

Estandarización de una prueba por PCR para el virus de la Leucosis enzoótica Bovina en Búfalos de agua del eje cafetero Colombiano.

Edgar Antonio Peláez Peláez^{1*}, Nathaly Trejos Marín^{1*}, Juan Carlos González²
Corrales, Juan Carlos Rincón Flórez²

¹Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, ²Docente Asesor, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira. Carrera 27 #10-02 Barrio Álamos, Risaralda, Colombia. Email:

edagarpelaez@utp.edu.co, nathaly_trejos@utp.edu.co

Resumen

La Leucosis viral enzoótica bovina (VLB) es una enfermedad neoplásica de origen viral, que se caracteriza por la aparición de acumulaciones de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos inmunosuprimiendo al animal, haciéndolo más vulnerable frente a distintas enfermedades. Experimentos in vitro reportan susceptibilidad de células humanas a la infección con el virus de la leucosis enzoótica bovina (se ha vinculado al VLB con cáncer de seno). La importancia de este trabajo radica en que no hay conocimiento sobre si este virus está presente en los búfalos y el posible riesgo que esto causaría a la salud de los consumidores. Se evaluó la presencia del VLB en 65 muestras de ADN de tres razas Bufalinas (*Bubalus bubalis*), Mediterráneo, Murrah y Bufalipso, animales productivamente activos y de diferentes edades. Las muestras fueron tomadas en el eje cafetero, en los departamentos de Risaralda, Caldas y Valle del Cauca, con el fin de la detección del virus, se amplificó una región del gen *env* viral, mediante PCR anidada, seguida de electroforesis y foto documentación, el cual arrojó como resultado una incidencia del 33.8% en búfalos siendo esta mayor que en

vacas que fue del 3.4%. Este es el primer trabajo reportado en América usando como muestra búfalos de agua con utilización de técnicas moleculares por PCR para la detección del VLB a partir de ADN extraído de muestras de sangre.

Palabras clave: leucemia bovina enzootica, PCR anidada, tumores linfoides, salud pública, búfalos lecheros.

Abstract

Enzootic bovine viral leukosis (VLB) is a neoplastic disease of viral origin, characterized by the appearance of accumulations of neoplastic lymphocytes in almost all organs immunosuppressing the animal, making it more vulnerable to different diseases. In vitro experiments report the susceptibility of human cells to infection with bovine enzootic leukosis virus (it has been linked to VLB with breast cancer). The importance of this work is that there is not knowledge about whether this virus is present in buffaloes and the possible risk that this would cause to the health of consumers. The presence of VLB was evaluated in 65 DNA samples of three races Bufalinas (*Bubalus bubalis*), Mediterranean, Murrah and Bufalipso, animals that are productively active, and with different ages. The samples were taken in the Eje Cafetero, in the departments of Risaralda, Caldas and Valle del Cauca. In order to detect the virus, a region of the viral Env gene was amplified, by nested PCR, followed by electrophoresis and photo documentation, which resulted in an incidence of 33.8% in buffaloes being higher than in cows that was 3.4%. This is the first work reported in America using water buffaloes as a sample with the use of molecular techniques by PCR for the detection of VLB from DNA extracted from blood samples.

Keywords: Enzootic bovine leukemia, Nested PCR, Lymphoid tumors, Public health, dairy buffaloes.

Introducción

El agente etiológico de la Leucosis viral enzootica bovina (VLB) es un virus tipo RNA, un retrovirus exógeno, perteneciente a la familia Retroviridae subfamilia Orthoretrovirinae, género Deltaretrovirus (1). Se caracteriza por ser maligna, sistémica, de alta morbilidad y baja mortalidad. Los retrovirus bovinos pueden ser una amenaza para la salud pública, por lo que se debe tener precaución al consumir productos o subproductos crudos provenientes de animales infectados, ya que aún no hay un consenso sobre la posibilidad de infección al hombre.

