

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Ajuste Metodológico Experimental de la Prueba de Inmunodifusión en
Agar gel para la Prueba de Leucosis Bovina, elaborada en Placas
Portaobjeto**

**Experimental Methodological adjustment of the Immunodiffusion Test in
Agar Gel for the Test of Bovine Leukosis, prepared in Slide Plates**

Tesis presentada por el Bachiller:

Onofre Palomino, Edwin Jose

(0009-0005-9368-2526)

para optar el Título Profesional de

Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

Dr. Fernández Fernández, Fernando

(0000-0001-6910-157X)

Arequipa - Perú

2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 27 de Diciembre del 2023

Dictamen: 008934-C-EPMVZ-2023

Visto el borrador del expediente 008934, presentado por:

2009185301 - ONOFRE PALOMINO EDWIN JOSE

Titulado:

**AJUSTE METODOLÓGICO EXPERIMENTAL DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL
PARA LA PRUEBA DE LEUCOSIS BOVINA, ELABORADA EN PLACAS PORTAOBJETO**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**01280819 - VILLANUEVA GANDARILLAS GARY ROLANDO
DICTAMINADOR**



**29614489 - SANZ LUDEÑA CARLO EDISON
DICTAMINADOR**



**40688434 - AGUILAR BRAVO HERBERT MISHAELF
DICTAMINADOR**



Ajuste Metodológico Experimental de la Prueba de Inmunodifusión en Agar gel para la Prueba de Leucosis Bovina, elaborada en Placas Portaobjeto

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
2	www.questionpro.com Fuente de Internet	1%
3	docplayer.es Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
6	view.ru Fuente de Internet	1%
7	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

A la Divina Providencia por velar por mi protección a lo largo de toda mi existencia, otorgándome fortaleza renovada con cada amanecer



AGRADECIMIENTOS

- Reconozco con gratitud a la prestigiosa Universidad Católica de Santa María, cuyos pilares académicos me han permitido forjar mi camino hacia la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.
- No puedo dejar de expresar mi sincero reconocimiento al distinguido Dr. Fernando Fernández, quien no solo desempeñó el crucial papel de asesor de mi tesis, sino que también se destacó por su inquebrantable compromiso con mi formación académica, brindándome enseñanzas invaluable de manera constante.
- Igualmente, agradezco con profunda gratitud al eminente Dr. Gary Villanueva Gandarillas, cuya labor de corrección se ha caracterizado por la sabiduría y la orientación paternal, lo cual ha contribuido significativamente a mi desarrollo académico y profesional.
- En este mismo sentido, debo expresar mi reconocimiento al Dr. Franci Hinostroza Elpanoca, cuya influencia fue fundamental para no permitir que mis fuerzas flaquearan, motivándome a superar obstáculos y perseverar en mi camino hacia el conocimiento y la excelencia.
- Finalmente, dedico palabras de agradecimiento a Eddie García Palomino, cuya confianza inquebrantable en mis capacidades ha sido un motor inspirador, alentándome a creer en mí mismo y a alcanzar metas que parecían inalcanzables. Su apoyo ha sido un regalo invaluable que siempre atesoraré en mi corazón.

RESUMEN

El proyecto de Investigación tiene como objetivo principal desarrollar una alternativa procedimental modificada para el diagnóstico de Leucosis Bovina en láminas portaobjetos, sustituyendo el procedimiento original de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel que se realizaba con placas Petri. Para el cual, se recolectaron muestras sanguíneas de la vena yugular con vacutainer amarillos, las cuales fueron utilizadas para realizar la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel y detectar positivos a la enfermedad de Leucosis bovina. Obteniéndose 28 muestras positivas (17.9%) de un total de 156 muestreados en el año 2023, debido a su simplicidad, bajo costo y facilidad de uso. Se aplicó la Prueba de Chi Cuadrado para analizar la relación entre la edad de los bovinos y la seropositividad a la prueba, concluyendo que no hay una relación estadística significativa. Asimismo, se observaron variaciones en la frecuencia de bovinos seropositivos en diferentes zonas, sin que la zona de procedencia influyera significativamente en la interpretación estadística de resultados. Similarmente, el número de partos y el promedio de producción láctea diaria no mostraron asociaciones estadísticamente significativas con la presencia de Leucosis Bovina. Al llevar a cabo la modificación experimental en la metodología, se obtuvieron resultados positivos y claramente observables al emplear la técnica de inmunodifusión en agar gel en placas portaobjetos que contenían hoyos de 3 mm de diámetro dispuestos a una distancia de 3 mm entre cada uno de otros 6 hoyos creados. Estos hoyos se distribuyeron de manera radial alrededor de un orificio central destinado a contener el antígeno. En la ejecución de la investigación, se lograron con éxito los objetivos propuestos, incluyendo el muestreo sanguíneo en diversos grupos de bovinos y la modificación experimental de la prueba en láminas portaobjetos. Estos logros establecen una base sólida para futuros desarrollos en el campo de la serología bovina, destacando la importancia de la investigación experimental y la adaptación de metodologías para optimizar las técnicas diagnósticas en la salud bovina en el distrito de Vitor.

Palabras clave: Inmunodifusión en agar gel, sueros, bovinos, Leucosis bovina.

ABSTRACT

The main objective of the research project is to develop a modified procedural alternative for the diagnosis of Bovine Leukosis in slides, replacing the original procedure of the Agar Gel Immunodiffusion test that was performed with Petri dishes. For which, blood samples were collected from the jugular vein with yellow vacutainers, which were used to perform the Agar Gel Immunodiffusion test and detect positives for Bovine Leukosis disease. Obtaining 28 positive samples (17.9%) of a total of 156 sampled in 2023, due to its simplicity, low cost and ease of use. The Chi Square Test was applied to analyze the relationship between the age of the cattle and the seropositivity to the test, concluding that there is no significant statistical relationship. Likewise, variations in the frequency of seropositive cattle were observed in different areas, without the area of origin significantly influencing the statistical interpretation of results. Similarly, the number of births and the average daily milk production did not show statistically significant associations with the presence of Bovine Leukosis. When carrying out the experimental modification in the methodology, positive and clearly observable results were obtained when using the immunodiffusion technique in agar gel in slide plates containing 3 mm diameter holes arranged at a distance of 3 mm between each other. 6 holes created. These holes were distributed radially around another central hole intended to contain the antigen. In the execution of the research, the proposed objectives were successfully achieved, including blood sampling in various groups of cattle and the experimental modification of the test on slides. These achievements establish a solid foundation for future developments in the field of bovine serology, highlighting the importance of experimental research and adaptation of methodologies to optimize diagnostic techniques in bovine health in the Vitor district.

Keywords: Immunodiffusion in agar gel, sera, cattle, Bovine leukosis

INDICE

	Págs.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Enunciado del problema.....	2
1.2. Descripción del problema.....	2
1.3. Efecto en el desarrollo local y/o regional.....	3
1.4. Justificación.....	3
1.5. Objetivos.....	5
1.6. Hipótesis.....	5
CAPÍTULO II.....	6
2. MARCO TEORICO.....	7
2.1 Marco Conceptual.....	7
2.1.1. Leucosis Viral Bovina.....	7
a. Sinonimias.....	7
b. Epidemiología.....	7
c. Etiología.....	9
d. Taxonomía y ubicación del VLB dentro de la familia de los retrovirus.....	9
e. Distribución.....	10
f. Patogenia.....	12
g. Transmisión.....	12
h. Signos Clínicos.....	14
i. Lesiones macroscópicas.....	16
j. Diagnóstico.....	20
k. Tratamiento.....	28
l. Control.....	28
2.2 Antecedentes de investigación.....	30
2.2.1 Revisión de tesis Universitarias.....	30
2.2.2. Revisión de trabajos de investigación e Internet.....	32

CAPÍTULO III	33
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1. Materiales	34
3.1.1. Localización del trabajo.....	34
3.1.2. Materiales biológicos.....	34
3.1.3. Materiales de laboratorio.....	34
3.1.4. Materiales de campo	34
3.1.5. Equipos y maquinarias.....	35
3.2. Métodos	35
3.2.1. Muestreo	35
3.2.2. Formación de Unidades Experimentales de Estudio	36
3.2.4. Variables de respuesta	37
3.2.3. Cuadro Operacional de Variables.....	38
3.2.4. Diseño Experimental	38
3.2.5. Análisis Estadísticos	39
CAPÍTULO IV	40
4. RESULTADOS Y DISCUSION	41
CAPÍTULO V	52
5. CONCLUSIONES	53
CAPÍTULO VI.....	54
6. RECOMENDACIONES.....	55
CAPÍTULO VII.....	56
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
CAPÍTULO VIII	62
8. ANEXOS	63
Anexo 1. Mapa o croquis de ubicación del distrito de Vitor, Arequipa.....	63
Anexo 2. Fotografías del trabajo de investigación.....	64

Índice de Tablas

	Págs.
Tabla 1. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, utilizando la prueba de inmunodifusión en agar (IDGA).....	41
Tabla 2. Frecuencia de Leucosis bovina en el distrito de Vitor, según edad.....	43
Tabla 3. Frecuencia de Leucosis bovina en el distrito de Vitor, según procedencia.....	45
Tabla 4. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según número de partos....	47
Tabla 5. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según promedio de producción láctea diaria.....	49

Índice de Gráficos

	Págs.
Gráfico 1. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, utilizando la prueba de inmunodifusión en Agar Gel (IDGA).	41
Gráfico 2. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según edad.....	43
Gráfico 3. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según Zona de procedencia.....	45
Gráfico 4. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según número de partos	47
Gráfico 5. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según promedio de producción láctea diaria.....	49

Índice de Figuras

	Págs.
Figura 1. Diagrama de la estructura del virus de Leucosis bovina	9
Figura 2. Leucosis bovina a nivel mundial	11
Figura 3. Lesiones macroscópica.....	16
Figura 4. Linfomas multicéntrico	16
Figura 5. Linfomas Tímico	17
Figura 6. Linfomas Tímico asemejando un exudado caseoso	17
Figura 7. Bovino Hereford con leucosis cutánea	18
Figura 8. Linfomas de Piel	18
Figura 9. Leucosis Bovina forma Adulta.....	19
Figura 10. Prueba de Inmunodifusión.....	27
Figura 11. Líneas de precipitación entrecruzadas indican la presencia de antígenos diferentes	28
Figura 12. Procesando las muestras en agar gel de agarosa	64
Figura 13. Placa Petri con gel de Agarosa y formación de hoyos de 5 mm	64
Figura 14. Placas Petri luego de incubación de 72 horas con control positivo y con muestras positivas.....	65
Figura 15. Placa portaobjetos con gel de agarosa y hoyos de 3mm y 2 mm	65



CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enunciado del problema

Ajuste metodológico experimental de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel para la prueba de Leucosis bovina, elaborada en placas porta objeto.

1.2. Descripción del problema

La Leucosis bovina es la enfermedad tumoral más frecuente en el ganado Bovino a nivel mundial, está entre los 5 agentes patógenos que más afectan al ganado bovino, la incidencia de esta enfermedad es mayor en el ganado destinado a producir leche respecto al ganado cárnico mayormente dado las condiciones de manejo de este, las cuales facilitan la transmisión (1).

Durante los últimos años, se demostró que el ganado importado a varios países lleva anticuerpos contra el virus de Leucosis bovina (BLV), ya que actualmente solo se permite importar ganado al cual se le realizan análisis de sangre para detectar anticuerpos séricos contra BLV, esto es una condición de importación en la mayoría de los países como criterio de importación (2).

Los principales virus notificados en el control de importación de semen bovino son la fiebre aftosa, lengua azul, leucemia bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, fiebre efímera y enfermedad de la piel nodular (3). Según los valores de prevalencia del 92% a nivel peruano se hace difícil la exportación de Semen a otros países, así como del desarrollo de líneas genéticas de alta productividad por las limitaciones que presenta su comercio a nivel internacional.

Se demostró según hallazgos de investigación, que una vaca seropositiva a VLB, tenía una vida útil más corta que sus contrapartes seropositivas, ya que el ganado seropositivo produjo 3.5% menos leche y además de esto tuvo 48 días no productivos respecto al ganado seronegativo, además se demostró una alta correlación a la infección por *Trichoputon verrucosum* (4).

La presencia de este virus en un hato productivo aumenta el riesgo de enfermedades con etiología infecciosa, en cambio las enfermedades de origen no infeccioso no aumentaron (5), por lo que hablamos de una enfermedad que compromete el sistema inmune del animal afectado, dada la disminución del número de linfocitos T CD4 Y CD8 (6).

Es importante determinar la prevalencia y epidemiología en el País peruano, para de esta manera obtener un conocimiento y mayor comprensión de la situación actual de la Leucosis Bovina y de esta manera revelar la posibilidad de existencia de genotipos enmascarados cuyos cebadores o primeros usados en OIE no pueden identificar (7), aquí recae la importancia de facilitar el diagnóstico de esta enfermedad para obtener resultados rápidos y fiables.

A pesar de las tasas moderadas de incidencia, prevalencia y mortalidad de LBE, se considera relevante desde un punto de vista social y económico porque impone restricciones de movimiento a los animales infectados, reduce su productividad, y provoca la depreciación económica de otros animales criados en la granja infectada. Por lo tanto, EBL se incluye en la lista de enfermedades de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (8).

1.3. Efecto en el desarrollo local y/o regional

La enfermedad de Leucosis Bovina está ampliamente diseminada a lo largo del territorio peruano, con una prevalencia de 92,7% (1). Lo que se traduce en la disminución de los índices productivos del ganado ya que existe una relación directa entre la prevalencia de la enfermedad, disminución de los índices productivos y de calidad láctea (9), así como el deterioro de la salud del ganado dada la inmunosupresión producida por la infección con VLB(Virus de Leucosis Bovina), que predispone a la aparición de otras enfermedades infecciosas tanto de origen Viral, Bacteriano y Parasitario.

1.4. Justificación

1.4.1. Aspecto General

Este trabajo de investigación tiene como finalidad, establecer un cambio procedimental respecto a la prueba de inmunodifusión en Agar Gel, el cual se realizaría en placas portaobjeto para diagnóstico de Leucosis Bovina.

1.4.2. Aspecto Tecnológico

La Medicina Veterinaria es una ciencia en constante expansión ya que año a año surgen nuevas teorías y descubrimientos que no hacen más que facilitar el trabajo del Médico Veterinario, ya que aportan nuevas alternativas de diagnóstico, así como del manejo de pacientes.

Para el diagnóstico de Leucosis Bovina se utilizan métodos de diagnóstico serológico como ELISA que mide títulos de anticuerpos, Inmunodifusión en Agar gel que indica la presencia de glicoproteína P51, así mismo como otra alternativa existe el diagnóstico molecular por medio de PCR para detectar la presencia de antígenos virales (8).

Poder establecer una alternativa rápida que facilite el diagnóstico de esta patología, evaluamos la posibilidad de modificar la prueba de inmunodifusión en Agar Gel, al realizarla en placas portaobjetos para de esta manera disminuir el tiempo mismo que requiere la prueba diagnóstica.

1.4.3. Aspecto Social

Es de alta importancia tanto para la salud pública como para el sector productivo, ya que dada la similitud del Virus de Leucosis Bovina (BLV) con los virus linfotrópicos T humanos 1 y 2 (HTLV1 y HTLV2), se ha demostrado que la infección con dicho virus podría permitir el desarrollo de linfoma en Humanos (10), además de generar pérdidas invisibles para el ganadero dada la alta tasa de morbilidad de la enfermedad.

