

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE ATENAS

MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

PRESENCIA DE LEUCOSIS VIRAL BOVINA EN SEMEN DE TOROS
SEROPOSITIVOS (*BOS INDICUS*, *BOS TAURUS* Y SUS CRUCES) EN
EXPLOTACIONES GANADERAS EN COSTA RICA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO
DE LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN
BUIATRÍA

BIANCA ABARCA SÁNCHEZ

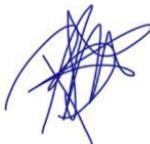
ATENAS, COSTA RICA

2023

DECLARACIÓN JURADA

Yo Bianca Abarca Sánchez, portadora de la cédula de identidad número 702570958, estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN en la carrera de Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, condecorador (a) de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 18 días del mes de septiembre del 2023



(Bianca Abarca Sánchez)
702570958

HOJA DE APROBACIÓN

Este proyecto de graduación modalidad Tesis de grado fue aprobado por el tribunal examinador como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria.



Josué Rivera Castillo
Director de Carrera



Gaby Dolz Wiedner, Ph.D.
Tutora UNA



Josué Varela Mora, Lic.
Lector TFG



Andrés Aguilar Chavarria, M.Sc
Lector TFG

DEDICATORIA

En primera instancia, este trabajo se lo agradezco a Dios por permitirme cumplir con esta gran etapa en mi vida y llenarme con bendiciones de ser médico veterinario.

Además, se lo dedico a mi hermana Rocío Abarca Sánchez, quién ha sido mi mayor apoyo e inspiración como profesional. Siempre fue mi ejemplo a seguir y será un pilar muy importante en mi vida, a pesar de estar en ámbitos profesionales completamente diferentes. Sin su colaboración no hubiese podido concretar mis estudios.

También se lo dedico a mi mamá, Marielos Sánchez Salazar, por nunca rendirse y trabajar fuerte para poder sustentar nuestro hogar y brindarme todo lo posible para poder estudiar y finalizar mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le agradezco a Dios por permitirme estudiar, cumplir todos mis anhelos y sueños, los cuales han sido muy difíciles, pero no imposibles.

Agradecerle a la Dra. Gaby Dolz Wiedner, por brindarme la oportunidad de ser mi tutora, de confiar en mí para esta investigación y por todas sus enseñanzas.

Luego, también quisiera agradecerle profundamente a la Dra. María José Zúniga por la paciencia y por todo el apoyo en el laboratorio al procesar las muestras, las correcciones y todo el aprendizaje.

Al Dr. Josué Varela Mora, quien me acompañó y enseñó desde la toma de muestras de los animales hasta la búsqueda de los productores, también al Dr. Andrés Aguilar por brindarme apoyo con algunas de las muestras y ser lector de mi proyecto.

Agradezco a mis hermanos Víctor Alonso Abarca Sánchez y Rocío Abarca Sánchez, por siempre estar ahí para mí.

Asimismo, agradezco a mi mamá por ser una luchadora, por nunca rendirse ante las adversidades y por brindarme todo el apoyo posible.

De igual manera, envió un fuerte agradecimiento hasta el cielo a Víctor Manuel Abarca Vásquez, el cual fue una figura paterna para mí y que siempre me aceptó como una hija más, por lo que siempre estaré profundamente agradecida.

Le agradezco a mi tío José Sánchez Salazar (Koy) por ayudarme con todos los medios tecnológicos para concretar la investigación y siempre estar pendiente de la sobrina.

Me gustaría agradecer a mi pareja, Johan Quirós Palma, por estar a mi lado siempre y brindarme palabras de aliento para seguir adelante.

A todos los productores que aceptaron formar parte de esta investigación y que me dieron la oportunidad de muestrear sus animales, sin ellos no hubiese podido realizar. Agradezco a mi querido amigo, Leonardo Quirós, por aclararme dudas con respecto a estadística.

Seguidamente, quisiera agradecer a Dr. Julián Pastor de SENASA, por realizar algunos enlaces para poder presentar la tesis a productores y recolección de muestras.

Quisiera agradecer a Corporación Ganadera (CORGOFA) por permitirme tomar muestras en fincas asociadas a la Corporación; especialmente, a la Dra. Carolina Solís, por capacitarme en el uso del equipo para tomar muestras de semen y por entrenarme en la toma de muestras de sangre.

Agradezco a mis profesores de la universidad, por todo lo aprendido, en especial al Dr. Josué Rivera por todo el apoyo brindado y a todos los compañeros cercanos, en especial, a mi compañera Angie Bolaños, en los 7 años de carrera cursada.

Tabla de contenidos

RESUMEN.....	10
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Problemática	13
1.2. Justificación.....	14
1.3. Antecedentes	15
1.4. Objetivos	16
1.4.1. Objetivo general	16
1.4.2. Objetivos específicos.....	16
1.5. Objetivo de la investigación.....	17
1.6. Hipótesis.....	17
1.6.1. Alternativa.....	17
1.6.2. Nula	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Historia, distribución y epidemiología.....	18
2.2. Etiología	18
2.3. Transmisión.....	19
2.4. Patogenia e inmunidad	22
2.5. Signos clínicos	22
2.6. Diagnóstico	23
2.7. Diagnóstico diferencial, tratamiento, control y profilaxis.....	24
2.8. Pérdidas económicas.....	25

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	26
3.1. Tipo de investigación	26
3.2. Ubicación	26
3.3. Recolecta de muestras de sangre y semen	26
3.4. Recolecta de información	27
3.5 Detección de anticuerpos contra BLV mediante ELISA.....	27
3.6 Detección de ADN de BLV en semen mediante PCR anidado	28
3.7. Análisis estadístico.....	29
3.8. Campaña de divulgación.....	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	30
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	36
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	39
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES	40
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS	41

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Potenciales vías de transmisión de BLV.....</i>	21
Figura 2. <i>Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.....</i>	34
Figura 3. <i>Alineamiento de un fragmento del gen gag de BLV de semen de bovino de Costa Rica (Consulta) con la secuencia MN410793 depositada en GenBank (Subject).....</i>	35

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Distribución de las muestras de sangre recolectadas de toros en cinco provincias de Costa Rica y seropositividad a BLV a nivel de animales y fincas para el periodo de septiembre 2022 a junio 2023.....</i>	30
Tabla 2. <i>Toros BLV seropositivos según raza, tipo de explotación y edad en cinco provincias del país en el periodo de septiembre 2022 a junio 2023.....</i>	31
Tabla 3. <i>Cantidad de toros y fincas analizadas, toros y fincas BLV seropositivas según raza y finca de los toros analizados en el periodo de septiembre 2022 a junio 2023 en cinco provincias del país.....</i>	32

Índice de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ARN:	Ácido ribonucleico.
CORFOGA:	Corporación Ganadera.
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático.
G	Fuerzas G, centrífuga.
IDGA:	Inmunodifusión en gel de agar.
IgM:	Inmunoglobulina M.
LVB:	Leucosis viral bovina.
MAb:	Anticuerpo monoclonal.
MAG:	Ministerio de Agricultura y Ganadería.
MgCl ₂ :	Cloruro de magnesio.
OIE:	Organización Mundial de la Salud Animal.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
SENASA:	Servicio Nacional de Salud Animal.
UNA:	Universidad Nacional de Costa Rica.

RESUMEN

Título: Presencia de leucosis viral bovina en semen de toros seropositivos (*Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruces) en explotaciones ganaderas en Costa Rica.

Autor: Bianca Abarca Sánchez.

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad causada por el virus de la leucosis bovina (BLV), el cual infecta los linfocitos B de bovinos. Los animales con BLV permanecerán infectados de por vida y todos desarrollarán anticuerpos, un 30 % desarrollará una linfocitosis persistente y un 10 % linfosarcomas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos en la sangre de toros utilizados como padrotes y la presencia de BLV en semen de toros seropositivos. Se recolectaron muestras de sangre y semen de 290 toros de cinco provincias (Limón, Alajuela, Heredia, San José y Puntarenas) entre septiembre 2022 y junio 2023 en un total de 49 fincas. De los animales se tomaron los siguientes datos: identificación, localización, raza, edad y tipo de producción. Las muestras de sangre se analizaron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el semen de toros seropositivos mediante técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa [PCR] y secuenciación). Del total de toros analizados: 68 (23,4 %) resultaron seropositivos, provenientes de 25 fincas (51,0 %, 25/49). La mayor cantidad de animales BLV seropositivos fueron *Bos taurus* (50,0 %) y sus cruces (36,0 %), toros que se encontraban en ganaderías de leche (41,0 %), y mayores a 6 años (31,6 %). Del total de 68 muestras de semen analizadas se determinó la presencia de BLV en tres animales (4,4 %): dos animales eran de la raza Charbay de edades entre 6 y 10

años, que provenían de la misma finca, una ganadería de cría; mientras que el otro toro era de raza Gyr de 3 años y provenía de una finca lechera. Los tres toros se encontraron en la provincia de Limón. El presente trabajo determinó una alta seroprevalencia de BLV en toros que se utilizan como padrotes en el país, éstos estaban presentes en más de la mitad de las fincas analizadas. Además, se estableció la presencia del virus en el semen de padrotes. Se recomienda realizar exámenes serológicos con el fin de identificar toros BLV seropositivos y no utilizar éstos como padrotes, debido a que representan una fuente de infección para las vacas en la finca. En casos de tener toros con alto valor genético sería posible determinar la ausencia de BLV en el semen mediante PCR.

