

**VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN OVEJAS DE DIFERENTES REGIONES
DE COLOMBIA**

KERLIMBER CRISTINA NÚÑEZ GUTIÉRREZ

BOGOTÁ DC

2018

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BACTERIOLOGIA

VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN OVEJAS DE DIFERENTES

REGIONES DE COLOMBIA

Epidemiología de virus en bovinos, ovinos y bufalinos

N° Registro: 00008240

Grupo de investigación de Enfermedades Infecciosas

ESTUDIANTE DE BACTERIOLOGÍA:

KERLIMBER CRISTINA NÚÑEZ GUTIÉRREZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de:

BACTERIOLOGA

DIRECTOR:

MARIA FERNANDA GUTIERREZ FERNANDEZ. Bact. MSc. PhD.

BOGOTÁ DC.

2018

**VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN OVEJAS DE DIFERENTES
REGIONES DE COLOMBIA**

ESTUDIANTE DE BACTERIOLOGÍA:

KERLIMBER CRISTINA NÚÑEZ GUTIÉRREZ

APROBADO

MARIA FERNANDA GUTIÉRREZ FERNANDEZ Bact. MSc. PhD.

Director trabajo de grado

MANUEL EDUARDO GONGORA MEDINA M.V. MSc.

Jurado

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 mis más sinceros agradecimientos a la Pontificia Universidad Javeriana porque en ella nuestros sueños son una realidad, a la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la facultad de estudios veterinarios y zootecnia por todo el apoyo que nos brindaron para la elaboración de este trabajo de grado.

A todos los miembros del grupo de investigación de Enfermedades Infecciosas, especialmente a la doctora María Fernanda Gutiérrez Fernández quien siempre estuvo dispuesta a orientarme en los momentos de duda y brindarme todos sus conocimientos.

A Adriana Corredor que con sus conocimientos e infinita paciencia siempre me guio en todo este proceso.

Finalmente quiero agradecer a mis amigas que siempre estuvieron dispuestas a ofrecerme su ayuda y colaboración: Alejandra Cortés, Melisa Gutiérrez, Jaz Rodríguez y Angelica Cabrera, gracias porque su mano amiga me dio la fortaleza y seguridad para continuar siempre firme con el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y mi fortaleza en cada paso de mi vida.

A mi madre a quien admiro por su perseverancia, a mis hermanos por creer en mí y darme todo su apoyo durante todos estos años, y especialmente a mi padre, papá te extraño todos los días.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA - JUSTIFICACIÓN	13
4. MARCO TEORICO.....	15
4.1. Generalidades	15
4.2 Patogenia.....	15
4.3 Genoma viral.....	16
4.4 Epidemiología	18
4.5. Transmisión.....	19
4.6. Estrategias preventivas.....	19
4.6.1. Estrategia de eliminación	19
4.6.2. Estrategia de segregación.....	20
4.7. Diagnóstico de VLB	20
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos específicos.....	22
6. METODOLOGÍA	23
6.1. Calculo del (n) muestral	23
6.2. Procesamiento de muestras.....	23

6.2.1. Separación del suero	23
6.2.2. ELISA.....	23
6.2.3. Extracción de ADN	24
6.2.4. Amplificación por PCR	24
6.2.5. Secuenciación	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1. Detección de ovejas serológicamente positivas para VLB	26
7.2. Detección de los segmentos génicos <i>gag</i> , <i>env</i> y <i>tax</i>	26
7.3. Secuenciación	28
9. CONCLUSIÓN	30
10. BIBLIOGRAFIA.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Genoma VLB tomado de Polat et al. (2017).....	17
Figura 2: Estructura viral VLB tomado de Gillet et al. (2007)	17
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al control interno citocromo oxidasa (267pb). Carril 1: Control negativo. Carril 2-6: Muestras. Carril 7: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb).	25
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico tax (206pb). Carril 1: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb). Carril 2: Control positivo. Carril 3: Control negativo. Carril 4-13: Muestras.....	27
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico gag (230pb). Carril 1: Control negativo. Carril 2-6: Muestras. Carril 7: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb).	27
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico env (750pb). Carril 1: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb). Carril 2-8: Muestras. Carril 9: Control negativo.....	28

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tecnicas utilizadas para el diagnóstico de VLB	22
Tabla 2: Protocolo ELISA VLB Ingenasa.....	24
Tabla 3: Protocolo PCR anidada para los segmentos gènicos tax, gag y env.	24

VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA EN OVEJAS DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA

1. RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un oncovirus, agente etiológico de la enfermedad linfoproliferativa que se conoce como leucosis bovina enzoótica (LBE), la cual ocasiona linfocitosis de células B y solo en un pequeño porcentaje de los animales infectados se desarrolla un linfosarcoma. El huésped natural del VLB es el ganado bovino, sin embargo, otras especies logran infectarse experimentalmente tales como ovejas, conejos, pollos y ratas entre otros. El modelo de infección utilizando ovejas es muy útil, pues estas desarrollan tumores de células B con una frecuencia más alta y con un período de latencia más corto que los observados en el ganado bovino infectado de forma natural. Sin embargo, la infección natural en esta especie ha sido poco estudiada.

Teniendo en cuenta el poco conocimiento que se tiene del comportamiento de la infección natural del VLB en ovejas, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia del VLB en ovejas de diferentes regiones de Colombia, las cuales se han infectado de manera natural, dado a que esta especie podría estar jugando un papel determinante en la epidemiología del VLB en Colombia. Para ello, se emplearon dos metodologías, una serológica para determinar anticuerpos anti-gp51 de VLB por medio de una prueba de ELISA y la otra, para detección de tres segmentos génicos del VLB, *env*, *gag* y *tax* por medio de la PCR. Se analizaron 95 ovejas provenientes de diferentes regiones de Colombia, de las que se recolectaron 95 sueros y 45 sangres totales de ovejas. Se encontró que las 95 muestras analizadas para la detección de anticuerpos, todas fueron negativas, pero al analizar las 45 muestras de sangre completa, separar los linfocitos y extraerles el DNA para luego realizar una amplificación por prueba de PCR, se encontró una positividad del 33%.

Con estos hallazgos se está demostrando la circulación del VLB en ovejas colombianas.

2. INTRODUCCIÓN

El VLB es un retrovirus, un miembro oncogénico del género *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Oncoviridae*, fue descrito por primera vez en 1871 por Leisering quien habló sobre la presencia de nódulos amarillentos en el bazo agrandado de una vaca [1]. VLB es el agente etiológico de la Leucosis Enzoótica Bovina (LBE), una enfermedad linfoproliferativa que se caracteriza por leucositosis de células B [2]. En bovinos la infección por VLB se puede presentar de manera asintomática en la mayoría de los animales o presentar linfocitosis persistente (LP), que se caracteriza por un aumento permanente y estable en el número de linfocitos B no transformados en sangre periférica y del 1 al 5% de ellos desarrollan linfoma de células B después de un periodo de latencia prolongado [2].

