

DETERMINACIÓN DE LEUCOSIS ENZOÓTICA BOVINA MEDIANTE LAS CLAVES HEMATOLÓGICAS DE GÖTTINGEN Y ELISA EN BOYACÁ, COLOMBIA

Enzootic Bovine Leukosis Assessment by Hematology Gottingen Keys and ELISA in Boyacá, Colombia

Martín Pulido-Medellín¹, Weimer González-Ariza, Hector Bayona-Ríos y
Ginette Chavarro-Tulcán

*Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ),
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Boyacá, Colombia*

Correo-E: martin.pulido@uptc.edu.co

Recibido: 28/11/16 - Aprobado: 17/07/17

RESUMEN

La Leucosis Enzootica Bovina (LEB) es una enfermedad de distribución mundial que genera grandes pérdidas económicas. Esta enfermedad, afecta principalmente la ganadería de las zonas lecheras y en Colombia no se tienen datos exactos del estado sanitario, ni se han estimado las pérdidas generadas a causa de esta patología. El objetivo fue determinar la presencia de LEB utilizando las claves hematológicas de Göttingen en Toca, Boyacá (Colombia). Se tomaron 243 muestras serológicas a 81 hembras de razas lecheras, seleccionadas al azar en intervalos de dos meses. Posteriormente, las muestras positivas y sospechosas a las claves, fueron procesadas mediante la técnica de ELISA, con el fin de corroborar su seropositividad. Las claves de Göttingen permitieron clasificar, de los 81 ejemplares, cinco muestras positivas y 18 sospechosas, de las cuales las cinco positivas resultaron también positivas a la técnica de ELISA. De los 18 ejemplares sospechosos, cinco resultaron seropositivos. La prevalencia total fue del 13.5 %; para los ejemplares entre 3 y 6 años de edad fue de 25% y para mayores de seis años fue del 6%. Se pudo concluir que el recuento de leucocitos fue de relevancia para el diagnóstico de la LEB. Sin

ABSTRACT

Bovine Leukemia Virus (BLV) is an internationally prevalent disease that causes great economic losses. It mainly affects livestock in dairy production areas. Colombia lacks accurate data on the prevalence of BLV and its economic effect. This study aimed to determine the presence of BLV using Göttingen Hematological Keys in Toca, Boyacá (Colombia). A total of 243 serological samples were taken from 81 females of randomly selected dairy breeds at two-month intervals. Subsequently, the positive and suspect samples to the keys were processed by the ELISA technique in order to corroborate their seropositivity. The Göttingen keys allowed researchers to classify, from the 81 specimens, five positive samples and 18 suspicious ones, of which the five positive samples were also positive for the ELISA technique. Of the 18 suspected specimens, five were also seropositive. The total prevalence was 13.5%; for individuals between 3 and 6 years of age the prevalence was 25% and for individuals over 6 years the prevalence was 6%. Researchers concluded that the leukocyte count was relevant for the diagnosis of LEB. However, the Göttingen techniques are unspecific for the detection of the disease, so techniques with greater specificity and

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

embargo, las técnicas de Göttingen resultan no ser tan específicas para la detección de la enfermedad, por lo cual se recomienda la aplicación de técnicas con una especificidad y una sensibilidad mayor como ELISA y PCR.

(Palabras clave: Leucosis bovina enzoótica; Virus de la Leucemia Bovina, ensayo de inmunoadsorción enzimática; reacción en cadena de las polimerasas; enfermedades de los bovinos)

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad de distribución mundial que genera grandes pérdidas económicas [1] y afecta principalmente la ganadería de las zonas lecheras. En Colombia, no se tienen datos exactos del estado sanitario, ni tampoco se han estimado las pérdidas provocadas a causa de esta patología [2].

Esta enfermedad es ocasionada por un virus oncogénico del género *Deltavirus*, subfamilia Oncovirinae, familia Retroviridae, conocido por ser un retrovirus tipo C de distribución mundial [1]. De los ejemplares infectados, el 30-70% desarrolla una linfocitosis persistente, mientras que entre el 0,1-10% de estos, desarrolla tumores [3].

La sintomatología es inespecífica y varía según la localización del proceso neoplásico y del grado de afección en los órganos de importancia vital [4]. Dentro de los síntomas se incluyen los siguientes: inapetencia, pérdida de peso, debilidad general y, en ocasiones, manifestaciones neurológicas. Los ganglios linfáticos superficiales pueden verse inflamados y se pueden palpar bajo la piel o mediante un examen rectal. Los órganos implicados con más frecuencia son la cuarta cavidad del rumen, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, el omaso, los pulmones y el útero [5].