Los virus pertenecientes a esta familia tienen la capacidad de introducir su genoma en el de la célula hospedera como mecanismo de protección contra el sistema inmune del mismo, un porcentaje cercano al 70% de los animales infectados pueden mantenerse clínicamente sanos; es decir sin mostrar síntomas externos de la enfermedad (2). Estudios han demostrado que los hatos infectados con Leucosis Bovina presentaban una menor producción de leche (2.5 a 3% del hato) y un aumento en la tasa de pérdidas selectivas, así como mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa como mastitis, diarrea y neumonía (3). En algunos hatos existen animales que presentan frecuentemente baja productividad por alguna inmunosupresión o cualquier factor oportunista, haciendo que el propietario invierta frecuentemente en tratamientos farmacológicos y en visitas veterinarias, tratando los síntomas sin hallar la fuente enfermedad.

En Colombia existe una población de búfalos de aproximadamente 234.994 animales distribuidos en 2.672 predios, con un crecimiento anual cercano al 10%, cifra superior al crecimiento de la ganadería bovina (4). Con respecto a la producción de leche de búfala, es importante resaltar que se ha tomado como una buena opción económica, debido a que el precio de la leche es 30% mayor que el de la leche de vaca (5), lo que ha aumentado su producción en Colombia y en el mundo llevándola a ocupar el segundo lugar en importancia en producción de leche, seguido de la cabra y la de oveja (6)

Dadas las condiciones medio ambientales que se han vivido los últimos años en Colombia, los búfalos han tomado importancia, por su capacidad de rendimiento con una alimentación de baja calidad, poco nutritiva, sin suplementación y con dietas

desbalanceadas. Además, la leche de búfala tiene un valor altamente nutritivo, es excelente para la preparación de subproductos tales como quesos, mantequilla, leche en polvo, helados, entre otros y además de caracteriza por tener más sólidos totales, grasa, proteína y lactosa que la leche bovina, por estas características los ganaderos han optado por invertir en estos animales dado su rusticidad y buen rendimiento (6).

Los productos y subproductos bufalinos han tenido gran acogida en el mercado gracias a su composición. La comparación entre la leche de búfalo y la de vaca se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación entre leche de búfala y distintas especies (7)

Especie	Agua (%)	Grasa (%)	Lactosa (%)	Albúmina (%)	Sales (%)
Búfala	85	7.6	4.8	4.70	1.0
Vaca	90	3.5	5.0	0.35	0.9
Cabra	90	4.0	4.8	0.65	1.0
Oveja	86	6.3	4.5	0.90	1.1
Mujer	90	3.5	7.0	0.50	0.3

La Leucosis viral bovina es una enfermedad que tiene una mortalidad que varía del 2% al 5 %, se caracteriza por la aparición de acumulaciones de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, haciéndolo más vulnerable frente a distintas enfermedades e infecciones (8).

Experimentos in vitro reportan susceptibilidad de células humanas a la infección con Leucosis Viral enzoótica bovina, se ha vinculado al VLB con cáncer de seno, en ensayos de Inmunodifusión, ELISA e Inmunoblot: detectaron anticuerpos contra p 24 en 257 sueros humanos, posiblemente por el consumo de alimentos de procedencia bovina. En el año 1996, se establece que el cáncer de mama en el ratón es causado por el virus que pasa de la madre a los recién nacidos vía lactogénica. También existe un informe sobre una firme correlación positiva entre el ganado lechero con alta prevalencia de la enfermedad y prevalencia de leucemia en un grupo especial de pacientes humanos (9).

Alrededor del 15% de los casos de cáncer a nivel mundial parecen estar asociados a infecciones virales y varios virus animales y humanos como el virus del papiloma humano (HPV), el Epstein-Barr (EBV), el virus de la leucemia murina (MLV) y el virus

de la Leucosis Bovina (BLV) ya son aceptados como causantes de malignidades específica (10). En diferentes estudios se ha demostrado la exposición de humanos al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica, mediante la detección de anticuerpos contra este en el suero de los pacientes analizados. También se ha reportado que VLB puede infectar células humanas in vitro y causar tumores y eritroleucemia en primates (11). En estudios realizados en la Universidad Javeriana (Colombia) se encontró un 7% de positividad para la presencia de BLV en casos diagnosticados con carcinoma canicular de seno, confirmando la susceptibilidad de las células humanas a la infección con este virus (12).

Hay que tener presente que para que se produzca el contagio solo basta el contacto con la milésima parte de volumen de una gota de sangre proveniente de un bovino infectado. También ciertos insectos que se alimentan de sangre, como mosquitos, tábanos o garrapatas, pueden participar como vectores en la transmisión de la enfermedad (13).