El VLB puede transmitirse horizontalmente por la transferencia de células infectadas a través del contacto directo o por fluidos biológicos como la sangre, la leche, el semen, la saliva y posiblemente por picaduras de insectos [3], sin embargo, los procedimientos iatrogénicos como el descornado, el tatuaje de oído y cualquier uso de agujas infectadas contribuyen significativamente a la propagación viral [4] y de manera vertical por transmisión de la madre al feto o por calostro [5].

Actualmente, el VLB es altamente prevalente con cifras que oscilan entre 1% y 80% en varias regiones del mundo e induce importantes pérdidas económicas en la producción y exportación de ganado [18] debido a la pérdida de peso, debilidad, baja producción de leche y mayor predisposición a infecciones que presentan los bovinos [19]. Aunque varios países europeos han erradicado con éxito la infección, en Colombia ha sido imposible dados los altos costos de los programas de erradicación y la falta de implementación de medidas de control por parte de los entes encargados. La seroprevalencia reportada en este país fue de 42,7% por animal y 67,7% por predio [20].

Dadas las evidencias experimentales de infección por VLB en ovejas [21-24] es importante reconocer la presencia de este virus en infección natural, ante el papel que esta especie pueda estar jugando en la epidemiología del VLB. Los resultados de este estudio son útiles para la epidemiología del VLB en Colombia y en el mundo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA - JUSTIFICACIÓN

El virus de la leucosis bovina es un oncovirus que infecta el ganado bovino en todo el mundo causando la leucosis bovina enzoótica (LBE), una patología en la que el 70% de los bovinos infectados son portadores asintomáticos del virus; el 30% de los animales presentan linfocitosis persistente y del 1 al 5% desarrollan la fase clínica de la enfermedad que se conoce como linfosarcoma [2]. Este virus induce importantes pérdidas económicas en la producción y exportación de ganado debido a la afectación que estos presentan en su sistema inmunológico [25]. Por ejemplo, la pérdida anual para la industria láctea estadounidense debido a VLB en 2003 fue de 525 millones de dólares [18].

El VLB se ha extendido a todos los continentes a través del comercio de animales y es frecuente en el ganado bovino de todo el mundo [18]. En Europa se han establecido medidas de control y programas de erradicación de VLB, que han tenido mucho éxito en la mayoría de los países que conforman la comunidad europea, sin embargo, el VLB todavía existe en naciones de Europa oriental como Polonia, Ucrania y Croacia [25]. En Colombia se ha reportado una seroprevalencia en ganado vacuno de 42,7% en animales y 67,7% en granjas de acuerdo con Ortiz y colaboradores [20], aunque es muy probable que esta aumente debido a la inexistencia de medidas de control y prevención. El aumento poblacional de las especies ovina y bovina según el último censo pecuario nacional realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario en el año 2018 fue de 2,4% y 4% con respecto al año 2017, dando cuenta de la importancia de ambas ganaderías en el país (ICA) [26].

Los bovinos son la principal fuente de infección del virus de la leucosis bovina, por lo que antes se creía que el virus solo podía infectar naturalmente al ganado

vacuno; sin embargo, se han hecho varios estudios de infección experimental en ovinos, utilizando diversas rutas de inoculación mostrando que esta especie también es susceptible al VLB. En Venezuela durante el año 1978, se examinaron 179 ovejas separadas en tres grupos, el objetivo era detectar anticuerpos anti-VLB por inmunodifusión en gel (AGID); estos animales se mantuvieron en pastizales separados, en una granja en la que había bovinos infectados. Se observaron animales seropositivos en los tres grupos: en el primero se detectaron ocho animales de cinco a seis años; en el segundo siete nuevos casos de cinco a seis años; y en el tercero un único caso de cinco años. Estos datos demostraron la seroprevalencia de VLB en rebaños de ovejas infectados de forma natural [27]. En Stavropol Rusia en 1989 se llevaron a cabo pruebas serológicas en tres distritos los cuales mostraron 82 ovejas seropositivas para VLB y los exámenes post mortem revelaron la presencia de linfosarcoma en ciertos órganos [28]. Un estudio más reciente hecho en Brasil durante el periodo 2005 -2007 en el cual se empleó la prueba de AGID, se procesaron 2592 muestras de ovejas de diferentes distritos, la tasa de rebaños seropositivos fue de 5.7% y para los animales fue de solo 0.077%; las dos ovejas seropositivas eran una hembra de 13 meses de edad y la otra era de edad y raza desconocidas [29]. Estas investigaciones confirmarían que, aunque el ganado bovino es el principal huésped natural de VLB, otras especies pueden estar infectadas naturalmente, así mismo sufrir la enfermedad en un periodo de tiempo más corto comparado con lo que ocurre en la vaca [4,21,22].

En Colombia, no se han realizado estudios sobre la seroprevalencia de VLB en ovejas infectadas de forma natural. La cría de ovejas es una industria en expansión en toda Colombia, el comercio de animales vivos y productos derivados de estos es una actividad importante. La explotación de la especie ovina en el país registra la existencia de 1.578.684 ejemplares distribuidos principalmente en los departamentos de la Guajira (42,43%), Magdalena (10,86%), Cesar (7,93%), Córdoba (7,08%) y Boyacá (6,71%) de acuerdo al censo reportado en el año 2018 por el ICA [26].

Por ello, teniendo en cuenta que las ovejas son susceptibles a enfermedades epidemiológicamente importantes y cumplen un papel decisivo en la supervivencia y diseminación de agentes virales como el VLB, deben ser una prioridad para los entes involucrados de la salud pecuaria establecer la prevalencia del VLB en esta especie, para en un futuro pueda ser incluida en programas de control y vigilancia, aportando así estrategias preventivas en pro de erradicar el virus de la leucosis bovina en el país.

4. MARCO TEORICO

4.1. Generalidades

El virus de la leucosis bovina es un retrovirus, un miembro oncogénico del género *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae*, subfamilia *Oncoviridae*, estrechamente relacionado con el virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1). Es el agente causante de la leucosis bovina enzoótica (LBE) [2], una enfermedad linfoproliferativa contagiosa del ganado que se presenta en todo el mundo, se caracteriza por linfosarcoma de células B, aunque el VLB puede infectar varias poblaciones de células inmunitarias, incluidas las células T, monocitos; y granulocitos en sangre periférica y tejidos linfoides del ganado vacuno [21,30]. Esta enfermedad se encuentra en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una enfermedad de gran importancia para el comercio internacional [31].