1.4.4. Aspecto económico

La infección por Leucosis Bovina genera grandes pérdidas económicas, principalmente por la muerte de animales en producción por Leucemia, Linfosarcoma y eliminación prematura de animales, así mismo, las restricciones en el comercio internacional de Bovinos y Material genético (1).

Otras causas de pérdidas económicas serían los costos de reemplazo de animales, diagnóstico y atención Veterinaria, pérdida de terneros y la pérdida de 10 meses de producción láctea, esto es significativo en caso se tenga un gran número de cabezas de ganado en etapa productiva ya que se traduciría en menores índices de ganancia económica. Además de esto dada la naturaleza subclínica de la enfermedad los animales que desarrollan tumores lo harán generalmente en la etapa adulta, es decir en la etapa de mayor producción lo que se traduce en mermas y eliminación de los animales en los hatos lecheros (11).

1.4.5. Importancia

La importancia de este trabajo recae en mitigar la diseminación de la enfermedad y por medio de esto establecer nuevas medidas de manejo del ganado lechero y cárnico siendo el primero el que más favorece la propagación de la enfermedad, de detectarse la presencia de animales seropositivos en hato lechero o cárnico, se podrían establecer

nuevas medidas de control y manejo del ganado para de esta manera disminuir el impacto económico que significa tener ganado seropositivo Leucosis bovina.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos Generales

- Elaborar una alternativa procedimental a la prueba de Inmunodifusión en Agar gel para el diagnóstico de Leucosis Bovina.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia de Leucosis bovina en el distrito de Vitor, según edad, procedencia local, número de partos, Promedio de Producción láctea diaria.
- Realizar el ajuste metodológico de la prueba de Inmunodifusión en agar gel en placas porta objeto y hoyos en dos especificaciones de 3 mm y 2 mm de diámetro y distancia entre hoyos.

1.6. Hipótesis

Dado que las condiciones epidemiológicas de la región Arequipa permiten la presencia de Leucosis Bovina, es probable que al utilizar la prueba de inmunodifusión en Agar Gel se encuentre una frecuencia alta en la zona de estudio, y que la modificación de la técnica pueda dar resultados positivos.



CAPÍTULO II

2. MARCO TEORICO

2.1 Marco Conceptual

2.1.1. Leucosis Viral Bovina

a. Sinonimias.

A esta enfermedad se le atribuyeron muchas sinonimias como Leucosis linfoide, leucemia bovina, linfosarcoma, linfoma maligno, Leucosis enzoótica o Leucosis endémica (12).

b. Epidemiología.

La Leucosis bovina es una enfermedad de curso crónico generalmente, en la que se encuentran circulando una gran cantidad de linfocitos de carácter neoplásico en casi todos los órganos del cuerpo, es de alta mortalidad además de esto afecta a bovinos de todas las razas y edades. En estudios se demostró que en el ganado lechero existe una mayor prevalencia comparado al ganado cárnico, esta diferencia respecto al ganado lechero puede mayormente deberse a las prácticas de manejo, factor importante para la transmisión del Virus de la Leucosis Bovina (12).

Esta enfermedad no se propaga rápidamente con tasas de infecciones pequeñas con una prevalencia del 100% en animales de un mismo estable, y una mortalidad del 2 al 5%, siendo mayor la prevalencia en vacas lecheras por sobre el ganado cárnico. Así mismo es posible relacionar el tamaño del colectivo con una frecuencia alta de linfoma, lo que refleja las frecuencias altas de infección por Leucosis en grandes colectivos. Otros factores contribuyentes como nutrición, infecciones concurrentes y factores estresantes ambientales y meteorológicos no se han estudiado lo suficiente (13).

Normalmente tiene cuatro formas de presentación:

- Forma Juvenil: se presenta normalmente antes del primer año, aunque puede presentarse previo al nacimiento, involucrando todos los nódulos linfáticos y órganos viscerales.
- Forma Tímica: se presenta en bovinos de edades entre el año y medio a dos años y medio. Cursa provocando tumores en el timo y nódulos linfáticos de cualquier parte del cuerpo.

- Forma Cutánea: se presenta en animales de dos a tres años. La regresión de las lesiones es posible, a lo que también predispone a la forma adulta de la enfermedad.
- Forma Adulta o Multicéntrica: aparece entre los 4 a 8 años, no existe una localización específica de los tumores ya que estos pueden formarse en todos los órganos linfáticos como nódulos linfáticos, riñón, bazo, corazón, cordón espinal en su porción lumbar, útero, abomaso y tejido linfático retrobulbar (12) (14).

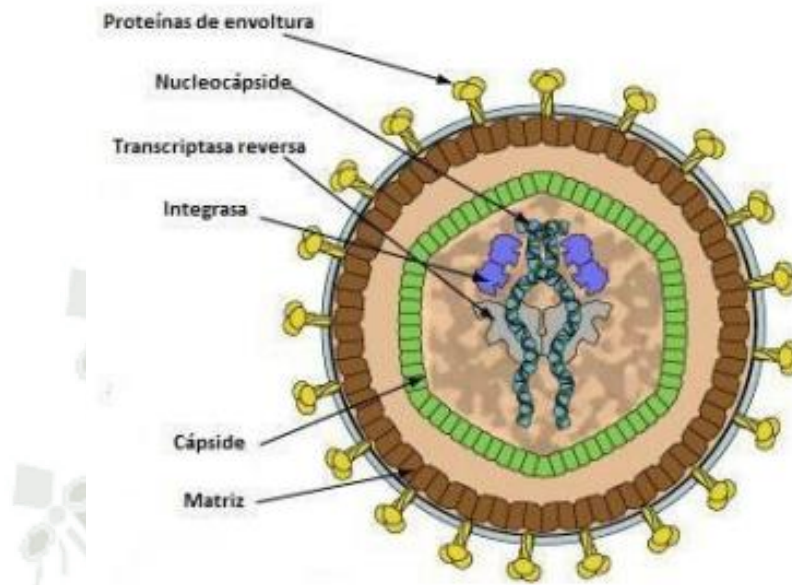
- **Anomalías Cromosómicas no aleatorias en el Linfoma Bovino.**

Si bien es conocido el mapa genético del virus de la leucemia Bovina (BLV), aun no se conoce el mecanismo por el cual la infección por BLV da como resultado la transformación y restricción del linaje de células B neoplásicas. Para lo cual se realizó un estudio que buscaba obtener nuevos conocimientos sobre la patogenia y mecanismos de génesis tumoral inducida por BLV mediante la determinación de los cariotipos de BLV asociados a linfomas en bovinos, en donde se encontraron entre las más frecuentes, adquisición de cromosomas adicionales (23-29). Trisomía en cromosomas 5 y 7, translocaciones robertsonianas e isocromosomas, también se encontraron reordenamientos en los cromosomas 10,12, 23 y 26, monosomía X, trisomía X y translocaciones del cromosoma X.

Los cromosomas 2, 3, 8, 9, 11, 13, 14, 19 y 21 estuvieron involucrados con poca frecuencia en cambios estructurales o numéricos. Los reordenamientos estructurales de los cromosomas 10, 12, 23 y 26 pueden reflejar anomalías primarias que ocurren tempranamente en la transformación de las líneas celulares linfocíticas., mientras que la trisomía en el 5 par puede ser una anomalía secundaria común (15).

c. Etiología

Figura 1. Diagrama de la estructura del virus de Leucosis bovina



*De Instituto Suizo de Bioinformatica (16).

d. Taxonomía y ubicación del VLB dentro de la familia de los retrovirus

- Familia:** *Retroviridae* (17)
Subfamilia: *Orthoretrovirinae*
Género: *Deltaretrovirus*
Especie: Virus de la Leucosis bovina
Subfamilia: *Spumaretrovirus* (18)

- El virus

El virus de la Leucosis bovina es un virus de tipo ARN perteneciente a la familia *Retroviridae*. Esta familia incluye virus causantes y no causantes de tumores en algunas especies incluyendo el hombre. La partícula viral es esférica, de 80 a 100 nanómetros de diámetro, está recubierta con unas proteínas de proyección de superficie.

Se cree que la glicoproteína de envoltura del virus gp51, interactúa con un receptor de superficie celular, iniciando una endocitosis mediada por el receptor, lo que lleva a entrar en la célula del huésped. Dentro de la partícula hay tres estructuras de proteínas no glicosiladas, la matriz, el nucleocápside y el núcleo. Tres enzimas, la transcriptasa inversa, la integrasa y una proteasa también se empaquetan dentro del virión. Durante la replicación, el ARN viral se convierte

en ADN por medio de la enzima transcriptasa inversa. Esto permite que los retrovirus se integren en el ADN del huésped, estableciendo una infección que persiste durante la vida del animal. El virus de la Leucosis bovina está presente en una subpoblación de linfocitos circulantes, donde se puede encontrar su información genética integrada en múltiples sitios del ADN celular. Los linfocitos de los tumores inducidos por BLV normalmente son del Linaje de Células B (Linfocitos B).

Las células tumorales son monoclonales u oligoclonales para el sitio de integración de VLB. Hasta ahora no se ha observado evidencia de un sitio de integración común para el provirus VLB en diferentes tumores. Es posible que el VLB no sea viable mucho tiempo fuera del entorno del anfitrión.

Se inactiva fácilmente por la exposición a la luz ultravioleta, el calentamiento a 56°C durante 30 minutos y con pasteurización. Sin embargo, el virus puede seguir siendo viable en la sangre almacenada a 4°C durante al menos dos semanas (19).

- **Genoma Retroviral**

Se compone de dos copias idénticas en sentido positivo, ARN de una sola cadena (19). El genoma de un retrovirus es diploide, contiene 2 moléculas idénticas de ARN no covalentemente unidas en los extremos de 5'. Cada segmento haploide es una sola cadena lineal de moléculas sensoriales de 5Kb. que está tapada en el extremo de 5' y en el extremo poliadenilado de 3' (20).

- **Retropepsina del Virus de Leucemia Bovina**

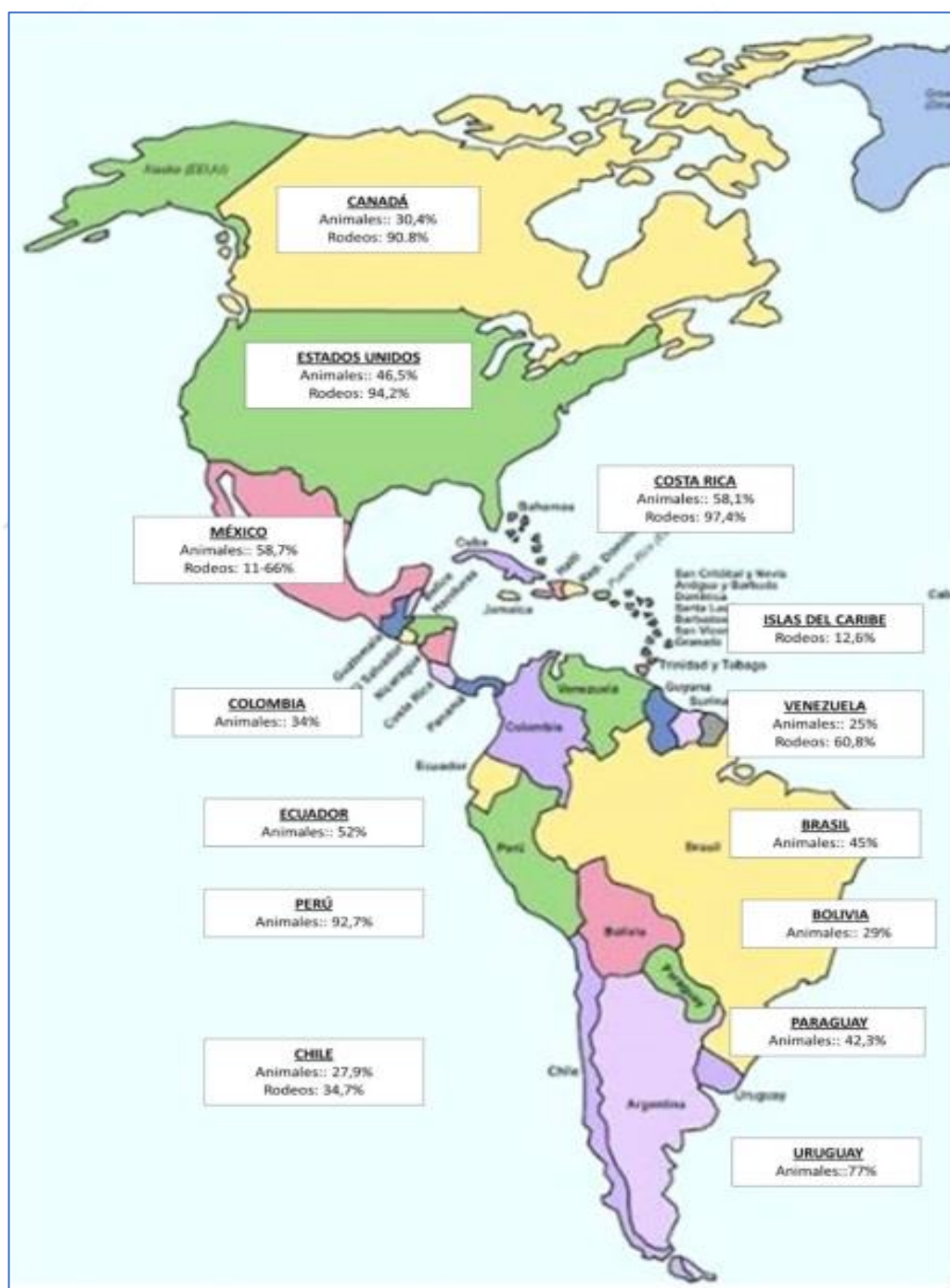
Se evidenció experimentalmente la existencia de retropepsina al someter las proteínas del Virus de Leucosis Bovina, a inmunoprecipitación, se analizó la composición de aminoácidos y la secuencia de 14 kDa de proteína lo que verificó la presencia del nucleótido verificado en la secuencia de datos y sugirió que la proteasa se produce por un mecanismo de cambio de marco ribosomal, a esta proteína también se le denomina BLV proteasa o proteinasa BLV (21).

e. **Distribución**

El Virus de la Leucosis Bovina se distribuye en todo el mundo, pero con marcadas diferencias regionales en la prevalencia. Es más común en América del Norte y del

Sur, Australia y algunas regiones de África. En Europa Occidental, el BLV se ha erradicado en gran medida en los últimos años, pero sigue siendo común en muchas zonas de Europa del Este. Además de causar problemas significativos de salud animal, la Leucosis bovina también puede representar una de las principales causas de pérdidas económicas (19).

Figura 2. Leucosis bovina a nivel mundial



*De Gutierrez, Silvina (1).

f. Patogenia

Una vez ingresado el virus al interior de las células, hay una interacción entre el genoma viral y los genes celulares. Esto provoca que los retrovirus mantengan un estado de latencia o que la infección progrese a un estado de linfocitosis persistente o linfosarcoma. Las principales células blanco para el virus de la leucemia bovina son los linfocitos B, los linfocitos T también pueden llegar a infectarse.

