

Deteción del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado

Bovine leukemia virus detection in Creole Colombian breeds using nested-PCR

Darwin Yovanny Hernández-Herrera^{1†}, Andrés Mauricio Posso-Terranova¹, Javier Antonio Benavides¹, Jaime Eduardo Muñoz-Flórez¹, Guillermo Giovambattista², y Luz Ángela Álvarez-Franco^{1*}

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. A.A 237, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, A.A. 296, La Plata, Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

*Autor para correspondencia: laalvarezf@unal.edu.co; †dyhernandezh@unal.edu.co

Rec.: 19.05.11 Accept.: 23.12.11

Resumen

Se evaluó la presencia del virus de la leucosis bovina (VLB) en 360 muestras de ADN de ocho razas bovinas criollas: Blanco Orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (RS) y San Martinero (SM), dos Razas Sintéticas Colombianas: Lucerna (LUC) y Velásquez (VEL) y dos razas foráneas: Brahmán (B) y Holstein (H). Para la detección del pro-virus se amplificó una región del gen *env* viral, mediante PCR anidada. La presencia del VLB fue mayor en la raza HV seguido por ChS (83.3% y 60% respectivamente), VEL y LUC tuvieron el mismo porcentaje (50%), en CAS, CCC y CQT la presencia del virus fue de 26.7%, 23.3% y 16.7% respectivamente; no se encontró el virus en BON, SM y RS. En las razas foráneas la presencia fue de 83.3% para H y 6.7% para B. Se encontró dependencia altamente significativa entre la presencia del VLB y la raza, el sexo y región de origen de la muestra. El promedio de presencia en las razas criollas fue menor que en las foráneas, menor en los machos que en las hembras y en la región norte que en el suroccidente y el centro del país.

Palabras clave: Diagnóstico molecular, ganado criollo, leucosis bovina enzoótica.

Abstract

Using 360 DNA samples from eight Creole bovine breeds Blanco Orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (RS) and San Martinero (SM), two synthetic Colombian breeds: Lucerna (LUC) and Velásquez (VEL) and two introduced breeds Brahmán (B) and Holstein (H); the presence of Bovine Leukemia Virus (BLV) was evaluated through the amplification of a viral gene region *env* (provirus detection – nested-PCR). The percentage of presence and independence test were calculated (X^2). Presence of BLV was higher in HV breed, followed by ChS (83.3% and 60% respectively); VEL and LUC breeds showed the same percentage (50%). In CAS, CCC and CQT the presence of virus was 26.7%, 23.3% y 16.7% respectively. On the other hand, no virus presence was found in BON, SM and RS. For the introduced breeds the presence of virus was 83.3% for H and 6.7% for B. The average of presence for Creole bovine breeds was lower than introduced breeds. A high and significant dependence was found between the presence of BLV with breed, sex and sampling places. The presence was lower in males than in females and in the northern part than the southwestern and central areas of the country.

Key words: Creole cattle, enzootic bovine leukosis, molecular diagnostic.

Introducción

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa producida por un retrovirus, el virus de la leucosis bovina (VLB), que afecta las células de la línea linfoide, los linfocitos B (Beyer *et ál.*, 2002; Dequiedt *et ál.*, 1999). Se caracteriza por inducir tumores (linfosarcoma, LS; linfoma maligno, LM) y/o un incremento sostenido del número absoluto de linfocitos en la corriente sanguínea (linfocitosis persistente, LP) (Dees *et ál.*, 1996).

El VLB pertenece a la familia Retroviridae, posee una transcriptasa-reversa responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir de ARN viral. El ADN formado (provirus) se integra al genoma del hospedero y se conserva en el núcleo de diversas células (Evermann, 1992).

La manifestación clínica de LBE comienza después de dos años de edad como anemia, emaciación e infertilidad. El signo más evidente es el aumento bilateral más o menos simétrico de los ganglios linfáticos explorables, la exoftalmia puede considerarse como una manifestación específica de la enfermedad, así como masas tumorales subcutáneas en diferentes localizaciones (linfadenopatías) (Chamizo, 2005; Malatestinic, 2003; Shell *et ál.*, 2004).

