

**Correlación de las pruebas diagnósticas de PCR y ELISA para  
la detección del virus de la leucosis bovina en diferentes especies animales**

**Trabajo de grado  
Presentado como requisito parcial para optar al título de:**

**BACTERIOLOGO**

**Presentado por:**  
Daniel Alejandro Rodríguez Escobar  
Estudiante de Bacteriología

**Director:**  
María Fernanda Gutiérrez, M.Sc, Ph.D

**Co-director:**  
Nury Nathalia Olaya G. M.Sc, cPh.D



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BOGOTÁ D.C.  
2019**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución N°. 13 de Julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso un agradecimiento sincero al grupo de investigación de Enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana y especialmente a la doctora María Fernanda Gutiérrez por haber puesto su confianza en mi y haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

A mi codirectora Nury Nathalia Olaya, gracias por su infinita paciencia, por brindarme todo su conocimiento, porque siempre estuvo dispuesta a orientarme en los momentos de duda y porque siempre fue la luz que me estuvo guiando por el buen camino que me llevo a culminar este trabajo con éxito.

Finalmente agradezco a mis amigas quienes siempre estuvieron pendientes de mi en este arduo proceso: Paola Nuñez, Alejandra Luque, Heidi Martínez, Juliana Noriega y Valentina Turriago, Gracias porque su apoyo incondicional y su amistad sincera me dieron mucha fortaleza y voluntad para terminar de forma satisfactoria este proyecto

## DEDICATORIA

A Dios por las bendiciones que día a día me da, porque es mi guía y fortaleza.

A mis padres a quienes tanto admiro, por su gran entrega hacia mí, por el gran esfuerzo que hacen por siempre sacarme a delante, por creer en mi y darme todo su apoyo incondicional durante todos los días de mi vida.

Finalmente, a mi hermano por darme siempre el buen ejemplo y ser también un pilar en mi vida.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1. GENERALIDADES.....	7
4.2. PATOGENESIS Y CICLO VIRAL.....	8
4.3. TRANSMISIÓN E INFECCIÓN A OTRAS ESPECIES.....	10
4.4. DIAGNÓSTICO.....	11
5. OBEJTIVOS.....	13
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
5.2 OBJETIVO ESPECIFICO.....	13
6. METODOLOGÍA.....	14
6.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS.....	14
6.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	15
6.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUINEO.....	15
6.2.2 DETECCIÓN DEL GENOMA.....	15
6.2.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VLB.....	16
6.2.4 ANALISIS DE RESULTADOS.....	17
7. RESULTADOS Y DISUCIÓN.....	17
8. CONCLUSION.....	21
9. BIBLIOGRAFIA.....	22

## **CORRELACION DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE PCR Y ELISA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN DIFERENTES ESPECIES**

### **1. RESUMEN**

El virus de la leucosis bovina (VLB), es el agente etiológico de la leucosis bovina enzootica (LBE), enfermedad caracterizada por ser linfoproliferativa y contagiosa. El VLB infecta de manera natural al ganado bovino, sin embargo, infecta a especies como los búfalos y el ganado ovino. Adicional el VLB se ha encontrado en humanos en sangre periférica, en tejido mamario con y sin cáncer de mama y en pulmón, planteando la propuesta de que este virus pueden ser de carácter zoonótico.

En el transcurso de la investigación con VLB se han encontrado resultados falsos negativos al realizar IGDA y ELISA para el diagnóstico del virus, por lo tanto, se recomienda utilizar la técnica de PCR para contrarrestar la poca sensibilidad de las pruebas serológicas. En la literatura se han reportado algunos estudios que se han realizado para evaluar la concordancia de pruebas diagnósticas para la detección del VLB como PCR y ELISA, dando como resultado que existen diferencias en el diagnóstico según las pruebas utilizadas, y concuerda con que la PCR es la técnica más adecuada para encontrar el VLB o segmentos de él, mientras que las pruebas de ELISA buscan anticuerpos lo cual puede llevar a un mayor número de resultados falsos negativos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue evaluar la concordancia para el diagnóstico del VLB entre las pruebas de ELISA y PCR en diferentes especies. Para esto, se utilizó una ELISA de bloqueo de la casa comercial INGENAZA diseñada para detectar anticuerpos anti-gp51 del VLB a partir de muestras de suero o de leche, y por otro lado, pruebas de PCR dirigidas al segmento génico *gag* del virus. El trabajo se realizó con muestras obtenidas de cuatro especies (68 muestras

de bovinos, 95 de ovinos, 42 de búfalos y 169 de humanos) a las cuales se les realizaron las pruebas previamente mencionadas. Para las serologías se encontraron 25% de muestras positivas para VLB provenientes de bovinos, y ninguna positiva para las muestras provenientes de otras especies; mientras por PCR, se encontró que el 57% de las muestras de bovinos fueron positivas para el virus, 18% de las muestras de ovinos, 21% de búfalos y 54% de humanos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa y contagiosa, propia de los bovinos, causada por el virus de la leucosis bovina (VLB) (1). Este virus pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *orthoretrovirinae*, y al género *deltaretrovirus*. La LBE fue descrita por primera vez en 1871, como la presencia de nódulos amarillentos en el bazo con esplenomegalia de una vaca (2). La infección con el virus se caracteriza por ser una infección clínicamente silenciosa, inducir linfocitosis persistente (LP), o en los casos más severos puede llegar hasta su fase neoplásica, asociada con linfosarcomas y/o leucemias (3). Esta infección puede ocasionar una reducción en la producción y calidad de la leche, pérdida de peso y una menor longevidad en el ganado lechero.

El VLB se distribuye a nivel mundial con prevalencias estimadas entre el 10-80% y genera como consecuencia grandes pérdidas económicas en la producción y exportación de ganado (4). Si bien el ganado bovino es el hospedero natural del virus, hay evidencia que el virus puede infectar otras especies como los búfalos, ovejas, cabras, alpacas (2) e incluso humanos, planteándolo como un potencial factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (5).

El VLB se transmite de manera horizontal a través de la transferencia de células infectadas por el contacto directo con fluidos corporales como sangre y semen, a través de la leche y por picaduras de insectos. Sin embargo, los procedimientos iatrogénicos como el descuerno, la marcación, tactos y uso de agujas compartidas entre animales contribuyen significativamente a la propagación viral (1). Una de las problemáticas desde la sanidad animal es la existencia de fincas de explotación pecuaria en las cuales

se comparten espacios con diferentes especies (6). Este factor favorece la transmisión del virus y otros agentes infecciosos entre los individuos de las diferentes especies, aumentando los problemas de diseminación.

