

DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL BLV EN MUESTRAS DE LECHE EN UNA POBLACIÓN DE VACAS HOLSTEIN, ANTIOQUIA

SEROLOGICAL DETECTION OF BLV IN MILK SAMPLES IN A POPULATION OF HOLSTEIN COWS, ANTIOQUIA

DETECÇÃO SOROLÓGICO DO BLV EM AMOSTRAS DE LEITE EM UMA POPULAÇÃO DE VACAS DA RAÇA HOLSTEIN, ANTIOQUIA

CRISTINA ÚSUGA-MONROY¹, LINA MARCELA LÓPEZ-LÓPEZ², KAREN YEPES-LUNA³, JOSÉ JULIÁN ECHEVERRI-ZULUAGA⁴, ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA⁵

RESUMEN

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) es el agente etiológico de la Leucosis Bovina Enzootica (LBE), esta enfermedad es infecciosa, crónica y específica del ganado bovino, presentando alta prevalencia, pero un bajo porcentaje de enfermos con manifestaciones clínicas. Entre 30-70% los animales infectados puede desarrollar Linfocitosis Persistente (LP) y entre el 0,1-10% de los bovinos con más de tres años de infección sufre algún tipo de Linfosarcoma (LS). El objetivo de este trabajo fue detectar serológicamente el BLV en muestras de leche de vacas Holstein en tres hatos lecheros del departamento de Antioquia. Se tomaron 133 muestras de leche de vacas Holstein de tres hatos lecheros ubicados en los municipios de Medellín y Belmira, se realizó una ELISA indirecta contra

Recibido para evaluación: 2 de Mayo de 2016. **Aprobado para publicación:** 14 de Septiembre de 2016.

- 1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M Sc, (e) Ph.D. Medellín, Colombia.
- 2 Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. (e) Zoot. Medellín, Colombia.
- 3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. (e) Zoot. Medellín, Colombia.
- 4 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M.Sc, Ph.D. Medellín, Colombia.
- 5 Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M.Sc, Ph.D. Medellín, Colombia.

Correspondencia: cusugam@unal.edu.co

la proteína de envoltura gp51 viral. La prueba ELISA mostró una seroprevalencia del 79,69% (106/133) para el total de muestras evaluadas. El hato con la mayor seroprevalencia fue el hato 1 (82,86%), seguido por el hato 2 (80%) y por último el hato 3 (77,08%). La presencia del BLV ha aumentado en Antioquia durante los últimos años, el diagnóstico rápido y eficiente a través de metodologías confiables permitiría el control sobre la diseminación de la enfermedad en los hatos lecheros.

ABSTRACT

The Bovine Leukosis Virus (BLV) is the etiological agent of the Enzootic Bovine Leukemia (EBL), this disease is infectious, chronic and specifically cattle, presenting a low percentage of patients with clinical manifestations. Between 30-70% of infected animals can develop persistent lymphocytosis (LP) and between 0,1-10% of cattle over three years of infection suffers some form of lymphosarcoma (LS). The aim of this work was serologically detection of BLV in milk samples from Holstein cows in three dairy herds in the department of Antioquia. Were taken 133 milk samples from Holstein cows three dairy herds located in the municipality of Medellín and Belmira, was conducted an indirect ELISA against gp51 envelope protein of the virus. The ELISA test showed a seroprevalence of 79,69% (106/133) for all samples tested. The herd was the largest herd seroprevalence 1 (82,86%), followed by the herd 2 (80%) and finally the herd 3 (77,08%). The presence of the BLV has increased in recent years in Antioquia, so fast and efficient diagnosis through reliable methodologies allow control over the spread of the disease in dairy herds.

PALABRAS CLAVE:

Seroprevalencia, ELISA, Glicoproteína-gp51.

KEYWORDS:

Seroprevalence, ELISA, Glycoprotein-gp51.

PALAVRAS-CHAVE:

Seroprevalência, ELISA, Glicoproteína-gp51.