La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente y al desarrollo de tumores, varía de acuerdo a diversos factores dentro de los cuales destacan la edad, la genética y la raza [6]. Sin embargo, la mayoría de animales infectados son portadores sanos y representan una fuente de contagio, especialmente durante los meses de verano en los cuáles se presenta mayor población de insectos, hecho que ha dificultado

sensitivity such as ELISA and PCR yield more accurate results.

(Key words: Bovine Leukemia Virus; enzyme-linked immunosorbent assay; polimerase chain reaction, cattle diseases)

su erradicación [7].

Además de la sintomatología que presentan los animales positivos, su producción se ve afectada, representando pérdidas económicas directas e indirectas. Las primeras se deben a los decomisos de cadáveres de animales con tumores linfoides y por restricciones en la importación y exportación tanto de ejemplares como de semen [8]; y las segundas, por un aumento en la tasa de pérdidas selectivas, así como una mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, como la mastitis, la diarrea y la neumonía [9]. En cuanto a la disminución en la producción de leche, existen estudios que reportan disminución de ésta [9] y estudios que por el contrario, no observan una disminución en la producción [10].

Dentro de los métodos para detectar los cambios en la fórmula leucocitaria se encuentra las claves de Göttingen. La seguridad de este método oscila entre 85 a 90% en la fase preclínica, debido a la linfocitosis persistente que permite detectar, en forma precoz la enfermedad en el ganado [11].

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de LEB utilizando las claves hematológicas de Göttingen y la Técnica de ELISA, así como sus factores de riesgo en Boyacá, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

El departamento de Boyacá se encuentra ubicado en el centro oriente del país y tiene una superficie de 23.189 Km². El territorio boyacense está constituido por dos grandes partes, una montañosa y otra plana, dando origen a cuatro regiones y diez subregiones; la región montañosa tiene la presencia de la Cordillera

Oriental de Los Andes que atraviesa el departamento de sur a norte; en dicha cordillera, se encuentra la mayor población bovina de Boyacá [12]. El municipio de Toca se encuentra en la región montañosa, entre los 5° 32' y 5° 95' de latitud Norte, y entre los 72° 60' al Oeste de Greenwich; a una altitud de 2810 msnm su temperatura media de 13°C [13].

Muestras

El municipio de Toca cuenta con una población bovina de 7408 ejemplares de los cuales 4791 son hembras [14]. Para realización del ensayo, se tomaron 243 muestras serológicas de 81 hembras de razas lecheras seleccionadas al azar en 9 hatos del municipio de Toca.

Las muestras se recolectaron en individuos entre los seis meses y los seis años de edad, directamente de la vena coccígea, con agujas BD Vacutainer® calibre 18 y se almacenaron en tubos BD Vacutainer® provistos de EDTA, como anticoagulante, para análisis hematológicos y tubos sin anticoagulante para análisis serológico. Una vez tomadas las muestras, los tubos se marcaron con el número de identificación del animal, edad, nombre de la finca, estado reproductivo y fueron transportadas al Laboratorio Clínico de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia para ser procesadas inmediatamente. Los sueros se almacenaron a -4°C, hasta el momento de su análisis, dos semanas después.

Procesamiento de las Muestras

Para el análisis hematológico se realizaron tres cuadros hemáticos por ejemplar a intervalos de dos meses y se realizó un recuento manual de leucocitos por triplicado, para cada muestra; a los resultados se les aplicaron las claves hematológicas de Göttingen (Cuadro 1).

Para el análisis serológico, las muestras de suero se procesaron mediante la técnica de ELISA. El procedimiento se realizó según las indicaciones del inserto del kit comercial (Svanovir® BLV gp51-Ab), en placas de poliestireno se colocaron 100 µL de la dilución de antígeno previamente establecida, en cada pocillo. Luego de la incubación y respectivos lavados, se sembraron por duplicado diluciones 1:24 de los sueros controles, positivo y negativo, y de las muestras problema en un volumen total de 100 µL por pocillo. Luego de lavar 3 veces, se agregó 50 µL por pocillo de anti-inmunoglobulina bovina marcada

Cuadro 1. Claves hematológicas de Göttingen (Wilhelm, 1979)

