

Universidad Nacional

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela de Medicina Veterinaria

Detección del Virus de la Leucosis Bovina en semen de toros en Costa Rica

Modalidad: Tesis

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en

Medicina Veterinaria

Luis Roberto Leiva González

Campus Presbítero Benjamín Núñez, Heredia

2019

Tribunal Examinador

Rafael Vindas Bolaños, PhD.

Decano Facultad Ciencias de la Salud

Laura S. Bouza Mora, M.Sc

Representante Dirección Escuela Medicina Veterinaria

Gaby Dolz Wiedner, PhD

Tutora

Juan José Romero Zúñiga, PhD

Lector

Jorge Chacón Calderón, PhD

Lector

Fecha: _____

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios, quién me ha dado la salud y me ha permitido vivir estos años y me ha guiado hasta llegar a concluir mi carrera. Se lo dedico a mi familia, Papi y Mami, ustedes me dieron la vida, el motor de inspiración, han sido mis principales motivadores y han sido el apoyo en los momentos difíciles y los que han hecho posible finalizar este sueño. A mis hermanos que han jugado un papel trascendental en estos años de estudio. A mis compañeros y amigos que siempre me alentaron y no me dejaron desfallecer en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por ser mi guía, por darme el don de la vida y permitirme cumplir este sueño.

A mis padres, Roberto y Julieta, que me han alentado en todo momento, que me han brindado su amor y cariño y me han permitido llegar al final de este ciclo, Papi y Mami esto es para ustedes, los amo.

A mis hermanos Anita, Adriana y David, por ser parte de esto, por ser fuente de ayuda y confianza, a ustedes gracias.

A mi tutora, la Dra. Gaby Dolz, muchas gracias por confiar en mí, por apoyarme en este proceso, por la ayuda incondicional en todo momento, por la paciencia y porque más que una tutora se convirtió en una guía y una amiga.

A mis amigos del laboratorio, Martita, Connie, Sergio y Antony, gracias especiales a ustedes por toda la ayuda en la realización de esta tesis y por la amistad durante todo este tiempo.

A mis lectores, Juan José Romero y Jorge Chacón, gracias por el apoyo, por los consejos, y el aprendizaje tanto en la carrera como en este proyecto.

A mis profesores y amigos durante la carrera, gracias por apoyarme, por todo lo aprendido y por las experiencias vividas, son parte esencial de mi aprendizaje.

Al Programa de Investigación en Andrología Animal Aplicada, por ayuda dada en la colecta de las muestras, ayuda en las giras y pago de los exámenes de BLV.

A FOCAES por el financiamiento dado para poder asistir a giras de recolección de muestras.

A la Escuela de Medicina Veterinaria por haber tenido la posibilidad de cumplir este gran sueño y por toda la formación dada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1. Virus leucosis bovina	1
1.1.2. Epidemiología	2
1.1.3. Transmisión.....	3
1.1.4. Signos clínicos	4
1.1.5. Diagnóstico	5
1.1.6. Control y erradicación.....	5
1.2 Justificación	7
1.3. Objetivos	8
1.3.1. Objetivo General	8
1.3.2 Objetivos Específicos.....	8
2. METODOLOGÍA	9
2.1 Tipo de estudio.....	9
2.2 Recolecta de muestras	10
2.3 Análisis serológico.....	10
2.4 Análisis Molecular	11
2.5 Análisis estadístico.....	12
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSIÓN	16
5. CONCLUSIONES	21
6. RECOMENDACIONES	21
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
8. ANEXOS	32
ANEXO 1. Información detallada de las muestras recibidas perteneciente a los animales seropositivos al VLVB.....	32
ANEXO 2. Información detallada de las muestras recibidas perteneciente a los animales seronegativos al VLVB.....	33
Anexo 3. Información de las pajillas de semen para IA utilizadas en el proyecto.....	35
Anexo 4. Resultado de las muestras analizadas mediante ELISA.	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de toros BLV seropositivos por provincias.....	12
Cuadro 2. Distribución de toros BLV seropositivos según raza en las fincas ganaderas.....	12
Cuadro 3. Distribución de toros BLV seropositivos según su origen racial, tipo de explotación y edad.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en gel agarosa de los productos de PCR, mostrando la amplificación de parte del gen <i>gag</i> de BLV	14
Figura 2. Alineamiento de un fragmento del gen <i>gag</i> de BLV en semen bovino de Costa Rica (Semen CR) con una cepa del virus detectada en sangre de bovino de Japón (AP018011)	15

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN = ácido desoxirribonucleico

BLV = virus de la leucosis bovina

CSS = servicios para semen certificado

ELISA = ensayo inmunoenzimático

env = envoltura

gag = antígeno específico de grupo

HTLV = virus de la leucemia de células T humanas

ID = inmunodifusión

IA = inseminación artificial

LP = linfocitosis persistente

LBE = leucosis bovina enzoótica

LTR = terminaciones largas repetitivas

OIE = Organización Mundial de Salud Animal

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

pol = polimerasa

RESUMEN

La leucosis bovina enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa incurable causada por el virus de la leucosis bovina (BLV) que infecta los linfocitos B y que se transmite sobre todo mediante transferencia de sangre. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra BLV en sangre de toros (*Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruces) de explotaciones ganaderas costarricenses (leche, carne y doble propósito), y detectar el ADN de BLV en el semen de estos toros.

Entre mayo del 2011 y agosto del 2018 se recolectó un total de 379 muestras de sangre y 133 muestras de semen de toros de 118 explotaciones ganaderas costarricenses (41 de leche, 47 de carne y 30 de doble propósito). De estos animales se obtuvo la siguiente información: procedencia, raza, edad y tipo de explotación. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante un ensayo inmunoenzimático.

Una muestra, seleccionada por conveniencia de 40 muestras de semen de toros seropositivos y 40 seronegativos fueron analizadas mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación). Además, se analizaron 51 pajillas de semen importado de toros de Brasil y Estados Unidos utilizados para inseminación artificial.

La seropositividad de BLV por toro y finca fue 43.3% (164/379) y 64.4% (76/118) respectivamente, siendo los toros de las razas Holstein (75.0%), Jersey (74.2%), y sus cruces (80.0%) los que presentaron una mayor seropositividad. Además, se determinó que los animales *Bos taurus* (71.9%) y toros entre 7.5-10 años (64.2%) presentaron mayores porcentajes de positividad, contrario a los hatos de carne (17.0%) y animales de los otros grupos etarios (0-3.5 años: 25.7% y 4-7 años: 49.2%).

El ADN de BLV se encontró únicamente en una muestra de semen (1.3%) de un toro seropositivo de 3.5 años, de raza Holstein, proveniente de un hato de leche de Pital de San Carlos. Las demás muestras analizadas mediante PCR (semen de animales seropositivos y seronegativos y pajillas) resultaron negativas. Se determinó una baja presencia del virus, por consiguiente, se confirma, que la transmisión de BLV mediante semen no parece ser una vía importante de transmisión del agente. Sin embargo, para fines de comercio y en hatos BLV libres se recomienda utilizar toros BLV seronegativos o analizar mediante PCR el semen de toros seropositivos, para reducir la probabilidad de ingreso del virus al hato.

ABSTRACT

BLV is an incurable infectious disease caused by the Bovine Leukosis Virus (BLV) which infects the B lymphocytes and is transmitted through blood transfusion between cattle. The aim of this research was to determine the presence of antibodies in the blood of bulls (*Bos indicus*, *Bos taurus* and its cross-breeds) of selected Costa Rican cattle farms (milk, beef and dual purpose); also, to detect the DNA of BLV in the semen of these bulls.

A total of 379 blood samples and 133 bull semen samples from 118 Costa Rican cattle farms (41 of milk, 47 of beef and 30 of dual purpose) were collected from May 2011 to August 2018. The information obtained from these animals was the following: origin, breed, age and type of exploitation. The blood samples were analyzed using an immunoenzymatic technique to detect antibodies against BLV.

A convenience sample of 40 seropositive and 40 seronegative bull semen samples was analyzed using the molecular technique (PCR and sequencing). In addition, 51 bovine semen straws imported from Brasil and United States and used for artificial insemination were analyzed.

A total of 43.3% (164) bulls were found to be BLV seropositive whereas 64.4% (76) farms were found to have seropositive bulls. Besides, Holstein (75.0%), Jersey (74.2%) and its cross-breeds (80.0%) revealed higher percentages of BLV positivity. In addition, *Bos taurus* (71.9%) and bulls between 7.5-10 years (64.2%) showed higher percentages of positivity, as beef herds (17.0%) and bulls of other ages (0-3.5 years: 25.7% and 4-7 years: 49.2%).

The DNA of BLV was only found in one semen sample (1.3%) of a 3.5 year old seropositive Holstein bull from a milk herd in Pital of San Carlos. A low presence of the virus was determined; therefore, it is confirmed that the transmission of BLV by semen does not seem to be an important route of agent transmission. However, for commercial purposes and in free BLV herds, it is recommended to use seronegative BLV bulls or to analyze the semen from seropositive bulls, in order to reduce the probability of the virus entering the herd.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1. Virus leucosis bovina

El virus de la leucosis bovina (BLV) es miembro de la familia Retroviridae, género Deltaretrovirus, y es reconocido como el agente etiológico de la leucosis bovina enzoótica (LBE), el cual infecta al ganado en todo el mundo y ocasiona grandes pérdidas económicas a la industria ganadera (Murphy *et al.*, 1999; Sabrina., 2009).

Todos los animales infectados con BLV van a desarrollar anticuerpos y permanecerán asintomáticos la mayor parte de su vida, actuando como portadores. Un 20-30% de los animales va a desarrollar una linfocitosis persistente asintomática, caracterizada por una expansión clonal de linfocitos B, y un 5-10% de los animales va a desarrollar linfomas malignos (linfosarcomas), la cual se conoce como la forma clínica fatal (Burny *et al.*, 1987).

Según Gillet y colaboradores (2007), el BLV está estrechamente relacionado con el virus de la leucemia de las células T humanas (HTLV), y posee los genes típicos del genoma retroviral: el gen *gag* (antígenos específicos de grupo), que codifica para la proteína de cápside (p24), proteína de matriz (p15) y la proteína de nucleocápside (p12), el gen *pol* (polimerasa), región que codifica para la transcriptasa reversa, y el gen *env* (envoltura), región que codifica para la glicoproteína de envoltura, la gp51. Esta proteína de envoltura contiene dominios funcionales que determinan su infectividad (Johnston *et al.*, 2002).