Una vez que el virus ingresa al organismo sus células blanco son los linfocitos B. La infección viral es seguida por una expansión policlonal de linfocitos que portan los provirus integrados (14). Durante el primer mes post infección las células infectadas son detectables en sangre alrededor de las dos semanas, alcanzando un pico en la tercer semana y luego decrecen rápidamente (15).

El perfil genético del hospedero puede predisponer al desarrollo de tumores, estos se producen debido a la infiltración de linfocitos B transformados que se acumulan en diversos tejidos y órganos como hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y ganglios linfáticos (8). Los síntomas se aprecian principalmente luego de los dos años de edad. La mayoría de los síntomas son inespecíficos y variables, los principales síntomas generados en el ganado bovino por esta enfermedad incluyen linfocitosis, linfadenopatía, neuropatía y pérdida de peso progresiva, sin embargo los animales infectados pueden ser asintomáticos y ser portadores del virus toda su vida, de estos solo el 5% sufren neoplasia, un incremento descontrolado del número de células o del tamaño de un órgano, como leucemia o linfosarcoma, también se han reportado momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos (8).

Aunque hasta hace unas décadas no se creía posible encontrar el virus en el humano, los avances de las técnicas moleculares permitieron identificar este patógeno en el hombre. Aunque no se conoce realmente el mecanismo de transmisión zoonótico, se presume que puede deberse a consumo de leche sin pasteurizar, carne poco cocida o a la transmisión entre humanos por la leche materna (16,17).

Debido a que no existe una vacuna o tratamiento para la Leucosis Bovina, la erradicación y control de esta se basa en el diagnóstico temprano y en la separación de los animales infectados. Varios métodos han sido desarrollados para la detección de anticuerpos en el ganado, la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) es muy usada para la detección de anticuerpos contra los antígenos *p24* o *gp51* que corresponden a unas de las proteínas de cubierta del virus (18), la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) ha sido usada para detectar anticuerpos de VLB incluso en muestras de sangre (18).

Un obstáculo usualmente encontrado para el uso de estos métodos es el hecho de que en los animales infectados se pueden encontrar niveles bajos e incluso nulos de anticuerpos por ejemplo en vacas en periodo peri parto, animales inmunodeprimidos y terneros hasta aproximadamente 6 meses de edad (19), por lo cual es importante la detección directa del virus.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica "in vitro" que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN, se trata de una técnica usada para crear un gran número de copias de un segmento de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por un ADN polimerasa termo resistente (20). Entre muchas de las aplicaciones que la PCR pone a disposición se encuentran la detección precoz o prenatal de enfermedades genéticas, la detección de infecciones virales latentes o la producción de grandes cantidades de fragmentos de ADN humano a una velocidad muy superior a la posible mediante otros métodos.

La importancia de establecer la prevalencia del virus radicó en la inexistencia de investigaciones y estudios sobre esta enfermedad en esta especie y región. Se pretendió establecer una prueba molecular con PCR a partir de muestras de ADN de sangre y leche para leucosis enzootica bovina en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*),

para determinar la prevalencia e implementar mecanismos de control y erradicación de la misma y así evitar que la población consumidora de productos y subproductos de origen bufalino se vea afectada con enfermedades. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estandarizar una prueba molecular por PCR para la detección del VLB ya que es la prueba más sensible y específica sin importar el periodo de virulencia, edad del animal y la carga de virus presente en la muestra de ADN. Este es el primer reporte en América que se realiza habiendo tomado muestras de sangre en distintas regiones del país y detectando este virus con las pruebas y métodos moleculares que se presentan en este artículo.

Materiales y métodos

Se utilizaron muestras de DNA procedentes de Búfalos de razas Murrah, Mediterráneo y Bufalipso en etapa productiva, muestreados en el eje cafetero durante el año 2017. Las muestras de sangre se llevaron a un tubo cónico de 15 ml se centrifugaron durante 4 minutos a 3000 rpm a una temperatura de 4°C en una centrifuga refrigerada para luego recuperar los leucocitos y almacenarlos a -20°C.