Además de la formación de linfosarcomas un trastorno benigno llamado "linfocitosis persistente" ocurre hasta en un 30 % del ganado seropositivo. El ganado con linfocitosis persistente tiene un mayor número de linfocitos infectados con Virus de Leucosis bovina y una mayor posibilidad de eliminar el virus (12).

g. Transmisión

El virus está presente en el calostro y la leche, en las secreciones traqueales, bronquiales, y más raramente, en las secreciones nasales y la saliva de los animales infectados. El virus también se encuentra en la fracción celular de la sangre, pero no en el plasma o el suero a menos que se haya producido una hemólisis. Sin embargo, no se ha encontrado en las heces ni en la orina y probablemente esté ausente del semen de la mayoría de los toros infectados. Un número muy pequeño de células sanguíneas infectadas son capaces de transmitir BLV. Tan solo 0,1 ml de sangre completa de una vaca infectada puede ser infecciosa cuando se administra en forma subcutánea al ganado (19).

Se estimó que la transmisión uterina se da en aproximadamente el 18% de los casos, en términos de infectividad, la sangre calostro y leche se consideran como medios para la transmisión por contener un número significativo de linfocitos infectados, sin embargo, cualquier contacto con leucocitos infectados puede ocasionar la infección.

La transmisión horizontal es más común, como el uso de instrumental sin buena limpieza demostró altas tasas de transmisión de LVB. En general el material no esterilizado usado en las cirugías y el uso de una aguja para varios animales aumenta el riesgo de infección. Se ha comprobado que la palpación rectal usando el mismo guante para varias vacas puede ser una vía de diseminación de la enfermedad dentro de un hato (10).

Se ha observado una mayor tasa de infección que coincide con el manejo reproductivo de las vaquillas, tal vez por la exposición a ganado de más edad, así como con la palpación rectal (12).

La infección experimental en ovejas al inyectar semen libre de leucocitos demostró que dicho semen no transmite la enfermedad, siendo la venta de semen libre de leucocitos una alternativa a países con seroprevalencias altas que cuentan con genéticas de elevado valor productivo, siendo quizás obstaculizado por el coste que significa la obtención de semen libre de leucocitos (22).

En ensayos de transmisión del virus a conejos, se demostró que estos eran seropositivos a lo largo del tiempo que fueron evaluados (2 años), expresando siempre anticuerpos contra la glicoproteína gp51, Siendo la prueba de inmunodifusión en Agar gel la que se utilizó en estas pruebas experimentales ya que demostró una alta especificidad al mismo. Además de que la inoculación experimental de monocitos y macrófagos producía animales persistentemente infectados (23).

En una investigación donde se infecta experimentalmente a búfalos, se demostró que, si bien todas las subespecies de búfalos eran susceptibles a la infección experimental, la infección natural solo fue demostrada en Búfalos de agua (24).

Se sabe que la infección por el virus tiene una distribución mundial, en climas templados el virus tiende a transferirse en forma iatrogénica de linfocitos infectados, en los climas cálidos existen áreas densamente poblados por insectos hematófagos, hay indicios de la transmisión por insectos (10).

Se examinó la microbiota fecal de vacas lecheras ya que esta puede verse afectada por la inmunomodulación resultante de infecciones virales y se encontró que la microbiota de vacas infectadas con BLV difería de las vacas no infectadas. Lo que explica el porqué de la transmisión fecal del virus de Leucosis Bovina (25).

Según recientes investigaciones se comprobó, que los insectos hematófagos jugaban un rol importante en la transmisión de la Leucosis Bovina, ya que de controlar la presencia de insectos en los hatos productivos se vería reducida en gran numero la transmisión de la enfermedad (26).

También al realizar evaluaciones al suero de fetos, no se encontraron anticuerpos para la enfermedad (27), lo que afirma que se contrae la infección en las primeras etapas de vida del animal.

Se realizó un ensayo experimental en ovejas, en donde se inoculó con células extraídas de cultivos celulares que contenían la cepa de células permanentemente infectadas, perteneciente a la línea Fetal Lamb Kidney, la cual dio como resultado que las ovejas inoculadas con 500 a 5000 células FLK-BLV desarrollaban la enfermedad, mientras que la inoculación con 50 células no desarrollaba la enfermedad (28).

h. Signos Clínicos

Según Venables (2004) afirma que la progresión de la infección de un animal con la enfermedad BLV depende de factores genéticos, ambientales y desconocidos. Más del 60 por ciento de los bovinos infectados son asintomáticos, sin embargo, casi todos desarrollan anticuerpos detectables con pruebas serológicas.

Entre el 30 y el 70 por ciento de los animales infectados muestran linfocitosis persistente, pero menos del 10 por ciento desarrollan linfosarcoma. La linfocitosis persistente se observa en el 28-85 por ciento de los casos de tumores. En los bovinos con leucemia, el aumento en el recuento de leucocitos se debe a un aumento de los linfocitos B. El porcentaje de linfocitos B en la sangre puede aumentar al 80 por ciento, en comparación con los valores normales del 15-20 por ciento. En el ganado infectado por BLV clínicamente normal sin linfocitosis todavía puede haber un aumento de los linfocitos al 40-50 por ciento.

Los signos clínicos en animales que desarrollan tumores dependen del órgano u órganos en particular involucrados. Uno o más ganglios linfáticos superficiales pueden agrandarse y estos se pueden sentir como bultos debajo de la piel, especialmente en las áreas del cuello y el flanco trasero. Sin embargo, cuando los ganglios linfáticos internos son los únicos afectados, el diagnóstico puede ser más difícil (19).

Los tumores pueden ocurrir en el abomaso, el lado derecho del corazón, la columna vertebral, el útero, los ganglios linfáticos y el sistema nervioso central y en el espacio retrobulbar de la órbita de ambos ojos.

Los signos clínicos pueden incluir depresión, indigestión, hinchazón crónica, abomaso desplazado, cojera o parálisis. Los tumores abdominales a veces se detectan por palpación rectal durante el examen del embarazo. La infección por BLV no parece estar asociada con una menor producción de leche, una disminución de la capacidad reproductiva en cualquiera de los sexos, o con mastitis, menor longevidad o mayor susceptibilidad a otras enfermedades. El virus de la Leucosis bovina no parece causar una inmunosupresión significativa en el feto o en el animal adulto (19).

La mayoría de las infecciones por el virus de la leucemia bovina son asintomáticas y solo se reconocen mediante pruebas serológicas. De los bovinos infectados, alrededor del 30% desarrollan linfocitosis persistente, pero esto no está asociado con ningún signo clínico.

En esos pocos animales que desarrollan enfermedad, se observan signos clínicos a los 4 a 8 años; hay tumores linfoides (es decir, linfosarcomas o linfomas malignos) en los ganglios linfáticos, el abomaso, el corazón, el bazo, los riñones, el útero, las meninges espinales y el cerebro, pero no la patogénesis, la patología y la oncogénesis de inmunidad es muy probable que dependa de la integración de un gen(s) v-oncogénico proviral bovino en el ADN celular (29).

En animales en etapa tumoral de BLV, las secuencias provirales se encontraron en células leucocitarias, así como en tumores sólidos como son los linfosarcomas, y en órganos con infiltración de células linfoides tumorales. Pero no se encontraron secuencias provirales en órganos que aparentaban estar normales (30).

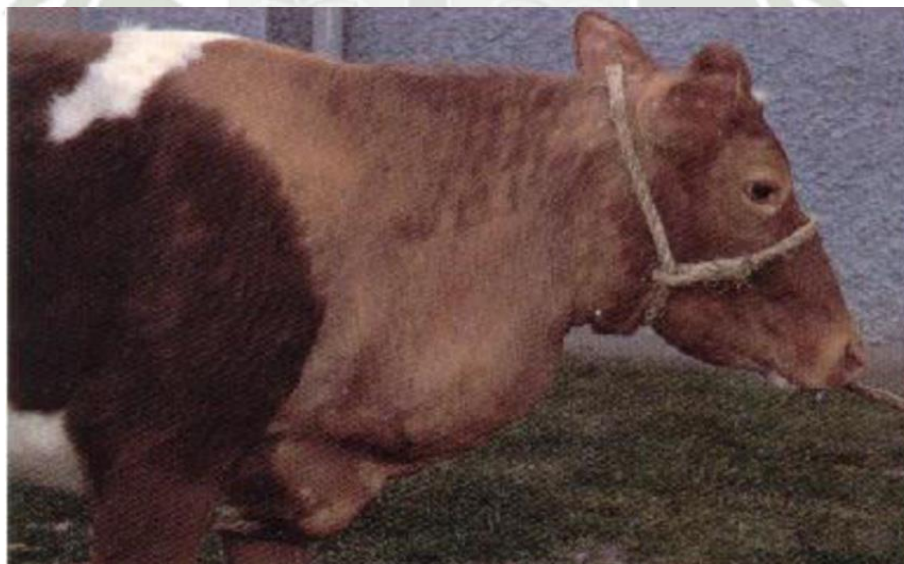
i. Lesiones macroscópicas

Figura 3. Lesiones macroscópica



*De Blowey, R.W. (31).

Figura 4. Linfosarcoma multicéntrico



De Blowey, R.W. et al (31).

La imagen muestra el ganglio preescapular agrandado, de un ternero el cual mostró linfadenopatía generalizada, los ganglios submandibulares, parotídeos y retrofaríngeos también se agrandaron simétricamente. La palpación reveló que los ganglios linfáticos eran lisos, indoloros y tenían movimiento libre, sin afectar con algún tipo de ulceración a la piel (31).

Figura 5. Linfomasarcoma Tímico



*De Blowey, R.W. et al (31).

Se observa una masa grande, firme y lisa que ocupaba la región preesternal de la novilla Guernsey de un año de edad, también encontramos edema, el novillo no presentó linfadenopatía generalizada.

Figura 6. Linfomasarcoma Tímico asemejando un exudado caseoso



*De Blowey, R.W. et al (31).

Podemos observar una sección transversal del tumor discreto de un Angus, no se encontró tejido granulomatoso, el contenido era amarillo pálido asemejando un exudado caseoso (31).

Figura 7. Bovino Hereford con leucosis cutánea



*De Blowey, R.W. et al (31).

Figura 8. Linfomasarcoma de Piel



*De Blowey, R.W. et al (31).

En las dos anteriores imágenes podemos observar la forma cutánea de Leucosis, la cual es rara. En la primera imagen se trata de un bovino Hereford, lo cual presenta nódulos de color blancos sobre el cuello, la espalda y los flancos, dichos nódulos se pueden extender profundamente en el tejido subcutáneo. También hay una linfadenopatía generalizada con prominentes ganglios precurales. En la segunda imagen observamos Leucosis cutánea limitada a grandes lesiones ulceradas alrededor de la cabeza. Dichas lesiones podrían presentarse también en actinobacilosis y actinomycosis para lo cual una biopsia y una prueba serológica podría ser de utilidad diagnóstica (31).

Figura 9. Leucosis Bovina forma Adulta



*De Blowey, R.W. et al (31).

Se presenta linfadenopatía generalizada con agrandamiento simétrico de la mayoría de los ganglios linfáticos periféricos, a menudo con otros signos (31).

En la imagen observamos como en algunos casos la presencia de tumores tiene predilección por las orbitas de los ojos en forma bilateral, normalmente se trata de una neoplasia retrobulbar, en este caso la vaca presenta exoftalmia masiva bilateral y protrusión del tejido de granulación como resultado de infiltración linfomatosa en la órbita del globo ocular (31).

Otros sitios de ubicación de Linfosarcoma, incluyen el propio globo ocular, canal espinal, medula espinal, causante de paresia posterior progresiva como resultado de la compresión de la medula espinal y el abomaso (31).

- **Caracterización inmunológica y Bioquímica de la glicoproteína de envoltura del virus de leucemia bovina GP51, producido en *Saccharomyces cerevisiae***

Se demostró que la glicoproteína gp51 se sintetizaba también al introducir la secuencia de nucleótidos que la codificaban, en un vector de *Escherichia coli*-levaduras, las cuales expresaron la proteína glicosilada en moléculas de proteína heterodispersas de 40 a 48 kDA (Kilodaltons), además de esto la gp51 no se excreta en el medio de cultivo. Por último, se estimó que dichas proteínas solo conformaban el 0,06% de proteínas solubles, este modesto nivel de expresión

esta dado por la naturaleza toxica de la gp51 para la célula de levadura. Habiendo poca reactividad para estas proteínas sintetizadas a partir de levaduras, esto se comprobó mediante ELISA y el análisis de epítomos biológicos bien definidos (32).

j. Diagnóstico

Este virus normalmente se detecta mediante inmunodifusión en gel de agar o ensayos ELISA. que se basan en la aparición de anticuerpos contra una proteína de superficie importante del virus, gp51, presente en el suero de ganado infectado. Hemos utilizado la reacción en cadena de la polimerasa, que depende de la amplificación de secuencias específicas de ADN como un ensayo sensible para la detección de BLV. era posible detectar ADN proviral en 100 pares de genes de ADN tumoral de un huésped infectado mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de tinción con bromuro de etidio. La sensibilidad del ensayo se incrementó en dos órdenes logarítmicos cuando el análisis de hibridación, usando una sonda de ADN proviral BLV, se usó en combinación con la amplificación del ADN Se detectó ADN proviral tanto en ADN linfocítico como tumoral y en todos Etapas de la infección en el ganado (33).

- Hematología

Los rebaños con una alta incidencia de linfosarcoma a menudo contienen muchos bovinos clínicamente normales con linfocitosis persistente. El desarrollo del linfosarcoma a menudo va precedido de linfocitosis persistente en ausencia de signos clínicos. Los métodos hematológicos fueron las principales herramientas de diagnóstico durante varios años y se desarrollaron varias "claves" relacionadas con el recuento de linfocitos y la edad, presentando valores máximos por encima de los cuales se declaró que un animal tenía linfocitosis persistente. El porcentaje de linfocitos en el ganado normal varía entre el 18 y el 28 por ciento. En el ganado infectado por BLV con linfocitosis persistente, el porcentaje de linfocitos B puede aumentar hasta el 70 por ciento. En el ganado infectado con BLV clínicamente normal sin linfocitosis, los linfocitos B aumentan al 40-50 por ciento (19).

- **Serología**

La prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGIDT) se puede utilizar para detectar anticuerpos específicos contra los antígenos virales p15, p24 y gp51. La prueba de anticuerpos gp51 es más sensible que las pruebas p15 y p24 o hematología para la detección de animales infectados. La prueba es simple y práctica y se ha utilizado ampliamente.

El antígeno de glicoproteína empleado en la prueba se prepara a partir del líquido sobrenadante de una línea celular infectada persistentemente con BLV. Utilizando monocapas de células infectadas por BLV, los sueros también se pueden probar para detectar anticuerpos específicos mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta o inmunoperoxidasa. También se han descrito varias pruebas de neutralización, basadas en la capacidad de los anticuerpos para inhibir los efectos del BLV en cultivos celulares.

Se ha utilizado la prueba de fijación del complemento utilizando antígenos virales de una línea celular infectada con BLV, pero parece ser menos sensible que la prueba de inmunodifusión en gel de agar para anticuerpos contra el antígeno glicoproteína gp51. Se ha descrito una prueba de inhibición de la transcriptasa inversa, basada en el hecho de que el suero de algunos bovinos leucémicos inhibe la actividad de la transcriptasa inversa de BLV.