A diferencia de otros retrovirus oncogénicos, los deltaretrovirus contienen una región adicional, el gen *tax*, que codifica una proteína reguladora, que induce el aumento de la transcripción

de LTR (terminaciones largas repetitivas), región del provirus que contiene promotores y amplificadores, ocasionando tumores lentamente (Gillet *et al.*, 2007).

El BLV no existe como partícula vírica libre en sangre periférica (Kerkhofs *et al.*, 1996); más bien, el ADN proviral se integra en el ADN genómico de linfocitos, lo que lleva a una infección de por vida a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes (OIE, 2011).

El virus es frágil e inestable en el medio ambiente, y si se realizan rutinas de manipulación como centrifugación y congelación pierde su infectividad. Puede ser destruido a temperaturas de 63°C por 30 minutos y es inactivado a temperaturas de pasteurización (Rubino & Donham, 1984). Tampoco sobrevive a procesos de secado para la producción de sustitutos de calostro (Toma *et al.*, 1990; Sharma & Adlakha, 2009; Choudhury *et al.*, 2013; Kanno *et al.*, 2013).

1.1.2. Epidemiología

El primer caso de una vaca con hipertrofia superficial de los ganglios linfáticos y esplenomegalia se describió en 1871 en el área de Klaipeda, Lituania (Burny *et al.*, 1980). Se cree que la LBE se propagó hacia los países del oeste, y de ahí a los EEUU en la primera mitad del siglo XX. Finalmente se introdujo a América Central y América del Sur por la importación de ganado desde América del Norte. Actualmente el virus se encuentra distribuido en los cinco continentes (Johnson & Kaneene, 1992).

Los estudios sobre BLV iniciaron en Hannover, Alemania, en 1953 por Götze y colaboradores (Olson & Miller, 1987); sin embargo, no fue hasta 1969 que Miller y colaboradores aislaron el agente causal de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2011).

En Costa Rica, González (1977) describió por primera vez la presencia de BLV en 1976, basado en hallazgos histopatológicos y signos clínicos. Posterior a esto, en 1980, Rodríguez y

colaboradores corroboraron la presencia de BLV en el país por medio de los métodos de inmunodifusión (ID) y llave hematológica, llegando a determinar una prevalencia de 39% en los animales de una finca (Rodríguez *et al.*, 1980). El análisis de 22463 vacas entre 1983 y 1993, determinó 4153 (18.4 %) positivos a la prueba de inmunodifusión (Jiménez *et al.*, 1995).

El BLV parece estar ampliamente distribuido en Costa Rica. En un estudio realizado en 76 hatos lecheros especializados, 74 (97.5%) resultaron positivos a BLV, de éstos, un 53% presentaron prevalencias por animal superiores al 40% (Beita, 2008). Además, se determinó un 22% y 17% de nuevos casos en estas fincas en el 2009 y 2012, respectivamente.

El análisis de un grupo de vacas durante cuatro lactancias determinó que los animales que desde el inicio fueron seropositivos y los que seroconvirtieron durante el estudio produjeron menos leche con respecto a los animales seronegativos. Se estimó una pérdida, por cada lactancia, de \$172 a \$231 por cada animal seropositivo y de \$264 a \$333 por cada animal seroconvertido en la finca (González, 2014).

1.1.3. Transmisión

La transmisión del BLV se da a través de linfocitos infectados, cuando estos son transferidos de un animal seropositivo a un animal negativo. La transmisión entre dos animales puede ocurrir por secreciones y excreciones que contienen linfocitos infectados, de manera transplacentaria durante la preñez (5-10% de los casos), además por alimentación de terneros con calostro o leche proveniente de animales infectados (Wrathall *et al.*, 2005; Monti *et al.*, 2007).

Según Monti (2005), la sangre puede actuar como fuente de contagio en diferente medida y variable intensidad, pues se necesita la transmisión mecánica de la sangre de un animal infectado a otro sano, además el semen con linfocitos infectados también puede propagar la infección a

numerosas fincas y áreas en un periodo corto de tiempo (van Rijn *et al.*, 2004). Además, Aida y colaboradores (2013), reporta que el virus está presente en linfocitos periféricos de animales seropositivos, por lo que se puede dar transmisión horizontal y vertical, siempre y cuando hayan microlesiones o transmisión mecánica de la sangre del animal seropositivo que pueda llegar a circulación del animal seronegativo.

Sin embargo, la vía de transmisión más eficiente de BLV es la infección iatrogénica. Esta ocurre, cuando los animales son tratados sin los cuidados de higiene adecuados, por ejemplo, mientras son inyectados, descornados, tatuados, areteados, castrados, o examinados en forma transrectal logrando pasar un microlitro de sangre con linfocitos infectados al animal sano (MacLachlan y Dubovi, 2011).

La transmisión de BLV por insectos ha sido reportada para tábanos y zancudos, sin embargo, es poco eficiente. La eficiencia de la transmisión de BLV por estos vectores mecánicos es más una función de la prevalencia de la infección dentro del hato, que una función de la habilidad propia del vector de transmitir el virus (Johnson y Kaneene, 1991; Hopkins & DiGiacomo, 1997; Nuotio *et al.*, 2003; Beita, 2008; Monti *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2010).

1.1.4. Signos clínicos

Solamente un 5-10% de los animales infectados desarrollarán tumores (linfosarcoma multicéntrico) que pueden estar localizados en muchos sitios con una gran variación en los signos y síndromes clínicos. La mayoría de estos tumores aparecerán de cuatro a cinco años después de la infección del animal, aunque muchas vacas permanecen asintomáticas durante toda su vida productiva (Monti, 2005; Radostis, 2006), con reducción del rendimiento (González, 2014). En un 5-10% de los casos clínicos, los animales afectados mueren repentinamente tras una pérdida

inexplicable de la condición corporal y el apetito. El abomaso, el corazón y los ganglios linfáticos viscerales y periféricos son los órganos más comúnmente afectados (Radostis, 2006).

La afectación de la pared del abomaso da como resultado digestión alterada y diarrea persistente. Cuando se afecta la pared auricular, se produce insuficiencia cardíaca congestiva. La afectación de las meninges espinales y los nervios da como resultado el inicio gradual de la parálisis posterior. La invasión de los tejidos peri orbitarios comúnmente resulta en exoftalmia. La obstrucción esofágica puede ser el resultado de la participación de los ganglios linfáticos mediastínicos (Radostis, 2006).

1.1.5. Diagnóstico

La ID y el inmunoensayo enzimático (ELISA) son las técnicas de diagnóstico serológico aprobados por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, 2012), y según Van der Maaten & Miller (1990), la seropositividad es el mejor indicador de la infección con BLV, ya que los animales infectados presentan una respuesta inmunológica persistente, caracterizada por altos títulos de anticuerpos dirigidos contra la gp51 y la p24.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en contraste, permite detectar el ADN de BLV (provirus) incorporado en linfocitos infectados, por consiguiente, permite detectar la presencia del agente en los bovinos semanas antes de la aparición de anticuerpos en el animal, evitando resultados falsos negativos (Choi *et al.*, 2002). Además, es posible confirmar o descartar infecciones intrauterinas en terneros que tomaron calostros de vacas positivas (OIE, 2011).

1.1.6. Control y erradicación

Dado que no existe aún una vacuna o tratamiento, se recomienda el control y la erradicación de la infección en el hato, realizando el diagnóstico precoz y la segregación de los animales

infectados. Existen tres alternativas básicas para los procedimientos de control: (i) realizar pruebas serológicas y sacrificar los animales seropositivos; (ii) realizar pruebas serológicas y separar los animales seropositivos de los animales seronegativos, manteniendo una distancia de 200 m entre estos grupos; o (iii) implementar medidas de manejo correctivas. El objetivo principal en estos procedimientos es evitar la transmisión horizontal (DiGiacomo, 1992; Radostis, 2006).

Los animales deben ser tratados con los cuidados de higiene adecuados para evitar la transmisión de la infección de manera iatrogénica, esto se logra al evitar la transmisión de sangre entre animales cuando estos son inyectados, descornados, tatuados, areteados, o castrados, en el recorte funcional de pezuñas, y durante la examinación transrectal. El calostro y la leche de alimentación de los terneros debe ser de vacas seronegativas, y cuando es de vacas seropositivas debe ser pasteurizada durante 30 minutos a 60°C para inactivar el virus.

Al manejar un grupo de terneros, los más jóvenes deberían ser manejados de primeros, posteriormente los de mayor edad y por último los animales infectados. Además, se recomienda el uso de toros seronegativos y el control de los insectos hematófagos, principalmente los de la familia Tabanidae. (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Nuotio *et al.*, 2003; Radostis, 2006; Beita, 2008; Monti *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2010). Un 5 a 10% de terneros se infectarán intrauterinamente, por lo que también es importante detectar a éstos con PCR (Radostis, 2006).

Para que un hato se considere libre de BLV debe cumplir los siguientes requisitos: 1) Que no se hayan detectado signos clínicos de LBE o animales seropositivos durante los últimos dos años, 2) Que todos los bovinos mayores a dos años hayan sido analizados dos veces en intervalos de cuatro a 12 meses y resultaran seronegativos, 3) Que después de cumplir los requisitos anteriores, se hayan introducido únicamente animales de hatos certificados como libre de BLV, o bien que hayan reemplazado solamente con animales propios.

Cuando se introduce un animal de un hato con estatus desconocido de BLV, éste debe ser mayor de 24 meses de edad, y haber sido diagnosticado 30 días antes del ingreso como seronegativo a la prueba de BLV. Este animal debe mantenerse por cuatro meses en aislamiento y resultar otra vez seronegativo a la prueba de BLV, para ser incorporado en el hato (Nuotio *et al.*, 2003).

1.2 Justificación

El BLV además de afectar la producción de leche y los parámetros reproductivos, produce pérdidas económicas en la exportación de ganado y germoplasma debido a la restricción sanitaria impuesta por la OIE (Asadpour & Jafari, 2010; OIE, 2012, González, 2014, Romero *et al.*, 2015). Adicionalmente, la introducción o comercialización de semen contaminado con agentes virales puede propagar la enfermedad, ya que podría infectar numerosas fincas y áreas en un periodo corto de tiempo (van Rijn *et al.*, 2004).

Estudios desarrollados hace varias décadas sugirieron que el semen de toros seropositivos no representaba una fuente de infección importante para las vacas receptoras (Miller & Van Der Maaten, 1979; Kaja & Olson, 1982).

