



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CONGELACIÓN DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE VACAS CON ALTA
CARGA PROVIRAL COMO PREVENTIVO DE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE
LEUCOSIS BOVINA EN UN BIOENSAYO OVINO

Línea de investigación:

Estadística y bioestadística

Tesis para optar el título de segunda especialidad profesional en
Estadística e Investigación Científica

Autora:

Sandoval Monzón, Rocío Silvia

Asesor:

Capa Luque, Walter

(ORCID: 0000-0003-4342-9264)

Jurado:

Aguirre Morales, Marivel Teresa

López Odar, Dennis Rolando

Franco Guanilo, Roxana Lorena

Lima - Perú

2021



Referencia:

Sandoval, R. (2021). *Congelación de linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral como preventivo de la transmisión del virus de Leucosis bovina en un bioensayo ovino* [Tesis de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5287>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**CONGELACIÓN DE LINFOCITOS PROVENIENTES DE VACAS CON ALTA
CARGA PROVIRAL COMO PREVENTIVO DE LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE
LEUCOSIS BOVINA EN UN BIOENSAYO OVINO**

Línea de investigación: Estadística y Bioestadística

Tesis para optar el título de segunda especialidad profesional en Estadística e Investigación

Científica

AUTOR:

Sandoval Monzón, Rocío Silvia

ASESOR:

Capa Luque, Walter

JURADO:

Aguirre Morales, Marivel Teresa

López Odar, Dennis Rolando

Franco Guanilo, Roxana Lorena

Lima - Perú

2021

DEDICATORIA

A Dios, por darme salud y fortaleza para lograr este importante objetivo.

A mis hijos que me regalaron parte de su tiempo.

A mi esposo, amigo y colega por su amor y paciencia.

A mi familia por su apoyo infinitos.

AGRADECIMIENTOS

A mi equipo de trabajo, mi asesor y mis revisores de tesis.

A la Facultad de Psicología de la Universidad Nacional Federico Villarreal que me acogió en sus aulas

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	iv
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
I. Introducción.....	9
1.1. Descripción y formulación del problema.....	9
1.2. Antecedentes	11
1.2.1. A Nivel Nacional	11
1.2.2. A Nivel Internacional	12
1.3. Objetivos.....	13
1.3.1. Objetivo general.....	13
1.3.2. Objetivos específicos.....	13
1.4. Justificación	14
1.5. Hipótesis	15
1.5.1. Hipótesis general	15
1.5.2. Hipótesis específica	15
II. Marco teórico	16
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	16
2.1.1. Leucosis Enzoótica Bovina: Definición	16
2.1.2. Situación en el Perú y en el mundo.....	17
2.1.3. Etiología y fisiopatología de la leucosis enzoótica bovina.....	18
2.1.4. Vías de transmisión y fuentes de contagio.....	21
2.1.5. Efectos en la salud animal y salud humana.....	29
2.1.6. Impacto en los sistemas de producción	31
2.1.7. Mecanismos de control y erradicación.....	33
2.1.8. Tratamientos para eliminar el VLB de la leche y el calostro.....	38
III. Método	42
3.1. Tipo de investigación.....	42
3.2. Ámbito temporal y espacial	42
3.3. Variables	42

3.3.1. <i>Variable independiente</i>	42
3.3.2. <i>Variable dependiente</i>	42
3.4. Población y muestra.....	42
3.5. Instrumentos.....	42
3.5.1. <i>Diagnóstico de seropositividad al virus de leucosis bovina</i>	42
3.5.2. <i>Determinación de alta carga proviral</i>	43
3.6. Procedimientos.....	43
3.6.1. <i>Obtención de muestras de sangre</i>	43
3.6.2. <i>Determinación de alta carga proviral en las vacas</i>	44
3.6.3. <i>Procesamiento de los linfocitos</i>	44
3.6.4. <i>Obtención del inóculo</i>	44
3.6.5. <i>Bioensayo en ovejas</i>	45
3.7. Análisis de datos.....	45
3.8. Consideraciones éticas	46
IV. Resultados.....	47
4.1. Efecto de la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral como preventivo de la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino 47	
4.2. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.....	49
4.3. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina	50
4.4. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.	52
V. Discusión de resultados.....	54
VI. Conclusiones.....	57
VII. Recomendaciones	58
VIII. Referencias.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 <i>Resultados semanales a la prueba de ELISA de las ovejas que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo proveniente de leche con células infectadas por el virus de leucosis bovina (VLB) previamente tratada con diferentes métodos de inactivación</i>	48
Tabla 2. <i>Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB)</i>	50
Tabla 3. <i>Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB)</i>	51
Tabla 4. <i>Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB)</i>	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Las principales rutas de transmisión del VLB.....	19
Figura 2. Curso clínico del VLB.....	20

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es evaluar la eficacia de la congelación sobre la inactivación del virus de la leucosis bovina presente en leche como estrategia de control en terneros lactantes. Para el estudio se realizó un bioensayo ovino, en el cual se emplearon 12 ovinos. Los ovinos recibieron por vía intraperitoneal un inóculo proveniente de leche con células infectadas por el virus de leucosis bovina (VLB) previamente tratada con uno de los métodos de inactivación del virus. Se evaluaron cuatro grupos de estudio: a) grupo control: leche con células infectadas por el VLB sin ningún tratamiento previo, b) grupo congelación 12 horas: leche con células infectadas por el VLB tratada por congelación durante 12 horas, c) grupo congelación 36 horas: leche con células infectadas por el VLB tratada por congelación durante 36 horas. Se encontró que a la décima semana post inoculación, el 100% de los animales del grupo control y el 75% de los animales del grupo congelación por 12 horas fueron seropositivos al VLB, mientras que ningún animal fue seropositivo (0%) al VLB en el grupo congelación por 36 horas. Los resultados nos indican que el proceso de congelación por 36 horas es eficaz para inactivar el virus de leucosis bovina, mientras que el proceso de congelación por 12 horas no logra inactivar el virus. La implementación del procesamiento de la leche y el calostro que reciben los terneros podría reducir la prevalencia de infección del VLB en los establos que implementen un hato paralelo como medida de control y eliminación del VLB.

Palabras clave: congelación, calostro, leche, leucosis enzoótica bovina, terneros

ABSTRACT

The objective of this work is to evaluate the efficacy of freezing on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk as a control strategy in lactating calves. For the study, a sheep bioassay was performed, in which 12 sheep were used. The sheep received an inoculum intraperitoneally from milk with cells infected with bovine leukosis virus (VLB) previously treated with one of the virus inactivation methods. Four study groups were evaluated: a) control group: milk with cells infected by the VLB without any previous treatment, b) freezing group 12 hours: milk with cells infected by the VLB treated by freezing for 12 hours, c) freezing group 36 hours: milk with cells infected by the VLB treated by freezing for 36 hours. It was found that at the tenth week after inoculation, 100% of the animals in the control group and 75% of the animals in the freezing group for 12 hours were seropositive to the VLB, while no animal was seropositive (0%) to the VLB in the freezing group for 36 hours. The results indicate that the process of freezing for 36 hours is efficient to inactivate the bovine leukosis virus, while the freezing process for 12 hours fails to inactivate the virus. The implementation of milk and colostrum processing received by calves could reduce the prevalence of VLB infection in stables that implement a parallel herd as a measure of control and elimination of VLB.

Keywords: pasteurization, freezing, colostrum, milk, bovine enzootic leukosis, calves

I. Introducción

El presente trabajo estudia un problema que afecta la sanidad del ganado y que tiene un potencial impacto en la salud del hombre. Su propósito es lograr evaluar una estrategia que permita disminuir la transmisión de la enfermedad a través de la evaluación de una técnica que permita inactivar al virus presente en los linfocitos que están presentes en diversas secreciones del ganado, entre ellas, en la leche. La introducción del presente documento está conformada por descripción y formulación del problema, los antecedentes, los objetivos, la justificación y la hipótesis del presente documento.

1.1. Descripción y formulación del problema

La Leucosis Enzoótica Bovina es una enfermedad de elevada prevalencia en los establos lecheros, con un importante efecto negativo en la economía y sanidad de estos. Recientes investigaciones demuestran que posee un importante potencial zoonótico. Esta enfermedad posee tres formas de presentación: seropositividad asintomática, linfocitosis persistente y fase tumoral. Los animales con linfocitosis persistente tienen un rol de gran importancia epidemiológica porque poseen alta carga proviral en las células de sangre periférica. El agente etiológico de la Leucosis Enzoótica Bovina es el virus de la leucosis bovina (VLB), el cual presenta una distribución mundial y es altamente endémico en el Perú.

Económicamente afecta negativamente a la producción de leche en los establos, disminuyendo 95 litros por vaca al año por cada incremento de 10% de prevalencia. Así también, diversos autores consideran que la infección del VLB es una importante y silenciosa amenaza que afecta la respuesta inmune del ganado, encontrándose una correlación positiva entre la infección por VLB y la incidencia de mastitis, problemas de pezuña, gastroenteritis y bronquitis en los rebaños lecheros.

Se ha encontrado que el 59% de muestras de cáncer mamario de mujeres tenían la presencia de ADN del VLB, mientras que sólo 29% de muestras sin cáncer mamario mostró

exposición al VLB. Demostrándose con esto que el VLB es transmisible a los seres humanos y que las probabilidades de tener cáncer de mama en una mujer que presenta el VLB es 3,1 veces mayor que cuando el virus está ausente.

A pesar de que la Leucosis Enzoótica Bovina es una enfermedad considerada en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), sólo veintidós países en el mundo han podido erradicarla. Esta situación no es diferente en nuestro país, que poco o nada ha hecho por implementar estrategias de control y erradicación de esta enfermedad.

La presencia del virus en leche y el calostro ha sido demostrada desde los años setenta, por lo tanto, es necesario implementar un plan estratégico de control y erradicación de la Leucosis Enzoótica Bovina en el Perú. La mejor manera de erradicarla es mediante un programa de detección y sacrificio, sin embargo, cuando la prevalencia es demasiado elevada y cuando el estado no subvenciona al ganadero es necesario utilizar un programa de detección y segregación.

Un punto crítico de la implementación de un programa de detección y segregación es el manejo del calostro. La toma de calostro en las primeras cuatro horas de vida es trascendente para la sobrevivencia del ternero, debido a que no recibe anticuerpos a través de la placenta durante la gestación. Si bien la presencia de inmunoglobulinas en el calostro tiene un efecto protector, también actúa como una fuente infectiva del VLB.

Aunque la leucosis bovina enzoótica no es una enfermedad que se transmita únicamente durante el período neonatal, durante este período los terneros están en un riesgo especial de llegar a ser infectados, y los terneros infectados pueden desempeñar un papel activo en la propagación temprana del VLB a los animales susceptibles.

Si bien, la pasteurización del calostro ha demostrado ser efectiva para conservar concentraciones ideales de inmunoglobulinas y evitar la transmisión del virus, este

tratamiento no es práctico cuando se aplican en el campo para alimentar un gran número de terneros. La congelación del calostro desde hace muchos años ha sido una alternativa para conservar el calostro y mantener las inmunoglobulinas. Así mismo, algunos estudios han demostrado que la congelación del calostro evita la transmisión VLB. Por estas razones resulta interesante estudiar si la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con linfocitosis persistente nos permitiría eliminar la transmisión del virus mediante una sencilla práctica de campo. Por lo tanto, es necesario investigar: ¿Qué efecto posee la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral en la prevención de la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino?

1.2. Antecedentes

1.2.1. A Nivel Nacional

Un estudio realizado por Sandoval, et al. (2015), determinaron que la frecuencia de seropositividad del virus de la Leucosis bovina en un estable lechero de Lima fue de 92.7%. Siendo la prevalencia de 100% para los bovinos mayores de 5 años, 97% para los animales entre 2 y 5 años y 60% para los animales menores de 2 años, recomendándose un plan de control y erradicación.

Un estudio realizado por Barrera (2010), determinó que la seroprevalencia del virus de la leucosis bovina en Valle Viejo (Santa Rosa, Omo, Rinconada, Charsagua) distrito de Moquegua fue de 20.00 %. Siendo de 32.00% en Omo, de 31.82% en Rinconada, de 21.21% en Santa Rosa y de 0% en Charsagua. Así también se determinó las prevalencias según la edad, obteniéndose un 25,75% en bovinos mayores de 2 años, 21,05% en bovinos de 1 a 2 años y 4% en bovinos menores de 1 año. Encontrándose que la prevalencia de leucosis según sexo del animal fue de 22,73% para hembras y 9,09% para machos. Quedando demostrado que existe un aumento de la prevalencia del VLB en el Valle Viejo de Moquegua, lo cual

confirma la necesidad de implementar un programa de control y prevención contra esta enfermedad, con la finalidad de reducir las pérdidas económicas.

Así también, un estudio realizado por Romero (2008), determinó la seroprevalencia del virus de la Leucosis bovina en el valle de Sama, provincia y departamento de Tacna. Los resultados evidenciaron una prevalencia de 23% para el Valle de Sama. Quedando evidenciado la importancia de esta enfermedad en el valle de Sama.

1.2.2. A Nivel Internacional

Un estudio realizado por Mirsky, et al. (1996) no encontró que pruebas convincentes de que los monocitos y linfocitos T de sangre periférica contengan el BLV provirus en vacas seropositivas con o sin linfocitosis persistente. Las vacas sin linfocitosis persistente presentaron 9.2% de células B CD51 y 0.1% de células B CD52 de los linfocitos B circulantes. Las vacas con linfocitosis persistente presentaron 66% de células B CD51 y 13.9% de células B CD52 infectadas con BLV. El aumento del número de linfocitos en las vacas con PL fue atribuible a 45 veces más y 99 más veces de células B CD51 y CD52 infectadas, respectivamente. Por lo tanto, se demuestra que las células B son las únicas células mononucleares en la sangre periférica que son significativamente infectados con BLV y existe una mayor propagación del virus por parte de los animales seropositivos con linfocitosis en comparación a los seropositivos sin linfocitosis.

En un estudio anterior realizado por Ferrer, et al. (1981) se ha encontrado que 17 de 24 vacas infectadas naturalmente con el VLB presentan carga proviral en su leche, demostrándose que el consumo de leche no pasteurizada es riesgo de infección para los terneros y humanos.

Otra investigación realizada por Romero, et al. (1983) reveló que la transmisión del virus a través la leche es significativa. Se ha encontrado que de los terneros alimentados con leche de vacas libres del VLB y habían nacido de madres seropositivas, sólo el 8.7% fueron

seropositivos al VLB. En cambio, de los terneros alimentados con leche de vacas seropositivas y habían nacido de madres positivas, el 16,7% resultaron seropositivos al VLB. Así también, al evaluar los terneros nacidos de madres seronegativas, se encontró que el 27% de los terneros que fueron alimentados con leche de vacas seropositiva se convirtieron en positivos al VLB. Esto demuestra que, si bien la presencia del VLB en el calostro es una fuente de transmisión, la presencia de inmunoglobulinas en el calostro también tiene un efecto protector.

