

Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina en una población de vacas Holstein, Colombia

Úsuga-Monroy, C.[®]; Echeverri, J. y López-Herrera, H.

Grupo de Investigación Biotecnología y Genética Molecular BIOGEM. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Colombia.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Lechería.
Leucosis bovina enzoótica.
Prevalencia molecular.
PCR anidada.

ADDITIONAL KEYWORDS

Dairy.
Enzootic bovine leukemia.
Molecular prevalence.
Nested PCR.

INFORMACIÓN

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 7.4.2015
Aceptado/Accepted: 7.9.2015
On-line: 10.12.2015
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
cusugam@unal.edu.co

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) posee un genoma RNA de cadena sencilla, pertenece a la familia Retroviridae y presenta ocho genotipos diferentes. Los linfocitos B son la célula blanco del BLV, lo cual tiene un impacto negativo sobre el sistema inmune de los bovinos ya que los hace más susceptibles a otras enfermedades de origen infeccioso además las vacas lecheras presentan una menor producción respecto al hato (2,5 a 5%). Esta enfermedad se transmite a través del consumo de leche y principalmente de forma iatrogénica. El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar BLV por medio de la técnica PCR anidada, para lo cual se tomaron 500 muestras de sangre de vacas Holstein pertenecientes a varios hatos ubicados en los principales municipios con carácter lechero en el departamento de Antioquia, durante los meses de febrero a junio de 2013. Se realizó una PCR anidada para detectar el provirus amplificando una región del gen *env* viral. Se obtuvo un fragmento de 444 pb y se comprobó la identidad de la secuencia a través de la aplicación BLAST®. La prevalencia para el departamento de Antioquia fue del 44% (219/500). Uno de los productos de PCR fue secuenciado y clasificado como genotipo 1; se encontró un 99% de identidad con la secuencia FJ808575.1. Se evaluaron tres subregiones lecheras Oriente, Norte y Valle de Aburra. La presencia del virus fue de 70%, 45%, 31% respectivamente. La prevalencia molecular de BLV varió entre 16 y 88% por municipio. Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el lugar de origen de la muestra y la presencia del virus. Se ha confirmado la presencia BLV en gran parte de las unidades lecheras evaluadas en una de las regiones lecheras más importantes en el departamento de Antioquia.

Molecular diagnosis of bovine leukemia virus in a population of Holstein cows, Colombia

SUMMARY

The bovine leukemia virus (BLV) has a single-stranded RNA genome; it belongs to the Retroviridae family and has eight different genotypes. B lymphocytes are the target cell of BLV, which has a negative impact on the immune system of cattle, making them more susceptible to other diseases of infectious origin; infected dairy cows also have lower production over herd (2.5 to 5%). The disease is transmitted through consumption of milk and mostly iatrogenic. The aim of this study was to make the diagnosis of BLV by nested PCR technique in 500 samples of blood from Holstein cows, which belonging to several herds located in municipalities with dairyness in the department of Antioquia, it were taken during the months of february to june 2013. It was performed a nested PCR to detect a region of the provirus detecting the viral *env* gene. A fragment of 444 bp was obtained and the sequence identity was found through BLAST® application. The BLV prevalence for the department of Antioquia was 44% (219/500). One of the PCR product was sequenced and classified as genotype 1; finding a 99% identity with the sequence FJ808575.1. Samples from three regions of Antioquia department (East, North and Aburra Valley) were evaluated; the BLV prevalence was 70%, 45%, 31% respectively. The molecular prevalence of BLV was between 16 and 88% by the municipality. There was statistically significant difference ($p < 0.05$) between the region of origin and the virus prevalence. The presence of BLV has been confirmed in the majority of the evaluated dairy units, which belong to one most important dairy regions in the department of Antioquia.