4.2 Patogenia

La infección por VLB puede dar lugar a una variedad de resultados clínicos, aunque el 70% de los bovinos infectados son portadores asintomáticos del virus, que no muestran signos de infección, algunos pueden exhibir un grado de desregulación inmunológica que conduce a pérdidas económicas por diversas razones, incluidas la reducción de la producción de leche [32], una alta incidencia de enfermedades infecciosas [33] y la ineficiencia reproductiva [34]. Se ha evidenciado que un 30% de los animales presentan linfocitosis persistente (LP),

caracterizada por un aumento permanente y estable en el número de células B que circulan en la sangre periférica y del 1 al 5% de los bovinos infectados desarrollan linfoma de células B que se origina de la acumulación mono u oligoclonal de células después de un período de latencia, esta forma maligna de linfoma de células B se detecta predominantemente en bovinos de 4 a 5 años de edad [35]. Los signos clínicos de los tumores inducidos por VLB son variados y principalmente implican trastornos digestivos, pérdida de peso, debilidad, baja producción de leche, pérdida de apetito y linfadenopatías [35].

Este virus al ser un retrovirus se integra en el genoma de las células diana y permanece allí como provirus conllevando a que todos los animales se infecten persistentemente y se conviertan en portadores del virus durante el transcurso de sus vidas [36].

4.3 Genoma viral

El genoma de VLB está compuesto por 8714 nucleótidos [37] y como todos los retrovirus, en sus extremos presenta una secuencia LTR (Repetición terminal larga) así como 6 marcos de lectura abiertos (orf) designados como *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *tax*, y *rex*, como se puede observar en la figura 1. Los orf codifican para proteínas estructurales y enzimas, las cuales tienen funciones esenciales e indispensables en el ciclo de vida viral, la infectividad viral y la producción de viriones infecciosos [36,37].

Además de los genes estructurales *gag*, *pro*, *pol* y *env* requeridos para la síntesis de las proteínas estructurales internas del virión, la proteasa viral, la transcriptasa inversa y las glicoproteínas de la envoltura. El genoma del VLB contiene una región pX situada entre la envoltura y la repetición terminal larga 3' [38,39], en la que se ubican el gen *tax*, que según los estudios de leucemogénesis inducida por VLB es un potente activador transcripcional de la expresión génica viral e induce la immortalización de las células infectadas. La proteína Rex es responsable de la exportación nuclear de ARN viral y promueve la acumulación

citoplásmica y la traducción del ARNm viral en células infectadas con VLB y las proteínas R3 y G4 contribuyen al mantenimiento de una alta carga viral [40].

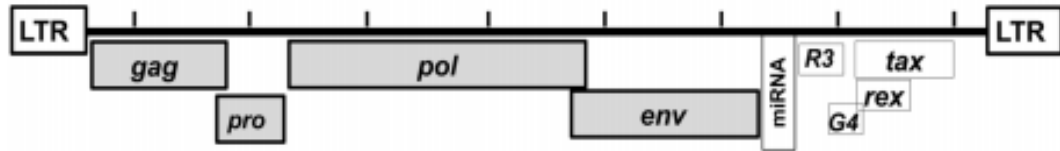


Figura 1: Genoma VLB tomado de Polat et al. (2017)

El gen *gag* codifica para la proteína de la matriz, p15, que se une al ARN genómico viral e interactúa con la bicapa lipídica de la membrana viral; la proteína de la cápside, p24 y la proteína de la nucleocápside, p12. El gen *pol* codifica para la ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa) además de una integrasa [41]. El gen *env* codifica para las glicoproteínas gp51 y gp30, gp51 se encuentra en la superficie de la membrana viral y favorece el reconocimiento del receptor viral celular [37], gp30 se inserta en la bicapa lipídica y ancla el complejo gp51/gp30 en la envoltura viral y la membrana celular infectada (figura 2) [41], la asociación gp30/gp51 ayuda a la fusión de la membrana durante la infección de la célula huésped [42,43].

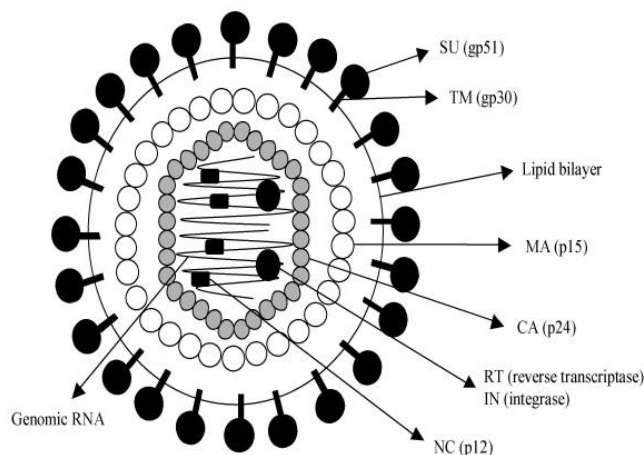


Figura 2: Estructura viral VLB tomado de Gillet et al. (2007)

4.4 Epidemiología

VLB se ha extendido a todos los continentes a través del comercio de animales de cría, y prevalece en el ganado en todo el mundo, aunque los niveles de infección varían entre los países. Los programas de erradicación de VLB y las medidas de control se han establecido en los países miembros de la Comunidad Europea desde la segunda mitad del siglo XX, y los programas de erradicación han tenido mucho éxito en la mayoría de Europa occidental [44,45] de hecho, algunos países, incluidos Dinamarca, Finlandia, Suiza, Estonia, los Países Bajos y Polonia, están completamente libres de VLB [44,46,47]. A pesar de que la mayoría de los países de Europa occidental están libres de VLB, la LEB todavía existe en los países de Europa oriental, incluidos Ucrania y Croacia [25,48,49]. Además, en Italia, Portugal, Bielorrusia, Letonia, Grecia, Rumania y Bulgaria el VLB está presente, aunque la enfermedad está ausente o está limitada a áreas específicas.

En América del Norte, un estudio epidemiológico de la prevalencia de VLB en el ganado lechero de Estados Unidos realizado por el Sistema Nacional de Monitoreo de la Salud Animal del Departamento de Agricultura demostró que el 83.9% del ganado lechero era VLB positivo a nivel de granja y el 39% de los rebaños de carne tenían al menos un animal infectado [50]. En Canadá, los estudios de prevalencia de VLB revelaron que hasta el 37.2% de las vacas y el 89% de las granjas eran positivas para VLB [51,52]. VLB también está presente en el ganado vacuno y lechero en México [53]; sin embargo, la enfermedad está ausente o está limitada a áreas específicas.