La infección se transmite de forma horizontal o por vía iatrogénica. La prevalencia aumenta a partir de seis meses de edad del vacuno, con la mayor incidencia entre dos y tres años, siendo mayor en hatos de bovinos de leche que en bovinos de carne (Chamizo, 2005).

Las tres pruebas serológicas más usadas en el diagnóstico de la enfermedad son: radioinmunoensayo (RIA), inmunodifusión en agar gel (IGDA) y ensayo inmunoenzimático (ELISA). La IGDA resulta un indicador confiable de infección por VLB y presenta un alto grado de especificidad debido en gran parte a la estabilidad del genoma viral. La prueba no permite distinguir entre los anticuerpos adquiridos pasivamente (calostrales) y los adquiridos mediante infección natural. Las pruebas RIA y ELISA son más sensibles y esta última tiene la ventaja de ser menos costosa, más fácil de realizar y se pueden

analizar muchas muestras provenientes de leche y no de sangre (González *et ál.*, 2001). Una desventaja de estas técnicas es que no permiten detectar animales jóvenes infectados o animales en estadios tempranos de la infección (Chamizo, 2005).

La prueba de hibridación de ácidos nucleídos ('dot blot') es altamente repetible y tiene concordancia con la prueba IGDA. Los resultados con 'dot blot' se obtienen en un periodo de análisis más corto que la IGDA (Chamizo, 2005).

La PCR ha sido utilizada para la detección temprana del VLB en animales menores de seis meses para evitar reacciones falsas positivas, causadas por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes, además, muestra una sensibilidad de 96% y una especificidad de 45% con respecto a la prueba de IGDA (Agresti *et ál.*, 1993; Fechner *et ál.*, 1996).

La principal desventaja de la PCR es la variación de la secuencia nucleotídica de algunos aislamientos del virus, que pueden inducir a errores en la hibridación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores y disminuir consecuentemente, la sensibilidad (Marsolais *et ál.*, 1994). Igualmente, en el proceso de extracción de ADN pueden persistir trazas de inhibidores que afecten la sensibilidad (Fechner *et ál.*, 1996).

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2009) entre 1996 y 2004 en Colombia se presentaron 198 focos de la enfermedad, 1.083 casos y 39 muertes debidas a la leucosis bovina. Los estudios sobre la presencia del VLB en Colombia son variables pues dependen de la región de muestreo de los animales y de la técnica serológica utilizada. En el nororiente del país el porcentaje de presencia varía entre el 3.9% y el 14.64% utilizando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (Aguilar *et ál.*, 1989; Trujillo, 1989; Ruiz, 1995). Ramírez *et ál.* (2002) reportan una presencia del 37.5% en novillas y un 71.9% en vacas. En el departamento de Córdoba se encontró 21.5% de positivos utilizando la técnica de ELISA (Betancur y Rodas, 2008), mientras que en la Sabana de Bogotá

—principal zona lechera de Colombia—se reportó 45.28% de presencia (Alfonso *et ál.*, 1998). Griffiths *et ál* (1982) encontraron prevalencias en ganado de leche de 24.9% para la región Andina, 14.4% para la región Caribe y 15.3 % para el piedemonte de los Llanos Orientales. Utilizando métodos moleculares (PCR-anidado), Muñoz *et ál* (2008) hallaron 25% de presencia del virus.

Colombia es considerado uno de los países más diversos en recursos zoogenéticos, ya que en cada una de las regiones naturales y las cuencas hidrográficas de los ríos Orinoco y Amazonas posee una raza bovina criolla (*Bos taurus*) adaptada, así: Romosinuano y Costeño con Cuernos, en la Costa Atlántica (zona norte); Chino Santandereano y Blanco Orejinegro en la zona montañosa de clima medio; Hartón del Valle en el Valle del Río Cauca; Sanmartinero y Casanareño en las planicies orientales; Caqueteño en el departamento del Caquetá; además, de las razas sintéticas colombianas Lucerna en el Valle del Cauca y Velásquez en Caldas (Martínez-Correal, 1992). Las razas criollas, junto con las razas sintéticas, forman el ganado criollo colombiano (GCC) con una población de 18.231 animales que corresponden al 0.08% de la población total de bovinos del país (Martínez-Correal, 2010).

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del virus de la leucosis bovina en las razas criollas y sintéticas colombianas mediante la técnica molecular PCR anidado.