Estudios recientes han demostrado la presencia de BLV en muestras de semen bovino. Dus Santos y colaboradores (2006), analizaron mediante PCR un total de 173 muestras de semen congelado provenientes de toros BLV seropositivos de Argentina, detectando la presencia del agente en nueve (5.2%) muestras.

En otro estudio realizado en Irán, se analizaron 45 muestras de semen, encontrándose cinco (11.1%) animales seropositivos mediante PCR, mientras que un toro seronegativo también resultó positivo, sugiriendo que dicho animal se encontraba en la fase inicial de la infección (Asadpour & Jafari, 2010).

Finalmente, un estudio realizado por Sharifzadeh y colaboradores (2011), analizó 172 muestras de semen y determinó una prevalencia del 20.9%, al detectar la presencia de BLV en 36 muestras de semen de toros utilizados para inseminación artificial (IA) en Irán.

La importancia del estudio radica en que es el primer estudio que se realiza en el país para determinar la seropositividad del BLV así como el análisis de muestras de semen congelado y de pajillas utilizadas para IA en el país.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

1.3.1.1 Determinar la presencia de BLV en semen de toros seropositivos de las explotaciones ganaderas de Costa Rica.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1. Determinar el estatus serológico a BLV de toros (*Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruces) utilizados en monta natural en explotaciones de carne y doble propósito de Costa Rica mediante inmunoensayo enzimático.

1.3.2.2. Implementar la técnica de PCR para la detección del BLV en semen.

1.3.2.3. Determinar la presencia del ADN del BLV en semen de toros seropositivos utilizados en monta natural en las explotaciones de carne y doble propósito costarricenses.

2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo con el propósito de determinar la presencia de anticuerpos contra el BLV en sangre de toros (*Bos indicus*, *Bos taurus* y sus cruces) de explotaciones ganaderas costarricenses seleccionadas (leche, carne y doble propósito), y detectar el ADN de BLV en el semen de toros seropositivos, así como en semen de pajillas utilizadas para inseminación artificial en estas explotaciones.

En el marco del proyecto del Laboratorio de Andrología de la Escuela de Medicina Veterinaria: “Programa de Investigación en Andrología Animal Aplicada” se recolectó, entre mayo del 2011 a agosto del 2018, un total de 379 muestras de sangre de toros reproductores de los cuales se obtuvo 133 muestras de semen. Los toros provenían de 118 explotaciones ganaderas costarricenses principalmente de las zonas de Guanacaste y Alajuela. De estos toros se obtuvo su procedencia, raza, edad, y tipo de explotación.

Las muestras de sangre se analizaron mediante ELISA (SVANOVIR® BLV gp51-Ab) para detectar anticuerpos contra BLV. Una muestra, por conveniencia, de 80 muestras de semen de estos animales (40 toros seropositivos y 40 toros seronegativos), recolectadas entre el año 2011 y el año 2018, se analizaron mediante PCR.

Además, se investigó la presencia de BLV en 51 pajillas de semen importado de Brasil y Estados Unidos de diferentes toros utilizados para inseminación artificial en una explotación de ganadería de carne, así como en una lechería de bajura, provenientes de la provincia de Guanacaste. Dichas pajillas tenían el certificado de Servicios para Semen Certificado (CSS) solicitado por SENASA para la importación de semen al país.

2.2 Recolecta de muestras

La muestra de sangre se tomó de la vena coccígea con el sistema Vacutainer en un tubo con vacío sin anticoagulante. Se tomaron 3 ml de sangre de cada animal, las cuales se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos hasta la refracción del coágulo. Se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria, a donde fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, para separar el suero. Se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

El semen se recolectó mediante la utilización de electro eyaculación, y se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C hasta su análisis.

2.3 Análisis serológico

Los sueros bovinos se analizaron en el Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria mediante ELISA de la compañía SVANOVA, Uppsala, Suecia. (SVANOVIR® BLV gp51-Ab), que detecta anticuerpos contra la gp51 de BLV. Este ensayo posee una sensibilidad de 100% y una especificidad de 99.7% (SVANOVA, 2011). El ensayo se realizó agregando suero de los toros en una dilución 1:25 en una placa sensibilizada con antígenos de BLV, se incubó durante una hora a 37°C, después se realizaron tres lavados, posterior a esto se agregó el conjugado, se incubó durante una hora a 37°C, se lavó tres veces, se adicionó el sustrato y se incubó durante diez minutos a temperatura ambiente, parando la reacción con solución de parado.

El color se midió mediante la densidad óptica (DO) por medio de un fotómetro de microplacas a 450 nm. Por medio de la fórmula $Porcentaje\ de\ Positividad\ (PP) = ((DO\ Muestra\ o\ Control\ Negativo) / (DO\ Control\ Positivo)) \times 100$ se calculó el porcentaje de positividad. Sueros de animales, cuyo porcentaje de positividad arrojaron valores mayores o iguales a 20% se

consideraron positivos y sueros de animales con PP menores a 20% se consideraron negativos, siempre y cuando la DO del control positivo hubiese resultado mayor a 1.0 y el PP del control negativo menor a 15%.

2.4 Análisis Molecular

La extracción del ADN de las muestras de semen se realizó mediante el ensayo Blood and Tissue Kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se implementó el PCR anidado descrito por Wang *et al.* (2002), el cual amplifica un segmento del gen *gag* del provirus.

En la primera ronda se utilizaron los cebadores BLV-F1 (5'- ATG GGA AAT TCC CCC TCC TAT-3') y BLV-R1 (5'- GTT TTT TGA TTT GAG GGT TGG-3'). En la segunda ronda se utilizaron los cebadores BLV-F2 (5'- AAC ACT ACG ACT TGC AAT CC-3') y BLV-R2 (5'- GTT CCT TAG GAC TCC GTC G-3').

Se usó un volumen total de 12.5 ul de reacción, la cual contenía aproximadamente 100 ng de ADN, 0.2 pM de cada cebador, 1.25ul de 10X tampón de PCR, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs y 2.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa.

La reacción de amplificación consistió en tres minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida por 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 50°C durante 45 segundos, y extensión a 72°C por un minuto, seguido de una extensión final a 72°C por cinco minutos.

Para la segunda ronda se utilizaron 2.5 ul de ADN de la primera ronda, la concentración de los reactivos y condiciones de temperatura fueron las mismas descritas para el primer PCR, durante 40 ciclos. Muestras que amplificaron un fragmento de 385 pb en el segundo PCR fueron consideradas positivas.

Como control positivo se utilizó una extracción de ADN de sangre proveniente de una vaca BLV positiva, donada por un productor proveniente de Copey de Dota (GenBank AP018011 hasta AP18032), y en el caso del control negativo se utilizó agua grado molecular.

Muestras positivas en el PCR anidado se enviaron a purificar y a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias parciales obtenidas se editaron y alinearon en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999), se compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología (NCBI). Las secuencias parciales obtenidas y editadas fueron depositadas en la base de datos del NCBI.

2.5 Análisis estadístico

La información de las muestras (sueros, semen, pajillas) se documentó en el formulario de recepción de muestras, recopilando los siguientes datos: identificación, raza, edad y tipo de explotación. Estos datos y los resultados de las pruebas diagnósticas (ELISA y PCR) se introdujeron en una base de datos digital, con la que se realizó un análisis descriptivo (Anexos).

3. RESULTADOS

Del total de 379 toros analizados provenientes de 118 fincas, 164 (43.3%) resultaron seropositivos para el BLV, distribuidos en 76 diferentes fincas para una prevalencia de 64.4% (76/118). La mayoría de los toros y fincas analizadas se ubicaron en las provincias de Guanacaste (34.7%) y Alajuela (53.4%), los porcentajes de positividad determinados a nivel de provincia y fincas se evidencian en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Distribución de toros BLV seropositivos por provincias.

Provincias	Fincas		Animales	
	BLV+/Total	%	BLV+/Total	%
Guanacaste	24/41	58.3	60/120	50.0
Alajuela	46/63	73.0	88/195	45.1
Puntarenas	4/7	51.1	12/29	41.3
Limón	0/2	0	0/21	0
Cartago	0/1	0	0/2	0
San José	0/1	0	0/2	0
Heredia	1/2	50.0	1/5	20.0
No reportado	1/1	100.0	3/5	60.0
TOTAL	76/118	64.4	164/379	43.3

En el Cuadro 2 se presenta la distribución de las diferentes razas de toros analizados en las fincas y los toros que resultaron seropositivos por raza. La mayor cantidad de toros seropositivos fueron cruces Holstein-Jersey, seguidos por toros de las razas Holstein, Jersey y Pardo Suizo, mientras que toros de las razas Brahman y Nelore mostraron los más bajos porcentajes de positividad. Los toros de las razas Brahman, Jersey y Holstein fueron además las razas más comunes en las fincas analizadas.

Cuadro 2. Distribución de toros BLV seropositivos en las fincas ganaderas según raza

Razas	Fincas		Animales	
	BLV+	%	BLV+/Total	%
Cruce Holstein x Jersey	3	1.7	4/5	80.0
Holstein	25	14.2	24/32	75.0
Jersey	42	23.8	52/70	74.2
Pardo Suizo	10	5.6	13/19	68.4
Gyr	13	7.3	6/12	50.0
Gyrolando	13	7.3	15/32	46.8
Simmental	5	2.8	2/6	33.3
Brangus	7	3.9	3/11	27.2
Otras razas	3	1.7	4/17	23.5
Brahman	39	22.1	18/120	15.0
Nelore	9	5.1	1/16	6.2
No reportado	7	3.9	22/39	56.4
TOTAL	176		164/379	43.3

Al analizar los toros de acuerdo con su genotipo, se determinó porcentajes de positividad de BLV más altos en *Bos taurus* y cruces, que en *Bos indicus*. Al analizar los toros según el tipo de explotación en el que se encontraban se determinó mayor cantidad de toros BLV seropositivos en explotaciones de leche y de doble propósito. El mayor porcentaje de toros BLV seropositivos se detectaron en el grupo de animales entre los 7.5 y 10 años (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de toros BLV seropositivos según su origen racial, tipo de explotación y edad.