La infección por VLB está muy extendida en China, las tasas de infección son de hasta el 49,1% entre el ganado lechero individual, mientras que el 1,6% del ganado de carne es positivo para VLB [54]. Los estudios epidemiológicos en Japón revelaron niveles variables de prevalencia de VLB en todo el país, las tasas de infección son de 40.9% en ganado lechero y 28.7% en ganado de carne [55]. Menos del 6% del ganado se encuentra infectado con VLB en Mongolia (3.9%) [56], Camboya (5,3%) [57], y Taiwán (5,8%) [58], mientras que una encuesta serológica

en Irán reveló que la prevalencia de VLB está entre el 22,1% y el 25,4% en ese país [21,59].

En América del Sur, se han observado niveles relativamente altos de prevalencia de VLB en la mayoría de los países. En Brasil, la prevalencia de VLB varía entre los estados, con tasas de infección que van del 17,1% al 60,8% [60-63], para Argentina la prevalencia de VLB a nivel individual y granja se encuentra en 77.4% y 90.9%, respectivamente [64-66], además, las tasas de infección individual reportadas en Chile, Bolivia, Perú, Venezuela, Uruguay y Paraguay varían entre 19.8% y 54.7% [66-68]. En Colombia se ha reportado una seroprevalencia en ganado vacuno de 42,7% en animales y 67,7% en granjas de acuerdo con Ortiz y colaboradores [20].

4.5. Transmisión

Este virus puede transmitirse de diferentes maneras, entre las que destacan la transmisión horizontal esencialmente a través de la transferencia de células infectadas [69] en sangre, leche, semen o saliva mediante la práctica de procedimientos iatrogénicos de manejo del ganado como el descornamiento, el tatuaje del oído, la palpación rectal y el uso de agujas infectadas explica en gran medida la propagación de la infección [70]. También se ha identificado la transmisión del VLB por insectos hematófagos [71] y el contacto directo entre animales infectados y sanos.

4.6. Estrategias preventivas

4.6.1. Estrategia de eliminación

Esta estrategia consiste en identificar y eliminar el ganado infectado con VLB, para la identificación de animales infectados se usan métodos hematológicos o serológicos; luego de identificar los animales estos deben ser sacrificados de inmediato [72]. Esta metodología ha sido fundamental para lograr el estado libre de VLB en las dentro de un período de tiempo relativamente breve en comparación con

otras alternativas [73-75]. La eficacia de esta estrategia se evidencia con la erradicación exitosa de la enfermedad en varios países de Europa occidental, pero, aunque este enfoque ha sido eficiente, su viabilidad enfrenta algunas restricciones importantes como por ejemplo que la tasa de prevalencia de infección no debe ser alta debido al alto costo económico al que conllevaría la implementación de esta estrategia.

4.6.2. Estrategia de segregación

Esta estrategia busca reducir los costos al segregar en lugar de sacrificar los animales infectados; al igual que en el enfoque de eliminación, se deben identificar los animales seropositivos y separarlos de los seronegativos [76,77]. La principal ventaja de este enfoque es la reducción de pérdidas económicas debido al sacrificio prematuro y obligatorio de animales positivos para VLB. Aunque es bastante exigente, este tipo de programa ha sido útil para disminuir la prevalencia o incluso lograr la erradicación de la enfermedad [78-80]. La desventaja es que existe un riesgo permanente de reintroducir animales infectados y, por lo tanto, puede ser más lento que la estrategia de eliminación.

4.7. Diagnóstico de VLB

Se han desarrollado técnicas para el diagnóstico de VLB que se han implementado en todo el mundo, estos métodos de diagnóstico pueden dividirse en dos grupos principales, que consisten en pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos, lo cual es conocido como seroprevalencia, para lo cual se utilizan pruebas de ELISA o la detección del genoma proviral, lo cual da la información de presencia del antígeno y a lo que se le denomina prevalencia, mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en ácidos nucleicos.

Los métodos serológicos para determinar anticuerpos contra el VLB son generalmente las pruebas convencionales como la inmunodifusión en gel de agar

(AGID), el ensayo de hemaglutinación pasiva (PHA), el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA), la mayoría de estos métodos serológicos tienen como objetivo detectar anticuerpos en suero y leche. AGID es relativamente económico y se puede usar para examinar varias muestras de suero simultáneamente; sin embargo, no es lo suficientemente sensible [81] y no es adecuado para el análisis de muestras de leche. La ELISA es un procedimiento que se puede utilizar para analizar muestras de suero y leche; sin embargo, produce resultados falsos negativos en muestras de suero de ganado en la fase temprana de la infección [82], lo cual la hace una técnica muy poco sensible.

Por otro lado, una variedad de métodos de PCR, que incluyen PCR estándar, PCR anidada y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), se han aplicado ampliamente en todo el mundo para la detección de VLB [83]. Una variedad de genes en el genoma de VLB están dirigidos a la detección de la prevalencia de la infección por BLV mediante métodos de diagnóstico directo de PCR, incluida la región LTR [83].

Las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de VLB son ELISA y la detección del genoma provírico mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a que el VLB puede integrarse en sitios dispersos dentro del genoma del huésped y permanecer allí toda la vida del animal [53,84]. Por lo tanto, además del diagnóstico de rutina de la infección con VLB usando las técnicas serológicas convencionales, los métodos de PCR pueden acelerar en gran medida la detección de la prevalencia de VLB. En la tabla 1, se presenta un resumen de las metodologías diagnósticas utilizadas.

Ensayo diagnóstico	Muestra	Objetivo	Ventajas	Desventajas
AGID	Suero	Anticuerpos	Específico, simple y fácil de realizar, detección a gran	Menos sensible, no permite evaluar el estado de la enfermedad

			escala, bajo costo y rápido	
ELISA	Suero y leche	Anticuerpos	Detección a gran escala, específica y rápida	Falsos negativos (ganado en la fase de infección temprana)
PHA	Partícula viral	Glicoproteínas VLB	Sensible y específica, menos costosa y rápida.	Afectado por el pH y la temperatura.
RIA	Suero	Anticuerpos	Sensible, capaz de detectar VLB durante el período temprano de la infección	No se puede utilizar para la detección a gran escala
PCR	ADN viral	Provirus	Rápido, sensible, detecta VLB durante la fase temprana de la infección, se pueden analizar varias muestras.	Requiere equipo especializado (Termociclador)

Tabla 1: Técnicas utilizadas para el diagnóstico de VLB

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar la presencia del virus de la leucosis bovina en ovejas de diferentes regiones de Colombia.

5.2. Objetivos específicos

- Detectar anticuerpos anti-VLB en ovejas de diferentes regiones de Colombia.
- Detectar la presencia de tres segmentos génicos *gag*, *env* y *tax* del VLB en ovejas de diferentes regiones de Colombia.

