

Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile[#]

Between and within-herd seroprevalence for bovine leukosis virus infection in dairy herds from southern Chile

MA Grau, G Monti*

Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

SUMMARY

The objectives of this study were to estimate herd and within-herd seroprevalences against bovine leukemia virus in dairy herds of Región de los Ríos and Los Lagos, and to describe them according to the characteristics of the farm. A cross-sectional study and a random stratified sampling strategy were used. 4,360 blood and serum samples from females older than 6 months and bulls were collected from 75 dairy herds from September to December 2007, and they were processed using a commercial ELISA according to the instructions of the manufacturer. An overall proportion of infected herds (PIH) over total and the apparent prevalence (AP) were estimated by herd size and age group. Overall PIH was 34.7% (CI 95% (22.6; 44.1)) and 23.9% (CI 95% (11.1; 36.7)) for small herds, 43.5% (CI 95% (21.6; 65.4)) for median and 83.3% (CI 95% (40.5; 100.0)) for large herds and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). General AP was 14.6% and the average AP was 5.3% (CI 95% (2.3; 8.3)). Average within-herd AP was 2.1% (CI 95% (0.34; 3.8)) for small herds, 10.13% (CI 95% (10.0; 10.2)) for median and 30.1% (CI 95% (29.9; 30.3)) for large herds and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The average AP for adults was 5.1% (CI 95% (1.6; 8.6)) and 1.3% (CI 95% (0.4; 2.2)) for young stock. The results suggest that in the area of study, large herds should be the target group for a control programme and the current situation might represent a business opportunity for small farmers by enrolling in a free certification scheme.

Palabras clave: bovino, leucosis enzoótica, prevalencia, Chile.

Key words: bovine, enzootic leukosis, prevalence, Chile.

INTRODUCCIÓN

La leucosis viral bovina es una enfermedad infecciosa del ganado, causada por un retrovirus llamado virus de la leucosis bovina (VLB) que infecta principalmente a los linfocitos B pero también posee la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T y monocitos (Mirsky y col 1996).

El VLB causa linfomas y otros desórdenes en el ganado; la enfermedad ha sido llamada por muchos años leucosis enzoótica bovina por la tendencia a mantenerse en áreas geográficas y rebaños. El virus está distribuido en todo el mundo y produce un gran impacto económico en el sector ganadero en muchos países (decomisos, muerte de animales, costos veterinarios, reemplazos tempranos y barreras para arancelarias) (Johnson y Kaneene 1992), especialmente en lecherías, debido a las prácticas de manejo (Hopkins y DiGiacomo 1997).

La infección se transmite principalmente en forma horizontal, vía iatrogénica, por exposición de los bovinos susceptibles a los linfocitos "B" portadores del virus (Hopkins y DiGiacomo 1997), pero también en forma vertical durante la gestación o en el parto (DiGiacomo 1992).

En Chile el virus fue aislado por primera vez en 1991 (Montes y col 1991); sin embargo, la información acerca de la seroprevalencia y las prácticas de manejo locales que pudieran influenciar la propagación del virus son insuficientes y desactualizadas, para poder planear una estrategia de control que sea sustentable y efectiva. Esto es particularmente importante, dadas las características de la enfermedad, tales como la ausencia de tratamiento curativo, ausencia de vacunas eficientes, la baja dosis infectante (0,1 µl de sangre de un animal infectado es capaz de infectar a un animal susceptible), larga duración de la infección, transmisión iatrogénica por medio de agujas u otros elementos traumáticos y transmisión a través de insectos y artrópodos hematófagos (Foil y col 1989, Hasselschwert y col 1993).

Según el proyecto de Vigilancia Pecuaría 1986-1995 del SAG, en Chile, la prevalencia predial para la Región de Los Lagos fue estimada en un 21% (González 1996) y para la zona central la prevalencia intrapredial lo fue

Acceptado: 21.10.2009.

[#] Proyecto Fondecyt de Iniciación en Investigación 2006 N° 11060125.

* Casilla 567, Valdivia, Chile; gustavomonti@uach.cl

en un 40 a 50% (Moraga 1998). Recientemente, Felmer y col (2009) estimaron para la Región de La Araucanía una seroprevalencia predial del 59%.

La producción de leche en Chile es una importante actividad económica, y para muchos pequeños productores de leche un significativo medio de subsistencia. Si bien los productores de leche están distribuidos en todo el país, el mayor abastecimiento de la industria láctea (> 80%) es producida en las regiones del sur (La Araucanía y de Los Lagos) (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) 2003) donde se concentra el 73,2% del total de vacas lecheras (INE 1997).