Actualmente existen tanto pruebas serológicas como moleculares para el diagnóstico del VLB. Entre las pruebas serológicas, se encuentra la inmunodifusión en gel de agar (IGDA) y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Ambas técnicas de diagnóstico son indicadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como la “prueba de oro” para la detección de anticuerpos específicos contra el VLB. En cuanto a las pruebas moleculares se realizan diferentes variaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica mucho más sensible y específica que detecta el ADN proviral y es una técnica directa para el diagnóstico del virus (7).

Sin embargo, se ha encontrado que al realizar pruebas serológicas estas arrojan falsos negativos generando problemas de subdiagnóstico. Para Colombia no se han reportado estudios de concordancia realizados en diferentes especies para determinar si también se presentan casos de subdiagnóstico en el país, por lo tanto, en este estudio se evaluó la concordancia entre las pruebas no solo para ganado bovino sino para otras especies en las cuales ya se detectó el virus en Colombia.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

Uno de los principales problemas de la infección por VLB, radica en la diseminación silenciosa del virus, al tener animales aparentemente sanos donde la manifestación de signos clínicos es escasa y la mayoría de las veces inaparente. Esto hace que se aumente la tasa de infección del virus y sea difícil de frenar la diseminación, ya que el VLB no es de control oficial y no es obligatorio el diagnóstico para este (6). Por otro lado, la diseminación del virus aumenta cuando se encuentran otras especies en un mismo espacio, a las cuales tampoco se les realiza el diagnóstico y pasan desapercibidas (5).

Si bien la vía de transmisión del virus para el bovino está muy bien descrita, la vía de transmisión inter-especies aún no está del todo definida, aunque se propone que se debe a las explotaciones pecuarias mixtas por medio de heridas expuestas a células infectadas o fluidos corporales, por condiciones iatrogénicas y por prácticas de manipulación entre los animales, así como lainoculación por insectos hematófagos (5). Para el caso de los humanos, se plantea por medio de un contacto directo con los animales o eventualmente por productos alimenticios derivados de bovinos infectados (8).

La LBE es una enfermedad de notificación obligatoria pero no de control oficial para Colombia y no se realiza el diagnóstico de rutina en campo (6). Realizar el diagnóstico adecuado para el VLB permite identificar animales infectados ante situaciones de portadores aparentemente sanos, con bajas o nulas manifestaciones clínicas, para así poder hacer seguimientos epidemiológicos, identificar focos de infección y eventualmente plantear estrategias de prevención y control (9).

Ahora bien, dentro de las pruebas diagnósticas estipuladas por la OIE, se tiene como prueba de oro el diagnóstico a partir de inmunodifusión en agar (IGDA). Sin embargo, esta técnica en la actualidad es poco usada debido a sus bajos niveles de sensibilidad y que ya ha sido reemplazada por otras técnicas como ELISA y PCR (7). A pesar de ello, no existe un estándar establecido por la OIE para escoger entre estas dos últimas y pocos estudios se han realizado enfocados a evaluar la concordancia entre las pruebas diagnósticas. En el transcurso de la investigación del VLB, se ha observado que al realizar el diagnóstico del virus por las pruebas serológicas que recomienda la OIE (IGDA y ELISA), en algunos casos se han presentado falsos negativos ya que existen animales que estando infectados con el virus no desarrollan un título de anticuerpos suficiente que pueda ser detectado por estas pruebas (7). Por lo que es recomendable hacer uso de pruebas de biología molecular como PCR y sus variantes para la detección directa de ADN viral, ya que a partir de pocas cantidades de ADN viral (10-100 ng) permitirá identificar los animales que se encuentran persistentemente infectados, muy seguramente con una carga viral baja que no sea suficiente para la producción de

anticuerpos (10). Por último, la OIE no contempla el diagnóstico del VLB para otras especies diferentes a bovinos pero si reconoce que búfalos, ovejas, caprinos y hasta chigüiros pueden estar infectados con el VLB. Por tanto, en el presente proyecto se quiere evaluar la concordancia existente entre las pruebas diagnósticas previamente mencionadas (PCR y ELISA) para especies de interés pecuario en Colombia como los ovinos, bufalinos, bovinos e incluso humanos, con el fin de determinar si en las otras especies también se detectan casos de falsos negativos como ya se ha reportado en los bovinos (1). Este tipo de estudios generan un interés particular para a futuro, implementar estrategias para el mejoramiento del diagnóstico del virus y en lo posible, evitar situaciones de subdiagnóstico poblacional, que así mismo generan un panorama de desinformación en los estudios epidemiológicos, afectando los procesos de prevención y control del virus en las diferentes explotaciones ganaderas.

#### **4. MARCO TEORICO**

##### **4.1. GENERALIDADES**

El VLB causa la leucosis enzoótica bovina, esta enfermedad afecta principalmente al ganado bovino, de los animales infectados solo un bajo número de estos (5-10%) alcanzan los estados más avanzados de la enfermedad asociados con linfosarcomas o leucemias, presentando signos clínicos de la enfermedad caracterizada por tumores malignos en el tejido linfático, pérdida de peso, baja producción de leche, muerte y altos costos veterinarios, entre otras. Esta enfermedad repercute de manera importante desde el punto de vista económico debido al impacto que tiene en el rendimiento de la producción ganadera, como en la reducción de más del 5% en la producción de leche, la disminución de peso de los animales, la comercialización y explotación cuyas repercusiones varían en diferentes regiones a nivel mundial (11).

El VLB es un retrovirus que al igual que el virus linfotrópico de células T humano 1 y 2 (HTLV 1 y HTLV 2), los cuales comparten características estructurales y funcionales. Las principales células blanco del VLB son los linfocitos B, aunque también tiene la capacidad de infectar otras células de la línea blanca como monocitos y macrófagos, y en algunos casos se ha visto en linfocitos T y células epiteliales (5,12).

El genoma viral está constituido por dos cadenas de ARNsc de polaridad positiva (13), el cual consta de genes que codifican tanto para proteínas estructurales como no estructurales. El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales p12, p15, 24, correspondientes a las proteínas de la cápside del virus. La nucleoproteína p12, tiene unión al ARN, y cumple la función de estabilizar la partícula viral. La p24 se considera la proteína más abundante de la partícula viral y, por último, la p15 constituye la matriz del virus, generando una tercera capa de la cápside. El gen *env* codifica para las glicoproteínas transmembranales (gp30) y de superficie (gp51), siendo la gp51 la proteína más antigénica del virus, es fundamental para el ciclo viral por las interacciones con los receptores celulares y es un marcador para el diagnóstico de este virus. En cuanto a sus genes codificadores de proteínas no estructurales, el gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa y los genes *tax* y *rex* codifican para proteínas auxiliares, que cumplen funciones de regulación en el ciclo viral, como la activación de la transcripción, transporte y protección del ARN viral en el citoplasma de la célula blanco (13).