Variables		BLV/Total	%
Origen racial	<i>Bos taurus</i>	95/132	71.9
	Cruces	18/43	41.8
	<i>Bos indicus</i>	25/148	16.8
Tipo explotación	Leche	80/106	75.4
	Doble propósito	30/56	53.5
	Carne	30/176	17.0
	No reportado	24/41	58.5
Edad	0 - 3.5	42/163	25.7
	4 - 7	60/122	49.2
	7.5 – 10	9/14	64.2
	No reportado	53/80	66.2

Del total de 80 muestras de semen de toros (40 seropositivos y 40 seronegativos) y 51 pajillas de semen analizadas mediante PCR solamente se pudo detectar la presencia de BLV mediante PCR en el semen de un toro seropositivo (Figura 1). El animal PCR positivo M-6

provenía de una finca lechera de Pital de San Carlos, Alajuela, era de raza Holstein, y tenía 3.5 años de edad.

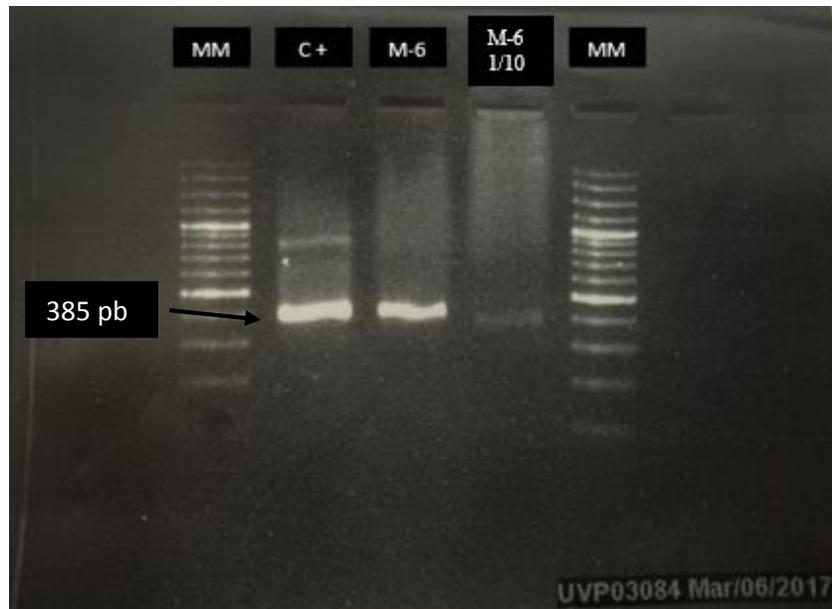


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, mostrando la amplificación parcial de parte del gen *gag* de BLV. **MM**: Marcador de peso molecular de 100 kb. **C+**: Control positivo. **M-6**: Muestra de semen positiva. **M-6**: Muestra de semen positiva diluida 1/10.

La secuenciación y el análisis BLASTn de la muestra, estableció un 100% de identidad nucleotídica entre la muestra M-6 y el control positivo (385/385 pb), asimismo un 100% de identidad con secuencias depositadas en GenBank (AP018011 al AP18032) de aislamientos de BLV en *Bos taurus* de Japón (Figura 2), y menor similitud nucleotídica (99,48%, 383/385 pb) con una secuencia aislada en tejido mamario humano (JQ480623). La secuencia de la muestra fue depositada en el GenBank con el número de accesoión 2443457 y 2443458.

Semen CR	1	AACACTACGACTTGCAATCCTGCAGGCCGACCTACTCCGGCTGACCTAGAACAACCTTG	60
AP018011	1069	AACACTACGACTTGCAATCCTGCAGGCCGACCTACTCCGGCTGACCTAGAACAACCTTG	1128
Semen CR	61	CCAATATATTGCTTCCCCGGTCGACCAAACGGCCCATATGACCAGCCTAACGGCAGCAAT	120
AP018011	1129	CCAATATATTGCTTCCCCGGTCGACCAAACGGCCCATATGACCAGCCTAACGGCAGCAAT	1188
Semen CR	121	AGCCGCCGCTGAAGCGGCCAACACCCTCCAGGGTTTTAACCCCAAACGGGACCCTAAC	180
AP018011	1189	AGCCGCCGCTGAAGCGGCCAACACCCTCCAGGGTTTTAACCCCAAACGGGACCCTAAC	1248
Semen CR	181	CCAACAATCAGCTCAGCCCAACGCCGGGATCTTAGAAGTCAATATCAAACCTCTGGCT	240
AP018011	1249	CCAACAATCAGCTCAGCCCAACGCCGGGATCTTAGAAGTCAATATCAAACCTCTGGCT	1308
Semen CR	241	TCAGGCCTGGAAAAATCTCCCTACTCGTCCTTCAGTACAACCTTGGTCCACCATCGTCCA	300
AP018011	1309	TCAGGCCTGGAAAAATCTCCCTACTCGTCCTTCAGTACAACCTTGGTCCACCATCGTCCA	1368
Semen CR	301	AGGCCCCGCCGAAAGCTATGTAGAGTTTGTCAACCGTTACAAATTTTCATTAGCTGACAA	360
AP018011	1369	AGGCCCCGCCGAAAGCTATGTAGAGTTTGTCAACCGTTACAAATTTTCATTAGCTGACAA	1428
Semen CR	361	CCTTCCCGACGGAGTCCCTAAGGAAC	386
AP018011	1429	CCTTCCCGACGGAGTCCCTAAGGAAC	1454

Figura 2. Alineamiento de un fragmento del gen *gag* de BLV en semen bovino de Costa Rica (Semen CR) con una cepa del virus detectada en sangre de bovino de Japón (AP018011).

4. DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio en Costa Rica que investiga la presencia de BLV en semen y determina el porcentaje de toros BLV seropositivos, que son utilizados en la monta natural. La seropositividad determinada concuerda con estudios previos realizados en nuestro país, que determinaron prevalencias alrededor del 40% en vacas lecheras especializadas (Rodríguez, 1980; Mora, 1997; Beita, 2008; González, 2014), y concuerda además con los reportes de Choi *et al.* (2002), quienes encontraron seropositividades del 40.2% en toros reproductores provenientes de Estados Unidos. Difiere, sin embargo, de otros estudios que reportaron seropositividades en

toros en rangos de 5.2% y 20.9% (Dus Santos *et al.*, 2006; Asadpour & Jafari, 2010; Sharifzadeh *et al.*, 2011).

Estas diferencias se pueden deber, a que estos autores analizaron animales de centros de inseminación artificial y no toros en fincas ganaderas. Aunque el presente estudio no fue diseñado para tener representatividad poblacional, sí ofrece información valiosa pues detectó una alta frecuencia de seropositividad de BLV en los reproductores; además, una amplia distribución del agente en el hato nacional, ya que en un 64% de las fincas se encontraron reproductores positivos, además en el 2008 Beita que gran cantidad de productores (52.6%) respondieron no conocer el estatus serológico de sus reproductores, lo que concuerda con los resultados del presente trabajo.

La mayoría de toros seropositivos (también la mayoría de animales analizados) provenían de las provincias de Alajuela (73.0%) y Guanacaste (58.3%), que también son las provincias en donde se encuentran la mayor cantidad de explotaciones de tipo extensivo, que utilizan toros para la monta natural (INEC, 2014). Estudios previos determinaron prevalencias de 50.2% y 53.7% de BLV en vacas de Alajuela y Guanacaste, respectivamente (Beita, 2008), similar a lo encontrado en este trabajo en toros.

La frecuencia de seropositivos por raza y genotipo concuerdan con lo reportado por Trainin y Brenner (2005) y Beita (2008), respecto a que la raza Holstein y sus cruces, o los *Bos taurus*, son más susceptibles a contraer una infección de BLV. Esto se ha explicado porque las vacas Holstein desarrollan, más frecuentemente linfocitosis persistente, por lo que la transmisión del virus ocurre con mayor facilidad en hatos con estas razas (Trainin y Brenner, 2005).

Además, se reporta una cierta resistencia de las vacas de la raza Jersey a BLV, por transmitir más grasa y proteína a través de la leche (Detilleux *et al.*, 1991), lo cual fue confirmado

por Beita (2008), quien reportó una prevalencia de BLV del 23.1% en vacas Jersey contra un 50.6% en vacas Holstein.

En el presente estudio las prevalencias de BLV en toros Holstein (75%) y Jersey (74.2%) fueron similares, lo que se puede deber, a que la prevalencia de BLV depende en estos más de las prácticas de manejo que se realizan en el hato (que pueden prevenir o a transmitir el virus) que de factores ecológicos o de raza (Pollari *et al.*, 2013).

El mayor porcentaje de toros seropositivos se encontró en explotaciones lecheras (75.4%) y doble propósito (53.5%), estos resultados concuerdan con lo descrito por Petukhov *et al.*, (2002) que reportan una mayor susceptibilidad del genotipo *Bos taurus* a infecciones con BLV y una mayor resistencia de *Bos indicus* al virus. Además, los *Bos taurus* tienen un manejo más intensivo a nivel de lecherías, lo que lleva a una mayor posibilidad de transmisión del virus, además de ser explotaciones donde los animales viven más, en contraste con los *Bos indicus*, quienes tiene una vida más corta, y por ende menos posibilidad de contagio (Choi *et al.*, 2002).

El porcentaje de positividad a BLV es menor en toros jóvenes, lo que concuerda con lo reportado por Radostis (2002) quien determinó un aumento significativo de toros BLV positivos en animales mayores de 24 meses, que es cuando los animales ingresan al hato de producción y tienen contacto directo y de mayor duración con animales infectados, además de que se realiza un manejo más intensivo con estos animales, lo que conlleva a mayor riesgo de transmisión iatrogénica del virus.

El ADN del virus se determinó únicamente en una muestra de semen, encontrando una baja presencia de BLV, lo que concuerda con lo encontrado por diversos autores, quienes reportan que

el semen de toros seropositivos no representa una fuente de infección importante para las vacas receptoras (Miller & Van Der Maaten, 1979; Kaja & Olson, 1982).

Estudios previos (Dus Santos *et al.*, 2006; Asadpour & Jafari, 2010; Sharifzadeh *et al.*, 2011) también determinaron la presencia del BLV en semen proveniente de toros seropositivos, con rangos de 5.2% y 20.9%, concluyendo que esta vía de transmisión tiene un bajo potencial infectante, no obstante recomiendan que en un programa de control y erradicación el análisis del semen de toros con un estatus serológico desconocido debe ser considerado, así como en la importación y exportación de pajillas de IA de un alto valor genético y económico utilizadas en explotaciones libres del virus. Sin embargo, el no encontrar ADN de BLV en semen de toros seropositivos debido a la ausencia de linfocitos infectados en el eyaculado no debe ser motivo para concluir que esta no sea una ruta importante en la transmisión del virus, por lo que se debe de investigar en trabajos futuros.