Existen diferencias sustanciales en los sistemas de manejo y tamaño de los rebaños en las regiones lecheras de Chile y ellas varían desde estabulación a sistemas de pastoreo todo el año. También los tamaños de los rebaños muestran una gran variabilidad, existiendo rebaños con unas pocas vacas de subsistencia y rebaños muy grandes y comerciales.

El objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia predial e intrapredial de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos y describirla según algunas características de los predios.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del estudio fue transversal y se utilizó una estrategia de muestreo aleatorio estratificado de predios lecheros en la principal área lechera del país (regiones de Los Ríos y de Los Lagos). El tamaño muestral se calculó basado en la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z^2 * P(1 - P)}{N * e^2 + Z^2 * P * (1 - P)}$$

donde **N** es el número de predios lecheros en la región (se estimó en 10.859 predios en las regiones de Los Ríos y Los Lagos (Anrique 1999)), **P** es la prevalencia predial esperada (25%), **e** es la precisión aceptada (10%) y **Z**,

nivel de confianza ($\alpha = 0,05$), lo que arroja una muestra mínima de 72 predios.

Dada la heterogeneidad de tamaños de los predios fue necesario además estratificar la muestra para preservar su representatividad, donde se mantuvieron las proporciones relativas de cada categoría de tamaño con respecto al universo de predios utilizados (2%, 13% y 85% para grande, mediano y chico respectivamente). Para definir el tamaño predial se utilizó el criterio del INE (1997), el cual considera como predio grande (G) aquel establecimiento que cuente con más de 200 animales, mediano (M) el que cuente entre 40 y 200 animales y chico (CH) aquel establecimiento que cuente con menos de 40 animales.

Se recolectaron 4.360 muestras de sangre con y sin anticoagulante de todas las hembras mayores de 6 meses y de los toros, de un total de 75 predios escogidos al azar, de las regiones de Los Ríos y Los Lagos durante los meses de septiembre a diciembre del 2007. Las muestras de sangre fueron extraídas mediante venopunción de la vena coccígea media o de la vena yugular en el caso de animales más jóvenes. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su arribo al laboratorio donde fueron extraídos los sueros y almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

Las muestras de suero se analizaron mediante un kit comercial de ELISA (IDEXX-Bommeli®), que es un ELISA indirecto contra anticuerpos contra el antígeno de superficie gp51, siguiendo los procedimientos sugeridos por los fabricantes, y las lecturas espectrofotométricas fueron realizadas en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) a 450 nm e interpretados de acuerdo a lo recomendado por el fabricante.

La prevalencia predial (PP) se estimó como la proporción de los predios infectados sobre el total de predios analizados. Para este análisis se definió como predio infectado a aquel que posea al menos dos animales con un resultado positivo a la prueba de ELISA, dado que su sensibilidad y especificidad diagnósticas no son del 100%. La prevalencia aparente (PA) intrapredial se estimó como: $PA = T^+ / N$; donde **T⁺** es el total de muestras con resultados positivos a la prueba de ELISA en suero y **N** es el total de muestras analizadas. La prevalencia real (PR) se estimó a partir

Cuadro 1. Prevalencia aparente promedio de la infección con el virus de la leucosis bovina para adultos y jóvenes según tamaño de los predios, en 75 lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos.

Average apparent prevalence of infection with bovine leukemia virus in adults and young animals by herd size, in 75 dairy farms from Los Ríos and Los Lagos regions.

Tamaño predio	Adultos	Jóvenes
Grande	25,02 (IC 95% 3,15;46,58)**	7,57 (IC 95% 0,13;15,02)*
Mediano	2,86 (IC 95% 0,52; 5,2)	1,51 (IC 95% -0,41;3,44)*
Chico	1,22 (IC 95% -0,33; 2,78)	0,31 (IC 95% -0,13;0,75)

* Diferencia estadísticamente significativa entre predios grandes y chicos y entre predios grandes y medianos (KW P < 0,05).