Materiales y métodos

Se utilizaron muestras de sangre de 30 individuos de cada raza de ganado criollo (Blanco orejinegro (BON), Chino Santandereano (ChS), Costeño con cuernos (CCC), Caqueteño (CQT), Casanareño (CAS), San Martinero (SM), Romosinuano (RS), Hartón del Valle (HV)), de cada raza sintética (Velásquez (VEL) y Lucerna (LUC)) y de las razas foráneas (Holstein (H) y Brahmán (B)). Los animales fueron muestreados en los departamentos de Atlántico, Arauca, Bolívar, Caldas, Caquetá, Cauca, Meta, Santander y Valle del Cauca durante el 2009, para un total de 240 muestras de ganado criollo, 60 de razas sintéticas colombianas y 60 de las razas foráneas. El

tamaño de muestra se calculó con base en los datos de presencia del VLB reportados por Muñoz *et ál* (2008) con 90% de confianza y 0.01 de margen de error máximo absoluto. En el Valle del Cauca se muestrearon HV (seis fincas), B (cinco fincas) y H (dos fincas); ChS, CQT y SM se muestrearon en dos fincas cada uno, situadas en Santander, Caquetá y Meta, respectivamente. En las demás razas sólo se tomaron muestras en una finca. El BON, oriundo de los departamentos de Antioquia y Caldas, fue muestreado en el departamento del Cauca. El 90% de los machos muestreados eran reproductores activos.

El ADN de los individuos se extrajo a partir de muestras de sangre mediante el protocolo de Salting Out (Miller *et ál.*, 1988). La concentración se determinó con ADN del bacteriófago Lambda, utilizando concentraciones conocidas y visualizado mediante geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio (Hernández *et ál.*, 2007). El ADN fue diluido a 10 ng/ μ l. En cada reacción de PCR se utilizaron testigos positivos y negativos suministrados por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia; el ADN de los testigos se extrajo de suero según la metodología descrita por Klein *et ál* (1997).

A partir del ADN de los bovinos se amplificó una región altamente conservada del gen *env* viral utilizando la técnica PCR-anidado (Beier *et ál.*, 2001). La primera reacción se realizó a un volumen final de 30 μ l que contenía 100 ng de ADN, 1.25 mM de cada oligonucleótido (F-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA y R-AACAACAACCTCTGGGGAGGGT), 0.2 mM de cada dNTP, 1X de tampón PCR, 2.5 mM MgCl₂ y 1U de Taq DNA polimerasa. En la segunda reacción de PCR se utilizó como ADN molde 3 μ l del producto de PCR de la primera amplificación y las mismas concentraciones de los otros reactivos con los oligonucleótidos F-CCCACAAGGGCGGCGCCGTTT y R-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG. El perfil térmico incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min, para terminar con una extensión final a 72 °C por 5 min. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas, excepto que la temperatura de hibri-

dación se aumentó a 68 °C (Beier *et ál.*, 2001). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100® Teltier Thermal Cycler, BIO-RAD. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio en una cámara SUB-CELL® GT, BIO-RAD. Una banda de 444bp indicó la presencia del provirus en un individuo (Beier *et ál.*, 2001).

Para los análisis estadísticos se formaron los siguientes grupos: razas criollas (BON, CAS, CCC, ChS, CQT, HV, RS y SM), razas sintéticas colombianas (LUC y VEL) y razas foráneas (H y B); se determinó el porcentaje de presencia del virus para cada raza y sexo. Los animales se agruparon de acuerdo con la región de origen de la muestra así: Norte (CCC, ChS y RS), Centro (VEL), Oriente (CAS y SM) y Sur Occidente (BON, CQT, HV y LUC) del país.

Se realizaron pruebas de chi-cuadrado (X^2) para determinar la dependencia entre la presencia del virus y la raza, el sexo y el

origen de la muestra, utilizando el software SAS versión 9.1 (SAS, 2003).

Resultados y discusión

Este es el primer trabajo reportado en razas de ganado criollo colombiano con utilización de técnicas moleculares para la detección del VLB. Los resultados que se presentan se refieren a la detección del VLB en muestras de sangre de bovinos.