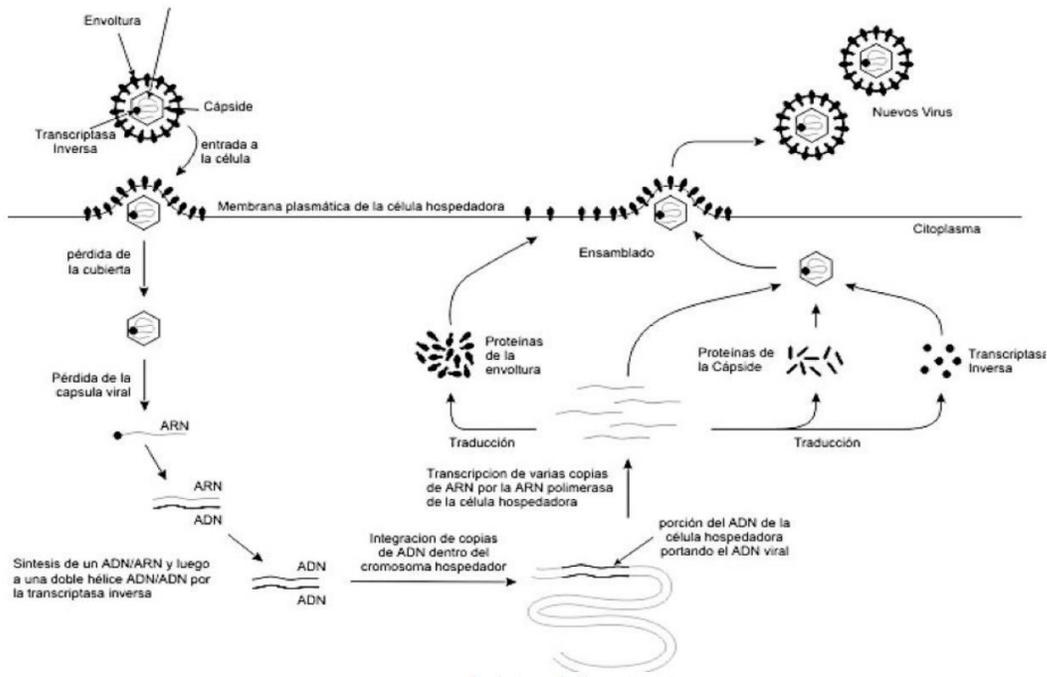
## **4.2 PATOGÉNESIS Y CICLO VIRAL**

Este virus produce una enfermedad llamada leucosis enzoótica bovina la cual es una enfermedad crónica y contagiosa del ganado bovino, con mayor prevalencia en ganado bovino de producción lechera (12). Se caracteriza por presentaciones clínicas poco aparentes, linfocitosis persistente y formación de linfosarcomas (5). A diferencia de otros retrovirus, la transformación celular no está directamente relacionada con los sitios de inserción del provirus (e.g. c-oncogenes, regiones reguladoras), sino por el efecto de la proteína Tax que favorece la proliferación celular, inhibición de apoptosis, bloqueo del mecanismo de reparación de ADN y transactivación de la transcripción, todos estos mecanismos conllevan a acumulación de mutaciones, lo que da como resultado la aparición de células transformadas (2).

La enfermedad por el VLB conlleva a 3 estados sucesivos en el animal, siendo estos un estadio inicial clínicamente silencioso, seguido de una linfocitosis persistente y en los estadios más avanzados de la enfermedad, la formación de los linfosarcomas (1). En la

mayoría de los casos la infección silenciosa no presenta ningún tipo de signo clínico físico ni cambios en el cuadro hemático, pero si es posible detectar anticuerpos específicos contra el virus. La linfocitosis persistente se manifiesta por lo general en animales mayores de 2 años de edad, estadio que puede permanecer de por vida en el animal hasta la aparición de tumores en animales con edades avanzadas (7 - 8 años). La linfocitosis persistente corresponde a una proliferación policlonal de los linfocitos B caracterizada por numerosos clones distinguidos por las diferentes zonas de integración del provirus en los cromosomas, en estos casos la tasa de anticuerpos aumenta al mismo tiempo que el número de leucocitos. El linfosarcoma es la única forma visible en el animal, caracterizada por la aparición de tumores en diversas partes del cuerpo, particularmente ubicados en el área del cuello y en áreas proximales a ganglios linfáticos. En este estadio avanzado se manifiesta en animales adultos, y ocurre entre el 5 y 10% de animales infectados (1).

El ciclo viral del VLB inicia cuando el virus ingresa a un animal no infectado y llega a los linfocitos B en el torrente sanguíneo. La proteína gp51 del virus interactúa con el receptor celular AP3d1, con lo cual se genera una fusión de membranas lo que permite el ingreso del virus a la célula, liberando la nucleocápside al interior de la misma, una vez el virus está al interior de la célula se genera la descapsidación quedando libre el ARN viral en el citoplasma, el cual es retrotranscrito por la polimerasa lo que hace que el ARN viral se convierte en ADN viral, y es transportado al núcleo donde se lleva a cabo el proceso de integración en el ADN de la célula blanco por medio de la integrasa, quedando en su estadio proviral (14). Una vez el virus se integra, este utiliza la maquinaria celular para llevar a cabo su replicación, transcripción y traducción para la producción de su progenie viral. Las nuevas partículas virales son liberadas de las células infectadas por gemación de la membrana celular, para así poder infectar otras células no infectadas (14).