** Diferencia estadísticamente significativa entre predios grandes y chicos (KW P < 0,05).

de los resultados obtenidos para la prevalencia aparente ajustados por la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba de acuerdo a la información descrita en la literatura (Monti y col 2005), sensibilidad del 95% y especificidad del 97%. De tal manera, la prevalencia real se estimó como:

$$\text{Prevalencia Real (PR)} = \frac{\text{PA} + (\text{ESP}-1)}{\text{SE} + (\text{ESP}-1)}$$

Donde PA es la prevalencia aparente; ESP es la especificidad de la prueba y SE es la sensibilidad de la prueba. Además, dentro de cada predio se analizó la PA en dos grupos etarios: Adultos, formados por vacas en ordeña, vacas secas y toros, y Jóvenes, formados por vaquillas y terneras, con el fin de evaluar si ambos estratos estaban igualmente afectados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar estadísticamente las diferencias entre frecuencias que resultaron de este estudio se utilizaron la prueba del Chi cuadrado o el test exacto de Fischer, según correspondiera. Para comparar las medias entre tres o más grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW). Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Statistix V8 (Analytical Software, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PP general fue de un 34,7% (IC 95% (22,6; 44,1)). Al analizarla según el tamaño de los predios, se observó que un 23,9% (IC 95% (11,1; 36,7)) de los predios CH, un 43,5% (IC 95% (21,6; 65,4)) de los predios M y un 83,3% (IC 95% (40,5; 100,0)) de los predios G, estaban infectados y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

La estimación de PP de este estudio en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos indica que ésta ha aumentado según la última estimación de González (1996) del 21 al 34,7%. Esta diferencia puede deberse al uso de diferentes métodos de diagnóstico utilizados en los dos trabajos, ya que González utilizó la prueba de inmunodifusión en gel agar que tiene una sensibilidad menor al ELISA (Monti y col 2005) y a la forma en que se definió predio infectado (al menos un animal infectado). Sin embargo, también es posible que este aumento sea real como consecuencia de una despreocupación de los productores por la enfermedad debido a la falta de incentivos económicos por parte de las industrias y la ausencia de un programa oficial de control obligatorio. En otros países, por ejemplo Estados Unidos (Ott y col 2003), la entrega de incentivos por controlar la infección se vio reflejada en una disminución de las prevalencias; lo mismo ocurrió en Finlandia (Nuotio y col 2003) donde la clave para la erradicación de la infección por VLB fue la compensación económica que se dio a los

ganaderos por el sacrificio de los animales seropositivos por parte del Estado.

La seroprevalencia encontrada es menor que en otros países de la región con sistemas productivos similares como Argentina (84% de los predios y 32,8% individuos) (Trono y col 2001), Brasil ((35,9% individuos) (García y col 1991) (49,8% individuos) (Molnar y col 1999)) y Uruguay (Braga y col 1998); como así también que la Región de La Araucanía (Felmer y col 2009). Este último estudio es temporalmente comparable con el nuestro, pero no metodológicamente, ya que nuestro estudio incluyó todos los estratos productivos, realizó un muestreo probabilístico y aleatorio y además el estudio de Felmer y col (2009) utilizó un criterio muy distinto para definir los tamaños prediales, lo que dificulta la comparación directa.

Del total de 4.360 animales muestreados, se obtuvo un PA del 14,6% ($n = 637$ animales), la PR fue del 14,9% y la PA predial promedio fue del 5,3% (IC 95% (2,3; 8,3)). Al estimarla por según el tamaño de los predios, se obtiene una PA intrapredial promedio de un 2,1% (IC 95% (0,34; 3,8)) para los predios CH, 10,13% (IC 95% (10,0; 10,2)) para los predios M y 30,1% (IC 95% (29,9; 30,3)) para los predios G y estas diferencias son estadísticamente significativas ($\text{Chi}^2 P \leq 0,05$). Se aprecia una notable diferencia de prevalencias en los predios de mayor tamaño, que presentan niveles altos de infección, y la tendencia coincide con lo encontrado por Gottschau y col (1990) en Dinamarca. Lamentablemente, no existen en la literatura disponible estudios chilenos que sean metodológicamente comparables y que permitan establecer una conclusión al respecto. El hecho de que la mayor proporción de predios infectados sea grande y a su vez presente el mayor número de reactores positivos puede deberse a que en este tipo de predios se lleva a cabo una mayor cantidad de prácticas de riesgo que en los predios medianos y chicos donde se realizan con menor frecuencia o no se realizan. Estas prácticas riesgosas corresponden, por ejemplo, a palpaciones diagnósticas, exámenes post parto, inseminación artificial, aplicación de vacunas, toma de muestras de sangre, etc. (DiGiacomo y col 1985, Divers y col 1995, Hopkins y DiGiacomo 1997), las que podrían contribuir a la diseminación de la infección si éstas no se realizan con la higiene adecuada. Otro factor que podría influenciar la mayor prevalencia en los rebaños grandes es la mayor susceptibilidad a infectarse con el VLB de las vacas de alto potencial genético para la producción de leche y grasa (Lewin 1994), ya que en los predios grandes es habitual encontrar animales de razas lecheras y de mayor potencial productivo que en los predios medianos y chicos, donde es frecuente encontrar animales de doble propósito.