Para la extracción del ADN se realizó la técnica de Salting out donde se utilizó el tubo cónico de 15 ml al cual se le adicionaron 2 volúmenes de buffer de lisis I (10 mM Tris HCl pH 7.6, 320 mM de sucrosa, 5 mM MgCl₂-6H₂O y 1% Tritón X-100), se centrifugó por 12 minutos a 3000 rpm, descartándose el sobrenadante y conservando el pellet, se realizaron varios lavados por centrifugación con buffer de lisis I hasta obtener un botón blanco de células, el cual luego se re suspendió en 5 ml de buffer de lisis II (10 mM Tris HCl pH 8.2, 400 mM de NaCl, 2 mM de Na₂EDTA, proteinasa K 2 mg/ml y 200 ul de SDS). Después de la digestión se adicionaron 1,5 ml de solución salina saturada (6 M), se mezcló con vórtex y se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm, se recogió el sobrenadante en un tubo de 15 ml, al cual se le agrego etanol al 100% a -20°C hasta rebozar el tubo, se agitó suavemente el tubo por inversión hasta observar la madeja de ADN. Se hizo un lavado con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugo a 4000 rpm descartando el sobrenadante, se dejó secar el tubo invertido sobre una toalla de papel y se re suspendió el botón en 1000 ul de buffer TE 1X pH 8.0 (Tris HCl 1 M y EDTA 0.5 M), el cual se almaceno a 4°C hasta el momento del análisis.

A partir de estas muestras se estandarizó una técnica de diagnóstico por medio de PCR (reacción en cadena polimerasa). Se utilizó como punto de partida una región altamente conservada del gen *env* viral utilizando la técnica PCR-anidado. La primera reacción se realizó a un volumen final de 25 µl que contenía 100 mg de ADN, 1,25 mM de cada oligonucleótido BLV forward (5'ATGCCCAAAGAACGACGG-3') and BLV reverse (5'CGACGGGACTAGGTCTGACCC-3') 0.2 Mm de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2.5 mM MgCl₂ y 1U de Top Taq DNA polimerasa. En la segunda reacción de PCR se utilizó como ADN molde 5µl del producto de PCR de la primera amplificación y las mismas concentraciones de los otros reactivos con los oligonucleótidos Internal: Env5032 forward (5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA- 3') and Env5608 Reverse (5'-AACAAACCTCTGGGAAGGGT-3') El perfil térmico incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 25 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 1 min, para terminar con una extensión final a 72°C por 8 min. Para la PCR anidada el perfil térmico incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 45 seg, para terminar con una extensión final a 72°C por 10 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermanl Cycler, BIO-RAD.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en una cámara SUB-CELL® GT, BIO-RAD. en gel de agarosa al 2% (Amresco, Cochran Road, OH). En cada pozo se sirvieron 5µl del producto de PCR diluidos en 2µl de tinción EZ vision (AMRESCO, Sidney, Aus) 1X (fermentas, Glen Burnie, MD). En cada línea de corrido se utilizaron 2µl de marcador de peso molecular de 100pb (low range Fermentas, Glen Burnie, MD). Los geles fueron visualizados mediante un fotodocumentador (Biometra™, Goettingen, Germany) para tomar evidencia fotográfica. Una banda de 444 bp indicó la presencia del provirus en un individuo. En todos los casos en la PCR se usó un control negativo con ADN negativo y un control positivo con ADN viral. Los controles fueron suministrados por el grupo de investigación de Biodiversidad y genética molecular (Biogem) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, de igual manera se utilizaron controles positivos y negativos hallados en esta prueba.

Resultados

Se logró estandarizar una prueba por PCR anidada para la detección del VLB usando como muestra Búfalos de agua con utilización de técnicas moleculares por PCR para la detección del VLB a partir de ADN extraído de muestras de sangre. Este trabajo constituye el primer reporte de búfalos naturalmente infectados con leucosis.