Así también, Kanno et al. (2014) utilizaron un bioensayo ovino para determinar el efecto del congelamiento de calostro para prevenir la transmisión del virus de leucosis bovina (BLV) entre terneros neonatales. Se aislaron leucocitos del calostro de una vaca Holstein infectada con BLV y luego se dejaron y fueron sometidos al tratamiento de congelación. Ovejas fueron inoculadas intraperitonealmente con los leucocitos provenientes del calostro. Tres semanas después de la inoculación se encontró que las ovejas inoculadas con leucocitos tratados no se infectaron.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral como preventivo de la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino.

1.3.2. Objetivos específicos

Evaluar los porcentajes de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.

Evaluar los porcentajes de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.

Evaluar los porcentajes de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.

1.4. Justificación

La Leucosis Enzoótica Bovina es una enfermedad de gran importancia económica y sanitaria en los establos lecheros de nuestro país y del mundo. Investigaciones recientes demuestran que la seropositividad al VLB disminuye la producción lechera y es considerada una amenaza silenciosa que afecta la respuesta inmune del ganado infectado. Su importancia zoonótica se ha demostrado recientemente al haber sido relacionado con el cáncer de mama en mujeres. Por consiguiente, implementar un plan de control y erradicación del virus en nuestro país es urgente, ya que la prevalencia tanto a nivel de los hatos y del ganado es muy elevada.

La mejor manera de erradicar la Leucosis Enzoótica Bovina es mediante un programa de detección y sacrificio. Sin embargo, cuando la prevalencia es demasiado elevada y cuando el estado no subvenciona al ganadero se puede utilizar un programa de detección y segregación. Parte importante de este programa es asegurar que el calostro que reciben los terneros no sea una fuente de transmisión, y a su vez cumpla su rol protector contra el virus. Por lo tanto, es necesaria la implementación de un adecuado manejo del calostro destinado al terneraje. Existen antecedentes de que la pasteurización podría eliminar la posibilidad de transmisión del VLB, pero esta técnica no se realiza probablemente porque es demasiado complicado ponerla en la práctica. La mayoría de los terneros son alimentados con calostro crudo. Por lo tanto, es sumamente importante realizar una investigación que compruebe la congelación es capaz de evitar la transmisión del VLB a partir del calostro de vacas con alta carga proviral.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis general

La congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral previene la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino.

1.5.2. Hipótesis específica

Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina seroconvierten en un 100%.

Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina no se mantienen negativos y seroconvierten.

Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina no se mantienen negativos y seroconvierten.

II. Marco teórico

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Leucosis Enzoótica Bovina: Definición*

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad de gran importancia económica y sanitaria en los establos lecheros (Nekouei et al., 2015), que posee un importante potencial zoonótico (Buehring et al., 2015). Se caracteriza por tres estadios o formas de presentación: seropositividad asintomática, linfocitosis persistente y fase tumoral o linfosarcoma (Bartlett et al., 2013). El agente etiológico de la LEB es el virus de la leucosis bovina (VLB), el cual se encuentra distribuido en todo el mundo (Kobayashi et al., 2010; Gutiérrez et al., 2015; Nekouei et al., 2015) y es altamente endémico en el Perú (Romero, 2008; Barrera, 2010; Sandoval et al., 2015). Aproximadamente más del 60% de animales seropositivos son asintomáticos, el 30% desarrolla linfocitosis persistente, mientras que sólo un 0,15 % desarrolla linfosarcoma (Kabeya et al., 2001). Los animales con linfocitosis persistente tienen un rol de gran importancia epidemiológica porque poseen alta carga proviral en las células de sangre periférica (Mirsky et al., 1996).

A pesar de que la Leucosis Enzoótica Bovina es una enfermedad considerada en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (OIE, 2012), sólo veintidós países en el mundo han podido erradicarla (Acaite et al., 2007). Su prevalencia a nivel mundial es preocupante, países como Estados Unidos, Japón y Argentina presentan infecciones bastante generalizadas, más del 83% de los rebaños infectados, con una prevalencia mayor al 30% dentro de cada hato (Frie y Coussens, 2015).

Esta situación no es diferente en nuestro país, que poco o nada ha hecho por implementar estrategias de control y erradicación de esta enfermedad.

2.1.2. Situación en el Perú y en el mundo

Los estudios epidemiológicos del VLB realizados en los establos lecheros de USA han mostrado que al menos 84% de los hatos lecheros de USA están infectados con el VLB y que 23% a 47% de las vacas dentro de cada hato infectado sean positivas al virus (LaDronka et al., 2018). Un estudio reciente reporta que 33.6% de los bovinos de carne hembras descartadas llevadas a los camales de USA eran seropositivas al VLB (Bauermann, et al., 2017). Se ha reportado por Bartlett et al. (2013) que el 25.7% de los toros de carne en Michigan, de más de un año de edad, estaban infectados por el VLB. Luego, (Benitez et al., 2019) reportaron un 44.6% de toros mayores de un año de edad provenientes de 39 diferentes establos de carne en Michigan fueron seropositivos. La evidencia de la infección por el VLB en hatos de carne origina nuevas preguntas sobre el impacto de esta enfermedad en la industria cárnica. Deben ser considerados más estudios a nivel nacional e internacional para comprender completamente el potencial impacto del VLB en la industria cárnica.

Muchos países y regiones alrededor del mundo están reportando una prevalencia leve (China (Yang et al., 2016), Colombia (Úsuga-Monroy et al., 2015), Costa Rica (Jiménez et al., 1995), Irán (Nekoei et al., 2015), Japón (Murakami et al., 2013), Mongolia (Ochirkhuu et al., 2015), Filipinas (Polat et al., 2015), Sudáfrica (Ndou et al., 2011), Turquía (Şevik et al., 2015), África Occidental (Walrand et al., 1986)) hasta alta (Argentina (Monti et al., 2005), Canadá (Nekouei et al., 2015), USA (LaDronka et al., 2018)) y frecuentemente en incremento. Mientras tanto, las áreas que han implementado programas de control hacia el VLB, tales como la Unión Europea, continúan apretando las restricciones de comercio para proteger sus hatos (The European Commission [EC], 2016).

Hace algunos años, en el Perú, las investigaciones sobre esta enfermedad determinaron que la prevalencia estaba entre 12 y 20% (Barrera, 2010). Sin embargo, un estudio realizado por (Sandoval et al., 2015) determinaron una prevalencia de casi 93%. Asimismo, en otro estudio se encontró que la frecuencia de linfocitosis persistente era del 5% (Arévalo et al., 2018). Se ha demostrado que en países como el nuestro, que no aplican ninguna medida de control, la prevalencia se incrementa con el transcurso de los años (Ruiz et al., 2018). Esto debido a que la mayor parte de los animales infectados son portadores asintomáticos de la enfermedad y no son separados del hato oportunamente (Kabeya et al., 2001; Juliarena et al., 2007).

2.1.3. Etiología y fisiopatología de la leucosis enzoótica bovina

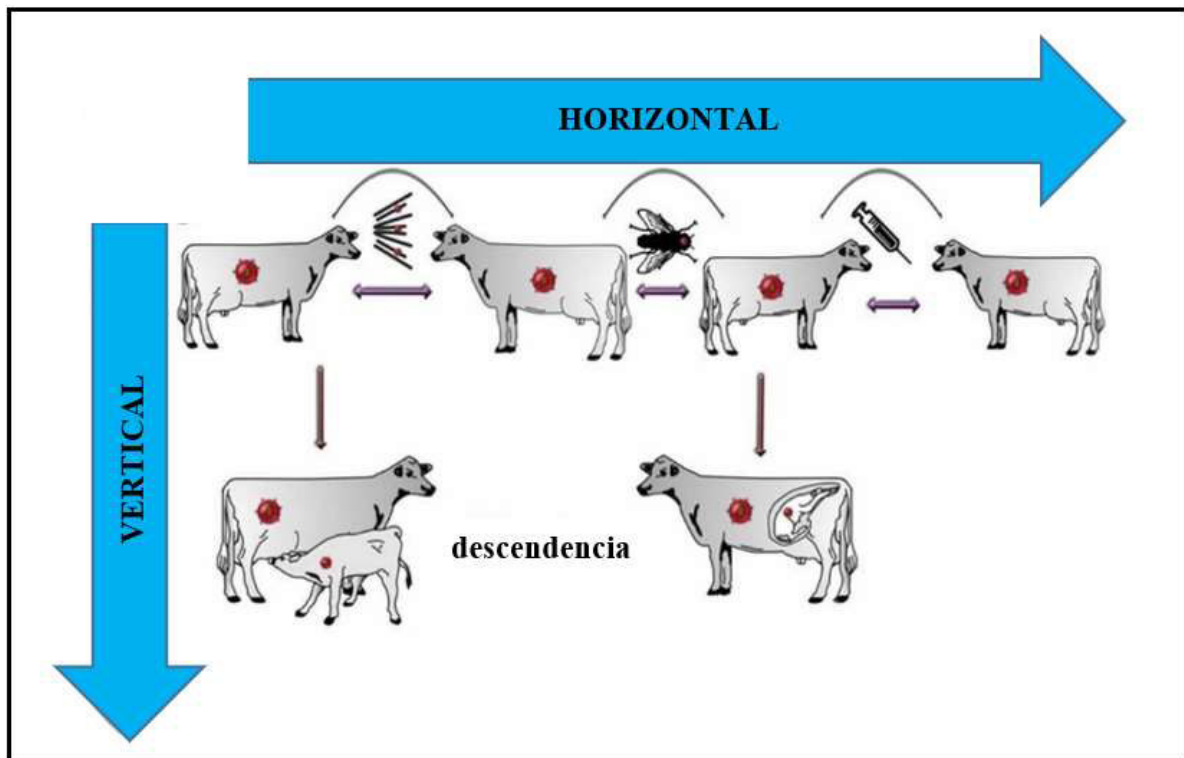
a) Etiología de la enfermedad. La LEB es una enfermedad infecciosa que se presenta naturalmente en los bovinos, causada por el VLB. Su forma clínica, el linfosarcoma, fue descrito por primera vez en Europa oriental en 1871 (Schwartz y Lévy, 1994), y durante décadas, muchas teorías expusieron por qué estos tumores aparecían en grupos geográficos y algunos hatos, pero no en otros (Bendixen, 1963). Aunque se sospechaba de una causa infecciosa, pasó casi un siglo antes que Miller et al. identificaran partículas virales, similares morfológicamente a los virus de la leucosis tipo C de otras especies (Miller et al., 1969). El virus además fue descrito por Kettmann et al. (1976), en estudios bioquímicos que caracterizaron al agente como un virus ARN exógeno, y su genoma fue secuenciado por Sagata et al. (1985). Desde ese momento, el genoma, particularmente la estructura del gen *env*, ha sido utilizado para identificar e investigar un creciente número de genotipos virales que han sido hallados a través de todo el mundo (Polat et al., 2016).

b) Fisiopatología de la enfermedad. En la figura 1 se puede observar cómo se transmite el VLB por vía horizontal o vertical a través de la transferencia de fluido biológico

contaminado con linfocitos que contienen al provirus del VLB. El VLB sufre un ciclo de replicación y produce nuevas infecciones en nuevas células blanco (Gutiérrez et al., 2014a).

Figura 1.

Las principales rutas de transmisión del VLB.



El virus de la leucosis bovina puede diseminarse ya sea de forma horizontal desde un hospedero a otro, o de forma vertical desde una generación a otra (madre a ternero). La transmisión horizontal del VLB es considerada la principal ruta de infección en los bovinos.

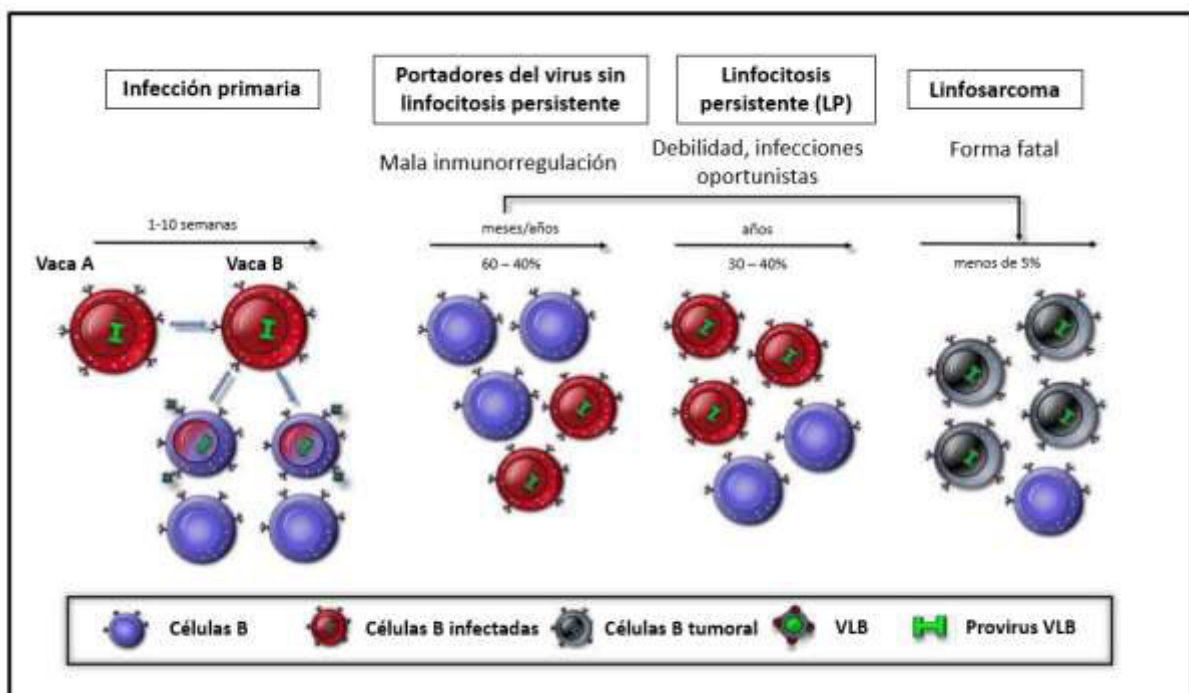
Dentro de 2 a 10 semanas después de la exposición inicial, el sistema inmune inicia una fuerte respuesta que limita la infección de nuevas células blanco (Burny et al., 1988). Desde aquí, la enfermedad natural puede progresar entre un par de meses hasta varios años.

Aproximadamente el 60 a 70% de los bovinos infectados con el VLB son mayormente asintomáticos. En estos animales no se manifiestan signos clínicos, y no ocurre la alteración

del conteo total de linfocitos (Swenson et al., 2013). Alternativamente, el VLB sufre una fase de escape donde 30% al 40% de los bovinos infectados con el VLB desarrollan una proliferación policlonal de células B, conduciendo a una linfocitosis persistente (Lewin, 1989; Kabeya et al., 2001). Consecuentemente, habrá diferentes clones de células B infectados que portan al provirus integrado del VLB que incrementa rápidamente durante la fase de linfocitosis persistente (Kettmann et al., 1980). Los diferentes cambios de la linfocitosis persistente pueden revelar ya sea una condición viral severa o una transitoria (Swenson et al., 2013; Juliarena et al., 2016). El curso clínico del VLB es representado en la figura 2.