En el Cuadro 1 se incluye la presencia del VLB (%) de acuerdo con la raza y el sexo para cada uno de los grupos raciales. El porcentaje de presencia del VLB fue mayor en las razas HV y ChS (83.3% y 60%, respectivamente), VEL y LUC tuvieron el mismo porcentaje de presencia (50%), y la presencia del virus en CAS, CCC y CQT fue de 26.7%, 23.3% y 16.7% respectivamente.

No se encontró el VLB en las razas BON, SM y RS. Dada la alta prevalencia de la enfer-

Cuadro 1. Presencia del virus de la leucosis bovina (VLB) (%) en razas criollas colombianas, sintéticas criollas y foráneas.

Grupo racial ^a	Razas	Presencia (%)	Por sexo			
			Machos		Hembras	
			No.	(%)	No.	(%)
Criollas	BON	0.0	8	0.0	22	0.0
	CAS	26.7	6	3.3	24	23.3
	CCC	23.3	3	3.3	27	20.0
	ChS	60.0	5	16.6	25	43.3
	CQT	16.7	5	0.0	25	16.7
	HV	83.3	4	13.3	26	70.0
	RS	0.0	7	0.0	23	0.0
	SM	0.0	3	0.0	27	0.0
	Promedio	26.7		4.6		21.7
Sintéticas	LUC	50	0	0.0	30	50.0
	VEL	50	11	20.0	19	30.0
	Promedio	50		10.0		40.0
Foráneas	B	6.7	1	3.3	29	3.3
	H	83.3	0	0.0	30	83.3
	Promedio	45.0		1.65		43.3

a. Criollas: Blanco Orejinegro (BON), Casanareño (CAS), Costeño con Cuernos (CCC), Chino Santandereano (ChS), Caqueteño (CQT), Hartón del Valle (HV), Romosinuano (RS) y San Martinero (SM). Sintéticas colombianas: Lucerna (LUC) y Velásquez (VEL). Foráneas: Brahmán (B) y Holstein (H).

medad en Colombia, este hallazgo puede sugerir una posible resistencia al VLB de estas razas, por lo cual es necesario continuar con estudios en un mayor número de fincas con el fin de relacionar la presencia del virus con los síntomas de la leucosis bovina enzoótica y con marcadores genéticos de resistencia a la enfermedad.

El promedio de presencia en las razas criollas (26.7%) y sintéticas colombianas (50%) fue menor que el promedio en la raza H (83.3%) pero mayor que en B (6.7%). Estos resultados concuerdan con los de Chamizo (2005) quien afirma que existe mayor presencia del VLB en los ganados *Bos taurus* que en los *Bos indicus*, y con Orjuela *et ál* (2000) quienes reportaron que el 9.4% de los *Bos taurus* y el 1.4% de los *Bos indicus* muestreados eran positivos a la enfermedad, mientras que los animales cruzados no lo fueron.

La presencia del virus en los ganados foráneos fue de 6.7% en B y 83.3% en H. De acuerdo con Chamizo (2005) en las razas de ganado de leche la presencia de la enfermedad es mayor que en ganados de ceiba, debido a la mayor exposición de estos animales a fuentes de infección como agujas de vacunas, material quirúrgico, guantes de palpación, entre otros.

La prueba de independencia o asociación mediante chi-cuadrado (X^2) dio como resultado que la presencia del virus depende de la raza ($X^2c = 209.62$; $P < 0.001$), contrario a lo reportado por Betancur y Rodas (2008) quienes no encontraron asociación entre razas cebuinas, europeas y cruzados con la enfermedad. Es de destacar que no se detectó la presencia del virus en las razas BON, SM y RS, lo cual puede ser un indicador del buen manejo y control sanitario que se lleva en los hatos de donde provienen estas muestras o estar relacionado con una posible resistencia al virus, lo cual debe ser comprobado en futuros estudios realizados en un mayor número de hatos, en los cuales, además de la presencia del virus, se estudie la presencia de síntomas de la enfermedad.