El radioinmunoensayo es muy sensible, pero tiene la desventaja de que se requieren reactivos radiomarcados y equipos especiales. El ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) es el método preferido actualmente para la detección de anticuerpos BLV. La prueba se puede utilizar con leche o tejido y fluidos, así como con muestras de suero. El ELISA es rápido, sensible y adecuado para la prueba de un gran número de muestras. Los kits de ELISA disponibles en el mercado, lo suficientemente sensibles como para permitir el examen de sueros y leche agrupados para su detección y vigilancia, han formado la base de programas exitosos de erradicación de VLB en varios países europeos (19).

- **Aislamiento y detección del virus**

Las partículas virales se pueden demostrar mediante microscopía electrónica en cultivos a corto plazo de linfocitos de animales infectados por BLV. El virus

también se puede recuperar del ganado infectado mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica con una célula indicadora susceptible, por ejemplo, células renales de cordero fetal.

Es posible que se requieran varios pasajes de los cultivos antes de que se pueda observar sincitios en monocapas manchadas de Giemsa. Las células infectadas se pueden visualizar específicamente, a menudo antes de la formación de sincitio, utilizando técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. Sin embargo, al igual que con otros retrovirus, ni la microscopía electrónica ni el aislamiento de virus son un método particularmente sensible para demostrar la infección. Hoy en día, se utilizan con frecuencia técnicas que incluyen el ensayo de la actividad de la transcriptasa inversa o la demostración de la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos VLB. Los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), generalmente desarrollados para detectar el ADN provincial BLV y ofrecer una sensibilidad y especificidad exquisitas, están ganando rápidamente la ventaja sobre los métodos culturales en los campos de investigación, diagnóstico y vigilancia (19).

- **Ensayo de ELISA**

Se basa en la detección de anticuerpos contra el virus de la leucemia bovina, esta prueba se basa en el sistema biotina-estreptavidina que utiliza IgG bovina policlonal no marcada contra la BLV como anticuerpo de captura e IgG bovina anti-BLV biotinilada como anticuerpo de detección. Se encontró que la sensibilidad era 50 a 100 veces mayor que la prueba de Inmunodifusión en Agar gel, con una especificidad de 100%. El ELISA de bloqueo demostró ser adecuado para la detección de anticuerpos contra BLV en suero y leche (34) (35). Así mismo, a nivel mundial se realizan ensayos de ELISA para determinar la prevalencia de anticuerpos en leche, con la finalidad de optar por medidas de control y prevención en las zonas productivas y seropositivas a la infección (36).

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Este procedimiento detecta el virus de la leucemia bovina proviral en sangre periférica, evaluando el ADN de células mononucleares. Esta prueba también logró distinguir los terneros infectados con BLV de terneros no infectados.

Esta prueba solo falla en el caso de que exista una baja proporción de linfocitos infectados con BLV en la muestra obtenida. La sensibilidad de la prueba de PCR de doble amplificación es comparable a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel. El problema del uso de esta prueba radica en las estrictas condiciones del PCR para prevenir resultados falsos positivos debido a la contaminación de las muestras (8).

El diagnóstico también se evalúa detectando la presencia de anticuerpos circulantes contra la proteína de envoltura viral, gp51. Este método que detecta directamente la presencia de ADN viral, tiene ventajas sobre los métodos diseñados para medir anticuerpos del huésped. Por lo que podemos optar por esta prueba ya que proporcionará un diagnóstico sensible (37).

- **Linfocitosis como criterio diagnóstico:**

En la década de 1970 a nivel mundial se reportó la presencia de linfocitosis en la mayoría de ganado infectado con Leucosis bovina, lo que a futuro sirvió como criterio diagnóstico de Leucosis y en menor medida de neoplasias de origen hemolinfático (38).

En 1994 se usó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADN proviral, se demostró que la sangre con antígeno positivo podría contener hasta 106 veces más Provirus integrado que la sangre de ganado negativo al antígeno (39).

- **Linfocitosis concepto (40):**

Se refiere a un mayor número de linfocitos circulantes. Es difícil poner un límite superior preciso al número de linfocitos en diferentes especies, pero alrededor de 9 mil millones por litro en rumiantes, existe y decrece con la edad y cerca de 6 mil millones por litro en monogástricos, estos valores sirven como guía. En el caballo, el número de linfocitos circulantes (y, por lo tanto, el número total de glóbulos blancos) disminuye con la edad hasta una medida bastante marcada, por lo que una leucopenia aparente es bastante normal en los caballos viejos.

Con la excepción de las afecciones neoplásicas, un hallazgo clínico de linfocitosis es bastante poco común y la interpretación es bastante inespecífica. Una linfocitosis fisiológica debido a la movilización de las células secuestradas en camas capilares colapsadas puede ocurrir de la misma manera que para los

neutrófilos, y es bastante común en gatos asustados. Si bien es posible inducir linfocitosis por medios experimentales (por ejemplo, inyección de heparina o *Bordetella pertussis*), una respuesta inmune a un antígeno bacteriano, aunque puede estimular la linfopoyesis, normalmente no causa un aumento significativo en el número de linfocitos circulantes.

La linfocitosis no suele ser una característica de las infecciones virales, esta es una impresión engañosa obtenida al intentar interpretar los recuentos relativos (porcentaje) en lugar de los recuentos numéricos absolutos \pm una neutropenia absoluta, por supuesto, conducirá a una aparente linfocitosis relativa.

La leucemia es un tema complejo que se aborda mejor a través de textos especializados en oncología, puede manifestarse como un número anormalmente alto de linfocitos circulantes, o formas anormales de linfocitos en circulación, o ambas cosas. Cuando el recuento de linfocitos está marcadamente elevado (con o sin células anormales), el diagnóstico básico rara vez está en duda real; sin embargo, puede ocurrir confusión cuando el recuento está solo ligeramente elevado, o cuando se ven células anormales en ausencia de un recuento aumentado, o cuando las células son demasiado anormales o degeneradas para reconocerlas.

En las dos primeras situaciones (recuento ligeramente elevado de células normales, o algunas células anormales, la única anomalía), un examen repetido en unos 5 ± 7 días generalmente proporcionará una imagen más clara.

Las células genuinamente extrañas e irreconocibles son prácticamente siempre neoplásicas, pero la degeneración anormalmente rápida de los glóbulos blancos también debe considerarse potencialmente siniestra. Aunque los leucocitos equinos se degeneran regularmente a formas irreconocibles dentro de las 18 ± 24 horas posteriores a la recolección de muestras, esto no es habitual en el perro o el gato. Por lo tanto, el hallazgo de muchas células degeneradas una muestra que se ha manejado correctamente y no se ha retrasado indebidamente en el transporte al laboratorio bien puede ser una advertencia de una posible leucemia en un animal pequeño. La solución es hacer una película de sangre inmediatamente se recoge la muestra y enviarla con la muestra repetida \pm una

precaución sabia, en cualquier caso, y una precaución esencial si se publican o retienen muestras de sangre equinas para el análisis al día siguiente (40).

- **Seroconversión a BLV**

El tiempo de seroconversión según estudios es de 4 a 5 semanas después de la infección, donde se observó la característica linfocitosis aguda con ayuda de la técnica de citometría de flujo (6), la cual permite diferencias líneas celulares tanto por tamaños como por marcadores de superficie expresados por el complejo mayor de histocompatibilidad.

Al momento de la seroconversión, el porcentaje de Linfocitos B Aumento de $19,1\% \pm 7,5\%$ a $37,9\% \pm 15,8\%$, y los porcentajes de linfocitos T (CD2+) disminuyeron de $36,7\% \pm 7,3\%$ a $22,7\% \pm 6,0\%$, esto se le atribuyó a la disminución del porcentaje de células T CD4 + así como de T CD8, para los terneros infectados. Aumentando también el número absoluto de células CD5+ lo que se coincide con el aumento de células B totales (6).

- **Reacciones de Precipitación (41)**

Si una solución de antígeno soluble se mezcla con un antisuero fuerte, la mezcla se vuelve turbia en unos minutos y luego flocula, finalmente se forma un precipitado el cual se asienta en el fondo de un tubo en aproximadamente una hora.

Este precipitado está compuesto de complejos de antígeno anticuerpo. Si se mezclan cantidades crecientes de antígeno soluble con una cantidad constante de anticuerpo, la cantidad de precipitado que se desarrolla está determinada por las proporciones relativas de los reactivos. No se forma ningún precipitado obvio a bajas concentraciones de antígeno. A medida que aumenta la cantidad de antígeno, se forman mayores cantidades de precipitado hasta que la cantidad sea máxima. Sin embargo, con la adición de aún más antígeno, la cantidad de precipitado disminuye gradualmente, hasta que no hay ninguno presente en los tubos que contienen un gran exceso de antígeno.

En la primera etapa de estas reacciones, sólo un poco de antígeno se compleja con anticuerpos, por lo que se deposita poco precipitado. En los tubos donde se produce la mayor precipitación, tanto de antígeno como de anticuerpo están completamente unidos formando múltiples complejos, y ninguno de los dos

puede ser observado en el líquido sobrenadante. Esto se llama la zona de equivalencia, y la proporción de anticuerpo a antígeno es óptima.

Cuando el antígeno se añade en exceso, no se forma un precipitado, aunque hay complejos inmunitarios solubles, y se puede detectar antígeno libre en el líquido sobrenadante. Su patrón es el resultado del hecho de que los anticuerpos son bivalentes y, por lo tanto, solo pueden interconectar dos epítomos a la vez, pero los antígenos complejos son generalmente multivalentes y poseen muchos epítomos. Cuando hay un exceso de anticuerpos, cada molécula de antígeno está cubierta con moléculas de anticuerpos, lo que evita la reticulación y, por lo tanto, la precipitación.

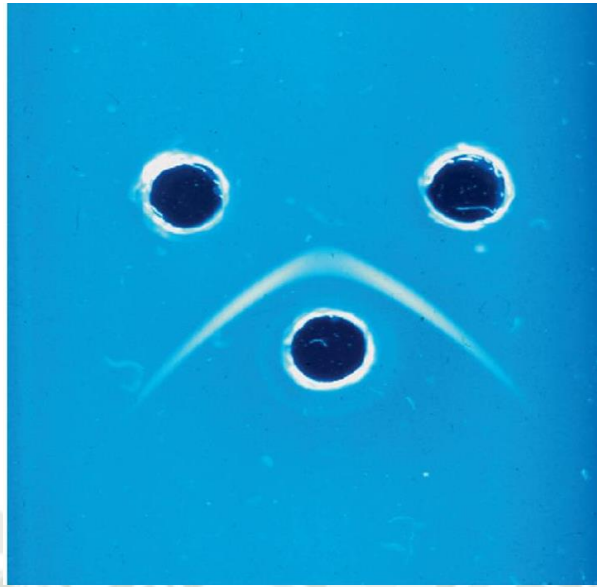
Cuando los reactivos están en proporciones óptimas, la relación entre el antígeno y el anticuerpo es tal que la reticulación y la formación de complejos son extensas. A medida que el número de complejos aumenta, se vuelve insoluble y finalmente precipita. En mezclas en las que el antígeno es excesivo, cada molécula de anticuerpo se une a dos moléculas de antígeno. Es imposible una mayor reticulación, y como estos complejos son pequeños y solubles, no se produce precipitación. Los fagocitos mononucleares son más eficientes en la unión y eliminación de complejos formados en proporciones óptimas y en exceso de anticuerpos (41).

- **Prueba de Inmunodifusión**

Un método simple para demostrar la precipitación inmunitaria es la inmunodifusión o la difusión en gel. Se elaboran pequeños orificios cortando pequeñas partes del agar transparente y estéril. Con tamaños, de unos 5 mm de diámetro y aproximadamente 1 cm de distancia.

Un pozo se llena con antígeno soluble y el otro con antisuero; los reactivos se difunden radialmente. Cuando los reactivos se encuentran en proporciones óptimas, aparece una línea blanca opaca de precipitado (41).

Figura 10. Prueba de Inmunodifusión



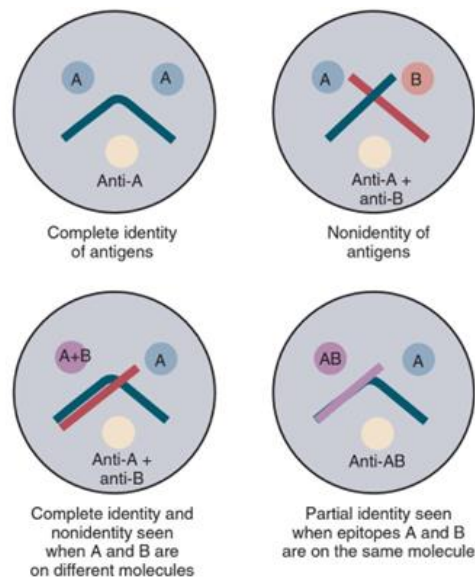
*De Tizard, Ian R. (41).

La figura muestra la precipitación en agar gel, tanto antígeno como anticuerpo colocado en su respectivo hueco o pozo en el agar, estos se precipitan en una región donde se logran proporciones óptimas. En la imagen referencial de la prueba de inmunodifusión en donde dos antígenos exactamente iguales son colocados en la parte superior, y como resultado de esto las líneas de precipitación se fusionan para mostrar la presencia de un mismo antígeno.

Si las soluciones utilizadas contienen varios antígenos y anticuerpos diferentes, es poco probable que los componentes alcancen las proporciones óptimas exactamente en la misma posición. En consecuencia, se produce una línea separada de precipitado para cada conjunto de antígenos y anticuerpos que interactúa.

Esta prueba se puede utilizar para determinar la relación entre los antígenos. Si se establecen dos pozos de antígeno y un pozo de anticuerpos, se formarán líneas entre cada pozo de antígeno y el pozo de anticuerpos. Si estas dos líneas se unen, los dos antígenos son probablemente idénticos. Si las líneas se cruzan, los dos antígenos son completamente diferentes. Si las líneas se fusionan con la formación de espuelas, existe una identidad parcial, lo que indica que un antígeno posee epítomos que no está presente en el otro.

Figura 11. Líneas de precipitación entrecruzadas indican la presencia de antígenos diferentes



*De Tizard, Ian R. Nota. (41)

La prueba de Coggins es un método de difusión en gel utilizado para detectar anticuerpos contra el virus de la anemia infecciosa equina en el suero de caballo. En esta prueba, un extracto del bazo de caballo infectado o un antígeno de cultivo celular reacciona con el suero del caballo sometido a prueba en gel de agar, y el desarrollo de una línea de precipitado constituye una reacción positiva.

Se utiliza una prueba similar para identificar el ganado infectado con el virus de la leucemia bovina (41).

k. Tratamiento

No existen vacunas o procedimientos terapéuticos que prevengan la diseminación del Virus de Leucosis Bovina, disponibles a la fecha (26), pero eso no descarta la posibilidad de elaborar una vacuna que podría ser de ARN recombinante de la glicoproteína gp51, ya que es la proteína que actúa como epítipo antigénico y estimula la respuesta humoral (42).

l. Control

Las medidas de control apropiadas para cualquier situación en particular están dictadas en gran medida por factores locales. La prevalencia de la infección es

probablemente la consideración principal, pero la economía, las prácticas de cría, los movimientos de ganado y la política pueden ser importantes (19).