RESUMO

A leucose vírus (BLV) é o agente etiológico da Leucose Bovina Enzootica (EBL), esta doença é infecciosa, crônica, e, gado específica, apresentando uma baixa percentagem de pacientes com manifestações clínicas. Entre 30-70% dos animais infectados podem desenvolver linfocitose persistente (LP) e entre 0,1-10% dos bovinos com mais de três anos de infecção sofre alguma forma de linfossarcoma (LS). LBE. O objetivo deste trabalho foi detecção sorologicamente o BLV em amostras de leite de vacas da raça Holstein em três rebanhos leiteiros no departamento de Antioquia. 133 amostras de leite de vacas da raça Holstein em três rebanhos leiteiros localizados no município de Medellín e Belmira tomaram um ELISA indireto contra a proteína do envelope gp51 do vírus foi realizado. O teste de ELISA mostrou uma soroprevalência de 79,69% (106/133) para todas as amostras testadas. a maior seroprevalência era evidente no rebanho (82,86%), seguido do rebanho 2 (80%) e, finalmente, o rebanho 3 (77,08%). A presença do BLV tem aumentado Antioquia nos últimos anos, o diagnóstico rápido e eficiente através de metodologias fiáveis permitem o controle sobre a propagação da doença em rebanhos leiteiros.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) es miembro del género *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae*. El BLV es el agente causante de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) y se ha descrito en todo el mundo [1]. La mayoría de los animales infectados (60%) no muestran signos hematológicos de la infección y se convierten en portadores asintomáticos del virus. Entre 30-70% los animales infectados puede desarrollar Linfocitosis Persistente (LP) y entre el 0,1-10% de los bovinos con más de tres años de infección sufre algún tipo de Linfoma (LS) [2,3].

La detección de ganado infectado con BLV es fundamental para el control de la infección la mayoría del ganado infectado con BLV no muestra síntomas clínicos, por lo que no puede detectarse a través de las prácticas de examen de rutina; sin embargo, algunos animales presentan exoftalmia la cual se caracteriza por la degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, este signo es bastante específico como signo de la enfermedad [4]. En otros casos los nódulos linfáticos aumentan de tamaño en animales con más de 3 años de infección, la palpación de los ganglios linfáticos es importante para identificar los animales infectados con BLV. Los principales métodos serológicos para identificar un portador infectado con el BLV son la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) [5]. Ambas técnicas de diagnóstico son recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas gp51 y p24 que hacen parte de la envoltura del virus [3,6].

La Leucosis Bovina Enzoótica se encuentra dentro de las 14 enfermedades bovinas sin control en nuestro país [7], lo que ha permitido que el desconocimiento juegue un papel a favor en la diseminación de la enfermedad. Durante el 2005 y 2009 se procesaron muestras de suero sanguíneo para determinar la seroprevalencia de LBE en algunos departamentos de Colombia; el departamento de Antioquia obtuvo una seropositividad del 28% y el departamento de Córdoba registró la mayor seroprevalencia de todos los departamentos evaluados (59%) [8], en tanto el resultado para Colombia fue del 25% de positividad [9]. La seroprevalencia del BLV en Colombia durante el 2014 fue del 42.7% en animales y del 67,7% en los hatos, esta información se obtuvo a partir del análisis serológico (ELISA) de 8150 bovinos ubicados en los departamento de Antioquia,

Boyacá, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Nariño y Meta [10]. La detección serológica del BLV en muestras de leche no se ha realizado en nuestro medio; sin embargo, se han detectado anticuerpos de BLV en muestras de tanques de leche [11]. De otra parte se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA en muestras de leche son similares a las obtenidas en muestras de suero [12]. Detectar el BLV en leche es ideal por ser menos invasivo ya que la toma de muestras se realiza durante el ordeño, además la toma de muestras de sangre crea un factor de estrés en los bovinos, por lo que algunos productores son reacios a esta práctica en sus hatos. La identificación de los animales infectados y el conocimiento de la prevalencia del BLV son parámetros de gran importancia, ya que permiten tomar medidas de control importantes para la producción. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia serológica del Virus de Leucosis Bovina en muestras de leche en una población de vacas Holstein en el departamento de Antioquia.

MÉTODO

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías propuestas por "The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" [13]. Para la toma de muestras se obtuvo la aprobación por parte del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia (CEMED-007, 14 de mayo de 2012).

Área de estudio

Se tomaron muestras de leche de 133 vacas Holstein que pertenecen a hatos de lechería especializada entre primer y quinto parto con edades de 3 a 7 años, las cuales pertenecen a 2 municipios del departamento de Antioquia. Las muestras estuvieron distribuidas de la siguiente forma: un hato de 35 vacas ubicado en el municipio de Medellín y dos hatos ubicados en el municipio de Belmira uno con 50 vacas y otro con 48 vacas. El manejo, la alimentación y sanidad son variables y dependen de cada hato.

