisión del virus de la leucosis bovina enzoótica en hatos lecheros de Costa Rica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, CR.
- Monti, G. 2005. Epidemiology, infection dynamics and effective control of bovine leukemia virus within dairy herds of Argentina: A quantitative approach. Tesis de Ph.D. Wageningen University, Germany.
- New York State Cattle Health Assurance Program (NYSCHAP). 2007. Bovine leucosis virus: Background and best management practices [en línea]. USA. <http://nyschap.vet.cornell.edu>. (Consulta: 5 jul. 2007).
- Pollari F., R. DiGiacomo & J. Evermann. 1993. Use of survival analysis to compare cull rates between bovine leukemia virus seropositive and seronegative dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1403-1440.
- Pollari F., R. DiGiacomo & J. Evermann. 2003. Comments on comparison of culling rates among cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223(7): 946.

- Radke, K. 1999. Bovine Leukemia Virus (*Retroviridae*). p. 191-192. *In* A. Granoff & R. Webster. Encyclopedia of virology. Academic Press Limited, Great Britian.
- Radostits, O. 2002. Leucosis bovina enzoótica (linfosarcoma bovino). p. 1239-1254. *In* O. Radostits, C. Gay, D. Blood & K. Hinchcliff. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. McGraw-Hill Interamericana. España.
- Rodríguez, L., R. Esquivel & J. Alvarado. 1980. Bovine viral leukaemia in dairy herds of the central valley of Costa Rica. *Cien. Vet.* 2: 183-194.
- Sargeant, J., D. Kelton, S. Martin & E. Mann. 1997. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 31:211-221.
- Sprecher, D., D. Pelzer & P. Lessard. 1991. Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 584-588.
- Straub, O. 1990. Estrategias de control de la leucosis viral bovina y de la rinotraqueitis infecciosa bovina. p. 38-41. *In* Simposio sobre leucosis viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina. nov. 8-9. Heredia, Costa Rica.

Svanova, 2007. Bovine leukemia virus gp51 antibody test BLV-gp51 [en línea]. Sweden.

<http://www.svanova.com/filearchive/BLV%2007-03.pdf> (Consulta: 22 dic. 2007).

Trainin, Z. & J. Brenner. 2005. The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel journal of veterinary medicine*. 60(4): 94-105.

Thurmond, M.C., R.L. Carter, D.M. Puhr, M.J. Burrige, J.M. Miller, M.J. Schmerr & M.J. Van der Mateen. 1983. An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. *Can. J. Comp. Med.* 47: 316-319.

Thurmond, M.C. 1991. Calf management to control bovine leukemia virus infection. *Cornell Vet.* 81: 227-231.

Yoshikawa, H., B. Xie, T. Oyamada, A. Hiraga & T. Yoshikawa. 1997. Detection of Bovine Leukemia Viruses (BLV) in mammary tissues of BLV antibody-positive cows affected by subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 59(4): 301-302.

Van der Maaten, M. J. & J. M. Miller. 1990. Bovine Leukosis Virus. p. 419-428. *In* Z. Dinter & B. Morein. *Virus infections of ruminants*. Elsevier Science Publishers B.V, The Netherlands.

VMRD, Inc. 2007. Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit [en línea]. USA. www.vmr.com

(Consulta: 1 ago. 2007).

ANEXOS

ANEXO 1

Encuesta realizada a los productores.

ENCUESTA RELACIONADA AL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA

Información de la finca.

1. Nombre del asociado: _____
2. Nombre de la finca: _____
3. Localización de la finca: _____

Provincia	Cantón	Distrito
-----------	--------	----------
4. ¿Cuál es la altitud de la finca? _____msnm.
5. ¿Cuál es el número total de animales en la finca? _____
6. ¿Cuántos son animales mayores de seis meses? _____
7. ¿Que clases de razas son las que manejan en la finca?
 - (a) Holstein
 - (b) Jersey
 - (c) Otra: _____
8. ¿Cada cuánto son las visitas del veterinario a su finca? _____
9. ¿Cuenta la finca con un área de cuarentena?
 - (a) Si
 - (b) No
10. Utilizan el programa VAMPP Bovino en la finca:
 - (a) Si
 - (b) No

Conocimiento acerca de leucosis.