**Figura 1.** Ciclo viral del VLB. (tomado de Murray et al. (2013))

Uno de los principales factores asociados al desarrollo de la enfermedad es la respuesta inmune desencadenada por el virus. Hay que resaltar que no todos los animales infectados desarrollan la enfermedad, lo que genera la pregunta si algunos de los animales infectados presentan mayor susceptibilidad a la infección por el virus que otros, y lo que se plantea en la literatura, es que en algunos casos mutaciones en genes asociados a la respuesta inmune pueden jugar un papel para reducir el desenlace de la enfermedad. El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), representa un papel importante dentro de la inmunidad de los mamíferos, ya que gracias a este se da la presentación antigénica y se genera la respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas. En el bovino el CMH se denomina Antígeno Leucocitario Bovino (BoLA) este se localiza en el cromosoma 23 y ha sido dividido en tres clases: clase I, clase II y clase III. Los genes clase I y los genes clase II (IIa y IIb) codifican glicoproteínas de membrana que se unen a péptidos exógenos. Los genes clase II son normalmente expresados por células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, las cuales procesan el antígeno y luego lo presentan a los linfocitos T ayudadores para desencadenar la respuesta inmune contra patógenos infecciosos. (15) La subregión

clase IIa contiene genes funcionales como DR y DQ. En bovinos, hay un gen DRA, tres genes DRB (DRB1, DRB2 y DRB3) y varios genes DQA y DQB. El gen BoLA-DRB3 es el más polimórfico en bovinos y tiene influencia en la presentación de antígenos a células T en la respuesta inmune a enfermedades infecciosas. Según la literatura este polimorfismo presente en los genes del BoLA se ha asociado a enfermedades infecciosas como la leucosis bovina que han sido asociadas principalmente a los polimorfismos presentes en el segundo exón del gen de clase II BoLA-DRB3. (15,16) Si bien esto se ha estudiado directamente en los bovinos, en las otras especies es poca e incluso nula la información disponible con respecto a la respuesta inmune y desarrollo de la enfermedad en otros hospederos diferentes al bovino.

#### **4.3 TRANSMISIÓN E INFECCIÓN DEL VLB EN OTRAS ESPECIES**

El VLB se transmite de manera horizontal entre el ganado bovino por el contacto directo de fluidos corporales que contengan células infectadas como la sangre, la leche o el semen, ya sea por el contacto sexual, lactancia materna y contacto con heridas entre el ganado. La transmisión del virus también se ha asociado con prácticas veterinarias deficientes como la reutilización de guantes de examinación rectal, agujas, instrumentos quirúrgicos contaminados e insectos que sirven como vectores mecánicos del virus (5,12).

Por otro lado, se ha demostrado que el VLB puede ser capaz de causar infección natural en búfalos y ovejas por la transferencia directa de células infectadas a través del contacto directo, por fluidos biológicos y posiblemente por picaduras de insectos (17). Esto ocurre sobre todo cuando se tienen producciones pecuarias mixtas, donde diferentes especies comparten un mismo espacio. En el caso de las ovejas, la infección del virus también se ha logrado a nivel experimental utilizando diversas rutas de inoculación, ya que se utiliza la oveja como modelo de estudio del virus, debido a que el desenlace de la enfermedad ocurre mucho más rápido que en el ganado bovino (18).

En el humano se ha reportado la presencia del virus en tejido mamario con y sin cáncer de mama, en sangre periférica y pulmón, así como la presencia de anticuerpos contra el virus en suero (8). Para este caso, se propone que la vía de transmisión del VLB al humano puede darse por el consumo de productos provenientes de ganado infectado como la leche, derivados lácteos y cárnicos o incluso por contacto directo con los animales y sus fluidos corporales, sin embargo, aún no hay evidencia concreta que permita entender la vía de transmisión del virus al humano (12).

#### **4.4 DIAGNÓSTICO**

Según las pruebas recomendadas por la OIE para el diagnóstico del virus, la prueba de IGDA utiliza como antígeno la gp51 para detectar anticuerpos contra este, mientras que ELISA pueden tener como antígeno gp51, p24 o inclusive los 2 de manera simultánea (7). La técnica IGDA fue difundida a mediados del siglo pasado por ser un método más específico, sensible y práctico que las pruebas hematológicas como el cuadro hemático, ya que es una prueba simple de realizar y tiene un alto nivel de especificidad (19). Sin embargo, hay que considerar que tiene una baja sensibilidad del 76% y su interpretación es subjetiva, en particular en casos de reacciones débiles (20)

También para realizar el diagnóstico del VLB la OIE recomienda las pruebas de ELISA, las cuales se basan en detectar anticuerpos específicos contra las proteínas gp51 o p24 del virus. Diferentes epitopos de la gp51 se han identificado con la aplicación práctica de desarrollar las pruebas de competición ELISA, que permiten revelar la presencia de anticuerpos anti gp51 en los bovinos infectados (1). Estos anticuerpos reactivos contra la proteína gp51, a su vez podría interpretarse asociado a la presencia de partículas virales activas ya que esta proteína es sintetizada en las etapas tardías del ciclo viral. Esta ELISA es más sensible que la IGDA y es posible utilizarla tanto en muestra de suero como en leche. Sin embargo, esta prueba de evaluación serológica presenta algunas desventajas ya que depende de los límites de detección de cada prueba donde antes casos de baja carga viral, es posible que no se produzcan anticuerpos suficientes que

puedan ser detectados por los kits de ELISA disponibles en el mercado, generando casos de falsos negativos (19).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular de diagnóstico directo del virus, también aprobada por la OIE. Este método es más sensible y específico para la detección del VLB a partir de muestras de sangre periférica detectando directamente la presencia de ADN proviral, así como también en ocasiones a partir de otros tejidos (ganglios linfáticos, linfomas, leche, etc). Esta prueba permite la detección de animales infectados incluso antes que la producción de anticuerpos sea suficiente para ser detectado por pruebas de ELISA. Esto implica que los animales seronegativos pueden ser detectados por estas pruebas, favoreciendo un diagnóstico temprano del VLB (19). Esta técnica de diagnóstico directo del virus es capaz de detectar y amplificar fragmentos génicos virales que se encuentren en estadio proviral o como partículas virales libres en el torrente sanguíneo (21). Actualmente el diagnóstico para el VLB y los estudios epidemiológicos se basan en pruebas de PCR y sus modificaciones como la PCR anidada, que es aceptada hoy en día por la OIE para una detección más precisa del virus, a pesar de los costos que esta técnica implica. Esta prueba aumenta significativamente la sensibilidad de los ensayos para la detección del virus, mitigando el efecto de los falsos negativos de las pruebas serológicas (7).

Diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar la concordancia que existe entre las pruebas serológicas y moleculares que recomienda la OIE para el diagnóstico del virus como la PCR y ELISA, dichos estudios se han llevado a cabo para conocer la relación y el grado de concordancia que hay al momento de realizar el diagnóstico del virus utilizando estas dos pruebas y así poder compararlas para saber cuál es más sensible y específica al momento de hacer un correcto diagnóstico. Uno de estos estudios, fue el reportado por Maikel y colaboradores (20) en la Universidad de la República en Uruguay donde determinaron que la técnica más sensible y confiable al momento de realizar el diagnóstico del virus es la PCR ya que permite detectar más animales positivos que la técnica de ELISA (20); estos resultados coinciden con estudios realizados por la Universidad Nacional de Colombia, en los cuales además de establecer

que la PCR es la técnica más sensible que el ELISA y establecen un grado de concordancia del 78% entre la PCR y ELISA, este resultado obedece a una concordancia significativa entre ambas pruebas (2).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la concordancia entre las pruebas diagnósticas de ELISA y PCR utilizadas para la detección del VLB en diferentes especies

### **5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar la presencia del genoma viral en muestras sanguíneas provenientes de ganado bovino, ovino, bufalino y en muestras humanas.
- Determinar la presencia de anticuerpos contra el VLB en muestras sanguíneas provenientes de ganado bovino, ovino, bufalino y en muestras humanas.
- Evaluar la correlación existente entre PCR y ELISA utilizadas para el diagnóstico del virus

## **6. METODOLOGIA**

### **6.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS**

El presente trabajo se realizó en dos fases, inicialmente se realizó una búsqueda en la base de datos del laboratorio de virología de la Pontificia Universidad Javeriana de los resultados obtenidos para muestras provenientes de ovinos y humanos analizadas mediante PCR y ELISA . Se recopiló la información relacionada para aquellas muestras que poseían disponibles ambos resultados.

La segunda fase, se realizó para los búfalos y los bovinos. Se recolectaron muestras de sangre periférica en tubos vacutainer tapa lila (con EDTA como anticoagulante) a partir de animales provenientes de fincas ubicadas en diferentes regiones del país, las cuales fueron transportadas al laboratorio de virología de la Pontificia Universidad Javeriana en

neveras de icopor con geles refrigerantes, teniendo en cuenta todas las normas de bioseguridad. A partir de dichas muestras se les separó el plasma y se extrajo el ADN.. En total, se incluyeron en el estudio 169 muestras de origen humano, 95 de ovinos, 68 de bovinos y 42 de búfalos.

## **6.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

### **6.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUINEO**

A partir de las muestras de sangre total, se realizó una dilución inicial en proporción 1:1 con buffer PBS a 1x (MP Biomedicals®). Posterior a esto, se realizó la separación de células mononucleares y recuperación de plasma sanguíneo utilizando el reactivo LymphoSep™ (MP Biomedicals®), por proceso de centrifugación a 400g x por 30 minutos. Luego de la centrifugación, se recuperó el plasma sanguíneo en tubos de 1.5 mL y fueron almacenados a -20°C. A partir del anillo de células mononucleares, se realizó la extracción de ADN total empleando el kit High Pure PCR template preparation kit de Roche ® de acuerdo a las instrucciones del fabricante y el ADN obtenido igualmente fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

### **6.2.2 DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL**

La detección del genoma viral se realizó por medio de una PCR anidada utilizando el kit de Roche ® PCR Master con cebadores específicos dirigidos a un segmento del gen *gag* del VLB. En la primera PCR, se realizó una PCR múltiple que incluía cebadores dirigidos al gen constitutivo GAPDH y a un fragmento del gen *gag* utilizando cebadores previamente reportados (4). La amplificación del gen de GAPDH se realizó con el fin de validar la integridad del ADN y descartar la presencia de inhibidores de PCR en las muestras. El perfil térmico fue de 5 min a 95°C para la denaturación inicial, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 59.3°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto con una enlongación final a 72°C por 10 min. Los fragmentos esperados para la PCR múltiple fueron de 856pb para el gen de GAPDH y de 385pb para la región de *gag*.

La segunda PCR se realizó dirigida una región interna del gen *gag* con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la técnica bajo las mismas condiciones previamente mencionadas, con una temperatura de anillamiento de 56°C. Los cebadores utilizados fueron igualmente reportados por Buehring y colaboradores en el 2014 (4). Para la PCR interna el fragmento esperado correspondía a 272pb. La PCR anidada se realizó únicamente a las muestras que fueron negativas para VLB en la primera PCR.

Como control positivo, se utilizó la línea celular FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectada con VLB y agua estéril como control negativo. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% preparados en TAE 1x teñidos con Diamond™- Nucleic Acid Dye de Promega® en una dilución 1/10,000.

### **6.2.3 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VLB**

La detección de anticuerpos contra el virus se realizó utilizando un estuche comercial de ELISA de bloqueo (INgezim BLV Compac 2.0 – Ingenasa®) dirigidos contra la proteína gp51 del VLB, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como controles positivos y negativos se utilizaron sueros de referencia suministrados en el kit.

Las muestras fueron consideradas positivas o negativas de acuerdo con el punto de corte calculado a través del cut off utilizando los valores de las absorbancias de los controles positivos y negativos para hacer el cálculo de la siguiente manera:

$$\text{Cut Off (-)} = \text{CN-} - [(\text{CN-CP}) * 0,4] ; \text{cut off (+)} = \text{CN-} - [(\text{CN-CP}) * 0,5]$$

Si el valor de la absorbancia de la muestra es mayor o igual al cut off negativo la muestra es negativa, y si es menor o igual al cut off positivo la muestra es considerada positiva.

\*Se consideró válido el ensayo si el valor de absorbancia del control negativo ha de ser al menos 5 veces superior al valor de absorbancia del suero control positivo y si el valor de absorbancia del suero control negativo ha de ser mayor de 1.

### **6.2.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Para el análisis de resultados se recopiló la información obtenida a partir de las muestras procesadas por especie, y se hizo la construcción de una base de datos binaria con sus respectivos resultados por PCR y ELISA. Los resultados fueron analizados en el programa IBM SPSS Statistics donde se aplicó la prueba estadística de concordancia con índice Kappa para determinar el porcentaje de concordancia entre las pruebas diagnósticas utilizadas. El índice kappa se interpreto teniendo en cuenta los siguientes parámetros. (Cita??)

<u>Kappa Statistic</u>	<u>Strength of Agreement</u>
<0.00	Poor
0.00–0.20	Slight
0.21–0.40	Fair
0.41–0.60	Moderate
0.61–0.80	Substantial
0.81–1.00	Almost Perfect

**Tabla 1.** interpretación de los valores del índice kappa

## 7. RESULTADOS Y DISUCIÓN

En la tabla 2 se observa el consolidado de resultados junto con su prueba estadística correspondiente.

Especie (n muestral)	PCR		ELISA		Concordancia: kappa
	% de positivos	% de negativos	% de positivos	% de negativos	
Bovinos (67)	57	43	25	75	0,383
Ovinos (95)	18	82	0	100	0
Búfalos (42)	21	79	0	100	0
Humanos (169)	54	46	0	100	0

**Tabla 2.** Resultados PCR, ELISA y concordancia kappa.

- **Datos demográficos**

Debido a que este estudio fue un compendio de resultados previos y de colaboraciones con las fincas y disponibilidad de los veterinarios para los muestreos, no fue posible determinar para todas las especies la edad de los animales, el género de estos y tampoco hubo disponibilidad de información con respecto al estado sanitario de los animales muestreados. Sin embargo, en la tabla 3 se encuentran los resultados demográficos discriminados según departamento, municipio y especie junto con sus respectivos resultados para las pruebas de PCR y ELISA.