Toma de muestras de leche

Para la toma de muestras de leche se limpió la ubre y cada uno de los pezones con servilletas de papel, se recolectaron los primeros chorros antes de poner las

pezoneras antes de iniciar el ordeño. La leche se recolectó en tubos individuales de 50 mL, cada tubo tenía como conservante un antimicrobiano (Bronopol). Las muestras fueron marcadas por vaca y hato, se homogeneizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (-4°C) para su posterior procesamiento el día siguiente al muestreo. Todos los hatos contaban con ordeño mecánico.

Extracción de sueros de leche

Las muestras de leche se trasladaron a tubos de 15 mL y se centrifugaron a 1500 g por 10 minutos para separar la leche en fracción grasa y fracción clarificada o suero. Se retiró la fracción grasa y el suero se recolectó en tubos marcados de 1,5 mL. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis de anticuerpos por la técnica ELISA.

Prueba serológica ELISA

Para el diagnóstico de anticuerpos contra el BLV (gp51) en las 133 muestras de leche se usó la técnica de ELISA. El procedimiento se realizó con un kit comercial (SVANOVIR® BLV gp51-Ab). Se adicionaron 4 µL del reactivo A (control positivo) y 4 µL del reactivo B (control negativo) en los pozos para los controles. Se adicionaron 100 µL de suero de cada muestra en los otros pozos. Se agitó el plato y se incubó a 37°C por 1 hora. Se lavó el plato con la solución PBS-Tween en un lavador de platos y se adicionaron 100 µL del conjugado (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales anti-IgG bovino) en cada pozo y se incubó a 37°C por 1 hora. Se repitió el lavado con la solución PBS-Tween y se adicionaron 100 µL de solución sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de sustrato con H₂O₂), se incubó 10 minutos a 25°C. Se adicionaron 50 µL de solución de parada (Ácido sulfúrico 2M). Se midió la densidad óptica (DO) de los controles y las muestras a 450 nm en un espectrofotómetro para microplatos (BioTek® ELx800)

Análisis estadístico

De acuerdo con la DO se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos contra la proteína del BLV (gp51) aquellas muestras que obtuvieron un valor positivo porcentual (PP) mayor o igual a 10 de acuerdo con los criterios del fabricante. Los resultados fueron tabulados en el paquete estadístico Excel® (Microsoft Office) mediante tablas, el análisis de los resultados se realizó de forma descriptiva.

RESULTADOS

Se estableció una prevalencia serológica total del 79,69% en los tres hatos evaluados. La mayor seroprevalencia se encontró en el hato 1 con un porcentaje de 82,86% ubicada en el municipio de Medellín, seguido del hato 2 con 80% de seropositividad en el municipio de Belmira y por último el hato 3 con 77,08% de seropositividad también ubicado en el municipio de Belmira (Cuadro 1). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del virus y el hato ($\chi^2c=0,4215$ $P=0,8100$ $P>0,05$), entre la presencia del BLV y el municipio ($\chi^2c=0,2928$ $P=0,5885$ $P>0,05$), ni entre la presencia del BLV y el número de parto ($\chi^2c=7,6944$ $P=0,4639$ $P>0,05$).

El Virus de la Leucosis Bovina tiene distribución mundial su tasa de prevalencia varía ampliamente entre países y continentes, en Estados Unidos y Europa la enfermedad es considerada como enzoótica. El BLV Tiene una alta prevalencia serológica en Estados Unidos uno de los principales productores de leche (83,9%) [14]. En Suramérica también se han encontrado altas seroprevalencias en muestras de suero sanguíneo, en Uruguay la seroprevalencia para BLV fue del 45% en vacas de recría en ganado lechero [15], en Brasil la seroprevalencia fue del 27,78% en bovinos con edades entre 11 y 15 años de edad [16], en Chile se han encontrado prevalencias serológicas del 23,9%

Cuadro 1. Seroprevalencia del BLV en tres 3 hatos lecheros del departamento de Antioquia.

Hatos	Número de vacas	ELISA +	ELISA -	Seropositivos (%)	Seronegativos (%)
Hato 1	35	29	6	82,86%	17,14%
Hato2	50	40	10	80,00%	20,00%
Hato 3	48	37	11	77,08%	22,92%

en predios chicos (<40 animales), 43,5% en predios medianos (40-200 animales) y del 83,3% en predios grandes (>200 animales) [17].

La prevalencia de anticuerpos en muestras de leche del presente estudio encontró un 79,69% de muestras antigénicamente positivas a la proteína gp51, Felmer *et al.*, (2006) encontró una prevalencia del 82,5% en muestras de leche del estanco predial [18]. Otro estudio realizado en Argentina encontró una seroprevalencia del 84% en muestras que también provenían de tanques de almacenamiento de leche [19]. Los resultados en muestras individuales y un “pull” de leche son similares; sin embargo, el manejo de muestras individuales permite detectar los individuos sanos de los infectados, lo cual es una estrategia para de desarrollo de planes de control de la enfermedad.