Palabras claves: leucosis, bovinos, sangre, semen, virus.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La presencia del virus de la leucosis bovina (BLV, por sus siglas en inglés, bovine leukemia virus), que ocasiona la leucosis bovina enzoótica, se encontró por primera vez presente en semen de un toro seropositivo de una lechería de Alajuela en el año 2014 (Leiva, 2014). Aunque ésta es una enfermedad de reporte obligatorio en nuestro país, no se realizan medidas de control o erradicación y se utilizan toros BLV seropositivos en la monta natural, los cuales podrían transmitir el virus a las vacas (Leiva, 2014; Romero et al., 2015). El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de BLV en semen de toros BLV seropositivos.

Para lograr este objetivo se tomaron muestras de sangre y semen de toros en forma aleatoria y en diferentes provincias del territorio nacional. Las muestras de sangre se analizaron mediante la técnica inmunoenzimática (ELISA) para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus. De los toros que resultaron BLV seropositivos se analizó el semen mediante la técnica molecular (reacción en cadena de la polimerasa [PCR] y secuenciación) para determinar la presencia del virus. Los resultados de esta investigación contribuyen a identificar la presencia de BLV en semen de toros que se utilizan en monta natural en Costa Rica y recomendar medidas de control, debido a que podrían transmitir el virus durante la cópula a las hembras. Los resultados se informarán al Sistema Nacional de Salud Animal (SENASA) y se divulgarán mediante ponencias orales a veterinarios y productores.

1.1. Problemática

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad de distribución mundial. En algunos países de Europa se ha erradicado con la implementación de programas de control financiados por el estado, mientras que en el continente americano no existen programas de control y se reportan altas seroprevalencias (Romero et al., 2015). +

El virus de la leucosis bovina fue diagnosticado en Costa Rica por primera vez en el año 1976 y 30 años después se determinó una seroprevalencia de 41,0 % a nivel nacional y un 97,4 % de fincas con animales BLV-positivos (Beita, 2008) e incidencias de 17,48 % y 21,9 %, 6 años después (González, 2014).

La enfermedad es de reporte obligatorio en Costa Rica (Decreto N.º 34669-MAG, 2008); sin embargo, el SENASA no cuenta con un programa de control o erradicación, por lo que el serodiagnóstico de la enfermedad más bien ha incidido en la diseminación de la enfermedad conforme ha pasado el tiempo (Romero et al., 2015).

La infección viral repercute negativamente en la producción y productividad de los animales afectados. Además, obligan al ganadero a desembolsar recursos en servicios veterinarios especializados y tratamientos adecuados. Otras consecuencias importantes son la muerte de animales, las restricciones en las exportaciones e importaciones de ganado y semen de animales seropositivos, por último, el decomiso de carcasas contaminadas en los mataderos. También se ha relacionado con casos de cáncer de mama en humanos (Asadpour y Jafari, 2010; Romero et al., 2015; OIE, 2011; Mejía y Torres, 2018).

No existe aún una vacuna comercial para prevenir la infección viral, por lo que la única forma de controlar la enfermedad es el diagnóstico temprano y evitar la transmisión de BLV a animales sanos, lo cual se puede lograr al eliminar o segregar los animales seropositivos y al implementar buenas medidas de manejo para evitar la transmisión iatrogénica (Romero et al., 2015; González, 2014).

Un estudio realizado por De Vries (2006) estimó las pérdidas económicas en Estados Unidos por aproximadamente \$560 millones, debido a una disminución en la producción de lácteos. En un estudio longitudinal realizado en Costa Rica, se estudiaron los datos productivos y reproductivos de vacas BLV seropositivas y BLV seronegativas durante 4 lactancias. En dicha investigación, se determinó que los animales positivos produjeron menos leche con respecto a los animales seronegativos, estimándose una pérdida por cada lactancia de \$172 a \$333 por cada animal BLV-positivo en la finca (González, 2014).

1.2. Justificación

Un estudio realizado en 1994 determinó que un 40,9 % (61/149) de toros del Pacífico Sur de Costa Rica que se usaban como padrotes eran seropositivos a BLV (comunicación personal, Gaby Dolz). Este dato es relevante, si se considera que en la mayoría de los centros de inseminación exigen que sus toros sean BLV seronegativos. Otro estudio realizado por Leiva (2019) estableció una seroprevalencia de BLV del 43,2 % (164/379) en la población de toros a nivel nacional, además, se determinó por primera vez la presencia del virus en el semen de un toro (2,5 %) de un total de 40 muestras analizadas.

Hasta el año 2018, Estados Unidos exportaba muestras de semen de toros seropositivos a Costa Rica, la práctica se justificaba con la ausencia de

programas de control de BLV en el país. Desde el año 2018, SENASA solicitó como requisitos para la importación de semen bovino que los toros donadores fueran BLV seronegativos (DCA-PG-02-RS-02-IN-015). Sin embargo, estos requisitos no se solicitan para los toros donadores de semen de Costa Rica. Es por este motivo que se planteó la presente investigación, la cual plantea determinar la presencia de BLV en semen de donadores nacionales y recomendar al SENASA, si fuera necesario, requisitos para el uso de semen de bovinos de Costa Rica.

El objetivo del presente trabajo fue identificar toros BLV seropositivos y determinar en éstos la presencia del virus en semen, con el fin de aportar la evidencia científica para poder regular el uso de semen de toros BLV seropositivos en Costa Rica.

1.3. Antecedentes

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad causada por el virus de la leucosis bovina (BLV), el cual infecta los linfocitos B en bovinos de por vida. Todos los bovinos desarrollarán anticuerpos, un 30 % desarrollarán linfocitosis persistente y un 10 % linfosarcomas (Toma et al., 1990; Lassauzet et al., 1991). La transmisión por semen se considera como insignificante (Ortega, 2014; Mejía y Torres, 2018; Marawan et al., 2021); sin embargo, se mantiene una restricción para la importación y exportación de semen de toros BLV positivos a nivel mundial, ya que podrían representar una fuente de infección si el esmegma contiene linfocitos infectados con BLV, los cuales podrían pasar a través de micro lesiones a la sangre de las vacas durante la cópula (Benitez et al., 2019).

Según Ortega (2014), los traumatismos en la región genitourinaria pueden inducir la presencia de linfocitos, aunque una transmisión de BLV se estima poco probable. Un estudio realizado en Argentina por Dus Santos et al. (2006) detectó la presencia de BLV en 5,2 % (9/173) de muestras de semen de toros seropositivos analizados mediante PCR (Trono et al., 2001; Mejía y Torres, 2018). En el estudio de Monke (1986) no se determinó seroconversión en las vacas y las crías, al inseminar vacas BLV-seronegativas con semen de toros BLV-seropositivos.

Un estudio llevado a cabo en Irán por Sharifzadeh et al. (2011) analizó 172 muestras de semen, donde se detectó la presencia de BLV en 36 muestras (20,9 %), este semen se vendía en pajillas para inseminación artificial (IA). Otro estudio realizado en el mismo país analizó 45 muestras por medio de PCR y se detectó presencia de BLV en 5 muestras (11,1 %), un toro BLV seronegativo que resultó positivo en semen y se concluyó que se encontraba en la fase inicial de la infección (Asadpour y Jafari, 2010).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de BLV en semen de toros seropositivos de hatos ganaderos de Costa Rica, mediante la técnica de PCR anidado para valorar una posible transmisión del agente mediante semen.

1.4.2. Objetivos específicos

Determinar la presencia de anticuerpos contra BLV en toros de producciones ganaderas de diferentes provincias de Costa Rica, mediante el uso de un ensayo inmunoenzimático para la identificación de animales seropositivos.