INTRODUCCIÓN

La producción lechera en Colombia pertenece a la rama económica de Agricultura, ganadería, caza, silvicultura y pesca la cual genera el 16,3% de los empleos totales en Colombia (DANE, 2014a) y obtuvo un crecimiento del PIB del 3,4% para el último trimestre del

2014 (DANE, 2014b). Por otra parte el departamento de Antioquia aportó el 19,7% del total de leche producida en el país para el 2013 (13'119.456 litros leche/año) (DANE, 2014c). Sin embargo, la presencia de algunas enfermedades puede perjudicar el comportamiento productivo y reproductivo de los animales y por lo tanto afectar la economía del país. La leucosis bovina

enzoótica (LBE) es una enfermedad que afecta a los bovinos y especialmente los dedicados a producción de leche, y está causada por el virus de la leucosis bovina (BLV), el cual pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Orthoretrovirinae, género *Deltaretrovirus* (Wu *et al.*, 2003).

La LBE es una enfermedad maligna, sistémica, de alta morbilidad y baja mortalidad. Generalmente los animales aparentan estar clínicamente sanos durante los primeros años post-infección, pero entre 30-70% los animales infectados puede desarrollar linfocitosis persistente (LP) y entre el 0,1-10% de los bovinos mayores a 3 años sufre algún tipo de linfomas (LS) (OIE, 2008). El BLV integra su genoma en los linfocitos B del bovino infectado, de manera que todos los animales infectados son portadores del virus durante toda su vida, esto tiene un impacto negativo sobre el sistema inmune de los animales, y los hace más susceptibles a otras enfermedades infecciosas provocando mayor incidencia de mastitis, metritis, diarrea y neumonía, además las vacas infectadas pueden reducir su producción de leche hasta en un 5% respecto al hato (Emanuelsson *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 2003; Cadavid, 2012).

El genoma del virus es un RNA de cadena sencilla de sentido positivo, el cual sufre mutaciones que lo llevan a tener una gran variabilidad genética, de esta manera se puede clasificar el BLV dentro de ocho genotipos a través de las secuencias de la proteína gp51 de varias regiones geográficas (Rola-Luszczak *et al.*, 2013), además utilizando el método PCR-RFLP se han encontrado siete genotipos diferentes y se ha demostrado la influencia del genotipo sobre la expresión de antígenos (Fechner *et al.*, 1997) y sobre la patogenicidad del virus (Inoue *et al.*, 2011).

Las pruebas serológicas AGID y ELISA son las pruebas que actualmente recomienda la OIE para el diagnóstico de la infección con BLV (OIE, 2008). Sin embargo, un obstáculo usualmente encontrado para el uso de estos métodos es el hecho de que en los animales infectados se pueden encontrar niveles bajos e incluso nulos de anticuerpos. Por ejemplo en vacas en periparto, animales inmunodeprimidos y terneros hasta aproximadamente los 6 meses de edad; en otros casos la coinfección con virus de la diarrea viral bovina (BVDV) disminuye el nivel de anticuerpos contra BLV (Rubianes *et al.*, 2000). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite un diagnóstico confiable desde las primeras semanas de infección, evitando así reacciones falso-positivas causadas por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro o falso-negativas por bajo nivel de producción de anticuerpos por el animal, además esta técnica se caracteriza por ser altamente sensible (Fechner *et al.*, 1996; Rubianes *et al.*, 2000; Rola *et al.*, 2002) y se convierte en un método de diagnóstico directo para la infección con BLV.

Debido a que en Colombia la LBE está incluida dentro de las enfermedades sin control por parte del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es importante determinar su nivel de prevalencia en el departamento con mayor producción de leche del país. Las condiciones actuales de producción de leche requieren el desarrollo de metodologías confiables de diagnóstico

que puedan servir como base para la implementación de estrategias que permitan reducir la presencia de esta infección viral en los hatos bovinos ya que hasta hoy no se cuenta con una vacuna comercial para controlar el progreso de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue diagnosticar leucosis bovina enzoótica por medio de la técnica PCR anidada, en una población de vacas Holstein pertenecientes a los principales municipios con carácter lechero en el departamento de Antioquía, Colombia.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES Y MUESTRAS

Se tomó una muestra de sangre de 500 vacas Holstein entre primer y quinto parto con edades de 3 a 7 años las cuales pertenecen a 17 hatos, ubicados en 3 subregiones del departamento de Antioquía: Valle de Aburra (Bello, Medellín), Norte (Belmira, Enterríos, San Pedro de los Milagros), Oriente (La Unión, Rionegro). Las muestras fueron recolectadas durante los meses de febrero a junio de 2013. Las condiciones específicas de manejo, alimentación y sanidad son variables y dependen del manejo de cada hato, así como la topografía y ubicación geográfica. Para la toma de muestras se obtuvo la aprobación por parte del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia (CEMED-007, 14 de mayo de 2012).