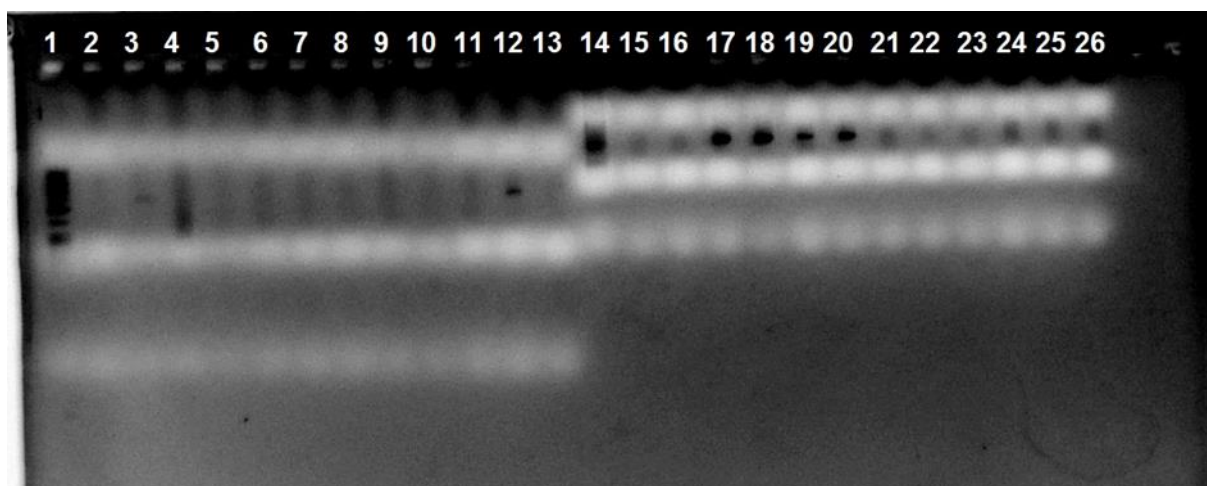


Figura 1. Gel de agarosa al 2 % para la los productos de PCR anidada del segmento env del genoma del virus de la leucosis bovina. Los posos 1 y 14 corresponden al marcador de peso molecular (la sección de 500 pares de bases nos ayuda a ubicar el virus). Los posos 2 y 3 corresponden al control – y + respectivamente. Se puede observar presencia del virus BLV en los corridos 12,17,18,19 y 20

En total se encontró una prevalencia aproximada del 33.8% en búfalos, superior a la encontrada en bovinos de la zona (3.4%) y en otros animales (Tabla 2), esto constituye un hecho importante si se tiene en cuenta que los búfalos podrían ser un reservorio natural de la enfermedad para los bovinos. Todos los resultados con sus intervalos de confianza se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Estadística de prevalencia encontradas en muestras de búfalos, bovinos, humanos, camuros, ovinos y leche de diferentes zonas del eje cafetero.

Muestra	n	Prevalencia	Intervalo de confianza 95%	
Bufalino	65	0.338	0.229	0.467
Bovino	58	0.034	0.005	0.129
Humano	9	0	0.000	0.371
Camuro	33	0	0.000	0.130
Ovino	2	0	0.000	0.802
Leche	4	0	0.000	0.604

Discusión

Algunos autores reportan la especificidad de distintas pruebas y el tiempo post infección para la detección del virus después de realizar una inoculación en bovinos. Esos autores reportaron que la prueba de ELISA indirecto (ELISA-I), detecta anticuerpos en todos los animales entre la 3^o y 6^o semana pos infección (PI). Con respecto a la Inmunodifusión en agar (ID) todos los animales inoculados dieron positivos entre la 4^o y 6^o semana, manteniéndose débiles positivos el 40% de los animales hasta la 6^o semana PI. En Western Blot (WB), los sueros positivos mostraron reactividad para la gp51 y la p24. Otras proteínas (gp30, p15, p12 y p10) no fueron detectadas en ningún caso. En el 90% de los bovinos inoculados, los anticuerpos contra la p24 se detectaron antes (2^o-4^o semana PI) que los anticuerpos contra la gp51. Finalmente, la prueba de PCR anidada fue desarrollada con primers para un segmento conservado del gen env. El 75% de los bovinos fueron positivos a la 2^o semana PI (22), lo que muestra su potencial para detectar infecciones recientes que no se pueden detectar con anticuerpos.

Tabla 3. Comparación de técnicas diagnósticas, especies y prevalencias en distintos países.