Figura 2.

Curso clínico del VLB.



Durante la infección primaria una célula infectada (roja) con el VLB integrado en el cromosoma del hospedero (provirus verde) es transmitida a un nuevo animal. El provirus del VLB entonces es expresado en partículas virales (hexágono verde) que infectan más células B (púrpura). Durante la infección persistente, las células que portan el provirus (rojas) se

expanden principalmente por mitosis debido a la presencia de una respuesta inmune activa. Esta fase dura varios meses o años y se caracteriza por una alteración del sistema inmune que puede conducir a un incremento en el número de células afectadas (animales con LP). Durante la fase de LP, la morbilidad está caracterizada por debilidad e infecciones oportunistas. En la fase tumoral, una sola célula infectada sufre mutaciones genéticas (negra) y forma un linfoma dentro o fuera de los nódulos linfáticos, conduciendo a la muerte del animal.

2.1.4. Vías de transmisión y fuentes de contagio

La transmisión entre hatos parece ser casi exclusivamente vía el movimiento de animales (Bendixen, 1963; European Food Safety Authority Panel on Animal Health and Welfare [EFSA AHAW Panel], 2015). La transmisión entre animales es mucho más complicada, ya que han sido descritas la transmisión vertical y horizontal del VLB, aunque la transmisión uterina parece ser rara (Thurmond et al., 1983). Las partículas virales son inestables (Rodríguez et al., 2011), así que se considera que la transmisión célula a célula es el mecanismo primario para la diseminación del VLB entre células en las etapas tempranas de la infección, como en muchos otros retrovirus (Sattentau, 2010).

a) Transmisión vertical. La transmisión del VLB puede ocurrir in útero (Jacobsen et al., 1983), pero se cree que ocurre infrecuentemente (Thurmond et al., 1983); solamente el 4% de los terneros nacidos de vacas naturalmente infectadas fueron seropositivos al VLB al nacimiento (Jacobsen et al., 1983; Agresti et al., 1993). El riesgo de ser seropositivo al VLB al nacimiento parece ser mayor si el ternero nace de una vaca seropositiva al VLB con linfocitosis persistente o linfosarcoma (Agresti et al., 1993). Esto refleja el incrementado riesgo de la transmisión del VLB desde las vacas que están en una fase avanzada de la enfermedad (Gutiérrez et al., 2014b). Algunos reportes también demuestran que el BLV

podría ser transmitido durante el parto cuando la sangre infectada y el fluido biológico contaminado pueden infectar el útero (Agresti et al., 1993).

- *Al momento del parto.* El momento más probable de transmisión de madre a descendencia es en el período periparto, ya sea a través de la transferencia de sangre durante el parto (Nagy et al., 2007) o a través de la ingestión de células infecciosas en la leche (Ferrer et al., 1981). El calostro es un factor de riesgo para la transmisión (Hopkins y DiGiacomo, 1997) y de tener efectos protectores debido a la transferencia pasiva de anticuerpos contra el VLB (Nagy et al., 2007). La evidencia del efecto protector del calostro se ha comprobado en estudios experimentales (Nagy et al., 2007) y en escenarios de transmisión natural (Kobayashi et al., 2010), no encontrándose nuevas infecciones en animales jóvenes cuando los terneros fueron alimentados con calostro de sus madres positivas al VLB (Dimmock et al., 1991). Estas últimas rutas de transmisión sólo explican un pequeño número de casos (6-16%) (Hopkins y DiGiacomo, 1997), sobre todo en hatos con alta prevalencia de infección del VLB. Además, ni la exposición experimental de embriones al VLB ni la inseminación de ovocitos con semen conteniendo el VLB resultaron en embriones con VLB detectable (Bielanski, et al., 2000). Otra potencial fuente del VLB incluye cualquier fluido contaminado con linfocitos infectados (Asadpour y Jafari, 2012; Yuan et al., 2015).

- *Calostro y leche.* El calostro y la leche pueden desempeñar un importante rol en la transmisión del VLB en terneros (Sprecher et al., 1991). La alimentación de terneros con calostro ha sido asociada con un papel protector en la infección con el VLB en la transmisión experimental, así como en la natural, mientras que la alimentación con leche no tratada es identificada más frecuentemente como un factor de riesgo para la infección con el VLB (Kanno et al., 2014). Por lo tanto, una estrategia preventiva para la transmisión del

VLB podría ser la alimentación de terneros con leche de vacas negativas al VLB o con calostro pasteurizado proveniente de vacas positivas al VLB.

Kanno et al. (2014) revelan que el calostro con linfocitos infectados con un período de congelamiento de 24 horas no es infeccioso para ovinos sensibles de forma experimental. Esta práctica podría ser fácilmente factible como una estrategia protectora para pequeños ganaderos en lugar de incrementar los costos con calostro pasteurizado y la seguridad para los terneros ya que la pasteurización puede desnaturalizar los anticuerpos necesarios para la inmunización pasiva (McMartin et al., 2006). La alimentación con calostro está asociada a la infección y los efectos protectores en escenarios de transmisión experimental y natural, mientras que la alimentación con leche mezclada, no tratada, es identificada más frecuentemente como un factor de riesgo (Romero et al., 1983; Dimmock et al., 1991; Kanno et al., 2014). Las mejores recomendaciones prácticas, por lo tanto, están basadas ya sea en una abundancia de precaución (alimentar solamente con calostro o leche negativos al VLB o pasteurizados) o en el deseo de prevenir la transmisión a los terneros (alimentar con calostro de vacas positivas al VLB). Un trabajo reciente realizado por Kanno et al. (2014) muestran evidencia de que los linfocitos del calostro de vacas positivas al VLB que se someten a un ciclo de congelamiento-descongelamiento de 24 horas no son infecciosos para ovinos sensibles. Esta puede ser una medida protectora más fácilmente alcanzable para los pequeños ganaderos que invertir en un pasteurizador (Pelzer, 1997) y es menos probable que desnaturalice los anticuerpos que la pasteurización (McMartin et al., 2006).

b) Transmisión horizontal. La transmisión horizontal del VLB ha sido fuertemente asociada con los procedimientos iatrogénicos (Sprecher et al., 1991). Una gran variedad de prácticas de manejo comunes puede resultar en transferencia de sangre tales como el tatuaje (Lucas et al., 1985), el descorne sin desinfección del equipo (Lassauzet et al., 1990), la reutilización de agujas hipodérmicas y guantes obstétricos (Hopkins y DiGiacomo, 1997), y

la monta natural (Erskine et al., 2012). El rol de los insectos hematófagos no es claro y puede ser geográficamente dependiente, aunque la evidencia experimental (Perino et al., 1990), observacional (Bech-Nielsen et al., 1978), y epidemiológica (Erskine et al., 2012; Ohno et al., 2015) parece indicar que estos vectores pueden desempeñar un rol. El estrecho contacto entre animales también ha sido identificado en muchos estudios como un factor de riesgo (Ohno et al., 2015), aunque el mecanismo exacto de transmisión no ha sido dilucidado. Recientes estudios que detectan ADN proviral del VLB en secreciones salivares y nasales (Yuan et al., 2015) así como en secreciones vaginales y heces (Yang et al., 2016) pueden proporcionar alguna información sobre el contacto como un factor de riesgo, pero aún no ha sido reportada evidencia experimental, aparte de los intentos fallidos para inocular ovinos con saliva (Dimmock et al., 1991).

- *Reutilización de guantes obstétricos.* La reutilización de guantes obstétricos para palpación rectal fue identificada como un factor de riesgo (Hopkins y DiGiacomo, 1997; Erskine et al., 2012), pero no en todos (Kobayashi et al., 2010) los estudios epidemiológicos. Una alta infectividad fue observada cuando se analizó experimentalmente la transmisión del VLB por palpación rectal utilizando el mismo guante entre un animal infectado con VLB y vacas nunca expuestas (Kohara et al., 2006). Otro estudio reportó que la presencia de 2 ml de sangre infectada sobre el guante durante la palpación es el volumen mínimo necesario para infectar animales sin trauma de la mucosa rectal (Hopkins et al., 1991).

- *Reutilización de agujas hipodérmicas.* Ha sido reportada una similar transmisión hematogena del VLB a través de la reutilización de agujas hipodérmicas en bovinos (Wilesmith, 1979), como en la transmisión de otros patógenos (Darpel et al., 2016). El uso repetitivo de la misma aguja para administrar productos farmacéuticos puede desempeñar un importante papel en la transmisión iatrogénica del VLB (Lassauzet et al.,

1990). La transferencia del VLB puede ocurrir a través de pequeñas cantidades de sangre con células infectadas de un animal a otro por vehículos que son utilizados diariamente en la práctica veterinaria. Los estudios han demostrado que 0.1 μL de sangre de un bovino infectado con linfocitosis persistente fue capaz de infectado exitosamente a otro animal independientemente de la ruta de inoculación (Mammerickx et al., 1981; Foil et al., 1987). Fue necesario un volumen 1000 veces más alto de sangre infectada con el VLB para inducir la misma respuesta si el animal no presentaba linfocitosis persistente (Mammerickx et al., 1981). Muy interesante, las agujas entre 20G a 18G con una longitud de 1" a 1.5" pueden contener volúmenes entre 0.061 a 0.1 μL en su cuerpo después de su uso (Küme et al., 2012); por lo tanto, ello implica que el riesgo de transmisión del VLB puede incrementarse de un bovino a otro cuando se utiliza la misma aguja para más de un animal. Compartir la aguja hipodérmica es un factor de riesgo conocido para la transmisión del virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) (Robert-Guroff, 1986) y ha sido identificado como un factor de riesgo para la infección con el VLB en estudios epidemiológicos (Hopkins y DiGiacomo, 1997; Erskine et al., 2012). Sin embargo, una cantidad de otros estudios no han mostrado una asociación estadística entre la reutilización de las agujas hipodérmicas y la infección con el VLB (Lassauzet et al., 1990; Kobayashi et al., 2010), y Weber et al. (1988) fueron incapaces de transmitir experimentalmente el VLB a ovinos susceptibles por la reutilización de agujas hipodérmicas.

- *Insectos chupadores.* La contribución de los insectos chupadores de sangre a la transmisión del VLB, comúnmente investigada por medios cualitativos tales como descripciones subjetivas de cantidades de moscas (Kobayashi et al., 2010) es apoyada en algunos casos por una incrementada incidencia en los meses de verano (Bech-Nielsen et al., 1978; Kobayashi et al., 2010). El rol de los insectos hematófagos en la transmisión del VLB no es claro y puede ser geográficamente dependiente (Perino et al., 1990).

Ha sido reportado que el VLB es transmitido por insectos (Foil et al., 1989). Los estudios epidemiológicos reportaron una alta asociación entre la transmisión del VLB y la presencia de insectos hematófagos (Erskine et al., 2012) tales como garrapatas (Romero et al., 1984) y una amplia variedad de moscas (*Tabanid nipponicus*, *Tabanid trigeminus*, *Tabanid juscicostatus*, y moscas del establo) (Bech-Nielsen et al., 1978; Foil et al., 1987; 1989). Las partes bucales de muchos insectos son similares a una pequeña aguja que puede contener desde 1 nL hasta 12 nL de sangre (Foil et al., 1987).

La transmisión del VLB puede ocurrir con la transferencia de aproximadamente 100 a 200 nL de sangre infectada (Foil et al., 1987) que puede contener ~ 2,500 linfocitos; lo que es considerado una dosis infecciosa intradérmica apropiada para bovinos (Klintevall et al., 1994). El volumen transferido de células infectadas y el riesgo de transmisión del VLB por insectos a los bovinos puede depender del tamaño de la mosca y el número de mordidas en el mismo animal (Foil et al., 1989).

- *Reutilización de equipo quirúrgico y empleado en el tatuaje.* El tatuado y el descorne son prácticas de manejo comunes asociadas con un incremento en la seroprevalencia del VLB en hatos de carne y lecheros (Ott et al., 2003; Erskine et al., 2012). Durante el proceso de tatuado, la piel es punzada por agujas del tatuador y los vasos sanguíneos pueden ser rotos en el proceso. En un rebaño de ovinos, 21/24 animales nunca expuestos tatuados al azar con el mismo instrumento utilizado para tatuar animales infectados con el VLB desarrollaron anticuerpos al VLB (Lucas et al., 1985). De forma similar, durante el descorne, podría haber sangre con células infectadas con el VLB en la herramienta de descorne (Stafford y Mellor, 2011) conduciendo a la transferencia de sangre entre animales infectados con el VLB y los animales nunca expuestos.

- *Monta natural.* Algunos estudios han reportado la detección del provirus del VLB en semen (Sharifzadeh et al., 2011), la administración experimental de semen de toros

positivos al VLB a ovejas susceptibles (Kaja y Olson, 1982), y la inseminación artificial con semen de toros positivos al VLB no ha sido asociada con la infección (Monke, 1986). Por lo tanto, la detección del VLB en semen es probablemente debido a la contaminación del esmegma con linfocitos que contienen al virus (Benitez et al., 2019). El uso de toros para monta natural está asociado con una mayor prevalencia del VLB en hatos lecheros (Erskine et al., 2012). El servicio natural puede facilitar la transmisión del VLB por el trauma del pene, vulva y vagina durante el acto físico de la copulación, lo cual puede conducir a la transferencia de sangre. También se conoce que las secreciones prepuciales (esmegma) contienen glóbulos blancos y podrían servir como una fuente de transmisión del VLB durante la copulación (Cobo et al., 2011). Alternativamente, la transmisión del VLB también puede ocurrir vía la transferencia de semen durante la copulación. La mayoría de los estudios en este tema no reportan evidencia del VLB en semen (Monke, 1986); sin embargo, un solo estudio reportó la presencia de provirus del VLB, según lo determinado por PCR, en el semen de bovinos seropositivos (Asadpour y Jafari, 2012). Recientemente se encontró que el ADN del provirus del VLB fue detectado en el esmegma de 7.4% (4/54) de toros infectados con el VLB. El número de copias provirales del VLB en el esmegma fue desde 4.50-618.78 copias/105 células. El provirus del VLB no fue detectado en las muestras de semen. (Ruggiero, 2019).

2.1.5. Formas de presentación de la enfermedad

Esta enfermedad se caracteriza por tener tres estadios o formas de presentación, una seropositividad asintomática, una fase de linfocitosis persistente y una fase tumoral o linfosarcoma (Bartlett et al., 2013).

El desarrollo de linfoma/linfosarcoma, a pesar de ser la primera secuela reconocida del virus, solamente ocurre en un pequeño porcentaje ($\leq 5\%$) de bovinos infectados (Bendixen, 1963; Arévalo et al., 2018). A pesar de este hecho, los tumores linfomatosos son la razón más

común de la condena de la carcasa de vacas lecheras al beneficio en USA (White y Moore, 2009), representando una carga económica para los productores (Pelzer, 1997; Ott et al., 2003; Rhodes et al., 2003).