La toma de muestras se hizo con una aguja calibre 18G con sistema al vacío vacutainer (DBvacutainer®) y EDTA como anticoagulante; las muestras se homogenizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración para realizar la extracción de DNA al día siguiente del muestreo. Para obtener el DNA de los leucocitos se realizó la técnica *salting out* propuesta por Miller *et al.* (1988) y se resuspendió en buffer TE 1X pH 8.0 (Tris HCl 1 M y EDTA 0,5 M), el cual se almacenó a 4°C hasta el momento del análisis.

PREVALENCIA MOLECULAR DE BLV

La prevalencia molecular por PCR anidada se determinó a partir del DNA de las muestras de células sanguíneas (leucocitos) de las 500 vacas Holstein; se amplificó una región del gen *env* (gp51) viral para obtener un fragmento de 444 pares de bases en las vacas positivas, los primers utilizados fueron descritos por Beier *et al.* (2001). La primera reacción se realizó en un volumen final de 25 µl con 150 ng de DNA, 3,0 µl de 10 mM de cada primer *env* 5023 (5'-TCTGTGCCA-AGTCTCCCAGATA-3') y *env* 5608 (5'-AACAAACA-ACCTCTGGGGAGGGT-3'), 0,4 mM de dNTPs, 1X de tampón PCR (ThermoScientific®), 3 mM MgCl₂ y 1U de Taq DNA Polimerasa. En la segunda reacción de PCR se utilizó como DNA molde 5µl del producto de PCR de la primera amplificación, con las mismas concentraciones de los otros reactivos y los primers *env* 5099 (5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3') y *env* 5521 (5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3'), en un volumen final de 30µl. Las reacciones para las dos PCR fueron idénticas y se realizaron en un termociclador T3 (Biometra®) con el siguiente protocolo: Desnaturalización inicial fue a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por

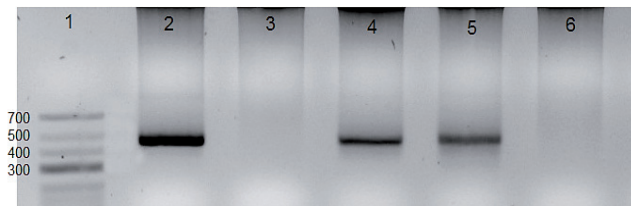


Figura 1. Producto de la PCR de BLV amplificado Carril 1= Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2= Control positivo. Carril 3= Control negativo. Carril 4 y 5= Animales positivos a la presencia del BLV. Carril 6= Animal negativo a la presencia de BLV (Product PCR amplified BLV. Lane 1= Molecular weight marker 100 bp. Lane 2= Positive control. Lane 3= Negative control. Lane 4 and 5= Positive for the presence of the BLV animals. Lane 6= Negative animal the presence of BLV).

30 segundos y 72°C por 1 minuto, para terminar con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Como control negativo se hicieron reacciones en ausencia de DNA y como control positivo se usó inicialmente el DNA de una vaca positiva para leucosis por la técnica de ELISA, después de esto se utilizó el DNA de una de las vacas que resultó positiva para la prueba. El producto de la segunda reacción se verificó en un gel de agarosa al 2% en un documentador de geles (Biorad®).

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE IDENTIDAD

Se envió uno de los productos de PCR positivos para la gp51 de BLV a la Empresa MacrogenInc® en Estados Unidos para su secuenciación. El producto de PCR (444 pb) se envió sin purificar en un vial de 1,5 ml el cual contenía 100 ng/µl en un volumen de 30 µl. La secuencia obtenida se editó manualmente en el programa MEGA® V6 para Windows y se realizó un análisis preliminar de la identidad del BLV con el programa BLAST®.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó una tabla de frecuencia para establecer la prevalencia del virus de la leucosis bovina. Se com-

pararon los porcentajes para establecer las diferencias entre las regiones, municipios y hatos utilizando tablas de contingencia. Se aplicó la prueba de independencia chi-cuadrado (χ^2) para determinar la relación entre la infección por leucosis y el origen de la muestra tanto para el municipio como para la subregión. La significancia de los datos se aceptó como $p < 0,05$. Todo el análisis se realizó en el programa SAS® versión 9.2 para Windows (SAS Institute Inc., Cary NC, USA).