Además Koning & Liebich, (2005) consideraron que el miembro peneano del bovino contiene placas linfáticas en su mucosa, las cuales pueden ser irritadas durante la monta natural, ocasionando la liberación de linfocitos infectados en toros BLV positivos, pudiendo así infectar a las hembras durante la copula. En concordancia con esta hipótesis, Beita (2008) determinó el utilizar toros seropositivos como un factor de riesgo, ya que fincas que utilizaban reproductores con estatus serológico de BLV desconocido presentaron prevalencias de BLV más altas que fincas que utilizaron reproductores BLV negativos.

La detección de ADN viral en una muestra de semen permite realizar el primer reporte en Costa Rica, sin embargo, no significa, que el semen de este toro vaya a infectar a una receptora. Según Kerkhofs *et al.*, (1996), el virus no se encuentra como partícula libre en la sangre periférica,

sino que dentro de linfocitos, por lo tanto, estos deben de sobrevivir en el cuello uterino e ingresar a través de microlesiones al torrente sanguíneo de la vaca para infectarla.

Según Choi y colaboradores (2002), una mala técnica de recolección de semen que resulta en traumatismo de los tejidos y la inflamación asociada puede causar la infiltración de leucocitos, y en el caso de un toro infectado con BLV, daría lugar a un PCR positivo en una colecta de semen. Por lo tanto, se recomienda el uso de técnicas adecuadas de recolección de semen para utilizar en inseminación artificial, evaluar microscópicamente el semen para descartar la presencia de leucocitos, o aplicar el PCR para detectar el virus en muestras representativas de semen de cada eyaculado (Choi *et al.*, 2002).

Según establece la legislatura de nuestro país, el semen de los toros que van a ser importados al país deben de provenir de centros de Inseminación Artificial, que deben cumplir los requisitos mínimos de CSS (SENASA, 2016). Sin embargo, en la resolución de Mercosur No. 43/02, se propone realizar PCR en muestras de 0.5 ml de las extracciones de semen de toros seropositivos. Un resultado negativo en PCR es suficiente para permitir la exportación de dicho semen.

En este contexto resulta de suma importancia el desarrollo de una prueba de diagnóstico para el BLV en muestras de semen, para certificar el germoplasma libre del virus y de esta forma, exportar a grupos que pertenecen al grupo Mercosur (Dus Santos *et al.*, 2006). Sin embargo, la OIE (2011) recomienda a los países importadores exigir el uso de semen de toros seronegativos.

Finalmente, se logró secuenciar un segmento de BLV presente en el semen de un toro, concordando con secuencias de BLV aisladas previamente en *Bos taurus* de Japón y Estados

Unidos. La utilización de técnicas moleculares, especialmente el PCR, para la detección de BLV en semen, permite el uso de ese material genético de alto valor.

5. CONCLUSIONES

- 1 Se determinó una prevalencia de 43.3% de toros BLV seropositivos, similar a la reportada en vacas en Costa Rica en estudios anteriores.
- 2 Se logró implementar la técnica del PCR para la detección del BLV en muestras de semen.
- 3 Se determinó una amplia distribución (76/118 fincas analizadas) de toros BLV seropositivos en explotaciones ganaderas de Costa Rica.
- 4 Se logró detectar BLV en el semen de un toro seropositivo utilizado como reproductor en una finca lechera.

6. RECOMENDACIONES

- 1 Realizar análisis serológico a los animales que van a ser utilizados como reproductores en las explotaciones ganaderas
- 2 Implementar un manejo adecuado siguiendo las medidas de control de BLV, con el fin de disminuir la prevalencia de este virus en los reproductores utilizados en nuestro país.
- 3 Analizar mediante PCR semen fresco o congelado de toros seropositivos utilizados en monta e IA en las explotaciones ganaderas del país.
- 4 Analizar mediante PCR las pajillas para IA, ya sea producidas en el país o importadas, cuando provengan de toros con estatus serológico de BLV positivo o desconocido.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima S.N, 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.* 4, 328.

APHIS. 2008. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007. United states department of agriculture.

Asadpour R & R Jafari. Detection of bovine leukosis provirus in blood and semen samples of Bulls. *Comp Clin Pathol* (2012) 21:187–191.

Beita G. 2008. Epidemiología de la leucosis enzoótica bovina en hatos lecheros especializados de Costa Rica. Licenciatura. Universidad Nacional. Costa Rica.

Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D & Thiel E. 2007. No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology*, 4, 11.

Burny A, Bruck C, Chantrenne H. 1980. Bovine Leukemia Virus: Molecular Biology and Epidemiology, Raven Press, New York.

- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L & Thomas R. (1987). Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv* 6, 139–159.
- Camargos M.F, Stancek D, Rocha M.A, Lessa M.K, dos Reis J.K & Leite R.C. 2002. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samplas and phylogenetic analysis. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 49: 325-331.
- Camargos M.F, Pereda A, Stancek D, Rocha M.A, dos Reis J.K, Greiser-Wilke I & Leite R.C. 2007. Molecular characterization of the *env* gene from Brazilian field isolates of *bovine leukaemia virus*. *Virus Genes*, 34: 343-350.
- Choi K, Monke D, Stott J, 2002. Absense of bovine leucosis virus in semen of seropositive Bulls. *J. Vet. Diag. Inv.* 14: 403-406.
- Choudhury B, Finnegan J, Frossard C, Venables & F. Steinbach. 2013. Colostrum replacer and Bovine Leukemia Virus seropositivity in calves. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1027-1028.
- Corfoga. 2014. VI Censo Nacional Agropecuario: actividades pecuarias, prácticas y servicios agropecuarios. [en línea]. <http://www.corfoga.org/estadisticas/poblacion-animal/> (Consulta 29 Julio 2018).

- Dávila G. 2010. Efecto de la infección con el virus de leucosis viral bovina (VLVB) sobre los parámetros productivos y reproductivos, e incidencia, en hatos lecheros de Costa Rica. Tesis para optar por el grado de *Master Scientiae*. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Detilleux J, A Freeman & L Miller. 1991. Comparison of natural transmission of bovine leukemia virus in Holstein cows of two genetic lines selected for high and average milk production. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1551-1555.
- Dolz-Wiedner, G. 2015. Entrevista con la Doctora Gaby Dolz Wiedner. Encargada Laboratorio de Entomología, Programa de Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Heredia. C.R. Set. 2015.
- Dus Santos M.J, Trono K, Lager I & A Wigdorovitz. 2006. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Sc. Direct. Vet. Mic.* 119: 10-18.
- Gillet N, A Florins, M Boxus, C Burteau, A Nigro, F Vandermeers, H Balon, A Bouzar, J Defoiche, A Burny, M Reichert, R Kettmann & L Willems. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in humans. *Retrovirology.* 50:4:18.
- González E, 1977. Linfoma: discovering of a fatal disease in cattle. *Agroindustria (Costa Rica)* 6, 15-18.

- González, A. 2014. Efectos de la infección con el virus de la leucosis bovina enzoótica sobre parámetros productivos y reproductivos en vacas lecheras de Costa Rica. Licenciatura. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Hopkins S.G, R.F DiGiacomo. 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. N. Am.* 13 (1), 107–128.
- Johnson R & J Kaneene. 1991. Bovine Leukemia virus. Part II. Risk Factors of Transmission. *The Compendium*. Vol. 13: 681-690.
- Johnson R, Kaneene J.B. 1992. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.*, 62, 287–312.
- Johnston E.R, Albritton L.M, Radke K. 2002. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptorbinding domain of bovine leukemia virus surface protein. *J. Virol.* 76, 10861–10872.
- Kanno T, R Ishihara, S Hatama, Y Oue, H Edamatsu, Y Konno, S Tachibana & K Murakami. 2013. Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of Bovine Leukemia Virus, [en línea]. *J. Vet. Med. Sci.* https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/2/76_13-0253/_article (Consulta: 20 jun. 2013)

Kaja R & C Olson. 1982. Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leucosis virus. *Theriogenology*. 18:107–112.

Kerkhofs P, Adam E, Droogmans L, Portetelle D, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R, Willems L, 1996. Cellular pathways involved in the ex vivo expression of bovine leukemia virus. *J. Virol.* 70, 2170–2177.

Kobayashi S, T Tsutsui, T Yamamoto, Y Hayama, K Kameyama, M Konishi. 2010. Risk factors associated within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan, [en línea]. *Vet. Rch.* <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/1> (Consulta: 04 marzo. 2018).

Koning H, Liebich H. 2005. *Anatomía de los Animales Domésticos: órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. 2da ed. Ed. Panamericana. Alemania.

MacLachlan N & E Dubovi (ed). 2011. *Fenner's Veterinary Virology*. 4th Ed. Elsevier. USA.

Miller J & M Van Der Maaten. 1979. Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Natl. Cancer. Inst.* 62:425–428.

- Mirsky M. L, Olmstead C.A, Da Y. & Lewin H.A. 1996. The prevalence of proviral bovine leukaemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J. Virol.* 70: 2178-2183.
- Monke D. 1986. Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *J Am Vet Med Assoc.* 188(8):823–826.
- Monti G. 2005. Epidemiology, infection dynamics and effective control of bovine leukemia virus within dairy herds of Argentina: A quantitative approach. Tesis de Ph.D. Wageningen University, Germany.
- Monti G.E, K Frankena & C.M de Jong. 2007. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina. *J. Epidemiology and infect.* 135: 228-237.
- Mora, E. 1997. Evaluación de prácticas de manejo asociadas al riesgo de la transmisión del virus de la leucosis bovina enzoótica en hatos lecheros de Costa Rica. Licenciatura. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Murphy F, Gibbs J, Horzinek M, and Studdert M. 1999. *Vet. Virol.* 3th ed.
- Nekouei O. 2015. Study of prevalence, risk factors, and lifetime impacts of infection with bovine leukemia virus in the Canadian dairy industry. University of Prince Edward Island, Atlantic veterinary college, department of. Management. 2015

Nuotio L, H Rusanen & E Neuvonen. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. J. Prevent. Vet. Med. 59: 43-49.

Olson C & J Miller. 1987. History and terminology of Enzootic Bovine Leukosis. p.2-8. In Burny A, Mammerickx M (eds). Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus. Martinus Nijhoff Publishing, USA.

OIE, 2011. Enzootic bovine leucosis: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.11_EBL.pdf (Consulta 25 Set 2014).

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2012. [en línea] <http://www.oie.int/es/> (Consulta: 23 Set. 2014).