11. ¿Conocía o había oído acerca del virus de la Leucosis Bovina?
 - (a) Si
 - (b) No
12. Ha realizado exámenes a sus animales para determinar la presencia del virus (VLVB) en el hato: (a) Si ¿Porqué? _____
 (b) No ¿Porqué? _____
13. La condición de seropositividad es razón para descarte de los animales:
 - (a) Si
 - (b) No
14. ¿Cuáles medidas de control se practican en su finca en relación al VLVB?
 - (a) Descarte
 - (b) Separación.
 - (c) Manejo
 - (d) Otro: _____
15. ¿Ha sido consciente usted o su veterinario de animales que presenten abultamientos anormales en la finca?
 - (a) Si → ¿Cuántos? _____

- (b) No
16. Ha tenido casos en la finca de animales que presenten tumores diagnosticados:
- (a) Si → ¿Cuántos? _____
- (b) No

Reproducción.

17. Para la reproducción utilizan inseminación artificial o monta natural:
- (a) I.A
- (b) Monta natural
18. En monta natural los toros son propios o son prestados de otra finca:
- (a) Propios
- (b) Otra finca
19. Si es propio, lo prestan a otras fincas:
- (a) Si
- (b) No
20. Los toros utilizados en monta natural tienen exámenes del VLVB:
- (a) Si → ¿Hace cuanto se le realizó la prueba? _____
- (b) No
21. ¿Con qué frecuencia se palpan las vacas en la finca? _____
22. A la hora de la palpación usa un guante diferente para cada animal:
- (a) Si
- (b) No
23. Si hay sangrado durante la palpación:
- (a) Utiliza otro guante
- (b) Lava el guante
- (c) No le toma importancia y sigue con el mismo guante.

Manejo de terneras

24. ¿Cuánto tiempo pasan las terneras recién nacidas con sus madres tomando calostro?
- (a) 0 horas
- (b) 0-12 horas
- (c) 12-24 horas
- (d) 24-48 horas
- (e) 48 horas o más.
25. Calientan o pasteurizan el calostro antes de darlo a las terneras:
- (a) No
- (b) Si → ¿Durante cuánto tiempo? _____
26. Las terneras reciben reemplazador:
- (a) Si
- (b) A veces
- (b) No
27. La leche de vacas mastíticas se utiliza en la cría de terneras:
- (a) Si
- (b) No
- (c) A veces
- * → ¿Calientan la leche antes de darla a las terneras? Si o No

28. Para la identificación de los animales en la finca utilizan:

- (a) Tatuaje
- (b) Arete
- (c) Otro: _____

→ Desinfectan el equipo entre cada ternera: Si o No

29. Practican el descorne en la finca:

- (a) Si
- (b) No

30. ¿Cuál es el sistema de descorne que utilizan?

- (a) Pasta
- (b) Cirugía
- (c) Eléctrico
- (d) Otro: _____

Manejo de los animales

31. A la hora de usar equipo quirúrgico, se hace desinfección entre cada animal:

- (a) Si
- (b) No
- (c) A veces

32. A la hora de usar inyectables, utiliza una aguja diferente para cada animal:

- (a) Si
- (b) No
- (c) A veces

33. El reemplazo de animales se realiza solamente con animales propios:

- (a) Si
- (b) No

33.a) Estos animales de reemplazo tienen exámenes de VLVB:

- (a) Si → ¿Hace cuanto? _____
- (b) No

34. ¿Compran animales a otras fincas?

- (a) Si
- (b) No

34. a) Estos animales comprados tienen exámenes de VLVB:

- (a) Si → ¿Hace cuanto? _____
- (b) No

35. ¿Cuál es el promedio de vida de los animales? _____ años

Manejo de vectores.

36. Hay murciélagos hematófagos en la zona donde se encuentra la finca:

- (a) Si
- (b) No

37. Existen tábanos y si es así practican medidas de control en cuanto a los tábanos:

- (a) No
- (b) Si → ¿Cuáles? _____

Historia clínica de la finca

38. ¿Cada cuánto realizan pruebas para la detección de mastitis en la finca?

- (a) Cada mes
- (b) Cada dos meses
- (c) Otro: _____

39. Las vacas con mastitis se separan del hato y se tratan inmediatamente:

- (a) Si
- (b) No
- (c) A veces

40. Las vacas con mastitis se ordeñan de último:

- (a) Si
- (b) No
- (c) A veces

Comentarios:

ANEXO #2



Universidad Nacional de Costa Rica.
Facultad de Ciencias de la Salud.
Escuela de Medicina Veterinaria.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SOBRE LEUCOSIS VIRAL BOVINA

Consejos Prácticos para evitar la transmisión en su hato.