Cada vez más, impulsados por las ventajas comerciales, los Estados miembros de la Unión Europea y otros países europeos han establecido estrategias de vigilancia y erradicación. Muchos de ellos han tenido éxito y los países ahora están oficialmente libres de Leucosis Bovina Enzootica (19).

Los tipos de acciones utilizadas, relacionadas con el monitoreo serológico, para producir rebaños libres de BLV se detallan a continuación:

- Los animales positivos para BLV se mantienen físicamente separados de los animales negativos para BLV. Las pruebas de control de animales negativos se llevan a cabo a intervalos regulares.
- Los terneros nacidos de vacas negativas se mantienen alejados de los animales infectados.
- Los terneros nacidos de vacas infectadas se crían solo con calostro y leche de vacas negativas y se mantienen aislados. Si son serológicamente negativos a los siete meses de edad, estos terneros se unen al rebaño negativo.
- Los animales de reemplazo deben introducirse de fuentes que se sabe que están libres de virus y deben someterse a un cribado serológico. Cualquier persona originaria de rebaño de estado desconocido debe demostrar dos pruebas claras a intervalos de seis meses antes de unirse a la manada principal.
- La transferencia de embriones e Inseminación Artificial a veces se utilizan como parte de un programa de control para que se puedan introducir nuevas poblaciones genéticas con un riesgo mínimo de introducir BLV (19).

Donde la prevalencia de ganado infectado ha sido baja, como ha sido el caso en la mayoría de los países de Europa Occidental ahora libres de EBL, se ha utilizado con éxito la detección serológica seguida de la matanza de reactores. Sin embargo, el aumento de la prevalencia de la infección rápidamente hace que este enfoque sea antieconómico (19).

Una alternativa de control puede ser la que se implementó en Lituania, donde a partir de 1986 se empezó a separar a todo el ganado positivo a BLV y al negativo a BLV, donde se alimentó a todos los terneros nacidos que conformaron el grupo de

seropositivos, con leche pasteurizada lo que disminuyó los índices de incidencia gradualmente (43).

Se descubrió, que la vacunación contra el virus de la fiebre aftosa (FMDV) en animales seropositivos o infectados con BLV, producía bajos títulos de anticuerpos anti -FMDV- en la primera vacunación. Por lo que era importante vacunar por segunda vez para lograr títulos más altos de anticuerpos que confieran una protección ante la enfermedad (44).

Al ser una enfermedad ampliamente diseminada en el continente latinoamericano, en el año 2009 en Chile se establecieron zonas geográficas en base a las tasas de prevalencia de Tuberculosis, lo que les permitió tomar acciones correctas para reducir la prevalencia de tuberculosis en el país (45).

Si bien el Perú tiene niveles más bajos de tuberculosis, los tenemos muy elevados llegando a un 92% (1), siendo esto un problema, y es de importancia copiar o adaptar este modelo para poder reducir el número de animales infectados con Leucosis bovina reduciendo su morbilidad y por ende también su mortalidad.

2.2 Antecedentes de investigación

2.2.1 Revisión de tesis Universitarias

a. Identificación de la gp51 y la p24 para el diagnóstico de leucosis bovina en ganado lechero de la Irrigación de Majes Sección C-1 C-2 C-3 provincia de Caylloma región Arequipa 2016

Resumen

Este trabajo de investigación se realizó en los establos de las secciones C1-C2- C3 de la Irrigación de Majes, distrito de Lluta, provincia de Caylloma, Región de Arequipa; durante el periodo de setiembre - diciembre 2016 y enero – marzo 2017, con el objetivo de determinar la frecuencia de infección por el virus de la leucosis bovina en ganado lechero. Se estimó un tamaño de muestra de 100 animales seleccionados al azar. En las muestras de suero tomadas se procedió a identificar gp 51 y la p-24 viral mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel. Los resultados obtenidos muestran una frecuencia de 22 animales positivos a leucosis bovina de los 31 establos monitoreados lo que representa el 22% del total de

muestras evaluadas, de este total de animales positivos a LVB pudimos determinar que el 36.2 %, procedía de animales comprados en la feria ganadera de La Colina del distrito de Majes, además de establecer que la mayoría de vacas seropositivas eran mayores de 5 años de edad. Paralelamente a este estudio realizamos una encuesta a cada ganadero de los establos comprometidos, determinándose el nivel de conocimiento de esta enfermedad, donde el 25.8% de los encuestados conocía esta enfermedad infecciosa en ganado vacuno. Por lo tanto, es necesario considerar a la leucosis bovina como una seria amenaza que pone en riesgo la salud del ganado lechero de la Irrigación de Majes secciones C-1, C-2, C-3 (46).

b. Leucosis bovina: actualización sobre los mecanismos de transmisión y estrategias de control y erradicación

Resumen

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad infecciosa transmitida por el virus de la leucosis bovina (VLB). Es importante porque causa pérdidas económicas relacionadas a la disminución de la producción láctea y ganancia de peso de los animales afectados, aumenta costos por tratamientos, aumenta la prevalencia de enfermedades infecciosas por la inmunosupresión que causa y origina pérdidas por el descarte y muerte prematura de animales con linfosarcomas. Existen estudios que demuestran una relación entre el VLB y el cáncer mamario en humanos, presumiendo un riesgo zoonótico para la población. Esta enfermedad es de distribución mundial y muchos países reportan una alta prevalencia, aunque otros han logrado erradicarla estableciendo diferentes estrategias de manejo, control y prevención. La elección de estrategias de control y erradicación del VLB depende del nivel inicial de prevalencia, el compromiso de querer erradicar la enfermedad y la factibilidad para aplicar medidas de bioseguridad y buenas prácticas de manejo. En nuestro país se debe iniciar con medidas poco costosas como las buenas prácticas de manejo y protocolos de bioseguridad para disminuir la transmisión iatrogénica y por calostro o leche contaminados con el virus. Además, se debe capacitar al ganadero, técnicos y veterinarios sobre la importancia de la enfermedad, su forma de transmisión y cómo evitar que los animales se infecten. Se recomienda realizar el análisis de los animales para hallar aquellos que tienen linfocitosis persistente y de ser posible descartarlos o aislarlos de los otros animales,

con el objetivo de disminuir la diseminación de la enfermedad. La mejor medida de control y erradicación es la detección de positivos y descarte inmediato, aunque en nuestro país esto aún no será posible debido a que no existe un sistema de compensación para el ganadero, por lo tanto, se sugiere que se realice la formación de hatos paralelos separando animales positivos y negativos (47).

2.2.2. Revisión de trabajos de investigación e Internet

a. Leucosis bovina: una visión actualizada

Resumen

La leucosis bovina enzoótica, causada por el virus de la leucosis bovina (BLV), es la enfermedad tumoral más frecuente del bovino. Las razas bovinas de leche y de carne son susceptibles a la infección por BLV y al linfosarcoma; sin embargo la enfermedad es más prevalente en rodeos lecheros, principalmente debido a las prácticas de manejo. La patogenicidad del BLV en el bovino está asociada a la genética del animal. La mayoría de los bovinos infectados por el BLV son asintomáticos, por lo que la infección puede pasar desapercibida cuando los índices de infección son relativamente bajos. En ausencia de medidas de control, el virus se disemina lentamente entre los animales del rodeo. El BLV causa importantes pérdidas productivas, no sólo debido a la mortandad de animales con linfosarcoma, sino también por las restricciones al comercio de animales infectados y sus subproductos. Existen distintas alternativas para el control del BLV, adecuadas para distintas situaciones epidemiológicas. Hasta el momento no existe ningún tratamiento o vacuna eficaz para el control de este virus. Cuando la prevalencia de infección es baja, inferior al 10-15% de animales infectados, se recomienda identificar y eliminar la totalidad de los animales infectados. Esta alternativa no se adecúa a rodeos con altas prevalencias de infección, como ocurre con la mayoría de los rodeos lecheros en Argentina. La selección genética de animales resistentes a la diseminación del BLV surge como una estrategia natural para limitar la diseminación de este virus y, por ende, para el control del linfosarcoma asociado (48).



CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Localización del trabajo

a. Espacial

El trabajo de investigación se realizó en el distrito de Vitor, provincia de Caylloma, Departamento de Arequipa.

b. Temporal. Se realizó durante los meses de octubre 2022 a diciembre 2023.

3.1.2. Materiales biológicos

- Las muestras biológicas fueron sueros sanguíneos de los bovinos del distrito de Vitor.

3.1.3. Materiales de laboratorio.

- Placas Petri
- Dispositivo de Coggins
- Agarosa al 1%
- Cámara de humedad
- Micropipetas de 100 a 250 ul
- Micropipetas de 20 a 100 ul
- Micropipetas de 5 – 10 ul
- Kit de Inmunodifusión de Leucosis bovina
- Centrifuga de 2000 a 6000 rpm
- Tips para micropipetas
- Horno Microondas
- Mechero Bunsen
- Cuchara de laboratorio
- Láminas portaobjeto
- Saca bocados de metal de 3 mm y 2 mm de diámetro

3.1.4. Materiales de campo

- Botas de jebe
- Marcadores
- Tubos vacutainer de tapa amarilla

- Agujas doble punta 20G
- Caja térmica
- Geles de conservación de frío
- Gradilla para tubos

3.1.5. Equipos y maquinarias

- Centrifuga
- Cámara de humedad
- Microondas
- Fuente de luz fría

3.2. Métodos

3.2.1. Muestreo

a. Universo.

El universo está conformado por la totalidad de bovinos hembras lecheras del distrito de Vitor que según SENASA es de 49,201 al año 2023.

b. Tamaño de la muestra.

El tamaño de muestra se calculó mediante la fórmula de estadística muestral de Daniel:

$$n = \frac{N}{N(d)^2 + 1}$$

En donde:

N: Universo: 49,201

d: Constante: 0.075

$$n = \frac{49201}{49201(0.075)^2 + 1}$$

$$n = 156$$

c. Procedimiento de muestreo

- Las muestras de sueros sanguíneo fueron tomadas en vacutainer de tapa amarilla con activador de la coagulación, directamente de la yugular.
- Las muestras de sangre tomadas permanecieron en ambiente a temperatura ambiente por 1 horas para permitir su coagulación luego transportadas al laboratorio I+D EIRL del Pedregal – Majes, para su centrifugación por 10 minutos a 5,000 rpm.

- Las muestras de sueros permanecieron congeladas en el laboratorio hasta su procesamiento en la prueba de IDAG.

3.2.2. Formación de Unidades Experimentales de Estudio

Cada muestra de sangre obtenida es una unidad experimental.

a. Metodología de la experimentación

- Preparación del agar para IDAG: Agarosa al 1%

1. Disolver Agarosa al 1% en agua destilada estéril, en un microondas hasta que esté completamente mezclado, en un tiempo aproximado de 30 minutos.
2. Dejar enfriar hasta 50° C aproximadamente en un Baño María.
3. Colocar 15 ml en placas petri de 50 mm y dejar enfriar
4. Perforar el agar con el dispositivo de Coguins
5. Extraer al agar de las perforaciones para dejar los hoyos visibles.
6. Para la fase experimental:
 - Se colocó agar sobre láminas portaobjeto y se dejó enfriar
 - Para el ajuste metodológico se diseñaron dos plantillas (1 de 3 mm y otra de 2 mm) y hacer las perforaciones.
 - Para conservar las láminas portaobjetos preparados se colocaron en una cámara para evitar su deshidratación. Se recomienda prepararlo un día antes de su utilización.

- Reconstitución de los componentes liofilizados

1. Antígeno BLV: reconstituir con 2ml de agua destilada.
2. Control Positivo: reconstituir con 3ml de agua destilada.

- Reacción

1. Dispensar 72 ul de antígeno BLV, en un pocillo central
2. En los pocillos externos colocar 72 ul de control positivo y en los otros 72 ul de suero problema.
3. Sellar las placas con cinta Parafilm.

- Elaboración de la prueba de inmunodifusión como ajuste metodológico:

1. Se limpió y esterilizó la lámina portaobjetos antes de su uso.
2. Previamente se preparó Agarosa al 1% con el procedimiento anteriormente descrito.

3. Para la elaboración utilizaremos el gel de agarosa aplicando una capa delgada en la superficie de la lámina porta objetos.
4. Una vez solidificado el agar, se procede a perforar la capa de agar en forma equidistante utilizando un sacabocado.
5. Se agregaron 30 ul de suero sanguíneo a los hoyos o pocillos periféricos y 30 ul de antígeno BLV al pocillo central.
6. Al cabo de 72 horas de incubación después de la difusión el complejo antígeno anticuerpo, se formaron precipitados representados bajo la forma de una línea blanquecina visible con ayuda de luz fría de bajo de la lámina.
7. Se consideró positivo si la línea de precipitación se forma con el antígeno, la muestra se considerará como negativa si no se forma una línea de precipitación con el antígeno.

b. Recopilación de la información

- **En el campo.** Se obtuvo muestras de bovinos, en cuyo hato existía la presencia de Leucosis bovina diagnosticada previamente.
- **En el laboratorio.** Se realizó diversos ensayos experimentales, para precisamente poder modificar la prueba de inmunodifusión, al elaborarla sobre placas portaobjeto.
- **En la biblioteca.** Recopile información de libros y bibliotecas virtuales obtenidos en la etapa de revisión bibliográfica.
- **En otros ambientes generadores de la información científica.** Información principalmente de Pubmed de NCBI.

3.2.4. Variables de Respuesta

a. Variables independientes

- Edad
- Número de Partos
- Raza
- Producción láctea
- Zona

b. Variables dependientes

- Prueba de Leucosis Bovina en inmunodifusión en agar Gel Modificado

3.2.3. Cuadro Operacional de Variables

Variable	Definición	Indicadores	Instrumento
Independiente			
• Edad		• De 2 años a 7 años	Tabla de registros
• Número de Partos		• De 1 a 6 partos	
• Promedio de producción diaria láctea		• De 7 a 16 litros	
• Zona de Procedencia		• Procedentes de las zonas de Taca, Chañal, Pueblo Viejo, San Luis, El Pasto, Pie de la cuesta, la caleta, Mocoro, Sotello, el Pastor, El Parto, La Cana, Valle Vitor	
Dependiente			
• Frecuencia de Leucosis Bovina	• Número de repeticiones de una unidad de medida	Positivos y negativos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada	Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para Diagnóstico de Leucosis Bovina

3.2.4 Diseño Experimental

- a. **Unidades experimentales.** Cada Bovino Hembra muestreado, es una unidad experimental.
- b. **Diseño de tratamientos.** Cada muestra de suero sanguíneo será sometida a la prueba de inmunodifusión en agar gel modificada.

3.2.5 Análisis Estadísticos

- **Método Chi cuadrado**

La prueba de Chi-Cuadrado es un procedimiento estadístico utilizado para determinar si existe una diferencia significativa entre los resultados esperados y los observados en una o más categorías (49).

Se trata de una prueba no paramétrica que es utilizada por los investigadores para examinar las diferencias entre variables categóricas en la misma población. También puede utilizarse para validar o proporcionar un contexto adicional para las frecuencias observadas (49).

De esta forma, se busca determinar si una diferencia entre los datos observados y los esperados se debe al azar, o si se debe a una relación entre las variables que se están estudiando (49).