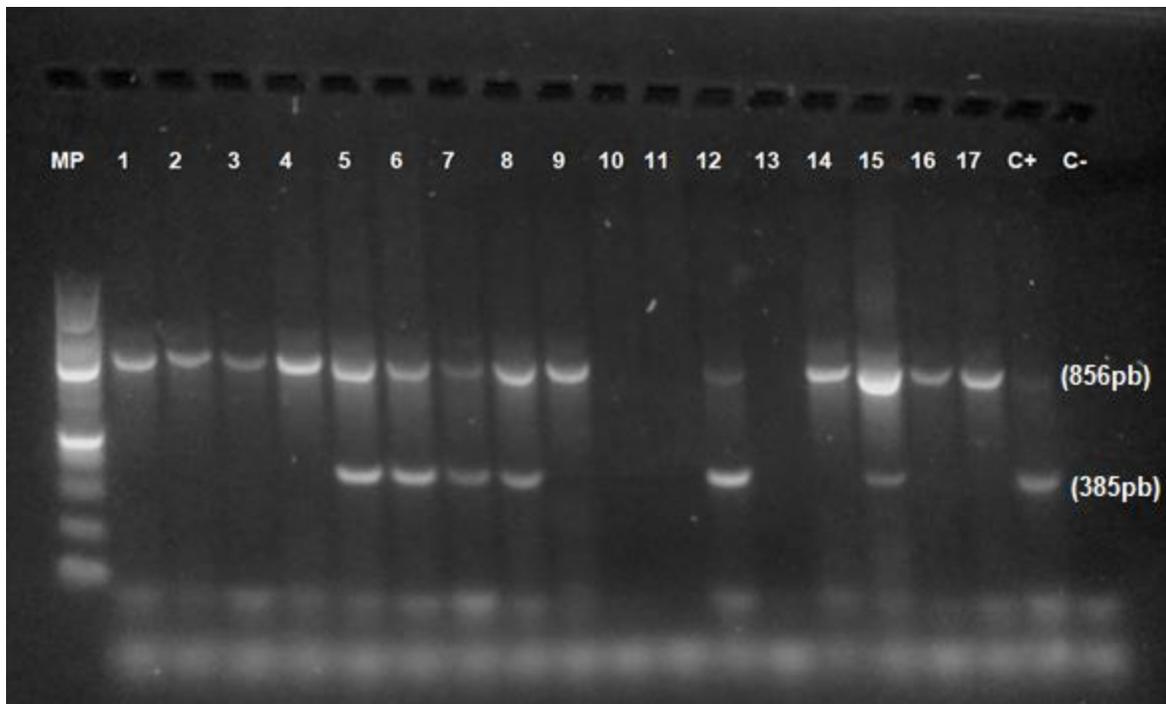
Departamento	Municipio	Especie (n muestral)	PCR	ELISA
			% de positivos	% de positivos
<b>Cundinamarca</b>	Bogotá	Humanos (mujeres, n=169)	54%	0%
	Tenjo	Vacas (32)	25%	13%
	Tocancipá	Vacas (35)	89%	37%
	Subachoque	Ovinos (35)	20%	0%
	Guasca	Ovinos (60)	17%	0%
	Agua de Dios	Búfalos (19)	31%	0%
<b>Antioquia</b>	Caucasia	Búfalos (23)	13%	0%

**Tabla  
3.**

Resultados demográficos para cada especie por PCR y ELISA

- **Determinación del genoma viral**

La detección del genoma viral se realizó por medio de una técnica directa (PCR), en la cual se realizó una PCR anidada con cebadores específicos para el gen *gag* del VLB con el fin de determinar la presencia del genoma viral en muestras sanguíneas provenientes de diferentes especies. En esta técnica se utilizó la línea celular FLK como control positivo, la cual es persistentemente infectada con el virus y como control negativo se utilizó agua estéril. De las muestras analizadas en este estudio y según la información recopilada de la base de datos del laboratorio, se determinó que por PCR se encontraron un total de 57% de muestras positivas de bovinos, 18% de ovinos, 21% en búfalos y un 54% en humanos. Hay que resaltar que para hacer la PCR anidada, se visualizaron los resultados de la primera ronda de PCR para identificar aquellas muestras que pudieran tener una alta carga proviral. En algunas muestras de bovinos, se obtuvieron resultados positivos en la primera PCR, por tanto, no fue necesario realizar la segunda PCR. Aquellas muestras negativas en la primera ronda de reacción, se les realizó la PCR. En el caso del resto de las especies, todas fueron diagnosticadas por PCR anidada, y lo que se plantea es que pueden tener una menor carga viral, razón por la cual era necesario ampliar la sensibilidad de la técnica. En la figura 2 se observa un gel representativo de la PCR múltiple realizada a las muestras de bovinos.



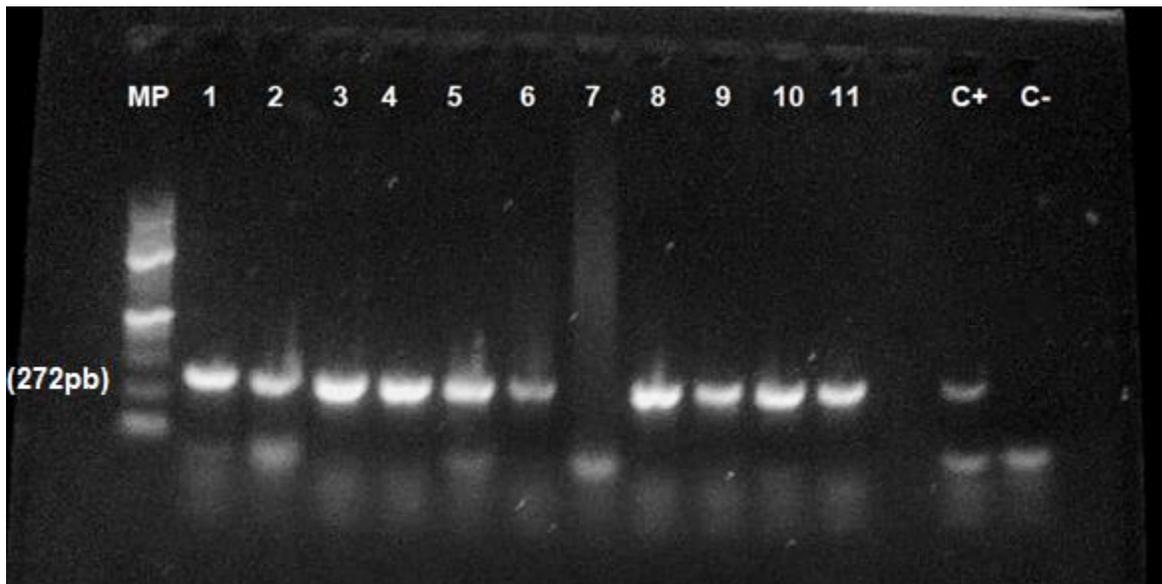
**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% representativo de los resultados del estudio. Se visualizan los resultados de la PCR múltiple, donde se observan bandas correspondientes al gen GAPDH (856pb), y bandas más pequeñas (385 pb) correspondientes al segmento génico *gag* del VLB. DNA Ladder (100pb). C+: control positivo (FLK-BLV). C-: control negativo (Agua estéril). Carril 1 a 17: muestras provenientes de bovino.