Determinar la presencia de BLV en semen de toros seropositivos mediante PCR anidado para valorar una posible transmisión del agente mediante el semen.

Divulgar los resultados mediante una ponencia oral dirigida a veterinarios y productores, como método de concientización sobre el riesgo del uso de padrotes BLV positivos en producciones ganaderas de Costa Rica.

1.5. Objetivo de la investigación

Identificar la presencia de BLV en semen de toros seropositivos utilizados como padrotes en diferentes producciones ganaderas, tanto lecherías como ganaderías de cría, con el fin de determinar si el semen podría ser una fuente de infección para las vacas.

1.6. Hipótesis

1.6.1. Nula

BLV no está presente en semen de toros padrotes seropositivos en las diferentes producciones ganaderas.

1.6.2. Alternativa

BLV está presente en semen de toros padrotes seropositivos en las diferentes producciones ganaderas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Historia, distribución y epidemiología

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad infecciosa persistente que afecta, especialmente, a bovinos adultos. Esta enfermedad es ocasionada por un retrovirus que infecta células del tejido linfoide, en particular, a los linfocitos B (Gao et al., 2020).

Los estudios de la enfermedad iniciaron en Alemania en el año 1953, después de la Segunda Guerra Mundial y se cree que desde Europa se introdujeron animales positivos a Estados Unidos, de ahí a Canadá y a los países latinoamericanos que reportan alta seroprevalencia de BLV (Johnson y Kaneene, 1991; Baruta et al., 2017; Úsuga, 2018).

En Costa Rica se diagnosticó BLV por primera vez en el año 1976 en la Universidad Nacional mediante sintomatología clínica e histopatología y en 1980 mediante técnica de inmunodifusión en gel de agar y hematología (Jiménez et al., 1995). Un estudio realizado en 1980 estableció una prevalencia de BLV de 39 % en un hato lechero del Valle Central de Costa Rica (Rodríguez et al., 1980). En el año 2008, Beita determinó una seroprevalencia de BLV de 41,0 % a nivel nacional y de 97,4 % a nivel de fincas en hatos lecheros especializados.

2.2. Etiología

El virus de la leucosis bovina (BLV) pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y género *Deltavirus*. Es un virus ARN, de una hebra positiva, diploide y envuelto, 60 a 125 nm de diámetro y simetría icosaédrica (Apaza, 2019).

El virus posee una transcriptasa reversa responsable de transcribir el ARN a ADN, el cual es insertado en el genoma celular como provirus (Bermúdez, 2017). El genoma consta de tres genes: *gag* (codifica para las proteínas de la cápside), *pol* (codifica para la transcriptasa reversa) y *env* (codifica para las proteínas de la envoltura), además de un gen *tax* (codifica para una proteína activadora transcripcional con potencial oncogénico que activa la ruta NF-kappa B) y un gen *rex* (codifica para una proteína exportadora nuclear de mRNAs virales) (Aida et al., 2013). El virus se inactiva con la pasteurización (56°C por 30 minutos) y su envoltura es susceptible a solventes orgánicos. (Apaza, 2019).

2.3. Transmisión

La transmisión de BLV se da por el paso de linfocitos B infectados de un animal a otro. La transmisión más común es la iatrogénica, luego, el contacto directo con sangre, leche y semen que contenga linfocitos infectados; sin embargo, existen pocos estudios sobre la importancia del semen como fuente de transmisión del virus (Gutiérrez, 2020).

En un estudio realizado por Juliarena et al. (2016) se describen las principales fuentes de transmisión establecidas en las producciones ganaderas, como lo son la palpación rectal, procedimientos quirúrgicos, transfusiones sanguíneas, fómites, inyecciones intravenosas con agujas reutilizables, como también la transmisión por artrópodos como tábanos (*Tabanus nigrovitatus*) y garrapatas (*Boophilus microplus*) como vectores mecánicos y murciélagos (Mora, 1997; Nuotio et al., 2003; Beita, 2008; Kobayashi et al., 2010; Cadavid, 2012). El calostro de madres BLV positivas generalmente contienen gran cantidad de anticuerpos que brindan protección a los terneros durante los

primeros 4-7 meses de edad. Solamente existe cierto riesgo con el calostro de vacas de primer parto que pueden presentar calostro de mala calidad (Johnson y Kaneene, 1991). En contraste, leche mastítica de vacas seropositivas que es ingerida por terneros que no cuentan con anticuerpos calostrales pueden significar un riesgo para esos animales, debido a la gran cantidad de linfocitos presentes en la leche mastítica (Johnson y Kaneene, 1991; Yoshikawa et al., 1997).

La transmisión intrauterina de BLV ocurre en un 2 a 10 % de los casos, en madres con linfocitosis persistente hasta en un 20 % de los casos. La transmisión intrauterina parece ocurrir en la segunda mitad de la gestación y es más común en crías con machos (Monti, 2005).

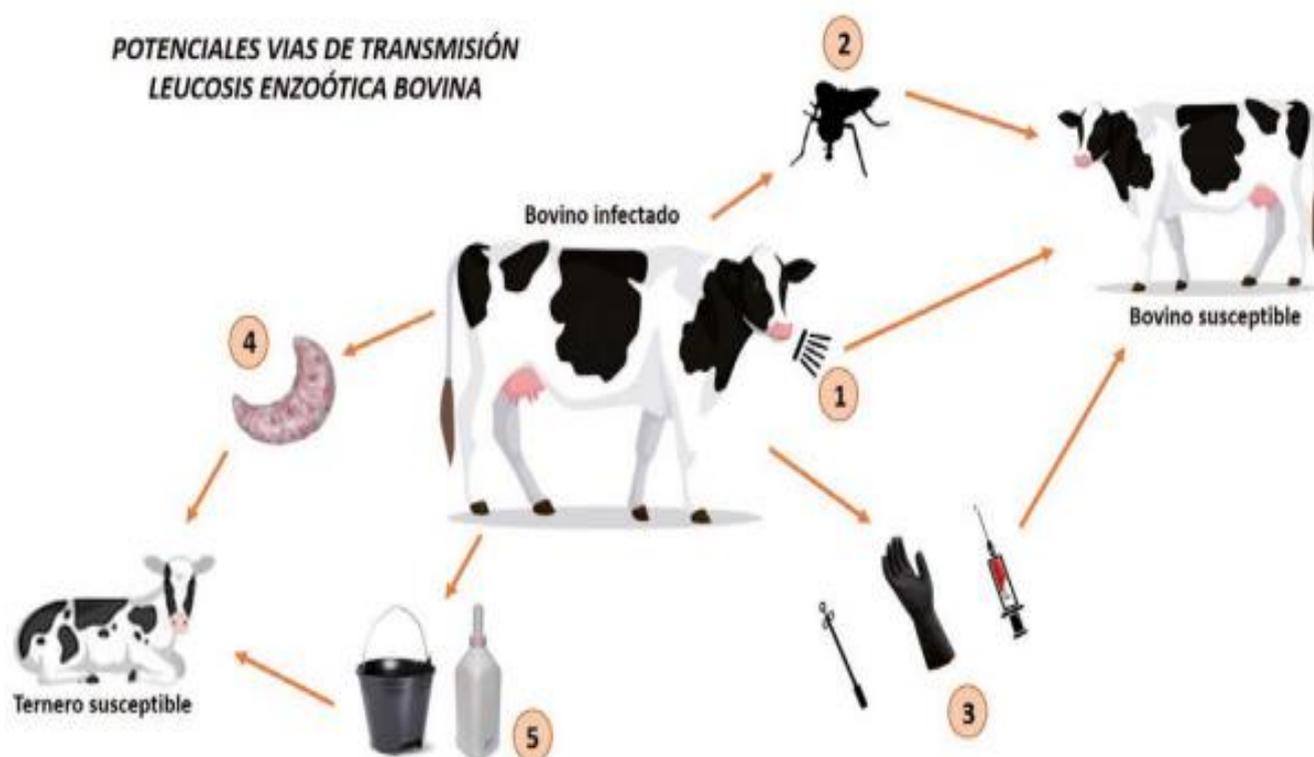
El uso de padrotes seropositivos y el utilizar animales provenientes de fincas con estatus de BLV desconocidos se determinaron como factores de riesgo (Kobayashi et al., 2010). Con relación a los toros seropositivos que se utilizan como padrotes en monta natural, se cree que infecciones del tracto reproductor podrían aumentar el número de linfocitos en el eyaculado y de esta forma propiciar la transmisión de BLV a vacas susceptibles (Kaja y Olson, 1982; Cobo et al., 2011; Scott et al., 2011; Thompson y Goodrich, 2018; Verde, 2019; Sandoval, 2021).