País	N	Especie	Diagnostico	Prevalencia	Autor
Chile	19635	Bovino	ELISA	59%	(23)
Colombia	56	Humano	Inmuno peroxidasa	7.14%	(9)
Brasil	315	Búfalo	PCR	0%	(24)
Filipinas	445	Búfalo	PCR	27.64%	(25)
Pakistán	370	Búfalo	Inmunodifusión	0.8%	(26)
Chile	126	Bovino	AGID	59.52%	(27)
Chile	126	Bovino	ELISA	79.36%	(27)
Chile	126	Bovino	PCR	79.36%	(27)
Colombia	360	Bovino	PCR	40.56%	(21)
E.E.U.U	257	humano	Inmuno blotting	74%	(28)

Al comparar los datos de la tabla 3 podemos observar que la prueba por PCR realizada en filipinas arroja una prevalencia del 27.64% mientras que la prueba realizada en Pakistán por Inmunodifusión arrojó 0.8%.

El PCR anidado aumenta la sensibilidad y especificidad del método, una de las ventajas del PCR es su capacidad para detectar el virus en animales infectados que recibieron calostro desde madres seropositivas, mediante PCR se pueden determinar infecciones recientes, entre 2-4 semanas más temprano que mediante AGID y puede ayudar en los programas de erradicación, especialmente en aquellos rebaños con una baja prevalencia de animales infectados (27).

La literatura reporta, que con la pasteurización de la leche de vacas positivas se logra inactivar los linfocitos infectados con BLV. El virus es muy poco resistente a las

influencias exteriores por lo que tiene escasa viabilidad, de menos de 4 horas fuera del animal. Los rayos ultra violeta, la congelación-descongelación repetidas y la pasteurización inactivan el virus, al igual que los desinfectantes utilizados habitualmente (29).

Los búfalos son animales que si importar las condiciones medio ambientales se mantienen y permanecen, a pesar de la enorme dotación de recursos forrajeros, la ganadería de los trópicos latinoamericanos enfrenta agudos problemas relacionados con la cantidad, calidad y productividad de las pasturas, en particular durante los prolongados períodos secos. Este es un problema a gran escala y obedece en gran parte a que una elevada fracción de la base forrajera disponible está conformada por pasturas nativas, adaptadas pero de baja productividad y por especies introducidas altamente degradadas. Es allí donde la explotación bufalina comienza a cobrar importancia productiva y rentable, puesto que hace un mejor aprovechamiento de las pasturas de baja calidad transformándolas más eficientemente en carne y leche. Al ser un animal rustico y gracias a esta resistencia se dificulta detectar signos de enfermedad temprana , lo cual es un problema para los ganaderos puesto que se ve disminuido su rendimiento en la producción cárnica y lechera, y en la ganancia monetaria lo que conlleva a invertir en visitas médicas y tratamientos sintomáticos sin hallar la verdadera causa (6).

Conclusiones y recomendaciones

Se detectó una presencia del 33.8% del VLB por transmisión directa en Búfalos en la región cafetera del país, cabe resaltar que en esta investigación hubo una mayor prevalencia del VLB en animales bufalinos que en los bovinos, convirtiéndose este resultado en un importante hallazgo, y partiendo de este podemos informar a toda la comunidad científica; productores y consumidores de productos y subproductos provenientes de Búfalos la importancia de realizar un buen proceso en su cadena productiva, ya que al ser un retrovirus es muy poco resistente a los cambios de temperatura y pH, con base a este conocimiento se asegura que el proceso de

pasteurización debidamente realizado es un mecanismo de control eficiente para este virus.

Detección de animales positivos a BLV y la eliminación de animales positivos del hato por medio de fusil sanitario, esto es difícil de realizar si se tienen prevalencias muy altas , en caso de no poder eliminar los animales positivos, se pueden manejar dos hatos separados (uno libre de leucosis y uno positivo), instaurar buenas medidas de manejo dentro del hato para disminuir la transmisión del BLV como el uso de agujas y guantes por cada animal, la desinfección de equipos, instrumentos entre otros. Manejar animales de remplazo negativos al BLV, no utilizar leche de vacas positivas para la alimentación de las crías. Se recomienda realizar exámenes para detección a los machos que se van a utilizar para monta natural y a los animales que serán adquiridos y así evitar una transmisión zoonótica (29).