Perzova R.N, Loghran T.P, Dube S, Ferrer J, Esteban E & Poiesz B.J. 2000. Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. Br. J. Haematol, 109:67-40.

Petukhov V.L, Kochnev N.N, Karyagin A.D, Korotkevich O.S, Petukhov I.V, Marenkov V.G, Nezavitin A.G. y Korotkova G.N. 2002. Genetic resistance to BLV. En Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier,

- Francia. Session 13, págs. 1–4. Agosto de 2002. Montpellier, Francia. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).
- Radostits, O. 2002. Leucosis bovina enzoótica (linfosarcoma bovino). p. 1239-1254. *In* O. Radostits, C. Gay, D. Blood & K. Hinchcliff. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. McGraw-Hill Interamericana. España.
- Radostits, O. 2006. Leucosis bovina enzoótica (linfosarcoma bovino). p. 1209-1221. *In* O. Radostits, C. Gay, P. Constable & K. Hinchcliff. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Saunders Ltd. USA.
- Rodríguez L, R Esquivel & J Alvarado. 1980. Bovine viral leukaemia in dairy herds of the central valley of Costa Rica. *Cien. Vet.* 2: 183-194.
- Rodríguez S, A Florins, N Gillet, A de Brogniez, M Sánchez, M Boxus, F Boulanger, G Gutiérrez, K Trono, I Alvarez, L Vagnoni & L Willems. 2011. Preventive and therapeutic strategies for Bovine Leukemia Virus: lessons for HTLV. *Virus Res.* 3:1210-1248
- Romero J.J, Dávila G, Beita G, Dolz G. 2015. Incidencia de Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) y efecto del estatus serológico sobre parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 39: 7-18.

Sabrina M, M.D Rodriguez, R.H Golemba, K.T Campos & R.J Jones. 2009. Bovine leukaemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. *J. General Virol.* 90: 2788-2799.

Schwartz I, Lévy D. 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet. Rch. BioMed Central*, 25 (6), pp.521-536

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA. 2005. Manual de Procedimientos: Leucosis Bovina Enzoótica. Buenos Aires, Argentina.

Servicio Nacional de Salud Animal, SENASA. 2016. Dirección de Cuarentena Animal. [en línea] www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/100516091049.doc. (Consulta: 10 Jul. 2019).

Sharifzadeh A, A Doosti & P. G Dehkordi. 2011. Molecular detection of bovine leukaemia virus (BLV) in the semen samples of Bulls. *World Journal of Zoology*. 6(3): 285-290.

Sharma N & C Adlkha. 2009. Textbook of veterinary virology. International book distributing, India.

Trainin Z. & J Brenner. 2005. The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel journal of veterinary medicine*. 60(4): 94-105.

- Toma B, M Eliot & M Savey. 1990. Animal diseases caused by retroviruses: enzootic bovine leukosis, equine infectious anemia and caprine arthritis-encephalitis. *Rev. Sci. Tech.* 4:1039-1076.
- Trono K, D Erez-Filgueira, S Duffy, M Borca & C Carrillo. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol.* 83(3):235–248.
- Van der Maaten M & Miller J.M. 1990. *Virus infections of ruminants.* Elsevier Science Publishers B.V. 419-429.
- Van Rijn P, Wellenberg G, Hakze-van der Honing R, Jacobs L, Moonen P, Feitsma H. 2004. Detection of economically important viruses in boar semen by quantitative real time PCR technology. *J. Virol. Meth.* 120 (2): 160-161.
- Wrathall A.E, H.A Simmons & A van Soom. 2005. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. 2005. *J. Sc. Direct. Theriogenology (Elsevier).* 65: 247-274.
- Zhao X, Buehring C. 2007. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Viol.* 366 (2007): 150-165.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Información detallada de las muestras recibidas perteneciente a los animales seropositivos al VLVB.

Identificación	Raza	Edad	Procedencia
02	Gyrolando	3 años	Fortuna, Alajuela
302/3	Brahman	3.5 años	Pocosol, Alajuela
Palomo	Brahman	7.5 años	Fortuna, Alajuela
Colby	Holstein	1.5 años	Fortuna, Alajuela
Manhatan	Jersey	5 años	Monterrey, Alajuela
Tomatillo	Jersey	3.5 años	Monterrey, Alajuela
Gamón	Jersey	2 años	Monterrey, Alajuela
Jace	Jersey	7 años	Monterrey, Alajuela
Perímetro	Jersey	3 años	Monterrey, Alajuela
Chumeco	Jersey	4 años	Monterrey, Alajuela
Julian	Jersey	3 años	Monterrey, Alajuela
Jacinto	Jersey	4 años	Monterrey, Alajuela
2/248	Brahman	4.5 años	Guatuso, Alajuela
407/6	Brahman	4.5 años	Guatuso, Alajuela
501	Holstein x Brahman	4 años	Pocosol, Alajuela
50	Pardo Suizo	6 años	Pocosol, Alajuela
2/266	Brahman	6 años	Pocosol, Alajuela
602/1	Gyr	10 años	Pocosol, Alajuela
1818	Brangus	3.5 años	Canalete, Alajuela
500	Jersey	5 años	Monterrey, Alajuela
Jersey Viejo	Jersey	8 años	Monterrey, Alajuela
Rojo	Jersey	8 años	Monterrey, Alajuela
Cachillo	Jersey	3.5 años	Monterrey, Alajuela
10	Holstein x Jersey	6 años	Monterrey, Alajuela

M-1	Gyrolando	4 años	Pital, Alajuela
M-6	Holstein	3.5 años	Pital, Alajuela
1797	Jersey x Holstein x Pardo	3 años	Río Cuarto, Alajuela
1697	Jersey	4 años	Río Cuarto, Alajuela
LG 13-09	Jersey	5 años	Río Cuarto, Alajuela
793/7	Brahman	7 años	Santa Clara, Alajuela
769/7	Brahman	4 años	Santa Clara, Alajuela
Juancito	Jersey	4 años	Monterrey, Alajuela
8107	Brahman	4 años	Abangares, Guanacaste
Holstein Rojo	Holstein	5 años	Monterrey, Alajuela
700	Jersey	2.5 años	Monterrey, San Carlos
3186	Jersey	10 años	Monterrey, San Carlos
10	Jersey	4.5 años	Monterrey, San Carlos
Luis	NR	NR	NR
Enrique	NR	NR	NR
Banano	NR	NR	NR

ANEXO 2. Información detallada de las muestras recibidas perteneciente a los animales seronegativos al VLVB.

Identificación	Raza	Edad	Procedencia
1024	Pardo Suizo	5 años	Pocosol, Alajuela
500	Marchigiana	4.5 años	Fortuna, Alajuela
455/05	Brahman	4.5 años	Fortuna, Alajuela
427/9	Gyr	2 años	Pocosol, Alajuela
Máximo	Jersey	3.5 años	Monterrey, Alajuela
Juanito	Holstein	5 años	Guatuso, Alajuela
10	Montbeliarde	5 años	Pocosol, Alajuela
8104	Brahman	4 años	Abangares, Gunacaste

51	Gyrolando	5 años	Pocosol, Alajuela
Palomo	Brahman	7 años	Abangares, Guanacaste
508/1	Brahman	2 años	Abangares, Guanacaste
Vaquero	Brahman	6 años	Chomes, Puntarenas
Chavarría	Brahman	6 años	Chomes, Puntarenas
2876	Sinmental	5 años	Guatuso, Alajuela
318/6	Brahman	4.5 años	Guatuso, Alajuela
200	Gyr	1.5 años	Pocosol, Alajuela
40/6	Brahman	5.5. años	Pocosol, Alajuela
942	Pardo Suizo	2 años	Pocosol, Alajuela
01	Pardo Suizo	3 años	Pocosol, Alajuela
Suarez	Brahman	3 años	Pocosol, Alajuela
Pando	Brahman	3 años	Pocosol, Alajuela
435	Brahman	6 años	Chomes, Puntarenas
0042	Brangus	4 años	Guatuso, Alajuela
08	Sinmental	2.5 años	Pococí, Limón
9107	Brahman	3 años	Abangares, Guanacaste
9111	Brahman	3 años	Abangares, Guanacaste
0021	Brahman x Angus	7 años	Guatuso, Alajuela
174/9	Brahman	2.5 años	Cañas, Guanacaste
927/8	Brahman	3.5 años	Fortuna, Alajuela
El Gyr	Holstein x Gyr	4 años	San Carlos
189	Gyrolando	3 años	Fortuna, Alajuela
710/07	Brahman	5 años	Chomes, Puntarenas
Sirano	Holstein	2.5 años	San Juan de Chicán, Cartago
604/6	Nelore	5.5 años	Pocosol, Alajuela
31	Jersey	5 años	Cutris, Alajuela
305/1	Nelore	2 años	Pocosol, Alajuela
290	NR	NR	NR

Pavito	NR	NR	NR
Quincho	NR	NR	NR
350	NR	NR	NR

Anexo 3. Información de las pajillas de semen para IA utilizadas en el proyecto.

Nombre toro	Raza
7027	Senepol
55-8 TOBY	Senepol
40-2	Senepol
OLR 25M	Senepol
CAMPEON	Senepol
NOCONA	Senepol
CN 5480 HERCULES	Senepol
CN 640	Senepol
CN 4635 BLONDIE	Senepol
CN 5825	Senepol
CN 550N	Senepol
CN 5K	Senepol
CN 435M	Senepol
CN 1029S	Senepol
CN 8033U	Senepol
CN 933R	Senepol
WC 98N	Senepol
WC 123	Senepol
WC 112N	Senepol
XC 238U	Senepol
WC 950K	Senepol
PRR 7013S	Senepol
PRR3023M	Senepol

PRR PRIMERO 6008R	Senepol
PRR 1009W	Senepol
RBS9704G	Senepol
RD HRCLS 6801J	Senepol
SCR 6001S	Senepol
SCR 3051N	Senepol
HBC 7115 48K	Senepol
TORÁ	Senepol
1-3 TE	Senepol
MEHUM	Senepol
PATROLA	Senepol
UMBAU	Senepol
COWBOW	Senepol
635E	Senepol
AVON	Jersey
EGGTROEN	Noruego Rojo
X-HAMILTON	Swiss Fleckvieh
MOCHA	Shorthorn
TIPOLI	Montbeliarde
8-1	SP25-H25-J25-AS25
T-6	AS50-HO25-SP25
SE-299	Senepol
AMAZING	Ayrshire
MR MIGHTY	Holstein Rojo
X-LORIN	Holstein Rojo
AMNESTY ET	Holstein Rojo
ADDIER	CharolaisS
FLOR DE MAYO	Senepol

Anexo 4. Resultado de las muestras analizadas mediante ELISA.