Asimismo, un estudio en Estados Unidos determinó que el uso de inseminación artificial disminuyó la prevalencia de BLV, probablemente, porque el virus no resiste la congelación de las pajillas para IA, en contraste con la monta natural, además, la cópula puede generar traumas vaginales y en caso de una infección del tracto reproductivo del macho podría ocasionar la transmisión de los leucocitos infectados a las vacas (Erskine et al., 2012; Koningy, 2005;

Kuczewski et al., 2021; Sandoval, 2021). También al realizar la extracción de semen mediante electroeyaculador, pueden ocurrir lesiones, las cuales podrían ocasionar la presencia de linfocitos en el semen, y contaminar otras muestras, si se reutiliza el equipo sin desinfectarlo entre cada animal (Sandoval, 2021).

Figura 1

Potenciales vías de transmisión de BLV



Nota: La figura muestra, a través de un recorrido ilustrativo, las potenciales vías de transmisión de BLV. 1- Contacto directo, 2- Dípteros hematófagos, 3- Iatrogénica, 4- Transplacentaria y 5- Calostro y leche. Tomado de Silveira y Fraga (2020).

2.4. Patogenia e inmunidad

La célula diana de BLV son los linfocitos B y al ser un retrovirus transactivador transforma las células con las proteínas codificadas por el gen *tax*, que activan las terminaciones largas repetitivas (LTR) del provirus y éstas a su vez hacen proliferar el linfocito, lo cual ocasiona leucemias e infiltración y hasta acumulación de linfocitos en hígado, corazón, piel, pulmones y ganglios linfáticos (MacLachlan y Dubovi, 2011; Borda, 2019). Aunque se producen anticuerpos contra la proteína de envoltura gp51 y contra la proteína de cápside p24, el provirus no puede ser detectado en las células infectadas ni éstas pueden ser eliminadas y se ocasiona una infección persistente. (Toma et al., 1990; MacLachlan y Dubovi, 2011).

El 100 % de los animales infectados desarrollarán anticuerpos contra BLV, un 30 % desarrollarán una linfocitosis persistente sin signos clínicos evidentes y, únicamente, un 10 % de los animales infectados desarrollarán linfoma maligno (Toma et al., 1990; Trainin y Brenner, 2005; Borda, 2019). El diagnóstico de los anticuerpos es posible entre las 2 a 8 semanas post infección. El título de anticuerpos puede disminuir en la sangre durante el parto, por el paso de los anticuerpos al calostro (Toma et al., 1990; Bulla, 2018).

2.5. Signos clínicos

El 10 % de animales infectados que desarrollarán linfosarcomas, los presentarán generalmente en linfonodos (adenopatías externas o internas), en el tejido retro bulbar (protrusión de ojo), útero (infertilidad, momificaciones), pericardio (reticulopericarditis), riñón, medula espinal (parálisis de miembros posteriores), entre otros tejidos. Los síntomas clínicos ocasionados por los

tumores aparecen generalmente en animales mayores (4-5 años post infección), y la muerte ocurrirá entre 2 semanas a 6 meses después de la aparición de los síntomas clínicos (Morales, 2017; Quispe, 2018; Azapa, 2019; Bulla, 2018). Además, genera debilidad, fiebre, respiración anormal, diarrea, pérdida de peso y disminución de la producción láctea (Radostits, 2002).

2.6. Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico que se utilizan para detectar animales BLV infectados son serológicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (OIE, 2011). Dichas técnicas detectan los anticuerpos en sangre y leche de bovinos. ELISA competitivo se basa en la detección del complejo antígeno-anticuerpo por medio de un antiantígeno conjugado a una enzima y cromógeno, con lo cual se visualiza el complejo antígeno-antiantígeno conjugado (Borda, 2019).

Recientemente, se han desarrollado técnicas moleculares para establecer la presencia del provirus en muestras de sangre, leche y semen. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que se basa en amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN presente en una muestra durante ciclos repetidos, lo que permite la detección del agente antes de la aparición de anticuerpos. Además, hace posible descartar la infección de terneros que consumieron calostro de vacas seropositivas (Choi et al., 2002; OIE, 2011).

En 1990, Miller y Van Der Maaten (1979) recomendaron el diagnóstico de anticuerpos contra las proteínas gp51 y p24 para el diagnóstico de BLV. Rama (2009) comparó resultados obtenidos con técnicas serológicas (IDGA y ELISA)

con las del PCR y concluyó esta última como la más sensible y la IDGA como la menos sensible. En contraste, IDGA y ELISA resultaron ser técnicas más específicas.

2.7. Diagnóstico diferencial, tratamiento, control y profilaxis

Como diagnóstico diferencial de la leucosis bovina enzoótica se debe de considerar la tuberculosis, la paratuberculosis, la reticulopericarditis traumática y el carbunco bacteriano (Borda, 2019).

No existe tratamiento para esta enfermedad (antirretrovirales eficaces o fármacos antitumorales), además sería demasiado costoso para el productor. Tampoco existen vacunas comerciales (Quispe, 2018; Bulla, 2018; OIE, 2018), por eso es importante el control de la infección en el hato: identificar animales seropositivos y separarlos de los animales negativos o descartarlos en caso de ser posible. Sin embargo, en hatos con altas prevalencias es imposible descartar todo el hato. También se torna difícil separar los animales y manejar dos hatos. En este caso es importante prevenir la infección entre los animales mediante buenas prácticas de manejo como el utilizar una aguja por animal, un guante de palpación por animal, desinfectar instrumentos quirúrgicos entre animales, desinfectar la tatuadora o las areteras entre animales, utilizar toros BLV seronegativos para la monta natural, no alimentar con leche mastítica a los terneros o pasteurizar la leche a 60°C por 30 minutos para inactivar el virus y comprar animales de fincas seronegativas (Radostits, 2006; Beita, 2008; Monatorio, 2012; Ruggiero, 2019).

2.8. Pérdidas económicas

Las pérdidas económicas que ocasiona BLV son: en primer lugar, por el decomiso de las canales en el matadero debido a los tumores linfoides; en segundo lugar, por limitaciones en la exportación e importación de animales, semen y embriones; en tercer lugar, por disminución en la producción de leche y los parámetros reproductivos; por último, por los gastos veterinarios (Leiva, 2019).

Un estudio longitudinal realizado por González (2014) durante cuatro lactancias estimó las pérdidas en un grupo de vacas lecheras especializadas que permanecieron seropositivas durante todo el estudio y otras que seroconvirtieron de negativas a positivas durante el estudio, comparado con vacas que permanecieron negativas durante las cuatro lactancias. Este estudio determinó pérdidas aproximadas de \$172 a \$231 por cada animal seropositivo y lactancia y de \$264 a \$333 por cada animal seroconvertido y lactancia (Leiva et al., 2017).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo y por conveniencia, cuyo propósito fue determinar la presencia de BLV en toros *Bos taurus*, *Bos indicus* e híbridos, en diferentes producciones ganaderas de cinco provincias de Costa Rica.

3.2. Ubicación

La recolecta de muestras de sangre y semen se realizó en las provincias de Limón, Alajuela, Heredia, San José y Puntarenas de Costa Rica, entre los meses de septiembre 2022 a junio 2023. Se incluyeron en la investigación 49 fincas en las que se recolectaron muestras de sangre y semen de 290 toros.

3.3. Recolecta de muestras de sangre y semen

La extracción de sangre se realizó de la vena coccígea mediante el uso de vacutainer, aguja de 20 G x 1 ½ y tubos estériles sin anticoagulante. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos hasta formar el coágulo, luego se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio donde fueron centrifugadas a 2000 g por 5 minutos. Finalmente, se decantó el suero en tubos Eppendorf y se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras de semen se extrajeron utilizando un electroeyaculador “Minitube” en pasos de 0,5 voltios de forma manual hasta obtener una muestra aproximada de 1 ml. Estas muestras se almacenaron en tubos Eppendorf los cuales se congelaron a -20°C hasta su análisis.

3.4. Recolecta de información

De los toros muestreados se recolectó la siguiente información: identificación, raza, edad, provincia, ubicación geográfica (por medio de un GPS con sus coordenadas) y actividad productiva.