Inicialmente fue propuesta una etapa subclínica de la enfermedad por los veterinarios europeos quienes observaron una asociación entre los hatos con múltiples tumores y los hatos con una gran cantidad de bovinos con un elevado conteo de linfocitos (linfocitosis) (Marshak et al., 1963). Los datos experimentales han confirmado esto y ahora es reconocido que aproximadamente 30% de los bovinos infectados desarrollarán persistentemente elevados conteos de linfocitos (Lewin, 1989; Kabeya et al., 2001). Hasta 70% experimentan una expansión en la población de células B, incrementando la proporción de células B/T, y algunas veces resultando en una inversión de la proporción de células B/T (Lewin et al., 1988).

La linfocitosis parece ser un marcador del compromiso inmune (Trainin et al., 1996), no es un predictivo de la oncogénesis, debido a que no todos los bovinos linfomatosos tienen linfocitosis (Lewin, 1989). En un reporte sobre 112 casos de linfoma bovino por Burton et al. (2010), solamente 25% tenían linfocitosis. Sin embargo, Lewin (1989) reportó que los bovinos con una proporción invertida de células B/T proporcionaron la población de fondo para los animales que desarrollaron tumores.

Según lo mencionado anteriormente, la genética es un área de enfoque para comprender la susceptibilidad y resistencia a la infección, perfiles de la enfermedad y desarrollo del tumor. Los alelos BoLA, específicamente, han sido asociados variadamente con un riesgo incrementado o disminuido para linfocitosis (Lewin y Bernoco, 1986) y linfoma (Aida, 2001).

La investigación de la integración del provirus del VLB dentro del genoma de la célula hospedera indica que el VLB es capaz de unirse en múltiples sitios y que pueden integrar múltiples copias del provirus dentro de una sola célula (Onuma et al., 1982). Pruebas PCR

cuantitativas más recientes proporcionan más información para permitir la determinación de la carga proviral, generalmente definida como el número de copias de provirus. Además de mejorar la sensibilidad de las pruebas serológicas (Klintevall et al., 1994), varios autores han propuesto utilizar la determinación de la carga proviral como una medida de la eficiencia de la transmisión (Gutiérrez et al., 2011; Rodríguez et al., 2011). Esta metodología es utilizada comúnmente para monitorear el riesgo de transmisión para humanos infectados con el HTLV-1 (Percher et al., 2016). Ohno et al. (2015) reportaron una fuerte correlación ($r = 0.855$) entre la alta carga del VLB y las cantidades de linfocitos en bovinos lecheros, y estudios previos han demostrado que los bovinos con altos conteos de linfocitos son más eficientes para transmitir el VLB (Mammerickx et al., 1987).

Experimentalmente, Molloy et al. (1994) fueron capaces de disminuir la transmisión de la infección del VLB descartando selectivamente vacas en base a la expresión del antígeno viral, que ellos asociaron con la linfocitosis persistente. Más recientemente, Gutiérrez et al. (2014b) reportaron una incrementada transmisión periparto del VLB en bovinos con alta carga viral, y otros investigadores han demostrado que las vacas con baja carga representan un bajo riesgo de transmisión a sus compañeras de hato susceptibles (Juliarena et al., 2016).

2.1.5. Efectos en la salud animal y salud humana

a) **Efectos en la salud animal.** Emanuelson et al. (1992), encontraron una significativa correlación positiva entre la infección por VLB y la incidencia de mastitis, problemas de pezuña, gastroenteritis y bronquitis en los rebaños lecheros. Se ha demostrado que la infección con el VLB produce una función inmune anormal (Frie y Coussens, 2015). El VLB inserta ADN proviral en el genoma de la célula huésped, principalmente linfocitos B, alterando progresivamente la maduración celular y la función para eventualmente interrumpir el sistema inmunitario del huésped (Frie et al., 2016).

Esta disfunción inmune facilita el desarrollo de linfosarcomas y linfocitosis, así como la reducción de la producción lechera (Ott et al., 2003; Erskine et al., 2012; Bartlett et al., 2014). Se ha encontrado que disminuye la calidad de la leche e incrementa el número de células somáticas en leche (Yang et al., 2016). Así también, diversos estudios sostienen que disminuye la longevidad de las vacas infectadas (Bartlett et al., 2013; Nekouei et al., 2015), esto debido a que las vacas seropositivas presentan más problemas reproductivos y tienen mayor riesgo de descarte prematuro en comparación con las seronegativas (Romero et al., 2015). La LEB es considerada una amenaza silenciosa que afecta la respuesta inmune, incrementando los casos de mastitis clínicas, neumonías y otras enfermedades infecciosas (Emanuelson et al., 1992; Trainin et al., 1996; Erskine et al., 2011; Frie y Coussens, 2015; Yang et al., 2016).

Se ha demostrado que la infección con el VLB produce una función inmune anormal (Frie y Coussens, 2015). El virus infecta los linfocitos B (Schwartz et al., 1994) y provoca una expansión policlonal benigna de éstos durante la linfocitosis persistente (Gillet et al., 2013). Esto conlleva a un funcionamiento anormal de los linfocitos B, como también de los linfocitos T, los monocitos, la producción diferencial de citoquinas, la expresión del receptor superficial y las capacidades proliferativas y apoptóticas (Frie y Coussens, 2015). Así también, se ha encontrado que las concentraciones totales de IgA en la leche y saliva de vacas seropositivas al VLB son menores que en las vacas seronegativas con linfocitosis, lo cual concuerda con el creciente consenso de que este virus altera el sistema inmunológico y podría disminuir las defensas a nivel de mucosas (Ruggiero, 2019).

b) **Efectos en la salud animal.** En los años 70, cuando Canadá y USA acordaron no controlar la diseminación del VLB debido a la carencia de evidencia sobre su impacto sobre la salud y rentabilidad, toda la evidencia disponible sugería que el VLB no era un riesgo para la salud humana. Más tarde, fue demostrado que el VLB prolifera en células cultivadas de

tejido humano (Buehring et al., 2003) y desencadena la producción de anticuerpos contra el VLB (Buehring et al., 2001).

Con respecto a su impacto zoonótico, en los últimos años se han presentado alarmantes descubrimientos. En el año 2013, un grupo de investigadores encontraron genes del VLB en tumores mamarios humanos (Mesa et al., 2013). Consecuentemente, Buehring et al. (2014) en una segunda investigación más profunda confirmaron la presencia del VLB en tejidos humanos provenientes de tumores mamarios. Finalmente, este último grupo de investigación encontró que el 59% de muestras de cáncer mamario de mujeres tenían la presencia de ADN del VLB, mientras que sólo 29% de muestras sin cáncer mamario mostró exposición al VLB (Buehring et al., 2015). Demostrándose con esto que el VLB es transmisible a los seres humanos y que las probabilidades de tener cáncer de mama cuando un ser humano presenta el VLB es 3,1 veces mayor que cuando el virus está ausente (Buehring et al., 2015). Sin embargo, los resultados son conflictivos con relación a si estos genes son hallados más frecuentemente en tejidos cancerosos o no cancerosos (Mesa et al., 2013). El consenso con relación al potencial zoonótico del VLB ahora es menos claro que lo era hace décadas, y este interés de salud pública claramente impacta la decisión con relación a si la transmisión del VLB debe ser restringida. Los efectos de la leche infectada con el VLB sobre la salud humana no han sido realizados y necesitan una cuidadosa consideración.

2.1.6. Impacto en los sistemas de producción

Definir el impacto económico real del VLB es desafiante y probablemente subreportado debido a costos desconocidos y efectos subclínicos no reconocidos (Pelzer, 1997). Se ha estimado que los costos de la condena de la carcasa debido a linfosarcomas asociados a la infección por el VLB están sobre los \$400 (Rhodes et al., 2003).

Recientemente, nuestro grupo demostró que los bovinos lecheros infectados con el VLB en hatos de Michigan (n =3849) tienen una menor supervivencia según lo comparado

a sus compañeras de hato no infectadas (Bartlett et al., 2013). Fue 23% más probable que los bovinos infectados sean descartados en un período de monitoreo de 19 meses. Fue 40% más probable que las vacas con los niveles más altos de anticuerpos al VLB en leche sean descartadas que sus compañeras de hato negativas. Mientras que los estudios previos mostraron una asociación entre el VLB y la disminución de la longevidad (Thurmond et al., 1985; Bartlett et al., 2013), otros no hallaron esta relación (Rhodes et al., 2003). Un estudio canadiense mostró una tendencia de que los bovinos lecheros mayores de 3.5 años positivos al ELISA son descartados a una mayor tasa que los bovinos negativos al ELISA (Jacobs et al., 1995).

Los efectos subclínicos (es decir, no tumorales) del VLB son variados, pero han sido reportadas consistentemente altas tasas de descarte en bovinos infectados con el VLB (Trainin et al., 1996; Bartlett et al., 2013). La alterada respuesta inmune puede ayudar a explicar esta tendencia (Frie y Coussens, 2015) tal como los recientes reportes de una disminuida respuesta a la vacunación en los bovinos infectados con el VLB (Erskine et al., 2011; Frie et al., 2016). Trainin et al. (1996) también observaron disminuidas respuestas humorales en animales infectados, incluyendo el fracaso para eliminar infecciones por *Trichophyton*, y Emanuelson et al. (1992) hallaron que la infección con el VLB estaba asociada con la incidencia de mastitis.

Diversos autores consideran que la infección del VLB es una amenaza importante y silenciosa que afecta la respuesta inmune del ganado seropositivo (Emanuelson et al., 1992; Erskine et al., 2011; Trainin et al., 1996). Erskine, et al. (2011) demostraron que los bovinos infectados con VLB produjeron menos anticuerpos en respuesta a la vacuna J5 en comparación con los animales no infectados.

El impacto económico de la enfermedad se sustenta en investigaciones recientes que sostienen que la infección del VLB afecta negativamente a la producción lechera,

disminuyendo 95 litros por vaca al año por cada incremento de 10% de prevalencia dentro del hato (Bartlett et al., 2014). Pelzer (1997), encontró un efecto negativo de la infección del VLB sobre la producción láctea en bovinos lecheros y puede resultar en el descarte prematuro de vacas (Da et al., 1993). Varios reportes estiman que los efectos económicos son de US\$1500 a US\$5000 por vaca genéticamente valiosa, US\$2500 hasta US\$10,000 por 100 vacas lecheras/año, y sobre US\$400 por caso de LEB (Rhodes et al., 2003), US\$85 a US\$250 millones (para los productores lecheros de USA; Ott et al., 2003), y frecuentemente dependen de factores inciertos tales como la presión del mercado (Losinger, 2006) y la prevalencia a nivel del hato (Rhodes et al., 2003).

La evidencia sobre un efecto perjudicial del VLB sobre la salud humana, puede llegar a ser un obstáculo mayor para el futuro del mercado de exportación lechero y de carne. Por ejemplo, las exportaciones de los productores lecheros y de carne son las principales contribuyentes para la economía de USA, explicando en 12% de todas las exportaciones de productos agrícolas (Klobuchar, 2013). Las restricciones a la importación en bovinos y productos bovinos en USA son guiadas parcialmente por un deseo de que los países sin VLB permanezcan libres de la enfermedad, pero los importadores preocupados con los asuntos de salud pública y bienestar animal (reales o imaginarios) pueden preferir comprar productos lecheros de uno de los 21 países que han erradicado el VLB (EFSA AHAW Panel, 2015).

Por otro lado, las vacas con potencial genético alto productivo también tienen mayor susceptibilidad genética al VLB según lo reportado por Wu et al. (1989), por lo tanto, seleccionar vacas con una disminuida susceptibilidad genética al VLB puede tener efectos negativos sobre la producción. Siendo necesario la considerar cuidadosa los programas de selección reproductiva y sus potenciales consecuencias a largo plazo sobre la industria láctea (Rauw et al., 1998).

2.1.7. Mecanismos de control y erradicación

La mejor manera de erradicar la LEB es mediante un programa de detección y sacrificio, es decir identifico a los animales positivos al virus y los elimino del establo. Estos programas solo son factibles cuando las prevalencias son bajas. Sin embargo, cuando la prevalencia es elevada y el estado no subvenciona al ganadero es necesario utilizar un programa de detección y segregación (Rodríguez et al., 2011). La selección de animales a eliminarse o segregarse depende mucho de los factores de riesgo y las vías de transmisión.

a) *Identificación de animales seropositivos.* En países de baja prevalencia se puede realizar la estrategia de la detección de animales seropositivos al virus y su sacrificio (Batho et al., 2008). En algunos casos, el descarte de todos los bovinos serológicamente positivos no es deseable o puede no ser económicamente factible. La segregación de animales positivos al VLB hasta que ellos puedan ser eliminados y reemplazados con bovinos libres del VLB ha sido exitosamente utilizada para eliminar la prevalencia del VLB a nivel del hato (Shettigara et al., 1989). Sin embargo, es necesaria una estricta adherencia a los protocolos de manejo para prevenir el contacto entre los bovinos positivos al VLB y los susceptibles – incluyendo la desinfección o descarte de equipos y suministros utilizados en los animales positivos al BVL – y deben ser mantenidos por largos períodos de tiempo, ya que los períodos previos a la erradicación de la enfermedad rápidamente resultan en nuevas infecciones (Johnson et al., 1985; Shettigara et al., 1989).

b) *Identificación de animales con linfocitosis persistente.* La implementación del análisis hematológico fue empleada hace muchas décadas en Dinamarca en 1959 (Bendixen, 1963). Brevemente, a la identificación de un animal afectado (linfoma), el hato sería evaluado para leucocitosis. Si eran identificados animales con linfocitosis, el hato sería puesto en cuarentena y estas vacas serían descartadas. Aunque esto eliminó nuevos casos de tumores en un período de cinco años, las vacas continuaron desarrollando leucosis y, por lo tanto, tales programas fueron considerados inadecuados para erradicar la enfermedad (Bendixen, 1963). El

descubrimiento de una población de bovinos con conteo normal de linfocitos y una alta carga proviral (Juliarena et al., 2007) al menos puede explicar parcialmente por qué este enfoque fracasó. Cuando las pruebas serológicas llegaron a estar disponibles, la incrementada sensibilidad hizo a las pruebas y el beneficio de animales individuales más eficaces (Batho et al., 2008).

El control de la diseminación del VLB utilizando las estrategias previamente mencionadas ha disminuido exitosamente la prevalencia del VLB en hatos con alta prevalencia (Sprecher et al., 1991), pero no siempre ha sido exitoso en otros casos (Kobayashi et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011).

La evidencia apoya una correlación entre el nivel de infectividad del VLB y la probabilidad de un animal para infectar animales nunca expuestos (Benitez et al., 2019). Mammerickx et al. (1987) reportaron que son suficientes poco menos de 200 linfocitos provenientes de un donador bovino seropositivo al VLB con linfocitosis persistente para inducir la infección por el VLB en ovinos, mientras que 20,000 linfocitos de un bovino seropositivo al VLB sin linfocitosis persistente no causa ninguna infección después de inocularlos a los ovinos (Mammerickx et al., 1987).