En el contexto nacional se han encontrado múltiples resultados de evaluaciones de la presencia del BLV en distintos departamentos, pero hasta el momento no se ha reportado la detección del virus en muestras de leche. En el municipio de montería se encontró una seroprevalencia del 21% en muestras de suero sanguíneo de animales que presentaban problemas reproductivos [20], siendo este valor menor respecto al encontrado en esta investigación, lo cual puede darse debido al tipo de sistema de producción, ya que se evaluó la seroprevalencia del virus en ganado cebuino y en doble propósito y no en lechería especializada.

Betancur *et al.*, (2008) encontraron una mayor seropositividad en ganado doble propósito (82,9%) con respecto al ganado de carne (17,1%). Lo anterior puede explicarse debido a que el manejo ganadero en sistemas de producción de carne es extensivo, por lo cual no es tan frecuente la infección iatrogénica en el sistema; en contraste los sistemas de producción de leche intensiva o doble propósito en la cual durante el ordeño se requiere una alta intervención y manipulación de los animales que facilita la diseminación iatrogénica de partículas virales en el hato a través de la leche, equipos o manos de los operarios.

Se ha reportado que la leche de vacas infectadas presenta exosomas que contienen proteínas del BLV, que aunque “no son infecciosas” son transmitidas por una vía alternativa diferente de la infección viral y tienen un papel importante en la eliminación de proteínas del BLV a través de células infectadas [21]. En el

Departamento de Antioquia la prevalencia serológica del BLV en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros, por medio de la técnica de AGID fue del 12,07%, encontrándose la mayor prevalencia en el grupo etario de 5 a 9 años [22]. Esta misma técnica fue aplicada en muestras de suero sanguíneo de la Sabana de Bogotá y de los Valles de Ubaté y Chiquinquirá, encontrándose una seroprevalencia del 45,28% [23].

Las técnicas de diagnóstico AGID y ELISA han sido aceptadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico serológico del BLV [3]; ambas técnicas detectan anticuerpos anti-BLV, los anticuerpos son generados por el estímulo que genera la infección viral la cual se desencadena como parte de respuesta inmune humoral frente a las proteínas inmunogénicas gp51 y p24 [6]. El valor de sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del BLV en muestras de leche respecto al AGID fue del 100%, mientras que la especificidad fue del 51% [12]. Por lo tanto la técnica ELISA detecta el 100% de los animales verdaderamente infectados.

El aumento en la seroprevalencia del BLV en los hatos lecheros puede ser explicado por malas prácticas de manejo. La reutilización de agujas para procesos de vacunación [10], de guantes durante la palpación [25] o el descorne [26] ayudan a la diseminación del virus. Los toros con BLV pueden transmitir la infección a través del semen, en el cual se ha encontrado el genoma del virus [27]. Los insectos hematófagos como los tábanos (*Tabanus spp*) también se encargan de distribuir el virus entre los animales [28], pero aún se desconoce el papel de la mosca con cuernos (*Haematobia irritans*) y la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) que se presentan con mayor frecuencia en las producciones. Estas prácticas probablemente explican la diferencia entre las seroprevalencias encontradas en este trabajo con las reportadas por otros autores.

CONCLUSIONES

La seroprevalencia del BLV en muestras de leche de hatos lecheros del Antioquia fue del 79,69%, esta alta seroprevalencia indica la capacidad de diseminación del virus en los hatos lecheros. El diagnóstico serológico en leche del BLV se propone como alternativa de fácil uso para ser aplicada en los hatos lecheros.