3.5 Detección de anticuerpos contra BLV mediante ELISA

El análisis de los sueros se realizó mediante el ensayo comercial "ID Screen BLV Competition, Bovine Leukosis Virus (BLV)" de la compañía IDVET (Francia) que detecta anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína gp51 de BLV en sueros de bovinos. Se colocaron 80 µl del diluyente 2 en cada pocillo, 20 µl del suero control positivo, 20 µl del control negativo (por duplicado) y 20 µl de cada muestra a analizar en los pocillos restantes. Se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron los pocillos 3 veces con solución de lavado, se colocaron 100 µl del conjugado anti gp51-peroxidasa (diluido 1:10 en el diluyente 2) en cada pocillo y se incubó por 30 min. Se volvieron a lavar los pocillos con solución de lavado, se colocó 100 µl de solución de revelado a cada pocillo y se dejó reposar por 15 min en oscuridad. Por último, se colocó la solución de parada a cada pocillo y se determinó la densidad óptica (DO) con un espectrofotómetro a 450nm. El ensayo se consideró válido, si el control negativo arrojó una DO mayor a 0.7 y el suero control positivo una DO inferior al 30 % de la DO del control negativo. El porcentaje de inhibición (PI) se calculó con la siguiente fórmula: $PI = (DO \text{ Muestra o Control Positivo}) / (DO \text{ Control Negativo}) \times 100$. Dependiendo del PI que se obtuvo, se clasificó los sueros como positivos ($\leq 50 \%$), sospechosos (entre 50 % y 60 %) o negativos ($\geq 60 \%$).

3.6 Detección de ADN de BLV en semen mediante PCR anidado

La extracción del ADN del semen se realizó agregando fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 (250 µl de fenol, 240 µl cloroformo y 10 µl de alcohol isoamílico) a 500 µl de semen. Se extrajo la fase acuosa y luego se sometió la muestra a extracción mediante el ensayo Blood and Tissue de Qiagen, según las instrucciones del fabricante (DNeasy Blood y Tissue Handbook, 2020). Para amplificar un segmento del gen *gag* del provirus se utilizó el PCR anidado descrito por Barzegar et al. (2021). En la primera ronda, se utilizaron los cebadores BLV-F1 (5`ATG GGA AAT TCC CCC TCC TAT-3`) y BLV-R1 (5`- GTT TTT TGA TTT GAG GGT TGG-3`) para amplificar un producto de tamaño 1175 pb. En la segunda ronda, se utilizaron los cebadores BLV-F2 (5`- AAC ACT ACG ACT TGC AAT CC-3`) y BLV-R2 (5`- GTT CCT TAG GAC TCC GTC G-3`) que amplificaron un producto de 384 pb. Para las reacciones se utilizaron volúmenes finales de 20 µl, que contenían 10 µl de DreamTaqR Máster mix (2X), 0,5 mM de cada uno de los cebadores, 5 µl de agua libre de nucleasas y 3 µl de ADN.

En la primera ronda, se utilizó una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, posteriormente, 30 ciclos de desnaturalización de 94°C por 1 minuto, alineamiento de 55°C por 1 minuto y extensión de 72°C por 2 minutos, por último, una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Para la segunda ronda, se utilizaron 3 µl de ADN de la primera ronda y se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento de 59°C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 40 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1 % y se le colocó 1 μ l de GelRed, 5 μ l del producto del PCR y un marcador molecular de 100 kb. La electroforesis se corrió por 40 minutos a 100 voltios. Muestras que amplificaron un fragmento de 384 pb en el segundo PCR se consideraron positivas y se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias se compararon con el algoritmo BLASTn según la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología.

3.7. Análisis estadístico

La información recopilada durante la toma de muestras (identificación, raza, edad, provincia, ubicación geográfica y actividad productiva) se ingresó en una base de datos digital (Excel), como también los resultados del ELISA y PCR.

Se calcularon frecuencias, se realizó un análisis descriptivo de los resultados y se determinó significancia estadística entre toros seropositivos y negativos con respecto a las variables raza (*Bos taurus* y *Bos indicus*), tipo de producción (leche o cría) y edad (< 6 años y \geq 6 años) mediante prueba de Chi cuadrado de Pearson (nivel de significancia $p < 0,05$), utilizando el lenguaje estadístico "R".

3.8. Campaña de divulgación

Al final de la investigación se presentaron los resultados de la investigación a los productores y funcionarios de SENASA mediante una ponencia oral organizada por la Cámara de Cañeros en San Ramón, el día 29 de junio del 2023.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

La mayoría de las muestras se recolectaron en las provincias de Limón (n=189, 65,1 %) y Alajuela (n=73, 25,1 %). Del total de toros analizados, un 23,4 % (68/290) resultaron positivos para BLV, estos animales se encontraron en un 51,0 % (25/49) de fincas analizadas. En la provincia de Limón, se encontró la mayor cantidad de toros seropositivos, mientras que en Alajuela la mayor cantidad de fincas con toros positivos (Tabla 1).

Tabla 1

Distribución de las muestras de sangre recolectadas de toros en cinco provincias de Costa Rica y seropositividad a BLV a nivel de animales y fincas para el periodo de septiembre 2022 a junio 2023

Provincia	Animales % (+/total)	Fincas % (+/total)
Limón	27,5 (52/189)	55,1 (16/29)
Alajuela	16,4 (12/73)	83,3 (5/6)
Puntarenas	10,0 (1/10)	50,0 (1/2)
Heredia	50,0 (1/2)	100 (1/1)
San José	12,5 (2/16)	18,1 (2/11)
Total	23,4 (68/290)	51,0 (25/49)

Al analizar los toros con respecto a raza, se determinó seropositividades de BLV más altas en *Bos taurus* (50,0 %) y cruces de *Bos taurus* x *Bos indicus* (36,0 %), que en toros *Bos indicus* (10,8 %), también se determinó mayor cantidad de fincas con animales seropositivos *Bos taurus* o cruces (Tabla 2).

La seropositividad de BLV de toros en ganaderías de leche (41,0 %) fue mayor al de toros en ganaderías de cría (20,7 %), igual se determinó mayor

cantidad de fincas lecheras con animales seropositivos que fincas de cría (Tabla 2). El mayor porcentaje de toros BLV seropositivos se detectaron en el grupo de animales mayor o igual a 6 años (Tabla 2).

Se determinó diferencia significativa entre animales BLV seropositivos y seronegativos con respecto a raza ($p < 0,05$) y tipo de producción ($p < 0,05$). Para el caso de la variable de edad no se estableció diferencia significativa ($p > 0,05$).

Tabla 2

Toros BLV seropositivos según raza, tipo de explotación y edad en cinco provincias del país en el periodo de septiembre 2022 a junio 2023

Variabes		Animales	Fincas
		% (+/total)	% (+/total)
Raza	<i>Bos taurus</i>	50,0 (19/38)	50,0 (8/16)
	Cruces	36,0 (31/86)	70,0 (14/20)
	<i>Bos indicus</i>	10,8 (18/166)	28,1 (9/32)
Tipo explotación	Lechería	41,0 (16/39)	60,0 (9/15)
	Cría	20,7 (52/251)	44,1 (15/34)
Edad	<6 años	21,3 (49/230)	50,0 (22/44)
	≥ 6 años	31,6 (19/60)	46,6 (7/15)

En la Tabla 3, se muestran los toros detectados como BLV seropositivos según la raza. La mayor cantidad de toros analizados fueron de la raza Brahman (n=130, 44,8 %), Pardo x Brahman (n=45, 15,5 %) y Nelore (n=28, 9,6 %), detectándose un 10,7 %, 31,1 % y 10,7 % de animales seropositivos, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3

Cantidad de toros y fincas analizadas, toros y fincas BLV seropositivas según raza y finca de los toros analizados en el periodo de septiembre 2022 a junio 2023 en cinco provincias del país