Del total de 4.360 animales muestreados, 1.279 animales fueron clasificados dentro de la categoría jóvenes y un 13,2% fueron reaccionantes positivos y de los 3.081 animales clasificados como adultos, un 15,2% fueron reaccionantes positivos, pero esa diferencia no fue estadísticamente significativa ($P > 0,05$). Estos resultados indicarían que no

habría una diferencia en la susceptibilidad por edad y esto coincide con lo demostrado por Wilesmith y col (1980), donde siguieron animales en forma periódica por dos años y no encontraron diferencias en la tasa de infección entre animales jóvenes y adultos y mostraron los mismos tiempos entre infección y seroconversión.

En la distribución de la PA intrapredial por grupo etario, se estimó una mediana de 5,1% (IC 95% (1,6; 8,6)) para el grupo de los Adultos y 1,3% (IC 95% (0,4; 2,2)) para el grupo de los Jóvenes. La PA por grupo etario y por tamaño predial se describe en el cuadro 1 y esas diferencias fueron estadísticamente significativas (KW $P \leq 0,05$) para los predios grandes en comparación con los otros dos, lo mismo se observó para el subgrupo de los jóvenes. Nuevamente, no existen en la literatura disponible estudios chilenos que hayan investigado los patrones etarios y que permitan establecer una conclusión al respecto, pero la evidencia encontrada podría explicarse por la introducción del virus en el predio por medio de animales adultos infectados (Monti y col 2007).

Un 29,2% (IC 95% (18,4; 39,9)) de los predios tienen adultos infectados y en aquellos predios que presentan adultos infectados, el 52,38% presenta sólo adultos reaccionantes positivos a la prueba de ELISA. Asimismo, un 15,3% (IC 95% (6,8; 23,8)) de los predios presenta el estrato de animales jóvenes infectados, de éstos, un 9,1% presentan únicamente reaccionantes positivos en el estrato de animales jóvenes. Esta diferencia es significativa dentro de los dos grupos ($\text{Chi}^2 P \leq 0,05$).

Nuevamente no encontramos en la literatura estudios previos en Chile, especialmente de estimaciones de prevalencia intrapredial y por grupos etarios que permitan comparar los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, los patrones encontrados son compatibles con una situación endémica donde la infección se introdujo a través de un animal infectado en una población totalmente susceptible varios años atrás (Monti y col 2007).

En el presente estudio se muestra que en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos el grupo de los predios con más animales debería ser el objetivo de un programa de control. Además los resultados muestran que si se instaurara un programa de certificación de predios libres, éste podría representar una oportunidad para los pequeños agricultores, ya que pocos predios están infectados y con pocos animales, por lo que les sería más sencillo obtener un estatus de libre que a los predios grandes.

RESUMEN

El objetivo fue estimar la seroprevalencia predial e intrapredial contra el virus de la leucosis bovina en lecherías de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos y describirla según algunas características de los predios. Se utilizó un estudio transversal y una estrategia de muestreo aleatorio estratificado. Se recolectaron 4.360 muestras de sangre de todas las hembras mayores de seis meses y de los toros, de un total de 75 predios durante los meses de septiembre a diciembre del 2007 y se analizaron mediante un kit comercial de ELISA, siguiendo los procedimientos e

interpretación sugeridos por los fabricantes. Se estimó la proporción de los predios infectados (PP) y la prevalencia aparente (PA) general y por tamaño predial y grupo etario. La PP general fue 34,7% (IC 95% (22,6; 44,1)) y 23,9% (IC 95% (11,1; 36,7)) en predios chicos, 43,5% (IC 95% (21,6; 65,4)) en medianos y 83,3% (IC 95% (40,5; 100,0)) en grandes y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La PA general fue 14,6% y la PA predial promedio fue 5,3% (IC 95% (2,3; 8,3)). La PA intrapredial promedio fue 2,1% (IC 95% (0,34; 3,8)) para los predios chicos, 10,13% (IC 95% (10,0; 10,2)) para medianos y 30,1% (IC 95% (29,9; 30,3)) para grandes y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). La PA promedio fue 5,1% (IC 95% (1,6; 8,6)) para adultos y 1,3% (IC 95% (0,4; 2,2)) para jóvenes. En nuestro estudio se muestra que en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos, el grupo de los predios más grandes debería ser el objetivo de un programa de control. Además se presenta una oportunidad para los pequeños agricultores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la invaluable cooperación de productores, profesionales privados y de INDAP durante la ejecución del trabajo.