- Recordar que la transmisión es principalmente iatrogénica (causada por el ser humano).
- Realizar periódicos análisis de sangre y pruebas de diagnóstico cada año para detectar el virus, esto a partir de los seis meses de edad de los animales.
- Tratar de mantener un hato cerrado; en caso de introducir animales nuevos realizar exámenes serológicos (mínimo 2 exámenes negativos en un intervalo de un mes).
- Esterilizar el material quirúrgico, espéculos, pipetas y otros elementos luego de cada intervención.
- Utilizar un método de descorne que impida el contacto con la sangre del animal altamente contaminada.
- Utilizar una aguja por animal a la hora de usar inyectables.
- Para cada vaca usar un guante para el tacto rectal.
- En caso de ordeñar, palpar, despalar, hacerlo primero en vacas seronegativas y luego seropositivas.
- Idealmente separar los animales que padezcan de bronconeumonía o afecciones que presenten secreciones.
- Evitar usar leche de vacas seropositivas o con mastitis para la crianza artificial de terneros (de no existir otra alternativa pasteurizarla).
- Si no es viable la creación del banco de calostro, los terneros hijos de vacas positivas mamarán una sola vez en cantidad suficiente en las primeras 6 horas de vida para garantizar la inmunidad que transfiere el calostro, sin la cual no es viable su crianza.
- No usar vacas seropositivas como vacas amas.
- Intensificar el uso de la inseminación artificial con semen negativo o sino mantener un toro seronegativo dentro del hato.
- No usar vacas seropositivas como recipientes durante la transferencia embrionaria.
- Mantener la higiene del parto durante la época de partos.

Para cualquier información, por favor comunicarse a los siguientes números telefónicos:

- 562-4508 (UNA)
- 830-5964 (Gabriela Beita)

ANEXO #3

Cuadro 9. Seroprevalencia del VLVB en 76 fincas lecheras especializadas en Costa Rica.

FINCA	POSITIVOS	ANIMALES	PREVALENCIA
10	36	212	16,98%
13	59	102	57,84%
19	67	172	38,95%
36	55	82	67,07%
37	37	50	74,00%
42	0	98	0,00%
48	93	149	62,42%
49	34	95	35,79%
50	47	122	38,52%
51	55	145	37,93%
52	10	55	18,18%
53	59	91	64,84%
54	16	36	44,44%
55	14	21	66,67%
56	15	42	35,71%
57	30	58	51,72%
68	93	141	65,96%
71	51	101	50,50%
74	15	26	57,69%
76	8	30	26,67%
77	20	40	50,00%
79	58	146	39,73%
80	14	34	41,18%
81	70	103	67,96%
82	136	198	68,69%
110010	36	151	23,84%
190008	105	216	48,61%
260002	1	63	1,59%
260007	99	131	75,57%
260023	26	208	12,50%
260102	8	149	5,37%
260106	41	88	46,59%
410001	0	248	0,00%
460001	27	115	23,48%
480003	114	155	73,55%
540001	167	255	65,49%
540004	112	125	89,60%
540005	74	90	82,22%

Cuadro 9. Seroprevalencia del VLVB en 76 fincas lecheras especializadas en Costa Rica (continuación).

FINCA	POSITIVOS	ANIMALES	PREVALENCIA
620001	5	218	2,29%
650001	86	117	73,50%
660001	11	106	10,38%
660002	28	107	26,17%
660003	4	96	4,17%
760075	23	77	29,87%
780001	53	93	56,99%
1100001	62	178	34,83%
1130001	34	121	28,10%
1170004	48	69	69,57%
1170026	58	125	46,40%
1290002	68	342	19,88%
1490003	105	171	61,40%
1570001	23	119	19,33%
1630001	52	67	77,61%
1700002	9	26	34,62%
1700003	57	253	22,53%
1700051	92	121	76,03%
1700113	6	18	33,33%
1700117	77	207	37,20%
1700120	57	115	49,57%
1770001	42	108	38,89%
1880009	21	45	46,67%
1890002	2	152	1,32%
1890004	5	100	5,00%
1910012	40	58	68,97%
1910034	15	49	30,61%
1930119	25	46	54,35%
1940029	82	131	62,60%
1960001	64	96	66,67%
1960004	25	39	64,10%
1960005	13	54	24,07%
1960006	34	70	48,57%
1960108	39	43	90,70%
2030001	56	101	55,45%
2300001	104	173	60,12%
2420001	30	90	33,33%
2450004	39	74	52,70%
TOTAL	3496	8518	41,04%