El mismo estudio realizado por Benitez et al. (2019), reportó que para lograr la infección, fue requerido 1 ml de sangre de una vaca sin linfocitosis persistente para inducir la infección en comparación con solamente 0.1 μ l de sangre proveniente de un animal con linfocitosis persistente (Mammerickx et al., 1987). Esto es parcialmente explicado por el hecho de que 25-40% de los leucocitos totales de animales con linfocitosis persistente incorporan las secuencias provirales del VLB cuando se comparan con animales sin linfocitosis persistente, mientras que menos del 5% de los leucocitos totales llevan el provirus (Kettmann et al., 1980).

En bovinos, las células B CD5+, el blanco principal para el VLB (Meiron et al., 1985), corresponden a aproximadamente 90.5% de las células B de los animales con linfocitosis persistente, mientras que solamente el 31% de células B de los bovinos no infectados expresarán típicamente CD5 (Stone et al., 1995). Además de esto, los bovinos con linfocitosis persistente tienen una síntesis disminuida de citoquinas que son una parte importante de la respuesta inmune al VLB en comparación con los bovinos sin linfocitosis persistente (Trainin et al., 1996). Los bovinos con linfocitosis persistente también incrementan la expresión del receptor de superficie de la envoltura CTLA-4 durante las capacidades proliferativa y apoptótica dentro de las células infectadas, mientras que ocurre lo opuesto en los bovinos sin linfocitosis persistente (Trainin et al., 1996).

Estos hallazgos indican que los bovinos con linfocitosis persistente tienen un alto número de células infectadas en comparación con los bovinos sin linfocitosis persistente, representando así un mayor riesgo de transmitir el VLB con cantidades menores de transferencia de fluido infectado (Johnson et al., 1985). Por esta razón, el descarte de los bovinos seropositivos al VLB y con linfocitosis persistente es una de las potenciales prácticas para disminuir la diseminación del VLB dentro de los hatos.

c) Identificación de animales con alta carga viral. Las nuevas técnicas de detección con PCR, particularmente la cuantificación de la carga proviral, abren nuevas posibilidades para mejorar los programas de control del VLB, y continuarán ganando importancia para el uso diagnóstico mientras continúe el desarrollo de la vacuna (Barez et al., 2015).

Los enfoques mixtos han demostrado éxito particularmente con la adición de la estricta segregación de los animales positivos al VLB y el cumplimiento de protocolos de manejo diseñados para reducir la transmisión dentro del hato (Shettigara et al., 1989; Sprecher et al., 1991), aunque estos esfuerzos requieren una inversión financiera (Pelzer, 1997) así como

administradores de hato comprometidos (Johnson et al., 1985) y son más exitosos con la implementación a nivel nacional (Acaite et al., 2007).

Entre los protocolos de manejo diseñados para reducir la transmisión del virus dentro del hato, tenemos los siguientes:

a) **Administración de calostro y leche libre del virus a los terneros.** La presencia del virus en leche y el calostro ha sido demostrada desde los años setenta (Burny et al., 1978; Miller y Van Der Maaten, 1979). Se ha encontrado que 17 de 24 vacas infectadas naturalmente con el VLB presentan carga proviral en su leche, demostrándose que el consumo de leche no pasteurizada es riesgo de infección para los terneros y humanos (Ferrer et al., 1981). Por lo tanto, es necesario implementar un plan estratégico de control y erradicación de la Leucosis Enzoótica Bovina en el Perú. La mejor manera de erradicar la Leucosis Enzoótica Bovina es mediante un programa de detección y sacrificio, sin embargo, cuando la prevalencia es demasiado elevada y cuando el estado no subvenciona al ganadero es necesario utilizar un programa de detección y segregación (Rodríguez et al., 2011), también denominado hato paralelo.

Un punto crítico de la implementación de un programa de detección y segregación es el manejo del calostro y la leche. Con respecto esto, se ha encontrado que los terneros nacidos de vacas seropositivas, que recibieron calostro de sus madres y que fueron alimentados con leche de vacas seronegativas, sólo el 8.7% se volvieron seropositivos. Mientras que de los terneros nacidos de las vacas seropositivas al VLB, que recibieron calostro de sus madres y que se alimentaron con leche de vacas seropositivas, el 16,7% se volvieron seropositivos (Romero et al., 1983). Lo que comprueba que no sólo el calostro es una fuente de transmisión, sino que también la leche de vacas seropositivas es una fuente importante de transmisión. Por otra parte, de los terneros nacidos de vacas seronegativas, que recibieron calostro de sus madres y que fueron alimentados con leche de vacas seropositivas se

convirtieron en positivos el 27% (Romero et al., 1983). Esto nos muestra que si bien, por la presencia del VLB, el calostro es una fuente de transmisión, la presencia de inmunoglobulinas tiene un efecto protector (Lassauzet et al., 1989).

Por otro lado, un estudio epidemiológico encontró que VLB se encuentra más difundido en hatos lecheros que en hatos de carne (Murakami et al., 2011). Esta diferencia probablemente se debe a que los hatos lecheros alimentan a sus terneros con leche de tanque y leche de descarte, mezclando la leche de madres positivas y negativas; mientras que los terneros del ganado de carne suelen ser alimentados sólo con la leche de su madre (Dimmock et al., 1991). Muchos programas de control de enfermedades infecciosas requieren calostro y leche libre de *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella spp*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus*, virus de la diarrea bovina y VLB (McGuirk y Collins, 2004). Si bien los tratamientos físicos como la pasteurización (Baumgartener et al., 1976; Johnson et al., 2007) y congelación (Kanno et al., 2014) han demostrado ser efectivos para conservar concentraciones ideales de IgG y existe evidencia de que podrían evitar la transmisión del virus.

b) **Prevención de la transferencia sanguínea mediante materiales e instrumental.** Otros programas de control han sido desarrollados exclusivamente en base a prácticas de manejo aparte de la segregación, tales como el tratamiento del calostro/leche y la prevención de la transferencia sanguínea vía el equipo de descorne, agujas y guantes. Aunque algunos de estos programas han disminuido la prevalencia del VLB en hatos con una alta prevalencia inicial (Sprecher et al., 1991), no han sido universalmente exitosos (Gutiérrez et al., 2011).

2.1.8. Tratamientos para eliminar el VLB de la leche y el calostro

El manejo de la leche y el calostro en la alimentación de los terneros es un punto crítico de la implementación de un programa de detección y segregación. La implementación

de tratamientos que permitan la eliminación del VLB presente en la leche y el calostro es necesaria (McGuirk y Collins, 2004). Existen estudios que evidencian que los tratamientos de pasteurización y congelación aplicados a la leche materna de mujeres infectadas por citomegalovirus y virus linfotrópico humano (Ando et al., 2004; Forsgren, 2004) son capaces de eliminar las posibilidades de infección de neonatos que consumen la leche de sus madres.

En un estudio realizado por Baumgartener et al. (1976) se mostró evidencia que calentar la leche a altas temperaturas por cortos periodos de tiempo elimina el VLB. Por otro lado, Johnson et al. (2007) demostró que la pasteurización del calostro permite mantener una adecuada concentración de inmunoglobulinas y mantiene las propiedades nutricionales del calostro. Así mismo, se ha reportado que la congelación del calostro permite la inactivación del virus de leucosis bovina en el calostro (Kanno et al., 2014), sin embargo, este estudio no determinó si existía diferencia estadística entre los grupos. Hoy en día, la pasteurización o congelación de la leche y calostro vuelven a ser importantes para alimentar de manera segura a los terneros lactantes.

Las variables críticas para el proceso de pasteurización incluyen a la temperatura, el tiempo y la composición del producto (Gröner et al., 2018). Los tratamientos que emplean el calor para inactivar virus desestabilizan térmicamente las interacciones intermoleculares entre las proteínas de la cápside y la integridad de la envoltura del virus. Esta desestabilización térmica produce una pérdida de la integridad estructural de la cápside del virión y la pérdida de infectividad de los virus (Boschetti et al., 2004). Las variables consideradas en el proceso de pasteurización fueron una temperatura de 60°C, durante un tiempo de 30 minutos. Estas variables críticas deben ser estrictamente controladas, monitoreadas y verificadas por prácticas de control de calidad durante el proceso de pasteurización a gran escala (Gröner et al., 2018). La pasteurización de la leche y el calostro es una estrategia factible para garantizar la inactivación del VLB (Baumgartener et al., 1976). Gröner et al. (2018) demostraron que la

pasteurización es un método efectivo para inactivar una amplia gama de virus envueltos y no envueltos. Asimismo, la pasteurización relámpago también tiene el beneficio adicional de ayudar a limitar la propagación de la enfermedad de Johne y otros patógenos (Stabel y Lambertz, 2004).

Todos estos hallazgos sugieren que realizar tratamientos tanto para el calostro como para la leche de tanque antes de administrarlos a los terneros podría ayudar a prevenir la infección temprana por VLB. Estudios realizados por Roberts et al. (1983) mostraron que el procedimiento de pasteurización de la leche a 50° C durante 70 segundos inactiva a los linfocitos infectados con VLB. Los resultados del trabajo de Chung et al., (1986) demuestran que el tratamiento térmico de la leche a 63 °C durante 30 minutos o una pasteurización relámpago, a 72-73 ° C durante 15 a 20 segundos, destruye la infectividad de los linfocitos infectados con VLB y del VLB libre en la leche. Así también, existen estudios en humanos que demuestran que la pasteurización también destruye de manera confiable al citomegalovirus pero desafortunadamente destruye algunos de los componentes nutricionales e inmunológicos (Forsgren, 2004).

Maschmann et al. (2006) reportan que la congelación de la leche materna evita la transmisión de citomegalovirus en humanos por lo que el proceso logra inactivar el citomegalovirus presente en la leche materna humana. Asimismo, Forsgren (2004) encontró que la congelación de la leche a -20 ° C durante 12 horas sólo redujo la infectividad en un 90%, mientras que la congelación durante 72 horas redujo la infectividad al 100%. Esto nos indica que la congelación por un periodo reducido de horas no es suficiente para inactivar a los virus.

En este sentido, un estudio encontró que el procesamiento de congelación-descongelación puede eliminar la infectividad del HTLV-1 de la leche materna, y que los portadores de este virus podrían administrar a sus bebés con leche materna congelada-

descongelada como una forma de prevenir la infección del HTLV-1 (Ando et al., 2004). Estos resultados se pueden explicar, ya que la congelación de las células produce la formación de hielo intracelular, lo que ocasiona que pierdan su potencial de membrana cuando un cristal de hielo rompa la membrana, por lo que no sobreviven al proceso de congelación (Shi et al., 2017). Normalmente los virus sobreviven al proceso de congelación, sin embargo, los virus intracelulares, como el VLB, que dependen de la célula que lo alberga, y si la célula no sobrevive durante el proceso de congelación, el virus no será capaz de infectar a otra célula.

La leche y el calostro del ganado infectado con el VLB contienen células infectadas con este virus que pueden causar infección en terneros neonatales de madres no infectadas, sin embargo, los anticuerpos presentes en el calostro protegen al ternero contra la infección neonatal (Kanno et al., 2014).

Según lo reportado por Hopkins y DiGiacomo (1997), las tasas de transmisión de VLB en terneros de 6 a 12 meses de edad potencialmente atribuible a la transmisión por leche o calostro infectada con el VLB es entre 6% y 16%. Por tanto, la población de terneros libres del VLB es infectada cuando reciben calostro y leche infectada, reduciendo las posibilidades de crear un hato paralelo libre de infección a partir de un hato infectado. La implementación del procesamiento de la leche y el calostro que reciben los terneros podría reducir la prevalencia de infección del VLB en los establos que implementen un hato paralelo como medida de control y eliminación del VLB.

III. Método

3.1. Tipo de investigación

Esta tesis tiene un enfoque cuantitativo y un diseño experimental propiamente dicho. El diseño experimental fue un diseño aleatorio simple.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo se realizó en la Clínica de Animales Mayores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante los meses de marzo a diciembre del 2018.

3.3. Variables

3.3.1. Variable independiente

Tratamiento de congelación en los linfocitos proveniente de vacas con alta carga proviral del VLB, el cual fue inoculado intraperitonealmente a los ovinos con los que se realizará el bioensayo. Es una variable nominal.

3.3.2. Variable dependiente

Presencia o ausencia de seroconversión al VLB de los ovinos que fueron inoculados intraperitonealmente con los inóculos de linfocitos proveniente de vacas con alta carga proviral del VLB. Es una variable binomial.

3.4. Población y muestra

Se trabajó con 12 ovinos de 2 a 3 meses de edad seronegativos al virus de leucosis bovina, los cuales fueron distribuidos aleatoria y equitativamente en los tres grupos experimentales: grupo control, congelación 12 horas, congelación 36 horas.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Diagnóstico de seropositividad al virus de leucosis bovina

El diagnóstico se realizó empleando el kit comercial INGEZIM BLV COMPAC 2.0 que es un inmunoensayo enzimático de competición basado en la utilización de anticuerpos

monoclonales específicos de la gp51 del VLB. Este kit diagnóstico mantiene el nivel de sensibilidad (100%) y especificidad (100%) requerido por la OIE. El proceso de evaluación se realizó según las indicaciones de la casa comercial (INGEZIM BLV COMPAC 2.0).

3.5.2. Determinación de alta carga proviral

La determinación de la alta carga proviral se realizó de manera indirecta mediante el diagnóstico de la linfocitosis persistente (Juliarena et al., 2007). El diagnóstico de linfocitosis persistente fue positivo cuando los recuentos de linfocitos superen los 10.000/ μ l y los recuentos de leucocitos superen los 15.000 / μ l por dos veces consecutivas con un intervalo de 72 días (Thurmond et al., 1990).

3.6. Procedimientos

3.6.1. Obtención de muestras de sangre

Se colectaron dos muestras de sangre por animal, las cuales fueron destinadas para realizar la prueba serológica y la evaluación del hemograma. La obtención de la muestra se realizó mediante la punción de la vena coccígea media en el caso de los bovinos y la vena yugular en el caso de los ovinos. Se empleó una aguja Vacutainer®, 20 mm x 1' y se conectó a un tubo colector sin anticoagulante (BD Vacutainer®) y/o a un tubo colector con EDTA (BD Vacutainer®) para tomar la muestra de suero y sangre entera, respectivamente. Una vez obtenidas las muestras, se rotularon los tubos considerando: identificación del animal y fecha de muestreo.

Los tubos sin anticoagulante se pusieron en reposo (en ángulo inclinado de 45°) por aproximadamente 30 minutos para la formación del coágulo. Una vez pasado el tiempo se centrifugaron a 2000 g por 5 minutos. Posteriormente se colectó el suero con la pipeta Pasteur y se almacenó en crioviales a una temperatura de inferior 20°C.