REFERENCIAS

- [1] WU, D., MURAKAMI, K., MOROOKA, A., JIN, H. and SENTSU, H. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Research*, 97(2), 2003, p. 81-87.
- [2] DEES, C., GODFREY, V., SCHULTZ, R. and TRAVIS, C. Wild type p53 reduces the size of tumors caused by bovine leukemia virus infected cell. *Cancer Letter*, 101(1), 1996, p.115-122.
- [3] ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA SALUD ANIMAL. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres [online]. 2012. Disponible: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf. [Citado 01 de Agosto 2016].
- [4] MALATESTINIC, A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Canadian Veterinary Journal*, 44(8), 2003, p. 664-666.
- [5] MARTIN, D., ARJONA, A, SOTO, I., BARQUERO, N., VIANA, M. and GÓMEZ-LUCÍA, E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 48(2), 2001, p. 97-106.
- [6] GILLET, N., FLORINS, A., BOXUS, M., BURTEAU, C. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4(18), 2007, p. 1-32.
- [7] SANTOS, S. 14 enfermedades sin control oficial atacan al ganado en Colombia [online]. 2014. Disponible: <http://www.contextoganadero.com/reportaje/14-enfermedades-sin-control-oficial-atacan-al-ganado-en-colombia>. [Citado 20 Mayo de 2016].
- [8] ALARCÓN, G. Caracterización epidemiológica de los Efectos Adversos Seguidos a la Vacunación (EASV) producidos en el primer ciclo de vacunación de 2010 y análisis de la situación sanitaria de enfermedades no sujetas a control oficial (ENSCO) entre 2005 y 2009, de la especie bovina en Colombia [Tesis Médico Veterinario]. Medellín (Colombia): Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2011, 26 p.
- [9] ALARCÓN, G. Enfermedades reproductivas, un problema con muchas causas [online]. 2013. Disponible: <http://www.contextoganadero.com/reportaje/enfermedades-reproductivas-un-problema-con-muchas-causas>. [Citado 10 Mayo de 2016].
- [10] ORTEGA. D., SÁNCHEZ, A., TOBÓN, J., CHAPARRO, Y., CORTÉS, S. and GUTIERREZ, M. Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 8(5), 2016, p. 35-43.
- [11] NEKOUËI, O., DUROCHER, J. and KEEFE, G. Diagnostic performance of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect bovine leukemia virus antibodies in bulk-tank milk samples. *Canadian Veterinary Journal*, 57(7), 2016, p.778-80.
- [12] FELMER, R., ZÚÑIGA, J. and 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. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 2006, p. 137-141.
- [13] COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [online]. 2012. Disponible: https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guiding_Principles_2012.pdf. [Citado 20 Mayo de 2016].
- [14] UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007 [Online]. 2008. Disponible: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf. [Citado 02 de Agosto de 2016].
- [15] ALGORTA, A. Leucosis bovina enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay [Ph.D Tesis en Ciencias Veterinarias]. Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, 2014, 27 p.
- [16] BIANCHI, I. Prevalência da leucose enzoótica bovina na região Norte Fluminense [MSc. Tese em Produção Animal]. Campos dos Goytacazes (Brasil): Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências de Tecnologias Agropecuárias, 2003, 26 p.
- [17] GRAU, M. and MONTI, G. Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(2), 2010, p. 87-91.
- [18] FELMER, R., ZÚÑIGA, J., RECABAL, M. and CHÁVEZ, R. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de

- PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(3) 2006, p. 253-257.
- [19] MARIÑO, B., NOGUES, M., IGUZQUIZA, I., GUTIERREZ, S., RODRIGUEZ, N., ESTEBAN, E. and OCHHI, H. Prevalencia de tambos infectados con el Virus de la Leucosis Bovina (BLV) mediante determinación de anticuerpos en leche por ELISA 108. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*, 2(2), 2003, p. 117-121.
- [20] BETANCUR, C. and RODAS, J. Seroprevalencia del Virus de la Leucosis Bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Revista MVZ Córdoba*, 13, 2008, p. 1197-1204.
- [21] YAMADA, T., SHIGEMURA, H., ISHIGURO, N. and INOSHIMA, Y. Cell Infectivity in Relation to Bovine Leukemia Virus gp51 and p24 in Bovine Milk Exosomes. *PLoSone*, 8(10), 2013, p. 1-7.
- [22] AGUILAR, L. Prevalencia serológica de la Leucosis Enzoótica Bovina en hatos lecheros del municipio de San Pedro Antioquia [Tesis Médico Veterinario]. Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1989, 61 p.
- [23] ALFONSO, R., ALMANSA, J. and BARRERA, C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev Sic Tech Off Int Epi*, 17(3), 1998, p. 723-732.
- [25] DIVERS, T., BATRTHOLOME, W. and GALLINGAN, D. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in commercial dairy herd. *Preventive Veterinary Medicine*, 23, 1995, p. 133-141.
- [26] DIGIACOMO, R., DARLINGTON, R. and EVERMANN, J. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 49(3), 1985, p. 340-324.
- [27] DUS SANTOS, J., TRONO, K., LAGER, I. and WIGDOROVITZ, A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Veterinary Microbiology*, 119(1), 2007, p. 10-18.
- [28] MANET, G., GUILBERT, X., ROUX, A., VUILLAU-ME, A. and PARODI, A. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 22(3), 1989, p. 255-263.