La prueba de asociación también mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) para la presencia del virus y el sexo ($X^2c = 0.0842$; $P < 0.0771$) que fue mayor en las hembras que

en los machos, tanto en las razas criollas (21.7% y 4.6%, respectivamente), como en las sintéticas colombianas (40% y 10%, respectivamente) (Cuadro 1). Es necesario señalar que aproximadamente el 90% de los machos muestreados correspondían a reproductores activos. Lo anterior coincide con Betancur y Rodas (2008), quienes reportan que el 68.6% de las hembras y el 31.4% de los machos fueron positivos a la enfermedad. Chamizo (2005) encontró que factores de manejo tales como rutinas de palpación, inseminación artificial y ordeño, entre otras, hacen que las hembras estén más propensas que los machos a contagiarse.

La relación de dependencia entre el virus y la región de origen de las muestras fue altamente significativa ($X^2c = 63.88$; $P < 0.001$). Las razas muestreadas en la zona norte de Colombia (CCC, ChS y RS) tuvieron un 25% de presencia del virus, 13% en la región oriental (CAS y SM), 50% en la región central (VEL), y en el sur-oriente (razas BON, CQT, HV y LUC) 33% de los individuos fueron positivos al virus. Griffiths *et ál* (1982) en ganado de leche encontraron prevalencias del 24.9% para la región Andina. La raza VEL, originaria de la zona centro de Colombia, mostró un 50% de presencia del VLB en este trabajo, siendo las diferencias entre este valor y el reportado por Griffiths *et ál* (1982) debidas a que estos investigadores diagnostican la presencia de la enfermedad y no del virus.

En las muestras recolectadas en el oriente colombiano, en SM no se observó presencia del virus y en CAS el porcentaje de presencia fue del 26.7%, valor más alto que el reportado por Griffiths *et ál* (1982) para ganado de leche (15.3%) en esta misma zona del país.

En los animales de la región norte de Colombia se encontraron presencias de 0% en RS, 23.3% en CCC y 60% en ChS. Orjuela *et ál* (2000) en esta misma región, utilizando la técnica de inmunodifusión, detectaron la presencia del VLB en el 1.5% de animales examinados. En el departamento de Córdoba se encontró un 21.5% de animales positivos utilizando la técnica ELISA (Betancur y Rodas, 2008) mientras que Griffiths *et ál* (1982) reportan prevalencias en ganado de leche del 14.4%. Con excepción de los animales Ro-

mosinuano, los valores de presencia del virus reportados en la literatura son menores que los hallados en el presente trabajo.

En HV y LUC, el porcentaje de presencia del virus fue del 83.3% y del 50% respectivamente, en las muestras evaluadas. Utilizando PCR anidado, Muñoz *et ál* (2008) encontraron 25% de presencia del virus mediante la evaluación de un banco de ADN de diferentes razas, en muestras tomadas en el Valle del Cauca, valor más bajo que el encontrado en el presente trabajo.

Conclusiones

No se detectó la presencia del VLB en las razas BON, SM y RS. Dada la alta prevalencia de la LBE en Colombia, este hallazgo puede sugerir una posible resistencia de estas razas al VLB. La alta presencia del VLB en razas como HV y ChS debe ser investigada con mayor detalle. Es necesario continuar con estudios en un mayor número de fincas, en los cuales se evalúen las condiciones de manejo de los animales y se relacione la presencia del virus con los síntomas de la LBE y con marcadores genéticos de resistencia a la enfermedad.

Agradecimientos

A la Dirección Nacional de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia-Palmira DIPAL, por la financiación (Proyecto 2030000) y a los criadores de Ganado Criollo Colombiano que permitieron la toma de muestras.

Referencias

Aguilar, L.; Giraldo, C.; y Velez, R. 1989. Prevalencia serológica de Leucosis Enzootica Bovina en hatos lecheros del Municipio de San Pedro – Antioquia. Trabajo de grado (Médico Veterinario). Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Medellín, 61 p.

Agresti, A.; Ponti, W.; Rocchi, M.; Meneveri, R.; Marozzi, A.; Cavalleri, D.; Peri, E.; Poli, G.; Ginelli, E. 1993. Use polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res.* 54 (3): 373-378.

Alfonso, R.; Almansa, J. E.; y Barrera, J. C. 1998. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzootica en

la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. *Rev. Sic. Tech. Off. Int. Epiz.* 17 (3): 723-732.

Beier, D.; Blankenstein, P.; Marquardt, O.; Kuzmak, J. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 114: 252-256.

Betancur H., C.; Rodas G., J. 2008. Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev MVZ Córdoba*, 13 (1): 1197-1204.