EDAD (años)	Normal	Sospechoso	Positivo
0-1	10,000	10,000-13,000	13,000
1-2	9,000	9,000-12,000	12,000
2-3	7,500	7,500-10,000	10,000
3-6	6,500	6,500-9,000	9,000
6	5,500	5,500-7,500	7,500

con peroxidasa, incubando 1 h a 37°C. Luego de lavar, se colocó 100 µl de la solución de sustrato (ABTS) a cada pocillo, se incubó y se realizó la lectura en espectrofotómetro con filtro, a 405 nm, utilizando para la interpretación de los resultados una relación de densidad óptica corregida (DO muestra/DO control positivo), igual o superior a 10% para las muestras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo utilizado fue el multivariable aleatorio secuencial de corte longitudinal. Los datos obtenidos fueron tabulados en Excel y analizados utilizando el programa de análisis estadístico epidemiológico *Epi Info* versión 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las claves de Göttingen permitieron evidenciar que, de las 81 muestras, cinco fueron positivas y 18 sospechosas. Estas 23 muestras fueron procesadas mediante la técnica de ELISA [15]; las cinco muestras positivas con las claves de Göttingen resultaron también positivas a la técnica de ELISA y seis de las muestras sospechosas resultaron positivas (Cuadro 2).

Al evaluar la linfocitosis se observa que el promedio de linfocitos aumentó significativamente en los animales infectados con LEB, razón por la cual fue posible detectar la presencia del virus con las claves, resultado que concuerda con Ohno *et al.* [16] y Rama *et al.* [17], quienes encontraron linfocitosis en ejemplares seropositivos a LEB.

La prevalencia total resultó ser del 13,5%, la cual es menor a la encontrada en el norte, centro y oriente de Colombia. En el norte, se encontró una prevalencia del 21% [18]; en el centro de 45,28%

Cuadro 2. Las muestras positivas o sospechosas adicionalmente fueron procesadas mediante la Técnica ELISA

Número de muestra	Edad	Claves hematológicas de Göttingen	Prueba de ELISA *Densidad óptica corregida (%)
1	6 años	Sospechosa	7
3	6 años	Sospechosa	11
6	3-6 años	Sospechosa	5
20	3-6 años	Sospechosa	13
22	3-6 años	Sospechosa	12
24	3-6 años	Sospechosa	11
27	3-6 años	Sospechosa	2
28	3-6 años	Positiva	12
29	3-6 años	Sospechosa	5
32	6 años	Sospechosa	12
33	6 años	Sospechosa	3
34	3-6 años	Positiva	13
39	3-6 años	Sospechosa	7
41	6 años	Sospechosa	8
45	6 años	Sospechosa	8
48	6 años	Sospechosa	9
54	3-6 años	Sospechosa	9
65	3-6 años	Sospechosa	5
68	3-6 años	Sospechosa	6
69	6 años	Positiva	13
76	3-6 años	Sospechosa	12
77	3-6 años	Positiva	14
78	3-6 años	Positiva	12

* Densidad óptica corregida obtenida a partir de la formula (DO muestra/DO control positivo).
Valores menores a 10% se consideran como negativos

en la Sabana de Bogotá y de 83,3% en vacas lecheras Holstein del municipio de Ubaté [19, 20]; y al oriente, se encontró una prevalencia del 15% en ganado de carne [21].

Esta prevalencia también resultó por debajo de los valores encontrados en América. En Venezuela, se encontró una prevalencia del 60,83% [22], en Estados Unidos del 38% [5], en Chile del 34,7% [23], en Cuba del 25,9% [15] y en Argentina de 32,53% [24]; pero está por encima de las prevalencias encontradas en Europa, de 0,08% en Italia [1] y Suiza donde están libres de la enfermedad [25].

Con relación a la sintomatología y la presencia de tumefacciones en los ganglios, no se encontró diferencia entre los seropositivos y seronegativos, lo cual indica que la ausencia de ellas no implica ausencia de infección [22]. Este resultado que también coincide con Resoagli *et al.* [24] quienes no encontraron signos clínicos compatibles con la afección en los animales que resultaron seropositivos.

El 100% de los individuos menores de tres años resultaron seronegativos; entre 3 y 6 años de edad, se

presentó un 25% de seropositividad; y en individuos mayores a 6 años hubo un 6% de seropositividad. De esta manera se presenta una mayor susceptibilidad al virus en individuos mayores a tres años, resultado que concuerda con Ohno *et al.* [16], Nava *et al.* [22] y Betancur y Rodas [18], quienes reportaron que la mayor seropositividad se presentó en ejemplares mayores a los tres años de edad. Gutiérrez *et al.* [26], encontraron que en animales cuyas edades sobrepasaron los tres años, la detección de anticuerpos osciló entre el 40% y el 60%; mientras que en animales recién nacidos y hasta los dos años y medio, las prevalencias varían entre 11% y 24%.

Rama *et al.* [17] determinaron que, además de la edad, las enfermedades concomitantes influyen en el recuento leucocitario. Para el caso de este estudio, todos los ejemplares con leucocitosis persistente, no presentaron sintomatología asociada a alguna patología.