RESULTADOS

PREVALENCIA MOLECULAR DEL BLV EN VACAS HOLSTEIN DE ANTIOQUÍA

Luego de la estandarización de la técnica molecular de diagnóstico de BLV se obtuvo un producto de PCR de 444 pb (**figura 1**), demostrando la presencia del provirus de leucosis bovina en los hatos lecheros del departamento de Antioquía. La PCR identificó un total de 219 vacas positivas a BLV de las 500 muestreadas, equivalente al 44% de infección en el departamento de Antioquía.

Al hacer el análisis por municipio de procedencia de las vacas muestreadas la prevalencia molecular de BLV varió entre 16 y 88%, encontrándose la mayor prevalencia molecular en el municipio de Rionegro (88%) y la menor prevalencia molecular se registró en Bello (16%). Por otro lado al analizar prevalencia de la infección por BLV por subregiones de Antioquía se encontró la mayor prevalencia en Oriente (70%), seguido de la subregión Norte (45%) y por último la menor prevalencia fue para la región del Valle de Aburra (31%) (**figura 2**).

La prueba Chi-cuadrado (χ^2) para la presencia del virus según municipio de procedencia fue altamente significativa ($\chi^2=61,58 p < 0,001$), es decir que la presencia del virus fue significativamente diferente en los municipios evaluados, por otra parte también se encontró