6. METODOLOGÍA

6.1. Calculo del (n) muestral

De acuerdo con WinEpiscope [85], con la fórmula para proporciones $n=p(1-p)(Z/E)^2$, teniendo en cuenta una prevalencia del 1% (basados en los antecedentes reportados previamente en otros países) [21,27-29], con un nivel de confianza del 99.5% y un margen de error de 3%, en una población de 1'449.705 ovejas reportada por el ICA según el censo ovino del año 2017, se tomó una muestra de 87 individuos. Dicho muestreo se realizó en ovejas provenientes de: Tolima, Huila, Cundinamarca y Santander que fueron llevadas a plantas de beneficio. Las muestras de sangre total se recolectaron en tubos vacutainer con EDTA; las cuales se transportaron al laboratorio de virología de la Pontificia Universidad Javeriana en neveras de icopor teniendo en cuenta todas las condiciones de bioseguridad. Allí se almacenaron (-20°C) hasta su procesamiento.

6.2. Procesamiento de muestras

6.2.1. Separación del suero

Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm y luego se recogió el suero en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se almacenó a (-20°C) hasta su procesamiento.

6.2.2. ELISA

Se utilizó un ensayo de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos contra VLB, siguiendo las recomendaciones del fabricante. (INGENASA). Sueros de referencia positivo y negativo se usaron como controles. El protocolo utilizado se describe en la tabla 2.

Reactivo	Volumen (µL)
Diluyente (En todos los pozos)	50
Controles (Pozos correspondientes)	50
Muestra	50
Incubar 1 hora a 37°C	

Lavado	
Conjugado (En todos los pozos)	100
Incubar 30 minutos a 37 ^a C	
Lavado	
Sustrato (Todos los pozos)	100
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente	
Solución de frenado (Todos los pozos)	100
Lectura 450nm	

Tabla 2: Protocolo ELISA VLB Ingenasa.

6.2.3. Extracción de ADN

A partir de la muestra de sangre total, se realizó la separación de células mononucleares empleando el reactivo Lympho separation medium y a estos se les extrajo el DNA total empleando el kit de preparación de PCR Roche High Pure de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El DNA se congeló (-20 ° C) y se almacenó hasta su uso posterior.

6.2.4. Amplificación por PCR

Las pruebas de PCR se realizaron utilizando el kit de Roche PCR con cebadores específicos para los genes mencionados anteriormente.

Un total de 45 DNAs obtenidos a partir de células mononucleares de ovejas se procesaron utilizando la técnica de PCR para identificar los tres segmentos génicos del VLB (*gag*, *env* y *tax*). Las pruebas de PCR se realizaron utilizando master mix de la casa comercial Roche, con primers específicos descritos en la tabla 3. Las condiciones de amplificación se resumen en la misma tabla.

Gen	Secuencia (primers)	Denaturación	Enlongación	Hibridación	Ciclos	Referencia
<i>Gag</i> (230pb)	F-ACCCTACTCCGGCTGACCTA R-CTTGGACGATGGTGGACCAA	95°C	56°C	72°C	40	Buehring <i>et al.</i>
<i>Env</i> (701pb)	F-CAACAATGGATGACARCATA R-GTTGCCTTGAGAAACRTT	94°C	54.9°C	72°C	40	Adriana Corredor
<i>Tax</i> (206pb)	F-ATGTCACCATCGATGCCTGG R-ATGTCACCATCGATGCCTGG	94°C	57°C	72°C	40	Buehring <i>et al.</i>

Tabla 3: Protocolo PCR anidada para los segmentos génicos *tax*, *gag* y *env*.

El DNA extraído de una muestra de sangre de un animal infectado y caracterizado previamente como VLB se usó como control positivo y agua libre de DNasa y RNasa como control de amplificación negativo.

El gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa ovina (267 pb) se utilizó como control interno de la PCR. Todas las muestras fueron positivas para el control interno. En la figura 3 se muestra un gel representativo.

Los resultados de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% preparados en 1x TAE (Biorad) teñidos con 10µl de Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega).

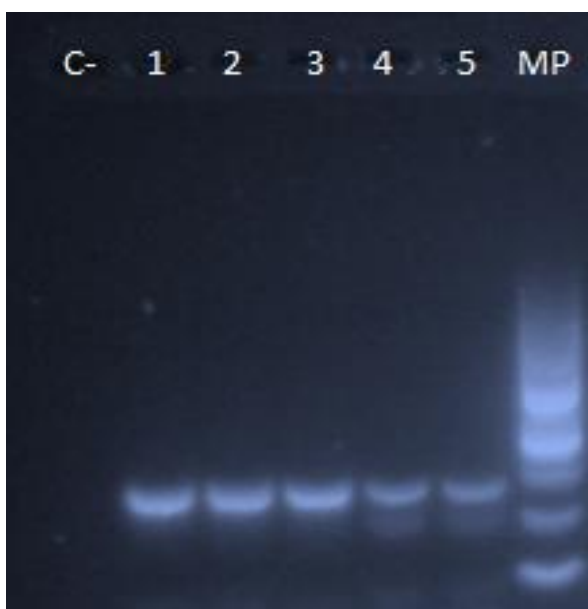


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al control interno citocromo oxidasa (267pb). Carril 1: Control negativo. Carril 2-6: Muestras. Carril 7: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb).

6.2.5. Secuenciación

Tres de los productos de PCR positivos para el segmento genico *tax* y uno para *env* se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR (Roche High Pure), siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego se enviaron al Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia para secunciar por Sanger. Los cebadores (sentido y antisentido) utilizados para la secuenciación fueron los mismos que los de la PCR anidada. Se utilizó BioEdit Sequence Alignment Editor

(versión 7.2.5) para editar las secuencias. Se obtuvieron secuencias consenso para cada muestra. La herramienta en línea BLASTn se utilizó para verificar la identidad de las secuencias obtenidas.

7. RESULTADOS

7.1. Detección de ovejas serológicamente positivas para VLB

La metodología de ELISA utilizando el kit de Ingenasa fue validada con los controles positivo y negativo provistos en el kit, sin embargo, todas las muestras fueron negativas para anticuerpos anti gp51 de acuerdo con el punto de corte descrito por el fabricante.

7.2. Detección de los segmentos génicos *gag*, *env* y *tax*

Por su parte, el criterio diagnóstico para evaluar la presencia de VLB en las muestras de oveja fue la presencia del segmento de 206 pb del gen *tax*. Un total de 15/45 muestras fueron positivas para la PCR, lo que implica una prevalencia de 33% para VLB. En la figura 4 se muestra un gel representativo.