La fórmula es:

$$\chi^2 = \sum \frac{(fo - ft)^2}{ft}$$

χ^2 = Chi-cuadrado

Σ = Sumatoria

fo = Frecuencia observada

ft = Frecuencia esperada



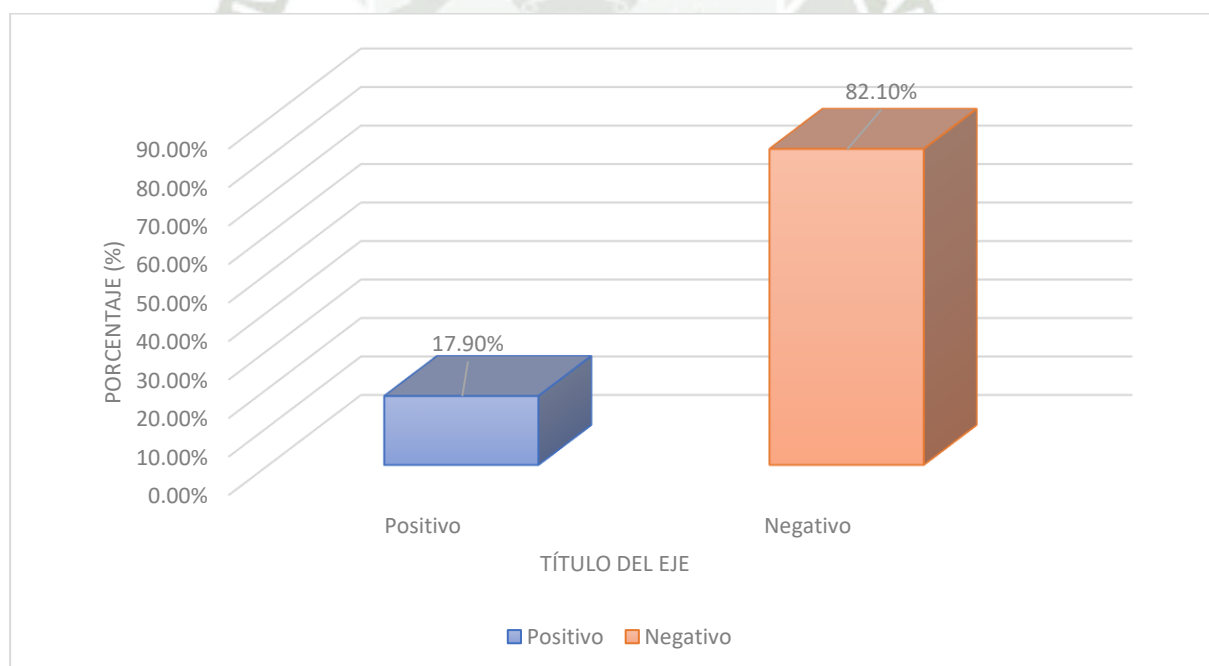
CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, utilizando la prueba de inmunodifusión en agar (IDGA).

Inmunodifusión en Agar Gel Modificado	N.º de Bovinos	%
Positivo	28	17.9%
Negativo	128	82.1%
Total	156	100%

Gráfico 1. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, utilizando la prueba de inmunodifusión en Agar Gel (IDGA).



En la tabla y gráfico 1. Muestran que de un total de 156 bovinos muestreados y sometidos a la Prueba Diagnóstica de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para diagnóstico de Leucosis Bovina, un 17.9% dio resultado Positivo a la prueba , mientras que un 82.1% dio resultado negativo a la prueba.

El 17.9% está conformado por 28 animales positivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel, siendo el 82.1% conformado por 128 animales negativos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel.

La Prevalencia relativa de Leucosis bovina en esta población es relativamente baja, aun así estos resultados representan una preocupación dado a que más de un sexto de la población muestra resultados positivos.

La seroprevalencia de este estudio en el año 2023 (17.9%) es mayor en comparación con los resultados de Flores y Rivera (2000), que mediante el uso de la prueba de ELISA obtuvieron una seroprevalencia de 12.8% de un total de 410 muestras. Dicho aumento en la seroprevalencia podría reflejar un cambio en la epidemiología de la Leucosis bovina en la región Arequipa. (50)

Las ventajas de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel respecto a la prueba de ELISA, es que la primera; es más simple de utilizar, más económica , requiere menos manipulación y capacitación, permite obtener resultados apreciables a simple vista, siendo también más versátil. Es importante señalar que a pesar de las ventajas cada método tiene sus propias limitaciones, tratándose a la prueba de Inmunodifusión, como una prueba cualitativa, a diferencia de la Prueba de ELISA, que sería cuantitativa y con utilidad para múltiples tipos de estudios cuantitativos de Anticuerpos en suero sanguíneo.

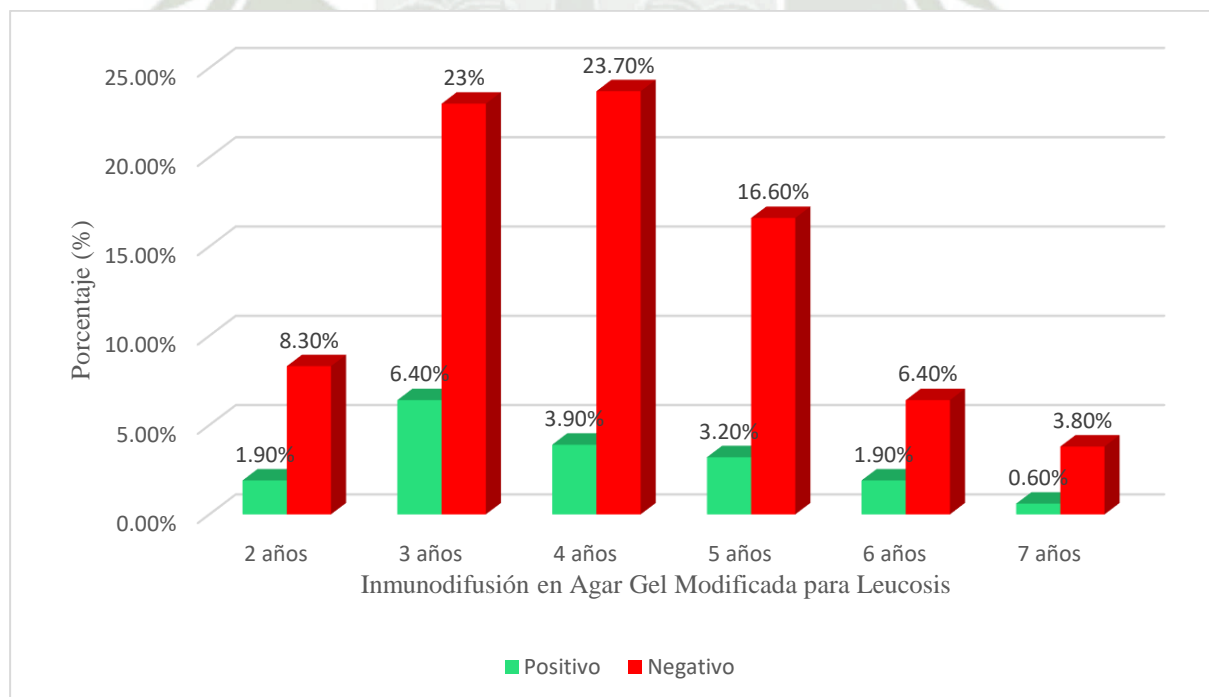
Considerando la fácil utilización y bajo costo de este método diagnóstico, el mismo debería implementarse en los establos bovinos, como protocolo de tamizaje de la enfermedad de Leucosis Bovina, para de esta manera poder establecer las más adecuadas medidas de control y prevención de esta enfermedad.

Si bien el universo muestreado es pequeño, no se descarta que al realizar posteriores estudios abarcando un universo de un tamaño y muestra mayor se podrían obtener distintos resultados en las tasas de seroprevalencia, por lo que es recomendable realizar nuevos estudios utilizando este método diagnóstico.

Tabla 2. Frecuencia de Leucosis bovina en el distrito de Vitor, según edad.

Edad/ años	Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para Leucosis				TOTAL		
	Negativo		Positivo		N.º	%	
	N.º	%	N.º	%			
2 años	13	8.3%	3	1.9%	16	10.2%	
3 años	36	23%	10	6.4%	46	29.4%	
4 años	37	23.7%	6	3.9%	43	27.6%	
5 años	26	16.6%	5	3.2%	31	19.8%	
6 años	10	6.4%	3	1.9%	13	8.3%	
7 años	6	3.8%	1	0.6%	7	4.4%	
Total						100%	

Gráfico 2. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según edad.



En la Tabla y Gráfico 2. Muestra los resultados de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel modificada y su relación con el grupo etario; los bovinos con edad de 2 años tuvieron 1.8% de resultados positivos, y 8.3% de bovinos con resultado negativo; los bovinos con edad de 3 años tuvieron 6.4% de resultados positivos, y 23% de bovinos con resultado negativo; los bovinos con edad de 4 años tuvieron 3.9% de resultados positivos, y 23.7% de bovinos con resultado negativo; los bovinos con edad de 5 años tuvieron 3.2% de resultados positivos, y 16.6% de bovinos con resultado negativo; los bovinos con edad de 6 años tuvieron 1.9% de resultados positivos, y 6.4% de bovinos con resultado negativo; los bovinos con edad de 7 años tuvieron 0.64% de resultados positivos, y 3.8% de bovinos con resultado negativo. Destacando que del total de todos los grupos, los más jóvenes (2, 3, 4 años) son los que presentan una mayor frecuencia de Leucosis Bovina respecto a los más adultos.

A los 3 años es la edad donde se encontró la frecuencia más alta con 6.4%, representando un total de 10 animales que dieron resultado Positivo a la Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel modificada para Leucosis bovina, siendo el segundo grupo etario con más animales del total de bovinos muestreados.

Se utilizó la Prueba de Chi Cuadrado ya que es la más adecuada para variables de tipo categórico.

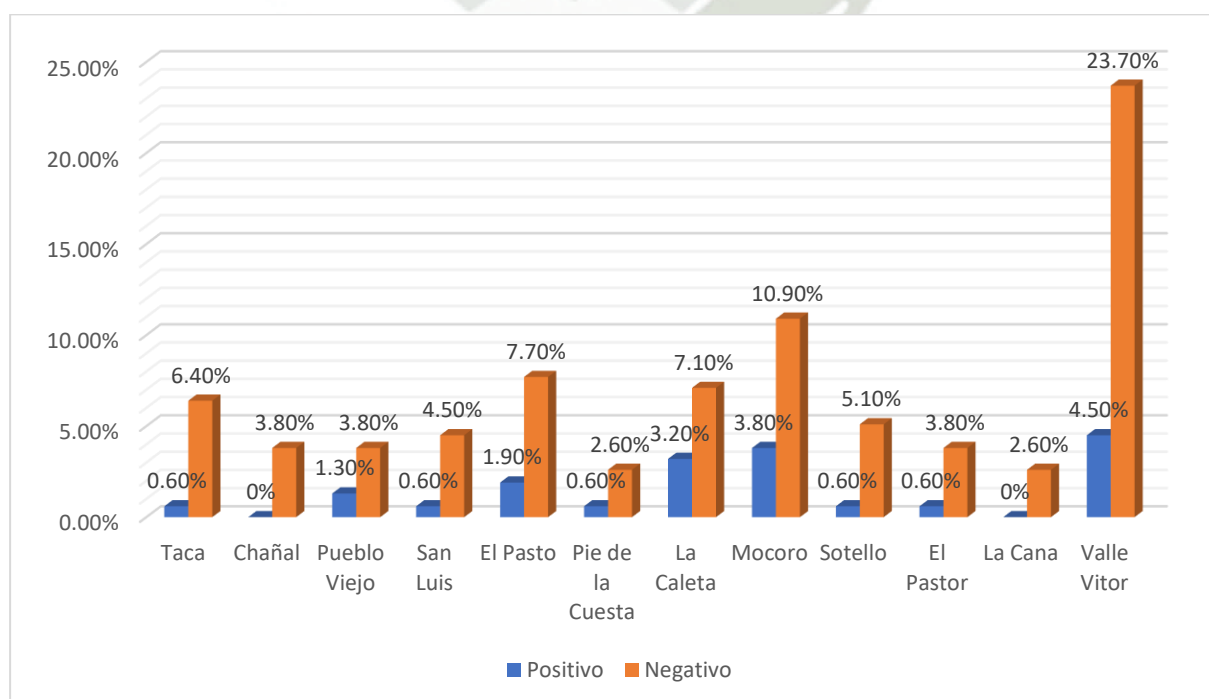
Según la prueba de Chi Cuadrado $X^2(1, N=156; N= \text{Tamaño de la muestra}) = 0.92$ muestra que la edad de los bovinos muestreados no presenta una relación estadística significativa con la presencia de Bovinos con Leucosis. ($P > 0.05$). Por tanto, se puede asumir que el grupo etario al que pertenece cada animal no influye en la interpretación animales seropositivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para diagnóstico de Leucosis.

Dado el pequeño tamaño de muestra en este estudio, al realizarse un estudio futuro que abarque un tamaño de muestra mayor, es probable pueda encontrarse una relación estadística entre el grupo etario y su influencia en la Interpretación de positividad o negatividad de la prueba.

Tabla 3. Frecuencia de Leucosis bovina en el distrito de Vitor, según procedencia

Zona	Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para Leucosis				TOTAL	
	Negativo		Positivo		N.º	%
	N.º	%	N.º	%		
Taca	10	6.4%	1	0.6%	11	7%
Chañal	6	3.8%	0	0%	6	3.8%
Pueblo Viejo	6	3.8%	2	1.3%	8	5.1%
San Luis	7	4.5%	1	0.6%	8	5.1%
El Pasto	12	7.7%	3	1.9%	15	9.6%
Pie de la Cuesta	4	2.6%	1	0.6%	5	3.2%
La Caleta	11	7.1%	5	3.2%	16	10.3%
Mocoro	17	10.9%	6	3.8%	23	14.7%
Sotello	8	5.1%	1	0.6%	9	5.7%
El Pastor	6	3.8%	1	0.6%	7	4.4%
La Cana	4	2.6%	0	0%	4	2.6%
Valle Vitor	37	23.7%	7	6.4%	44	28.2%
TOTAL					156	100%

Gráfico 3. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según Zona de procedencia



En la tabla y gráfico 3. Se evidencia la relación entre el resultado de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel modificada y la Zona de procedencia de los bovinos muestreados pertenecientes al Valle de Vitor. En la zona de Taca un 0.6% de bovinos con resultados positivos, y 6.4% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Chañal un 0% de bovinos con resultados positivos, y 3.8% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Pueblo Viejo un 1.3% de resultados positivos, y 3.8% de bovinos con resultados positivos; en la zona de San Luis 0.6% de resultados positivos, y 4.5% de bovinos con resultados negativos; en la zona de El Pasto 1.9% de resultados positivos, y 7.7% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Pie de la Cuesta 0.6% de resultados positivos, y 2.6% de bovinos con resultados negativos; en la zona de La Caleta 3.2% de resultados positivos, y 7.1% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Mocoro 3.8% de resultados positivos, y 10.9% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Sotello 0.6% de resultados positivos, y 5.1% de bovinos con resultados negativos; en la zona de El Pastor 0.6% de resultados positivos, y 3.8% de bovinos con resultados negativos; en la zona de La Cana 0% de resultados positivos, y 2.6% de bovinos con resultados negativos; en la zona de Valle Vitor 4.5% de resultados positivos, 23.7% de bovinos con resultados positivos.