Adicionalmente, en las razas bovinas Holstein y Jersey se encontró un porcentaje de heredabilidad a la susceptibilidad para adquirir la enfermedad, del 8%,

por lo cual, la selección genética podría ser usada para disminuirla [5]. Para este caso, los ejemplares muestreados pertenecían a la raza Holstein; sin embargo, en Colombia, los pequeños hatos lecheros dentro de las prácticas reproductivas no suelen tener en cuenta animales de alta calidad genética, debido a los altos costos que representan.

Es probable que las prácticas de manejo inadecuadas, tales como el uso de las mismas agujas y guantes de palpación en varios animales, el transporte de animales seropositivos hacia hatos que están libres de la enfermedad y prácticas de control inadecuadas sean factores de riesgo para la adquisición del virus [27].

Las deficiencias en el control zootécnico y veterinario en el que sin tener en cuenta el estatus sanitario de esta enfermedad, se trasladan y mezclan los rebaños, constituyen una de las principales causas de la diseminación de la enfermedad. Al no existir controles adecuados por parte de las autoridades pertinentes, ni una sensibilización por parte de los propietarios, que les permita ser conscientes del problema, el manejo de la enfermedad, no se controla adecuadamente y se infectan hatos que se encontraban libres al introducir animales infectados [23].

Así mismo, las malas prácticas veterinarias como el uso de agujas sin esterilizar y su mismo empleo para la inoculación de un gran número de animales, los programas deficientes para el control de los hematófagos [15], las prácticas como palpaciones diagnósticas, exámenes post parto e inseminación artificial que se realizan sin tener en cuenta mínimas prácticas de asepsia [23], hacen que los animales seropositivos transmitan la enfermedad, ya que volúmenes de 5 μ L de sangre periférica de animales seropositivos y sin linfocitosis son suficientes para transmitir la enfermedad por las distintas vías [28].

Mundialmente, se ha demostrado que la adecuada implementación de las prácticas de manejo y la sensibilización de los productores, llevan exitosamente a la disminución y posterior erradicación de esta enfermedad. En Italia se reportó disminución en la seroprevalencia, de 0,21% en 2005 a 0,08% en 2012, debido principalmente a la implementación efectiva de un programa de erradicación, el cual se concentró principalmente en la capacitación continua de los diferentes productores para que implementaran prácticas de manejo adecuadas y reportaran oportunamente las anomalías en su ganado

[1]. Estas medidas también fueron implementadas en Suiza, resultando que, desde 1994 el país está libre de LEB [25]. Por esta razón, se considera que la sensibilización de los productores y los médicos veterinarios conllevará a la disminución en la transmisión del virus.

CONCLUSIONES

Debido a que los ejemplares que presentaron una leucocitosis persistente, en las tres muestras, a intervalos de dos meses, resultaron también seropositivos a la técnica ELISA, se puede concluir que para este caso el recuento de leucocitos fue de relevancia para el diagnóstico de la LEB. Sin embargo, las técnicas de Göttingen resultan no ser tan específicas para la detección de la enfermedad, por lo cual se recomienda la aplicación de técnicas con una especificidad y una sensibilidad mayor como ELISA y PCR.

En Colombia, es necesario trabajar más con los productores, los zootecnistas y los veterinarios, para que se sensibilicen acerca de la importancia de un manejo adecuado del ganado y para que reporten a tiempo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

MOPM: Fase experimental, análisis de los datos y edición del manuscrito. WAGA y HDBR: Fase experimental, análisis de los datos. GICT: Edición del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Maresca C, Costarelli S, Dettori A, Felici A, Iscaro C, Feliziani F. *Enzootic bovine leukosis: Report of eradication and surveillance measures in Italy over an 8-year period (2005–2012)*. *Prev Vet Med.* 2015; 119:222–226. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.024>.
2. ICA (2013). *Colombia Sanidad Animal 2012*. [Internet] [acceso 19 de noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getattachment/bce28fb3-c2c7-4f46-99fc-6bae850353fc/2012.aspx>
3. Forti K, Rizzo G, Cagiola M, Ferrante G, Marini C, Feliziani F, *et al.* Identification of a novel overlapping sequential E epitope (E0) on the bovine leukaemia virus SU glycoprotein and analysis of immunological data. *Vet Microbiol.* 2014; 172:157–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.016>