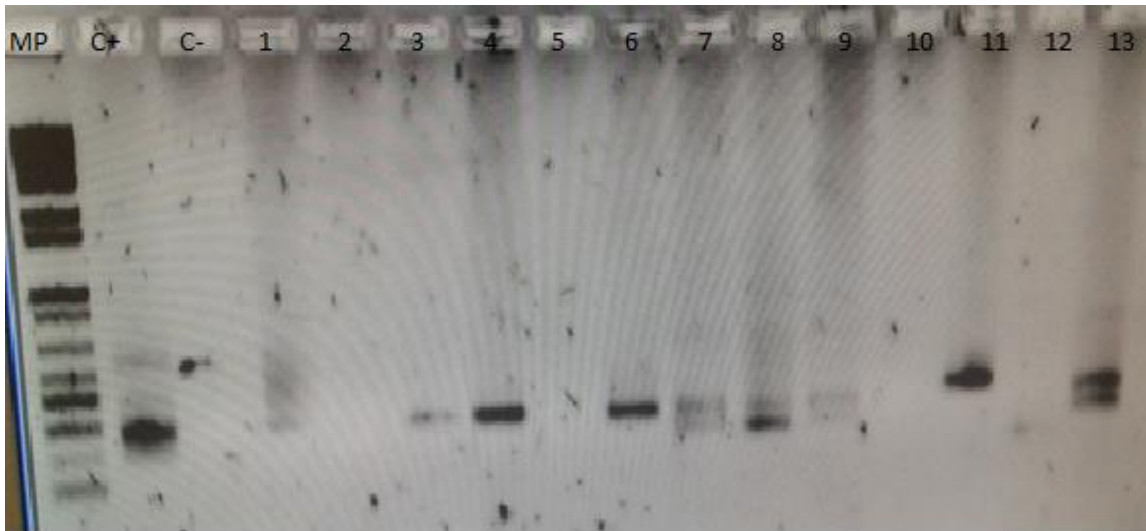


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico *tax* (206pb). Carril 1: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb). Carril 2: Control positivo. Carril 3: Control negativo. Carril 4-13: Muestras.

Las muestras positivas por *tax* se les realizó PCR para *gag* (230 pb). En la figura 5 se muestra un gel representativo.

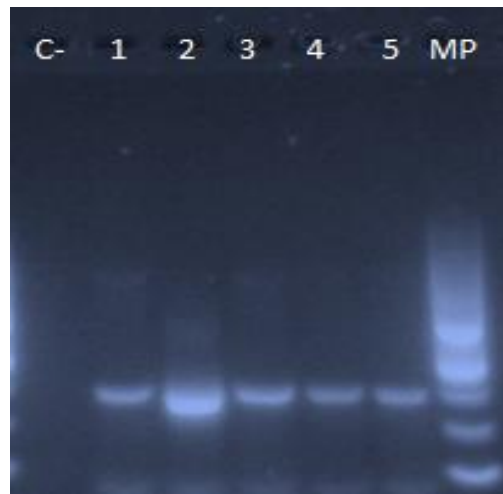


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico *gag* (230pb). Carril 1: Control negativo. Carril 2-6: Muestras. Carril 7: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb).

Finalmente se realizó una última PCR para identificar el gen *env* (730 pb) en las muestras positivas para *tax*.

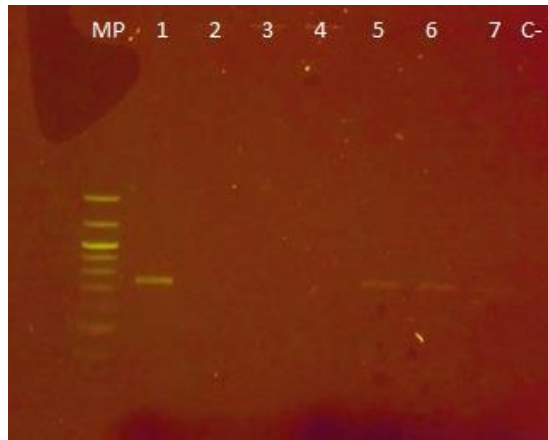


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observan patrones de bandas correspondientes al segmento génico *env* (7300pb). Carril 1: Marcador de peso molecular DNA Ladder (100pb). Carril 2-8: Muestras. Carril 9: Control negativo.

7.3. Secuenciación

La identidad de las tres muestra analizadas para el segmento del gen *tax* fue de 95% a 100%, así mismo la identidad de la muestra que fue analizada para el segmento génico *env* fue de 100% como se puede observar en el anexo 1, demostrando que la secuencia analizada corresponde a dicho segmento génico del VLB, adicionalmente se demostró que estas secuencias hacen match con las reportadas de cepas aisladas de bovinos colombianos por el grupo de investigación de enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana.

8. DISCUSIÓN

La importancia de las infecciones retrovirales veterinarias en los últimos años ha aumentado considerablemente ya que los retrovirus poseen la capacidad de integrarse y permanecer en el DNA de las células que infectan, de tal forma que el individuo que adquiere la infección permanece así durante toda su vida.

El Virus de la Leucosis Bovina infecta en condiciones naturales a los bovinos, en los cuales se le ha asociado con deterioros inmunológicos y baja productividad y sobrevida, a pesar de que la mayoría de los infectados permanecen asintomáticos y sólo una baja proporción manifiestan sintomatología clínica. El virus se encuentra distribuido en la población bovina del mundo, y las pérdidas asociadas a la

presencia del VLB en hatos afectados justifican los estudios destinados a conocer la seroprevalencia de esta infección y en base a estos datos aplicar estrategias de control y erradicación, por lo que el presente estudio se realizó con el fin de conocer la prevalencia mediante la técnica de PCR que nos permite detectar el genoma proviral y la seroprevalencia a través de la detección de anticuerpos anti-VLB.

En el presente trabajo se pretendió detectar anticuerpos anti-gp51 dado que existe una fuerte respuesta serológica contra este antígeno, por lo que es un buen indicador de la infección por VLB; no obstante, se encontraron resultados distintos al comparar la seroprevalencia con la prevalencia determinada por la técnica de PCR. La infección por VLB estuvo presente en un 33% de los animales por la técnica de PCR los cuales fueron confirmados por secuenciación, encontrando un porcentaje de identidad entre el 95% y 100%. Por su parte todas las muestras analizadas por la técnica de ELISA fueron negativas. Las pruebas serológicas son una buena herramienta para detectar animales infectados con VLB, sin embargo, éstas no siempre son capaces de determinar la infección en casos de infecciones tempranas y muestras con concentraciones bajas de anticuerpos debido a un bajo estímulo inmunológico [81,82].

En otros países la prevalencia de la infección por VLB en ovinos está poco documentada [21,27-29], sin embargo, en Brasil la seroprevalencia reportada fue de solo 0.077% por animal; por otro lado, en Irán se estableció una prevalencia de 9,5% en ovejas infectadas con VLB de forma natural. Los estudios a nivel nacional son nulos, por lo que la prevalencia de este virus en ovejas colombianas se desconoce.