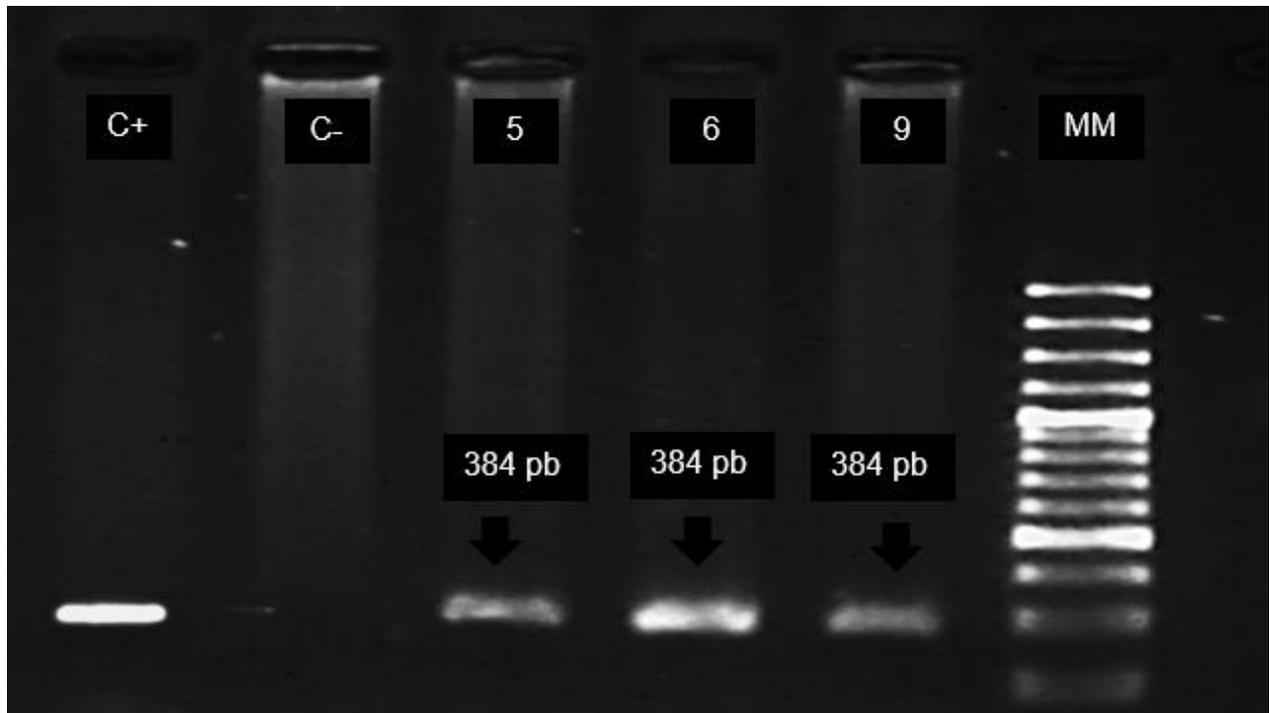
Raza	Animales % (+total)	Fincas % (+total)	# Finca de origen
Bos taurus			
Beef máster	33,3 (1/3)	50,0 (1/2)	7, 30
Charolais	40,0 (2/5)	50,0 (2/4)	18, 23, 25, 3
Holstein	66,6 (2/3)	66,6 (2/3)	24, 30, 33
Jersey	75,0 (3/4)	100 (1/1)	30
Limosin	0 (0/1)	0 (0/1)	20
Pardo suizo	63,6 (7/10)	75,0 (3/4)	16, 24, 27, 35, 47
Senepol	60,0 (3/5)	50,0 (1/2)	14, 20
Simmental	14,2 (1/7)	25,0 (1/4)	33, 39, 45, 49
Subtotal	50,0 (19/38)		-
Bos indicus			
Brahman	10,7 (14/130)	53,8 (14/26)	1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 21, 24, 28, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 49
Gyr	14,2 (1/7)	25,0 (1/4)	16, 30, 32, 41
Nelore	10,7 (3/28)	28,5 (2/7)	6, 8, 24, 26, 28, 39, 41
Sardo negro	0 (0/1)	0 (0/1)	33
Subtotal	10,8 (18/166)		-
Cruces			
Brahman x Holstein	100 (1/1)	100 (1/1)	24
Brahman x Nelore	100 (1/1)	100 (1/1)	20
Brangus	66,6 (4/6)	18,1 (2/11)	7,20, 3, 44

Charbray	23,0 (3/13)	100 (2/2)	20, 22
Girolando	50,0 (5/10)	66,6 (4/6)	7, 29, 42, 46, 48, 30
Pardo x Brahman	31,1 (14/45)	100 (1/1)	17
Simbrah	20,0 (1/5)	25,0 (1/4)	19, 37, 39, 41
Simbra x Brangus	50,0 (1/2)	100 (1/1)	5
Simmental x Holstein	100 (1/1)	100 (1/1)	10
Subtotal	36,0 (31/86)	-	-
Total	23,4 (68/290)	-	25/49

La presencia de BLV en semen se determinó en un 4,4 % (3/68) de las muestras analizadas. Dos muestras positivas provenían de toros que eran utilizados como padrotes en una misma finca de ganadería de cría, ambos de raza Charbray de edades 6 y 10 años, respectivamente. La otra muestra positiva provenía de un toro que era utilizado como padrote en una finca de lechería, raza Gyr lechero, de 3 años. Los tres toros se encontraron en la provincia de Limón, los toros de raza Chabray (muestras 5 y 6) en el cantón de Pococí y la del toro de raza Gyr (muestra 9) en el cantón de Guácimo (Figura 2).

Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR



Nota: Se muestra la amplificación parcial de parte del gen gag de BLV. C+: Control positivo. C-: Control negativo. Muestras de semen positivas 5, 6 y 9. MM: Marcador de peso molecular de 100 kb.

La secuenciación de la muestra 6 mostró una identidad nucleotídica de 100 % (341 pb/341 pb) con una secuencia aislada del semen de un toro de Costa Rica (MN315101) y de una secuencia aislada de sangre de un toro de Irán (MN410793) (Figura 3).

Figura 3

Alineamiento de un fragmento del gen gag de BLV de semen de bovino de Costa Rica (Consulta) con la secuencia MN410793 depositada en GenBank (Subject)

Puntaje	Esperar	identidades	Brechas	Hebra
630 bits (341)	5e-176	341/341(100%)	0/341(0%)	Mas menos
Consulta 1	ATGAAATTTGTAACCGGTTGACAAACTCTACATAGCTTTTCGGCGGGGCCTTGGACGATGG	60		
Sbjct 350	ATGAAATTTGTAACCGGTTGACAAACTCTACATAGCTTTTCGGCGGGGCCTTGGACGATGG	291		
Consulta 61	TGGACCAAGGTTGTAAGGACGAGTAGGGAGATTTTCCAGGCCTGAAGCCAGAGGT	120		
Sbjct 290	TGGACCAAGGTTGTAAGGACGAGTAGGGAGATTTTCCAGGCCTGAAGCCAGAGGT	231		
Consulta 121	TTTGATATTGACTTCTAAGATCCCCGGCGTTGGGCTGAGCTGATTGTTGGGTTAGGGTCC	180		
Sbjct 230	TTTGATATTGACTTCTAAGATCCCCGGCGTTGGGCTGAGCTGATTGTTGGGTTAGGGTCC	171		
Consulta 181	CGTTTTGGGGGTTAAAACCCTGGAGGGTGTGGCCGCTTCAGCGGCGGCTATTGCTGCCG	240		
Sbjct 170	CGTTTTGGGGGTTAAAACCCTGGAGGGTGTGGCCGCTTCAGCGGCGGCTATTGCTGCCG	111		
Consulta 241	TTAGGCTGGTCATATGGGCCGTTTGGTCGACCGGGGAAGCAATATATTGGCAAAGTTGTT	300		
Sbjct 110	TTAGGCTGGTCATATGGGCCGTTTGGTCGACCGGGGAAGCAATATATTGGCAAAGTTGTT	51		
Consulta 301	CTAGGTCAGCCGGAGTAGGGTCGGCCTGCAGGATTGCAAGT	341		
Sbjct 50	CTAGGTCAGCCGGAGTAGGGTCGGCCTGCAGGATTGCAAGT	10		

La divulgación de los resultados se realizó el día 29 de junio del 2023 mediante una ponencia en San Ramón, Alajuela, en la Cámara de Cañeros, en la que estaban presentes funcionarios de SENASA y productores. Se presentaron los resultados de la investigación y se recomendaron estrategias para evitar la transmisión de BLV a otros bovinos, por ejemplo, mediante el uso de padrotes BLV seronegativos en las explotaciones ganaderas. Finalmente, se realizó una mesa redonda para aclarar dudas.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La cantidad de toros detectados como positivos en la presente investigación (23,4 %) fue menor a la seroprevalencia de BLV determinada por Leiva (2019) de los toros a nivel nacional (43,3 %) y los hallazgos de Choi et al. (2002), quienes determinaron seropositividades del 40,2 % en padrotes de fincas ganaderas en Estados Unidos. Dicha diferenciación puede deberse a que en el presente trabajo se analizaron mayor cantidad de toros *Bos indicus* y en las investigaciones realizadas por Choi et al. (2002) y Leiva (2019) se utilizaron, en su mayoría, toros *Bos Taurus*.