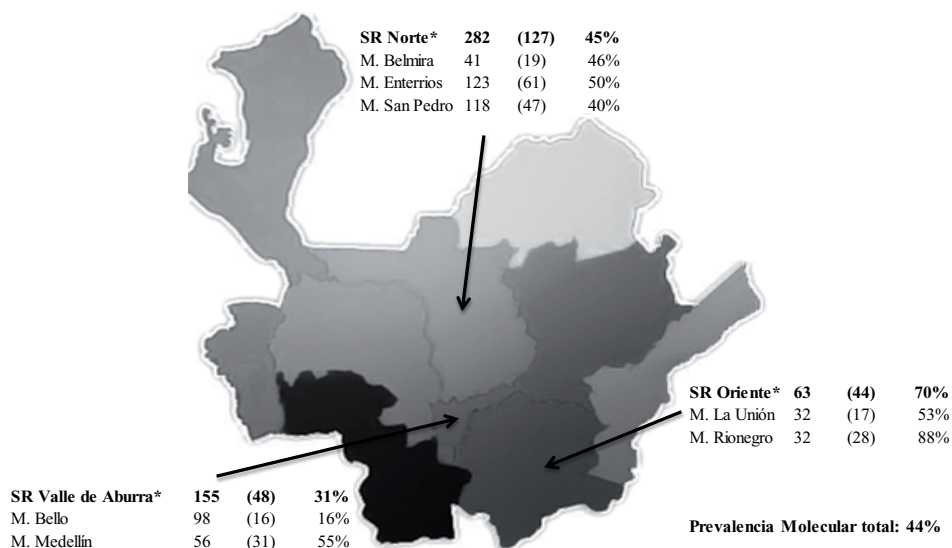


Figura 2. Prevalencia molecular de la LBE por municipios (M) y subregiones (SR) de Antioquía. Se indica el número de vacas positivas dentro de paréntesis, del total de animales muestreados. Significancia estadística para la diferencia entre los datos por subregión * $p < 0,05$ (Prevalence of molecular EBL by municipalities (M) and subregions (SR) of Antioquia. Total of animals sampled and number of positive cows (in parenthesis). *Statistical significance for the difference between the data by subregion $p < 0.05$).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
706 bits(367)	0.0	376/378(99%)	2/378(0%)	Plus/Plus
BLV 466 1		TCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCC		60
FJ808575.1 308		TCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTGGGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCC		367
BLV 466 61		ACTGGGA--ATGCCTCCCAGGCCGATCGAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTAT		118
FJ808575.1 368		ACTGGGACAATGCCTCCCAGGCCGATCGAGGATCCTTTTATGTCAATCATCAGATTTTAT		427
BLV 466 119		TCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG		178
FJ808575.1 428		TCCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGGGATATG		487
BLV 466 179		ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCC		238
FJ808575.1 488		ATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCC		547
BLV 466 239		AGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAG		298
FJ808575.1 548		AGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTGAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAATCAAACAG		607
BLV 466 299		CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAA		358
FJ808575.1 608		CACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAA		667
BLV 466 359		TATTAGTATATAACAAAA 376		
FJ808575.1 668		TATTAGTATATAACAAAA 685		

Figura 3. Alineamiento en BLAST® para un fragmento del BLV. Muestra positiva por PCR (BLV 466) de 376 pares de bases y la secuencia FJ808575.1 del GeneBank (Alignment in BLAST® for a fragment of BLV. PCR positive sample (BLV 466) of 376 bp and the sequence GenBank FJ808575.1).

asociación altamente significativa entre la presencia de la enfermedad y la subregión de procedencia ($\chi^2=29,48$ $p<0,001$).

DETECCIÓN DEL PROVIRUS DE BLV

Para confirmar que la banda de 444 pb obtenida luego de la PCR anidada pertenecía la región *env* viral del BLV, una de las muestras positiva fue enviada a MacroGeneInc® para su secuenciación. A través del programa MEGA® V6 se estableció manualmente la secuencia sentido y antisentido y se obtuvo una secuencia de 376 pares de bases la cual se comparó a través un análisis BLAST® con otras secuencias depositadas en el GeneBank. Se encontró un 99% de identidad con la secuencia FJ808575.1 que se encuentra en el GenBank (**figura 3**), la secuencia de comparación se encuentra clasificada en el genotipo 1 y fue aislada en Argentina en el año 2009. Solo se encontró diferencia en dos nucleótidos (376/378).

DISCUSIÓN

Los bovinos infectados con leucosis bovina enzootica no presentan ninguna sintomatología específica hasta un estado muy avanzado de la enfermedad cuando los linfosarcomas empiezan a hacerse visibles. El diagnóstico temprano es una herramienta fundamental para ejercer control sobre la enfermedad a través de la separación y manejo diferencial de los animales afectados (Dus Santos *et al.*, 2007), de hecho los 500 bovinos de este estudio permanecían en los hatos clínicamente sanos.

La sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas diagnóstico son dos factores críticos (Dus Santos *et al.*, 2007), la técnica molecular PCR es una metodología que confiere resultados altamente confiables sobre la presencia del genoma del BLV en los bovinos. Aunque no es la prueba recomendada por la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2008), se ha demostrado que la amplificación y detección de secuencias DNA o RNA de BLV mediante la PCR constituyen una metodología sensible de diagnóstico directo para la infección con BLV (Fechner *et al.*, 1996; Rubianes *et al.*, 2000; Rola *et al.*, 2002). En contraste las pruebas serológicas AGID y ELISA aprobadas por la OIE (OIE, 2008) pueden verse afectadas por condiciones fisiológicas del animal que afecten el título de anticuerpos en sangre por ejemplo en vacas en periparto, animales inmunodeprimidos y terneros hasta aproximadamente los 6 meses de edad, o la coinfección con virus de la diarrea viral bovina (BVDV) que también disminuye el nivel de anticuerpos contra BLV (Rubianes *et al.*, 2000). La PCR para el virus de la leucosis bovina se basa en secuencias cebadoras del gen *env*, que codifica la proteína de superficie gp51. Este gen está muy conservado, y tanto el gen como el antígeno están generalmente presentes en todos los animales infectados a lo largo de las fases de infección (Baruta *et al.*, 2011).