3.6.2. Determinación de alta carga proviral en las vacas

La determinación de la alta carga proviral se realizó de manera indirecta mediante el diagnóstico de la linfocitosis persistente. El cual fue positivo cuando los recuentos de linfocitos superen los 10.000/ μ l y los recuentos de leucocitos superen los 15.000 / μ l por dos veces consecutivas con un intervalo de 72 días (Thurmond et al., 1990).

3.6.3. Procesamiento de los linfocitos

Con la finalidad de obtener la muestra, la sangre de cuatro vacas con linfocitosis persistente fue colectada. Se colectó 450 mL de sangre de cada vaca. Las muestras fueron rotuladas, envasadas y transportadas adecuadamente a temperatura de refrigeración a 2°C. Posteriormente, la muestra fue dividida en tres partes iguales para luego ser sometidas a los diferentes tratamientos.

a. Control. 500 mL de sangre fue refrigerado a 2°C hasta su posterior centrifugación para la obtención del inóculo correspondiente.

b. Congelación durante 12 horas. 500 mL de sangre fue congelada a menos 23°C y mantenido en congelación durante toda una noche, para su posterior descongelación. Una vez a temperatura ambiente se realizó la centrifugación para la obtención del inóculo correspondiente (Kanno et al., 2014).

c. Congelación durante 36 horas. 500 mL de sangre fue congelada a menos 23°C y mantenido en congelación durante 36 horas, para su posterior descongelación. Una vez a temperatura ambiente se realizó la centrifugación para la obtención del inóculo correspondiente (Kanno et al., 2014).

3.6.4. Obtención del inóculo

Para la obtención del inóculo, la muestra procesada fue centrifugada a 2800 g durante 15 minutos para recuperar el suero y leucocitos. Después, el suero y leucocitos fue centrifugada a 2800 g durante 15 min adicionales. El sedimento fue mezclado con buffer

fosfato salino (PBS) y fue sometido a centrifugación a 2800 g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue diluido con PBS hasta completar un volumen de 10 mL (Kanno et al., 2014). Fueron inoculados 2 ovinos con cada inóculo obtenido.

3.6.5. Bioensayo en ovejas

Estudios anteriores han demostrado que los ovinos proporcionan un medio alternativo para estudiar la transmisión del VLB (Miller y Van Der Maaten, 1979; Ferrer et al., 1981; Kenyon et al., 1981; Murakami et al., 2011; Kanno et al., 2014). Se ha demostrado que esta especie es altamente susceptible a la infección experimental por el VLB y que no existe transmisión horizontal de la infección entre ovinos (Kenyon et al., 1981). Estudios previos han utilizado de manera exitosa el bioensayo ovino como un método para estudiar la transmisión del VLB desde las secreciones y excreciones de vacas naturalmente infectadas con el virus (Miller y Van Der Maaten, 1979; Ferrer et al., 1981; Kanno et al., 2014).

Al iniciar el experimento, los ovinos fueron sometidos a un examen clínico completo con la finalidad de obtener las medidas de los ganglios linfáticos superficiales y se comprobó la seronegatividad de los mismos al VLB. Una vez obtenida y verificada esta información, los ovinos fueron inoculados por vía intraperitoneal con el inóculo correspondiente a cada grupo experimental. Posteriormente se tomaron muestras semanales de sangre para determinar la seropositividad al antígeno gp51 del VLB. Las muestras fueron colectadas durante 10 semanas.

3.7. Análisis de datos

Para el análisis estadístico se empleó el software IBM SPSS Statistics 22. Se realizó una prueba de asociación con la prueba exacta de Fisher. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia del 5%.

3.8. Consideraciones éticas

La presente investigación fue aprobada por el comité de ética y bienestar animal de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos, según la constancia de autorización ética N° 2019-5. Los ensayos respetaron los principios directrices internacionales para la investigación biomédica que implica el uso de animales aprobado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Ginebra, 1985 (CIOMS). La presente investigación tiene como finalidad proteger la salud y bienestar del hombre y de los animales y tiene la necesidad de recurrir a la experimentación en animales vivos, no siendo posible su simulación in vitro.

IV. Resultados

4.1. Efecto de la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral como preventivo de la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino

Con la finalidad de evaluar el efecto de la congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral como preventivo de la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino se compararon los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos presentados anteriormente.

Ho: La congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral no previene la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino.

Ha: La congelación de los linfocitos provenientes de vacas con alta carga proviral previene la transmisión del virus de la leucosis bovina en un bioensayo ovino.

Los resultados generales se presentan en la tabla 4 y demuestran que, bajo las condiciones específicas e implementadas en cada proceso, la congelación es un método que permiten la inactivación del VLB de forma altamente efectiva. Según los resultados del presente trabajo, el proceso de pasteurización y congelación por 36 horas son eficientes para inactivar el virus de leucosis bovina, mientras que el proceso de congelación por 12 horas no logra inactivar el virus. En la tabla 4, se puede observar que durante la décima semana post inoculación, el 100% de los animales del grupo control y el 75% de los animales del grupo congelación por 12 horas fueron seropositivos al VLB, mientras que ningún animal fue seropositivo (0%) al VLB en el grupo congelación por 36 horas. También se puede observar que los animales del grupo control mostraron positividad a partir de la primera semana post

inoculación y que los animales del grupo congelación por 12 horas mostraron positividad a partir de la tercera semana post inoculación.

Tabla 1.

Resultados semanales a la prueba de ELISA de las ovejas que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo proveniente de leche con células infectadas por el virus de leucosis bovina (VLB) previamente tratada con diferentes métodos de inactivación

Semana	Control	Congelación 12 h	Congelación 36 h
	Pos/n (% Pos)	Pos/n (% Pos)	Pos/n (% Pos)
0	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a
1	1/4 (25%) ^a	0/4 (0%) ^a	0/4 (0%) ^a
2	4/4 (100%) ^a	0/4 (0%) ^b	0/4 (0%) ^b
3	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
4	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
5	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
6	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
7	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
8	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
9	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b
10	4/4 (100%) ^a	3/4 (75%) ^{ab}	0/4 (0%) ^b

Pos: número de ovinos seropositivos; n: total de ovinos; % Pos: porcentaje de positivos.

Letras (a,b) diferentes indican diferencia estadística significativa entre las filas ($p < 0.05$).

Por lo tanto, los resultados obtenidos con el tratamiento de congelación durante 36 horas rechazan la *H₀* y se puede concluir que el método de congelados durante 36 horas de los linfocitos de vacas con alta carga proviral del VLB previene la seroconversión en los ovinos inoculados. A diferencia de los resultados obtenidos con el tratamiento de congelación durante 12 horas, los cuales no rechazan la *H₀* y no se puede concluir que el método de

congelación durante 12 horas de los linfocitos de vacas con alta carga proviral del VLB prevenga la seroconversión en los ovinos inoculados.

4.2. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina se inocularon cuatro ovinos. Se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina no seroconvierten.

Ha: Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina seroconvierten en un 100%.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5. Como podemos observar, al inicio del experimento, semana 0, los cuatro ovinos seleccionados fueron negativos al VLB. Luego de la inoculación, la semana 1, uno de los ovinos seroconvirtió, sin embargo no se encontró diferencia estadística significativa a la prueba exacta de Fisher entre los resultados de la semana 1 en comparación con la semana 0 ($p=1.00$) y ya a partir de la semana 2, los cuatro ovinos inoculados con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral seroconvirtieron (100%) y se mantuvieron positivos durante las semanas posteriores, encontrándose diferencias estadísticas significativas a la prueba exacta de Fisher entre los resultados de la semana 2 y las siguientes semanas con respecto a la semana 0 ($p=0.03$). Por lo tanto, como los resultados de la prueba exacta de Fisher a partir de la semana 2 fueron menores a 0.05, se rechaza la *Ho* y se concluye que la inoculación con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del VLB produce la seroconversión en los ovinos inoculados.

Tabla 2.

Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB)

OVINO	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6	Sem 7	Sem 8	Sem 9	Sem 10
Control 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positivos	0	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Negativos	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Positivos	0%	25%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sig (Sem x vs. Sem 0)		1.000	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029

Sem: Semana; (+): Número de ovinos positivos al ELISA; (-): Número de ovinos negativos al ELISA; % Pos: Porcentaje de ovinos positivos; n: Número total de ovinos; Sig (Sem x vs. Sem 0): Significancia a la prueba exacta de Fisher al comparar la semana de la columna indica con la semana 0.

4.3. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina se inocularon cuatro ovinos.

Ho: Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina se mantienen negativos y no seroconvierten.

Ha: Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina no se mantienen negativos y seroconvierten.

Tabla 3.

Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB).

OVINO	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6	Sem 7	Sem 8	Sem 9	Sem 10
Cong12-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cong12-2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cong12-3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cong12-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positivos	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3
Negativos	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1
% Positivos	0%	0%	0%	75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%	75%
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sig (Sem n vs. Sem 0)		1.000	1.000	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143

Sem: Semana; Pos: Número de ovinos positivos al ELISA; Neg: Número de ovinos negativos al ELISA; % Pos: Porcentaje de ovinos positivos; n: Número total de ovinos; Sig (Sem x vs. Sem 0): Significancia a la prueba exacta de Fisher al comparar la semana de la columna indica con la semana 0.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6. Como podemos observar, al inicio del experimento, semana 0, los cuatro ovinos seleccionados fueron negativos al VLB. Luego de la inoculación, la semana 3, tres de los ovinos seroconvirtieron (75%) y se mantuvieron positivos durante las semanas posteriores, sin embargo, no se encontró diferencia estadística significativa a la prueba exacta de Fisher entre los resultados de la semana 3 y posteriores en comparación con la semana 0 ($p=0.14$). Por lo tanto, como los resultados de la prueba exacta de Fisher a partir de la semana 1 fueron mayores a 0.05, no se rechaza la H_0 y a pesar de que tres ovinos seroconvirtieron, no se puede concluir que la inoculación con linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del VLB produzca la seroconversión en los ovinos inoculados.

4.4. Seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina.

Con la finalidad de evaluar el porcentaje de seroconversión de ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina se inocularon cuatro ovinos.

H_0 : Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina se mantienen negativos y no seroconvierten.

H_a : Los ovinos infectados experimentalmente con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina no se mantienen negativos y seroconvierten.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7. Como podemos observar, al inicio del experimento, semana 0, los cuatro ovinos seleccionados fueron negativos al VLB. Luego de la inoculación, ninguno de los ovinos seroconvirtió (0%), por lo que no se encontró

diferencia estadística significativa a la prueba exacta de Fisher entre los resultados de la semana 1 y posteriores en comparación con la semana 0 ($p=1.00$). Por lo tanto, como los resultados de la prueba exacta de Fisher a partir de la semana 1 fueron mayores a 0.05, por lo que no se rechaza la H_0 y se puede concluir que la inoculación con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del VLB no produce la seroconversión en los ovinos inoculados.

Tabla 4.

Resultados semanales a la prueba de ELISA de los ovinos que recibieron por vía intraperitoneal un inóculo con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del virus de la leucosis bovina (VLB)

OVINO	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6	Sem 7	Sem 8	Sem 9	Sem 10
Cong36-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cong36-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cong36-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cong36-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positivos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negativos	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
% Positivos	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Sig (Sem n vs. Sem 0)		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Sem: Semana; Pos: Número de ovinos positivos al ELISA; Neg: Número de ovinos negativos al ELISA; % Pos: Porcentaje de ovinos positivos; n: Número total de ovinos; Sig (Sem x vs. Sem 0): Significancia a la prueba exacta de Fisher al comparar la semana de la columna indica con la semana 0.

V. Discusión de resultados

Los resultados de la presente investigación nos muestran que los ovinos del grupo control, animales inoculados con células linfocíticas provenientes de la centrifugación de calostro de vacas con linfocitosis persistente comprobada, seroconvierten positivamente al VLB. La obtención de un 100% de ovinos infectados en el grupo control nos demuestra que la inoculación de ovinos con células linfocíticas del calostro de vacas con linfocitosis persistente es capaz de transmitir la enfermedad, lo cual coincide con los resultados de Kanno et al. (2014) También podemos observar que la seroconversión positiva al VLB, no es inmediata en los ovinos del grupo control. Notándose que incrementa el número de animales positivos en el transcurso de 3 semanas. Esto está relacionado por el largo periodo de incubación propio del VLB (Ruiz et al., 2018).

Así también, la obtención de un 100% de ovinos infectados en el grupo control nos sirve para comprobar que esta especie es ideal para realizar simulaciones de infección con el VLB. Coincidiendo con Ruiz et al. 2018, quienes sustentan el modelo ovino es el más consistente para estudiar la infección del VLB, pues en este modelo ocurre la presentación completa de la enfermedad en un periodo aproximado de 18 meses y la frecuencia de linfocitosis persistente y linfosarcomas es de casi el 100%.

Por otro lado, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la congelación - descongelación de la leche considerando dos tiempos de congelación, pudiéndose encontrar que cuando se compara el grupo control con el grupo congelación por 12 horas, no se encuentra diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), mientras que al comparar el grupo control con el grupo congelación por 36 horas, se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.01$). Este trabajo coincide con lo reportado por Maschmann et al. (2006), quienes reportan que la congelación y descongelación de la leche materna evita la transmisión de citomegalovirus en humanos por lo que el proceso logra inactivar el citomegalovirus presente

en la leche materna humana. Asimismo, estos resultados coinciden con los encontrados con Forsgren (2004), quien encontró que la congelación de la leche a -20°C durante 12 horas sólo redujo la infectividad en un 90%, mientras que la congelación durante 72 horas redujo la infectividad al 100%. Esto nos indica que la congelación por un periodo reducido de horas no es suficiente para inactivar a los virus.

En este sentido, un estudio encontró que el procesamiento de congelación-descongelación puede eliminar la infectividad del HTLV-1 de la leche materna, y que los portadores de este virus podrían administrar a sus bebés con leche materna congelada-descongelada como una manera de evitar la transmisión del HTLV-1 (Ando et al., 2004). Estos resultados se pueden explicar, ya que la congelación de las células produce la formación de hielo intracelular, lo que ocasiona que pierdan su potencial de membrana cuando un cristal de hielo rompa la membrana, por lo que no sobreviven al proceso de congelación (Shi et al., 2017). Normalmente los virus sobreviven al proceso de congelación, sin embargo, los virus intracelulares, como el VLB, que dependen de la célula que lo alberga, y si la célula no sobrevive durante el proceso de congelación, el virus no será capaz de infectar a otra célula.

La leche y el calostro del ganado infectado con el VLB contienen células infectadas con este virus que pueden causar infección en terneros neonatales de madres no infectadas, sin embargo, los anticuerpos presentes en el calostro protegen al ternero contra la infección neonatal (Kanno et al., 2014). El presente estudio demuestra que el proceso de pasteurización y el proceso de congelación por más de 36 horas eliminan la infectividad del VLB, lo cual significa que se deben realizar estos procesos antes de administrar leche y calostro de vacas infectadas a sus crías. Así también, estos procesos eliminan al VLB de la leche destinada para consumo humano.