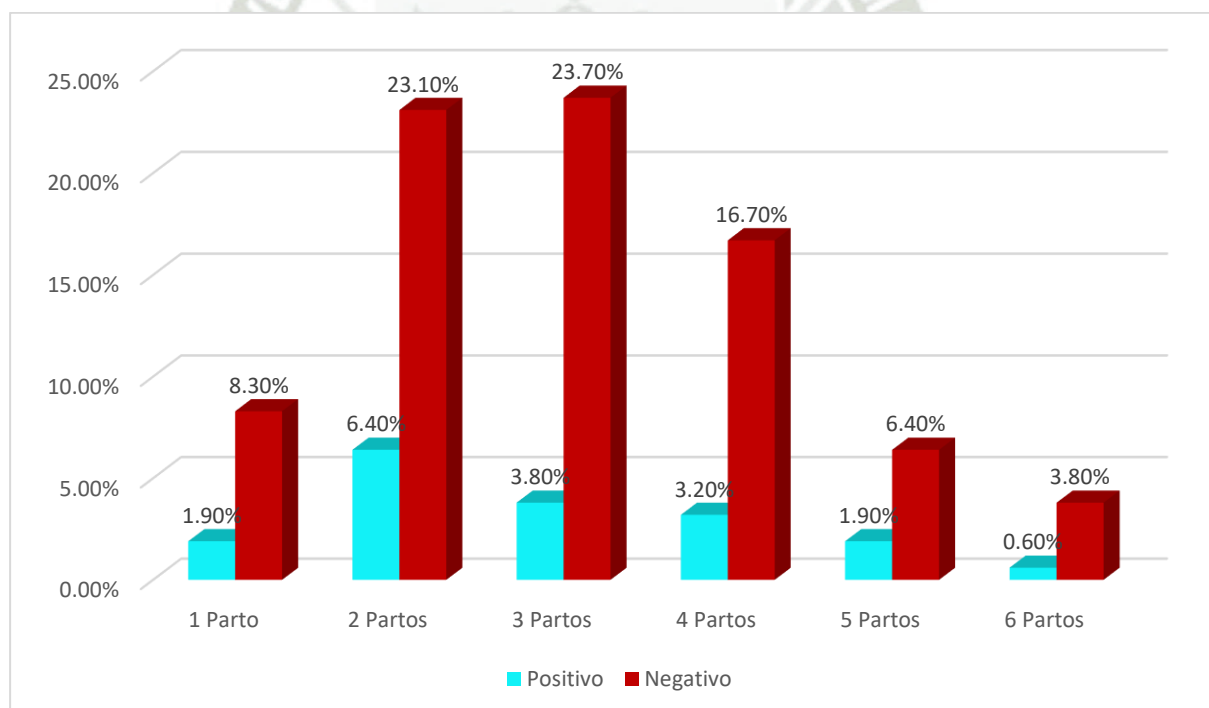
La zona con mayor frecuencia de bovinos seropositivos es la del Valle de Vitor con 4.5%, esto se debe en parte a que fue la Zona con más individuos muestreados; destaca también Mocoro con 3.8% de bovinos seropositivos, siendo la segunda Zona con más individuos muestreados.

Según la prueba de Chi Cuadrado $X^2(1, N=156) = 0.84$ muestra que la Zona de procedencia no presenta una relación estadística significativa con la presencia de Bovinos con leucosis. ($P > 0.05$). Esto concluye en que la zona de donde proceden los bovinos, no tiene influencia en la interpretación de animales seropositivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para diagnóstico de Leucosis Bovina.

Tabla 4. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según número de partos

Partos	Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para Leucosis				TOTAL	
	Negativo		Positivo		N.º	%
	N.º	%	N.º	%		
1	13	8.3%	3	1.9%	16	10.3%
2	36	23.1%	10	6.4%	46	29.5%
3	37	23.7%	6	3.8%	43	27.6%
4	26	16.7%	5	3.2%	31	19.9%
5	10	6.4%	3	1.9%	13	8.3%
6	6	3.8%	1	0.6%	7	4.5%
TOTAL					156	100%

Gráfico 4. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según número de partos



En la tabla y gráfico 4. Muestra la relación entre el resultado de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel modificada y el Número total de Partos. En los bovinos que solo tuvieron 1 parto se encontraron 1.9% de bovinos con resultados positivos, y 8.3% de resultados negativos a la prueba; en los bovinos que tuvieron 2 partos se encontraron 6.4% de bovinos con resultados positivos, y 23.1% de resultados negativos a la prueba; en los bovinos que tuvieron 3 partos se encontraron 3.8% de bovinos con resultados positivos, y 23.7% de resultados negativos a la

prueba; en los bovinos que tuvieron 4 partos se encontraron 3.2% de bovinos con resultados positivos, y 16.7% de resultados negativos a la prueba; en los bovinos que tuvieron 5 partos se encontraron 1.9% de bovinos con resultados positivos, y 6.4% de resultados negativos a la prueba; en los bovinos que tuvieron 6 partos se encontraron 0.6% de bovinos con resultados positivos, y 3.8% de resultados negativos a la prueba.

Los bovinos con 2 partos presentaron la frecuencia más alta con 6.4% de bovinos positivos, el segundo grupo con la frecuencia más alta es la de los bovinos con 3 partos los cuales mostraron 3.8%, así mismo es importante resaltar que ambos grupos de animales son los más grandes.

Según la prueba de Chi Cuadrado $X^2(1, N=156) = 0.942$ muestra la cantidad de partos no presenta una relación estadística significativa respecto a la presencia de Bovinos con leucosis ($P > 0.05$). Lo que sugiere que el número total de partos no tiene influencia en la interpretación de animales seropositivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para diagnóstico de Leucosis Bovina.

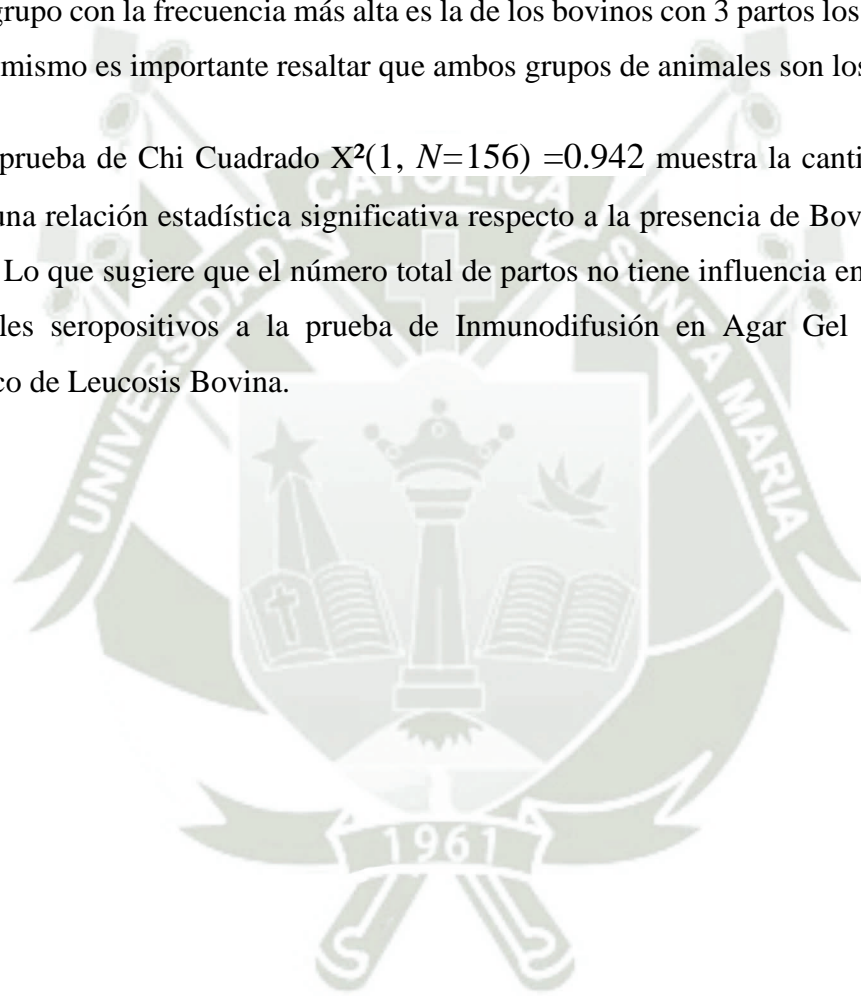
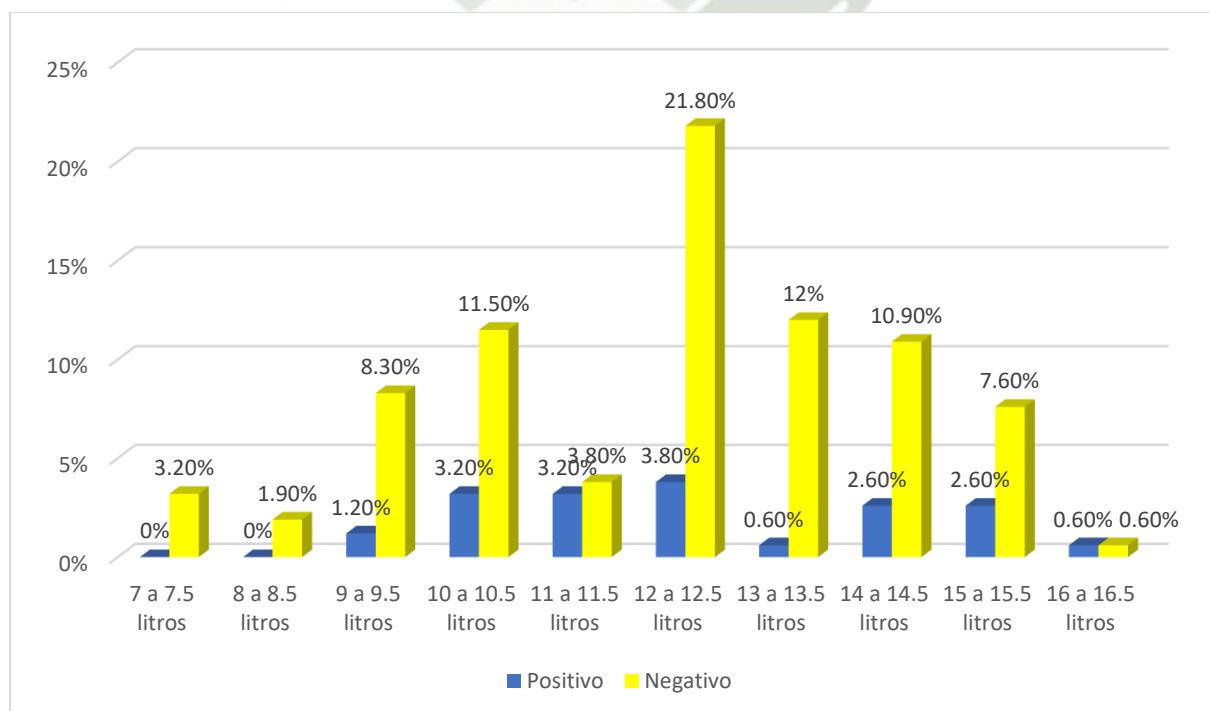


Tabla 5. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según promedio de producción láctea diaria.

Promedio de Producción Láctea diaria	Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para Leucosis				Total	
	Negativo		Positivo		N.º	%
	N.º	%	N.º	%		
7 a 7.5 litros	5	3.2%	0	0%	5	3.2%
8 a 8.5 litros	3	1.9%	0	0%	3	1.9%
9 a 9.5 litros	13	8.3%	2	1.2%	15	9.5%
10 a 10.5 litros	18	11.5%	5	3.2%	23	14.7%
11 a 11.5 litros	6	3.8%	5	3.2%	11	7%
12 a 12.5 litros	34	21.8%	6	3.8%	40	25.6%
13 a 13.5 litros	19	12%	1	0.6%	20	12.6%
14 a 14.5 litros	17	10.9%	4	2.6%	21	13.5%
15 a 15.5 litros	12	7.6%	4	2.6%	16	10.2%
16 a 16.5 litros	1	0.6%	1	0.6%	2	1.2%
Total					156	100%

Gráfico 5. Frecuencia de Leucosis Bovina en el distrito de Vitor, según promedio de producción láctea diaria.



En la tabla y gráfico 5. Muestra la relación entre el resultado de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel modificada y el Promedio de Producción Láctea diaria. En los bovinos con promedios de 7 a 7.5 litros diarios, no se encontraron bovinos con resultados positivos (0%), siendo 3.2% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 8 a 8.5 litros diarios, no se encontraron bovinos con resultados positivos (0%), siendo 1.9% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 9 a 9.5 litros diarios, se encontró un 1.2% con resultados positivos, siendo 8.3% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 10 a 10.5 litros diarios, se encontró un 3.2% con resultados positivos, siendo 11.5% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 11 a 11.5 litros diarios, se encontró un 3.2% con resultados positivos, siendo 3.8% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 12 a 12.5 litros diarios, se encontró un 3.8% con resultados positivos, siendo 21.8% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 13 a 13.5 litros diarios, se encontró un 0.6% con resultados positivos, siendo 12% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 14 a 14.5 litros diarios, se encontró un 2.6% con resultados positivos, siendo 10.9% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 15 a 15.5 litros diarios, se encontró un 2.6% con resultados positivos, siendo 7.6% de bovinos con resultados negativos; en los bovinos con promedios de 16 a 16.5 litros diarios, se encontró un 0.6% con resultados positivos, siendo 0.6% de bovinos con resultados negativos.

La frecuencia de resultados positivos aumenta en los rangos de producción láctea de 9 a 9.5 litros diarios, 10 a 10.5 litros diarios, 11 a 11.5 litros diarios, 12 a 12.5 litros diarios y 14 a 14.5 litros diarios, alcanzando valores entre 0.6% y 3.8%. Esto puede deberse a que los grupos de bovinos de 7 a 7.5 litros y 8 a 8.5 litros están conformados por un número bajo de individuos al igual que los del grupo de 16 a 16.5 litros.

Según la prueba de Chi Cuadrado $X^2(1, N=156) = 0.089$ muestra el promedio de producción láctea diaria no presenta una relación estadística significativa con la presencia de Bovinos con Leucosis ($P > 0.05$). Lo que permite concluir que el promedio de producción láctea diaria no tiene influencia en la interpretación de animales seropositivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel Modificada para diagnóstico de Leucosis Bovina.

Resultado del Ajuste metodológico de la Prueba de Inmunodifusión en agar gel en Portaobjeto

Los resultados después de la adecuación del gel de agarosa a dos dimensiones de tamaño de hoyos o perforaciones y utilización de diferentes cantidades de suero y antígenos se llegaron a visualizar las líneas de precipitación entre las muestras positivas a la prueba de Cogings, en placas portaobjeto con hoyos y distancias de 3 mm, mas no con las de 2mm de diámetro de hoyos y distancia entre ellas.





CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

Primera. Se concluyó que el porcentaje de prevalencia general de Leucosis Bovina para el distrito de Vitor 2024 fue de 17.9 %, siendo la mayor prevalencia en vacas de 3 años procedentes del Valle de Vitor con un 6.4%, en vacas con 2 parto con un 6.4%, en vacas entre 12 a 12.4 litros de producción con 3.8%.