Como antecedente a esta investigación se realizó un estudio comparativo entre las técnicas de diagnóstico ELISA y PCR anidada, la población de estudio para este trabajo fueron 26 vacas Holstein pertenecientes al hato Paysandú propiedad de la Universidad Nacional de Colombia. La prueba ELISA se realizó a través del

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la PCR se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Se encontró un menor número de muestras positivas (11/26) detectadas por PCR en relación a la ELISA (21/26). La sensibilidad de la PCR fue de 52 % respecto a la ELISA, sin embargo la especificidad fue de 100 % (κ 0,30), por lo que la PCR es capaz de detectar los verdaderamente negativos. A partir de esta información se determinó usar como método de diagnóstico para la siguiente fase de la investigación de LBE la técnica molecular PCR.

La LBE tiene una amplia distribución mundial se considera que en América la enfermedad se encuentra en forma enzoótica con seroprevalencias de 35,9 % en Chile, 18,4 % en Costa Rica, 77 % en Uruguay y 70 % en Brasil (Galdino de Lima, 1999), algunos países de la Unión Europea son libres a la LBE y otros se encuentran en proceso de erradicación (Gillet *et al.*, 2007). En Colombia se muestrearon 14 hatos de lechería especializada (985 vacas) durante el 2004 y la seroprevalencia fue del 44 % con variaciones dentro de fincas del 21 % al 85 % (FEDEGAN, 2014), durante el 2005 y 2009 se procesaron muestras de suero para determinar la seroprevalencia de LBE en algunos departamentos de Colombia; el departamento de Antioquía obtuvo una seropositividad del 28 % y el departamento de Córdoba registró la mayor seroprevalencia de todos los departamentos evaluados (59 %), en tanto el resultado para Colombia fue del 25 % de positividad (Alarcón, 2013). El porcentaje de seroprevalencia para LBE en 1982 en Antioquía fue del 24,9 % (Griffiths *et al.*, 1982), para el 2009 la seroprevalencia fue del 28 %; es decir que la prueba ELISA detectó un cambio del 3,1 % en 27 años. El presente estudio encontró una prevalencia molecular del 44 % para los hatos lecheros del departamento, es decir un aumento del 16 % de positividad en 5 años, lo cual puede estar relacionado con dos factores: el primero de ellos es la diseminación de la infección y/o la enfermedad ligado a malas prácticas sanitarias durante la producción como vacunación, descorne (Darlington *et al.*, 1985) castración o palpación rectal (Divers *et al.*, 1995), además de la transmisión vertical por calostro (Nagy *et al.*, 2007) y por vectores como *Tabanus* spp (Manet *et al.*, 1989). El segundo factor está relacionado con la diferencia entre las dos metodologías de diagnóstico, para el caso de la ELISA los factores fisiológicos del animal pueden influir sobre el nivel de anticuerpos y presentar falsos negativos, mientras que la PCR anidada es una prueba de diagnóstico directo ya que detecta el provirus integrado en los linfocitos B. El municipio de San Pedro de los Milagros es uno de los principales productores de leche en el departamento de Antioquía, para 1989 se encontró una prevalencia del 12,07 % de BLV aplicando la técnica AGID (Aguilar *et al.*, 1989), mientras que este estudio registró una prevalencia molecular del 40 % para este municipio, lo que representa un aumento significativo de la infección por BLV en uno de los municipios con mayor producción de Leche de Antioquía.

La prevalencia molecular de LBE para la raza Holstein, en un estudio realizado por Hernández en el Valle del Cauca fue del 83,3 % (Hernández, 2010), asimismo

en 2012 se encontró un resultado similar con el 77,8 % de positividad para vacas Holstein en producción en el Valle del Cauca (Cadavid, 2012). La subregión y el municipio están altamente relacionados con la presencia del virus, otros estudios también han establecido la dependencia entre el lugar de origen y la presencia de la enfermedad (Hernández *et al.*, 2011). Para Antioquía el presente estudio determinó una prevalencia molecular del 44 %, menor a la registrada en el Valle del Cauca utilizando el mismo método diagnóstico, lo cual puede estar relacionado tanto con el lugar de origen como con las diferencias en los sistemas de producción, ya que el departamento de Antioquía cuenta con una lechería más especializada en cuanto a estructura y manejo de los animales. La seroprevalencia para el departamento de Antioquía durante el 2004 fue del 44 % en ganado lechero Holstein con variaciones dentro de fincas del 21 % al 85 % (FEDEGAN, 2014), mientras que las variaciones entre municipios con el método de diagnóstico por PCR estuvieron entre el 16 % y 88 % y la prevalencia molecular fue igual (44 %).