Según lo reportado por Hopkins y DiGiacomo (1997), las tasas de transmisión de VLB en terneros de 6 a 12 meses de edad potencialmente atribuible a la transmisión por leche o calostro infectada con el VLB es entre 6% y 16%. Por tanto, la población de terneros libres del VLB es infectada cuando reciben calostro y leche infectada, reduciendo las posibilidades de crear un hato paralelo libre de infección a partir de un hato infectado. La implementación del procesamiento de la leche y el calostro que reciben los terneros podría reducir la prevalencia de infección del VLB en los establos que implementen un hato paralelo como medida de control y eliminación del VLB. Asimismo, muchos programas de control de enfermedades infecciosas requieren calostro y leche libre de *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma bovis*, *Staphylococcus aureus*, Virus de la Diarrea Bovina y VLB (McGuirk y Collins, 2004).

VI. Conclusiones

- La inoculación con linfocitos sin congelar de vacas con alta carga proviral del VLB produce la seroconversión en los ovinos inoculados.
- A pesar de que tres ovinos que recibieron linfocitos congelados durante 12 horas de vacas con alta carga proviral del VLB seroconvirtieron, no se puede concluir que la inoculación produzca la seroconversión en los ovinos inoculados.
- La inoculación con linfocitos congelados durante 36 horas de vacas con alta carga proviral del VLB no produce la seroconversión en los ovinos inoculados.
- El método de congelados durante 36 horas de los linfocitos de vacas con alta carga proviral del VLB previene la seroconversión en los ovinos inoculados. A diferencia del método de congelación durante 12 horas de los linfocitos de vacas con alta carga proviral del VLB, el cual no previene la seroconversión en los ovinos inoculados.

VII. Recomendaciones

- El bioensayo ovino para evaluar la transmisión del VLB es un método adecuado para realizar estudios de investigación en esta enfermedad.
- El tiempo de congelación debe ser tomado en cuenta como una variable a controlar cuando se emplee este método con la finalidad de prevenir la transmisión del VLB.
- La congelación por 36 horas o más puede prevenir la transmisión del VLB, por lo cual debe ser tomada en cuenta como una alternativa de control para esta enfermedad.
- Se recomienda realizar futuras investigaciones para evaluar la eficacia en campo de la congelación del calostro y la leche como preventivo de la transmisión del VLB.

VIII. Referencias

- Acaite, J., Tamosiunas, V., Lukauskas, K., Milius, J. y Pieskus, J. (2007). The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Preventive veterinary medicine*, 82(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.05.010>
- Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Marozzi, A., Cavalleri, D., Peri, E., Poli, G., y Ginelli, E. (1993). Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *American journal of veterinary research*, 54(3), 373-378.
- Aida, Y. (2001). Influence of host genetic differences on leukemogenesis induced bovine leukaemia virus. *AIDS Reseach and Human Retroviruses*, 17(Supplement 1), S12.
- Ando, Y., Ekuni, Y., Matsumoto, Y., Nakano, S., Saito, K., Kakimoto, K., Tanigawa, T., Kawa, M., y Toyama, T. (2004). Long-term serological outcome of infantas who received frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-I positive mothers. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 30(6), 436-438. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2004.00227.x>
- Arévalo, I. K., Carrillo, A., Sandoval, R. S., y Ruiz, L. F. (2018). Frecuencia de linfocitosis persistente relacionada al virus de la leucosis bovina en vacas de Lima. En: Ruiz y Sandoval (Eds.) *Memorias del I Congreso Científico de la Sociedad Peruana de Buiatría: VII Jornada Peruana de Buiatría. Perú* (pp 67-68). Lima: Sociedad Peruana de Buiatría.
- Asadpour, R., y Jafari, R. (2012). Detection of bovine leukosis provirus in blood and semen samples of bulls. *Comparative Clinical Pathology*, 21(2), 187-191. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1083-5>
- Barez, P. Y., De Brogniez, A., Carpentier, A., Gazon, H., Gillet, N., Gutiérrez, G., Hamaidia, M., Jacques, J.R., Perike, S., Sriramareddy, S., Renotte, N., Staumont, B., Reichert, M.,

- Trono, K., y Willems, L. (2015). Recent Advances in BLV Research. *Viruses*, 7(11), 6080–6088. doi:10.3390/v7112929.
- Barrera Ancco, M. (2010). *Seroprevalencia de Leucosis Viral Bovina (LVB) en el Valle Viejo del distrito de Moquegua, 2010*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú]. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/665>
- Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., y Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *Journal of dairy science*, 96(3), 1591-1597. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5930>
- Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Zalucha, J., y Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(8), 914-922. <https://doi.org/10.2460/javma.244.8.914>
- Batho, H., Bendixen, H. J., Meyer-Gerbaulet, H. y Westergaard, J. (2008). *The EU Veterinarian: animal health, welfare & veterinary public health developments in Europe since 1957*. Luxemburgo: European Commission.
- Bauermann, F. V., Ridpath, J. F., y Dargatz, D. A. (2017). Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 704- 706. <https://doi.org/10.1177%2F1040638717702183>
- Baumgartener, L., Olson, C., y Onuma, M. (1976). Effect of pasteurization and heat treatment on bovine leukemia virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(11), 1189-1191.
- Bech-Nielsen, S., Piper, C. E., y Ferrer, J. F. (1978). Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects. *American journal of veterinary research*, 39(7), 1089–1092.

- Bendixen, H. J. (1963). Preventive measures in cattle leukemia: leukosis enzootica bovis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(3), 1241–1267. doi:10.1111/j.1749-6632.1963.tb13448.x
- Benitez, O. J., Roberts, J.N., Norby, B., Bartlett, P. C., Maeroff, J. E., y Grooms, D. L. (2019). Lack of Bovine leukemia virus transmission during natural breeding of cattle. *Theriogenology*, 126, 187–190. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.12.005
- Bielanski, A., Maxwell, P., y Simard, C. (2000). Effect of bovine leukaemia virus on embryonic development and association with in vitro fertilised embryos. *Veterinary Record*, 146(9), 255–256.
- Boschetti, N., Niederhauser, I., Kempf, C., Stühler, A., Löwer, J., y Blümel, J. (2004). Different susceptibility of B19 virus and mice minute virus to low pH treatment. *Transfusion*, 44(7), 1079-86. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03420.x>
- Buehring, G. C., Philpott, S. M., y Choi, K. Y. (2003). Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS research and human retroviruses*, 19(12), 1105-1113. <https://doi.org/10.1089/088922203771881202>
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Choi, K. Y., Sun, D., y Nuovo, G. (2014). Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging infectious diseases*, 20(5), 772. doi: 10.3201/eid2005.131298
- Buehring, G. C., Shen, H. M., Jensen, H. M., Jin, D. L., Hudes, M., y Block, G. (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus is associated with breast cancer: a case-control study. *PLoS One*, 10(9), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304>
- Buehring, G., Choi, K., y Jensen, H. (2001). Bovine leukemia virus in human breast tissues. *Breast Cancer Research* 3(Supplement 1), A14. <https://doi.org/10.1186/bcr338>
- Burny, A., Bex, F., Chantrenng, H., Cleuter, Y., Dekegel, D., Ghysdael, J., Kettman, R., Leclercq, M., Leunen, J., Mammerickx, M. y Portetelle, D. (1978). Bovine leukemia

- virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Advances in cancer research*, 28, 251-311. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60649-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60649-1)
- Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van de Broeke, A., Willems, L., y Thomas, R. (1988). Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*, 17(3), 197-218. doi: 10.1007/978-94-009-1243-4_4
- Burton, A. J., Nydam, D. V., Long, E. D., y Divers, T. J. (2010). Signalment and clinical complaints initiating hospital admission, methods of diagnosis, and pathological findings associated with bovine lymphosarcoma (112 cases). *Journal of veterinary internal medicine*, 24(4), 960–964. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0537.x
- Chung, Y., Prior, H., Duffy, P., Rogers, R., y Mackenzie, A. (1986). The effect of pasteurisation on bovine leucosis virus-infected milk. *Australian Veterinary Journal*, 63(11), 379–380. doi:10.1111/j.1751-0813.1986.tb02908.x
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., y BonDurant, R. H. (2011). Immunity to infections in the lower genital tract of bulls. *Journal of reproductive immunology*, 89(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.02.002>
- Da, Y., Shanks, R. D., Stewart, J. A., y Lewin, H. A. (1993). Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6538–6541. doi:10.1073/pnas.90.14.6538
- Darpel, K. E., Barber, J., Hope, A., Wilson, A. J., Gubbins, S., Henstock, M., Frost, L., Batten, C., Veronesi, E., Moffat, K., Carpenter, S., Oura, C., Mellor, S., y Mertens, P. P. C. (2016). Using shared needles for subcutaneous inoculation can transmit bluetongue virus mechanically between ruminant hosts. *Scientific reports*, 6(1), 20627. doi:10.1038/srep20627

- Dimmock, C. K., Chung, Y. S. y MacKenzie, A. R. (1991). Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Australian veterinary journal*, 68(7), 230-233. doi:10.1111/j.1751-0813.1991.tb03213.x
- Emanuelson, U., Scherling, K. y Pettersson, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 12(1-2), 121-131. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90075-Q](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90075-Q)
- Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Sabo, K. M. y Sordillo, L. M. (2011). Bovine leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 Escherichia coli bacterin. *Veterinary medicine international*, 2011, 915747, 5 paginas. doi:10.4061/2011/915747
- Erskine, R., Bartlett, P., y Byrem, T. (2012). Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *Journal of dairy research*, 79(4), 445–450. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000520>
- European Food Safety Authority Panel on Animal Health and Welfare. (2015). Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal*, 13(7), 4188. doi:10.2903/j.efsa.2015.4188
- Ferrer, J. F., Kenyon, S. J. y Gupta, P. (1981). Milk of Dairy Cows Frequently Contains a Leukemogenic Virus. *Science*, 213(4511), 1014–1016. Doi :10.1126/science.6267692
- Foil, L., Adams, W., McManus, J., y Issel, C. (1987). Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of medical entomology*, 24(6), 613-616.
- Foil, L., French, D., Hoyt, P., Issel, C., Leprince, D., McManus, J., y Seger, C. (1989). Transmission of bovine leukemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *American journal of veterinary research*, 50(10), 1771-1773.

- Frie, M. C., y Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 163(3), 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>
- Frie, M. C., Sporer, K. R., Wallace, J. C., Maes, R. K., Sordillo, L. M., Bartlett, P. C., y Coussens, P. M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 182:125–135. doi:10.1016/j.vetimm.2016.10.013
- Gillet, N. A., Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., De Brogniez, A., Renotte, N., Alvarez, I., Trono, K., y Willems, L. (2013). Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003687. doi:10.1371/journal.ppat.1003687
- Gröner, A., Broumis, C., Fang, R., Nowak, T., Popp, B., Schäfer, W., y Roth, N. J. (2018). Effective inactivation of a wide range of viruses by pasteurization. *Transfusion*, 58(1), 41-51. <https://doi.org/10.1111/trf.14390>
- Gutiérrez, G., Alvarez, I., Merlini, R., Rondelli, F., y Trono, K. (2014b). Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 82. doi:10.1186/1746-6148-10-82.
- Gutiérrez, G., Alvarez, I., Politzki, R., Lomónaco, M., Santos, M.J., Rondelli, F., Fondevila, N., y K. Trono. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 151(3-4), 255–263. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.035

- Gutiérrez, G., Lomonaco, M., Alvarez, I., Fernandez, F., y Trono, K. (2015). Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. *Veterinary microbiology*, 177(3-4), 366-369. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>
- Gutiérrez, G., Rodríguez, S. M., De Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., Jaworski, J. P., Alvarez, I., Vagnoni, L., Trono, K., y Willems, L., (2014a). Vaccination against δ -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses* 6(6), 2416-2427. <https://doi.org/10.3390/v6062416>
- Hopkins, S. G., DiGiacomo, R. F., Evermann, J. F., Christensen, J. D., Deitelhoff, D. P., y Mickelsen, W. D. (1991). Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199(8), 1035-1038.
- Hopkins, S., y DiGiacomo, R. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food. Animal Practice*, 13(1), 107-128. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4)
- Jacobs, R. M., Pollari, F. L., McNab, W. B., y Jefferson, B. (1995). A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records, and management practices. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59(4), 271-278.
- Jacobsen, K., Bull, R., Miller, J., Herdt, T., y Kaneene, J. (1983). Transmission of bovine leukemia virus: prevalence of antibodies in precolostral calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 1(3), 265-272. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(83\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0167-5877(83)90031-4)
- Jiménez, C., Bonilla, J. A., Dolz, G., Rodriguez, L. R., Herrero, L., Bolaños, E., Cortéz, M. R., y Moreno, E. (1995). Bovine Leukaemia-virus Infection in Costa Rica. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 42(1-10), 385-390. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1995.tb00726.x>

- Johnson, J. L., Godden, S. M., Molitor, T., Ames, T., y Hagman, D. (2007). Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of dairy science*, 90(11), 5189-5198. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0219>
- Johnson, R., Gibson, C. D. y Kaneene J. B. (1985). Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Preventive Veterinary Medicine*, 3(4), 339-349. doi:10.1016/0167-5877(85)90011-X
- Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Ceriani, M. C. y Esteban, E. N. (2016). Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *Journal of dairy science*, 99(6), 4586-4589. doi:10.3168/jds.2015-10480
- Juliarena, M., Gutierrez, S., y Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus–infected cattle with and without lymphocytosis. *American journal of veterinary research*, 68(11), 1220-1225. doi:10.2460/ajvr.68.11.1220.
- Kabeya, H., Ohashi, K., y Onuma, M. (2001). Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(7), 703-708. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.703>
- Kaja, R.W. y Olson, C. (1982). Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Theriogenology* 18(1), 107–112. doi:10.1016/0093-691X(82)90054-1
- Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Oue, Y., Edamatsu, H., Konno, Y., Tachibana, S., y Murakami, K. (2014). Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(2), 255-257. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0253>

- Kenyon, S. J., Ferrer, J. F., McFeely, R. A., y Graves, D. C. (1981). Induction of Lymphosarcoma in Sheep by Bovine Leukemia Virus 23. *Journal of the National Cancer Institute*, 67(5), 1157-1163. <https://doi.org/10.1093/jnci/67.5.1157>
- Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A. y Chantrenne, H. (1980). Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), 2577-2581. doi:10.1073/pnas.77.5.2577
- Kettmann, R., Portetelle, D., Mammerickx, M., Cleuter, Y., Dekegel, D., Galoux, M., Ghysdael, J., Burny, A., y Chantrenne, H. (1976). Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(4), 1014–1018. doi:10.1073/pnas.73.4.1014
- Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Näslund, K., y Belak, S. (1994). Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 42(2-3), 191-204. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90018-3)
- Klobuchar, A. (2013, Setiembre). *The Economic Contribution of America's Farmers and the Importance of Agricultural Exports*. En Washington, DC: Comité Económico Mixto, Congreso de EE. UU. Recuperado de https://www.jec.senate.gov/public/_cache/files/266a0bf3-5142-4545-b806-ef9fd78b9c2f/jec-agriculture-report.pdf
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K. I., Konishi, M., y Murakami, K., (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC veterinary research*, 6(1), 1. doi:10.1186/1746-6148-6-1