Este estudio por conveniencia analizó sobre todo toros (65,2 %) y explotaciones (59,2 %) de la provincia de Limón, con lo que se genera por primera vez información sobre la situación de BLV en toros de esta provincia, en contraste con el primer estudio en el país. Dicho estudio corresponde al de Leiva (2019), quien analizó 21 toros provenientes de dos fincas y todos resultaron negativos. Sorprende el hallazgo de un 55,1 % de explotaciones con toros positivos en esta provincia, similar a la prevalencia a nivel nacional reportada por Leiva (43,3 %) lo que demuestra la amplia distribución del agente en la provincia de Limón (Leiva, 2019) y la relativa alta prevalencia de BLV en toros de la provincia de Limón (27,5 %), esto al considerar que la mayoría eran de razas *Bos indicus* (10,8 %) (Leiva 2019).

Con respecto a la raza, se determinó diferencia significativa entre toros *Bos taurus*, cruces de *Bos taurus* y *Bos indicus* ($p < 0,05$). Por lo tanto, se determinó mayor seropositividad de toros *Bos taurus* y cruces, lo cual concuerda con lo reportado por Marawan et al. (2021) y Leiva (2019) con respecto a que

Bos indicus tiene porcentajes menores de seropositividad. Los autores indican que las diferencias genéticas entre *Bos taurus* y *Bos indicus* podrían influir en la susceptibilidad de los animales a una infección con BLV, además de causar diferentes respuestas inmunológicas, lo que influye en las diferentes tasas de infección entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, como lo describieron Choi et al. (2002) y Marawan et al. (2021). En el presente trabajo, se encontraban 25 toros *Bos taurus* y *Bos indicus* en 8 fincas y, se asumiría que, al recibir el mismo manejo existiría la misma probabilidad de ser BLV positivos o negativos. Sin embargo, de estos toros 15/25 *Bos taurus*, 6/25 cruces y 4/25 *Bos indicus* resultaron BLV positivos.

Según lo obtenido, los toros *Bos taurus* y los cruces de *Bos taurus* x *Bos indicus* tienen más probabilidad de ser seropositivos que toros *Bos indicus*.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre seropositividades de toros de ganaderías de cría y lechería, los toros en lechería mostraron mayor seropositividad de BLV, lo cual concuerda con Erskine et al. (2012). En los sistemas ganaderos con actividad productiva para cría, los animales tienen un ciclo de vida más corto, puesto que viven en pastoreo sin contacto cercano. Dicha condición, indica que se someten a menos manejo de tal forma que la transmisión de BLV por contacto directo o vía iatrogénica es más baja que en lecherías (Marawan et al., 2021).

No se encontró diferencia significativa entre el grupo de animales < 6 años y ≥ 6 años con respecto a la seropositividad de BLV ($p < 0,05$), lo cual coincide con Radostis (2002) que menciona que la edad no tiene relación con la infección y que cualquier animal puede ser infectado. Sin embargo, difiere con Marawan et al. (2021) que apunta a que el riesgo de infección aumenta con el pasar del

tiempo y que existe más probabilidad de encontrar animales seropositivos conforme pasan más tiempo en el hato.

Del semen extraído a los animales seropositivos (68) solamente se logró amplificar BLV en un 4,4 % de las muestras, datos similares a los de Leiva (2019) y Dus Santos et al. (2006) con un 2,5 % (1/40) y 5,2 % (9/173), respectivamente.

Estos resultados demuestran que la presencia de BLV en semen es baja (Cobo et al., 2011). No obstante, es importante que los programas de control y erradicación de BLV consideren el uso de toros BLV seronegativos como padrotes y evalúen o monitoreen el semen de los toros cuyo estado serológico es desconocido y el que es manejado en pajillas para la inseminación artificial (Erskine et al., 2012; Leiva, 2019)

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

En la presente investigación se determinó un 23,4 % (68/290) de toros seropositivos a BLV en 51,0 % (25/49) de fincas. Las seropositividades establecidas por provincias con respecto a las fincas fueron: Limón 55,1 % (16/29), Alajuela 83,3 % (5/6), Puntarenas 50 % (1/2), Heredia 100 % (1/1) y San José 18,1 % (2/11). La mayor seropositividad a BLV en toros se determinó en *Bos taurus* con un 50,0 % (19/38) y sus cruces (36,0 %, 31/86), comparado con *Bos indicus* (10,8 %, 18/166). La mayor cantidad de toros BLV seropositivos se encontró en lecherías especializadas (41,0 %, 16/39), comparado con toros BLV positivos en ganaderías de cría (20,7 %, 52/251). Aunque la mayor cantidad de toros mayores o iguales a 6 años (31,6 %, 19/60) resultaron seropositivos no se encontró diferencia significativa con respecto al grupo de toros menores de 6 años.

La presencia de BLV en semen se detectó en 4,4 % (3/68) muestras, dos toros eran padrotes en fincas de cría de raza Charbray con edades mayores de 6 años y un toro padrote de una lechería de raza Gyr lechero de 3 años; todos provenientes de la provincia de Limón.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda divulgar los resultados obtenidos en la presente investigación a los productores e incentivarlos a utilizar toros BLV seronegativos en la monta natural. Además, exigir la certificación de toro BLV seronegativo al comprar pajillas de semen para inseminación artificial. Aunque existe un control sobre el semen que es importado al país, a nivel nacional no existe esa inspección. Los productores compran el semen libre de brucelosis y tuberculosis, pero desconocen si el animal es BLV positivo. Se recomienda a SENASA regular esta situación.

En caso de comprar un padrote, es indispensable también solicitar una cuarentena de 30 días del animal y luego realizar el examen serológico de BLV para comprobar que el animal es BLV negativo.

En la presente investigación, se constató que muchos productores no tenían conocimiento sobre la leucosis bovina enzoótica y signos clínicos, por lo que tampoco conocían ni aplicaban medidas de control. Se recomienda incentivar a los productores a realizar exámenes serológicos para BLV y así minimizar las fuentes de infección. En casos muy aislados de algún toro de alto valor genético y BLV seropositivo, se podrían enviar muestras de semen de lotes de pajillas para determinar la presencia o ausencia de BLV en esas muestras mediante PCR.

Finalmente, se recomienda informar a los productores sobre medidas de manejo que pueden implementarse en sus fincas. Dichas medidas contribuirían a evitar el contagio entre animales; sobre todo la transmisión iatrogénica (por agujas, guantes, instrumentos, mangas) y determinar antes de adquirir un animal si es BLV seronegativo.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

- Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M. y Takeshima, S. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol*, 4 -328.
- Apaza, J. D. (2019). *Seroprevalencia de la Leucosis Viral Bovina (LVB) en vacunos de la raza Brown Swiss en tres asociaciones del distrito de Paucarcolla*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano].
- Asadpour, R. y Jafari, R. (2011). Detection of bovine leukosis provirus in blood and semen samples of Bulls. *Springer-Verlag London Limited*, 21: 187-191.
- Baruta, D. A., Ardoino, S. M., Brandan, J. L., Sosa, R. E., Mariani, E. L. y Albretch, E. (2017). Leucosis bovina enzoótica. *Ciencia Veterinaria*, 13(1), 9-16
<https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1855>
- Barzegar, H., Mirshahabi, H., Motamed, N., Yavarmanesh, M., Poor, B. M., Moaddab, S. R., y Asgharzadeh, M. (2021). Identification of bovine leukemia virus in raw milk samples in North-West of Iran. *Veterinary Research Forum*, 12(2), 223-227.
- Benitez, O. J., Roberts, J. N., Norby, B., Bartlett, P. C., Takeshima, S. N., Watanuki, S., y Grooms, D. L. (2019). Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 254(11), 1335-1340.
- Bermúdez, L. (2017). Leucosis viral bovina prevalencia e impacto económico en Colombia: *Revisión bibliográfica*.
<http://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/4913/2/Articulo%20Final%20-%20LEUCOSIS%20VIRAL%20BOVINA.pdf>

- Borda, J. U. (2019). *Seroprevalencia de la Leucosis Viral Bovina (LVB) en vacunos de la raza Brown Swiss en tres parcialidades del distrito de Taraco*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano].
- Bulla, D. M., García, D. J., y Pulido, M. O. (2018). Leucosis bovina enzoótica, revisión sistemática de literatura. *Pensamiento y Acción*, (25), 7–18. https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento_accion/article/view/8751
- Cadavid, L. A. (2012). Impacto del virus de la leucosis bovina en la producción de leche. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- 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>
- Choi, K. Y., Monke, D., y Stott, J. L. (2002). Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 14(5), 403-406.
- De Vries, A. (2006). *Determinants of the cost of days open in dairy cattle*. <https://studylib.net/doc/10303437/determinants-of-the-cost-of-days-open-in-dairy-cattle>
- DNeasy, Q. Blood y Tissue Handbook. (2006). Purification of total DNA from animal tissues (Spin-Column Protocol), 28–30.
- Dolz-Wiedner, G. 2015. Entrevista con la Doctora Gaby Dolz Wiedner. Encargada Laboratorio de Entomología, Programa de Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Heredia. C.R. Set. 2015.