Este estudio demostró una prevalencia de 33% por PCR en ovejas provenientes de los departamentos de Santander y Cundinamarca, con un 20% de prevalencia para Santander y 13% Cundinamarca. La prevalencia obtenida en este estudio para la infección natural en ovejas es mucho mayor a la reportada en Irán por Nekoei y colaboradores, y tiene unos datos epidemiológicos importantes ya que justifica la necesidad de investigar la infección por VLB en ovinos en otras regiones con el fin de evaluar la prevalencia total de la enfermedad en el país.

Finalmente, los datos obtenidos, muestran no solo el significado de la enfermedad como un problema de salud animal, sino también el rápido crecimiento de la población bovina infectada debido a la convivencia con otras especies que también pueden contraer la infección.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación comprueban que efectivamente el VLB es capaz de infectar animales que comparten el mismo nicho ecológico con su huésped principal, en este caso la oveja, lo cual no descarta la posibilidad de que también este infectando otras especies. Estos resultados son determinantes para los entes involucrados de la salud pecuaria, ya que les permitirá establecer programas de control y vigilancia que no solo contemplen al ganado vacuno sino otras especies que puede estar jugando un papel importante en la transmisión y epidemiología del VLB en Colombia como es el ganado ovino.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Leisering A. (1871) Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. *Bericht über das Veterinarwesen im Königreich Sachsen* 16 15–16.
- [2] Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., et al. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*.
- [3] Ferrer JF, Piper CE. (1978). An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Ann Rech Vet*.
- [4] Hopkins SG, DiGiacomo RF. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*.
- [5] Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res*.

- [6] Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M. (2000). Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci*.
- [7] Altanerova V, Ban J, Altaner C. (1989). Induction of immune deficiency syndrome in rabbits by bovine leukaemia virus. *AIDS*.
- [8] Onuma M, Wada M, Yasutomi Y, Yamamoto M, Okada HM, Kawakami Y. (1990). Suppression of immunological responses in rabbits experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Microbiol*.
- [9] Wyatt CR, Wingett D, White JS, Buck CD, Knowles D, Reeves R, Magnuson NS. (1989). Persistent infection of rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction. *J Virol*.
- [10] Altanerova V, Portetelle D, Kettmann R, Altaner C. (1989). Infection of rats with bovine leukaemia virus: establishment of a virus-producing rat cell line. *J Gen Virol*.
- [11] Boris-Lawrie K, Altanerova V, Altaner C, Kucerova L, Temin HM. (1997). In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. *J Virol*.
- [12] Altanerova V, Ban J, Kettmann R, Altaner C. (1990). Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis. *Arch Geschwulstforsch*.
- [13] Olson C, Kettmann R, Burny A, Kaja R. (1981). Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst*.
- [14] Mammerickx M, Portetelle D, Burny A. (1981) Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species. *Zentralbl Veterinarmed B*.
- [15] Djilali S, Parodi AL, Levy D, Cockerell GL. (1987). Development of leukemia and lymphosarcoma induced by bovine leukemia virus in sheep: a hematopathological study. *Leukemia*.
- [16] Djilali S, Parodi AL. (1989). The BLV-induced leukemia--lymphosarcoma complex in sheep. *Vet Immunol Immunopathol*.

- [17] Kohara J, Konnai S, Onuma M. (2006) Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn J Vet Res*.
- [18] Da Y, Shanks RD, Stewart JA, Lewin HA. (1993). Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- [19] Bendixen HJ. (1967). Epizootiology, diagnosis and control of bovine leukosis. *Bull Off Int Epizoot*.
- [20] Ortiz D, Sánchez A, Tobón J, Chaparro Y, Cortés S, Gutiérrez M. (2016). Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*.
- [21] Nekoei S, Taktaz T, Doosti A, Khamesipour F. (2015) Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*.
- [22] Marín, C.; López, N.; Alvarez, L.; Castaños, H. España, W. León, A. Bello, (1982) Humoral spontaneous response to Bovine Leukemia Virus Infection in zebu, sheep, buffalo and capybara. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*.
- [23] Kunakov, A. A.; Abakin, S. S. (1993) Bovine leukosis virus infection in cattle and sheep in Stavropol Territory, Russia. *Veterinariya*.
- [24] Del Fava C, Bastlio ML, de Donato TM, Ribeiro CP, Okuda LH, de Stefano E, Pituco EM (2010) Occurrence of seropositive sheep (*Ovis aries*) to Bovine Leukemia Virus in Brazil. *Braz J Vet Res Anim*.
- [25] Rola-Luszczak M, Pluta A, Olech M, Donnik I, Petropavlovskiy M, Gerilovych A, Vinogradova I, Choudhury B, Kuzmak J. (2013). The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *PLoS One*.
- [26] Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Censo pecuario nacional (2018)
- [27] Marín, C.; López, N.; Alvarez, L.; Castaños, H. España, W. León, A. Bello, (1982) Humoral spontaneous response to Bovine Leukemia Virus Infection in zebu,

sheep, buffalo and capybara. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*.

[28] Kunakov, A. A.; Abakin, S. S. (1993) Bovine leukosis virus infection in cattle and sheep in Stavropol Territory, Russia. *Veterinariya*.

[29] Del Fava C, Bastlio ML, de Donato TM, Ribeiro CP, Okuda LH, de Stefano E, Pituco EM (2010) Occurrence of seropositive sheep (*Ovis aries*) to Bovine Leukemia Virus in Brazil. *Braz J Vet Res Anim*.

[30] Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human Tcell leukemia virus. *Front Microbiol*.

[31] OIE. (2012) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: chapter 2.4.11. Enzootic Bovine Leukosis. Seventh Edition edn. France: *World organization for animal health*.

[32] Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D, Keefe G. (2016) Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev Vet Med*.

[33] Sandev N, Koleva M, Binev R, Ilieva D. (2004) Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Veterinarski Archiv*.

[34] Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT, Erskine RJ. (2013) Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci*.

[35] Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SJ. (1978) Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet*.

[36] Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, Ghysdael J, Burny A, Chantrenne H. (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*.

[37] Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. (1985) Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*.