- Kohara, J., Konnai, S., y Onuma, M. (2006). Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 54(1), 25–30. <https://doi.org/10.14943/jjvr.54.1.25>
- Küme, T., Şişman, A.R., Solak, A., Tuğlu, B., Çinkooğlu, B., y Çoker, C. (2012). The effects of different syringe volume, needle size and sample volume on blood gas analysis in syringes washed with heparin. *Biochemia medica*, 22(2), 189-201.
- LaDronka, R. M., Ainsworth, S., Wilkins, M. J., Norby, B., Byrem, T. M. y Bartlett, P. C. (2018). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle. *Veterinary medicine international*, 2018, 5831278, 8 pages. doi:10.1155/2018/5831278
- Lassauzet, M. L., Johnson, W. O., Thurmond, M. C., y Stevens, F. (1989). Protection of colostral antibodies against bovine leukemia virus infection in calves on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(4), 424.
- Lassauzet, M. L., Thurmond, M. C., Johnson, W. O., Stevens, F., y Picanso, J. P. (1990). Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 54(1), 184–189.
- Lewin, H. A. (1989). Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. *Journal of Dairy Science*, 72(5), 1334-1348. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79241-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79241-9)
- Lewin, H. A., y Bernoco, D. (1986). Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Animal genetics*, 17(3), 197–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1986.tb03191.x>
- Lewin, H. A., Wu, M. C., Stewart, J. A., y Nolan, T. J. (1988). Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics*, 27(5), 338-344. <https://doi.org/10.1007/BF00395129>

- Losinger, W. C. (2006). Evaluating the uncertainty in estimates of the economic impacts of Bovine-Leukosis virus in U.S. dairy cows. *Agricultural Economics*, 35(3), 363–372. doi:10.1111/j.1574- 0862.2006.00168.x
- Lucas, M. H., Roberts, D. H., y Wibberley, G. (1985). Ear tattooing as a method of spread of bovine leukosis virus infection. *British Veterinary Journal*, 141(6), 647–649. doi:10.1016/0007-1935(85)90013- 2.
- Mammerickx, M., Portetelle, D., y Burny, A. (1981). Experimental Cross-Transmissions of Bovine Leukemia Virus (BLV) between Several Animal Species. *Zoonoses and Public Health*, 28(1), 69-81. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1981.tb01740.x>
- Mammerickx, M., Portetelle, D., de Clercq, K., y Burny, A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leukemia research*, 11(4), 353-358. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(87\)90180-9](https://doi.org/10.1016/0145-2126(87)90180-9)
- Marshak, R. R., Hare, W. C. D., Abt, D. A., Croshaw Jr., J. E., Switzer, J. W., Ipsen, I., Dutcher, R.M., y Martin, J. E. (1963). Occurrence of lymphocytosis in dairy cattle herds with high incidence of lymphosarcoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(3), 1284-1301. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1963.tb13451.x>
- Maschmann, J., Hamprecht, K., Weissbrich, B., Dietz, K., Jahn, G., y Speer, C. P. (2006). Freeze-thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 91(4), F288-F290. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2004.050625>
- McGuirk, S. M., y Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>

- McMartin, S., Godden, S., Metzger, L., Feirtag, J., Bey, R., Stabel, J., Goyal, S., Fetrow, J., Wells, S., y Chester-Jones, H. (2006). Heat Treatment of Bovine Colostrum. I: Effects of Temperature on Viscosity and Immunoglobulin G Level. *Journal of dairy science*, 89(6), 2110–2118. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72281-0
- Meiron, R., Brenner, J., Gluckman, A., Avraham, R., y Trainin, Z. (1985). Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). *Veterinary immunology and immunopathology*, 9(2), 105-114. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(85)90011-X)
- Mesa, G., Ulloa, J. C., Uribe, A. M., y Gutierrez, M. F. (2013). Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. *Open journal of medical microbiology*, 3(1), 28694, 7 pages DOI:10.4236/ojmm.2013.31013
- Miller, J. M., y Van der Maaten, M. J. (1979). Infectivity Tests of Secretions and Excretions From Cattle Infected With Bovine Leukemia Virus. *Journal of the National Cancer Institute*, 62(2), 425-428. <https://doi.org/10.1093/jnci/62.2.425>
- Miller, J. M., Miller, L. D., Olson, C., y Gillette, K. G. (1969). Virus-Like Particles in Phytohemagglutinin-Stimulated Lymphocyte Cultures With Reference to Bovine Lymphosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(6), 1297–1305. doi:10.1093/jnci/43.6.1297
- Mirsky, M. L., Olmstead, C. A., Da, Y., y Lewin, H. A. (1996). The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of virology*, 70(4), 2178-2183. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.4.2178-2183.1996>
- Molloy, J. B., Dimmock, C. K., Eaves, F. W., Bruyeres, A. G., Cowley, J. A., y Ward, W. H. (1994). Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected

- cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. *Veterinary microbiology*, 39(3-4), 323–333. doi:10.1016/0378-1135(94)90168-6.
- Monke, D. R. (1986). Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(8), 823–826.
- Monti, G., Schrijver, R., y Beier, D. (2005). Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. *Archives of virology*, 150(3), 443-458. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0437-1>
- Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K. I., y Tsutsui, T. (2013). Nationwide Survey of Bovine Leukemia Virus Infection among Dairy and Beef Breeding Cattle in Japan from 2010–2011. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(8), 1123-1126. doi:10.1292/jvms.12-0374
- Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K. I., Yamamoto, T., y Tsutsui, T. (2011). The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary microbiology*, 148(1), 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.001>
- Nagy, D. W., Tyler, J. W., y Kleiboeker, S. B. (2007). Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(5), 1104–1107. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb03071.x
- Ndou, R. V., Sejesho, F., Dzoma, B. M., Motsei, L. E., Nyirenda, M., y Bakunzi, F. R. (2011). A serosurvey of the prevalence of enzootic bovine leukosis in the Mafikeng area of the North West Province of South Africa. *Journal of Human Ecology*, 36(1), 53–55. <https://doi.org/10.1080/09709274.2011.11906417>
- Nekoei, S., Hafshejani, T., Doosti, A., y Khamesipour, F. (2015). Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep. *Polish journal of veterinary sciences*, 18(4), 703–707. doi:10.1515/pjvs-2015-0091

- Nekouei, O., VanLeeuwen, J., Sanchez, J., Kelton, D., Tiwari, A., y Keefe, G. (2015). Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Preventive veterinary medicine*, *119*(3), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.025>
- Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Nishimori, A., Okagawa, T., Murata, S., y Ohashi, K. (2016). Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. *Archives of virology*, *161*(4), 985-991. doi:10.1007/s00705-015-2676-8
- Onuma, M., Sagata, N., Okada, K., y Ogawa, Y. (1982). Integration of Bovine Leukemia Virus DNA in the Genomes of Bovine Lymphosarcoma Cells. *Microbiology and immunology*, *26*(9), 813–820. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00227.x>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2012). *Manual de animales terrestres de la OIE*. Paris: Organización Mundial de Sanidad Animal.
- Ott, S., Johnson, R., y Wells, S. (2003). Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Preventive veterinary medicine*, *61*(4), 249-262. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.003>
- Pelzer, K. D. (1997). Economics of Bovine Leukemia Virus Infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *13*(1), 129–141. doi:10.1016/S0749-0720(15)30368-6
- Percher, F., Jeannin, P., Martin-Latil, S., Gessain, A., Afonso, P. V., Vidy-Roche, A., y Ceccaldi, P. E. (2016). Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses*, *8*(2), 40. doi:10.3390/v8020040

- Perino, L. J., Wright, R. E., Hoppe, K. L., y Fulton, R. W. (1990). Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. *American journal of veterinary research*, 51(8), 1167–1169.
- Polat, M., Ohno, A., Takeshima, S. N., Kim, J., Kikuya, M., Matsumoto, Y., Mingala, C., Onuma, M., y Aida, Y. (2015). Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in Philippine cattle. *Archives of virology*, 160(1), 285–296. doi:10.1007/s00705-014-2280-3
- Polat, M., Takeshima, S., Hosomichi, K., Kim, J., Miyasaka, T., Yamada, K., Arainga, M., Murakami, T., Matsumoto, Y., De la Barra, V., Panei, C. J., Gonzalez, E., Kanemaki, M., Onuma, M. Giovambattista, G., y Aida, Y. (2016). A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. *Retrovirology*, 13(1), 4. doi:10.1186/s12977-016-0239-z
- Rauw, W. M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E. N., y Grommers, F. J. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock production science*, 56(1), 15–33. doi:10.1016/S0301-6226(98)00147-X
- Rhodes, J. K., Pelzer, K. D., y Johnson, Y. J. (2003). Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(3), 346-352. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.346>
- Robert-Guroff, M., Weiss, S. H., Giron, J.A., Jennings, A. M., Ginzburg, H.M., Margolis, I. B., Blattner, W., y Gallo, R. (1986). Prevalence of Antibodies to HTLV-I, -II, and -III in Intravenous Drug Abusers From an AIDS Endemic Region. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 255(22), 3133-3137. doi:10.1001/jama.1986.03370220095034

- Roberts, D. H., Lucas, M. H., y Wibberley, G. (1983). Effect of heat on bovine leukosis virus-infected lymphocytes. *British Veterinary Journal*, 139(4), 291-295.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)30434-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)30434-7)
- Rodríguez, S., Florins, A., Gillet, N., De Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M., Boxus, M., Boulanger, F., Gutierrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., y Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*, 3(7), 1210-1248. doi:10.3390/v3071210
- Romero, C. H., Cruz, G. B., y Rowe, C. A. (1983). Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Tropical animal health and production*, 15(4), 215-218
- Romero, C., Abaracon, D., Rowe, C. y Silva, A. (1984). Bovine leukosis virus infectivity in *Boophilus microplus* ticks. *Veterinary Record*, 115(17), 440-441.
<https://doi.org/10.1007/BF02242060>
- Romero, J. J., Dávila, G., Beita, G., y Dolz, G. (2015). Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 7-18.
- Romero, S. (2008). *Seroprevalencia de Leucosis Viral Bovina (LVB) en el Valle de Sama - Tacna*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú].
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/557>
- Ruggiero, V. J. (2019). *Field Studies on the Control of Bovine Leukemia Virus in Dairy Cows*. [Tesis doctoral, Michigan State University, EE. UU.]
- Ruiz, V., Porta, N. G., Lomónaco, M., Trono, K., y Alvarez, I. (2018). Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Frontiers in veterinary science*, 5: 267. doi:10.3389/fvets.2018.00267
- Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y., y Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary

- relationship to other retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(3), 677–681. doi:10.1073/pnas.82.3.677
- Sandoval, R., Delgado, A., Ruiz, L., y Ramos, O. (2015). Determinación de la seroprevalencia del virus de la Leucosis Bovina en un establo lechero de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 152-158.
- Sattentau, Q. J. (2010). Cell-to-cell spread of retroviruses. *Viruses*, 2(6), 1306–1321. doi:10.3390/v2061306.
- Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M., y Levy, D. (1994). In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *Journal of virology*, 68(7), 4589-4596. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4589-4596.1994>
- Schwartz, I., y Lévy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary Research*, 25(6), 521–536.
- Şevik, M., Avcı, O., y İnce, Ö. B. (2015). An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. *Tropical animal health and production*, 47(4), 715–720. doi:10.1007/s11250-015-0783-x.
- Sharifzadeh, A., Doosti, A., y Dehkordi, A. G. (2011). Molecular Detection of Bovine leukemia virus (BLV) in the Semen Samples of Bulls. *World Journal of Zoology*, 6(3), 285–290.
- Shettigara, P. T., Samagh, B. S., y Lobinowich, E. M. (1989). Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(1), 108–110.
- Sprecher, D. J., Pelzer, K. D. y Lessard, P. (1991). Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199(5), 584–588.

- Stabel, J. R., y Lambertz, A. (2004). Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of food protection*, 67(12), 2719–2726. doi:10.4315/0362-028X-67.12.2719
- Stafford, K. J., y Mellor, D. J. (2011). Addressing the pain associated with disbudding and dehorning in cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 135(3), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.10.018>
- Stone, D. M., Hof, A. J., y Davis, W. C. (1995). Up-regulation of IL-2 receptor α and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48(1-2), 65-76.
- Swenson, C. L., Erskine, R. J., y Bartlett, P. C. (2013). Impact of bovine leukemia virus infection on neutrophil and lymphocyte concentrations in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(1), 131-135. <https://doi.org/10.2460/javma.243.1.131>
- The European Commission. (2016). Commission Implementing Decision (EU) 2016/168. *Official Journal of the European Union* 32, 153-157.
- Thurmond, M. C., Carter, R. L., Picanso, J. P., y Stralka K. (1990). Upper-normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus. *American journal of veterinary research*, 51(3), 466-470.
- Thurmond, M. C., Carter, R. L., Puhr, D. M., Burr ridge, M. J., Miller, J. M., Schmerr, M. J., y Van der Maaten, M. J. (1983). An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(3), 316–319.
- Thurmond, M. C., Maden, C. B., y Carter, R. L. (1985). Cull rates of dairy cattle with antibodies to bovine leukemia virus. *Cancer research*, 45(5), 1987-1989.

- Trainin, Z., Brenner, J., Meiom, R., y Ungar-Waron, H. (1996). Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 54(1-4), 293-302. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05706-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05706-6)
- Úsuga-Monroy, C., Echeverri, J., y López-Herrera, H. (2015). Molecular diagnosis of bovine leukemia virus in a population of Holstein cows, Colombia. *Archivos de Zootecnia*, 64(248), 383–388.
- Walrand, F., Fumoux, F., Roelants, G., Parodi, A. L., y Levy, D. (1986). Incidence of bovine leukemia virus-specific antibodies in West African cattle. *International journal of cancer*, 37(4), 619–621. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370423>
- Weber, A. F., Meiske, J. C., Haggard, D. L., Sorensen, D. K., Domagala, A. M., y Flaum, A. M. (1988). Failure to demonstrate transmission of enzootic bovine leukemia virus infection from cows to sheep by use of common injection needles. *American journal of veterinary research*, 49(11), 1814–1816.
- White, T. L., y Moore, D. A. (2009). Reasons for whole carcass condemnations of cattle in the United States and implications for producer education and veterinary intervention. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(8), 937-941. <https://doi.org/10.2460/javma.235.8.937>
- Wilesmith, J. (1979). Needle transmission of bovine leucosis virus. *Veterinary Record*, 104(5), 107. doi:10.1136/vr.104.5.107-a.
- Wu, M. C., Shanks, R. D., y Lewin, H. A. (1989). Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(3), 993–996. doi:10.1073/pnas.86.3.993.
- Yang, Y., Fan, W., Mao, Y., Yang, Z., Lu, G., Zhang, R., Szeto, C., y Wang, C. (2016). Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and

increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3688-3697.
doi:10.3168/jds.2015-10580.

Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Murakami, H., Takeshima, S. N., y Aida, Y. (2015). Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus research*, 210, 248-254.
doi:10.1016/j.virusres.2015.08.013.