4. Chamizo E. Leucosis Bovina Enzoótica. En: Di Bella T, Editor. *Patología Especial y Diagnóstico de las Enfermedades de los Animales Domésticos*. 1ª Edición. Mexicali: UABC; 1995. p. 78.
5. Abdala E, Rosa G, Weigel K, Byrem T. Genetic analysis of leukosis incidence in United States Holstein and Jersey populations. *J Dairy Sc.* 2013; 96 (9):6022–6029. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6732>.
6. Frie M, Coussens P. Bovine Leukemia Virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunop.* 2015; 163:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>.
7. Rola-Łuszczak M, Finnegan C, Olecha M, Choudhury B, Kuzmak J. Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods.* 2013; 189: 258-264. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.02.014>.
8. Chamizo E. Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *Revista REDVET [revista en Internet]* 2005 [acceso 22 de septiembre de 2015]; 6 (7). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/>.
9. Beier D, Riebe R, Blankenstein B, Starick E, Bondzio A, Marquardt O. Establishment of a new bovine leukosis virus producing cell line. *J Virol Methods.* 2004; 121:239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.017>.
10. Sorge U, Lissemore K, Cantin R, Kelton D. Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. *J Dairy Sc.* 2011; 94(10):5062–5064. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4339>.
11. Wilhelm R. Leucosis linfática enzoótica del bovino. *Monografías de medicina veterinaria [revista en Internet]* 1979. [acceso 1 de octubre de 2015]; 1 (1): Disponible en:<http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4826/4711> >.
12. Gobernación de Boyacá, 2015. Tunja: Gobernación de Boyacá. [Internet], [acceso 28 de septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.boyaca.gov.co/>.
13. Alcaldía de Toca. [Internet] [acceso el 21 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.toca-boyaca.gov.co/index.shtml>.
14. ICA FEDEGAN. (2015). Informe consolidado nacional bovinos 2015. [Internet] [acceso 18 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>.
15. Delgado I, Alfonso A, Martínez N, Abeledo M, Rodríguez M, Barrera M. Presencia de anticuerpos al virus de la Leucosis bovina en rebaños pertenecientes a las provincias occidentales y centrales de Cuba. *Rev. Salud Anim.* 2009; 31(1): 24-28.
16. Ohno A, Takeshima S, Matsumoto Y, Aida Y. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Res.* 2015; 210:283–290. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.020>.
17. Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, *et al.* Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay.* 2010; 46 (177-178-179-180):15-22.
18. Betancur C, Rodas J. Seroprevalencia del virus de la Leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev Mvz Cordoba.* 2008; 13 (1):1-11.
19. Alfonso R, Barrera J, Almansa J. Prevalencia serológica y evaluación de riesgos de la Leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá. *Rev Cient Tec Ofic Inter Epizoo.* 1998; 17(3):723-732.
20. Hernández-Herrera D, Posso-Terranova A, Benavides J, Muñoz-Flórez J, Battista G, Álvarez-Franco L. Detección del virus de la Leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agron.* 2011; 60(4):312-318.
21. Bautista N, Nova Y, Pulido-Medellín M, Andrade-Becerra R. Determinación serológica de Leucosis bovina enzoótica en novillas de levante y vacas adultas de la vereda Morichal, Yopal, Casanare. *Ciencia y Agricultura.* 2013; 10(1):31-37. <https://doi.org/10.19053/01228420.2832>.
22. Nava Z, Obando C, Molina M, Bracamonte M, Tkachuk O. Seroprevalencia de la Leucosis enzoótica bovina y su asociación con signos clínicos y factores de riesgo en rebaños lecheros del Estado Barinas, Venezuela. *Rev Fac Cienc Vet UCV.* 2011; 52(1):13-23.
23. Grau M, Monti G. Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. *Arch Med Vet.* 2010; 42:87-91. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000200010>.
24. Resoagli J, Jacobo R, Storani A, Cipolini A, Stamarti G, Segura R. Prevalencia de la Leucosis enzoótica bovina en rodeos de cría de la provincia de Corrientes, Argentina. *Anales de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la SGCYT, Unne Corrientes Argentina.* 2012; 16-17.
25. Schärer S, Schwermer H, Presi P, Lindberg A, Zinsstag J, Reist M. Cost and sensitivity of on-farm versus slaughterhouse surveys for prevalence estimation and substantiating freedom from disease. *Prev Vet Med.* 2015; 120:51-61. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.020>.

- org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.020.
26. Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos M, Rondelli F, *et al.* Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol.* 2011; 151 (3–4):255–263. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.035>.
27. Nekouei O, Van Leeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med.* 2015; 119:105–113. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.025>.
28. González E, Oliva G, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray M. Leucosis Enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Vet [revista en Internet]* 2001. [acceso 21 de septiembre de 2015]; 21 (2). Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11131/Documento_completo_.pdf?sequence=1.