- [38] Sagata N, Yasunaga T, Ohishi K, Tsuzuku-Kawamura J, Onuma M, Ikawa Y. (1984) Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *EMBO J*.
- [39] Dube S, Bachman S, Spicer T, Love J, Choi D, Esteban E, Ferrer JF, Poiesz BJ. (1997) Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J Gen Virol*
- [40] Katoh I., Yoshinaka Y., Ikawa Y. (1989). Bovine leukemia virus trans-activator p38tax activates heterologous promoters with a common sequence known as a cAMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF. *EMBO J*.
- [41] Powers MA, Grossman D, Kidd LC, Radke K. (1991) Episodic occurrence of antibodies against the bovine leukemia virus rex protein during the course of infection in sheep. *J Virol*
- [42] Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Bumy A, Portetelle D. (1992) The 19-29 amino acid fragment of GP51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J Biol Chem*
- [43] Voneche V, Portetelle D, Kettmann R. (1992) Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- [44] Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. (2003) Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*.
- [45] Maresca C, Costarelli S, Dettori A, Felici A, Iscaro C, Feliziani F. (2015) Enzootic bovine leukosis: report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005-2012). *Prev Vet Med*.

- [46] Gottschau A, Willeberg P, Franti CE, Flensburg JC. (1990) The effect of a control program for enzootic bovine leukosis. Changes in herd prevalence in Denmark, 1969-1978. *Am J Epidemiol*.
- [47] EFSA Panel on Animal Health and Welfare, More SJ, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, Bicoût D. (2017) Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL). *EFSA J*.
- [48] Zhao XR, Jimenez C, Sentsui H, Buehring GC. (2007) Sequence polymorphisms in the long terminal repeat of bovine leukemia virus: evidence for selection pressures in regulatory sequences. *Virus Res*.
- [49] European Panel on Animal Health and Welfare (EPAHW) (2015) Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA J*.
- [50] Chethanond U-S. (1999) The epidemiology of enzootic bovine leukosis in dairy cattle in New Zealand. Massey University.
- [51] Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007. (2008). *United states department of agriculture*.
- [52] Nekouei OA. (2015) Study of prevalence, risk factors, and lifetime impacts of infection with bovine leukemia virus in the Canadian dairy industry. University of Prince Edward Island, Atlantic veterinary college, department of Health Management.
- [53] Meripet Polat, Shin-nosuke Takeshima, Yoko Aida. (2017) Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology J*.
- [54] Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C, Wang C. (2016) Bovine leukemia virus infection in cattle of China: association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J Dairy Sci*.
- [55] Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Tsutsui T. (2013) Nationwide survey of bovine leukemia virus infection among dairy and beef breeding cattle in Japan from 2009-2011. *J Vet Med Sci*.
- [56] Ochirkhuu N, Konnai S, Odbileg R, Nishimori A, Okagawa T, Murata S, Ohashi K. (2016) Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Arch Virol*.

- [57] Meas S, Ohashi K, Tum S, Chhin M, Te K, Miura K, Sugimoto C, Onuma M. (2000) Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci*.
- [58] Wang CT. (1991) Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci*.
- [59] Mousavi S, Haghparast A, Mohammadi G, Tabatabaeizadeh SE. (2014) Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in the northeast of Iran. *Vet Res Forum*.
- [60] Samara SI, Lima EG, Nascimento AA. (1997). Monitoring of enzootic bovine leukosis in dairy cattle from the Pitangueiras region in São Paulo, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*.
- [61] D'Angelino JL, Garcia M, Birgel EH. (1998). Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. *Trop Anim Health Prod*.
- [62] Camargos MF, Stancek D, Rocha MA, Lessa LM, Reis JK, Leite RC. (2002). Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*.
- [63] Camargos MF, Pereda A, Stancek D, Rocha MA, dos Reis JK, Greiser-Wilke I, Leite RC. (2007). Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. *Virus Genes*.
- [64] Trono KG, Perez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*.
- [65] Monti G, Schrijver R, Beier D. (2005). Genetic diversity and spread of bovine leukaemia virus isolates in argentine dairy cattle. *Arch Virol*.
- [66] Polat M, Takeshima SN, Hosomichi K, Kim J, Miyasaka T, Yamada K, Arainga M, Murakami T, Matsumoto Y, de la Barra Diaz V, et al. (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*.
- [67] Bovine CAH. Leukaemia virus infection in Peru. (1983). *Trop Anim Health Prod*.

- [68] Felmer R, Munoz G, Zuniga J, Recabal M. (2005). Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microbiol.*
- [69] Johnson, R.; Gibson, C.D.; Kaneene, J.B. (1985) Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med*
- [70] Ohshima, K.; Okada, K.; Numakunai, S.; Yoneyama, Y.; Sato, S.; Takahashi, K. (1981) Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Nippon Juigaku Zasshi.*
- [71] Ferrer, J.F. (1979) Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc*
- [72] Suzan VM, Onuma M, Aguilar RE, Murakami Y. (1983) Prevalence of bovine Herpesvirus-1, Para-Influenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine Adenovirus-7, bovine leukemia-virus and bluetongue virus-antibodies in cattle in Mexico. *Jap J Vet Res.*
- [73] Knapen, K.; Kerkhofs, P.; Mammerickx, M. (1993) Eradication of enzootic bovine leukosis in Belgium: Results of the mass detection on the national cattle population in 1989, 1990 and 1991. *Ann. Med. Vet.*
- [74] Nuotio, L.; Rusanen, H.; Sihvonen, L.; Neuvonen, E. (2003) Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.*
- [75] Acaite, J.; Tamosiunas, V.; Lukauskas, K.; Milius, J.; Pieskus, J. (2007) The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev. Vet. Med.*
- [76] Johnson, R.; Gibson, C.D.; Kaneene, J.B. (1985) Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med.*
- [77] Brenner, J.; Meiron, R.; Avraham, R.; Savir, S.; Trainin, Z. (1988) Trial of two methods for the eradication of bovine leucosis virus infection from two large dairy herds in Israel. *Isr. J. Vet. Med.*
- [78] Van Der Maaten, M.J.; Miller, J.M. (1979) Appraisal of control measures for bovine leukosis. *Vet. Med. Assoc.*

- [79] Shettigara, P.T.; Samagh, B.S.; Lobinowich, E.M. (1989) Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *J. Vet. Res.*
- [80] Kaja, R.W.; Olson, C.; Rowe, R.F.; Stauffacher, R.H.; Strozinski, L.L.; Hardie, A.R.; Bause, I. (1984) Establishment of a bovine leukosis virus-free dairy herd. *Vet. Med. Assoc.*
- [81] Naif HM, Brandon RB, Daniel RCW, Lavin MF. (1990) Bovine leukemia Proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain-reaction. *Vet Microbiol.*
- [82] Johnson, R.; Gibson, C.D.; Kaneene, J.B. (1985) Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Prev. Vet. Med.*
- [83] Brenner, J.; Meiron, R.; Avraham, R.; Savir, S.; Trainin, Z. (1988) Trial of two methods for the eradication of bovine leucosis virus infection from two large dairy herds in Israel. *Isr. J. Vet. Med.*
- [84] Burrridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. (1982) Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can J Comp Med.*
- [85] WinEpiscope. Disponible: <http://www.winepi.net/>