Agradecimientos

A nuestros padres por su infinita paciencia, confianza, acompañamiento y amor, a la Universidad Tecnológica de Pereira, al grupo de investigación Biología molecular y Pecuaria (BIOPEC), a vicerrectoría académica de la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación del proyecto 5-16-9 “Determinación molecular de la prevalencia de leucosis enzoótica viral bovina por medio molecular en hatos de búfalos del eje cafetero y su relación con el desempeño productivo”.

Bibliografía

1. Wu D, Murakami K, Morooka A, Jin H, Inoshima Y, Sentsui H. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Res. Elsevier*; 2003;97(2):81–7.
2. Smirnov YP, Suvorova IL. Hematological indices in cows in asymptomatic stage of leucosis process. *RDVINZRF*; 2008;
3. gorden pj, plummer p. control, management, and prevention of bovine

respiratory disease in dairy calves and cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* Elsevier; 2010;26(2):243–59.

4. ICA. Censo Pecuario Nacional. Bogotá; 2015.
5. Fedegán. Plan de desarrollo ganadero 2014-2019. Bogotá; 2014.
6. Cervantes E, Espitia A, Prieto E. Viabilidad de los sistemas bufalinos en Colombia. *Rev Colomb Cienc Anim.* 2010;2(1):215–24.
7. Almaguer Pérez Y. El búfalo, una opción de la ganadería. *Redvet Rev electrónica Vet. Veterinaria Organización;* 2007;8(8).
8. Chamizo Pestana EG. Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. *REDVET Rev Electrónica Vet. Veterinaria Organización;* 2005;6(7).
9. 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. Pontificia Universidad Javeriana;* 2006;11(2).
10. Wong M, Pagano JS, Schiller JT, Tevethia SS, Raab-Traub N, Gruber J. New associations of human papillomavirus, Simian virus 40, and Epstein-Barr virus with human cancer. *J Natl Cancer Inst. Oxford University Press;* 2002;94(24):1832–6.
11. Somma M, Querci M. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. *Extracción y purificación ADN Eur Com JRC.* 2007;
12. Wrathall AE, Simmons HA, Van Soom A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. *Theriogenology.* Elsevier; 2006;65(2):247–74.
13. Kohara J, Konnai S, Onuma M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn J Vet Res. The Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University;* 2006;54(1):25–30.
14. 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*. London: BioMed Central; 2007 Mar;4:18.
15. Fulton Jr. BE, Portella M, Radke K, Fulton BE. Dissemination of bovine leukemia virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. *J Virol*. 2006;80(16):7873–84.
 16. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. *PLoS One*. Public Library of Science; 2015;10(9):e0134304.
 17. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis*. Centers for Disease Control and Prevention; 2014;20(5):772.
 18. Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):2658–63.
 19. Alvarez Rubianes N, Oriani DS. Reacción en cadena de la polimerasa (rcp) como herramienta diagnóstica de leucosis enzoótica bovina.
 20. Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids Health Dis*. BioMed Central; 2007;6(1):25.
 21. Herrera DYH, Terranova AMP, Benavides JA, Flórez JEM, Giovambattista G. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agronómica*. 2011;60(4):312–8.
 22. González ET, Oliva GA, Valera AR, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. Leucosis Enzoótica Bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Vet*. 2001;21.
 23. Felmer R, Zúñiga J, López A, Miranda H. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX

Región, Chile. Arch Med Vet. Scielo Chile; 2009;41(1):17–26.

24. De Oliveira CHS, Resende CF, Oliveira CMC, Barbosa JD, Fonseca AA, Leite RC, et al. Absence of Bovine leukemia virus (BLV) infection in buffaloes from Amazon and southeast region in Brazil. Prev Vet Med. Elsevier; 2016;129:9–12.
25. Mingala CN, Konnai S, Cruz LC, Onuma M, Ohashi K. Comparative molecular-immunological analysis of swamp-and riverine-type water buffaloes responses. Cytokine. Elsevier; 2009;46(2):273–82.
26. 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. Japanese society of veterinary science; 2000;62(3):329–31.
27. Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. Arch Med Vet. Scielo Chile; 2006;38(2):137–41.
28. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. AIDS Res Hum Retroviruses. Mary Ann Liebert, Inc.; 2003;19(12):1105–13.
29. González Arias AL. Efectos de la infección con el virus de la leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica Efectos de la infección con el virus de la leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica Efectos de la infección con el virus de la leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica. Universidad Nacional de Costa Rica; 2014;