Beyer, J.; Köllner, B.; Teifke, J. P.; Starick, E.; Beier, D.; Reimann, L.; Grunwald, U.; Ziller, M. 2002. Cattle infected with Bovine Leukemia Virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis, but also persistent B-cell lymphopenia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49 (6): 270-277.

Chamizo, E.G. 2005. Leucosis Bovina Enzootica: Revisión. Revista Electrónica de Veterinaria *RE-DVET*, Vol VI, No 7.

Dees, C.; Godfrey, V. L.; Schultz, R. D.; Travis, C. C. 1996. Wild type p53 reduces the size of tumors caused by Bovine Leukemia Virus infected cell. *Cancer Lett.* 101: 115-122.

Dequiedt, F.; Cantor, G. H.; Hamilton, V. T.; Pritchard, S. M.; Davis, W. C.; Kerkhofs, P.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. 1999. Bovine Leukemia Virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B-lymphocytes. *J. Virol.* 73 (2): 1127-1137.

Evermann, J. 1992. Understanding BLV infection. How far we have come in a decade. *Vet. Med.* 87: 246.

Fechner, H.; Kurg, A.; Geue, L.; Blankenstein, P.; Mewes, G.; Ebner, D.; Beier, D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 43 (10): 621-630.

Griffiths, I. B.; Gallego, M. I.; y Villamil, L. C. 1982. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Colombia: División de Disciplinas Pecuarias, ICA. 168 p.

González, E.T.; Oliva, G.A.; Valera, A.; Bonzo, E.; Licursi, M.; y Etcheverrigaray, M. E. 2001. Leucosis enzootica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria* 21 (2): 12-20.

Hernández, D.; Muñoz, D.; Valencia, N.; Posso, A.; y Muñoz, J. E. 2007. Caracterización molecular del pato criollo colombiano en cuatro departamentos. *Acta Agronómica* 56 (3): 141-145.

Klein, A.; Barsuk, R.; Dagan, S.; Nusbaum, O.; Shouval, D.; Galun, E. 1997. Comparison of methods

- for extraction of the nucleic acid from hemolytic serum for PCR amplification of hepatitis B virus DNA sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (7): 1897-1899.
- Malatestinic, A. 2003. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Can. Vet. J.* 44 (8): 664-666.
- Marsolais, G.; Dubuc, R.; Bergeron, J.; Morrey, J. D.; Kelly, E. J.; Jackson, M. K. 1994. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Invest* 6: 297-301.
- Martínez-Correal, G. 1992. El ganado criollo colombiano blanco orejinegro (BON). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Villavicencio, Meta, COLOMBIA. En *Animal Genetic Resources Information*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP). Pp. 27-35.
- Martínez-Correal, G. 2010. Plan nacional de acción para la conservación, mejoramiento y utilización sostenible de los recursos genéticos animales de Colombia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 180 p.
- Miller, S. A.; Dikes, D. D.; Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16 (3): 1215.
- Muñoz, D.; Posso, A.; y Muñoz, J. 2008. Detección de la leucosis bovina utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev Colomb Cienc Pecu* 21: 153-161.
- Organización Mundial De Sanidad Animal (OIE) Disponible en: http://www.oie.int/esp/es_index.htm 13-07-2009.
- Orjuela, J.; Navarrete, M.; Betancourt, A.; Roqueme, L.; Cortez, E.; Morrison, R. B. 2000. Salud y productividad en bovinos de la Costa Norte de Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 10 p.
- Ramírez, N.; Gaviria, G.; Restrepo, L.; y Gómez, C. 2002. Diagnostico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la Universidad de Antioquia. Tesis de grado (Medico Veterinario) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. 36 p.
- Ruiz, I. 1995. Avance de resultados Municipio de San José de la Montaña. Estudio de infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. Universidad de Antioquia y otras. 29 p.
- SAS. 2003. Users guide for windows environment. 9.1 Ed, Cary, SAS Institute Inc.
- Shell, A.; Heckert, H.; Muller, K. 2004. Case report: lymphosarcoma in a cow. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 111 (1): 38-41.
- Trujillo, L. 1989. Estudio serológico de la Leucosis Bovina en el hato Paysandú. Trabajo de investigación. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. 50 p.