REFERENCIAS

- Anrique R. Caracterización del Chile lechero. 1999. En: Latrille L (ed). *Producción Animal*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, Pp 140-157.
- Braga AC, JCA Rosa, LG Oliveira, PE Reckziegel, JCF Teixeira, CS Lisboa. 1998. Presence of antibodies against bovine leukemia virus in dairy cattle imported from Uruguay. *Pesqui agropecu gaúch* 4, 35-38.
- DiGiacomo RF, RL Darlington, JF Evermann. 1985. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. *Can J Comp Med* 49, 340-342.
- DiGiacomo RF. 1992. Vertical transmission of the bovine leukemia virus. *Vet Med* 87, 258-262.
- Divers TJ, RC Bartholomew, D Galligan, C Littel. 1995. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. *Prev Vet Med* 23, 133-141.
- Felmer R, J Zúñiga, A López, H Miranda. 2009. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. *Arch Med Vet* 41, 17-26.
- Foil LD, DD French, PG Hoyt, CJ Issel, DJ Leprince, JM McManus, CL Seger. 1989. Transmission of bovine leukemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *Am J Vet Res* 50, 1771-1773.
- García M, JL D'Angelino, EH Birgel. 1991. Bovine leukosis in Brazil. *Comun Cient Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo* 15, 31-39.
- González C. 1996. Informe final del proyecto de vigilancia pecuaria, período 1989-1996. Servicio Agrícola y Ganadero, Pp 10-13.
- Gottschau A, P Willeberg, CE Franti, JC Flensburg. 1990. The effect of a control program for enzootic bovine leukosis. Changes in herd prevalence in Denmark 1969-1978. *Am J Epidemiol* 131, 356-364.
- Hasselschwert DL, DD French, LJ Hribar, DG Luther, DJ Leprince, MJ Van der Maaten, CA Whetstone, LD Foil. 1993. Relative susceptibility of beef and dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera: Tabanidae) feeding. *J Med Entomol* 30, 472-473.
- Hopkins SG, RF DiGiacomo. 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract* 13, 107-128.
- INE, Instituto Nacional de Estadísticas. 1997. *VI Censo Nacional Agropecuario*. Instituto Nacional de Estadísticas, Chile.
- Johnson R, JB Kaneene. 1992. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet Bull* 62, 287-312.
- Lewin HA. 1994. Host genetic mechanism of resistance and susceptibility to a bovine retroviral infection. *Anim Biotechnol* 5, 183-191.

- Mirsky ML, CA Olmstead, D Yang, HA Lewin, D Yang. 1996. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J Virol* 70, 2178-2183.
- Molnar E, L Molnar, M Carvalho, ES de Lima. 1999. Seroepidemiological survey on enzootic bovine leukosis in Para State, Brazil. *Rev Bras Ciencia Vet* 6, 92-97.
- Montes OG, CG Villouta, CS Valdez, AM Cornejo. 1991. Isolation and partial characterization of the virus of enzootic bovine leukosis in Chile. *Av Cs Vet* 6, 62-66.
- Monti GE, K Frankena, B Engel, W Buist, HD Tarabla, MCM de Jong. 2005. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 17, 451-457.
- Monti GE, K Frankena, MCM De Jong. 2007. Transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds by simulation modelling. *Epidemiol Infect* 135, 722-732.
- Moraga R. 1998. Antecedentes epidemiológicos de la leucosis enzoótica bovina en planteles lecheros de la zona central de Chile. *Arch Med Vet* 30, 23-24.
- Nuotio L, H Rusanen, L Sihvonen, E Neuvonen. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med* 59, 43-49.
- ODEPA, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2003. *Boletín de la Leche Año 2002*. Ministerio de Agricultura, Chile.
- Ott SL, R Johnson, SJ Wells. 2003. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med* 61, 249-262.
- Trono KG, DM Perez-Filgueira, S Duffy, MV Borca, C Carrillo. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83, 235-248.
- Wilesmith JW, OC Straub, RJ Lorenz. 1980. Some observations on the epidemiology of bovine leucosis virus infection in a large dairy herd. *Res Vet Scie* 28, 10-16.