Se observaron variaciones en la frecuencia de bovinos seropositivos, entre la edad, procedencia de la zona del Valle de Vitor, número de partos, promedio de producción láctea diaria; dichas variables, nos indican que no tienen influencia significativa en la interpretación de resultados seropositivos a la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel para el diagnóstico de Leucosis Bovina en la población estudiada.

Segunda. En el ajuste metodológico de la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel adecuada a láminas portaobjeto se logró identificar que las variaciones de hoyos a diámetro 3 mm y distancia entre hoyos de 3 mm son adecuadas para una prueba de Leucosis Bovina, con uso de menor cantidad de antígeno y sueros

Tercera. Se implementó adecuadamente la Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel con hoyos y distancia entre ellos de 3mm, como una alternativa de protocolo de tamizaje en los establos bovinos, dada su simplicidad, bajo costo y facilidad de uso.



CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Dada la seroprevalencia del 17.9% de Leucosis Bovina y su aumento con respecto a estudios anteriores, se recomienda la implementación de la Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel como protocolo de tamizaje en los establos bovinos del distrito de Vitor. Su simplicidad, bajo costo y facilidad de uso la convierten en una herramienta valiosa para la detección temprana de la enfermedad.
- Monitoreo continuo de la epidemiología de la Leucosis Bovina, ya que, dada la variabilidad en la seroprevalencia entre diferentes grupos etarios, zonas geográficas y niveles de producción láctea, se sugiere llevar a cabo un monitoreo continuo de la epidemiología de la Leucosis Bovina en la región. Esto permitirá entender mejor los factores que contribuyen a la propagación de la enfermedad y adaptar estrategias de control específicas.
- Considerar factores adicionales en futuras investigaciones, si bien la edad, la zona de procedencia, el número de partos y la producción láctea diaria no mostraron una correlación estadística significativa con la presencia de Leucosis, se recomienda explorar otros posibles factores de influencia. Futuras investigaciones podrían incluir variables ambientales, genéticas o de manejo que podrían tener un impacto en la seropositividad.
- Refuerzo de medidas de bioseguridad y manejo adecuado en zonas con mayor frecuencia de seropositividad, a pesar de la falta de correlación estadística significativa entre la zona de procedencia y la presencia de Leucosis, se sugiere reforzar las medidas de bioseguridad y adoptar prácticas de manejo adecuadas en aquellas zonas con una mayor frecuencia de bovinos seropositivos. Esto podría contribuir a la prevención y control de la enfermedad en estas áreas.
- Dado el éxito en la implementación de la fase experimental y la adaptación de la metodología para la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel, se recomienda utilizar el ajuste metodológico estudiado y continuar con la investigación experimental. Esto permitirá afinar aún más la sensibilidad y precisión de la prueba, contribuyendo a su aplicabilidad en futuros estudios y diagnósticos.



CAPÍTULO VII

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Leucosis bovina: una visión actualizada*. Gutierrez, Silvina, y otros. 3, Lima : s.n., Jul-Sep de 2020, Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, Vol. 31.
2. *BOVINE LEUKOSIS: AN EXAMPLE OF POOR DISEASE MONITORING OF INTERNATIONAL LIVESTOCK SHIPMENTS TO DEVELOPING COUNTRIES*. Odend´hal, Stewart. 10, Great Britain : s.n., 1986, Social Science & Medicine, Vol. 23, págs. 1017-1020.
3. *THE SEARCH FOR VIRUSES IN BOVINE SEMEN, A REVIEW*. Kahrs, Robert, Gibbs, E.P.J. y Larsen, R.E. 1980, THERIOGENOLOGY, págs. 151-165.
4. *The implication of BLV Infection in the Productivity, Reproductive Capacity and Survival Rate of a Dairy Cow*. Brenner, J., y otros. 1989, Veterinary Immunology and Immunopathology, págs. 299-305.
5. *Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds*. Emanuelson, Ulf, Scherling, Krister y Petterson, Hans. 1992, Preventive Veterinary Medicine, págs. 121-131.
6. *BOVINE LEUKEMIA VIRUS: EARLY REFLECTIONS IN BLOOD AFTER AN EXPERIMENTAL INFECTION OF CALVES*. Klintevall, Kristina, Fuxler, Lisbeth y Fossum, Caroline. 2, 1997, Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., Vol. 20, págs. 119-130.
7. *Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle*. Corredor-Figueroa, Adriana, y otros. 80, Enero de 2020, ELSEVIER.
8. *A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle*. Eaves, F.W., y otros. 1994, Veterinary Microbiology, Vol. 39.
9. *Seroprevalencia de leucosis bovina en establos lecheros de Chachapoyas y Pomacochas*. Frias, Hugo, y otros. 2021, Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology, págs. 62-69.

10. *Bovine Leukaemia: Facts and Hypotheses Derived from the study of an Infectious Cancer*. Burny, A, y otros. 17, 1988, Veterinary Microbiology.
11. *A path model of factors influencing bovine leukaemia virus transmission between cattle herds*. Casal, Jordi, Learte, Pilar y Torre, Elvira. 10, Julio de 1990, Preventive Veterinary Medicine, págs. 47-61.
12. Quiroz Martínez, Miguel Ángel. LEUCOSIS VIRAL BOVINA. *Clínica de los Bovinos I*. s.l. : Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Aleman, Monica y Carlson, Gary P. Enfermedades de los sistemas hematopoyetico y hemolinfatico - LINFOMA BOVINO. [aut. libro] Bradford P. Smith. *MEDICINA INTERNA DE GRANDES ANIMALES*. Cuarta Edición. Barcelona : Elsevier España, 2010, págs. 1173-1176.
14. *Bovine Leukosis: Researches on the enzootic form in Italy*. Rutili, D y Severini, M. 1976, Veterinary microbiology, págs. 307-310.
15. *NONRANDOM CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN BOVINE LYMPHOMA*. Schnurr, Mary, y otros. 1994, Leukemia Research, págs. 91-99.
16. Instituto Suizo de Bioinformatica . *SIB Swiss Institute of Bioinformatics*. [En línea] 2018. <https://www.sib.swiss/>.
17. ICTV. [En línea] 2018. <https://ictv.global/>.
18. *Leucosis bovina: actualización sobre los mecanismos de transmisión y*. Guzmán Verde, Jimmy Pedro. 2019, Universidad.
19. Venables, C. y Lucas, M.H. Enzootic bovine leukosis. [aut. libro] R.W. Blowey, H. Boyd y R.G. Eddy. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Segunda. Oxford : Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing Company, 2004, 43, pág. 693.
20. Nandi, S. Retroviridae. *Veterinary Virology: At A Glance*. Lucknow : International Book distributing Co., 2009, pág. 85.
21. Sperka, Tamás, Matúz, Krisztina y Tozsér, József. Bovine Leukemia Virus Retropepsin. [aut. libro] Neil Rawlings D. *Handbook of Protolytic Enzymes, 3rd Edn*. s.l. : Elsevier, 2013, págs. 218-220.

22. *NON- INFECTIVITY OF SEMEN FROM BULLS INFECTED WITH BOVINE LEUKOSIS VIRUS.* Kaja, R.W. y Olson, C. 1982, THERIOGENOLOGY, págs. 107-112.
23. *Macrophages infected with bovine leukaemia virus (BLV) induce humoral response in rabbits.* Doménech, A., y otros. 1997, Veterinary Immunology and Immunopathology, págs. 309-320.
24. *Bovine leukemia virus: Experimental infection in buffaloes and evaluation of diagnostic test reliability.* Feliazini, Francesco, y otros. 114, 2017, Research in Veterinary Science, págs. 450-454.
25. *Examination of the fecal microbiota in dairy cows infected with bovine leukemia virus.* Uchiyama, Jumpei, y otros. 240, 2020, Veterinary Microbiology.
26. *Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle.* Juliarena, Marcela, y otros. 2016, J. Dairy Sci., págs. 4586-4589.
27. *Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina.* Pinto, G.B., Hawkes, P. y Zabal, O. 1998, Research in Veterinary Science, págs. 385-388.
28. *Experimental infection of sheep with Bovine Leukemia virus (BLV): Minimum dose of BLV-FLK cells and cell-free BLV and neutralization activity of natural antibodies.* Porta, Natalia, y otros. 2019, Revista Argentina de Microbiología, págs. 316-323.
29. Murphy, Frederick A., y otros. *Veterinary Virology.* California : Elsevier, 1999. págs. 382-383.
30. *DISTRIBUTION OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS PROVIRAL DNA SEQUENCES IN TISSUES OF ANIMALS WITH ENZOOTIC BOVINE LEUKOSIS.* Kettmann, Richard, y otros. 1978, Leukemia Research , págs. 23-32.
31. Blowey, R.W. y Weaver, A.D. *A Colour Atlas of DISEASES & DISORDERS OF CATTLE.* 1991.
32. *Biochemical and immunological characterization of the bovine leukemia virus(BLV) envelope glycoprotein (gp51) produced in Saccharomyces cerevisiae.* Legrain, Michele, y otros. 79, Febrero de 1989, Gene, págs. 227-237.

33. *Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction.* Hassan, Naif, y otros. 25, Marzo de 1990, Veterinary Microbiology, págs. 117-129.
34. *Demonstration of antibodies against bovine leukemia virus (BLV) by blocking ELISA using bovine polyclonal anti-BLV immunoglobulin.* Have, P y Hoff-Jorgensen, Rikke. 1991, Veterinary Microbiology, págs. 221-229.
35. *Dépistage de la leucose bovine enzootique par le test elisa appliqué au lactoserum concentré de tank.* P., Prevost, M., Eloit y B., Toma. 1988, Journal of Biological Standardization, págs. 91-97.
36. *Investigation of within- and between-herd variability of bovine leukaemia virus bulk tank milk antibody levels over different sampling intervals in the Canadian Maritimes.* Jhon, Emily, y otros. 2018, Preventive Veterinary Medicine, págs. 90-94.
37. *Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction.* Brandon, R.B. y Naif, H. 1991, Research in Veterinary Science, págs. 89-94.
38. *BOVINE LEUKOSIS: A COMPARATIVE STUDY OF THREE HAEMATOLOGICAL DIAGNOSTIC KEYS IN CHILEAN CATTLE.* W., Rudolph, y otros. 128, 1972, Br. Vet. F., pág. 506.
39. *Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures.* Molloy, J.B., y otros. 1994, Veterinary Microbiology, págs. 323-333.
40. Kerr, Morag G. The white blood cells- Lymphocytosis. *Veterinary Laboratory Medicine.* Oxford : Blackwell Science, 2002, págs. 61-62.
41. Tizard, Ian R. *Veterinary Immunology.* Novena. St. Louis Missouri : ELSEVIER SAUNDERS, 2013.
42. *Bovine Leukemia Virus--- Issue and Model.* Elsevier Science Publishers B.V. 22, 1989, Veterinary Immunology and Immunopathology, págs. 199-200.
43. *The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania.* Acaite, J., y otros. 2007, Preventive Veterinary Medicine, págs. 83-89.

44. *Short communication: Bovine leukemia virus infection in adult cows does not interfere with foot-and-mouth disease vaccination.* Jaworski, Juan, Sala, Manuel y Capozzo, Alejandra. 2018, J. Dairy Sci, págs. 11247-11250.
45. *National control and eradication program of bovine tuberculosis in Chile.* Max, Vanessa, y otros. 2011, Veterinary Microbiology, págs. 188-191.
46. Santillana Amado, Rocio De María. Identificación de la GP51 y la P24 para el Diagnostico de Leucosis Bovina en Ganado Lechero de la Irrigación de Majes Sección C-1 C-2 C-3 Provincia de Caylloma Región Arequipa 2016. [En línea] 2016. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7344?show=full>.
47. Verde-Guzmán, Jimmy-Pedro. Leucosis bovina: actualización sobre los mecanismos de transmisión y estrategias de control y erradicación. *Universidad Mayor de San Marcos.* [En línea] <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10855>.
48. Gutiérrez, Silvina-Elena y Lützelschwab, Claudia-María. Leucosis bovina: una visión actualizada. [En línea] 2020. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172020000300001.
49. Narvaez, Marytere. *Question Pro.* [En línea] [Citado el: 2 de Marzo de 2023.] <https://www.questionpro.com/blog/es/prueba-de-chi-cuadrado-de-pearson/>.
50. *SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA EN LA CUENCA LECHERA DE AREQUIPA.* Flores A., Alicia y Rivera G., Hermelinda. 11, 2000, Revista Investigación Veterinaria Perú, Vol. 2.
51. *Risk-based sample size calculation for consecutive surveys to document freedom from animal diseases.* Schwermer, Heinzpeter, Reding, Isabel y Hadorn, Daniela C. 2009, Preventive Veterinary Medicine , págs. 366- 372.
52. ENFERMEDADES CAUSADAS POR VIRUS Y CLAMIDIAS- LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA. *Medicina General.* 9, págs. 407- 410.



CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

Anexo 1. Mapa o croquis de ubicación del distrito de Vitor, Arequipa



*De Tomado de Google maps,

Anexo 2. Fotografías del trabajo de investigación

Figura 12. Procesando las muestras en agar gel de agarosa



Figura 13. Placa Petri con gel de Agarosa y formación de hoyos de 5 mm



Figura 14. Placas Petri luego de incubación de 72 horas con control positivo y con muestras positivas

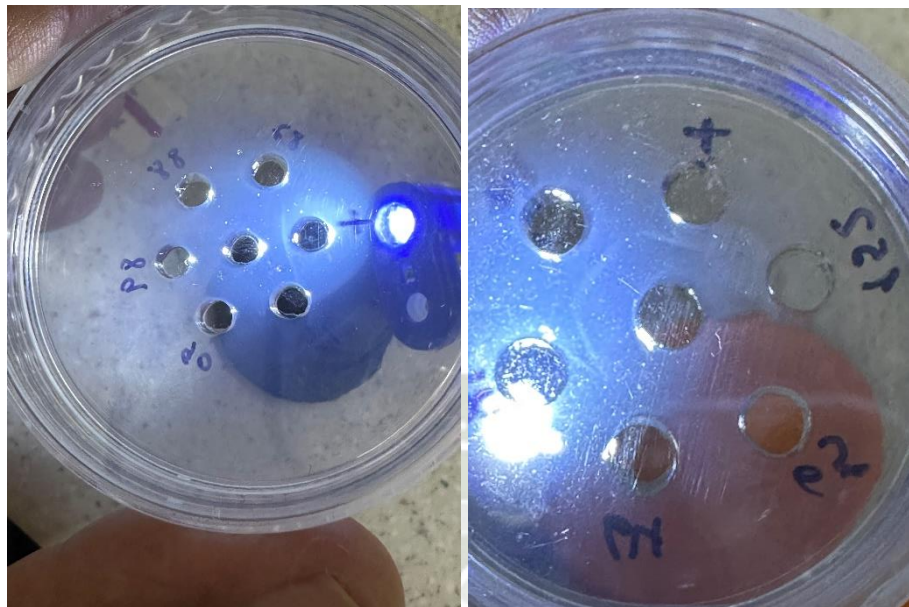


Figura 15. Placa portaobjetos con gel de agarosa y hoyos de 3mm y 2 mm