Para los bovinos, todas las muestras positivas por ELISA fueron positivas por PCR en la primera ronda realizada, estos resultados demuestran la presencia de genoma viral y presencia de anticuerpos contra el virus, para estos casos, se puede decir que hay una alta carga viral y por lo tanto también se ve reflejada en la producción de anticuerpos, como se observó en la seropositividad detectada por ELISA.

Sin embargo, en los bovinos no todas las muestras positivas por PCR anidada fueron positivas por ELISA y en las otras especies como ovinos, búfalos y humanos solamente fueron detectados individuos positivos por PCR anidada y no por ELISA. Esto indica que hay presencia de genoma viral pero no presencia de anticuerpos detectables con la ELISA utilizada, al haber tenido un resultado por la PCR anidada y no en la primera ronda

de PCR, podría sugerir que hay una baja carga viral que pueda estar influenciando una producción de anticuerpos que sea suficiente para ser detectada por las pruebas de ELISA debido especialmente a un error de tipo analítico pues la muestra utilizada fue plasma y no suero, ó a la baja sensibilidad de la prueba.

En la figura 3 se observa un gel representativo de la PCR anidada realizada a las muestras de bovinos.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% representativo de los resultados del estudio. Se visualizan los resultados de la PCR anidada, donde se observan bandas correspondientes al segmento génico *gag* (272 pb) del VLB. DNA Ladder (100pb). C+: control positivo (FLK-BLV). C-: control negativo (Agua estéril). Carril 1 a 11: muestras provenientes de bovino.

En total de las 67 muestra de los bovinos las que fueron positivas por la primera PCR fueron del 25% y por la PCR anidada fueron de 33%, para las demás especies como ovinos, búfalos y humanos el total de los resultados positivos por PCR fueron a partir de la PCR anidada.

- **Determinación de la presencia de anticuerpos contra el VLB**

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA, se encontró que, para los bovinos, solamente 25% de las muestras analizadas fueron positivas, mientras para el resto de las especies, no se obtuvo ninguna muestra positiva por esta técnica. Todos los ensayos fueron validados con los controles positivos y negativos suministrados en el kit y por el rango del cut-off.

Un punto interesante de este trabajo fue que a partir de la prueba de ELISA sólo fue posible detectar muestras positivas provenientes de bovinos. Esta ELISA al tratarse de una ELISA de bloqueo, está diseñada para detectar la presencia de anticuerpos contra la gp51 en muestras de suero o leche de bovinos ya que es lo sugerido por la casa comercial; sin embargo, para esta prueba se utilizó plasma dada la disponibilidad. En esta prueba, el anticuerpo conjugado suministrado en el kit va dirigido igualmente a la proteína gp51 que se encuentra en la fase sólida de la ELISA y no contra los anticuerpos de bovinos (22), de este modo, ante muestras negativas para anticuerpos contra la gp51, el conjugado se unirá epítopes de la gp51 de la fase sólida y, por el contrario, al encontrarse anticuerpos con afinidad a esta proteína, desplazaría la unión del anticuerpo conjugado, inhibiendo la reacción de color de la prueba. Por lo tanto, esta prueba podría ser usada para otras especies para el diagnóstico del VLB, como lo plantea Schwingel D. en su estudio para humanos en Brasil (23). Vale aclarar que, para el caso de búfalos, ovinos y humanos, las muestras positivas para VLB fueron evaluadas a partir de PCRs anidadas las cuales aumentan la sensibilidad de detección de 10-100 ng hasta 1-10 pg de ADN inicial como ha sido reportado para otros agentes patógenos (16), lo que podría indicar una baja carga viral que no pueda ser detectado por la presencia de anticuerpos.

Otro punto importante, es que por dificultades de muestreo no en todos los casos se pudo utilizar suero para las pruebas de ELISA pero se utilizó plasma sanguíneo. Si bien en algunos casos puede hacer interferencia con el diagnóstico serológico al usar plasma, se verificó con la casa comercial si era posible utilizar el plasma sanguíneo para este kit diagnóstico a pesar que el inserto del kit no lo especifica, y la casa comercial informó que

en otras ocasiones se ha utilizado plasma. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que al usar muestras de plasma hayan podido estar enmascarados los anticuerpos y así mismo que las proteínas presentes en el plasma hayan podido interferir con la prueba de ELISA.

- **Correlación existente entre PCR y ELISA**

El valor de concordancia entre las 2 pruebas para los bovinos fue de 0,383; este valor es considerado como una concordancia favorable de acuerdo a la escala de valoración propuesta por Landis y Koch (24). Para el caso de las otras especies como ovinos, búfalos y humanos el valor de concordancia fue 0, esto de acuerdo con la escala de valoración significa que no hay concordancia entre las 2 pruebas analizadas, aunque es importante tener en consideración los análisis previamente discutidos..

Ahora bien, las pruebas que fueron utilizadas en este estudio son aquellas avaladas por la OIE para el diagnóstico de VLB (7). Si bien en Colombia no se hace de rutina el diagnóstico del virus, por lo general el tamizaje poblacional para este virus se hace por medio de pruebas de ELISA debido a los altos costos y equipos especializados que requieren las pruebas de biología molecular como la PCR (6). Sin embargo, al realizar la prueba de concordancia entre estas dos técnicas para las muestras analizadas, se determinó que no existe una correlación entre los diagnósticos obtenidos por ambas pruebas.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que el diagnóstico del VLB por medio de PCR es mucho más sensible que por la prueba de ELISA ya que se lograron detectar un mayor número de muestras positivas en todas las especies comparado con los resultados de las ELISAs. Esto podría sugerir que en campo puede haber animales infectados con una baja cantidad de anticuerpos que no sean posible detectarlos por pruebas serológicas, al estar por debajo del límite de detección de las pruebas de ELISA, y así generando falsos negativos dando como consecuencia un subdiagnóstico del virus en todas las especies analizadas.