Este estudio da un primer acercamiento al genotipo del BLV que circula en Colombia en ganado Holstein, de acuerdo con la información arrojada por el análisis de identidad en el programa BLAST® se identificó que la secuencia encontrada en una de las vacas evaluadas tiene una homología del 99 % con la secuencia FJ808575.1 de Argentina y que corresponde al genotipo 1 según Rola-Luszczak *et al.* (2013), lo cual indica que este es uno de los genotipos que circulan en Antioquía, el departamento de mayor producción de leche en Colombia. En América este virus se encuentra ampliamente distribuido, en Estados Unidos se encuentran los genotipos 1 y 2, en Costa Rica el 1 y 5 (Zhao *et al.*, 2007), en Brasil el 1, 2 y 6 (Camargos *et al.*, 2002) y en Chile el 7 (Felmer *et al.*, 2005). Los genotipos 1, 2 y 3 son los más predominantes de acuerdo a un estudio publicado por Inoue *et al.* (2011) en diferentes razas bovinas en Japón. Este estudio identificó que el 12,7 % de los animales presentaron el genotipo 1, el 75 % el genotipo 2 y el 8,3 % el genotipo 3. Para la raza Holstein la prevalencia molecular del virus fue del 95,3 % y el genotipo más frecuente fue el 2 con el 76,7 % seguido del 1 con el 14,1 % (Inoue *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Se ha demostrado la presencia del BLV en la lechería de Antioquía a través de la prueba molecular PCR. La prevalencia molecular del BLV en los diferentes municipios de Antioquía es variable y posiblemente depende de varios aspectos ligados al sistema de producción como las prácticas de manejo. Se obtuvo en general una prevalencia molecular del 44 % y se identificó que una de las muestras secuenciadas pertenece a el genotipo 1, además el lugar de origen de la muestras está altamente relacionada con la presencia del agente infeccioso. La LBE no presenta sintomatología específica y no es de reporte obligatorio, esto en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo demuestra la necesidad de continuar con las investigaciones que contribuyan al mejoramiento de la producción lechera en Antioquía. Sólo metodologías de diagnóstico apro-