- Dus Santos M. J., Trono, K., Lager I. y Wigdorovitz, A. (2006). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Veterinary Microbiology*, 119(1): 10-18. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030101/>
- Erskine, R. J., Barlett P. C., Byrem T. M., Render C. L., Febvay C. y Houseman J.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>
- Gao, A., Kouznetsova, V. L. y Tsigelny, I. F. (2020). Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 149. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7384413/>
- González, A. L. (2014). *Efectos de la infección con el virus de la Leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12905>.
- Gutiérrez, S. E., Lützelshwab, C. M., Barrios, C. N., y Juliarena, M. A. (2020). Leucosis bovina: una visión actualizada. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3).
- Innovative Diagnostic Kits (IDVET). (2022). *ID Screen® BLV Competition*. ELISA kits. <https://www.id-vet.com/produit/id-screen-blv-competition/>
- Jiménez. C., J. Bonilla, G. Dolz, L. Rodríguez, L. Herrero, E. Bolaños, M. Cortez y E. Moreno. (1995). Bovine Leukaemia-virus Infection in Costa Rica. *Journal Of Veterinary Medicine*, 42: 385-390
- Johnson, R. y Kaneene, J. (1991). Bovine Leukemia virus. Part IV. Economic Impact and Control Measures. *The Compendium*. 13, 1727- 1737.

- 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.
- Kaja, R. y Olson, C. (1982). Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leucosis virus. *Theriogenology*. 18:107–112.
- Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K. y Konishi, M. (2010). Risk factors associated within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *Veterinary Research*, 6(1), 1 - 6
<https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-6-1>
- Koning, H. E. y Liebich, H. (2005). *Anatomía de los Animales Domésticos: órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. Editorial Médica Panamericana.
- Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Mason, S., Erskine, R., y van der Meer, F. (2021). Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. *Journal of dairy science*, 104(6), 6358-6375.
- Lassauzet, M., M. Thurmond, W. Johnson y C. Holmberg. (1991). Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. *Veterinary Research*, 55: 264-268.
- Leiva, L., González, A., Beita, G., Romero J., Chacón, J., y Dolz, G. (2017). Situación Nacional de la Leucosis Bovina: aspectos generales, distribución y estrategias futuras. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 28-28.
- Leiva, R. (2019). *Detección del Virus de la Leucosis Bovina en semen de toros en Costa Rica*. (Tesis de grado, Universidad Nacional de Costa Rica).
- MacLachlan, N. y Dubovi, E. (ed). (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier.

- Marawan, M. A., Alouffi, A., El Tokhy, S., Badawy, S., Shirani, I., Dawood, A., y Selim, A. (2021). Bovine Leukaemia Virus: current epidemiological circumstance and future prospective. *Viruses*, 13(11), 2167.
- Mejía, J. B., y Torres, L. S. (2018). Virus de Leucosis Bovina (VLB): Una revisión. *Revista Sinergia*, 1(3), 130-151.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2008). *Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria*. <http://www.mag.go.cr/legislacion/2008/de-34669.pdf>
- Miller, J. y Van Der Maaten, M. (1979). Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *Journal National Cancer Institute*, 62(2), 425–428.
- Monke, D. (1986). Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(8):823–826.
- Monti, G. (2005). *Epidemiology, infection dynamics and effective control of bovine leukemia virus within dairy herds of Argentina: A quantitative approach*. [Tesis de Ph.D, Wageningen University, Germany].
- Mora, E. (1997). Evaluación de prácticas de manejo asociadas al riesgo de la transmisión del virus de la leucosis bovina enzoótica en hatos lecheros de Costa Rica. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica].
- Morales, Á. (2017). *Determinación Seroprevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en Predio*. [Tesis de grado, Universidad de Las Américas].
- Nuotio, L., Rusanen, H. y Neuvonen, E. (2003). Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Preventive Veterinary Medicine*, 5(1-2)9: 43-49.

- Organización Mundial de la Salud (OIE). (2011). *Enzootic bovine leucosis: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines*.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2018). *Leucosis bovina enzoótica. Manual Terrestre de la OIE*.
https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.09_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf
- Ortega, J. I. (2014). *Propuesta de un diseño muestral para la leucosis bovina enzoótica en Nicaragua*. (Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua).
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/4312/1/228624.pdf>
- Quispe, J. A. (2018). *Seroprevalencia de la leucosis viral bovina (LVB) en vacunos Brown Swiss de la cuenca lechera del distrito de Pomata*. (Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano).
- Rodríguez, L., Esquivel, R. y Alvarado, J. (1980). Bovine Viral Leukaemia in Dairy Herds of the Central Valley of Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 2, 183-194.
- 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.
- Ruggiero, V. J. (2019). *Field Studies on the Control of Bovine Leukemia Virus in Dairy Cows*. [Tesis doctoral, Michigan State University.]

- Sandoval Monzón, R. S. (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.*
- Sharifzadeh, A., Doosti, A. y Dehkordi, P. G. (2011). Molecular detection of bovine leukaemia virus (BLV) in the semen samples of Bulls. *World Journal of Zoology*, 6(3), 285-290.
- Silveira, C y Fraga, M. (2020). Virus de la leucosis bovina: un villano silencioso. *Revista INIA*, 61, 37 - 41. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/14492/1/Rev-INIA-61-Junio-2020-p-37-41.pdf>
- Scott, P. H., Penny, C. D. y Macrae, A. I. (2011). *Cattle medicine*. Manson Publishing.
- Trainin, Z. y Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel journal of veterinary medicine*, 60(4): 94-105.
- Toma, B., Eliot, M. y Savey, M. (1990). Animal diseases caused by retroviruses: enzootic bovine leukosis, equine infectious anemia and caprine arthritis-encephalitis. *Revue Scientifique et Technique*, 9(4):1039-1076.
- Thompson, B. S. y Goodrich, E. L. (2018). *Miscellaneous infectious diseases*. En Peek SF, Divers TJ, eds. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. 3^a ed. Missouri: Elsevier.
- Trono, K., Lager, I., y Wigdorovitz, A. (2007). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Veterinary Microbiology*, 119(1), 10–18. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.030

- Úsuga-Monroy, C., Echeverri-Zuluaga, J. J., y López-Herrera, A. (2018). Detección molecular y serológica del virus de la leucosis bovina en una población de vacas Holstein, de Colombia. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(2), 387-399.
- Verde Guzmán, J. P. (2019). Leucosis bovina: actualización sobre los mecanismos de transmisión y estrategias de control y erradicación. [Tesis Médico Veterinario, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]
- Yoshikawa, H., Xie, B., Oyamada, T. y Hiraga, T. (1997). Detection of Bovine Leukemia Viruses (BLV) in mammary tissues of BLV antibody-positive cows affected by subclinical mastitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(4): 301-302. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9152942/>

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS FINALES DE
GRADUACIÓN
UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL**

Alajuela, Costa Rica. 03 de octubre, 2023.

Señores
Vicerrectoría de Investigación
Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales

Estimados señores:

Nombre de sustentantes	Cédula
Bianca Abarca Sánchez	702570958

Nosotros en calidad de autores del trabajo de graduación titulado:

“Presencia de leucosis viral bovina en semen de toros seropositivos (*bos indicus*, *bos taurus* y sus cruces) en explotaciones ganaderas en costa rica”

El cual se presenta bajo la modalidad de:

_____ Seminario de Graduación

_____ Proyecto de Graduación

___x___ Tesis de Graduación

Presentado en la fecha __18 / __09 / __2023__, autorizamos a la Universidad Técnica Nacional, sede __Atenas_____, para que nuestro trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Autorizamos	
Conservación de ejemplares para préstamo y consulta física en biblioteca	x
Inclusión en el catálogo digital del SIBIREDI (Cita catalográfica)	x
Comunicación y divulgación a través del Repositorio Institucional	x
Resumen (Describe en forma breve el contenido del documento)	x
Consulta electrónica con texto protegido	x
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	x
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	x

Por otra parte, declaramos que el trabajo que aquí presentamos es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma conjunta, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizamos que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA). Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, se exime de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional.

Conscientes de que las autorizaciones no reprimen nuestros derechos patrimoniales como autores del trabajo. Confiamos en que la Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar nuestros derechos de propiedad intelectual.

Nombre del estudiante	Cédula	Firma
Bianca Abarca Sánchez	702570958	

Día: ___03 de octubre, 2023_____