Al ver los resultados de concordancia entre las 2 pruebas diagnósticas, se pudo observar que en el caso de los bovinos la concordancia es poco significativa y que para las otras especies es nula. Estos resultados comparados con los de Úsuga y colaboradores, donde comparan la concordancia de las pruebas de PCR y ELISA en una población de vacas Holstein en Antioquia tuvieron una concordancia moderada, en este caso la prueba de ELISA utilizada fue una ELISA indirecta que detecta la gp51 y la PCR fue dirigida al gen *env*. Si bien en este estudio utilizamos un kit de ELISA diferente, los autores discuten que las concordancias pueden variar dependiendo de la epidemiología del virus en el lugar donde se realizó el muestreo, los factores sanitarios y las diferentes prácticas veterinarias que se realizan en los hatos ganaderos donde es aplicado el estudio. (25)

Según los resultados de este estudio, donde se pudo observar que para los bovinos la concordancia es poco significativa y para las otras especies (ovinos, búfalos y humanos) la concordancia entre las 2 técnicas diagnósticas fue nula, se puede decir que la técnica de PCR es capaz de detectar un mayor número de individuos positivos tanto en los bovinos como en las otras especies evaluadas y que la técnica de ELISA no es la más adecuada en el momento de realizar el diagnóstico para el VLB, ya que esta detectó menor número de individuos positivos en comparación con la PCR para los bovinos y no fue capaz de detectar individuos positivos en las otras especies. Por lo tanto, con estos resultados se podría inferir que al utilizar la técnica de ELISA para hacer el diagnóstico para VLB en otras especies como búfalos, ovinos y humanos, esta puede arrojar falsos negativos, dejando pasar desapercibida la infección.

## **8. CONCLUSION.**

Al ver los resultados globales obtenidos en este estudio podemos concluir que no hay una correlación significativa entre las pruebas de PCR y ELISA para el diagnóstico del VLB aplicadas en diferentes especies.

Para cada uno de los objetivos propuestos, se pudo concluir que:

- Se logró determinar la presencia del genoma viral en todas las especies analizadas.
- Se logró determinar la presencia de anticuerpos solamente en el bovinos.
- No hay concordancia significativa entre las pruebas de ELISA y PCR

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Toma B, Eloit M, Savey M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. *Rev sci tech Off int Epiz* [Internet]. 1990;9(4):1077–119. Available from: <https://www.oie.int/doc/ged/D9426.PDF>
2. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4:1–32.
3. Alfonso R, Almansa Je, Barrera J. del C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgos de leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev Sci Tech l'OIE*. 1998;17(3):723–32.
4. Baruta DA, Ardoino SM, Brandan JL, Sosa RE, Mariani EL, Albretch E. Leucosis bovina enzoótica. *Cienc Vet* [Internet]. 2017;13(1):9–16. Available from: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1855/1812>
5. Buehring G, Choi K, Jensen H. Bovine leukemia virus in human breast tissues. *Breast Cancer Res*. 2014;3(S1).
6. FEDEGAN., Federación Colombiana de Ganaderos. Situación en Colombia de enfermedades bovinas no sujetas a control oficial. 2011. 115 p.
7. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y DE LAS VACUNAS PARA LOS ANIMALES TERRESTRES ( mamíferos , aves y abejas ) Volumen I. 2004.
8. Ochoa Cruz A, Uribe A, Gutiérrez M. Estudio Del Potencial Zoonótico Del Virus De La Leucosis Bovina Y Su Presencia En Casos De Cáncer De Seno. *Univ Sci* [Internet]. 2006;11(2):31–40. Available from: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4968>

9. Johnson, R.; Gibson, C.D.; Kaneene, J.B. (1985) Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med.*
10. Hafez AHM, Hauck R, Lüschoff D, McDougald L, Hafez HM, Hauck AR, et al. Comparison of the Specificity and Sensitivity of PCR, Nested PCR, and Real-Time PCR for the Diagnosis of Histomoniasis. 2019;49(3):366–70. Published by: American Association of Avian Pathologists Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/4099101>.
11. Gasque R. Leucosis bovina. *Encicl Bov [Internet]*. 2008;173–5. Available from: [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e\\_bovina/04LeucosisBovina.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04LeucosisBovina.pdf)
12. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.*
13. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, et al. Recent advances in VLB research. *Viruses*. 2015;7(11):6080–8.
14. Villegas V. LEUCOSIS BOVINA ENZOÓTICA [Internet]. 2015. Available from: [http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17577/14092042\\_2015.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17577/14092042_2015.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
15. Arteaga JCZ, Zuluaga JE, Herrera AL. Characterization of the genetic polymorphism of the BoLA drb3.2 gene in Holstein and Bonholstein cows from a dairy herd in Antioquia. *Rev Lasallista Investig.* 2016;13(1):76–84.
16. Baltian L, Follmer A, Peratta D, Schmidt E, Severini R, Delbonis S, et al. Polimorfismos del exón 2 del gen BoLA-DRB3 asociados con resistencia / susceptibilidad a leucosis en ganado Holstein de La Pampa. 2016;18:9–28.
17. MEAS S, SETO J, SUGIMOTO C, BAKHSH M, RIAZ M, SATO T, et al. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. *J Vet Med Sci.* 2002;62(3):329–31
18. Porta, N. G., Alvarez, I., Suarez Archilla, G., Ruiz, V., Abdala, A., & Trono, K. (2019). Experimental infection of sheep with Bovine leukemia virus (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies. *Revista Argentina de Microbiología*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.004>
19. Buitrago Mejía J., Salazar Torres L. Virus De Leucosis Bovina (VLB): Una Revisión. *Rev Sinerg.* 2018;3:130–51.

20. Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, et al. Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Veterinaria*. 2010;46(177):15–22.
21. Felmer R, Muñoz G, Zuñiga J, Recabal M, et al. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISa y IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Medicina Veterinaria*. 2006; 38: 137-141
22. Ingenasa. INgezim BLV Compac 2.0. 2015. :2–3
23. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LMS, Frandoloso R, Kreutz LC. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>
24. Landis J, Koch, G. The measurement of observer agreement for categorical data: *Biometrics* 1977; 33: 159-174.
25. Úsuga-Monroy C, Echeverri-Zuluaga JJ, López-Herrera A. Detección molecular y serológica del virus de la leucosis bovina en una población de vacas Holstein, de Colombia. *Rev Mex Ciencias Pecu*. 2018;9(2):387.