piadas podrán generar la suficiente información para desarrollar planes de control sobre este virus.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por su financiación para el desarrollo de esta investigación, proyecto código Quipu 201010012967.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, L.; Giraldo, C. y Veléz, R. 1989. Prevalencia serológica de la leucosis enzoótica bovina en hatos lecheros del municipio de San Pedro Antioquía. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Antioquía Medellín. Colombia.
- Alarcón, G. 2013. Enfermedades reproductivas, un problema con muchas causas. Documento de sitio web. CONtextogadero. <http://www.contextogadero.com/reportaje/enfermedades-reproductivas-un-problema-con-muchas-causas> (13/01/2015).
- Baruta, D.; Ardoino, S.; Brandan, J.; Sosa, R.; Mariani, E. y Albrecht, E. 2011. Leucosis bovina enzoótica. *Cienc Vet*, 13: 9-14.
- Beier, D.; Blankenstein, P.; Marquard, O. and Kuzmak, J. 2001. Identification of different BLV provirus isolates by PCR RFLPA and DNA sequencing. *Berl Munch Tierarztl*, 114: 252-256.
- Cadavid, L. 2012. Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Palmira. Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/9308/1/lascarioartemocadavidgutierrez.2012.pdf> (15/01/2015).
- Camargos, M.; Stancek, D.; Rocha, M.; Lessa, L.; Reis, J. and Leite, R. 2002. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. *J Vet Med B*, 49: 325-331.
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. 2014a. Principales indicadores del mercado laboral. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/ech/ech/bol_empleo_dic_14.pdf (13/01/2015).
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. 2014b. Cuentas Trimestrales Colombia Producto Interno Bruto (PIB) Tercer Trimestre de 2014. http://www.larepublica.co/sites/default/files/larepublica/bol_PIB_IIItrime14.pdf (13/01/2015).
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. 2014c. Encuesta Nacional Agropecuaria 2013. http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2013/boletin_ena_2013.pdf (13/01/2015).
- Darlington, R.; Digiacomo, R. and Evermann, J. 1985. Bovine leukemia virus transmission by dehorning in dairy heifers. *Bovine Prac*, 19: 144-146.
- Divers, T.; Batrtholomew, R. and Galligan, D. 1995. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in commercial dairy herd. *Prev Vet Med*, 23: 133-141.
- Dus Santos, J.; Trono, K.; Lager, I. and Wigdorovitz, A. 2007. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet Microbiol*, 119: 10-18.
- Emanuelsson, U.; Scherling, K. and Pettersson, H. 1992. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*, 12: 121-131.
- Fechner, H.; Kurg, A.; Geue, L.; Blankenstein, P.; Mewes, G.; Ebner, D. and Beier, D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zbl Vet Med B*, 43: 621-630.
- Fechner, H.; Blankenstein, P.; Looman, A.; Elwert, J.; Geue, L.; Albrecht, C. and Ebner, D. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*, 237: 261-269.
- FEDEGAN. Federación Colombiana de Ganaderos. 2014. Carta Fedegán 142: El consumo de sal mineralizada en el sector bovino. Bajo consumo, baja productividad. <http://www.fedegan.org.co/carta-fedegan-142-el-consumo-de-sal-mineralizada-en-el-sector-bovino-bajo-consumo-baja-productividad> (15/01/2015).
- Felmer, R.; Muñoz, G.; Zúñiga, J. and Recabal, M. 2005. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. *Vet Microbiol*, 108: 39-47.
- Galdino de Lima, P. 1999. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos no estado do Pará. Tesis de Maestría. Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. Universidade Federal do Pará. Pará. Brasil. <http://www.ipades.com.br/publicacoes/IPADES-LEUCOSE-ENZOOTICA-BOVINOS-PARA.pdf> (15/01/2015).
- Gillet, N.; Florins, A.; Boxus, M.; Burteau, C.; Nigro, A.; Vandermeers, F. and Willems, L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4: 1-32.
- Griffiths, I.; Gallego, M. y Villamil, L. 1982. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en el ganado de leche en Colombia. División de disciplinas pecuarias. Instituto Colombiano Agropecuario. 982 pp.
- Hernández, D. 2010. Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en razas criollas y colombianas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/2137/15/01/2015>.
- Hernández, Y.; Posso, M.; Benavides, J.; Muñoz, J.; Giovambattista, G. y Álvarez, L. 2011. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agron*, 60: 312-318.
- Inoue, E.; Matsumura, K.; Maekawa, K.; Nagatsuka, K.; Nobuta, M.; Hirata, M. and Okazaki, K. 2011. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Arch Virol*, 156: 1137-1141.
- Manet, G.; Guillbert, X.; Roux, A.; Vuillaume, A. and Parodi, A. 1989. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet Immunol Immunop*, 22: 255-263.
- Miller, S.; Dykes, D. and Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- Nagy, D.; Tyler, W. and Kleiboeker, S. 2007. Decreased periparturient-trasmission of bovine leukemia virus in calostrum-fed calves. *Vet Intern Med*, 21: 1104-1107.
- OIE. Organización Internacional de la Salud Animal. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.11_Leucosis_bovina_enzoótica.pdf (13/01/2015).
- Ott, S.; Johnson, R. and Wells, S. 2003. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med*, 61: 249-262.
- Rola, M. and Kuzmak, J. 2002. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods*, 9: 33-40.
- Rola-Luszczak, M.; Pluta, A.; Olech, M.; Donnžik, I.; Petropavlovskiy, M.; Gerilovych, A.; Vinogradova, I.; Choudhury, B. and Kužmak, J. 2013. The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. *PLoS ONE*, 8: e58705.
- Rubianes, A. and Oriani, D. 2000. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta diagnóstica de leucosis enzoótica bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias UNL Pampa. *Cienc Vet*, 103-109.
- Wu, D.; Murakami, K.; Morooka, A.; Jin, H.; Inoshim, Y. and Sentsui, H. 2003. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. *Virus Res*, 97: 81-87.
- Zhao, X. and Buehring, G. 2007. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. *Virology*, 366: 150-165.