Identificación	Raza	Edad	Procedencia	Resultado ELISA
2415/8	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
2358/8	Brahman	3.5 años	Abangares	Negativo
2414/8	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
889/1	Brahman	2 años	Abangares	Negativo
7	Holstein	2 años	Fortuna	Negativo
02	Gyrolando	3 años	Fortuna	POSITIVO
189	Gyrolando	3 años	Fortuna	Negativo
1024	Pardo Suizo	5 años	Pocosol	Negativo
40/6	Brahman	5.4 años	Pocosol	Negativo
935/2	Brahman	3.7 años	Pocosol	Negativo
302/3	Brahman	3.7 años	Pocosol	POSITIVO
6/3	Brahman	3.7 años	Pocosol	Negativo
453/6	Brahman	5.5 años	Pocosol	Negativo
427/9	Gyr	1.8 años	Pocosol	Negativo
253/2	Holstein	1.4 años	Fortuna	POSITIVO
Colby	Holstein	1.2 años	Fortuna	POSITIVO
455/05	Brahman	6 años	Fortuna	Negativo
303/4	Brahman	7.4 años	Fortuna	Negativo
134/2	Brahman	7.9 años	Fortuna	Negativo
Palomo	Brahman	7.5 años	Fortuna	POSITIVO
500	Marchigniana	4.4 años	Fortuna	Negativo
Manhatan	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
Maximo	Jersey	3.4 años	Monterrey	Negativo
Tomatillo	Jersey	3.6 años	Monterrey	POSITIVO
Gavon	Jersey	2.2 años	Monterrey	POSITIVO
Jace	Jersey	7 años	Monterrey	POSITIVO

Perímetro	Jersey	3.2 años	Monterrey	POSITIVO
Chumeco	Jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
Julian	Jersey	3 años	Monterrey	POSITIVO
Jacinto	Jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
28055Y	Brahman	3.5 años	Fortuna	Negativo
2703107	Brahman	3.9 años	Fortuna	Negativo
413/2	Brahman	1.4 años	Fortuna	Negativo
448/3	Brahman	3 años	Fortuna	Negativo
Juanito	Holstein	5 años	Guatuso	Negativo
0021	Brangus	6.9 años	Guatuso	Negativo
35	Simmental	3 años	Guatuso	POSITIVO
2/248	Brahman	4.6 años	Guatuso	POSITIVO
2876	Simmental	5 años	Guatuso	Negativo
407/6	Brahman	4.6 años	Guatuso	POSITIVO
318/6	Brahman	4.6 años	Guatuso	Negativo
174/9	Brahman	2.7 años	Cañas	Negativo
173/9	Brahman	2.7 años	Cañas	Negativo
Suarez	Brahman	3 años	Pocosol	Negativo
942	Pardo Suizo	2 años	Pocosol	Negativo
01	Pardo Suizo	3 años	Pocosol	Negativo
Pando	Brahman	3 años	Pocosol	Negativo
501	Holstein x Brahman	4 años	Pocosol	POSITIVO
200	Gyr	1.6 años	Pocosol	Negativo
604/6	Nelore	5.5 años	Pocosol	Negativo
708/4	Brahman	3 años	Pocosol	Negativo
50	Pardo Suizo	6 años	Pocosol	POSITIVO
2/266	Brahman	6 años	Pocosol	POSITIVO
51	Holstein x Gyr	5 años	Pocosol	Negativo
10	Montbelier	5 años	Pocosol	Negativo

361/3	Brahman	3.8 años	Pocosol	Negativo
602/1	Gyr	10 años	Pocosol	POSITIVO
100	Pardo Suizo	4 años	Pocosol	Negativo
920/9	Brahman	2.9 años	Abangares	Negativo
887/9	Brahman	2.9 años	Abangares	Negativo
886/9	Brahman	2.9 años	Abangares	Negativo
995/8	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
985/8	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
804/8	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
756/8	Brahman	3.5 años	Abangares	Negativo
Teja	Jersey	6 años	Monterrey	Negativo
821/1	Nelore	4.9 años	Aguas Zarcas	Negativo
31	Jersey	5 años	Cutris	Negativo
6	Jersey x Pardo suizo	2 años	Cutris	Negativo
927/8	Brahman	3.5 años	Fortuna	Negativo
500	Jersey	6 años	Monterrey	POSITIVO
240	Jersey	3.5 años	Monterrey	Negativo
Jacinto	Jersey	3 años	Monterrey	Negativo
Jersey viejo	Jersey	8 años	Monterrey	POSITIVO
Teja	Jersey	3.6 años	Monterrey	Negativo
Rojo	Jersey	8 años	Monterrey	POSITIVO
Cachillo	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
110	Jersey	3.6 años	Monterrey	Negativo
10	Jersey x Hostein	6 años	Monterrey	POSITIVO
710/07	Brahman	5 años	Chomes	Negativo
408/9	Nelore	3.4 años	Chomes	Negativo
2115	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
205	Brahman	1.9 años	Cañas	Negativo

301/11	Jersey	1.6 años	Coronado	Negativo
302/9	Jersey	3.6 años	Coronado	Negativo
8104	Brahman	4 años	Abangares	Negativo
9107	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
9111	Brahman	3 años	Abangares	Negativo
8107	Brahman	4 años	Abangares	Negativo
Palomo	Brahman	7 años	Abangares	Negativo
508/1	Brahman	2 años	Abangares	Negativo
618	Brahman	5.6 años	Cañas	Negativo
495/2	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
08	Simmental	2.6 años	Pococí	Negativo
0063	Brangus	2.2 años	Guatuso	Negativo
0042	Brangus	4 años	Guatuso	Negativo
Juanito	jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
10	Jersey	4.6 años	Monterrey	POSITIVO
3186	Jersey	1.4 años	Monterrey	POSITIVO
Holstein rojo	Holstein	5 años	Monterrey	POSITIVO
700	Jersey	2.6 años	Monterrey	POSITIVO
Enrique	NR	NR	NR	POSITIVO
Banana	NR	NR	NR	POSITIVO
Pavito	NR	NR	NR	Negativo
Quincho	NR	NR	NR	Negativo
Luis	NR	NR	NR	POSITIVO
271027	Nelore x Brahman	6 años	Barva	Negativo
Vaquero	Brahman	4 años	Chomes	Negativo
435	Brahman	6 años	Chomes	Negativo
Chavarría	Brahman	6 años	Chomes	Negativo
534/2	Brahman	2.6 años	Cañas	Negativo
208	Brahman	2 años	Cañas	Negativo

437/1	Brahman	1.9 años	Cañas	Negativo
M-1	Gyrolando	4 años	Pital	POSITIVO
M-6	Holstein	3.5 años	Pital	POSITIVO
821/9	Nelore	3.7 años	Pocosol	Negativo
127/1	Nelore	2.2 años	Pocosol	Negativo
609/1	Nelore	1.9 años	Pocosol	Negativo
52/10	Brahman	3 años	Pocosol	Negativo
305/1	Nelore	2 años	Pocosol	Negativo
Guapo	Sardo	2.9 años	Pocosol	Negativo
295/61	Brahman	3 años	Pocosol	Negativo
472/4	Brahman	10 años	Cañas	Negativo
346-D2	Nelore x Brahman	9 años	Upala	Negativo
209/8	Nelore	3.9 años	Upala	Negativo
6-Negro	Hereford x Brahman	6 años	Upala	Negativo
2/452	Nelore	3.7 años	Upala	Negativo
2/411	Nelore	3.9 años	Upala	Negativo
503/7	Nelore	15 años	Upala	Negativo
33/8	Brangus	4 años	Upala	Negativo
2/477	Nelore	3.5 años	Upala	Negativo
34/8	Brangus	4 años	Upala	Negativo
1818	Brangus	3.6 años	Upala	POSITIVO
183/11	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
181/11	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
185/11	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
178/10	Brahman	2.2 años	Cañas	Negativo
182/11	Brahman	2 años	Cañas	Negativo
179/10	Brahman	2.2 años	Cañas	Negativo
11/13	Brahman	2.8 años	Chomes	Negativo

717/2	Nelore	2 años	Chomes	Negativo
123	Holstein x Gyr	2.4 años	Fortuna	Negativo
05	Jersey	6 años	Hojancha	Negativo
11	Gyr	3 años	Hojancha	Negativo
2526	Brahman	2 años	Abangares	Negativo
13 LM	Limousine	5 años	Fortuna	Negativo
16 LM	Limousine	5 años	Fortuna	Negativo
12 LM	Limousine	5 años	Fortuna	Negativo
870/8	Brahman	6 años	Fortuna	Negativo
18	Limousine	5 años	Fortuna	Negativo
378/6	Brahman	7 años	Fortuna	Negativo
49/3	Simmental	10 años	Fortuna	Negativo
56/3	Brahman	10 años	Fortuna	POSITIVO
361/6	Brahman	7 años	Fortuna	Negativo
1002/6	Brahman	7 años	Fortuna	Negativo
633/0	Brahman	4 años	Fortuna	Negativo
176	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
195	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
153	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
230	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
220	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
239	Holstein x Gyr	4 años	Nicoya	Negativo
501/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
505/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
507/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
517/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
519/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
521/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
525/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo

535/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
971/2	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
973/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
975/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
981/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
983/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
985/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
987/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
993/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
995/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
997/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
999/3	Brahman	2.8 años	Guápiles	Negativo
304/4	Brahman	2.7 años	Guápiles	Negativo
2732	Brangus	2.6 años	La Vega, SC.	POSITIVO
2977	Brangus	2.4 años	La Vega, SC.	Negativo
2726	Brangus	2.6 años	La Vega, SC.	Negativo
645/7	Brahman	4 años	La Vega, SC.	POSITIVO
620	NR	3 años	Monterrey	POSITIVO
618	NR	5 años	Monterrey	POSITIVO
Pardo	Pardo Suizo	NR	Atenas	POSITIVO
394/6	Brahman	NR	Atenas	POSITIVO
662/6	Brahman	NR	Atenas	Negativo
Jersey	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Chumeco	Holstein x Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Chumeco 2	Holstein x Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Venado	Holstein x Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Pirata	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Mardoqueo	Marchigniana	NR	Tilarán	Negativo
500	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO

Venezolano	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Gato	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
Pedregal	Nelore	NR	Tilarán	POSITIVO
Toño	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO
Cabro	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO
Mariano	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO
Lolo	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO
Sanson	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
7000	Holstein Rojo	NR	Tilarán	POSITIVO
Mechudo J1	Jersey	NR	Tilarán	Negativo
5000	Holstein	NR	Tilarán	POSITIVO
Emanuel HR1	Holstein	NR	Tilarán	Negativo
Toño 4000	Jersey	NR	Tilarán	POSITIVO
878	NR	NR	Cañas	Negativo
372	NR	NR	Cañas	Negativo
185	NR	NR	Cañas	POSITIVO
184	NR	NR	Cañas	POSITIVO
201	NR	NR	Cañas	POSITIVO
48	NR	NR	Cañas	POSITIVO
113	NR	NR	Cañas	Negativo
2067	NR	NR	Cañas	Negativo
615	NR	NR	Cañas	POSITIVO
9144	NR	NR	Cañas	POSITIVO
934	NR	NR	Cañas	POSITIVO
Cuzuco	NR	NR	Miramar	POSITIVO
Marito	NR	NR	Miramar	POSITIVO
Zorro	NR	NR	Miramar	POSITIVO
Clon	NR	NR	Miramar	Negativo
Cutacha	NR	NR	Miramar	POSITIVO

1000	NR	NR	Tronadora	POSITIVO
21	NR	NR	Tronadora	POSITIVO
1	NR	NR	Tronadora	POSITIVO
600	NR	NR	Aguacate	POSITIVO
4	NR	NR	Aguacate	POSITIVO
100	NR	NR	Aguacate	Negativo
83/4	Brahman	3 años	Sarapiquí	Negativo
B51	Brahman	2 años	Sarapiquí	Negativo
410/5	Brahman	10 años	Sarapiquí	POSITIVO
B57	Brahman	2 años	Sarapiquí	Negativo
394	Holstein x Gyr	NR	Cañas	Negativo
209	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
1194	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
226	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
442	Simental	NR	Cañas	POSITIVO
449	Pardo Suizo	NR	Cañas	Negativo
306	Brahman x Holstein	NR	Cañas	POSITIVO
311	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
880	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
936	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
421	Holstein	NR	Cañas	POSITIVO
1072	Pardo Suizo	NR	Cañas	POSITIVO
Macho	Brahman	4 años	Los Chiles	POSITIVO
Juan	Brahman	4 años	Los Chiles	POSITIVO
236	Jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
A944	Pardo Suizo	3 años	Monterrey	POSITIVO
583	Holstein x Gyr	4 años	Monterrey	POSITIVO
El Jersey	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
804	Holstein Rojo	4 años	Monterrey	POSITIVO

Basúa	Jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
Vaidoso	Gyr	3 años	Monterrey	POSITIVO
Vecinito	Gyr	5 años	Guatuso	POSITIVO
Drogba	Holstein Rojo x Brahman	6 años	Guatuso	POSITIVO
318	Holstein	3 años	Guatuso	POSITIVO
323	Gyr	6 años	Guatuso	Negativo
307	Jersey	7 años	Guatuso	POSITIVO
Fofo	Gyrolando	2 años	Cutris	POSITIVO
Mengano	Jersey	2 años	Cutris	POSITIVO
Gavilan	Gyr	36 meses	Monterrey	POSITIVO
El de la casa	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
Pedro	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
Ronald	Jersey	4 años	Monterrey	POSITIVO
Mierma	Gyrolando	4 años	Monterrey	POSITIVO
Pequeño	Jersey	2 años	Monterrey	POSITIVO
Pancho	Jersey	2 años	Monterrey	POSITIVO
Macho negro	Jersey	5 años	Monterrey	POSITIVO
Chapernal	Gyr	8 años	Tierras Morenas	Negativo
Mulo	Gyr	2.6 años	Tierras Morenas	Negativo
Salazar	Holstein	3 años	Tierras Morenas	Negativo
Ulate	Jersey	2 años	Tierras Morenas	POSITIVO
521	Jersey	4 años	San Carlos	POSITIVO
52	Holstein x Gyr	3 años	Fortuna	POSITIVO
Lajas	Jersey	4.6 años	Tanque	POSITIVO
88	Jersey	2.5 años	San Carlos	POSITIVO
Papillo	Jersey	6 años	San Carlos	POSITIVO
Legal	Jersey	2.6 años	San Carlos	POSITIVO
10	Holstein	NR	San Carlos	POSITIVO

Juancito	Jersey	NR	San Carlos	Negativo
6666	Holstein	3 años	San Carlos	POSITIVO
01	Gyr	3 años	San Carlos	POSITIVO
H 09	Holstein	NR	San Carlos	POSITIVO
Pelon	Jersy	3 años	Arenal	Negativo
Gyr	Gyr	5 años	Arenal	POSITIVO
23	Holstein	4 años	Tilarán	POSITIVO
Jersey	Jersey	6 años	Tilarán	POSITIVO
González	Jersey	6 años	Arenal	POSITIVO
Colorado	Holstein Rojo	2 años	Tilarán	POSITIVO
Jupon	Holstein	1.5 años	Tilarán	POSITIVO
Adrian	Jersey	2.5 años	Tilarán	Negativo
Geiner	Jersey	2.5 años	Tilarán	POSITIVO
Jacinto	Holstein	2 años	Tilarán	POSITIVO
79002	Jersey	5 años	Tilarán	POSITIVO
Por si acaso	Jersey	2 años	Tilarán	POSITIVO
Arturo	Jersey	5 años	Tilarán	POSITIVO
3340	Jersey	5 años	Tilarán	POSITIVO
Quijote	Jersey	2 años	Tilarán	POSITIVO
Lui	Jersey	2 años	Tilarán	POSITIVO
317/34	NR	NR	San Carlos	Negativo
318/34	NR	NR	San Carlos	POSITIVO
4584	NR	NR	San Carlos	Negativo
4585	NR	NR	San Carlos	Negativo
457	NR	NR	San Carlos	Negativo
4574	NR	NR	San Carlos	Negativo
4541	NR	NR	San Carlos	Negativo
1007/3	NR	NR	San Carlos	Negativo
080/23	NR	NR	San Carlos	POSITIVO

229/53	NR	NR	San Carlos	Negativo
2717	NR	NR	San Carlos	Negativo
3518	Brahman	4 años	Los Chiles	Negativo
927/3	Brahman	4 años	Los Chiles	POSITIVO
791/3	Brahman	4 años	Los Chiles	POSITIVO
155	Gyrolando	NR	Nicoya	POSITIVO
8Y6	Jersey	NR	Nicoya	Negativo
100	Holstein	NR	Nicoya	POSITIVO
500	Holstein	NR	Nicoya	POSITIVO
Arete rojo	Gyrolando	NR	Nicoya	POSITIVO
154	Gyrolando	NR	Nicoya	POSITIVO
250	Jersey	NR	Nicoya	POSITIVO
461	Gyrolando	NR	Nicoya	POSITIVO
Cochis	Gyrolando	5 años	Nicoya	POSITIVO
Pollo	Simbrah	1.5 años	Nicoya	Negativo
100 lulo	Holstein	2.5 años	Nicoya	POSITIVO
Viejo	Brahman	2 años	Nicoya	Negativo
Gris	Brahman	6 años	Puntarenas	POSITIVO
Pardo	Pardo Suizo	6 años	Puntarenas	POSITIVO
1207	Gyrolando	4 años	Puntarenas	POSITIVO
58	Jersey	5 años	Puntarenas	POSITIVO
3720	Pardo Suizo	2 años	Puntarenas	Negativo
1199	Gyrolando	3 años	Puntarenas	POSITIVO
3495	Holstein x Pardo S.	2 años	Puntarenas	Negativo
Martin	Brahman	6 años	Puntarenas	POSITIVO
Rodillo	Pardo Suizo	3 años	Nandayure	POSITIVO
213	Gyrolando	2 años	Puntarenas	Negativo
8912	Gyrolando	3 años	Puntarenas	Negativo
10	Gyrolando	5 años	Puntarenas	POSITIVO

313	Gyrolando	2 años	Puntarenas	Negativo
87-12	Gyrolando	3 años	Puntarenas	Negativo
14 Impresor	Gyrolando	5 años	Puntarenas	Negativo
9312	Gyrolando	3 años	Puntarenas	Negativo
3 cabro	Gyrolando	8 años	Puntarenas	POSITIVO
211	Gyrolando	4 años	Puntarenas	Negativo
2/753	Brahman	3 años	Guatuso	Negativo
318/6	Brahman	6 años	Guatuso	Negativo
Tortugo	Brangus	9 años	Guatuso	POSITIVO
Pichon	Brangus	4 años	Guatuso	Negativo
Pardín	Pardo Suizo	4 años	Guatuso	POSITIVO
Brahman B	Brahman	6 años	Guatuso	Negativo
36	Brahman Rojo	4 años	Guatuso	POSITIVO
Manhatan	jersey	36 años	Tilarán	Negativo
100	Holstein x Jersey	2 años	Tilarán	Negativo
2/217	Nelore	2 años	San Carlos	Negativo
008/2	Nelore	2 años	San Carlos	Negativo
Luisquito	Jersey	3 años	Monterrey	Negativo
Pando	Jersey	6 años	Monterrey	Negativo
739	Brahman	3.8 años	Aguas Zarcas	Negativo
93/4	Brahman	2.9 años	Aguas Zarcas	Negativo
El gyr	Gyrolando	4 años	San Carlos	Negativo
Sirano	Holstein	2.6 años	San Juan de Chicán	Negativo
Rómulo	Holstein	1.5 años	San Juan de Chicán	Negativo
337/9	Brahman	5 años	San Carlos	Negativo
769/7	Brahman	4 años	San Carlos	POSITIVO
659/7	Brahman	4 años	San Carlos	Negativo

0/027	Brahman	3 años	San Carlos	Negativo
793/7	Brahman	7 años	San Carlos	POSITIVO
LG 13-09	Jersey	5 años	Río Cuarto	POSITIVO
1697	Jersey	3.5 años	Río Cuarto	POSITIVO
1797	Jersey x Holstein x Pardo Suizo	2.5 años	Río Cuarto	POSITIVO
022/11	Brahman	2 años	Pocosol	Negativo
265/3	Holstein	2 años	Pocosol	Negativo
285/3	Holstein	2.5 años	Pocosol	Negativo
427/9	Gyr	3.5 años	Pocosol	Negativo
283/00	Brahman	2.5 años	Pocosol	Negativo